บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การงอกของละอองเรณูฟรีเซีย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ละอองเรณูฟรีเซีย 6 สายพันธุ์ คือ Gompey, Suzy, Calimero, Smarty, Fidelio, Popey
2. พู่กัน
3. แผ่นสไลด์
4. น้ำตาลซูโครส
5. หลอดแก้ว
6. กล่องพลาสติก
7. กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope

อาหารเหลวเลี้ยงละอองเกสร(อดิศร, 2539) ประกอบด้วย

Stock mineral solution

H_3BO_3	0.10 g.
$Ca\ NO_3.7H_2O$	0.30 g.
$MgSo_4.7H_2O$	0.20 g.
KNO_3	0.10 g.
น้ำ	100 ml.

Culture solution

Stock solution	1.0 ml.
น้ำตาลซูโครส	
น้ำ	9.0 ml.

ในการศึกษานี้ได้มีการศึกษา

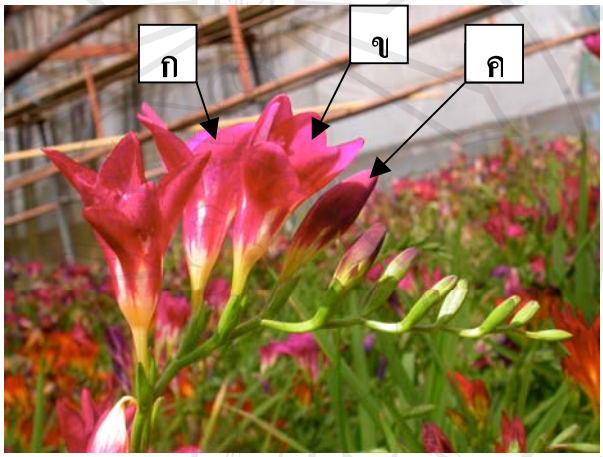
1. ช่วงระยะการบานของดอก ได้แก่ 1) ระยะดอกตูม
   2) ระยะดอกบาน 1 วัน
   3) ระยะดอกบาน 2-3 วัน
2. ระยะเวลาในการเก็บละอองเรณูทุกๆ 1 ชั่วโมงตั้งแต่เวลา 6.00 – 15.00 น.
3. ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 0, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.50, 1.00, และ 1.50 g. ต่อ culture solution 10 ml.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

1 เก็บละอองเรณู นำมาเคาะบนแผ่สไลด์ หยด culture solution

2 นำแผ่นสไลด์นั้นใส่ลงในกล่องที่มีความชื้น แล้วปิดฝา ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนำแผ่นสไลด์นั้นมาส่องดูการงอกของละอองเรณูทุกๆ 30 นาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสุ่มนับจำนวนละอองเรณูในแต่ละแผ่นสไลด์ 5 ตำแหน่ง ที่มีละอองเรณู ตั้งแต่ 20 อันขึ้นไป นำค่าที่ได้มาคำนวนเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย



ภาพ 3 ช่วงระยะการบานของดอกที่เก็บละอองเรณูมานับเปอร์เซ็นต์การงอก ระยะดอกตูม(ก) ระยะดอกบาน 1 วัน(ข) ระยะดอกบาน 2 – 3 วัน(ค)

การทดลองที่ 2 ความมีชีวิตของละอองเรณูฟรีเซีย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ละอองเรณูฟรีเซีย
2. พู่กัน
3. สไลด์
4. กระบอกตวงสาร ขนาด 50 ml
5. หลอดแก้ว
6. กล่องพลาสติก
7. แท่งแก้วคนสาร
8. ตะปูที่เป็นสนิม
9. บีกเกอร์ขนาด 100 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

10. เครื่องทำความร้อน
11. กระดาษกรอง
12. เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง
13. กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope
14. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีละอองเรณู

14.1 สี คาร์มีน (carmine)	1-2 กรัม
14.2 กรดกลาเซียล อซิติก(Glacial Acetic acid)	50 มิลลิลิตร
14.3 น้ำกลั่น	50 มิลลิลิตร

<u>การเตรียมสีย้อม</u>

เตรียมโดย นำกรดกลาเซียล อะซีติก(glacial acetic acid) ตั้งไฟให้เดือด ใส่สีคาร์มีน (carmine)ให้ละลายจนหมด ใส่ตะปูที่เป็นสนิม แกว่งสักครู่เพื่อช่วยให้สีเข้มขึ้น ประมาณ 10 นาที ยกลงจากเตาไฟ ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่น แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไป คนให้สีละลายเข้ากัน เมื่อเย็นแล้วกรองใส่ขวดสีชาปิดฝาเก็บในตู้เย็น

2.1 การเลือกละอองเรณู

คัดเลือกจากดอกที่บาน 2-3 วัน อับละอองเรณูเปิดออกเห็นละอองเรณูสีเหลือง

2.2 การย้อมสีละอองเรณู

ใช้พู่กันรวบรวมละอองเรณู มาวางบนแผ่นสไลด์ ใช้สีย้อมหยดลงบนละอองเรณู 1-2 หยด แล้วนำแผ่นสไลด์ไปวางในกล่องพลาสติกที่มีความชื้น ปิดฝากล่องพลาสติกป้องกันลม เพื่อไม่ให้แผ่นสไลด์แห้ง คอยสังเกตดูแผ่นสไลด์เป็นระยะ ถ้าแผ่นสไลด์แห้ง หยดสีย้อมลงบนละอองเรณูให้มีความเปียกชุ่มอยู่ตลอดเวลา นำแผ่นสไลด์มาตรวจสอบดูการติดสีย้อม ละอองเรณูที่มีชีวิตอยู่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การติดสีย้อมสามารถเห็นสีชมพูเข้มถึงแดง

2.3 การบันทึกข้อมูล

บันทึกจำนวนเรณูที่ติดสีย้อม นำข้อมูลคำนวนเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเฉลี่ย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 การศึกษาโครโมโซมของฟรีเซีย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ปลายรากฟรีเซีย
2. จานแก้ว (petri-dish)
3. กรรไกร
4. ปากคีบ
5. ขวดแก้วขนาดเล็กมีจุกปิดสำหรับใส่เนื้อเยื่อ
6. เข็มเขี่ย
7. ปากคีบ
8. หลอดหยด
9. สไลด์และแผ่นปิดสไลด์
10. หลอดทดลอง
11. น้ำยาทาเล็บชนิดใสสำหรับทาขอบแผ่นปิดสไลด์
12. กระดาษทิชชู
13. แผ่นป้าย (label), ปากกา
14. water bath
15. กระดาษเช็ดเลนส์
16. immersion oil
17. ฟิล์มสี เทอร์โมมิเตอร์
18. กล้องจุลทรรศน์ พร้อมอุปกรณ์การถ่ายภาพ
19. สารเคมีที่ใช้ศึกษาโครโมโซม

19.1. สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดการสร้างเส้นใย spindle (pre-treatment solution) สารละลายอิ่มตัว para dichlorobenzene (PDB)

19.2 สารเคมีสำหรับหยุดทำงานของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ (fixative solution) ประกอบด้วย แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ และ กลาเซียลอซีติก ในอัตราส่วน 3 : 1 โดยปริมาตร

19.3 สารเคมีสำหรับทำให้เซลล์แยกออกจากกัน (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (1N HCl)

19.4 สารเคมีที่ใช้ย้อมสีโครโมโซม คือ carbol fuchsin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

นำหัวพันธุ์ฟรีเซีย มาวางในรูบนแผ่นโฟมที่เจาะรูไว้ แล้วนำแผ่นโฟมไปวางในกล่องพลาสติกที่มีน้ำสูงประมาณ 2 นิ้ว วางไว้ที่มีแสง รอจนรากงอกให้มีความยาว 1-3 ซม. ตัดปลายนำไปใช้ศึกษาจำนวนโครโมโซม

<u>การเตรียมตัวอย่างปลายรากฟรีเซีย</u>

1. เตรียมปลายราก โดยตัดเฉพาะส่วนปลายมีสีขาวขุ่นที่กำลังเจริญเติบโตยาว 0.5 ซม. โดยเก็บในเวลา 9.30 น.
2. หยุดการเจริญของเส้นใยสปินเดิลของเซลล์โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย para dichlorobenzene เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที
3. รักษาสภาพเซลล์ นำรากออกมาจากสารละลาย para dichlorobenzene ล้างน้ำให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำรากไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที จากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่น
4. นำรากออกจากน้ำยารักษาสภาพเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ใน 1 N HCl ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 °ซ นานประมาณ 5 นาที
5. นำรากออกจาก 1N HCl ล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด แล้วนำไปย้อมสี carbol fuchsion ที่อุณหภูมิ 15-18 °ซ นาน 24 ชม.
6. นำราก จากข้อ 5 ใช้เข็มเขี่ยตัดเอาเฉพาะส่วนของปลายรากยาวประมาณ 1 มม. แล้วหยดสี carbol fuchsion 1 หยด ตรงบริเวณที่ปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อปลายรากให้แยกออกเป็นชิ้นเล็กๆ ปิดแผ่นสไลด์ ใช้กระดาษซับวางบนแผ่นสไลด์ บริเวณที่ปิดแผ่นสไลด์ กดนิ้วบนกระดาษให้เซลล์กระจาย และเป็นการซับสีที่มากเกินไป
7. นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส โดยเลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายไม่ทับกัน นับจำนวนโครโมโซม และทำการบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 4 การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของฟรีเซีย

วัสดุและอุปกรณ์

1. หัวพันธุ์ฟรีเซีย 6 สายพันธุ์ คือ Suzy, Fidelio, Smarty, Popey, Gompey, Calimero
2. พู่กัน
3. ผ้าตาข่ายบางสีขาว
4. แผ่นป้าย

5. แอลกอฮอล์
6. กระบะเพาะ
7. วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ ขุยมะพร้าว แกลบเผา ดินร่วน อัตราส่วน 1 : 1 : 2
8. ถุงดำปลูก ขนาด 4 × 6 นิ้ว
9. ปุ๋ยออสโมโค้ทสูตร 14 : 14 : 14
10. ลวด
11. ปากคีบ
12. กาวดักแมลง
13. แผ่นผลาสติกสีเหลือง
14. คีมตัดลวด
15. ทราย
16. แกลบเผา
17. ขุยมะพร้าว

ภาพ 4 สายพันธุ์ฟรีเซีย ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

1.1 การผสมพันธุ์

<u>การเตรียมดอกที่ใช้เป็นต้นแม่</u>

ดอกที่ใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ คัดเลือกดอกที่สมบูรณ์ ใช้คีมดึงเกสรตัวผู้ออกซึ่งในแต่ละดอกมีเกสรตัวผู้ 2-4 ดอก จากนั้นคลุมถุงตาข่ายบาง บนโครงลวดดัด ที่ครอบต้นไว้ เพื่อป้องกันไม่ให้ดอกได้รับความเสียหายจากถุงที่ครอบ

ภาพ 5 ดอกต้นแม่พันธุ์ที่ดึงเกสรตัวผู้ออก

<u>การเตรียมดอกที่ใช้เป็นต้นพ่อ</u>

คลุมดอกด้วยถุงตาข่ายบาง ขณะดอกที่ยังตูมอยู่ รอจนกว่า อับละอองเรณูแตกออกเห็นละอองเรณูสีเหลือง

ภาพ 6 ลักษณะละอองเรณูที่ใช้ในการผสมพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 วิธีการผสมพันธุ์

ใช้พู่กันรวบรวมละอองเรณูที่แก่เต็มที่เวลาเก็บที่เหมาะสม 9.00 - 12.00 น.ใส่ในภาชนะแล้วนำละอองไปแตะบนยอดเกสรตัวเมียที่พร้อมรับการผสมโดยสังเกตุได้จากปลายยอดเกสรแยกออกเป็นแฉก มี 3-4 แฉก และมีน้ำเหนียวใส หลังจากถ่ายละอองเรณูแล้วบันทึกคู่ผสมและวันที่ผสมพร้อมกับใช้ถุงตาข่ายครอบไว้เพื่อป้องกันการผสมซ้ำ หลังจากนั้น ประมาณ 7 วัน สังเกตดู ที่บริเวณรังไข่ถ้ามีการผสมเกิดขึ้น ส่วนของรังไข่มีการขยายออกเป็นฝัก หลังจากมีการถ่ายละอองเรณู 30- 45 วัน ฝักของฟรีเซีย เริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวมาเป็นสีน้ำตาล จึงทำการเก็บฝักและนำเมล็ดไปเพาะต่อไปได้

ก

ข

ภาพ 7 ก) ขั้นตอนการถ่ายละอองเรณู ข) คลุมต้นด้วยตาข่ายขาวบางหลังจากถ่ายละอองเรณู

1.3 การเพาะเมล็ด

นำเมล็ดที่เก็บมาเก็บไว้ ให้พ้นระยะพักตัว ประมาณ 1 เดือน โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง มาเพาะในกระบะเพาะเมล็ด โดยใช้วัสดุทรายร่อน ขุยมะพร้าวร่อน แกลบเผา ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 ที่มีแสงแดดรำไร รดน้ำสม่ำเสมอ

1.4 การปลูกและการดูแลรักษา

เมื่อต้นกล้ามีใบจริง 2-3 ใบ ย้ายลงถุงดำ ขนาด 4 × 6 นิ้ว โดยปลูกในวัสดุปลูกที่มี ขุยมะพร้าว แกลบเผา ดินร่วน ในอัตราส่วน 1 : 1 : 2 ดูแลรดน้ำอย่างสม่ำเสมอไม่ให้ดินแห้ง ให้ปุ๋ยออสโมโค้ท 14 : 14 : 14 และใช้กาวดักจับแมลงที่อาจมารบกวนต้นไม้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 8 ต้นฟรีเซียปลูกลงถุง ขนาด 4 × 6 นิ้ว

1.5 การบันทึกข้อมูล

1.5.1 จำนวนเมล็ดที่ได้

1.5.2 ความงอกของเมล็ด

1.5.3 จำนวนดอก

1.5.4 ความยาวก้านช่อดอก

1.5.5 ระยะเวลาการบานของดอก

1.5.6 ลักษณะสีของกลีบดอก

เวลาดำเนินงานทดลอง

พฤศจิกายน 2545 – มีนาคม 2547

สถานที่ดำเนินการทดลอง

สถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์(ขุนกลาง) อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved