บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานและช่วงเวลาออกดอก

การทดลองนี้เป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการผสมพันธุ์ว่านสี่ทิศ อันได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานของต้น ช่วงเวลาออกดอกและช่วงพร้อมผสมของดอกของว่านสี่ทิศซึ่งเป็นพืชทดลอง 2 กลุ่ม ที่มีช่วงเวลาออกดอกแตกต่างกัน

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 พืชทดลอง

พืชทดลอง คือ ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นบ้าน 2 กลุ่ม กลุ่มที่ออกดอกปีละ 1 ครั้ง ได้แก่ พันธุ์ดอกสีแดง (R) พันธุ์ดอกสีชมพู (P) และ พันธุ์ดอกสีส้ม (O) และกลุ่มที่ออกดอกปีละหลายครั้ง ได้แก่ พันธุ์รางเงิน (S) พันธุ์รางทอง (G) และพันธุ์รางนาก (B)

1.1.2 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.2.1 วัสดุปลูก คือ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่วในอัตราส่วน 2 : 1 : 1

1.1.2.2 ถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 4 x 6 นิ้ว

1.1.2.3 ยากันเชื้อรา (ชื่อการค้า : Benlate OD; ชื่อสามัญ : Benomyl)

1.1.2.4 สายยางรดน้ำพร้อมฝักบัว

1.1.2.5 วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ ถุงมือยาง แผ่นป้ายพลาสติก ลวด ดินสอ และเวอร์เนียคาลิปเปอร์

1.2 วิธีการวิจัย

ปลูกหัวพันธุ์ของพืชทดลองทั้ง 6 พันธุ์ในถุงพลาสติกสีดำที่บรรจุเครื่องปลูกพันธุ์ละ 5 ต้น ใช้หัวที่มีขนาดที่ให้ดอกได้ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับพันธุ์แล้วเลี้ยงไว้ภายใต้โรงเรือนพรางแสงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (%) เพื่อบันทึกข้อมูลทางสัณฐานของหัว ใบ และดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตลอดจนช่วงเวลาออกดอก และช่วงพร้อมผสมของดอกของพืชทดลองทั้ง 6 พันธุ์ ในระยะที่ต้นและดอกเจริญเติบโตเต็มที่ตามวิธีการของ ดวงทิพย์ (2539) ข้อมูลที่บันทึก มีดังต่อไปนี้

1.2.1 สัณฐานของพืชทดลอง

1.2.1.1 หัว

1.2.1.1.1 เส้นรอบวงของหัว (ซม)

1.2.1.1.2 สีของหัวและสีของกาบหัวชั้นนอก

1.2.1.2 ใบ

ข้อมูลของใบบันทึกจากใบที่ยาวที่สุดของต้น

1.2.1.2.1 ความกว้างและความยาวของใบ โดยวัดความกว้างของใบจากขอบใบด้านหนึ่งมายังขอบใบอีกด้านหนึ่งที่ตำแหน่งที่กว้างที่สุดของใบ และความยาวของใบ วัดจากฐานใบถึงปลายใบ

1.2.1.2.2 สีของใบ

1.2.1.3 ดอก

ข้อมูลของดอกวัดจากดอกที่ใหญ่ที่สุดของช่อดอก

1.2.1.3.1 ความยาวของก้านช่อดอก

1.2.1.3.2 เส้นผ่าศูนย์กลางของก้านช่อดอก โดยวัดที่บริเวณที่อยู่เหนือโคนก้านช่อดอกขึ้นมา 10 ซม

1.2.1.3.3 สีของก้านช่อดอก

1.2.1.3.4 ความกว้างและความยาวของกาบใบหุ้มช่อดอก วัดเช่นเดียวกับ 1.2.1.2.1

1.2.1.3.5 สีของกาบหุ้มช่อดอก

1.2.1.3.6 ความยาวของก้านดอกย่อย

1.2.1.3.7 สีของก้านดอกย่อย

1.2.1.3.8 เส้นผ่าศูนย์กลางของดอกบาน วัดจากบริเวณที่กว้างที่สุดของดอก

1.2.1.3.9 ความยาวของกลีบดอกและความกว้างของกลีบดอก วัดจากตำแหน่งที่กว้างที่สุดของดอก

1.2.1.3.10 สีของกลีบดอก

1.2.1.3.11 ความยาวของก้านชูเกสรตัวผู้

1.2.1.3.12 ความกว้างและความยาวของอับละอองเกสร

1.2.1.3.13 สีของเกสรตัวผู้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.1.3.14 ความยาวของก้านชูเกสรตัวเมีย

1.2.1.3.15 จำนวนแฉกของยอดเกสรตัวเมีย

1.2.1.3.16 สีของเกสรตัวเมีย

1.2.2 ช่วงเวลาออกดอกและช่วงพร้อมผสม

1.2.2.1 ช่วงเวลาที่พืชทดลองออกดอก บันทึกจากวันปลูกจนถึงวันที่แทงช่อดอก และจากวันปลูกจนถึงวันที่ดอกแรกเริ่มแย้มบาน

1.2.2.2 ช่วงระยะเวลาที่พืชทดลองพร้อมผสม บันทึกในช่วงหลังดอกบาน 1 วัน จนถึงหลังดอกบาน 3 วัน ดูจากลักษณะของปลายยอดเกสรตัวเมียโดยที่ปลายยอดเกสรตัวเมียที่แผ่ออกและมีเมือกเหนียวใสคลุมอยู่เป็นปลายยอดเกสรตัวเมียที่อยู่ในสภาพพร้อมผสม

การทดลองที่ 2 การผสมเกสร

การทดลองนี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการผสมเกสรพืชทดลอง 6 พันธุ์ ดังระบุในข้อ 1.1.1 โดยวิธีการผสมแบบพบกันหมดและสลับพ่อแม่ หลังจากนั้นติดตามผลของการผสมตลอดจนการเจริญเติบโตของฝักของดอกที่ผสมติด ทดสอบการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าลูกผสม

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 วัสดุและอุปกรณ์เพื่อศึกษาการผสมเกสร

2.1.1.1 หัวพันธุ์ที่มีขนาดที่ให้ดอกได้ของพืชทดลอง 6 พันธุ์ ดังระบุในข้อ 1.1.1

2.1.1.2 ห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 13 °ซ เพื่อเก็บรักษาหัวพันธุ์

2.1.1.3 วัสดุปลูก คือ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่วในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 และวัสดุเพาะ คือ ทรายหยาบ และถ่านแกลบ ในอัตราส่วน 1 : 1

2.1.1.4 ถุงพลาสติกสีดำขนาด 4 x 6 นิ้ว

2.1.1.5 ตะกร้าพลาสติกสำหรับเพาะเมล็ด

2.1.1.6 ยากันเชื้อรา (ชื่อการค้า : Benlate OD; ชื่อสามัญ : Benomyl)

2.1.1.7 ซองกระดาษลอกลายสำหรับคลุมเกสรตัวเมีย

2.1.1.8 ขวดขนาดเล็กสำหรับบรรจุละอองเกสร

2.1.1.9 วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ แผ่นป้ายพลาสติก ลวด มีด พู่กัน ดินสอ และ คลิบหนีบกระดาษ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2 วัสดุและอุปกรณ์ในการศึกษาการงอกของละอองเกสรและการเก็บรักษาละอองเกสร

2.1.2.1 ละอองเกสรจากดอกของพืชทดลอง 6 พันธุ์

2.1.2.2 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope

2.1.2.3 ขวดบรรจุละอองเกสร

2.1.2.4 silica gel

2.1.2.5 วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ จานแก้ว กระดาษกรอง แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม กระจกสไลด์ กระจกปิดสไลด์ หลอดหยด ปากคีบ และ เข็มเขี่ย

2.1.3 อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงละอองเกสร ตามวิธีการของ Brewbaker and Beyong (1963) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

stock mineral solution

H_3BO_3	0.01	กรัม
$Ca\ (NO).\ 4H_2O$	1.3	กรัม
$MgSO_4\ .\ 7H_2O$	0.2	กรัม
KNO_3	0.1	กรัม
น้ำ	100	มิลลิลิตร (มล)

culture solution

stock mineral solution	1	มล
sucrose	0.2 – 1.0	กรัม
น้ำ	9.0	มล

2.2 วิธีการวิจัย

2.2.1 การผสมเกสร

2.2.1.1 การเตรียมต้นพืชทดลอง

นำหัวพันธุ์ของพืชทดลองทั้ง 6 พันธุ์ มาแช่ในยากันราแล้วนำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิประมาณ 13 °ซ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดเวลานำออกมาปลูกในถุงพลาสติกที่บรรจุวัสดุปลูก เลี้ยงไว้ภายใต้โรงเรือนกรองแสงประมาณ 50 % จนถึงระยะที่ต้นออกดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.1.2 การเตรียมดอกของต้นแม่พันธุ์

เลือกต้นแม่พันธุ์ที่มีก้านดอกแข็งแรง และคัดเลือกดอกตูมที่สมบูรณ์เพื่อทำหมันดอก โดยใช้มีดตัดกลีบดอกและเกสรตัวผู้ออกให้เหลือเฉพาะเกสรตัวเมีย สำหรับกรณีที่เป็นการผสมแบบผสมตัวเองนั้นไม่ตัดอับละอองเกสรของดอกออก จากนั้นคลุมดอกเหล่านั้นด้วยซองกระดาษและติดคลิบหนีบกระดาษเอาไว้เพื่อป้องกันการผสมข้ามจากละอองเกสรที่ไม่ต้องการ

2.2.1.3 การเตรียมละอองเกสรจากต้นพ่อพันธุ์

นำต้นที่ใช้เป็นพ่อซึ่งอยู่ในระยะดอกตูมหรือระยะก่อนดอกบาน 1 หรือ 2 วัน ไปไว้ในมุ้งตาข่ายสีขาว แยกพันธุ์ละ 1 มุ้งเพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายของละอองเกสรข้ามพันธุ์ หลังจากดอกบานแล้ว 1–2 วัน อับละอองเกสรจะแตกออกและปล่อยละอองเกสรออกมามีลักษณะเป็นผงสีเหลือง นำละอองเกสรจากอับละอองเกสรที่แตกแล้วดังกล่าวไปผสมกับดอกของต้นแม่

สำหรับคู่ผสมที่ออกดอกไม่พร้อมกันในสภาพธรรมชาติ ใช้วิธีการปฏิบัติ 2 วิธี คือ เก็บรักษาหัวพันธุ์ไว้ที่ 13 °ซ แล้วนำหัวพันธุ์ออกปลูก โดยกระยะเวลาปลูกให้คู่ผสมแต่ละคู่ออกดอกพร้อมกัน หรือ ใช้วิธีการเก็บรักษาละอองเกสรไว้ในสภาพอุณหภูมิต่ำเพื่อรอการผสมในช่วงที่ต้นแม่พันธุ์ออกดอกและพร้อมผสม

2.2.1.4 การผสมเกสร

เมื่อเกสรตัวเมียของดอกที่ใช้เป็นต้นแม่อยู่ในระยะพร้อมผสมซึ่งสังเกตได้จากยอดเกสรตัวเมียที่แผ่ออกและมีเมือกเหนียวใสคลุม นำละอองเกสรของดอกจากต้นพ่อพันธุ์ที่เตรียมไว้มาผสมแบบสลับพ่อแม่ด้วยมือ โดยเปิดซองกระดาษที่คลุมดอกต้นแม่ออกแล้วใช้พู่กันขนาดเล็กแตะละอองเกสรจากดอกของต้นพ่อมาแตะบนยอดเกสรตัวเมียของต้นแม่ จากนั้นใช้ซองกระดาษคลุมดอกของต้นแม่ไว้เหมือนเดิม พร้อมกับเขียนป้ายติดบอกคู่ผสม และวันที่ผสมไว้ที่ก้านดอกที่ผสมแล้ว สำหรับการผสมตัวเองในคู่ผสมที่เป็นแบบผสมตัวเองนั้นใช้พู่กันแตะละอองเกสรมาแตะบนยอดเกสรตัวเมียของต้นเดียวกัน

ผสมเกสรจำนวน 20 ดอกในแต่ละคู่ผสม ช่วงเวลาของการผสม คือ 7.00 – 9.00 น คู่ผสมมีดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คู่ที่ 1 R⊗
คู่ที่ 2 P⊗
คู่ที่ 3 O⊗
คู่ที่ 4 S⊗
คู่ที่ 5 G⊗
คู่ที่ 6 B⊗
คู่ที่ 7 R x P
คู่ที่ 8 R x O
คู่ที่ 9 R x S
คู่ที่ 10 R x G
คู่ที่ 11 R x B
คู่ที่ 12 P x R
คู่ที่ 13 P x O
คู่ที่ 14 P x S
คู่ที่ 15 P x G
คู่ที่ 16 P x B
คู่ที่ 17 O x R
คู่ที่ 18 O x P
คู่ที่ 19 O x S
คู่ที่ 20 O x G
คู่ที่ 21 O x B
คู่ที่ 22 S x R
คู่ที่ 23 S x P
คู่ที่ 24 S x O
คู่ที่ 25 S x G
คู่ที่ 26 S x B
คู่ที่ 27 G x R
คู่ที่ 28 G x P
คู่ที่ 29 G x O
คู่ที่ 30 G x S
คู่ที่ 31 G x B
คู่ที่ 32 B x R
คู่ที่ 33 B x P
คู่ที่ 34 B x O
คู่ที่ 35 B x S
คู่ที่ 36 B x G

2.2.1.5 การบันทึกข้อมูล

2.2.1.5.1 จำนวนดอกที่ผสมติด

2.2.1.5.2 ระยะเวลาในการติดฝักจนถึงระยะฝักแก่

2.2.1.5.3 จำนวนเมล็ดต่อฝัก

2.2.1.5.4 น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก

2.2.2 การทดสอบความงอกของละอองเกสรและการเก็บรักษาละอองเกสร

เก็บตัวอย่างละอองเกสรจากอับละอองเกสรของพืชทดลอง โดยเก็บจากดอกที่บานแล้ว 3 วัน ซึ่งระยะนี้เป็นระยะการบานที่อับละอองเกสรแตกเต็มที่ หลังจากเก็บมาแล้วแบ่งใส่ขวดสำหรับเก็บรักษาละอองเกสร แล้วนำขวดไปเก็บรักษาในสภาพที่แตกต่างกัน 2 สภาพ คือ

สภาพที่ 1 เปิดฝาขวดที่บรรจุละอองเกสรแล้วเก็บขวดเหล่านั้นไว้ในโถแก้วปิดฝาที่บรรจุ silica gel ไว้ภายใน ตั้งไว้ในห้องที่อุณหภูมิห้อง (25 – 28 °ซ)

สภาพที่ 2 เก็บขวดบรรจุละอองเกสรวิธีเดียวกับสภาพที่ 1 แต่นำโถแก้วไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 °ซ

นำละอองเกสรมาทดสอบความงอก เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 0, 1, 3, 6, 10, 15, 21, 28, 36, 45, 55, 66, 78, 91, 105 และ 120 วัน สุ่มละอองเกสรมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับเลี้ยงละอองเกสรโดยหยดอาหารเหลวลงบนกระจกสไลด์แผ่นละ 2 หยด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำกระจกสไลด์ไปวางไว้ในจานแก้วที่รองพื้นด้วยกระดาษกรองชุ่มน้ำเพื่อให้ความชื้นแก่ละอองเกสรในอาหาร โดยมีแท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมรองรับกระจกสไลด์ไว้ ปิดฝาจานแก้วและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ติดตามการงอกของละอองเกสรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกการงอกของท่อละอองเกสรต่อจำนวนละอองเกสรที่ตรวจพบทั้งหมด แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอกของละอองเกสร ทำ 3 ซ้ำต่อพันธุ์

2.2.3 การเพาะเมล็ดลูกผสม

หลังจากฝักแก่แกะเอาเมล็ดที่ได้จากคู่ผสมต่าง ๆ ไปเพาะในตะกร้าที่บรรจุวัสดุเพาะดังระบุในข้อ 2.1.1.3 เพาะเมล็ดเป็นแถว รดน้ำให้ชุ่ม ตั้งตะกร้าเพาะเมล็ดไว้ภายใต้โรงเรือนพรางแสงประมาณ 50 % บันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการงอกของเมล็ดและเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

2.2.4 การบันทึกการเจริญเติบโตของต้นลูกผสม

ติดตามการอยู่รอดของต้นอ่อนของลูกผสมที่ได้จากคู่ผสมแต่ละคู่ ตลอดจนการเจริญเติบโตทางใบ และการออกดอก บันทึกลักษณะทางสัณฐานของต้นลูกผสมที่สามารถอยู่รอดและเจริญเติบโตได้

การทดลองที่ 3 การศึกษาเซลล์วิทยา

การทดลองนี้เป็นการศึกษาคาริโอไทป์ของพืชทดลอง ซึ่งใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์ และศึกษาโครโมโซมของลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ โดยใช้เทคนิคการศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากด้วยวิธี Feulgen's squash ดัดแปลงโดย ดวงทิพย์ (2539) และประภัสสร (2543)

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ปลายรากของพืชทดลอง

3.1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างราก

3.1.3 water bath

3.1.4 ปรอทวัดความร้อน

3.1.5 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.1.6 กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์

3.1.7 วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ ปากคีบ มีดผ่าตัด เข็มเขี่ย กระบอกตวงสารเคมี และ น้ำยาทาเล็บ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.8 สารเคมี

3.1.8.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการหยุดวงชีพเซลล์ (pre-treatment)ได้แก่ para-dichlorobenzene (PDB)

3.1.8.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixtative) คือ 95 % ethyl alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1

3.1.8.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล (N)

3.1.8.4 สีย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 เตรียมรากของพืชทดลองโดยนำหัวของต้นที่จะศึกษามาตัดรากเก่าที่ติดมากับหัวออกให้หมด ผึ่งหัวให้แห้งแล้วนำไปชำในกระบะทราย รดน้ำให้ชุ่ม รากใหม่จะงอกออกมาจากฐานหัวภายใน 5 – 7 วัน

3.2.2 เก็บตัวอย่างปลายรากในเวลา 9.30 – 10.00 น โดยเลือกรากที่มีสีขาวและปลายรากมีสีขาวขุ่นให้มีความยาว 3 – 5 มิลลิเมตร (มม) ล้างรากให้สะอาด

3.2.3 หยุดวงชีพเซลล์ โดยแช่ปลายรากในสารละลาย PDB ที่อิ่มตัวในน้ำ เก็บไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิประมาณ 15 °ซ และไม่เกิน 18 °ซ เป็นเวลา 36 – 48 ชั่วโมง

3.2.4 รักษาสภาพเซลล์ โดยนำรากที่แช่ในสารละลาย PDB มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 2 – 3 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที แล้วล้างรากให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

3.2.5 ย่อยแยกเซลล์ โดยนำรากแช่ลงใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 5 – 10 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

3.2.6 ย้อมเนื้อเยื่อรากด้วยสี carbol fuchsin เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

3.2.7 นำเนื้อเยื่อที่ย้อมสีแล้ววางลงบนแผ่นกระจกสไลด์ ใช้มีดผ่าตัดตัดเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาวประมาณ 1 มม เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสี carbol fuchsin ลงไป 1 หยด จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย ใช้ปากคีบคีบส่วนของรากที่ไม่ต้องการออก แล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้กระดาษซับวางลงบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วกดแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อให้เซลล์กระจายและซับสีที่เกินออก

3.2.8 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีนิวเคลียสที่แบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟส และเป็นเซลล์ที่มีการกระจายตัวของโครโมโซมดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้แม่นยำ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดกระจกปิดสไลด์เบา ๆ เพื่อให้เซลล์แบนและอยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้น้ำยาทาเล็บทาบริเวณขอบกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้ง นำแผ่นสไลด์ไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ และบันทึกภาพโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.9 นำฟิล์มที่ล้างแล้วไปขยายด้วยเครื่องอัดรูป ตัดรูปโครโมโซม จัดคู่โครโมโซมให้หมายเลขโครโมโซม กำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ วัดความยาวของโครโมโซมจากภาพที่ถ่ายแล้วเทียบความยาวเป็นไมครอน และ วัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll) และความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) โดยใช้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์เป็นหลัก

3.2.10 นำค่า Ll และ Ls มาคำนวณหาค่า relative length (RL) และค่า centromeric index (CI) โดยคำนวณจากสูตร (กันยารัตน์, 2532) ดังนี้

$$\text{relative length (RL)} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT = Ll + Ls)}}{\text{ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกคู่ } (\Sigma \text{LT})}$$

$$\text{centromeric index (CI)} = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll)}}{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}$$

3.2.11 นำค่า CI มาใช้ในการกำหนดชนิดของโครโมโซม ดังนี้ โครโมโซมที่มีค่า CI ระหว่าง 0.5 - 0.599 จัดเป็น metacentric chromosome ค่า CI ระหว่าง 0.6 - 0.699 จัดเป็น submetacentric chromosome ค่า CI ระหว่าง 0.7 - 0.899 จัดเป็น acrocentric chromosome ค่า CI ตั้งแต่ 0.9 - 1.0 จัดเป็น telocentric chromosome (กันยารัตน์, 2532)

3.2.12 จัดขนาดของโครโมโซม โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ 1 เป็นคู่ที่ใหญ่ที่สุด (Large ; L) โครโมโซมขนาดกลาง (Medium ; M) ได้แก่ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมที่ใหญ่ที่สุดรวมกับโครโมโซมที่เล็กที่สุด M < 1 / 2 (LT เฉลี่ยคู่ที่ 1 + LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย) ส่วนโครโมโซมขนาดเล็ก (Small ; S) ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่สุด S < 1 / 2 (LT เฉลี่ยคู่ที่ 1)

3.2.13 ทำอิดิโอแกรม โดยจัดเรียงโครโมโซมตามขนาดของโครโมโซมคู่ใหญ่สุดไปหาคู่เล็กสุดให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่ในแนวเดียวกัน

3.2.14 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงและความแตกต่างของคาริโอไทป์ของพืชทดลองและเปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมตลอดจนลักษณะของโครโมโซมของลูกผสมที่ได้จากการผสมในคู่ผสมต่าง ๆ ตามความจำเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ทำการวิจัย

แปลงทดลองของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการ

เดือนกุมภาพันธ์ 2544 – เดือนพฤษภาคม 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved