

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิง

ทำการเก็บรวบรวมกล้วยไม้สกุลม้าวิงในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง ครอบคลุม 5 จังหวัด ได้แก่ สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี และอำนาจเจริญ และรวบรวมในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ครอบคลุม 5 จังหวัด ได้แก่ เลย ร้อยเอ็ด สกลนคร กาฬสินธุ์ มุกดาหาร ทำการเก็บรวบรวมในช่วงฤดูออกดอก ประมาณเดือนมิถุนายน ถึงเดือนตุลาคม จำนวน 15 ครั้ง จากนั้นนำต้นมาปลูกเลี้ยงในโรงเรือนเพาะชำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี บันทึกภาพลักษณะต้นและดอกเพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลในการวิจัยของโครงการย่อยที่ 1 2 และ 3 ต่อไป

2. การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิง

2.1 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิงในสภาพปลอดเชื้อ

ศึกษาโครโมโซมจากปลายรากอ่อนของต้นกล้วยไม้สกุลม้าวิงสายพันธุ์แดงอุบล ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เลือกรากที่กำลังมีการเจริญโดยสังเกตจากรากที่มีสีเขียวใสและปลายรากมีสีขาวขุ่นเล็กน้อย ขั้นตอนศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างรากโดยทำการเก็บตัวอย่างปลายรากอ่อนในเวลา 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 11.00, และ 12.00 น. และศึกษาเวลาที่เหมาะสม โดยเก็บปลายรากอ่อนในเวลา 9.15, 9.30 และ 9.45 น. ทำการตัดส่วนปลายของรากมา 1-2 มิลลิเมตร แล้วหยุดวงซีพของเซลล์เนื้อเยื่อปลายรากในสารละลาย 8- hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M เป็นเวลานาน 3-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แล้วเท 8- hydroxyquinoline ออก ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จากนั้นตรึงเซลล์ในน้ำยาคาร์นอย (Carnoy's solution) สูตรดัดแปลงโดย Kamemoto *et al.*, 1961 แล้วแช่ในตู้เย็น อ่างน้อย 1 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 1 เดือน เพื่อให้สภาพโครโมโซมคงที่ ล้างปลายรากให้สะอาดก่อนนำไปย่อยแยกเซลล์ใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที ล้างน้ำ 4-5 ครั้ง เก็บตัวอย่างรากในกรดน้ำส้ม 45 % อย่างน้อย 1 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 1 เดือน นำปลายรากวางบนแผ่น slide ตัดเฉพาะปลายรากยาวประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร (ต้องเขียนหวกราก root cap ออกเสียก่อน) หยดสี orcein 1-2 หยด แล้วใช้ปลายเข็มเขี่ยแยกเซลล์ของปลายรากออกจากกันให้มากที่สุดแล้วทิ้งไว้ 5-10 นาทีในกล่องขึ้นซึ่งอ้อมตัวด้วยโอกรดน้ำส้ม 45 % เพื่อให้โครโมโซมติดสี นำแผ่น slide มาปิดด้วย cover slip แล้วผ่านเปลวไฟจากตะเกียง alcohol พออุ่นวาง slide บนแผ่นกระดาษซับใช้แผ่นกระดาษซับอีกแผ่นวางทับด้านบน ใช้นิ้วหัวแม่มือค่อยวางบนกระดาษซับกดลงไปแนวตั้งฉากเพื่อให้เซลล์แบนที่สุดเท่าที่จะทำได้ ซับสีส่วนเกินออก นำแผ่น slide ไปศึกษาเซลล์ปลายรากใต้กล้องจุลทรรศน์เลือกเซลล์ที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟส นับจำนวนโครโมโซม แล้วบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมคือ 9.15 น. แล้วจึงทำการศึกษาความยาวนานในการหยุดวงซีพเซลล์ ด้วยสารละลาย 8- hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M นาน 1, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ตามด้วยขั้นตอนต่างๆในการศึกษาโครโมโซมปลายรากดังที่กล่าวมาข้างต้น

2.2 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิงในสภาพแปลง

ศึกษาโครโมโซมจากปลายรากอ่อนของต้นกล้วยไม้สกุลม้าวิงสายพันธุ์แดงอุบล ม้าวิง และม้าบิน ที่อยู่ในสภาพแปลง เลือกรากที่กำลังมีการเจริญโดยสังเกตจากรากที่มีสีเขียวใสและปลายรากมีสีขาว ชุ่มเล็กน้อย ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างรากโดยทำการเก็บตัวอย่างปลายรากอ่อนในช่วงเวลา 8.00 น. ถึง 10.00 น. ทำการตัดส่วนปลายของรากมา 1-2 มิลลิเมตร แล้วหยดวุ้นซีพของเซลล์ เนื้อเยื่อปลายรากในสารละลาย 8- hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M เป็นเวลานาน 3-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำตามวิธีการเช่นเดียวกับการศึกษาโครโมโซมปลายรากที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ และทำการศึกษาคำนวณโครโมโซมจากเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในระยะ metaphase จำนวน 10 เซลล์

2.3 การใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์เพื่อศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิง

การใช้เอนไซม์ช่วยในการย่อยผนังเซลล์ก่อนทำการศึกษาโครโมโซมก็เป็นอีกวิธีหนึ่ง เนื่องจากผนังเซลล์เป็นโครงสร้างที่สำคัญของเซลล์พืชมีหน้าที่ทำให้เซลล์คงรูปร่างอยู่ได้ (สมบุญ, 2548) ส่วนชนิดของเอนไซม์และความเข้มข้นที่ใช้จะแตกต่างกันตามชนิดพืชที่ศึกษา เช่น การศึกษาโครโมโซมในสตรอเบอร์รี่ได้ย่อยผนังเซลล์ด้วย enzyme mixture ที่ประกอบด้วย (4% cellulose, 0.3% pectolyase, 2.1% macerozyme และ 1mM (EDTA) (Preeda *et al.*, 2007) และใน *Crotalaria juncea* L. ก่อนที่จะทำการศึกษาก็ย่อยตัวอย่างใน mixture (2% cellulase, 0.3% pectinase ใน citrate buffer) (Mondin *et al.*, 2006) ดังนั้นในการศึกษาจึงควรมีการเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมกับชนิดของพืช ในงานวิจัยครั้งนี้ได้มีการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์รวมถึงระยะเวลาในการแช่ตัวอย่างใน enzyme solution ที่เหมาะสมในการย่อยผนังเซลล์เพื่อศึกษารูปร่างและลักษณะของโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลม้าวิง

2.3.1 ศึกษาชนิดน้ำยาในการตรึงเซลล์ (fixative) และระยะเวลาการแช่ enzyme solution

พืชทดลองที่นำมาศึกษาคือกล้วยไม้แดงอุบลที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างปลายรากที่มีการเจริญเติบโตดี ยาวประมาณ 1-2 ซม. ที่เวลา 9.15 น. แช่ในสารละลาย 8 - hydroxyquinoline ที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C เป็นเวลา 4 ชม. ศึกษาในน้ำยาในการตรึงเซลล์ 2 ชนิด นำรากมา fixed ในน้ำยาคาร์นอย (Carnoy's solution) สูตรดัดแปลง (Kamemoto *et al.*, 1961) ที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C เป็นเวลา 24 ชม. หรือนำรากมา fixed ในสารที่ประกอบด้วย absolute ethanol และ acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 ที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C เป็นเวลา 24 ชม. ล้างรากด้วย 95% ethyl alcohol และเก็บรากไว้ใน 70 % ethyl alcohol หลังจากนั้นนำรากที่ตรึงในน้ำยาทั้ง 2 ชนิดมาย่อยผนังเซลล์โดยใช้ enzyme solution ที่ประกอบด้วย 2% cellulase, 0.3% pectinase, 9.1g sorbitol (0.5 M) และ 5 mM CaN₂O₆·4H₂O ปรับ pH 5 แช่ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6, 12, และ 24 ชม. จากนั้นล้างรากด้วยน้ำ ตัดเฉพาะปลายรากวางบนแผ่นสไลด์ และย้อมสีรากด้วย orcein 1-2 หยด ใช้ปลายเข็มเขี่ยแยกเซลล์ของปลายรากออกจากกันให้มากที่สุดแล้วทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที นำแผ่นสไลด์ มาปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วผ่านเปลวไฟจากตะเกียง alcohol พออุ่น วางแผ่นสไลด์บนแผ่นกระดาษซับใช้แผ่นกระดาษซับอีกแผ่นวางทับด้านบน ใช้นิ้วหัวแม่มือค่อยวางบนกระดาษซับกดลงไป ในแนวตั้งฉากเพื่อให้เซลล์แบนที่สุดเท่าที่จะทำได้ ซับสีส่วนเกินออก นำแผ่นสไลด์ ไปศึกษาเซลล์ปลาย

รากไต้กลิ้งจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในระยะเมตาเฟสและโครโมโซมมีการกระจายตัวดี เปรียบเทียบรูปร่างโครโมโซมและลักษณะของเซลล์ในน้ำยาทั้ง 2 ชนิดและช่วงระยะเวลาการแช่ enzyme solution ที่แตกต่างกัน

2.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ ต่อการกระจายตัวของโครโมโซม

เก็บตัวอย่างปลายรากที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อที่เวลา 9.15 น. นำปลายรากไป pretreatment ด้วยสารละลาย 8- hydroxyquinoline เพื่อหยุดวงซัพจักรของเซลล์ เป็นเวลา 4 ชม. จากนั้นนำตัวอย่างปลายรากตรึงเซลล์ ด้วยน้ำยา Carnoy's solution เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. แต่ไม่เกิน 1 เดือน ศึกษาความเข้มข้นของ enzyme คือ cellulase 2% + pectinase 0.6% และ cellulase 4% + pectinase 0.3% โดยสารอื่นๆที่เป็นองค์ประกอบของ enzyme solution คือ sorbitol และ $\text{CaN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ มีความเข้มข้นเท่ากัน แช่ตัวอย่างใน enzyme solution นาน 12 ชม. ย้อมสีรากด้วย orcein 1-2 หยด นาน 5-10 นาที แล้วนำมาศึกษาโครโมโซมด้วยวิธี Squash method เช่นเดียวกับการศึกษาการตรึงเซลล์

2.4 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลสปลายรากกล้วยไม้แดงอุบลด้วยเทคนิค

Feulgen

ในการศึกษาลักษณะของโครโมโซม นอกจากการ pretreatment ที่ทำให้โครโมโซมหดตัวสั้นที่สุด เพื่อง่ายต่อการศึกษาแล้ว ขั้นตอนที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือ การย้อมสี เพื่อทำให้เห็นรูปร่างและลักษณะของโครโมโซมได้อย่างชัดเจน และเทคนิค Feulgen ที่ใช้การย้อมสีโครโมโซมด้วย Leuco-basic fuschin ก็เป็นเทคนิคหนึ่ง ที่สีม่วงจะติดเฉพาะนิวเคลียสของเซลล์ ส่วนของไซโตพลาสซึมจะมีลักษณะใส เมื่อนำเซลล์ปลายรากที่อยู่ในระยะที่ต้องการศึกษาย้อมสีนี้ ก็จะทำให้เห็นลักษณะของโครโมโซมชัดเจนขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาโครโมโซมด้วยเทคนิคนี้ ระยะเวลาของการไฮโดรไลสจะมีความสำคัญต่อการติดสี ซึ่งในพืชแต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันออกไป ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาระยะเวลาของการไฮโดรไลสที่เหมาะสมของกล้วยไม้สกุลมาว้าง

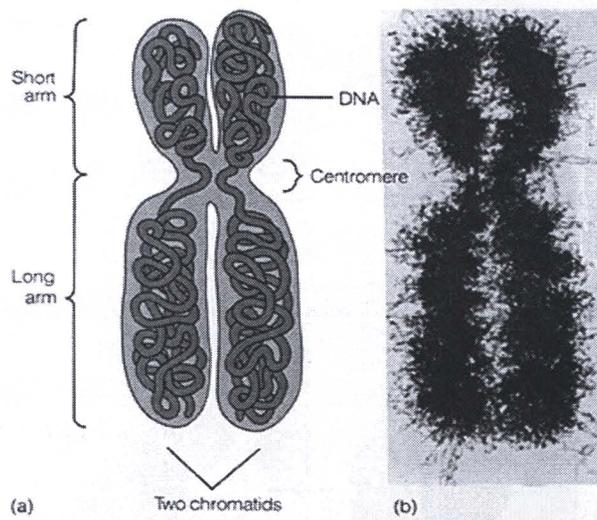
วิธีการทดลอง

เก็บตัวอย่างปลายรากที่กำลังมีการเจริญเติบโต ของกล้วยไม้แดงอุบลที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อที่เวลา 9.15 น. หลังจากนั้นก็นำปลายรากที่เก็บไปหยุดวงซัพจักรของเซลล์ในสารละลาย 8 - hydroxyquinoline ที่อุณหภูมิประมาณ 10°C เป็นเวลา 4 ชม. ก่อนที่จะนำไปเก็บในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ ที่ประกอบด้วย absolute ethanol และ acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 ที่อุณหภูมิประมาณ 10°C เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชม. แต่ไม่เกิน 1 เดือน จากนั้นนำปลายรากมาไฮโดรไลสด้วยกรดเกลือ 1 N ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที และเก็บใน 45% กรดอะซิติก อย่างน้อย 1 ชม. จากนั้นแช่ใน Leuco-basic fuschin ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชม. ปลายรากที่ได้จะติดสีม่วงเข้ม แล้วล้างปลายรากด้วยน้ำประปาเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำปลายรากวางบนสไลด์ ตัดปลายรากเฉพาะส่วนที่ติดสีม่วงเข้ม หยด 50% กรดอะซิติก 1 หยด ใช้ปลายเข็มแยกเซลล์ของปลายรากออกจากกันให้มากที่สุด แล้วนำแผ่นสไลด์ มาปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ผ่านเปลวไฟจากตะเกียง alcohol พออุ่น วางแผ่นสไลด์บนแผ่นกระดาษซับใช้แผ่นกระดาษซับอีกแผ่นวางทับด้านบน ใช้นิ้วหัวแม่มือหรือปลายดินสอเคาะเบาๆบน

กระดาดำซับนในแนวตั้งฉากเพื่อให้เซลล์แบนที่สุดเท่าที่จะทำได้ ซับสีส่วนเกินออก ศึกษาเซลล์ปลายราก ภายใตกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการติดสีที่ระยะเวลาการไฮโดรไลสที่แตกต่างกัน

2.5 การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ป่าบิน

ในการศึกษารูปร่างหรือลักษณะของโครโมโซม ระยะการแบ่งเซลล์ที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษาคือ ระยะเมทาเฟส ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ซึ่งรูปร่างของโครโมโซมก็จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความยาวของโครโมโซมและตำแหน่งของเซนโตรเมียร์ ซึ่งมี 4 แบบ คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่ตรงกลาง (metacentric) อยู่เกือบตรงกลาง (submetacentric) อยู่ค่อนข้างไปทางปลายแท่ง (acrocentric) และอยู่ตรงปลายแท่งของโครโมโซม (telocentric) (ภาพที่ 1 และ 2)

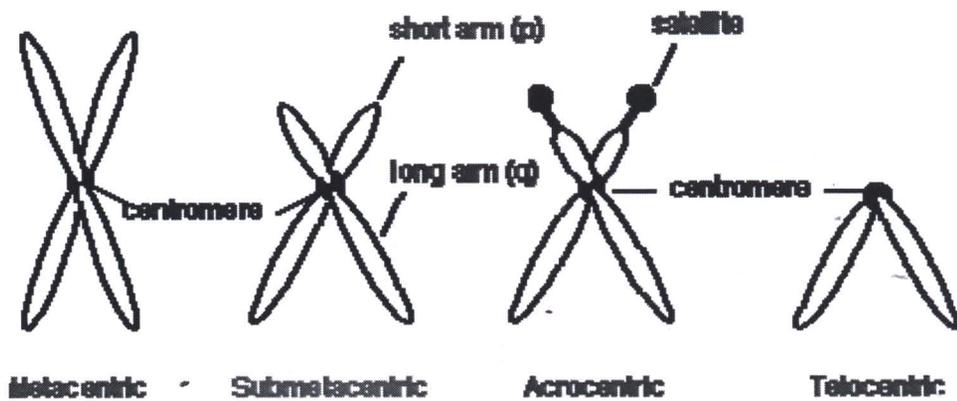


ภาพที่ 1 รูปร่างของโครโมโซม

ที่มา : www.copernicusproject.ucr.edu/.../chromosome.gif



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดวิจัย
วันที่.....-8.10.2556.....
เลขทะเบียน.....245685.....
เลขเรียกหนังสือ.....



ภาพที่ 2 ตำแหน่งของเซนโตรเมียร์

ที่มา : www.sc.chula.ac.th/.../text3/subtext3/a_3-1.gif

วิธีการทดลอง

เก็บตัวอย่างปลายรากที่กำลังมีการเจริญเติบโต ของกล้วยไม้ม้าบินที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเวลาที่ใช้เก็บตัวอย่างคือเวลา 9.30 น. หลังจากนั้นก็นำปลายรากที่เก็บไปหยุดวงซีพจักรของเซลล์ในสารละลาย 8 - hydroxyquinoline ที่อุณหภูมิประมาณ 10°C เป็นเวลา 4 ชม. ก่อนที่จะนำไปเก็บในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ ที่ประกอบด้วย absolute ethanol และ acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 ที่อุณหภูมิประมาณ 10°C เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชม. แต่ไม่เกิน 1 เดือน จากนั้นนำปลายรากมาไฮโดรไลส์ด้วยกรดเกลือ 1 N ที่อุณหภูมิ 60°C ประมาณ 2-3 นาที เพื่อให้ปลายรากอ่อนนุ่ม และเก็บใน 45% กรดอะซิติก อย่างน้อย 1 ชม. นำปลายรากวางบนสไลด์ ตัดเฉพาะปลายราก ย้อมสีรากด้วย orcein 1-2 หยด ใช้ปลายเข็มเขี่ยแยกเซลล์ของปลายรากออกจากกันให้มากที่สุดแล้วทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที ใน 45% กรดอะซิติกที่อมตัว เพื่อช่วยในการติดสี แล้วนำแผ่นสไลด์ มาปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ผ่านเปลวไฟจากตะเกียง alcohol พออุ่น วางแผ่นสไลด์บนแผ่นกระดาษซับใช้แผ่นกระดาษซับอีกแผ่นวางทับด้านบนใช้นิ้วหัวแม่มือหรือปลายดินสอเคาะเบาๆบนกระดาษซับในแนวตั้งฉากเพื่อให้เซลล์แบนที่สุดเท่าที่จะทำได้ ซับสีส่วนเกินออก นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาเซลล์ปลายรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส

2.6 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจากดอกอ่อนและระยะการแบ่งเซลล์แบบ

meiosis

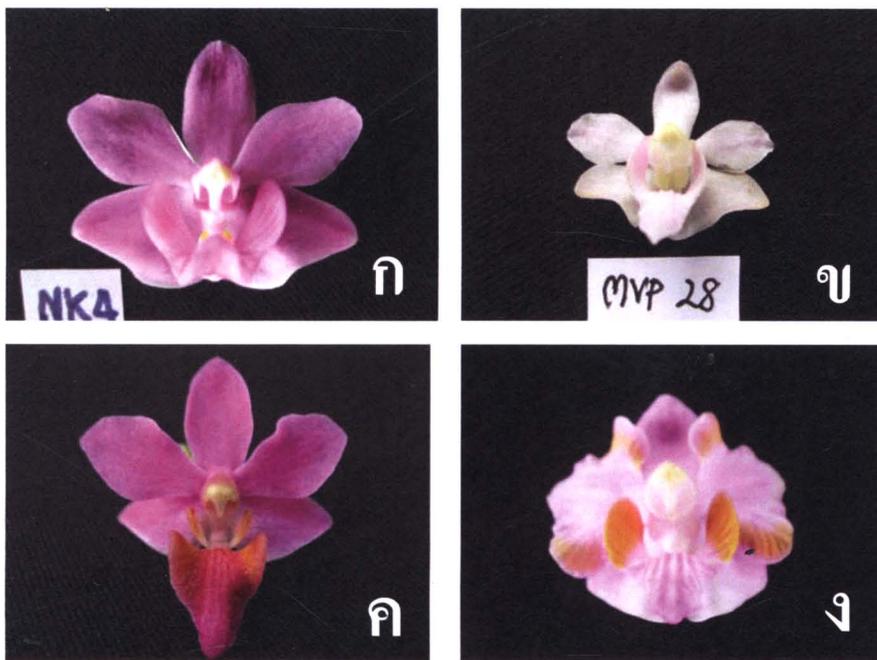
เลือกดอกตูมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งทั้งสายพันธุ์แดงอุบล ม้าวิ่ง และม้าบิน ที่มีขนาดประมาณ 1 ใน 4 ของดอกตูมใกล้บาน ฝาดอกและแกะก้อนเรณู (pollinia) จำนวนเล็กน้อยวางบน slide หยด acetic acid 45% ที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 5 นาที ซับกรด acetic acid ออกแล้วย้อมด้วยสี orcein 1-2 หยด เป็นเวลา 2-3 นาที ปิด cover slip แล้วให้ความร้อน หลังจากนั้นใช้ปลายดินสอเคาะเบาๆ เพื่อให้โครโมโซมกระจายตัว ซับสีส่วนเกินออก เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะ diakinesis เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม และบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การศึกษาพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวีงและพันธุ์ลูกผสม

การศึกษาพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญในด้านของการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเป็นการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งจะแสดงลักษณะหรือพฤติกรรมการเข้าสู่ของโครโมโซมในระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์ เป็นการศึกษาที่แสดงถึงความสัมพันธ์ทางด้านพันธุศาสตร์ของต้นพ่อและต้นแม่ที่ทำการผสม อีกทั้งยังสามารถอธิบายสาเหตุความเป็นหมันและคาดคะเนจำนวนโครโมโซมในลูกผสมรุ่นต่อไปได้ (Kamemoto *et al.*, 1961)

วิธีการศึกษา

เลือกดอกตูมของกล้วยไม้สกุลม้าวีงสองสายพันธุ์คือแดงอุบล ม้าวีง ส่วนพันธุ์ลูกผสมที่ใช้ในการทดลอง 2 พันธุ์คือ แดงอุบล x ม้าวีงบลู และ ม้าบิน x แดงอุบล (ดังแสดงในภาพที่ 3) ที่มีขนาดดอกประมาณ 1 ใน 4 ของดอกตูมใกล้บาน ทำการผ่าดอกและแกะก้อนเรณู (pollinia) จำนวนเล็กน้อยวางบน slide หยด acetic acid 45% ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 5 นาที ซับกรด acetic acid ออกแล้วย้อมด้วยสี orcein 1-2 หยด เป็นเวลา 2-3 นาที ปิด cover slip แล้วให้ความร้อน หลังจากนั้นใช้ปลายดินสอเคาะเบาๆเพื่อให้โครโมโซมกระจายตัว ซับสีส่วนเกินออก เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะ diakinesis เพื่อศึกษาลักษณะการเข้าสู่ของโครโมโซม (univalent, bivalent, trivalent และ quadrivalent) และความผิดปกติที่เกิดขึ้นในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในระยะ anaphase I และ telophase I แล้วบันทึกภาพได้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 3 กล้วยไม้สกุลม้าวีงและสายพันธุ์ลูกผสม

(ก) กล้วยไม้แดงอุบล

(ข) กล้วยไม้ม้าวีง

(ค) กล้วยไม้ลูกผสม (แดงอุบล x ม้าวีงบลู)

(ง) กล้วยไม้ลูกผสม (ม้าบิน x แดงอุบล)

4. การสร้าง sporad ของกล้วยไม้สกุลม้าวิงและพันธุ์ลูกผสม

การศึกษาการสร้าง sporad หรือ sporogenesis เป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ Swanson (1957) ได้รายงานว่ ต้นไม้ที่มีการสร้าง sporad ที่ผิดปกติมักจะมี ความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ โดยปกติ micropore ของกล้วยจะอยู่ในระยะ 4 เซลล์หรือที่เรียกว่า tetrad จะมีรูปร่างแตกต่างกัน (ศิริพร, 2546) ซึ่งจะแสดงถึงระดับของความสมบูรณ์พันธุ์ในลูกผสม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ มีการศึกษาลักษณะการสร้าง sporad ของกล้วยไม้สกุลม้าวิงและพันธุ์ลูกผสม

วิธีการศึกษา

เลือกดอกตูมของกล้วยไม้สกุลม้าวิงสองสายพันธุ์คือแดงอุบล ม้าวิง ส่วนพันธุ์ลูกผสมที่ใช้ในการ ทดลอง 2 พันธุ์คือ แดงอุบล x ม้าวิงบลู และ ม้าบิน x แดงอุบล (ดังแสดงในภาพที่ 1) ที่มีขนาดดอก ประมาณ 1 ใน 4 ของดอกตูมใกล้บาน ทำการผ่าดอกและแกะก้อนเรณู (pollinia) จำนวนเล็กน้อยวางบน slide หยด acetic acid 45% ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 5 นาที ซับกรด acetic acid ออกแล้วย้อม ด้วยสี orcein 1-2 หยด เป็นเวลา 2-3 นาที ปิด cover slip แล้วให้ความร้อน หลังจากนั้นใช้ปลายดินสอ เคาะเบาๆเพื่อให้โครโมโซมกระจายตัว ซับสีส่วนเกินออก ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 1000 เท่า ทำการตรวจนับลักษณะ sporad formation ประมาณ 300 sporad / PMCs และหาค่าเฉลี่ย sporad formation ที่พบในแต่ละพันธุ์