

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาความสามารถในการผสมข้ามสกุลย่อยของกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิด แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 การศึกษาพื้นฐานวิทยาและช่วงเวลาการออกดอกของกล้วยไม้รองเท้านารี การทดลองที่ 2 การผสมพันธุ์และการติดฝัก และการทดลองที่ 3 จำนวนเมล็ดที่สมบูรณ์จากฝักกล้วยไม้รองเท้านารีที่ผสมติด

การทดลองที่ 1 พื้นฐานวิทยาและช่วงเวลาการออกดอกของกล้วยไม้รองเท้านารี

1. วัสดุอุปกรณ์

- 1.1 ชนิดกล้วยไม้รองเท้านารีที่ใช้ในการทดลอง ทั้ง 6 สกุลย่อย สกุลย่อยละ 3 ชนิด ดังนี้ (ภาพที่ 20)

1.1.1 สกุลย่อย *Brachypetalum* ใช้ *P. bellatulum*, *P. concolor* และ *P. niveum*

1.1.2 สกุลย่อย *Cochlopetalum* ใช้ *P. liemianum*, *P. moquettianum* และ *P.*

primulinum

1.1.3 สกุลย่อย *Paphiopedilum* ใช้ *P. charlesworthii*, *P. spicerianum* และ *P. villosum*

1.1.4 สกุลย่อย *Parvisepalum* ใช้ *P. delenatii*, *P. jackii* และ *P. micranthum*

1.1.5 สกุลย่อย *Polyantha* ใช้ *P. dianthum*, *P. philippinense* และ *P. rothschildianum*

1.1.6 สกุลย่อย *Sigmatopetalum* ใช้ *P. appletonianum*, *P. callosum* และ *P. sukhakulii*

- 1.2 เครื่องปลูก ได้แก่ เปลือกไม้ รากเฟินชายผ้าสีดาที่ตายแล้ว หินภูเขาไฟไฮโดรตรอนที่

แตก

แล้ว และสารเคมีในการปลูกเลี้ยง ได้แก่ ปุ๋ยน้ำสูตร 16-16-16 และสารเคมีเร่งราก

- 1.3 อุปกรณ์ในการบันทึกข้อมูล ได้แก่ ไม้บรรทัด สายวัด มีดผ่าตัด กรรไกร กล้องถ่ายภาพดิจิทัล สมุดบันทึก และปากกา



ภาพที่ 20 กล้วยไม้รองเท้านารี 18 ชนิด สกุลย่อย *Brachypetalum*: ก) *P. bellatulum*; ข) *P. concolor*; ค) *P. niveum*; สกุลย่อย *Cochlopetalum*: ง) *P. liemianum*; จ) *P. moquettianum*; ฉ) *P. primulinum*; สกุลย่อย *Paphiopetalum*: ช) *P. charlesworthii*; ฌ) *P. spicerianum*; ฎ) *P. villosum*; สกุลย่อย *Parvisepalum*: ฐ) *P. delenatii*; ฑ) *P. jackii*; ค) *P. micranthum*; สกุลย่อย *Polyantha*: ล) *P. dianthum*; ฌ) *P. philippinense*; ฌ) *P. rothschildianum*; สกุลย่อย *Sigmatopetalum*: น) *P. appletonianum*; ป) *P. callosum*; ฟ) *P. sukhakulii*

2. วิธีการทดลอง

2.1 วิธีการดูแลและการปลูกเลี้ยง

ปลูกกล้วยไม้รองเท้านารีสกุลย่อย *Brachypetalum* โดยใช้เครื่องปลูกที่ประกอบด้วย เปลือกไม้:หินภูเขาไฟ:ไฮโดรตรอนที่แตก อัตราส่วน 1:1:1 สกุลย่อย *Cochlopetalum* และ *Polyantha* ใช้เครื่องปลูกที่ประกอบด้วย เปลือกไม้:หินภูเขาไฟ :ไฮโดรตรอนที่แตก:รากเฟินชายผ้าสีดา อัตราส่วน 1:1:1:1 สกุลย่อย *Paphiopetalum* *Parvisepalum* และ *Sigmatopetalum* ใช้เครื่องปลูกที่ประกอบด้วย เปลือกไม้:หินภูเขาไฟ:ไฮโดรตรอนที่แตก:รากเฟินชายผ้าสีดาที่ตายแล้ว อัตราส่วน 2:1:1:2 รดน้ำสัปดาห์ละสองครั้งในช่วงเช้าของวันพุธและวันอาทิตย์ โดยรดจนชุ่มโชกและใช้ปุ๋ยน้ำสูตร 16-16-16 ปริมาณ 15 มิลลิลิตรและสารเคมีเร่งรากปริมาณ 5 มิลลิลิตรผสมกันในน้ำ 20 ลิตร รดทั่วทั้งต้นและใบ สัปดาห์ละหนึ่งครั้ง ปลูกเลี้ยงภายในโรงเรือนที่มีการพรางแสง 70% และมีหลังคาพลาสติกกันฝน

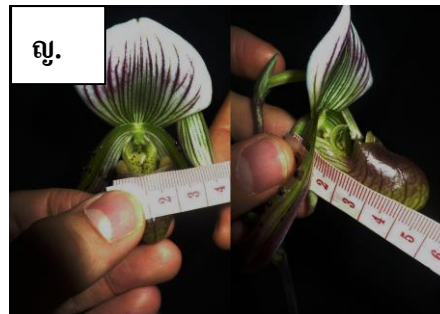
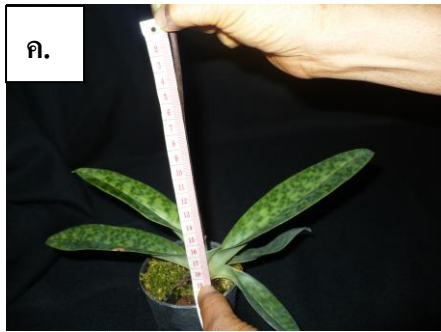
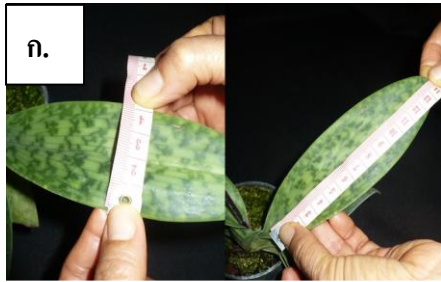
2.2 วิธีการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา

บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของส่วนประกอบของต้นกล้วยไม้รองเท้านารี ได้แก่ ใบ ก้านช่อดอก ก้านดอกย่อย กลีบเลี้ยง กลีบดอก กลีบปาก และ ศึกษานินคพร้อมทั้งบันทึกภาพลักษณะขนบนก้านดอก ก้านดอกย่อย กลีบเลี้ยง และกลีบดอก โดยบันทึกจากต้นตัวอย่างที่ส่วนต่างๆ เจริญเต็มที่และให้ดอกจำนวน 5 ต้น เพื่อคำนวณค่าเฉลี่ย และบันทึกช่วงเวลาที่เกิดกล้วยไม้รองเท้านารีออกดอก

2.2.1 บันทึกภาพและขนาดของส่วนประกอบของต้น (ภาพที่ 21) ดังนี้

- ใบ บันทึกภาพหน้าใบและหลังใบ วัดขนาดความกว้างใบ ความยาวใบ และจำนวนใบ

- **ต้น** บันทึกภาพลักษณะสีของโคนใบบริเวณต้น
- **ช่อดอก** บันทึกภาพลักษณะสีก้านดอก ขนบนก้านดอก และวัดความยาวของก้านช่อดอก
- **ก้านดอกย่อย (pedicel)** บันทึกภาพลักษณะสีของก้านดอกย่อย ขนบนก้านดอกย่อย และวัดความยาวของก้านดอกย่อย
- **ดอก** บันทึกภาพลักษณะดอกด้านหน้า ด้านข้าง ด้านบน พร้อมทั้งวัดขนาดความกว้างเมื่อดอกบานเต็มที่ในแนวระนาบและความกว้างดอกในแนวตั้ง
- **กลีบเลี้ยง** บันทึกภาพลักษณะสีของกลีบเลี้ยงบน(dorsal sepal) และกลีบเลี้ยงล่าง (synsepal) ขนบนกลีบเลี้ยง และวัดความกว้าง และความยาวของกลีบเลี้ยง
- **กลีบดอก** บันทึกภาพลักษณะสีของกลีบดอก ขนบนกลีบดอก จุดไฝบนกลีบดอกและวัดความกว้าง และความยาวของกลีบดอก
- **กลีบปาก** บันทึกภาพลักษณะสีของกลีบปาก พร้อมทั้งวัดขนาดความกว้าง และความยาวของกลีบปากหรือกระเปาะ
- **สตามิโนด (staminode)** บันทึกภาพลักษณะของสตามิโนด พร้อมทั้งวัดขนาดของสตามิโนด
- **ช่วงเวลาการออกดอก** บันทึกช่วงเวลาและจำนวนดอกของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ใช้ในการทดลองที่ออกดอกในรอบปี



ภาพที่ 21 การวัดขนาดทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ใช้ในการทดลอง ก) ใบ, ข) ต้น, ค) ก้านช่อดอก, ง) ก้านดอกย่อย, จ) ดอก, ฉ) กลีบเลี้ยง, ช) กลีบดอก, ฅ) กลีบปาก, ฎ) สตามิโนด

การทดลองที่ 2 การผสมพันธุ์และการติดฝัก

1. วัสดุอุปกรณ์

- 1.1 ต้นกล้วยไม้รองเท้านารี ทั้ง 18 ชนิด
- 1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมพันธุ์ ได้แก่ ถุงซิปล แคลปซูลยาแบบไฮ ป้ายแขวนพลาสติก ลวดมัดกล้วยไม้ สมุดบันทึก และกล้องถ่ายภาพดิจิทัล

2. วิธีการทดลอง

2.1 วิธีการผสมพันธุ์

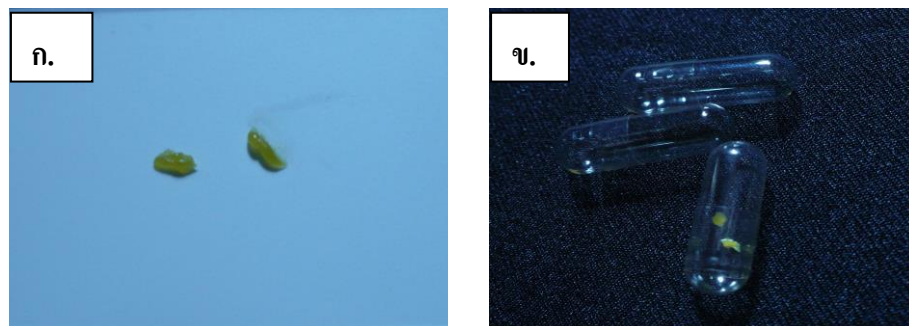
- 2.1.1 เมื่อมีดอกแม่พันธุ์บาน โดยมีอายุการบานอยู่ในช่วงที่เหมาะสม คือประมาณครึ่งหนึ่งของอายุการบานของดอก ดอกมีสีสดใส เต็มกระเปาะ (กลีบปาก) ของต้นแม่พันธุ์ออก และตรวจสอบว่ามีกลุ่มเรณูเข้าไปปนเปื้อนติดอยู่บริเวณของยอดเกสรเพศเมีย (stigma) หรือไม่ (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 เกสรเพศเมียของกล้วยไม้รองเท้านารี

- 2.1.2 เก็บเกสรเพศผู้ของต้นแม่พันธุ์ออก เพื่อเก็บไว้นำไปใช้ผสมกับต้นแม่พันธุ์ต้นอื่น เนื่องด้วยรองเท้านารีบางชนิดในแต่ละสกุลย่อยมีช่วงฤดูกาลออกดอกที่แตกต่างกัน จึงต้องมีการเก็บเกสรเพศผู้ไว้ผสม โดยเมื่อดอกของต้นที่จะใช้เป็นพ่อพันธุ์บาน เก็บเกสรจากต้นพ่อพันธุ์โดยใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยอับเรณูออกมา จากนั้นใช้ปลายไม้จิ้มฟันเขี่ยเอาเฉพาะส่วนของกลุ่มเรณูที่มีลักษณะคล้ายแป้งเปียกสีเหลืองใส เก็บไว้ในหลอดแคลปซูลยาโดยป้ายติดกับผิวด้านในหลอดแคลปซูลยา เขียนชื่อ

วันที่เก็บ แล้วนำไปใส่ถุงปิดผนึก จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ 5 °C (สามารถเก็บไว้ได้นานเป็นระยะเวลา 1 ปี) (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 วิธีการเก็บแมลงเพศผู้ ก) กลุ่มแมลงของคืนพ่อพันธุ์; ข) นำกลุ่มแมลงที่ได้ แปะชูลงเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 °C

2.1.3 แมลงเพศผู้ที่นำมาใช้ผสมพันธุ์ไม่ควรแก่เกินไป สังเกตได้จากกลุ่มแมลงที่มีสีเหลืองใส ไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ และไม่มีราขึ้น (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 แมลงเพศผู้ที่มีลักษณะเหลืองใสสามารถนำไปใช้ผสมพันธุ์ได้

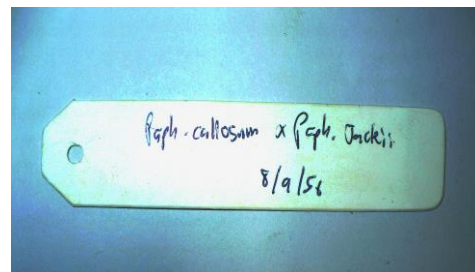
2.1.4 การถ่ายแมลงทำได้ในช่วงเช้า 8:00–10:00 น. หรือในช่วงที่อากาศไม่ร้อนจัด เพราะอากาศที่ร้อนจัด สามารถทำให้แมลงเพศผู้แห้งได้

2.1.5 ถ่ายแมลงโดยใช้ไม้จิ้มฟันปลายแหลมที่สะอาดเขี่ยกลุ่มแมลงมาเกลี่ยลงบนยอดแมลงเพศเมียของคืนแม่พันธุ์ให้ทั่ว (ภาพที่ 25) โดยผสม 4 แบบ คือ ผสมตัวเอง ผสมข้ามต้นในชนิดเดียวกัน ผสมข้ามข้ามชนิดภายในสกุลย่อยเดียวกัน และผสมข้ามสกุลย่อย โดยผสมแต่ละแบบอย่างน้อย 5 ดอก



ภาพที่ 25 การเกลี่ยกลุ่มเรณูลงบนยอดเกสรเพศเมีย

2.1.6 ทำป้ายแขวนไว้ที่ก้านดอกโดยเขียนชื่อ แม่พันธุ์ × พ่อพันธุ์ วันเดือนปีที่ทำการ ผสม (ภาพที่ 26) พร้อมทั้งจดบันทึกลงสมุดบันทึก



ภาพที่ 26 ตัวอย่างการเขียนป้ายชื่อ เพื่อบอกกลุ่มผสมและวันเดือนปีที่ผสม

2.2 วิธีการบันทึกผล

หลังจากผสมเกสรไปได้ประมาณ 1-2 สัปดาห์ ให้สังเกตก้านดอกย่อยมีสีเขียวยาว และมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น แสดงว่าผสมติดแต่เพื่อให้แน่ใจต้องรอจนกว่าเส้าเกสรจะเหี่ยวหลุดออกจากก้านดอกย่อยแล้ว ก้านดอกย่อยยังคงขยายขนาดใหญ่ และยืดยาวขึ้นแสดงว่าการผสมประสบความสำเร็จ (ภาพที่ 27) เมื่อแน่ใจว่า

ดอกที่ผสม ผสมติดแน่นนอนแล้ว บันทึกจำนวนฝักที่ผสมติดจากจำนวนดอก
ทั้งหมดที่ผสมในแต่ละกลุ่มผสมเพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดฝัก



ภาพที่ 27 ฝักของกล้วยไม้รองเท้านารีที่พัฒนาจากก้านดอกย่อยหลังจากได้รับการปฏิสนธิ

การทดลองที่ 3 จำนวนเมล็ดที่สมบูรณ์จากฝักกล้วยไม้รองเท้านารีที่ผสมติด

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ฝักกล้วยไม้ นารีที่ได้จากการทดลองที่ 2

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้ ได้แก่ มีดผ่าตัด เข็ม
เขี่ยปากกิบ กระดาษสไลด์ แผ่นปิดสไลด์ หลอดหยด ขวดสีชา และกล้องจุลทรรศน์
OLYMPUS รุ่น CX31

1.3 สารเคมี

สิ่งที่ใช้ย้อมเพื่อดูความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารี ได้แก่ lacto propionic
orcein ซึ่งเตรียมเป็น stock solution โดยชั่ง orcein 2 กรัม ละลายในส่วนผสม
ระหว่าง lactic acid 50 มิลลิลิตร และ propionic acid 50 มิลลิลิตร คนผสมให้เข้า
กันและแช่ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมากรองเก็บไว้เป็น stock solution เมื่อนำมาใช้
ให้ผสมน้ำกับ stock solution ให้มีความเข้มข้นระหว่าง 45 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ แล้ว
กรองอีกครั้งหนึ่งเมื่อกรองเสร็จบรรจุในขวดสีชาและเก็บไว้ในตู้เย็น

2. วิธีการทดลอง

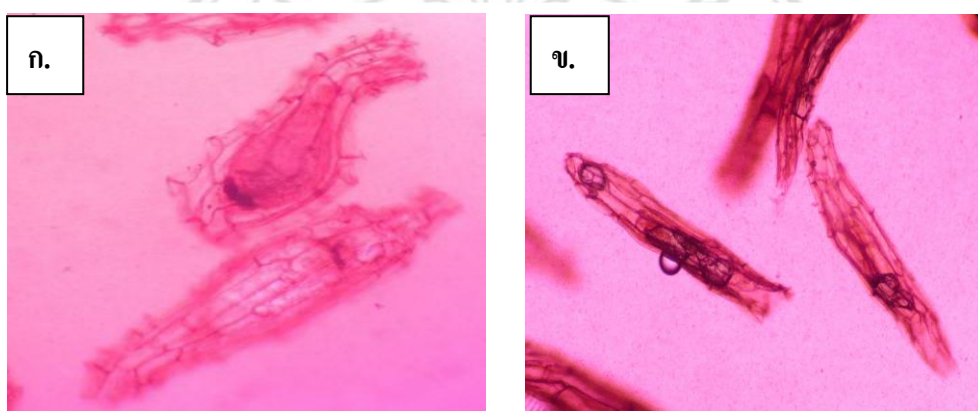
2.1 วิธีการตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ด

2.1.1 นำฝักกล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาเปิดฝัก โดยใช้มีดผ่าตัดผ่าครึ่ง
แล้วใช้เข็มเขี่ย เขี่ยเมล็ดกล้วยไม้ลงบนแผ่นสไลด์

2.1.2 ใช้หลอดหยดดูดสีย้อมมาหยดลงบนเมล็ดที่แช่ลงบนสไลด์ให้ท่วมเมล็ด จากนั้นใช้เข็มเขี่ย เขี่ยเมล็ดให้เข้ากันกับสีย้อม ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ทิ้งไว้ 40 นาที สังเกตความสมบูรณ์ของเมล็ดด้วยไม้ก้านจุ่มจุ่มจุ่ม โดย แบ่งเป็นเมล็ดสมบูรณ์และเมล็ดลีบ (ภาพที่ 28)

2.2 วิธีการบันทึกผลการตรวจสอบจำนวนเมล็ดที่สมบูรณ์

นับจำนวนเมล็ดสมบูรณ์และเมล็ดลีบ โดยสุ่มตรวจบนแผ่นสไลด์โดยตรวจนับ 5 ซ้ำใน 1 สไลด์ สุ่มนับซ้ำละ 20 เมล็ด กลัวยไม้ 1 ฝักทำการตรวจนับทั้งสิ้น 5 สไลด์ เพื่อคำนวณค่าเฉลี่ยความสมบูรณ์ของเมล็ด



ภาพที่ 28 ลักษณะของเมล็ดกลัวยไม้ร่องเท้าพันธุ์ผสมติด ก) เมล็ดที่สมบูรณ์; ข) เมล็ดลีบ