อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้ ประกอบด้วย 2 การทดลอง โดยการทดลองที่1 เป็นการศึกษาลักษณะเซลล์พันธุศาสตร์ของข้าวจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 เหนียวสันป่าตอง ก่ำดอยสะเก็ด ข้าวก่ำ 87046 และข้าวก่ำ 88468 และข้าวทั้ง 5 พันธุ์นี้จะใช้เป็นข้าวพันธุ์พ่อแม่ เพื่อใช้ในการสร้างลูกผสมชั่วที่1 (F_1) ในการทดลองที่ 2 เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่ควบคุมการถ่ายทอดสีของลูกผสมชั่วที่1 และลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวนหนึ่งคู่ผสมโดยคัดเลือกคู่ผสมที่ข้าวพันธุ์พ่อแม่มีสีบนลักษณะสัณฐานแตกต่างกันอย่างชัดเจน

เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2539 และสิ้นสุดเดือนธันวาคม 2541

การทดลองที่1 การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของข้าวพันธุ์พ่อแม่

ทำการศึกษาที่ห้องปฏิบัติการเซลล์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ โดยศึกษาจำนวนโครโมโซม และคารีโอไทป์ ของข้าวพันธุ์พ่อแม่จำนวน 5 พันธุ์ มีขั้นตอนดังนี้ คือ นำเมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์มาเพาะบนกระดาษเพาะ ทิ้งไว้ 5-7 วัน เมื่อรากงอกทำการตัดปลายรากยาว 3-5 มิลลิเมตร ใส่ในขวดแก้วขนาดจุ 15 มิลลิลิตรที่มีสารละลาย para-dichlorobenzene บรรจุอยู่เพื่อหยุดการเจริญของเส้นใยสปินเดิลของเซลล์ หลังจากนั้นนำรากออกจากสารละลาย para-dichlorobenzene ล้างรากให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำรากไปแช่ไว้ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (แอทธิลแอลกอฮอล์ 95% และกรดอะซิติกเข้มข้น อัตราส่วน 3:1) นาน 5 นาที แล้วจึงทำการแยกเซลล์ออกจากกัน โดยแช่รากในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่นและแช่รากในสีย้อม carbol fuchsin นาน 5 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดระยะเวลาการย้อมสีแล้ว ทำการศึกษาโครโมโซมบนแผ่นสไลด์ โดยใช้เทคนิค Squash method นำแผ่นสไลด์ที่ผ่านการเตรียมเซลล์เรียบร้อยแล้วไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ในระยะเมตาเฟสและโครโมโซมกระจายไม่ทับกัน ทำการบันทึกภาพ จากนั้นนำรูปถ่ายที่ได้มาศึกษาคารีโอไทป์ จัดรูปร่างโครโมโซม โดยทำการกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ วัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (LI) และความยาวของโครโมโซมทั้งแท่ง (LT) แล้วนำค่า Ls, LI และ LT มาคำนวณหาค่า Relative Length (RL) และค่า Centomeric index (CI) โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\text{Relative length (RL)} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT=Ls+LI)}}{\text{ความยาวรวมของโครโมโซมทุกคู่ } (\sum \text{LT})}$$

$$\text{Centromeric index (CI)} = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (LI)}}{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT)}}$$

นำค่า CI ที่ได้จากการคำนวณ มากำหนดชนิดหรือรูปร่างของโครโมโซม โดยโครโมโซมที่มีค่า CI อยู่ระหว่าง 0.500-0.599 จัดเป็น metacentric chromosome ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.600-0.699 จัดเป็น submetacentric chromosome ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.700-0.899 จัดเป็น subtelocentric chromosome ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.900-1.000 จัดเป็น telocentric chromosome แล้วทำการจัดขนาดโครโมโซม โดยจัดแบ่งโครโมโซมออกเป็น 3 ขนาด คือโครโมโซมขนาดใหญ่ (Large=L) ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1 ซึ่งเป็นคู่ที่ยาวที่สุด โครโมโซมขนาดกลาง (Medium=M) ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมที่ยาวที่สุดรวมกับโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุด และโครโมโซมขนาดเล็ก (Small=S) ได้แก่โครโมโซมคู่ที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุด

เมื่อจัดขนาดและรูปร่างโครโมโซมเรียบร้อยแล้ว จัดอิดิโอแกรม (Idiogram) โดยจับคู่โครโมโซมที่มีรูปร่างเหมือนกัน ขนาดเท่ากัน พิจารณาจากค่า Relative length (RL) เพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่ง จะมีค่าคงที่ในทุกเซลล์ ทำให้การจับคู่โครโมโซมมีความแม่นยำ ถูกต้องกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT) (กันยารัตน์, 2532)

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลแต่ละลักษณะของข้าวพันธุ์พ่อแม่ทั้ง 5 พันธุ์ ดังต่อไปนี้ คือ

1. จำนวนโครโมโซม
2. ขนาดโครโมโซม
3. รูปร่างโครโมโซม

การทดลองที่ 2 ลักษณะทางพันธุกรรมที่ควบคุมการถ่ายทอดสี

1. พันธุ์และประชากรลูกผสม

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์ และที่แปลงทดลองของภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2539 ถึงเดือนธันวาคม 2541

1.1 <u>พันธุ์พ่อแม่</u> พันธุ์พ่อแม่ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในการศึกษาครั้งนี้ ประกอบด้วย

ขาวดอกมะลิ 105

เหนียวสันป่าตอง

ก่ำดอยสะเก็ด

ข้าวก่ำ (87046)

ข้าวก่ำ (88468)

1.2 <u>การสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 และชั่วที่ 2</u>

ในฤดูนาปี พ.ศ. 2539 ปลูกข้าวทั้ง 5 พันธุ์ในกระถาง ทำการผสมพันธุ์เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 seed) ได้ทั้งหมด 6 คู่ผสม ดังนี้คือ

ก่ำดอยสะเก็ด x ขาวดอกมะลิ 105

ก่ำดอยสะเก็ด x เหนียวสันป่าตอง

ก่ำดอยสะเก็ด x ข้าวก่ำ (87046)

ข้าวก่ำ (87046) x เหนียวสันป่าตอง

ข้าวก่ำ (88468) x ขาวดอกมะลิ 105

ข้าวก่ำ (88468) x เหนียวสันป่าตอง

ในฤดูนาปีต่อมา นำเมล็ดส่วนหนึ่งของลูกผสมชั่วที่ 1 ของแต่ละคู่ผสมปลูกลงในกระถาง ปล่อยให้ต้นข้าวออกดอกผสมตัวเองเพื่อสร้างเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 2 ต่อไป

2. ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะสีในลูกผสมชั่วที่ 1

<u>การปลูกและการดูแลรักษา</u>

ทำการปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 ลงในแปลงทดลอง เพื่อศึกษาการถ่ายทอดสีของลูกผสมชั่วที่ 1 โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design จำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยประชากรพันธุ์พ่อแม่จำนวน 5 พันธุ์ๆละ 1 แถว และลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 6คู่ผสมๆละ 2 แถว ใช้ระยะปักดำ 25x25 ซม.

การจัดการและการดูแลรักษา ก่อนการปักดำหว่านปุ๋ยไนโตรเจนในอัตรา 4 กก. ไนโตรเจนต่อไร่ หลังจากปักดำแล้ว 7 วัน หว่านสารเคมีมาเซตเต้ อัตรา 4 กก. ต่อไร่ เพื่อกำจัดวัชพืชก่อนงอกและหว่านสารเคมีฟูราดาน 3 จี อัตรา 4 กก. ต่อไร่ ป้องกันหนอนกอเจาะลำต้นรวมทั้งแมลงอื่นๆ จากนั้นเมื่อต้นข้าวอายุประมาณ 50 วันหลังปักดำ หว่านปุ๋ยไนโตรเจนในอัตรา 6.9 กก.ไนโตรเจนต่อไร่ อีกครั้งอาจมีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชอีกขึ้นอยู่กับสภาพที่เกิดขึ้นในแปลงทดลอง เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยว ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตรวมในแต่ละคู่ผสม

การบันทึกข้อมูลและลักษณะที่ศึกษา

สีบนต้นกล้าและสีบนส่วนต่างๆของต้นข้าวพันธุ์พ่อ-แม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 ทำการบันทึก 10 ต้นต่อ 1 คู่ผสม โดยบันทึกข้อมูลตามคู่มือการเก็บข้อมูลพันธุ์ข้าวของสถาบันวิจัยข้าว (2531) แบ่งการบันทึกข้อมูลออกเป็น 2 ระยะ คือ

- Flowering stage ประกอบด้วยส่วนต่างๆของต้นข้าว ดังนี้

ต้นกล้า	แผ่นใบ	กาบใบ
เยื่อกันน้ำฝน	เขี้ยวกันแมลง	ปล้อง
ยอดดอก	ยอดเกสรตัวเมีย	

- Ripening stage ประกอบด้วยส่วนต่างๆของต้นข้าว ดังนี้

เปลือกหุ้มเมล็ด เยื่อหุ้มเมล็ด

3. ศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมการถ่ายทอดลักษณะสีในลูกผสมชั่วที่สอง

ทำการคัดเลือกคู่ผสมที่ข้าวพันธุ์พ่อแม่มีสีบนลักษณะสัณฐานแตกต่างกัน คือ ก่ำดอยสะเก็ด x เหนียวสันป่าตอง

การปลูกและการดูแลรักษา

ปลูกเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 2 ของคู่ผสมที่ทำการคัดเลือก และข้าวพันธุ์พ่อแม่ลงในกระถาง โดยปลูกข้าวพันธุ์พ่อแม่พันธุ์ละ 5 กระถางๆละ 5 ต้น และลูกผสม 25-30 กระถาง จำนวน 5 ต้นต่อ 1 กระถางเช่นเดียวกัน ดังนั้นลูกผสมจะมีจำนวน 100-150 ต้น การดูแลรักษากระทำเช่นเดียวกับการปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 ในแปลง ในระยะเก็บเกี่ยวทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตแต่ละต้นแยกกัน

การบันทึกข้อมูลและลักษณะที่ศึกษา

สีบนต้นกล้าและสีบนส่วนต่างๆของต้นลูกผสมชั่วที่ 2 ทำการบันทึกเช่นเดียวกับการทดลองในลูกผสมชั่วที่ 1

การวิเคราะห์ข้อมูล

- ประเมินการกระจายตัวของสีในลูกผสมชั่วที่ 2 โดยใช้ chi square (χ^2 test) ในการทดสอบ
- การทดสอบการกระจายตัวของการปรากฏของสีบนลูกผสมชั่วที่สอง

1. ถ้าลักษณะของสีถูกควบคุมด้วยยีน 1 คู่

(1.1) มี action ของยีนเป็นแบบ complete dominance

อัตราส่วนของ genotype = 3 AA+Aa : 1 aa

อัตราส่วนของ phenotype = 3 ม่วง : 1 เขียว

(1.2) มี action ของยีนเป็นแบบ incomplete dominance

อัตราส่วนของ genotype = 1 AA : 2 Aa : 1 aa

อัตราส่วนของ phenotype = 1 ม่วง : 2 เขียวปนม่วง : 1 เขียว

2. ถ้าลักษณะของสีถูกควบคุมด้วยยีน 2 คู่

(2.1) ถ้าสีเขียวถูกควบคุมด้วย homozygous recessive (aabb) และมี gene action เป็นแบบ complete dominance

อัตราส่วนของ genotype = 15 A_B_+A_bb+aaB_ : 1 aabb

อัตราส่วนของ phenotype = 15 ม่วง : 1 เขียว

(2.2) ถ้าสีเขียวถูกควบคุมด้วย homozygous recessive (aabb) และสีม่วงถูกควบคุมด้วย homozygous dominance และมี gene action เป็นแบบ incomplete dominance

อัตราส่วนของ genotype = 1 AABB :14 A_B_+aaB_+A_bb : 1 aabb

อัตราส่วนของ phenotype = 1 ม่วง : 14 เขียวปนม่วง : 1เขียว

(2.3) ถ้าสีเขียวถูกควบคุมด้วย homozygous recessive (aabb) และสีม่วงถูกควบคุมด้วย homozygous dominance และมี gene action เป็นแบบ complementary factor

อัตราส่วนของ genotype = 1 AABB :8 A_B_ : 7 A_bb+aaB_+aabb

อัตราส่วนของ phenotype = 1 ม่วง : 14 เขียวปนม่วง : 1เขียว

และ อัตราส่วนของ genotype = 9 A_B_ : 7 A_bb+aaB_+aabb

อัตราส่วนของ phenotype = 9 ม่วง : 7 เขียว