สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

การเตรียมเนื้อเยื่อเจริญปลายรากของแฝกจากกลุ่มพันธุ์สงขลาและนครสวรรค์เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม

Preparation of Chromosome from Root Tips of Songkhla and Nakornsawan Ecotypes of Vetiver Grass for Chromosome Counting

T109028

โดย

นางสาวชลลดา บริสุทธิ์

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 109028
วัน,เดือน,ปี - 2 มิ.ย. 2553

b.....
i.....

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชสวน)

พุทธศักราช 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาพืชสวน

การเตรียมเนื้อเยื่อเจริญปลายรากของแฝกจากกลุ่มพันธุ์สงขลา
และนครสวรรค์เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม

Preparation of Chromosome from Root Tips of Songkhla and Nakornsawan Ecotypes of Vetiver Grass for Chromosome Counting

โดย

นางสาวชลลดา บริสุทธิ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

.....

(ผศ.มณทินี ธีรารักษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

วันที่ 4 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2552

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร.สมชาย กล้าหาญ)

หัวหน้าภาควิชาพืชสวน

วันที่ 6 เดือน มี.ค. พ.ศ. 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนช่วยเหลือจากหลายฝ่ายด้วยกัน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.มณทินี ธีรารักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ที่ช่วยกรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ติดตามความก้าวหน้าและช่วยแก้ไขปัญหา อุปสรรค และข้อบกพร่อง ทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.จำรูญ เล้าสินวัฒนา ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำต่างๆ

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอการบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยเป็นกำลังใจ ส่งเสริมในทุกๆด้านมาตลอด ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆที่คอยช่วยเหลือ และขอขอบคุณภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเป็นสถานศึกษาและมีส่วนช่วยให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

ชลลดา บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง : การเตรียมเนื้อเยื่อเจริญปลายรากของแฝกจากกลุ่มพันธุ์สงขลาและนครสวรรค์เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม

โดย : นางสาวชลลดา บริสุทธิ์

สาขาวิชา : พืชสวน

ภาควิชา : พืชสวน

คณะ : เทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.มณทินี ธีรารักษ์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการเตรียมสไลด์สำหรับการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของแฝก (Vetiver) กลุ่มพันธุ์สงขลา และกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ ในระยะไมโทซิส ด้วยเทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์ และย้อมสีโครโมโซมด้วยสี Giemsa ผลการศึกษาสรุปได้ดังนี้ เวลาที่เหมาะสมในการเก็บรากกลุ่มพันธุ์สงขลา คือ 9.30 น. ส่วนกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ เวลาที่เหมาะสมในการเก็บราก คือ 10.00 น. หยุดวงชีพเซลล์ด้วย 8-hydroxyquinoline เข้มข้น 0.002 M นาน 10 ชั่วโมง นำเซลล์ปลายรากแฝกมาย่อยด้วยเอนไซม์ ที่ประกอบด้วย cellulase 12% pectnase 8% ละลายในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 0.01 M citrate และ 0.001 sodium citrate เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และย้อมสีด้วย Giemsa เข้มข้น 5% เป็นเวลา 15 นาที พบโครโมโซมแฝกทั้งสองกลุ่มพันธุ์อยู่ในระยะเมทาเฟส และมีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 20$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title : Preparation of Chromosome from Root Tips of Songkhla and Nakornsawan Ecotypes of Vetiver Grass for Chromosome Counting

By : Miss Chonlada Borisut

Major : Horticulture

Departmant : Horticulture

Faculty : Agricultural Technology

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Advisor : Assist.Prof. Montinee Teerarak

The aim of this experiment was to establishing cytogenetic method to study chromosome number in Songkhla and Nakornsawan ecotypes of vetiver grass. For mitotic chromosome counting, the cytogenetic method used was root tips collecting, pretreatment with 8-hydroxyquinoline, enzymatic maceration and stained chromosome with Giemsa solution. The results showed that the suitable time of root tips of Songkhla ecotype collecting was 9.30 a.m. whereas the time of root tips of Nakornsawan ecotype collecting was 10.00 a.m. The root tips were pretreated with 0.002 M 8-hydroxyquinoline for 10 hours and then were macerated in an enzyme mixture containing cellulase 12% and pectinase 8% in buffer containing 0.01 M citrate and 0.001M sodium citrate. Chromosomes were stained with 5% Giemsa solution for 15 minutes. The chromosome complements of the both ecotypes which exhibited at metaphase were found to be 2n=2x=20.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

สารบัญ	i
สารบัญภาพ	ii
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	1
ตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์	13
วิธีการ	13
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	16
สรุปผลการทดลอง	24
เอกสารอ้างอิง	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลา เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ cellulase และpectinase ที่ระยะเวลาต่างๆ (กำลังขยาย 40x)	18
2	เนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ cellulase และ pectinase ที่ระยะเวลาต่างๆ (กำลังขยาย 40x)	19
3	เนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลา ที่แบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะต่างๆ (กำลังขยาย 40x)	20
4	เนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ ที่แบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระต่างๆ (กำลังขยาย 40x)	21
5	เนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลา ที่แช่สาร 8- hydroxyquinoline (กำลังขยาย 100x)	22
6	เนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ ที่แช่สาร 8- hydroxyquinoline (กำลังขยาย 100x)	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

แฝก (Vetiver) เป็นพืชวงหญ้าที่จัดอยู่ในสกุล (Genus) Vetiveria พบแพร่กระจายในภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก เป็นพืชที่มีความสำคัญเนื่องด้วยพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช ทรงตระหนักถึงความสำคัญและความจำเป็นในการป้องกันการชะล้างพังทลายของดินซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศ นอกจากนี้ยังใช้แฝกในการป้องกันความเสื่อมโทรมของทรัพยากรดินและทรัพยากรน้ำ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงได้พระราชทานพระราชดำริให้ใช้แฝกในการอนุรักษ์ดินและน้ำ เพื่อป้องกันการชะล้างพังทลายและปรับปรุงสภาพแวดล้อมให้ดีขึ้น เนื่องจากแฝกมีรากที่ยาวหยั่งลึก และแผ่กระจายเป็นลักษณะตาข่ายลงไปในดิน เสมือนเป็นกำแพงธรรมชาติที่มีชีวิต นอกจากนี้แฝกยังมีประโยชน์ทางด้านหัตถกรรมโดยนำแฝกมาผลิตเป็นเครื่องใช้สอยต่างๆ จึงมีนักวิทยาศาสตร์และนักวิชาการให้ความสนใจค้นคว้าเรื่องราวเกี่ยวกับแฝกในด้านต่างๆ เช่น การอนุรักษ์ดินและน้ำ การขยายพันธุ์ สรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา รวมทั้งการสำรวจและจำแนกชนิด กลุ่มพันธุ์ของแฝก การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของแฝกส่วนใหญ่จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช และสภาพทางนิเวศของพื้นที่ที่พืชนั้นขึ้นอยู่ เช่น ความสูงต่ำของพื้นที่ เนื้อดิน สภาพการระบายน้ำ เป็นต้น โดยตั้งข้อสมมติฐานว่า แฝกในสภาพธรรมชาติที่มีสภาพทางกายภาพแตกต่างกันน่าจะมีความแตกต่างในลักษณะทางกลุ่มพันธุ์ (ecotype) คือ แฝกกลุ่ม (*Vetiveria zizanioides* Nash) และแฝกดอน (*Vetiveria nemoralis* A.Camus) กรมพัฒนาที่ดิน (2541) ดังนั้นหากมีข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ของแฝก เช่น จำนวนโครโมโซม ประกอบเป็นข้อมูลพื้นฐาน จะช่วยให้การศึกษาชีววิทยาของแฝกมีความกระจ่างมากยิ่งขึ้น ซึ่งนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์แฝกต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเทคนิคการเตรียมโครโมโซมจากปลายรากของแฝก (Vetiver) กลุ่มพันธุ์สงขลา และกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ในระยะเมทาเฟส ด้วยเทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์
2. เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมของแฝกในกลุ่มพันธุ์สงขลา และกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

1. แฝก (Vetiver)

แฝกจัดเป็นพืชที่อยู่ในสกุล Vetiveria เป็นพืชล้มลุกมีอายุได้หลายปี (กรมพัฒนาที่ดิน, 2541) แหล่งเดิมหรือศูนย์กลางการแพร่กระจายแฝกสันนิษฐานว่าอยู่บริเวณตอนกลางและตอนใต้ของประเทศอินเดียและได้แพร่กระจายลงมาครอบคลุมตลอดภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในปัจจุบันจึงปรากฏอยู่แพร่หลายทั่วไป โดยเฉพาะประเทศในแถบเส้นศูนย์สูตรของทวีปเอเชีย หมู่เกาะในมหาสมุทรอินเดียและแปซิฟิก ทวีปแอฟริกา ทวีปออสเตรเลีย ทวีปอเมริกากลาง ทวีปอเมริกาใต้ และตอนใต้ของทวีปอเมริกาเหนือ แฝกสามารถเจริญเติบโตได้ดีในทุกสภาพแวดล้อม ได้แก่ สภาพภูมิประเทศที่ราบใกล้เคียงระดับน้ำทะเลถึงพื้นที่ภูเขาสูงจากระดับน้ำทะเล 2,600 เมตร สภาพภูมิอากาศตั้งแต่ฝนตกชุกเกือบตลอดปี เช่น ในประเทศมาเลเซียจนถึงเขตแห้งแล้งในประเทศอินเดีย นอกจากนี้ยังสามารถเติบโตในสภาพดินเกือบทุกประเภทตั้งแต่ดินเปรี้ยว ดินเค็ม ไปจนถึงดินด่าง และเจริญในสภาพหนาวเย็นต่ำกว่าศูนย์องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิร้อนถึง 45 องศาเซลเซียส

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

แฝกมีชื่อสามัญว่า Vetiver เป็นพืชวงศ์หญ้า (Gramineae) อยู่ในสกุล *Vetiveria* เป็นพืชที่มีอายุหลายปี ขึ้นเป็นกอแน่น เส้นผ่าศูนย์กลางกอประมาณ 30 เซนติเมตร มีความสูงประมาณ 100-150 เซนติเมตร โคนต้นมีลักษณะแบบใบแตกออกจากโคน กอเรียงซ้อนกันแน่น ใบมีรูปขอบขนานปลายสอบแหลมยาว 30-80 เซนติเมตร มีส่วนกว้างประมาณ 5-9 มิลลิเมตร สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ

ลำต้น

แฝกเป็นหญ้าที่ขึ้นเป็นกอมีลักษณะเป็นพุ่มใบตั้งตรงขึ้นสูง ขึ้นอยู่เป็นกลุ่มใหญ่หรือกระจายกันอยู่ไม่ไกลมากนัก กอแฝกมีขนาดค่อนข้างใหญ่ โคนกอเบียดกันแน่น เป็นลักษณะเฉพาะอย่างหนึ่งที่แตกต่างจากหญ้าอื่นๆค่อนข้างชัดเจน ส่วนโคนของลำต้นจะแบนเกิดจากส่วนของโคนใบที่จัดเรียงพับซ้อนกัน ลำต้นแท้จะมีขนาดเล็กซ่อนอยู่ในกาบใบบริเวณคอดิน การเจริญเติบโตและการแตกกอของแฝกจะมีการแตกหน่อใหม่ทดแทนต้นเก่าอยู่เสมอ โดยจะแตกหน่อ ออกทางด้านข้างรอบกอดินทำให้กอมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ โดยปกติแล้วแฝกมีลำต้นสั้นข้อ และปล้องไม่ชัดเจน การแตกตะเกียงและการยกลำต้นขึ้นเตี้ยๆเหนือพื้นดินไม่พบมากให้สภาพที่อุดมสมบูรณ์ แต่เป็นลักษณะที่พบได้ทั่วไปในถุงปลูกแฝก (วีระชัย, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบ

ใบของแฝกจะแตกออกจากโคนกอ มีลักษณะแคบยาว ขอบใบขนาน ปลายสอบแหลม แผ่นใบกร้าน โดยเฉพาะใบแก่ขอบใบและเส้นกลางใบมีหนามละเอียด (spinulose) หนามบนใบมีส่วนโคนและกลางแผ่นจะมีน้อย แต่จะมีมากบริเวณปลายใบมีลักษณะตั้งทแยงปลายหนามชี้ขึ้นไปทางปลายใบ กระจังหรือเยื่อน้ำฝนที่โคนใบ (ligule) จะลดรูปมีลักษณะเป็นเพียงส่วนโค้งของขนสั้นละเอียด บางครั้งสังเกตได้ไม่ชัดเจน (วีระชัย, 2536)

ราก

รากเป็นส่วนสำคัญและเป็นลักษณะพิเศษของแฝกที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นหลักหญ้าส่วนใหญ่ โดยทั่วไปจะมีรากเป็นระบบรากฝอย (fibrous roots) แตกจากส่วนลำต้นใต้ดินกระจายออกแผ่กว้างเพื่อยึดพื้นดินตามแนวนอน (horizontal) มีระบบรากแนวดิ่ง (vertical)ไม่ลึกมาก แต่ระบบรากของแฝกจะแตกต่างจากรากหญ้าส่วนใหญ่ทั่วไป คือ มีรากที่สานกันแน่นหยั่งลึกแนวดิ่งลงในแนวดินไม่แผ่ขนานรากแขนง โดยเฉพาะมีรากฝอยแนวดิ่งจำนวนมาก (วีระชัย, 2536)

1.2 ชนิดของแฝก (*Vetiveria spp.*)

แฝกมีอยู่ในโลกประมาณ 11 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีแหล่งกระจายพันธุ์แตกต่างไป ดังตารางที่ 1 ในประเทศไทยนักพฤษศาสตร์ได้ตรวจสอบพบว่ามีอยู่เพียง 2 ชนิด ได้แก่ แฝกหอม (*V.zizanioides* Nash) และแฝกดอน (*V.nemoralis* A.Camus) กรมพัฒนาที่ดิน (2541) ในธรรมชาติพบว่าแฝกทั้ง 2 ชนิด มีกระจายทั่วไป ขึ้นได้ดีทั้งในสภาพที่ลุ่มและที่ดอนในสภาพต่างๆจากความสูงใกล้ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับประมาณ 800 เมตร

แฝกหอม

แฝกหอมหรือแฝกกลุ่มเป็นพืชที่มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีและ เป็นไปได้ค่อนข้างเร็ว แฝกหอมมีใบยาว 45-90 (100) เซนติเมตร กว้าง 0.6-0.9 (1.2) เซนติเมตร มีหลังโค้งปลายใบแบน มีสีเขียวเข้ม เนื้อใบค่อนข้างเนียน มีไขเคลือบ (wax) ทำให้ดูมัน ท้องใบมีสีขาวซีดกว่าด้านหลังใบและเมื่อนำใบส่องดูกับแดดจะเห็นรอยกั้น (septum) ขวางในเนื้อใบค่อนข้างชัดเจนโดยเฉพาะพื้นใบบริเวณส่วนโค้งและกลางใบ เส้นกลางใบ (midrib) ฝังอยู่ในแผ่นไม่โตหรือเห็นชัดเจน แฝกหอมรากจะมีกลิ่นหอมสามารถนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ ซึ่งผลผลิตและคุณภาพน้ำมันหอมนี้แปรผันไปตามพันธุ์และยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่นอายุ ความสมบูรณ์ของดิน วิธีการสกัด เป็นต้น แฝกหอมอายุประมาณ 1 ปี จะมีรากหยั่งลึกกว่าประมาณ 1 เมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพของดินและความอุดมสมบูรณ์ของพืช ในสภาพธรรมชาติดินร่วนปนทรายที่มีการระบายน้ำได้ดี แฝกจะให้รากยาวที่สุด ตัวอย่างแฝกหอมที่ได้มาจากแหล่งพันธุกรรมต่างๆ ได้แก่ กำแพงเพชร 2 เชียงราย สงขลา 1 สงขลา 2 สงขลา 3 สุราษฎร์ธานี ตรัง 1 ตรัง 2 ศรีลังกา เชียงใหม่ และแม่ฮ่องสอน (วีระชัย, 2536; วิฑูร, 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แฝกดอน

แฝกดอนหรือแฝกพื้นบ้านจะพบทั่วไปในที่สภาพแห้งแล้งหรือที่ระบายน้ำได้ดี ในทุกภาคของประเทศไทยโดยเฉพาะป่าเต็งรัง แฝกดอนมีใบยาว 35-60 (80) เซนติเมตร กว้าง 0.4-0.6 (0.8) เซนติเมตร ใบสีเขียดซีด หลังใบพับเป็นสันสามเหลี่ยม เนื้อใบหยาบ สากคาย มีไขเคลือบน้อยทำให้ดูกร้านไม่เคลือบมัน ท้องใบมีสีเดียวกับด้านหลังใบแต่มีสีซีดกว่าแผ่นใบเมื่อส่องกับแดดไม่เห็นรอยกั้นในเนื้อใบ เส้นกลางใบสังเกตได้ชัดเจนมีลักษณะแข็งเป็นแกนนูนทางด้านหลัง ช่อดอกจะมีได้หลายสี ได้แก่สีขาวครีมถึงสีม่วงอมแดง ซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ โดยทั่วไปแฝกดอนที่มีอายุประมาณ 1 ปีจะมีรากหยั่งลึกได้ประมาณ 80-100 เซนติเมตร ตัวอย่างแฝกดอนที่ได้มาจากแหล่งพันธุกรรมต่างๆ ได้แก่ อุดรธานี 1 อุดรธานี 2 นครพนม 1 นครพนม 2 ร้อยเอ็ด ชัยภูมิ เลย สระบุรี 1 สระบุรี 2 ราชบุรี และกำแพงเพชร 1 (วีระชัย, 2536; วิฑูร, 2541)

ตารางที่ 1 ชนิดของแฝกและแหล่งกระจายพันธุ์

ชนิดของแฝก	แหล่งที่พบ
1.*V.elongata*(RBR) Staf ex CE.Hubbard	นิวกินี ออสเตรเลีย
2.*V.festucoides* (Presl) ohwi	ญี่ปุ่น
3.*V.filipes* CE. Hubbard	นิวกินี ออสเตรเลีย (ควีนส
แลนด์)	
4.*V.fulvibarbis* Stapf	แอฟริกากลาง และแอฟริกา
ตะวันออก	
5.*V.intermedia* S.T. Blake	ออสเตรเลีย (ควีนสแลนด์)
6.*V.iawasonii* (Hook.f.) Blatt.et McCann	อินเดีย
7.*V.nemoralis* (Balansa) A.Camus	เอเชียตะวันออกเฉียงใต้
8.*V.nigritrana* Stapf	แอฟริกากลาง และแอฟริกา
ตะวันออก	
9.*V.paucifrora* S.T.Blake	ออสเตรเลีย (ควีนสแลนด์)
10.*V.rigida* B.K. Simon	ออสเตรเลีย (ควีนสแลนด์)
11.*V.zizanioides* Nash	เอเชียกลางและเอเชีย
ตะวันออกเฉียงใต้	

ที่มา : กรมพัฒนาที่ดิน (2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 การจัดจำแนกพันธุ์แฝกในทางกายภาพ

การจัดจำแนกพันธุ์ในทางกายภาพเป็นการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตเป็นกลุ่มใหญ่ๆตามหลักเกณฑ์ ดังต่อไปนี้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ซึ่งการนำโครงสร้างที่เห็นเด่นชัดมาเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต มีข้อเสีย คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมได้

แบบแผนการเจริญของสิ่งมีชีวิตตั้งแต่แรกเริ่มนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกโดยอาศัยหลักที่ว่าสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดมากย่อมจะมีรูปแบบการเจริญเติบโตคล้ายกันมาก

พฤติกรรมความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตกับสิ่งแวดล้อมตลอดจนการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ สามารถใช้ในการจัดจำแนกได้เช่นกัน

ได้มีผู้จัดจำแนกพันธุ์แฝกโดยใช้เกณฑ์ต่างๆกันสรุปได้ดังนี้

จเร (2535) จัดจำแนกพันธุ์แฝกในประเทศไทยออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ พันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก โดยพันธุ์ป่าเป็นพันธุ์ที่ออกดอก มีลำต้นหนาปานกลาง มีรากแขนงมาก ส่วนพันธุ์ปลูกเป็นพันธุ์ที่ไม่ออกดอก ลำต้นหนากว่าและรากแตกแขนงน้อยกว่า นอกจากนี้รากของแฝกป่าจะไม่มีกลิ่นหอม

วีรชัย (2536) จำแนกพันธุ์แฝกเพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบ โดยแบ่งออกเป็น 12 แหล่งพันธุกรรมตามแหล่งที่มา ได้แก่ แหล่งพันธุกรรมอุทัยธานี ราชบุรี พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ขอนแก่น เลย เพชรบุรี อุบลราชธานี นครพนม สกลนคร และสุราษฎ์ธานี

กรมพัฒนาที่ดิน (2541) มีการรวบรวมแฝกจากแหล่งต่างๆทั่วประเทศ และสำรวจคัดเลือกแฝกตามระบบทางนิเวศวิทยา(ecosystem) ที่พบในธรรมชาติ ซึ่งสภาพของพื้นที่ต่างกัน เช่นความสูงต่ำของพื้นที่ เนื้อดิน การระบายน้ำ เป็นต้น โดยตั้งสมมุติฐานที่ว่าแฝกในธรรมชาติที่มีสภาพทางกายภาพแตกต่างกันน่าจะมีความแตกต่างกันในกลุ่มพันธุ์และการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ทั้งนี้เพื่อเลือกแหล่งพันธุกรรมที่เหมาะสมต่อการใช้ที่ดินประเภทต่างๆเช่น ดินร่วน ดินทราย ดินเหนียว เป็นต้น ส่วนการตั้งชื่อกลุ่มพันธุ์จะใช้ชื่อจังหวัดที่พบเป็นชื่อกลุ่มพันธุ์ หากพบมากกว่า 1 แห่งจะเรียงลำดับเป็นกลุ่มพันธุ์ที่ 1 และที่ 2 โดยเริ่มต้นจากจากแหล่งที่พบบนที่ดอนเป็นกลุ่มพันธุ์ที่ 1 และที่ลุ่มเป็นกลุ่มพันธุ์ที่ 2 เช่น กำแพงเพชร 1 และกำแพงเพชร 2 ยกเว้นจังหวัดที่พบในที่ลุ่มหรือดอนเพียงอย่างเดียวแต่มาจากหลายพื้นที่จะเรียงลำดับเป็น 1, 2 และ 3 เช่นเดียวกัน เช่น แหล่งพันธุกรรมสงขลา 1 สงขลา 2 และสงขลา 3 เป็นต้น จากการคัดเลือกพบว่าแหล่งพันธุกรรมที่น่าสนใจและนำมาศึกษาวิจัยเปรียบเทียบพันธุ์ทั้งหมดมี 28 แหล่งพันธุกรรมที่ขึ้นทะเบียนของกรมพัฒนาที่ดิน ตัวอย่างแฝก 28 พันธุกรรมในประเทศไทย (ตามทะเบียนของกรมพัฒนาที่ดิน) แฝกหอมได้แก่ กำแพงเพชร 2 เชียงราย สงขลา 1 สงขลา 2 สงขลา 3 สุราษฎร์ธานี ตรัง 1 ตรัง 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศรีลังกา เชียงใหม่ และ แม่ฮ่องสอน แฝกดอนได้แก่ อุดรธานี 1 อุดรธานี 2 นครพนม 1 นครพนม 2 ร้อยเอ็ด ชัยภูมิ เลย สระบุรี 1 สรระบุรี 2 ราชบุรี และ กำแพงเพชร 1

2. โครโมโซม (Chromosome)

โครโมโซม คือโครงสร้างทางพันธุกรรม (heredity structure) ซึ่งเป็นที่อยู่ของหน่วยพันธุกรรม โครโมโซมทำหน้าที่เก็บรักษา (storage) ถ่ายทอด (transmission) และแสดงออก (expression) ของข้อมูลพันธุกรรม (genetics information) (กันยารัตน์, 2532) เป็นองค์ประกอบของนิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotion) มีสมบัติในการย้อมติดสีที่เป็นเบสได้ (basic dye) เช่น อะซีโตคาร์มีน (aceto-carmine) อะซีโตออร์ซีน (aceto-orcein) และสีกิมซ่า (Giemsa)รูปร่างของโครโมโซมจะเปลี่ยนแปลงขณะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส และไมโอซิส โครโมโซมต้องมีรูปร่าง ขนาดและจำนวนคงที่ในแต่ละเซลล์ เมื่อดูโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นโครโมโซมเป็นแท่ง ซึ่งนิยมตรวจนับเซลล์ในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส และระยะไดอะไคเนซิสหรือเมตาเฟสI ในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส

2.1 ขนาดของโครโมโซม (Chromosome size)

ขนาดของโครโมโซมจะผันแปรได้ในระยะต่างๆของการแบ่งเซลล์และชนิดของพืช โครโมโซมมีขนาดสั้นที่สุดในระยะเมตาเฟส และเป็นระยะที่ใช้กำหนดขนาดของโครโมโซม ในพืชชั้นสูง *Trillium sp.* เป็นพืชที่มีไมโทติดโครโมโซมยาวที่สุด อาจยาวถึง 30 ไมครอน โดยทั่วๆไปพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะมีโครโมโซมใหญ่กว่าพืชใบเลี้ยงคู่ แต่มีข้อยกเว้นในพืชบางชนิด ในพวกราส่วนมากจะมีโครโมโซมขนาดค่อนข้างเล็ก โครโมโซมที่มีขนาดเล็กที่สุดมีขนาด 0.25 ไมครอน ในพืชแต่ละชนิดจะพบว่าขนาดของโครโมโซมที่เมทาเฟสจะค่อนข้างคงที่ แต่บางครั้งความแปรผันของขนาดโครโมโซมก็อาจพบได้ในเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน ขนาดของโครโมโซมไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้จำนวนยีน ขนาดของโครโมโซมที่แตกต่างกันอาจมีความสัมพันธุ์กับส่วนของโครโมโซมที่ไม่มียีนอยู่และระดับการหดตัวของโครโมโซม (นิตย์ศรี, 2541)

2.2 จำนวนของโครโมโซม (Chromosome number)

โดยทั่วไปจำนวนโครโมโซมในนิวเคลียสจะคงที่สำหรับเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ความแปรผันของจำนวนโครโมโซมในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดก็อาจพบได้ เช่น จำนวนโครโมโซมเพศจะแตกต่างกันทั้งสองเพศในพวก *Humulus laponicas* เพศเมียมีโครโมโซม XX เพศผู้มีโครโมโซมเป็น XXX ดังนั้นความแปรผันของจำนวนโครโมโซมอาจเนื่องมาจาก supernumerary chromosome ซึ่งโครโมโซมดังกล่าวไม่ได้จำเป็นต่อการดำรงชีวิต และมีจำนวนได้แตกต่างกันในพืชแต่ละต้น ความแปรผันของจำนวนโครโมโซมอาจเนื่องมาจากการจัดเรียงตัวแบบต่างๆกันในพืช นอกจากนี้จะพบความไม่คงตัวได้เมื่อโครโมโซมมากๆ เช่น พอลิพลอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(polypliod) บางชนิดจะมีโครโมโซมเล็กๆอยู่มาก โอกาสที่โครโมโซมเล็กๆนี้จะสูญหายไปเกิดขึ้นได้เสมอ จำนวนโครโมโซมจะผันแปรจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปยังสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งจำนวนโครโมโซมน้อยที่สุดที่พบเท่ากับ 2 ในพวกพยาธิ Ascaris mecalacephala (2n=2) ในพืช Hapalopappus gracilis (2n=4) และ Crepis capillaries (2n=6) พืชที่เป็นดิพลอยด์ส่วนมากจะมีจำนวนโครโมโซมอยู่ระหว่าง12-50 จะมีเพียงส่วนน้อยที่มีจำนวนโครโมโซมน้อยหรือมากกว่านี้ ในพืชพวกที่พบว่ามีจำนวนโครโมโซมมากที่สุด คือ เฟิร์น Ophioglassum petiolatum (2n=1020) เป็นพอลิพลอยด์

2.3 รูปร่างของโครโมโซม (Chromosome structure)

โครโมโซมจัดเรียงและขดตัวสั้นที่สุดทำให้เห็นรูปร่างชัดในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์ไมโทซิสและไมโอซิส สามารถจัดจำแนกรูปร่างของโครโมโซมตามตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ได้ 4 ชนิด ดังนี้ โครโมโซมเมทาเซนทริก (metacentric chromosom) เป็นโครโมโซมที่มีเซนโตรเมียร์ อยู่กึ่งกลางแท่ง โครโมโซมซับเมทาเซนทริก (submetacentric chromosome) เป็นโครโมโซมที่มีเซนโตรเมียร์ อยู่ค่อนมาทางกึ่งกลางแท่ง โครโมโซมอะโครเซนทริก (acrocentric chromosome) เป็นโครโมโซมที่มีเซนโตรเมียร์ อยู่ค่อนมาทางปลายแท่งและโครโมโซมทีโลเซนทริก (telocentric chromosome) โครโมโซมที่มีเซนโตรเมียร์ อยู่ปลายแท่งของโครโมโซม ในระยะแอนาเฟสโครโมโซมดังกล่าวมีรูปร่างคล้ายอักษรวี (V) แอล (L) เจ (J) และไอ (I) ตามลำดับ การหาค่าดัชนีเซนโตเมียร์ (centromere index) หรืออัตราส่วนระหว่างแขนข้างสั้นกับข้างยาว หรืออัตราส่วนระหว่างแขนข้างยาวกับความยาวของโครโมโซมจะบอกให้ทราบว่าเป็นโครโมโซมชนิดใด

2.4 โครงสร้างของโครโมโซม

โครโมโซมประกอบด้วยโปรตีนและดีเอ็นเอ ซึ่งอยู่ในสภาพโครมาทิน (chromatin) มีอยู่ 2 ประเภทคือ ยูโครมาทิน (euchromatin) เป็นโครมาทินที่หดตัวได้ไม่เท่ากันและเป็นส่วนที่ทำงาน โครมาทิน (heterochromatin) ประกอบด้วยลำดับของเบสที่ซ้ำๆกันจะมีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ของโครโมโซม ในแต่ละโครโมโซมประกอบด้วยส่วนต่างๆดังนี้

เซนโทรเมียร์ (centromere) เป็นตำแหน่งที่แขนทั้งสองข้างมาพบกัน และเป็นตำแหน่งที่เรียกว่า kinetochore ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ และโปรตีน ที่เป็นกรด ทำหน้าที่การควบคุมการเคลื่อนที่ของโครโมโซมให้เป็นไปตามแบบแผนและการสร้างสายใยสปินเดิล เป็นจุดเชื่อมโยงไปตามขั้วเซลล์ปกติ สามารถตรวจพบเซนโทรเมียร์ได้โดยการย้อมสีชนิด C-band

secondary constriction และ satellite โครโมโซมจะจัดจำแนกได้โดยใช้ secondary constriction หรือ nucleolar organizing regions (NORs) เป็นตำแหน่งที่มีเบสซ้ำๆกันแต่อาจมียีน ribosomal RNA ได้หลายชุดที่อยู่บนแขนหนึ่งหรือทั้งสองแขน ยังพบว่ามีการสร้างนิวคลีโอไลด้วย แต่ทุกโครโมโซมไม่จำเป็นต้องมีนิวคลีโอไลเกาะติดอยู่ ในระยะปลายโพรเฟสนิวคลีโอลัสลด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดลงและหายไปจากโครโมโซม ตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไลจะอยู่ในสภาพไม่ขดตัวแน่นและติดสีอ่อน ตำแหน่ง secondary constriction ที่อยู่ตามยาวของโครโมโซมนั้นจะคงที่สำหรับแต่ละโครโมโซม แต่แตกต่างจาก primary constriction เพราะไม่มีเครื่องหมายสังเกตได้จากแขนข้างใดข้างหนึ่ง สามารถเห็นส่วนของ secondary constriction ได้ชัดในระยะแพไคนีมานิวคลีโอลัสมีขนาดใหญ่ จะแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งไปยังอีกชนิดหนึ่ง บางชนิดจะเห็นเป็นบริเวณที่มีสีเข้มหรือรอยคอดเว้า

เทโลเมียร์ (telomere) เป็นบริเวณปลายของโครโมโซม ในสภาพธรรมชาติมีพฤติกรรมเฉพาะตัว และมีลำดับเบสที่ซ้ำๆกัน เช่น (TTAGGG)n จะอนุรักษ์ไว้บริเวณส่วนปลายของโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยทั่วไปไม่สามารถย้ายตำแหน่งมาจากบริเวณปลายมายังบริเวณ กลางโครโมโซมได้ ถ้าส่วนปลายโครโมโซมขาดหายจะสามารถชดเชยให้มีพฤติกรรมปกติได้ ถ้าปลายเกิดหักปลายที่หักจะเข้ามาเชื่อมกันเอง เช่น ถ้ามีโครโมโซม 2 แท่ง ปลายที่หักของโครโมโซมทั้ง 2 จะมาเชื่อมกันเอง (นิตย์ศรี, 2541)

3.พฤติกรรมโครโมโซมพืชในระยะไมโทซิส

การทำการศึกษาโครโมโซมพบว่าระยะของไมโทซิสช่วงเวลาเดียวของวัฏจักรเซลล์ที่โครโมโซมมีรูปร่างเห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ระยะต่างๆของการแบ่งเซลล์ในไมโทซิส ระยะแรกเรียกว่า โพรเฟส (prophase) ระยะต้นของโพรเฟสนั้นโครโมโซมปรากฏเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีขนาดยาว โดยแต่ละเส้นประกอบสายใยเป็นคู่เรียกว่า sister chromatid ในตอนปลายระยะนี้โครโมโซมจะหดสั้นมาก แต่ละโครโมโซมจะมีรอยคอดติดสีจางเรียกว่า เซนโทเมียร์ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเกาะติดของสายสปินเดิลเพื่อช่วยแยกโครโมโซมออกจากการแบ่งเซลล์จากเซนโทเมียร์ ไปจนถึงปลายโครโมโซมข้างใดข้างหนึ่ง เรียกว่า แขน (arm) เมื่อสิ้นสุดระยะโพรเฟสจะพบว่าผนังนิวเคลียสเกิดการสลายตัว กลายเป็นส่วนประกอบของเอนโดพลาสมิค เรติคิวลัม (endoplasmic reticulum) และเริ่มเข้าสู่ระยะแบ่งเซลล์ เรียกว่า เมทาเฟส (metaphase) โครโมโซมหดตัวหนาขึ้น สังเกตเห็นโครโมโซม 1 แท่ง ประกอบด้วยโครมาทิด 2 แท่ง จากนั้นเซนโทเมียร์จะแบ่งตัวเป็นสองแล้วเคลื่อนย้ายไปสู่คนละเซลล์ พร้อมสร้างสายใยสปินเดิล ระยะนี้มีความสำคัญมาก คือโครโมโซมจะหดสั้นที่สุด และเป็นระยะที่เหมาะสมอย่างยิ่งในการนำโครโมโซมมาศึกษาทางไซโตจีเนติก (cytogenetic) เช่น นับจำนวน ตรวจดูรูปร่างและนำมาย้อมสีแบบต่างๆ ต่อมาเริ่มเคลื่อนย้ายมาสู่ตรงกลางของเซลล์เซนโทรเมียร์ของแต่ละโครโมโซม มีการแบ่งครึ่งเพื่อทำการแยกโครมาทิด ระยะต่อมาคือ ระยะแอนาเฟส (anaphase) โครโมโซมแยกออกจากกัน และเคลื่อนย้ายไปอยู่กันคนละขั้วของเซลล์ จะปรากฏโครโมโซมแยกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ diploid ของสปีชีส์นั้นๆ ระยะสุดท้ายของไมโทซิสคือ เทโลเฟส โครโมโซมที่แยกไปอยู่คน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละขั่วเริ่มคลายการหดตัวและขยายยาวเริ่มเห็นผนังนิวเคลียสสร้างขึ้นล้อมแต่ละกลุ่มของโครโมโซม ภายหลังเมื่อมีการแบ่งของนิวเคลียสแล้วเริ่มแบ่งไซโตพลาสซึม ในเซลล์สัตว์พบว่าผนังเซลล์จะคอดตรงกลางแล้วแยกออกเป็น 2 เซลล์ สำหรับเซลล์พืชจะมีการสร้างผนังเซลล์ (cell plate) มีลักษณะเป็นผนังบางกั้นตรงกลางสำหรับเซลล์ ซึ่งเวลาต่อมาจะมีสาร cellulose มาสะสมจนเปลี่ยนสภาพเป็นผนังเซลล์ที่แข็งแรง เรียกว่า cell wall เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์ จะได้เซลล์แม่เริ่มต้น 1 เซลล์ แบ่งได้เป็นเซลล์ลูกจำนวน 2 เซลล์ (อมรา, 2540)

4. การเตรียมโครโมโซมจากปลายรากพืช

4.1 การเตรียมราก

ปลายรากพืชที่ได้จากการเพาะเมล็ดหรือปลูกพืช รากที่นำมาใช้ต้องสดและมีสุขภาพดีเพื่อให้ได้เซลล์ที่มีอัตราการแบ่งมากๆนิยมใช้รากชนิดรากแขนง (lateral root) ลักษณะรากที่ดีมีความเปราะโปร่งแสงและมีสีขาว ส่วนปลายรากมีสีขาวอมครีม (อมรา, 2540)

4.2 การทำ pretreatment

สารเคมีที่ใช้ 8-Hydroxyquinoline เตรียมที่ความเข้มข้น 0.002 M ในน้ำเพื่อให้ละลายน้ำได้ดีใช้วิธีอุ่นในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน10-20 นาที บางครั้งอาจนานถึง1 ชั่วโมง จึงจะละลายหมด ล้างรากพืชให้สะอาด ตัดรากตามยาวจากปลายรากขึ้นมาประมาณ 1 เซนติเมตร แช่ในสารละลาย Pretreatment เพื่อให้เซลล์หยุดการแบ่งไมโทซิสที่ระยะเมทาเฟส เป็นเวลา10 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่เย็นอุณหภูมิต่ำกว่า18 องศาเซลเซียส หรือแช่ในน้ำแข็ง(ไม่ควรมีน้ำขัง) ภาชนะที่ใช้ต้องสะอาดปราศจากสารเคมี เมื่อสิ้นสุดเวลานำรากออกมาแช่ในน้ำยา fixative ต่อไปการทำ Pretreatment กับรากพืชเพื่อที่จะทำให้เซลล์หยุดการแบ่งเซลล์ไมโทซิสในระยะเมทาเฟส สารที่ใช้ทำ Pretreatment มีหลายชนิด มีผลต่อเซลล์เหมือนกันคือ ทำให้ spindle fiber ของเซลล์ไม่สามารถสร้างขึ้นมาได้ การทำ Pretreatment มีวัตถุประสงค์หลัก 3 ประการ คือทำให้ไซโตพลาสซึมใสเพื่อไม่ให้บดบังหรือเป็นอุปสรรคต่อการศึกษาโครโมโซมแยก middle lamella ออกจากเซลล์ เพื่อให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่มง่ายต่อการทำให้เซลล์แยกออกจากกัน ทำเซนโทรเมียร์และรอยคอดอื่นให้เห็นชัดเจนยิ่งขึ้น (อมรา, 2540)

4.3 Fixation

เลือกรากที่มีลักษณะโปร่งแสงและปลายรากมีสีขาวขุ่น แช่ในน้ำยา Fixation เป็นเวลา 10 – 12 ชั่วโมง หรือนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ถ้าต้องการเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนนำมาศึกษาโครโมโซมให้เปลี่ยนจากแช่น้ำยา fixative มาเป็น ethanol 70% และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะศึกษาต่อไปการคงสภาพเซลล์เป็นกระบวนการตรึงเนื้อเยื่อและองค์ประกอบภายในเซลล์ให้ หยุดอยู่ในระยะการแบ่งเซลล์หรือสภาพนั้นๆ หรือเป็นการฆ่าเซลล์หรือเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั่นเอง วิธีคงสภาพเซลล์โดยทั่วไปคือการแช่แข็ง แต่สามารถใช้สารเคมีคงสภาพเซลล์ได้ น้ำยาที่เป็น Fixing หรือ Killing นี้ใช้เพื่อทำให้เซลล์พืชคงสภาพเดิม เหมือนเช่นการดองสัตว์ให้คงสภาพไม่เน่าเปื่อย น้ำยาประเภทนี้ส่วนใหม่จะเตรียมใหม่ๆแล้วใช้ทันที การทำ Fixation (การตรึงเซลล์) เป็นการฆ่าเซลล์อย่างทันทีทันใดเพื่อให้เซลล์คงอยู่ในสภาพที่มีการแบ่งเซลล์ระยะต่างๆ แต่บางครั้งการศึกษารูปร่างของโครโมโซมให้เห็นชัดเจนนั้น จะต้องให้เซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะเมทาเฟสหรือโครโมโซมขดตัวเป็นแท่งชัดเจน (อมรา, 2540)

4.4 Maceration

การทำ Maceration (การทำให้เซลล์นิ่ม) เป็นวิธีที่ย่อยสลาย pectin ซึ่งเป็น cell wall ในชั้น middle lamella ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ตรงกลางระหว่างเซลล์ในส่วนของ primary wall ทำหน้าที่ต่อเชื่อมเซลล์ในลักษณะคล้ายคลึงกับซีเมนต์ที่ใช้ยึดแผ่นอิฐสองแผ่นเข้าด้วยกัน โดยปกติแล้ว middle lamella มีขนาดยาวมากและไม่อาจเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั่วๆไป การทำให้ Maceration มีวัตถุประสงค์เพื่อลดจำนวนเซลล์ที่จะอยู่ซ้อนกันหลายๆชั้นจึงช่วยทำให้เซลล์ที่ปลายรากพืชสามารถแยกตัวออกมาเป็นเซลล์เดี่ยวๆ (อมรา, 2540)

4.5 Stain

Giemsa เป็นสีผสมที่ได้จากการผสมระหว่าง methylene blue กับสีที่เกิดจากการออกซิไดส์ methylene blue มีชื่อรวมเรียกว่า eosiny ซึ่งเป็นสีที่มีคุณสมบัติเป็นกรดเมื่อย้อมโครโมโซม และโครมาทินจะติดสีน้ำเงินแดง ส่วนไซโตพลาสซึมจะติดสีน้ำเงิน วิธีการเตรียมสี giemsa ความเข้มข้น 5% ละลายในน้ำกลั่น 95 ml เก็บในที่เย็นและมืด โดยปกติจะเตรียมแล้วใช้ทันทีไม่ได้ใช้ครั้งต่อไปโดยการนำรากขึ้นจากน้ำกลั่น วางรากบนแผ่นสไลด์ตัดเอาตรงส่วนของ meristem (ปลายราก) มาวางบน slide ทำความสะอาดด้วย 95% ethanol จากนั้นหยด fixatative (ethanol 95% 3 ส่วน : acetic 1 ส่วน) 1-2 หยด แล้ว smear ให้ทั่วแผ่น slide ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วย้อมด้วยสี giemsa 5% 15 นาที นำ slide ผ่านน้ำ จากนั้นตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (อมรา, 2540)

5. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภิญญารัตน์ (2546) การพัฒนาเทคนิคพันธุศาสตร์เซลล์แสดงถึงสัณฐานวิทยาของโครโมโซม โดยใช้เซลล์รากจากแฝก ซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมในประเทศไทย 15 แหล่งพันธุกรรม จัดเป็นแฝกหอม (*Vetiveria zizaniodes*) 8 แหล่งพันธุกรรม และแฝกดอน (*V.nemoralis* A.Camus) 7 แหล่งพันธุกรรม การใช้กรด humic ช่วยให้ได้รากมีความอุดมสมบูรณ์เหมาะสมที่ใช้เตรียมสไลด์เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการตัดรากเพื่อการตรึงเซลล์ คือ ช่วงเวลา 11.00-13.00 น. การใช้เอนไซม์เพื่อทำให้เซลล์อ่อนนุ่ม แยกเป็นเซลล์เดี่ยวและทำให้ไซโตพลาสซึมใส พบว่าแฝกจากทุกแหล่งพันธุกรรมมีโครโมโซมจำนวนเท่ากัน 2n=2x=20 มีเพียงหนึ่งแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุกรรมพบ B-chromosome เพิ่มขึ้นมา 3 โครโมโซม นอกจากนี้ยังพบ satellite chromosome ที่มีความผันแปรในแง่ของจำนวนและรูปร่างจากแฝก 6 แหล่งพันธุกรรม โครโมโซมมีขนาดอยู่ในช่วง 1.8-8.4 ไมโครเมตรแคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก และซับเมทาเซนทริก จัดเป็นแคริโอไทป์ที่ค่อนข้างเป็นแบบสมมาตร การย้อมแถบสีโครโมโซมได้โดยการใช้เทคนิค modified C – band และ N – band ใช้ระบุบริเวณที่เป็นเฮเทอโรโครมาทิน และใช้ในการจำแนกโครโมโซมแต่ละคู่ของแฝกได้ การจำแนกโครโมโซมของแฝกทั้ง 10 คู่ ทำให้ได้รูปแบบของแถบสีร่วมกับความยาวและอัตราส่วนของแขนทั้งสองของโครโมโซม รูปแบบของแถบสีที่ย้อมติดโครโมโซมสามารถใช้เป็นพื้นฐานในการทำแคริโอไทป์ที่ทำซ้ำแล้วให้ผลคงที่ และตรวจสอบความสัมพันธ์ของโครโมโซมในแหล่งพันธุกรรมที่ศึกษา แฝกจากแต่ละแหล่งพันธุกรรมมีโครโมโซมอย่างน้อยหนึ่งคู่ที่ติดสีเข้มทั้งโครโมโซม เป็นบริเวณของเฮเทอโรโครมาทิน ส่วนโครโมโซมคู่อื่นนั้นจะมีบริเวณแถบสีเข้มและสีจางแตกต่างกันในแต่ละแหล่งพันธุกรรม จากการศึกษาพฤติกรรมของโครโมโซมในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสพบว่าเป็นปกติ

Vosa (1974) ได้วิเคราะห์แคริโอไทป์ของข้าวไรย์ 5 สายพันธุ์ (*Secale cereal* L.) โดยใช้สี (fluorochromosome) และเทคนิคการย้อมด้วยสีกิมซ่า พบว่าการใช้สีสะท้อนแสง Hoechst 33258 และเทคนิคการย้อมด้วยสีกิมซ่า ทำให้เห็นความแตกต่างของส่วนเฮเทอโรโครมาทินในโครโมโซมที่เป็นแฮพลอยด์พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 7 ประกอบด้วย 11 แถบใหญ่และ2 แถบเล็กบริเวณปลายโครโมโซมมีแถบแทรกอยู่ระหว่างโครโมโซม 4 แถบและมีแถบที่ไม่คงที่อยู่ใกล้กับ nucleolar constriction ซึ่งจะพบอยู่เสมอในข้าวไรย์ทุกสายพันธุ์ โครโมโซมอีก 5 โคโมโซมจะพบแถบเล็กๆ แทรกอยู่อย่างกระจัดกระจายในทุกๆสายพันธุ์ ในโครโมโซมทุกๆโครโมโซมพบว่ามีแถบบางๆอยู่บริเวณเซนโทรเมียร์

Lavania (1985) ศึกษารายละเอียดทางสัณฐานวิทยาของโครโมโซม ในแฝกหอม (Vetiveria zizanioides) ซึ่งเก็บรวบรวมพันธุ์จาก 20 แหล่งพันธุกรรมในประเทศอินเดีย พบว่าแฝกจากทุกๆแหล่งพันธุกรรมมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 20 แคริโอไทป์เป็นแบบสมมาตร โครโมโซมเป็นชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก อย่างไรก็ตามพบว่าการเก็บแฝกมาจากหลายแหล่งพันธุกรรมมีผลต่อความแตกต่างของขนาดโครโมโซมและค่าปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียส สายโครมาทินมีความยาวรวมอยู่ในช่วง 25.6-38.7 ไมโครเมตรและค่าปริมาณดีเอ็นเอ 2C อยู่ในช่วง 2.02-2.56 พิโคกรัม นอกจากนี้ใช้เทคนิค C-band ศึกษาโครโมโซมของแฝกจากแหล่ง Bharatpur พบว่าที่เซนโตรเมียร์และปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 1,2 และ3 ติดสีเข้ม โครโมโซมแท่งที่ 4,5และ 6 ติดสีเข้มบริเวณเซนโทรเมียร์ และโครโมโซมแท่งที่ 7,8,9 และ 10 ติดสีเข้มที่ปลายแขนข้างใดข้างหนึ่งยกเว้นแท่งที่ 8 ติดสีเข้มที่ปลายแขนทั้ง 2 ข้างของโครโมโซม

Lavania (1987) การทำให้เกิดโครโมโซม 4 ชุด โดยใช้สารโคชิซิน เพื่อให้มีเพิ่มปริมาณน้ำมันหอมระเหยในแฝก การที่มีโครโมโซม 4 ชุด จะเพิ่มความแข็งแรง มีรากหนาและยาว การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บันทึกผลใน 17 เดือนหลังจากปลูกแฝกที่มีโครโมโซม 4 ชุด จากพ่อแม่ที่มีโครโมโซม 2 ชุด แสดงให้เห็นถึงลักษณะที่ดีกว่าของโครโมโซม 4 ชุด การให้น้ำมันหอมระเหยของแฝกที่มีโครโมโซม 4 ชุดเท่ากับ 62.5% และ 39.2% มากกว่าพ่อแม่ที่มีโครโมโซม 2 ชุด ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการปรับปรุงมีขอบเขต จากการศึกษาแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนการทำให้เกิดโครโมโซม 4 ชุดบรรลุผลสำเร็จอย่างรวดเร็ว ในการปรับปรุงลักษณะทางพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวเนื่องของกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่ได้สารเกิดขึ้น

Kongprakhon *et al.* (2005) การใช้เกสรตัวผู้แฝกหอม (Vetiveria zizanioides) ในการวิจัยเพื่อศึกษาจำแนกความแตกต่างทางพันธุศาสตร์เซลล์ของการพัฒนาระยะการเจริญเติบโตของเกสรตัวผู้แฝก ซึ่งเมื่อก่อนศึกษาสัณฐานวิทยาของโครโมโซมโดยใช้เซลล์รากจากแฝก ซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมในประเทศไทย เพื่อดูการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติของแฝก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์

วัสดุและอุปกรณ์

1. หญ้าแฝกได้แก่กลุ่มพันธุ์สงขลา กลุ่มพันธุ์นครสวรรค์
2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม
   - 2.1 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M
   - 2.2 alcohol 95%
   - 2.3 alcohol 70%
   - 2.4 glacial acetic acid
   - 2.5 สีย้อม giemsa
   - 2.6 น้ำกลั่น
3. อุปกรณ์
   - 3.1 มีดผ่าตัด
   - 3.2 บีกเกอร์
   - 3.3 ขวดเก็บตัวอย่าง
   - 3.4 คีมปลายแหลม (forceps)
   - 3.5 เข็มเขี่ยปลายแหลม,ดอปเปอร์
   - 3.6 กระดาษทิชชู
   - 3.7 แผ่นสไลด์ และ coverslips
   - 3.8 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus , ประเทศญี่ปุ่น)
   - 3.9 นาฬิกาจับเวลา
   - 3.10 waterbath

วิธีการ

1.การเตรียมรากแฝก

1.1 การชักนำให้เกิดรากของแฝก

ล้างทำความสะอาดกอแฝก แบ่งกอเป็นต้นเดี่ยวๆ และตัดรากแก่ ซึ่งมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเหนียวและแข็งออก แล้วแช่ตัวอย่างที่ตัดแต่งแล้วในน้ำสะอาด แช่ทิ้งไว้ 2-3 วันรากใหม่ซึ่งมีลักษณะขาวอวบและที่ปลายรากมีสีขาวขุ่นจะงอกออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.การเตรียมโครโมโซมแฝกเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม

2.1 การตรึงเซลล์ (pretreatment)

ตัดปลายรากที่มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตรโดยตัดในช่วงเวลาประมาณ 9.30 นาฬิกา เวลาในการตัดปลายรากแฝกที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับแฝกแต่ละกลุ่มพันธุ์แล้วนำปลายรากแช่ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 ชั่วโมง 8-hydroxyquinoline ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยสปินเดิล เซลล์จะหยุดอยู่ในระยะเมทาเฟส ไม่มีการแบ่งนิวเคลียส และช่วยทำให้โครโมโซมหดตัวได้ดี ทำให้ไซโตพลาสซึมใสสามารถเห็นรูปร่างโครโมโซมเป็นแท่งได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

2.2 การหยุดการทำงานของเซลล์

นำปลายรากที่เตรียมไว้มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้งจากนั้นนำมาแช่ในน้ำยาคงสภาพ (ethanol 95% : acetic acid = 3:1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 15 นาที หลังจากนั้นเก็บปลายรากไว้ที่ ethanol 70%

2.3 การย่อยราก

ล้างรากแฝกที่อยู่ใน ethanol 70% ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมาบ่มด้วยเอนไซม์ที่มีส่วนประกอบของ cellulase 12% pectinase 8% ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างรากที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยน้ำกลั่น ขยี้รากบนแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำยาคงสภาพ (ethanol 95% : acetic acid = 3:1) ทิ้งไว้ให้แห้ง

2.4 การย้อมสี

เตรียมสี Giemsa 5% นำ slide ที่เตรียมไว้มาย้อมด้วยสี Giemsa 5% นาน 15 นาที ผ่าน slide ด้วยน้ำปล่อยไว้ให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายดี มานับจำนวนโครโมโซม โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาระยะเวลาในการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์

นำรากแฝกที่เก็บรักษาอยู่ใน ethanol 70% มาล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีส่วนประกอบของ cellulase 12% pectinase 8% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเซลล์รากแฝกด้วยเอนไซม์

การทดลองที่ 2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเซลล์

ทำการเก็บรากแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลาและกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ในช่วงเวลาต่างๆได้แก่8.00, 8.30, 9.00, 9.30, 10.00 และ10.30 นาฬิกาโดยนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ cellulase 12% pectinase 8% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่ได้จากผลการทดลองที่1เพื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรากที่แบ่งเซลล์ไมโทซิสในระยะเมทาเฟส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 ศึกษาระยะเวลาในการทำ pretreatment

การทำ Pretreatment ทำโดยตัดปลายรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ในแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลาและกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ตัดปลายรากเวลาที่ได้จากผลการทดลองที่ 2 จากนั้นแช่ปลายรากแฝกสารละลาย 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซียส ในระยะเวลาต่างกัน ได้แก่ 5, 10, 15, 20 และ 25 เพื่อศึกษาระยะเวลาในการทำ pretreatment ที่ทำให้เห็นโครโมโซมได้ชัดเจน

2.5 เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มการทดลอง เดือน สิงหาคม 2551

สิ้นสุดการทดลอง เดือน พฤศจิกายน 2551

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลางภาควิชาพืชสวนคณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาระยะเวลา ในการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์

จากการศึกษาแฝก 2 กลุ่มพันธุ์ ได้แก่ กลุ่มพันธุ์สงขลา และกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ โดยใช้เทคนิคการย่อยรากด้วยเอนไซม์ cellulase 12% และ pectinase 8% และ ย้อมด้วยสี Giemsa มีรายละเอียดของโครโมโซมที่พบดังนี้ การย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ cellulase 12% และ pectinase 8% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ซ้อนกันอยู่หลาย ๆ ชั้นทำให้มองไม่เห็นโครโมโซม (ภาพที่ 1a, 2a) เมื่อเพิ่มเวลาในการแช่เอนไซม์เป็น 2 ชั่วโมง พบว่าเซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แต่ยังมองเห็นโครโมโซมไม่ชัด (ภาพที่ 1b, 2b) ต่อมาเมื่อเพิ่มเวลาในการแช่เอนไซม์เป็น 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่าเซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และมองเห็นโครโมโซมดีขึ้น (ภาพที่ 1c, 1d, 2c, 2d) การทำให้เซลล์นิ่ม เป็นวิธีที่ย่อยสลาย pectin ซึ่งเป็น cell wall ในชั้น middle lamella ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ตรงกลางระหว่างเซลล์ในส่วนของ primary wall ทำหน้าที่ต่อเชื่อมเซลล์ในลักษณะคล้ายคลึงกับซีเมนต์ที่ใช้ยึดแผ่นอิฐสองแผ่นเข้าด้วยกัน โดยปกติแล้ว middle lamella มีขนาดยาวมากและไม่อาจเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั่วๆไป การทำให้ Maceration มีวัตถุประสงค์เพื่อลดจำนวนเซลล์ที่จะอยู่ซ้อนกันหลายๆชั้นจึงช่วยทำให้เซลล์ที่ปลายรากพืชสามารถแยกตัวออกมาเป็นเซลล์เดี่ยวๆ (อมรา, 2540) ดังนั้นการใช้สารละลายเอนไซม์ช่วยย่อยเซลล์ราก ทำให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆและย่อยผนังเซลล์ ส่วนที่ได้จะเป็นโพรโทพลาสต์หรือเกือบเป็นโพรโทพลาสต์ที่สมบูรณ์

การทดลองที่ 2 ศึกษาเวลาที่เหมะสมในการเก็บเซลล์

เมื่อศึกษาระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ของรากแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลา และ กลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ เพื่อหาระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ของเซลล์ปลายรากแฝก โดยตัดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ที่เวลาต่างๆแล้วนำปลายรากแช่ในน้ำยาคงสภาพเซลล์ (ethanol 95% 3 ส่วน : acetic 1 ส่วน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที หลังจากนั้นนำปลายรากเก็บใน ethanol 70 % แล้วนำมาย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ cellulase 12% และ pectinase 8% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ย้อมด้วยสี Giemsa 5% เป็นเวลา 15 นาที สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ากลุ่มพันธุ์สงขลา เมื่อเริ่มเก็บเซลล์เวลา 8.00 นาฬิกา พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่แบ่งตัวอยู่ในระยะ interphase (ภาพที่ 3a) เป็นจำนวนมากต่อมาเมื่อเก็บเซลล์เวลา 9.00 นาฬิกา เริ่มพบเซลล์แบ่งตัวอยู่ในระยะ prophase (ภาพที่ 3b) จำนวนมากขึ้น ที่เวลา 9.30 นาฬิกา เซลล์แบ่งตัวอยู่ในระยะ metaphase (ภาพที่ 3c) เป็นส่วนใหญ่ (ซึ่งเป็นช่วงการแบ่งเซลล์ที่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด) เมื่อเก็บเซลล์รากแฝกที่เวลา 10.00, 10.30 นาฬิกา พบเซลล์แบ่งตัวอยู่ในระยะ anaphase และ telophase (ภาพที่ 3d, 3e) และมีเซลล์ที่แบ่งอยู่ในระยะอื่นๆเล็กน้อย ส่วนกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ เริ่มเก็บเซลล์เวลา 8.00 นาฬิกา จนถึง 8.30 นาฬิกา พบว่าเซลล์

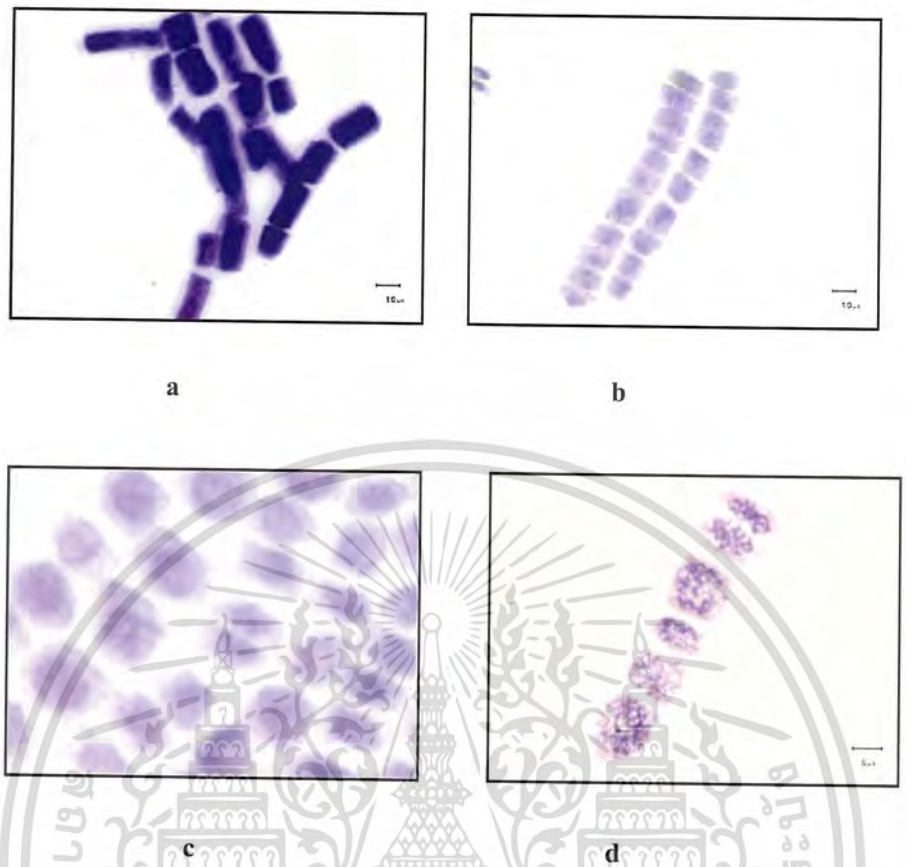
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยรวมแบ่งตัวอยู่ในระยะ interphase (ภาพที่ 4a) ต่อมาเมื่อเก็บเซลล์เวลา 9.00 นาฬิกา เซลล์เริ่มแบ่งตัวในระยะ prophase (ภาพที่ 4b) มากขึ้นที่เวลา 10.00 นาฬิกา พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่แบ่งตัวอยู่ในระยะ metaphase (ภาพที่ 4c) ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสำหรับการนับโครโมโซมเก็บเซลล์เวลา 10.30 นาฬิกา เริ่มพบเซลล์แบ่งตัวอยู่ในระยะ anaphase (ภาพที่ 4d) และเมื่อเก็บเซลล์เวลา 11.00 – 12.00 นาฬิกา เซลล์ส่วนใหญ่แบ่งตัวอยู่ในระยะ telophase (ภาพที่ 4e) และพบเซลล์ในระยะอื่นเล็กน้อย

การทดลองที่ 3 ระยะเวลาในการทำ pretreatment

จากการทดลองเพื่อศึกษาระยะเวลาในการทำ pretreatment ของรากแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลาและกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ พบว่ากลุ่มพันธุ์สงขลา เมื่อเก็บเซลล์ปลายรากที่เวลา 9.30 นาฬิกาและไม่ทำการ pretreatment นำไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ (ethanol 95% : acetic acid = 3:1) ทันที พบว่าเห็นโครโมโซมยืดยาวไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้โดยพบเนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลาที่แบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะต่างๆดังนี้ รากที่แบ่งเซลล์อยู่ในระยะ interphase (ภาพที่ 3a), ระยะprophase (ภาพที่ 3b),ระยะ metaphase (ภาพที่ 3c), ระยะ anaphase (ภาพที่ 3d), และระยะ telophase (ภาพที่ 3e) กลุ่มพันธุ์นครสวรรค์รากที่แบ่งเซลล์อยู่ในระยะ interphase (ภาพที่ 4a), ระยะprophase (ภาพที่ 4b),ระยะ metaphase (ภาพที่ 4c), ระยะ anaphase (ภาพที่ 4d), และระยะ telophase (ภาพที่ 4e) เมื่อทำการ pretreatment ด้วยสาร 8 hydroxyquinoline ในแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลา เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ภาพที่ 5b) พบว่าเซลล์ใสขึ้น และโครโมโซมหดสั้นลงเล็กน้อย จึงเพิ่มเวลาในการทำ pretreatment เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (ภาพที่ 5c) พบว่าเซลล์ใส และโครโมโซมหดสั้นอยู่ในระยะ metaphase เหมาะสมต่อการนับจำนวนโครโมโซม และเมื่อเพิ่มเวลาเป็น 15 , 20 และ 25 ชั่วโมง (ภาพที่ 5d, 5e, 5f) พบว่าเห็นโครโมโซมไม่ชัดเจนเนื่องจากโครโมโซมหดสั้นมาก และเนื่องจากโครโมโซมของแฝกนั้นมีขนาดเล็กจึงทำให้นับไม่ได้ชัดเจน ส่วนกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ ระยะเวลาในการทำ pretreatment 10 ชั่วโมง และเวลาในการเก็บเซลล์คือ 10.00นาฬิกา พบว่าเซลล์ใส และโครโมโซมหดสั้นอยู่ในระยะ metaphase เหมาะสมต่อการนับจำนวนโครโมโซม (ภาพที่ 6) จากการทดลองที่ได้นั้นพบว่าแฝกทั้ง 2 กลุ่มพันธุ์มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=20 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของภิญญารัตน์ (2546) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาเทคนิคพันธุศาสตร์เซลล์แสดงถึงสัณฐานวิทยาของโครโมโซม โดยใช้เซลล์รากจากแฝกซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมในประเทศไทย 15 แหล่งพันธุกรรมพบว่าแฝกจากทุกแหล่งพันธุกรรมมีโครโมโซมจำนวนเท่ากัน 2n=2x=20

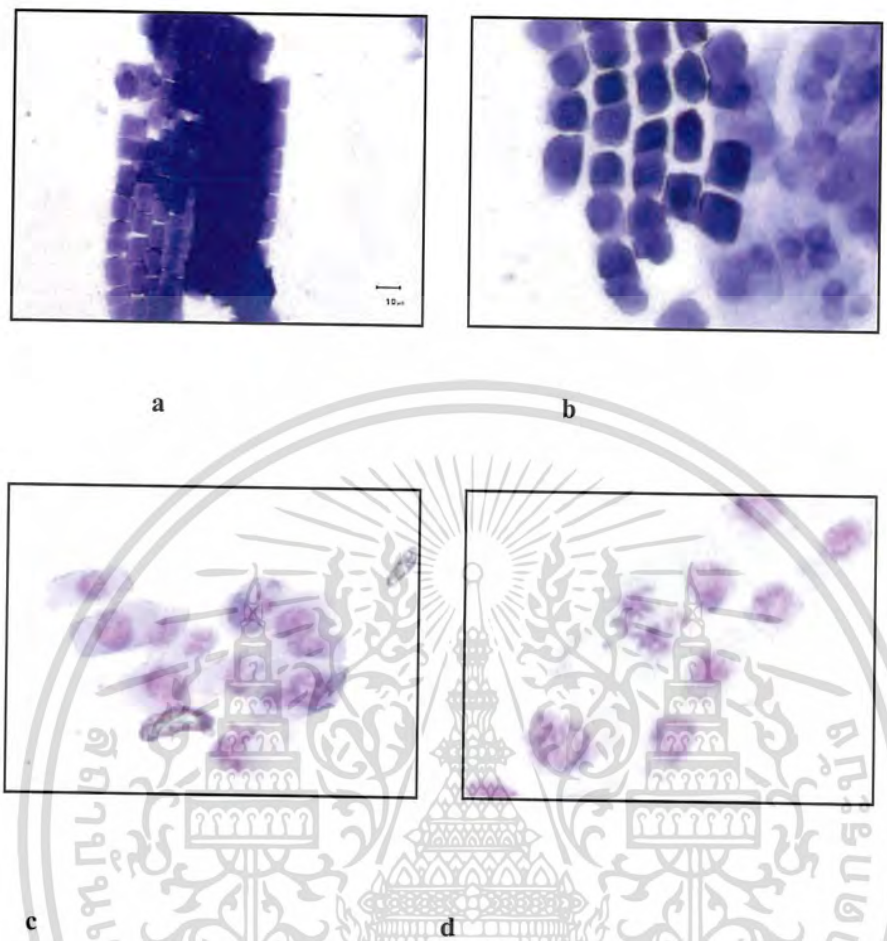
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
109028



ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลา เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ cellulase และ pectinase ที่ระยะเวลาต่างๆ (กำลังขยาย 40x)

a) ย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
b) ย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
c) ย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
d) ย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

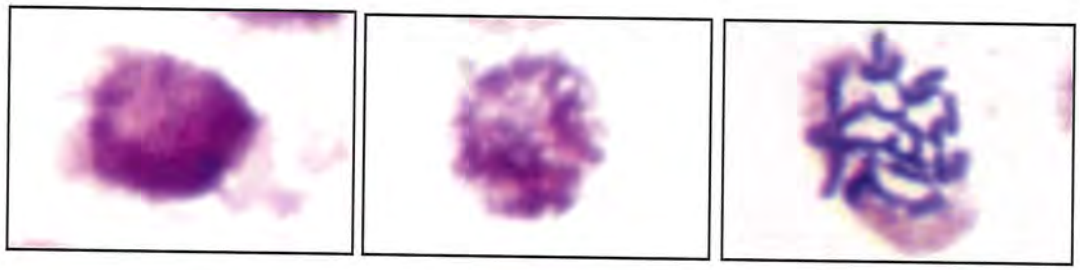
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



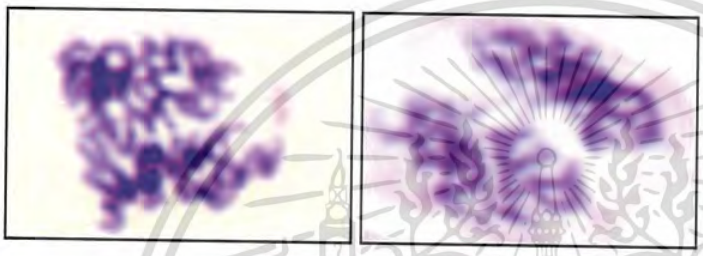
ภาพที่ 2 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ cellulase และ pectinase ที่ระยะเวลาต่างๆ (กำลังขยาย 40x)

a) ย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
b) ย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
c) ย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
d) ย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



a b c

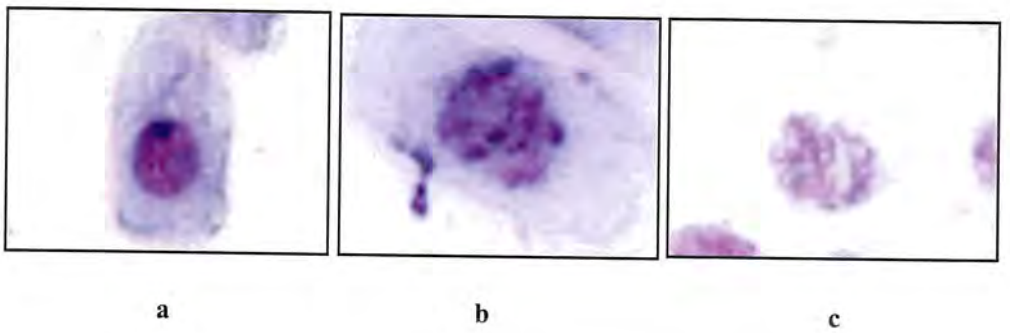


d e

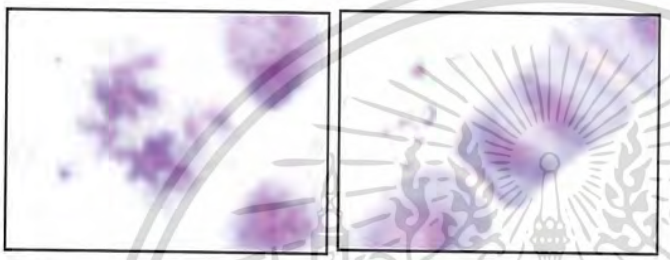
ภาพที่ 3 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลา ที่แบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะต่างๆ (กำลังขยาย 40x)

a) รากที่แบ่งเซลล์อยู่ในระยะ interphase
b) รากที่แบ่งเซลล์อยู่ในระยะ prophase
c) รากที่แบ่งเซลล์อยู่ในระยะ metaphase (ซึ่งเป็นระยะที่เห็นโครโมโซมชัดเจนที่สุด พบเวลา 9.30 น)
d) รากที่แบ่งเซลล์อยู่ในระยะ anaphase
e) รากที่แบ่งเซลล์อยู่ในระยะ telophase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



a b c

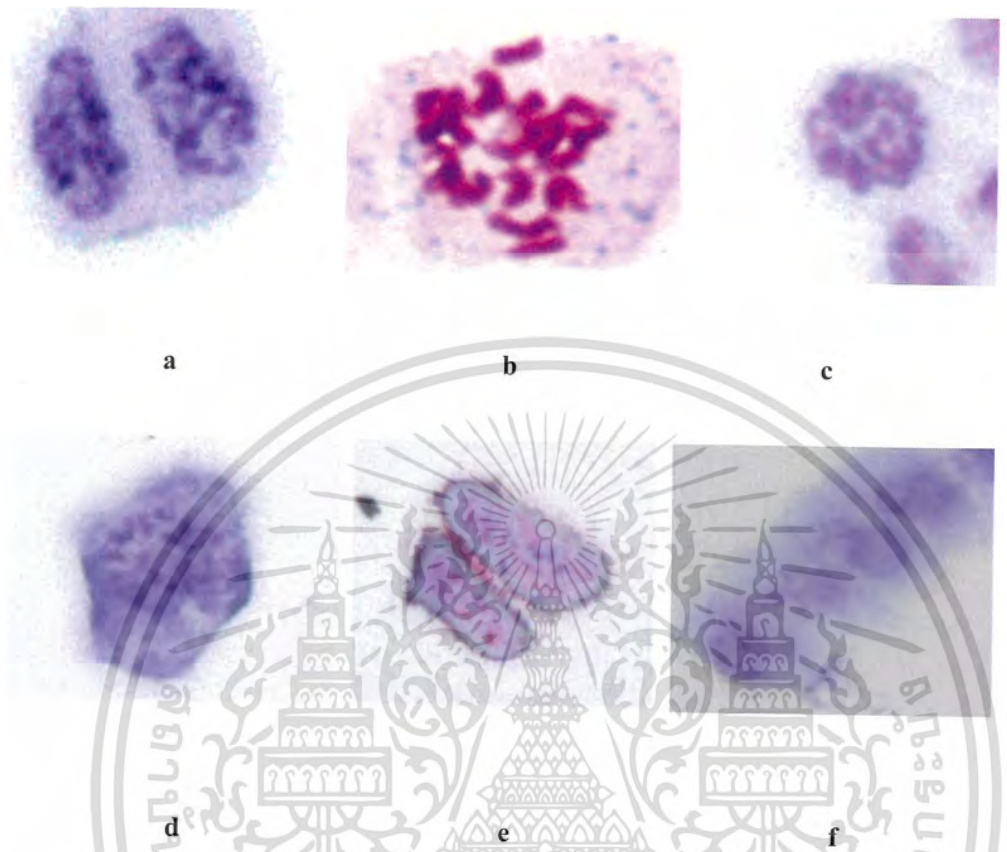


d e

ภาพที่ 4 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ ที่แบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระต่างๆ (กำลังขยาย 40x)

a) รากที่แบ่งเซลล์อยู่ในระยะ interphase
b) รากที่แบ่งเซลล์อยู่ในระยะ prophase
c) รากที่แบ่งเซลล์อยู่ในระยะ metaphase (ซึ่งเป็นระยะที่เห็นโครโมโซมชัดเจนที่สุด พบเวลา 10.00 น)
d) รากที่แบ่งเซลล์อยู่ในระยะ anaphase
e) รากที่แบ่งเซลล์อยู่ในระยะ telophase

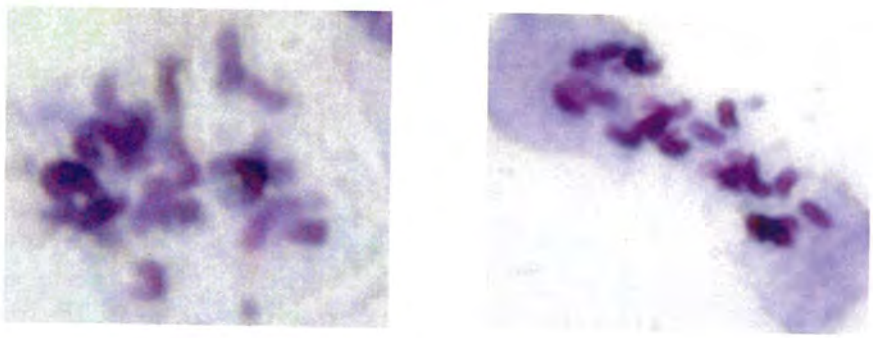
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลา ที่แช่สาร 8- hydroxyquinoline

a) รากที่ไม่ได้แช่สาร 8- hydroxyquinoline
b) รากที่แช่สาร 8- hydroxyquinoline เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
c) รากที่แช่สาร 8- hydroxyquinoline เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (เก็บเซลล์เวลา 9.30 น)
d) รากที่แช่สาร 8- hydroxyquinoline เป็นเวลา 15 ชั่วโมง
e) รากที่แช่สาร 8- hydroxyquinoline เป็นเวลา 20 ชั่วโมง
f) รากที่แช่สาร 8- hydroxyquinoline เป็นเวลา 25 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ ที่แช่สาร 8- hydroxyquinoline เป็นเวลา 10 ชั่วโมง และเก็บเซลล์เวลา 9.30 นาฬิกา (กำลังขยาย 100x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

เก็บเซลล์จากปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์สงขลาที่เก็บรากเวลา 9.30 นาฬิกา แช่ในสาร 0.002 M 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 10 ชั่วโมง และย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ cellulase12% และ pectinase 8% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เซลล์อยู่ในระยะ metaphase โครโมโซมไม่เรียงอยู่กลางเซลล์ และมีลักษณะหนาสั้น เหมาะแก่การนับจำนวนโครโมโซม ส่วนเซลล์จากปลายรากแฝกกลุ่มพันธุ์นครสวรรค์ เก็บรากเวลา 10.00 นาฬิกา แช่ในสาร 0.002 M 8 hydroxyquinoline เป็นเวลา 10 ชั่วโมง และย่อยเซลล์ด้วยในเอนไซม์ cellulase 12% และ pectinase 8% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เซลล์อยู่ในระยะ metaphase โครโมโซมไม่เรียงอยู่กลางเซลล์ และมีลักษณะหนาสั้นเหมาะแก่การนับจำนวนโครโมโซมและแฝกทั้ง 2 กลุ่มพันธุ์มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2541. การพัฒนาและการรณรงค์ใช้หญ้าแฝกอันเนื่องมาจากพระราชดำริ: คู่มือการดำเนินงานและฝึกอบรม. กองการฝึกอบรม ฝ่ายการพิมพ์ กองแผนที่และการพิมพ์ กรมพัฒนาที่ดิน, กรุงเทพฯ. 87 น.

กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล Zaphyranthes. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 260 น.

จเร สดากร. 2535. แฝกหอม.ข่าวพฤกษศาสตร์และวัชพืช 5 (1) : 5-7.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2541. พันธุศาสตร์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 295 น.

ภิญญารัตน์ กงประโคน. 2546. การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของแฝกจากแหล่งพันธุกรรมในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วีระชัย ณ นคร. 2536. การศึกษาอนุกรมวิธานของหญ้าสกุล Vetiveria ในประเทศไทย. รายงานผลการดำเนินงานโครงการพัฒนาและรณรงค์การใช้หญ้าแฝกอันเนื่องมาจากพระราชดำริประจำปี 2536. กองแผนงานกรมพัฒนาที่ดิน, กรุงเทพฯ. 135 น.

วิฑูร ชินพันธุ์. 2541. พันธุ์หญ้าแฝก, น.1-22. *ใน* สำนักคณะกรรมการพิเศษเพื่อการประสานงานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (สำนักงาน กปร.). คู่มือสาระน่ารู้เรื่องหญ้าแฝกโครงการพัฒนาและรณรงค์การใช้หญ้าแฝกอันเนื่องมาจากพระราชดำริประจำปี 2541.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 322 น.

Lavania, U. C. 1985. Nuclear DNA and karyomophological studies in vetiver (*Vetiveria zizanoides* L.) Nash. Cytologia 50: 177-185.

Lavania, U. C. 1987. Enhance productivity of the essential oil in the artificial autopolyploid of vetiver (*Vetiveria zizanoides* L. Nash). Euphytica 38: 271-276.

Kongprakhon, P. N. Sangduen, V. Hongtrakul and K. Namwongprom. 2005. Meiosis of vetiver germplasm in Thailand. AU J.T. 9(1): 9-14.

Vosa, C.G. 1974. The basic karyotype of Rye (*Secale cereale*) analysed with Giemsa and Fluorescence methods. Heredity 33: 403-408.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้