

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ

การถ่ายทอดลักษณะดอกดาวเรือง

อุปกรณ์และการศึกษา

1. พืชทดลอง

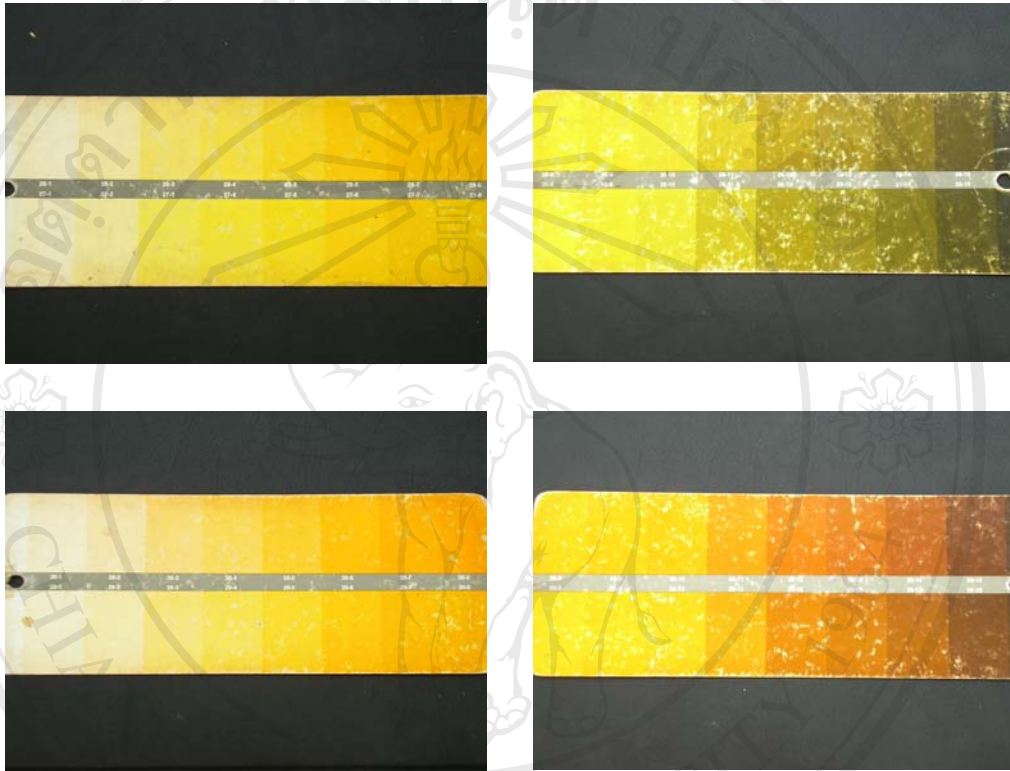
คัดเลือกต้นพ่อแม่ที่มีสีและลักษณะของดอกแตกต่างกัน จากการสังเกตสีของดอกด้วยตาเปล่าและวัดด้วยแผ่นเทียบสี Munsell Limit Color Cascade ของบริษัท Munsell Color, USA (ภาพ 3.1) โดยคัดเลือกจากพันธุ์ที่ได้ทำการรวบรวมและศึกษา ณ ศูนย์บริการการพัฒนaxyพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.หางดง จ.เชียงใหม่ ได้ดาวเรืองทั้งหมด 18 หมายเลข (ตาราง 3.1)



ภาพ 3.1 แผ่นเทียบสี Munsell Limit Color Cascade
ของบริษัท Munsell Color, USA

2. การเตรียม

2.1 ทำการคัดเลือกต้นที่มีระดับสีและลักษณะดอกที่แตกต่างกันมาจับคู่ (ภาพ 3.2) เพื่อเป็นต้นพ่อแม่พันธุ์ ทำการผสมข้ามและสลับกลับพ่อแม่ (reciprocal cross)



ภาพ 3.2 ระดับสีของแผ่นเทียบสี Munsell Limit Color Cascade ของบริษัท Munsell Color, USA

2.2 เพาะเมล็ดในวัสดุเพาะที่มีส่วนผสมของ ทรายร่อน ขุยมะพร้าวร่อน จี๊ถั่วแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 โดยปริมาตร เมื่อครบ 1 เดือนหลังเพาะเมล็ด ย้ายปลูกลงในถุงดำขนาด 6×10 เซนติเมตร ที่มีวัสดุปลูก ดินร่วน แกลบ ทราย ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 1:1:1:1 โดยปริมาตร

2.3 การเตรียมดอกแม่พันธุ์ สังเกตจากการบานของดอก ใช้วิธีการ 2 วิธี

วิธีที่ 1 ตัดส่วนปลายดอกที่ยังตูมอยู่ (ภาพ 3.3) โดยใช้ใบมีดที่คมตัดส่วนปลายดอกเล็กน้อย เพื่อให้เห็นภายในของดอก (ภาพ 3.4) พยายามให้อยู่เหนือยอดเกสรเพศเมีย ใช้ปากคีบปลายแหลมขนาดเล็กคีบดอกย่อยกลางที่อยู่ตรงกลางออกให้หมด (ภาพ 3.5) เหลือเพียงส่วนที่เป็น

ดอกย่อยวงนอกไว้ กลุ่มดอกไว้ด้วยถุงกระดาษเพื่อป้องกันเกสรอื่นปะปน รอคการพัฒนาดอก
สังเกตจากยอดเกสรเพศเมีย ยืดยาวออกมาและที่ปลายแยกตัวออกเป็นสองแฉก



ภาพ 3.3 ลักษณะและช่วงการเจริญเติบโตดอกควาเรียง
ที่นำมาใช้เป็นดอกแม่พันธุ์หรือพ่อพันธุ์



ภาพ 3.4 ดอกที่คัดเลือกไว้หลังการตัดส่วนปลาย



ภาพ 3.5 ลักษณะของดอกที่ทำการดึงส่วนดอกย่อยกลาง

วิธีที่ 2 เลือกดอกที่ยังตูมอยู่ ใช้ถุงคลุมไว้เพื่อป้องกันเกสรอื่นปนเปื้อน แล้วหมั่นสังเกต การพัฒนาของดอก เมื่อส่วนที่เป็นดอกย่อยวงนอก ที่อยู่วงด้านนอกเริ่มบาน (ภาพ 3.6) ใช้ปากคีบ ปลายแหลมขนาดเล็กดึงดอกย่อยกลางที่อยู่ตรงกลางออกให้หมด เพื่อป้องกันไม่ให้มีการพัฒนา ต่อไป สามารถทำการผสมพันธุ์ได้ทันทีในวันที่เตรียมเมื่อเห็นยอดเกสรเพศเมียแล้วหรือรอการ พัฒนาต่อไป



ภาพที่ 3.6 ดอกย่อยวงนอกที่อยู่วงด้านนอกเริ่มบาน

2.4 เตรียมดอกพ่อพันธุ์ ต้องเป็นดอกที่ตูมอยู่ เนื่องจากว่าในดอกที่บานแล้วอาจมีเกสรดอกอื่นปะปนได้ กลุ่มดอกไว้ด้วยถุงเช่นกัน เมื่อดอกมีการพัฒนามากขึ้น ดอกย่อยกลางที่อยู่วงนอกสุดบานก่อนและบานถัดเข้าไป ดังนั้นดอกหนึ่ง ๆ จึงใช้เป็นแหล่งของเกสรได้หลายครั้ง (ภาพ 3.7)



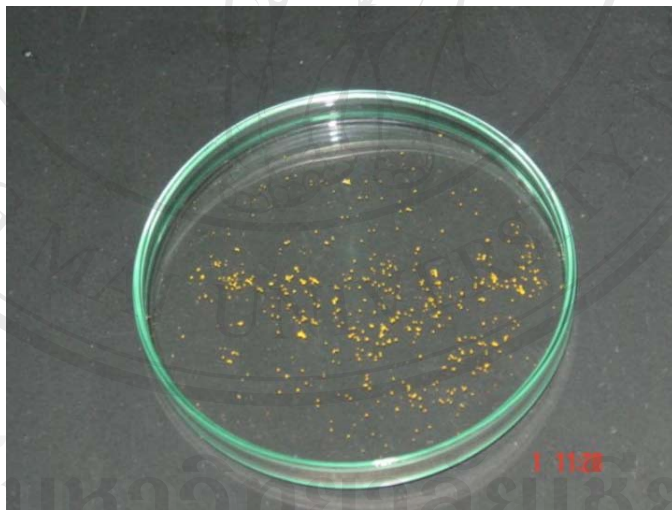
ภาพที่ 3.7 การคลุมดอกเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของละอองเกสรอื่น

3. การผสมพันธุ์

สังเกตการพัฒนาของยอดเกสรเพศเมียในดอกที่เป็นแม่พันธุ์ (ภาพ 3.8) รวบรวมละอองเกสรจากดอกพ่อพันธุ์ โดยการเคาะดอกเบา ๆ ให้ละอองเกสรตกลงในภาชนะเล็ก ๆ (ภาพ 3.9) (ดอกยังบานไม่เต็มที่สามารถเก็บไว้ใช้เป็นแหล่งของเกสรได้ในครั้งต่อไป) ใช้พู่กันขนาดเล็กในการแตะละอองเกสรที่รวบรวมไว้แตะบนยอดเกสรเพศเมียเบา ๆ (ภาพ 3.10) คลุมดอกไว้เพื่อป้องกันเกสรอื่นปะปนก่อนติดเมล็ด หากไม่แน่ใจการผสมทำการผสมซ้ำอีกครั้งในวันถัดไป ติดป้ายไว้บันทึกผู้ผสม



ภาพ 3.8 ลักษณะของยอดเกสรเพศเมียที่พร้อมการผสม



ภาพ 3.9 ละอองเกสรเพศผู้ที่เก็บมาเพื่อใช้ในการผสม



ภาพ 3.10 การถ่ายละอองเกสร โดยนำละอองเกสรเพศผู้ไปแตะบนยอดเกสรเพศเมียที่พร้อมผสม

4. ปลุกทดสอบ

หลังจากมีการผสมพันธุ์ไป 3 สัปดาห์ ดอกเริ่มแห้ง เก็บเมล็ดกลุ่มผสมที่ได้ทั้งหมด นำไปผึ่งให้แห้งก่อนเพาะเมล็ด แล้วปลุกทดสอบ

5. บันทึกข้อมูล

บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด สังเกตลักษณะการถ่ายทอดสีและรูปร่างของลูกผสมรุ่นที่ 1 ทั้งหมดเทียบด้วยแผ่นเทียบสี Munsell Limit Color Cascade ของบริษัท Munsell Color, USA เปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ กับพ่อแม่

6. คัดเลือกลูกผสมที่ได้จากการผสมรุ่นที่ 1 จำนวน 10 คู่ผสมมาทำการผสมตัวเอง แล้วทำเช่นเดียวกันกับการทำลูกผสมรุ่นที่ 1

ตาราง 3.1 ลักษณะของดอกและสีที่ได้คัดเลือก เพื่อนำมาใช้ในการศึกษา

หมายเลข	ลักษณะสีดอกที่ได้จากการ		ลักษณะสีดอกที่ได้จากการ วัดด้วยแผ่นเทียบสี Munsell Limit Color Cascade	ลักษณะดอก
	สังเกตด้วยตาเปล่า			
M458	เหลือง		เหลือง (9.8)	ชั้นเดียว
M470	ส้มเหลือง		แดงเหลือง (9.1)	ชั้นเดียว
M402	เหลืองส้ม		เหลือง (0.5)	ชั้นเดียว
M160	เหลืองทอง		เหลือง (4.0)	ชั้นเดียว
M381	เหลืองใส		เหลือง (7.4)	ชั้นเดียว
M296	เหลือง		เหลือง (9.8)	หลายชั้น
M476	ส้ม		แดงเหลือง (6.4)	หลายชั้น
M382	เหลืองทอง		เหลือง (4.0)	หลายชั้น
M381/1	เหลืองใส		เหลือง (7.4)	หลายชั้น
M375	เหลืองอ่อน		เหลืองเขียว (2.9)	พู่กลม
M315	เหลืองอ่อน		เหลืองเขียว (1.5)	พู่กลม
M301	เหลือง		เหลือง (9.8)	พู่กลม
M385	ส้มเหลือง		แดงเหลือง (9.1)	พู่กลม
M275	เหลืองส้ม		เหลือง (0.5)	พู่กลม
M303	เหลืองทอง		เหลือง (4.0)	พู่กลม
M444	เหลืองเข้ม		เหลือง (2.5)	พู่กลม
M399	เหลืองใส		เหลือง (7.4)	พู่กลม
M029/2	เหลืองเข้ม		เหลือง (1.6)	พู่กลม

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของดอกดาวเรือง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ปลายรากของดาวเรืองที่ต้องการนับจำนวนโครโมโซม ที่ได้จากการเพาะเมล็ด และปักชำ

2. ขวดแก้วขนาดเล็ก สำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

3. สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์

4. คีบปลายแหลม

5. เข็มเขี่ย

6. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound microscope และ Photomicroscope

7. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาจำนวนโครโมโซม

- สารเคมีที่ใช้สำหรับการหยุดการสร้างเส้นใยสปินเดิล (pre-treatment) ได้แก่ para-dichlorobenzene

- สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมน้ำยาในการหยุดการเจริญของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ (fixative) คือ เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติกเข้มข้น อัตราส่วน 3:1

- สารเคมีที่ใช้สำหรับเป็นน้ำยಾಯ่อยสลาย (macerating fluid) คือ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล

- สารเคมีที่ใช้ย้อมสีโครโมโซม คือ Lacto-propionic orcein

ขั้นตอนการศึกษา

1. เตรียมปลายราก ตัดเฉพาะส่วนปลายรากที่กำลังเจริญเติบโต โดยสังเกตจากรากที่มีสีเขียวและปลายรากมีสีขาวขุ่นเล็กน้อย แบ่งการเก็บในช่วงเวลา 8.00 น., 8.30 น., 9.00 น., 9.30 น. และ 10.00 น.

2. หยุดการเจริญของเส้นใยสปินเดิลของเซลล์ โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย para-dichlorobenzene เป็นเวลา 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 1 ชั่วโมง 30 นาที และ 2 ชั่วโมง แล้วล้างปลายรากด้วยน้ำกลั่นเพื่อนำไปรักษาสภาพเซลล์โดยการแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ นาน 10 นาที แล้วล้างปลายรากด้วยน้ำกลั่น

3. แยกเซลล์โดยการแช่ปลายรากลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

4. ย้อมสีเนื้อเยื่อปลาขรากด้วยสีย้อม Lacto-propionic orcein โดยแช่นาน 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 1 ชั่วโมง 30 นาที, 2 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง
5. วางเนื้อเยื่อปลาขรากบนแผ่นแก้วสไลด์ ใช้เข็มเย็บขี้ปลาขราก และแยกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ ใช้กระดาษซับบริเวณแผ่นแก้วปิดสไลด์ กดนิ้วหัวแม่มือลงไป เพื่อให้เซลล์กระจายและเป็นการจับสีที่มากเกินไปออก
6. นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส โดยเลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายไม่ทับกัน นับจำนวนโครโมโซมแล้วบันทึกภาพ