

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ดาวเรือง

แม่พันธุ์ เป็นพันธุ์การค้าจากบริษัท เอ เอฟ เอ็ม ฟลาวเวอร์ ซีด จำกัด จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ Antigua Gold Jamaica Gold Inca Gold และ Sovereign Gold ลักษณะดอกมีเฉพาะดอกย่อยชั้นนอก (ray floret) และมีเกสรเพศผู้เป็นหมัน บริษัท เอ เอฟ เอ็ม ฟลาวเวอร์ ซีด จำกัด รายงานลักษณะประจำพันธุ์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ดังนี้

Antigua Gold ความสูงต้น 25-30 เซนติเมตร ดอกซ้อนและดก สีเหลืองทอง ขนาดดอก 8 เซนติเมตร มีการแตกพุ่มดี ทำให้ทรงต้นสวย อายุ 60 วัน สามารถออกดอกได้ เหมาะสำหรับปลูกเป็นไม้กระถางหรือปลูกประดับแปลง (ภาพที่ 3.1 A)

Jamaica Gold จัดอยู่ในกลุ่มดาวเรืองตัดดอกขนาดกลาง ต้นสูง 35-40 เซนติเมตร ทรงพุ่มขนาดย่อม ออกดอกต่อเนื่องและสม่ำเสมอ ดอกใหญ่แข็งแรงมาก สีดอกสวยสดใส ขนาดดอก 7-8 เซนติเมตร ออกดอกเมื่ออายุ 60-65 วัน เหมาะสำหรับปลูกเป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถาง (ภาพที่ 3.1B)

Inca Gold ความสูงต้น 35 เซนติเมตร ดอกซ้อนขนาดใหญ่ 10-12 เซนติเมตร สีเหลืองทอง ออกดอกเร็ว มีสีสดสวยตั้งแต่ดอกเริ่มบานจนถึงดอกโรย หรือแม้แต่สภาพอากาศที่ร้อนมาก เหมาะสำหรับเป็นไม้กระถางหรือปลูกประดับแปลง (ภาพที่ 3.1 C)

Sovereign Gold ความสูงต้น 90-100 เซนติเมตร มีดอกดก สีเหลืองทอง ขนาดดอกประมาณ 13 เซนติเมตร อายุการปักแจกันนาน เหมาะเป็นไม้ตัดดอกหรือทำพวงมาลัย (ภาพที่ 3.1D)



A



B



C



D

ภาพที่ 3.1 ลักษณะดอกแม่พันธุ์ ดาวเรือง 4 สายพันธุ์

A Antigua Gold (แอนทิกัว โกลด์)

B Jamaica Gold (จาไมก้า โกลด์)

C Inca Gold (อินคา โกลด์)

D Sovereign Gold (ซอฟเวอร์เรน โกลด์)

พ่อพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ ที่ได้จากการคัดเลือกโดยการผสมตัวเองจนกระทั่งลักษณะและสี
ดอกมีความคงตัวของศูนย์บริการการขยายพันธุ์ไม้ดอก ไม้ผล บ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ
อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ SN1 SN2 SN3 และ SN4

SN1 ลักษณะช่อดอกแบบดอกฟูกลม มีดอกย่อยชั้นนอก 1 ชั้น ดอกย่อยชั้นในยาวเห็น
ชัดเจน (ภาพที่ 3.2 A)

SN2 ลักษณะช่อดอกแบบดอกกระจุกชั้นเดียว มีดอกย่อยชั้นนอกชั้นเดียว ดอกย่อยชั้นใน
สั้นเป็นกระจุกตรงกลาง (ภาพที่ 3.2 B)

SN3 ลักษณะช่อดอกแบบดอกฟูกลม มีดอกย่อยชั้นนอก 1 ชั้น ดอกย่อยชั้นในยาวเห็น
ชัดเจน (ภาพที่ 3.2 C)

SN4 ลักษณะช่อดอกแบบดอกฟูกลม มีดอกย่อยชั้นนอก 1 ชั้น ดอกย่อยชั้นในยาวเห็น
ชัดเจน (ภาพที่ 3.4 D)



A



B



C



D

ภาพที่ 3.2 ลักษณะดอกพ้อพันธุ์ ดาวเรือง 4 สายพันธุ์

A SN1 B SN2 C SN3 D SN4

อุปกรณ์

1. ถาดเพาะกล้า และตะกร้าพลาสติกสำหรับเพาะกล้า
2. วัสดุเพาะกล้า ได้แก่ ขุยมะพร้าว และทรายละเอียด อัตราส่วน 1: 1
3. ถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 5 × 10 นิ้ว
4. วัสดุปลูก ประกอบด้วย ดิน : ปุ๋ยคอก : แกลบดิบ อัตราส่วน 2:1:1
5. ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15
6. สารเคมีป้องกันกำจัดโรค
7. อุปกรณ์การผสมเกสร ได้แก่ พู่กัน กล่องพลาสติกใส่อับละอองเรณู กรรไกร ป้ายชื่อ แอลกอฮอล์ คลิปหนีบกระดาษ ถังกระดาษคลุมดอก
8. อุปกรณ์การเก็บและบันทึกข้อมูล ได้แก่ สมุด ปากกา ดินสอ ไม้

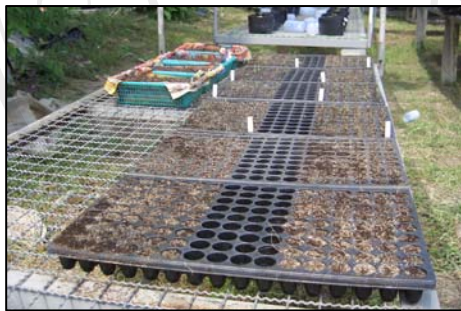
วิธีการ

1. การเตรียมต้นกล้าแม่พันธุ์ พ่อพันธุ์ ลูกผสมชั่วที่ 1 และลูกผสมชั่วที่ 2 การเตรียมต้นกล้ามีอยู่ 2 วิธีคือ

1.1 การเพาะกล้าในถาดเพาะกล้า (ภาพที่ 3.3 A) เป็นการเตรียมต้นกล้าแม่พันธุ์ และพ่อพันธุ์ เมื่อเมล็ดพันธุ์มีจำนวนน้อย และราคาแพง ประโยชน์ของการเพาะวิธีนี้คือต้นกล้าถูกกระทบกระเทือนน้อย ทำให้อัตราการรอดชีวิตสูง ต้นกล้ามีขนาดพอเหมาะ และระบบรากเจริญเติบโตเต็มที่พร้อมย้ายปลูกได้

1.2 การเพาะกล้าในตะกร้าพลาสติก (ภาพที่ 3.3 B) เป็นวิธีการเตรียมต้นกล้า ลูกผสมชั่วที่ 1 และชั่วที่ 2 เมื่อมีเมล็ดที่ต้องการเพาะจำนวนมาก

วัสดุเพาะกล้าใช้ขุยมะพร้าวผสมกับทรายละเอียด อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ทำการเพาะกล้าพ่อพันธุ์ก่อนแม่พันธุ์ประมาณ 15 วัน เพื่อให้ดอกบานในระยะเดียวกัน เนื่องจากแม่พันธุ์มีอายุสั้นกว่าพ่อพันธุ์



A



B

ภาพที่ 3.3 การเตรียมการเพาะกล้าและวิธีการ

A การเพาะกล้าในถาดเพาะกล้า

B การเพาะกล้าในตะกร้าพลาสติก

2. การปลูกและการดูแลรักษา

2.1 การย้ายกล้า เมื่อต้นกล้าอายุ 15-20 วันหรือมีใบจริง 3-5 ใบ

2.2 การปลูก ปลูกในถุงพลาสติกสีดำขนาด 5×10 นิ้ว จำนวน 1 ต้นต่อถุง โดยใช้วัสดุปลูกคือ ดินผสมกับแกลบดิบ และปุ๋ยคอก อัตราส่วน 1:1:1 โดยปริมาตร ปลูกในช่วงฤดูฝน และวางถุงปลูกบนโต๊ะปลูก

2.3 การให้น้ำ ดาวเรืองเป็นพืชที่ไม่ต้องการน้ำมาก แต่ต้องการสม่ำเสมอ จึงให้น้ำทุกวัน รดวันละครั้ง โดยใช้สายยางรดน้ำ

2.4 การใส่ปุ๋ย ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตราที่ใส่ 20 กรัมต่อถุง ทุก 15 วัน

2.5 การเด็ดยอด ทำการเด็ดยอดเมื่อต้นดาวเรืองมีใบจริง 4 คู่ เพื่อให้แตกกิ่งแขนง การเด็ดยอดทำการเด็ดให้ชิดกับส่วนของข้อ

2.6 การป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทำการพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคใบไหม้ทุก 15 วัน และกำจัดวัชพืชโดยวิธีการถอน

3. การผสมเกสร

3.1 การผสมเกสร ทำการผสมข้ามพันธุ์แบบพบกันหมด ได้ลูกผสมทั้งหมด 16 คู่ผสม ดังนี้

Antigua Gold × SN1 = คู่ผสม MC001

Jamaica Gold × SN1 = คู่ผสม MC002

Inca Gold × SN2 = คู่ผสม MC003

Sovereign Gold × SN1 = คู่ผสม MC004

Antigua Gold × SN2 = คู่ผสม MC005

Jamaica Gold × SN2 = คู่ผสม MC006

Inca Gold × SN2 = คู่ผสม MC007

Sovereign Gold × SN2 = คู่ผสม MC008

Antigua Gold × SN3 = คู่ผสม MC009

Jamaica Gold × SN3 = คู่ผสม MC010

Inca Gold × SN3 = คู่ผสม MC011

Sovereign Gold × SN3 = คู่ผสม MC012

Antigua Gold	× SN4	=	กลุ่มผสม MC013
Jamaica Gold	× SN4	=	กลุ่มผสม MC014
Inca Gold	× SN4	=	กลุ่มผสม MC015
Sovereign Gold	× SN4	=	กลุ่มผสม MC016

3.2 ช่วงเวลาการผสมเกสร

ทำการผสมเกสรประมาณ 08.00 – 12.00 น. เนื่องจากอับละอองเกสรเพศผู้พร้อมให้
ละอองเกสรเพศผู้สำหรับการผสม

3.3 ขั้นตอนการผสมเกสร (ภาพที่ 3.4)

3.3.1 เลือกดอกแม่พันธุ์ในระยะดอกตูม

3.3.2 ใช้กรรไกรตัดส่วนปลายของดอกย่อยชั้นนอกออก เพื่อสะดวกในการผสม
เกสร

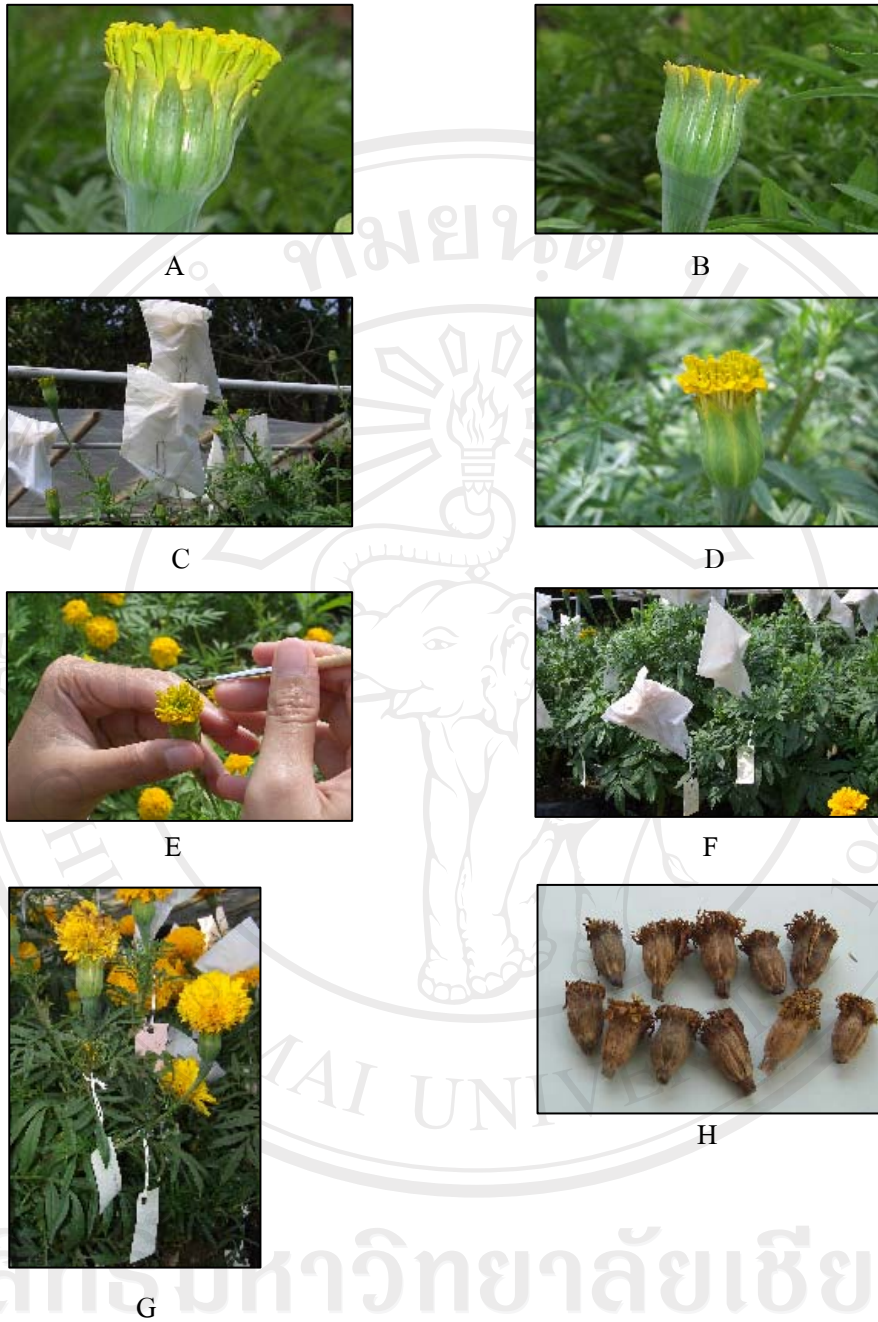
3.3.3 คลุมดอกแม่พันธุ์ที่ตัดดอกย่อยชั้นนอกออกแล้วด้วยถุงกระดาษ ทิ้งไว้
ประมาณ 3 วัน เพื่อป้องกันมิให้ดอกได้รับการผสมจากละอองเกสรเพศผู้จากต้นอื่น และช่วย
ป้องกันการแห้งของดอกด้วย

3.3.4 แกะถุงกระดาษที่คลุมออกเมื่อเห็นยอดเกสรเพศเมีย (stigma) โผล่ขึ้นมา
เหนือรอยตัดอย่างชัดเจน

3.3.5 เก็บละอองเกสรเพศผู้อย่างระมัดระวังการปนเปื้อนละอองเกสรจากต้นอื่นที่
ไม่ต้องการ โดยการคลุมดอกด้วยถุงกระดาษก่อนการเก็บละอองเกสรล่วงหน้า 1 วัน เมื่อต้องการใช้
ละอองเกสรทำการเก็บโดยการเจาะช่องดอก เพื่อให้ละอองเกสรร่วงลงมาใส่กล่องพลาสติกที่นำมา
รองรับ แล้วใช้ฟู่กันแตะละอองเกสรมาแตะบนยอดเกสรเพศเมีย เกลี่ยให้ทั่ว

3.3.6 หลังจากผสมเกสรเสร็จแล้วคลุมด้วยถุงกระดาษอีกครั้ง ทำการติดป้ายชื่อที่
มีรายละเอียดของกลุ่มผสม และวัน เดือน ปี ที่ผสม ต้องติดป้ายชื่อทันทีหลังการผสม เพื่อป้องกัน
ความผิดพลาดในการเก็บเมล็ดพันธุ์ ในแต่ละต้นทำการผสม จำนวน 10 ดอก

3.3.7 หลังจาก 7 วันแกะถุงกระดาษออก ปล่อยให้ดอกเจริญเติบโตและแห้งคาต้น
เนื่องจากช่วงการทดลองเป็นช่วงฤดูฝนการเก็บเมล็ดพันธุ์มีความชื้นสูงจึงต้องนำไปอบเพื่อลด
ความชื้นก่อน เก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ในซองกระดาษโดยเขียนชื่อกลุ่มผสม และเก็บป้ายชื่อที่ติดไว้ในขณะ
ผสมไว้ในถุงด้วย



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University
A H

ภาพที่ 3.4 ขั้นตอนการผสมเกสรดอกดาวเรือง
A เลือกดอกตูม B ตัดดอกย่อยชั้นนอก ด้วยกรรไกร C คลุมดอกด้วยถุงกระดาษ D ขอด
เกสรเพศเมียโผล่ขึ้นมาเหนือรอยตัด E ผสมเกสร F คลุมดอกด้วยถุงกระดาษและติดป้ายชื่อ
คู่ผสม G ปลอ่ยให้ดอกเจริญเติบโตและแห้งคาคั้น H ดอกแห้งพร้อมเก็บเมล็ดพันธุ์

4. การปลูกและการดูแลรักษาลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1)

นำเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากการผสมเกสร จำนวน 16 กลุ่มผสม ได้แก่ MC 001 ถึง MC 016 มาเพาะกล้าในตะกร้าพลาสติก และย้ายต้นกล้าที่มีใบประมาณ 4 คู่ มาปลูกในถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 5×10 นิ้ว ถุงละ 1 ต้น แต่ละกลุ่มผสมปลูกกลุ่มผสมละ 100 ต้น (ภาพที่ 3.5 A) เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะประจำพันธุ์ของลูกผสม ทำการปลูกในช่วงฤดูหนาว และวางถุงปลูกบนพื้นดิน มีการเจาะกันถุง เพื่อให้รากสามารถเจริญเติบโตในดินได้บางส่วน เพื่อพวงลำต้นไม่ให้ล้ม การดูแลรักษาทำเช่นเดียวกันกับการดูแลรักษาแม่พันธุ์ และพ่อพันธุ์ เมื่อเริ่มออกดอกทำการคลุมถุงกระดาษเฉพาะดอกที่มีเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ภายในดอกเดียวกัน เพื่อให้ดอกมีการผสมตัวเอง จำนวนกลุ่มผสมละ 15 ดอก เมื่อครบ 7 วัน เปิดถุงออกแล้วให้เมล็ดมีการเจริญจนกระทั่งดอกแห้ง เก็บเมล็ดที่ได้เป็นเมล็ดชั่วที่ 2

5. การปลูกและการดูแลรักษาลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2)

นำเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 2 ที่ได้มาเพาะกล้า และปลูกในช่วงฤดูฝน (ภาพที่ 3.5 B) ปลูกและดูแลรักษาเช่นเดียวกันกับลูกผสมชั่วที่ 1 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต ลักษณะประจำพันธุ์ และการกระจายตัวของลูกผสม



A



B

ภาพที่ 3.5 แปลงปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 และลูกผสมชั่วที่ 2

A แปลงปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 เมื่อย้ายกล้าลงถุง

B แปลงปลูกลูกผสมชั่วที่ 2 เมื่อต้นเริ่มออกดอก

6. การบันทึกข้อมูล

6.1 ศึกษาการเจริญเติบโต ได้แก่

6.1.1 วัดความสูงต้น โดยการวัดจากผิวดินถึงตายอด เมื่ออายุ 60 วัน หลังจากย้ายปลูก และนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

6.2 ศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ ได้แก่

6.2.1 สีดอก เทียบจาก The Munsell Limit Color Cascade, USA

6.2.2 ลักษณะช่อดอก

6.2.3 ลักษณะดอกย่อยชั้นนอก

6.2.4 ลักษณะดอกย่อยชั้นใน

6.3 ศึกษาขนาดของดอก (เซนติเมตร) ตามลักษณะของช่อดอก โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของดอก สุ่มเก็บข้อมูลกลุ่มผสมละ 10 ดอกต่อลักษณะดอก 1 ลักษณะ และนำมาหาค่าเฉลี่ย

6.4 จำนวนดอกย่อยชั้นใน และดอกย่อยชั้นนอกต่อดอก ทำการแยกกลีบดอกย่อยชั้นใน และดอกย่อยชั้นนอกแต่ละดอก เพื่อนับจำนวน

7. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของแม่พันธุ์ พ่อพันธุ์ ลูกผสมชั่วที่ 1 และลูกผสมชั่วที่ 2 โดยวิธี Squashing (อดิศร, 2546)

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 ปลายรากดาวเรืองที่ได้จากการเพาะเมล็ดและปักชำกิ่ง

7.1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

7.1.3 สไลด์ (slide) และแผ่นปิดสไลด์ (cover slip)

7.1.4 เข็มเจีย

7.1.5 ปากคีบปลายแหลม

7.1.6 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound microscope

7.1.7 สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้ยับยั้งการเกิดเส้นไฮสปินเดิล (pre-treating agent)

ได้แก่ para-dichlorobenzene ในรูปของสารละลายอิ่มตัวในน้ำ

- น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative) เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์

ให้เร็วที่สุด โดยที่เซลล์ดังกล่าวต้องมีสภาพเหมือนกับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ น้ำยารักษาสภาพเซลล์ที่ใช้ผลดีคือ Acetic-alcohol fixative ประกอบด้วยส่วนผสมของ glacial acetic acid 1 ส่วน กับ absolute ethanol 3 ส่วน

- นำมาย่อยสลาย (macerating fluid) เพื่อช่วยให้เซลล์ที่ปลายรากพืชแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล

- ลีซียมโครโมโซม Lacto-propionic orcein

7.2 ขั้นตอนการศึกษาจำนวนโครโมโซม (สิริกัญญา, 2548)

7.2.1 ตัดปลายรากดาวเรืองให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตรโดยตัดเฉพาะส่วนที่กำลังมีการเจริญเติบโต สังเกตจากรากที่มีสีขาวและปลายรากมีสีขาวขุ่นเล็กน้อย ตัดปลายรากซึ่งเน้นเวลาที่เหมาะสมในการนำปลายรากมาศึกษาในช่วงเวลา 09.00-09.30 น.

7.2.2 แช่ปลายรากในสารละลาย para-dichlorobenzene เพื่อยับยั้งการเกิดเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง (สิริกัญญา, 2548) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แต่ไม่เกิน 18 องศาเซลเซียส

7.2.3 นำปลายรากมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปรักษาสภาพเซลล์ นานประมาณ 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

7.2.4 แยกเซลล์โดยการแช่ปลายรากในกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำ

7.2.5 ย้อมสีปลายรากด้วยลีซียม Lacto-propionic orcein

7.2.6 เตรียมสไลด์โดยการนำปลายรากที่ย้อมสีแล้ววางบนแผ่นสไลด์ ใช้เข็มเย็บตัดเฉพาะส่วนปลายรากไว้ประมาณ 1 มิลลิเมตร เอาส่วนที่เหลือทิ้งไป หยดสีหยดเล็ก ๆ ที่ปลายรากดังกล่าว ก่อนหยดสีหากปลายรากมีหยดน้ำ ใช้กระดาษทิชชูซับเอาหยดน้ำออกก่อน และถ้าสีที่หยดมากเกินไปใช้กระดาษทิชชูซับออกด้วย จากนั้นใช้เข็มเย็บยึดปลายรากและใช้ด้ามของเข็มเย็บค่อย ๆ เคาะบนเนื้อเยื่อ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ หากต้องการให้เซลล์กระจายตัวมากยิ่งขึ้นใช้ด้ามเข็มเย็บเคาะด้านบนของแผ่นปิดสไลด์หลาย ๆ ครั้ง ต่อมาทำการกด (squash) เพื่อให้เซลล์แบนเป็นระนาบเดียวกัน ทำได้โดยการนำกระดาษทิชชูที่พับไว้หลาย ๆ ชั้นวางบนแผ่นปิดสไลด์ แล้วใช้หัวแม่มือกดลงตรง ๆ ระวังอย่าให้แผ่นปิดสไลด์เคลื่อนที่ เพราะทำให้เซลล์แตก

7.2.7 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมซึ่งอยู่ในระยะ metaphase กระจายอยู่ทั่วๆไปในนิวเคลียสที่สามารถนับจำนวนได้ จำนวน 1 เซลล์ต่อ 1 ลักษณะช่อดอกของทุกคู่ผสม