สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของดาวเรือง

The Study of Chromosome Number of *Tagetes erecta* Linn.

โดย

นายกฤษฎา มนัสพาสน์เกษม

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 73521
วัน,เดือน,ปี 20 ก.ค. 2550

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชสวน)

พุทธศักราช 2548

b 11794303
i:.....

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชา พืชสวน

เรื่อง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของดาวเรือง

The Study of Chromosome Number of *Tagetes erecta* Linn.

โดย

นายกฤษฎา มนัสพาสน์เกษม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

.....

อาจารย์มณทินี ธีรารักษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(26/ มี.ค./ 2549)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ. สมชาย กล้าหาญ)

หัวหน้าภาควิชาพืชสวน

(26/ มี.ค./ 49)

ชื่อเรื่อง	:	การศึกษาจำนวนโครโมโซมของคาวเรือง
โดย	:	นายกฤษฎา มนัสพาสน์เกษม
สาขาวิชา	:	พืชสวน
ภาควิชา	:	พืชสวน
คณะ	:	เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	อาจารย์มณทินี ธีรารักษ์

บทคัดย่อ

การทดลองในครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้คาวเรืองสายพันธุ์ใหม่ ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้มุ่งเน้นถึงการพัฒนาวิธีการเตรียมโครโมโซมจากปลายรากคาวเรืองในระยะเมตาเฟส โดยการเตรียมเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายรากคาวเรือง และหยุดวงชีพเซลล์ด้วย 8-hydroxyquinoline ที่ความเข้มข้น 0.002 M เป็นเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นหยุดกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ด้วยกรดอะซีติกและแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:3 ย้อมสีโครโมโซมด้วย alcoholic-hydrochloric-acid carmine หลังจากการ hydrolyse ด้วย HCl ที่ความเข้มข้น 1 N เป็นเวลา 5 นาที พบว่าเวลาที่เหมาะสำหรับการตัดรากคือ 7.00-7.30 นาฬิกา และแช่สาร 8-hydroxyquinoline ภายในเวลา 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า รากที่แช่สาร 8-hydroxyquinoline นาน 12 และ 24 ชั่วโมง มีผลทำให้รูปร่างเซลล์ผิดปกติ

Tile	:	The Study of Chromosome Number of *Tagetes erecta* Linn.
By	:	Mr. Kritsada Manaspaskasem
Major	:	Horticulture
Department	:	Horticulture
Faculty	:	Agricutural Technology
Advisor	:	Miss Montinee Teerarak

Abstract

Marigold chromosome investigation is part of improvement program of plant and useful to breed new cultivars. Therefore, this study was carried out in attempt to develop an efficient chromosome preparation of Marigold for dividing cell at metaphase stage. For chromosome preparation, root tips of marigold were pre-treated in 0.002 M 8-hydroxyquioline for 3, 6, 12 and 24 hours, followed by fixation in 1 : 3 acetic acid – alcohol. Chromosome were stained in alcolholic-hydrochloric-acid carmine after hydrolysis in 1 N HCl for 5 minuts. The results showed that thc suitable time for cutting off root tips was 7.00 – 7.30 a.m. in the morning and pre-treated in 8-hydroxyquinoline within six hours. Moreover, the incubation duration of roots in 8-hydroxyquinoline for 12 and 24 hours induced deformation of cell shape.

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนช่วยเหลือจากหลายฝ่ายด้วยกัน อาจารย์มณทินี ธีรารักษ์ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งช่วยกรุณาให้คำแนะนำปรึกษาตลอดจนการตรวจสอบแก้ไข จนการทดลองสำเร็จไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณพระบิดา มารดา ที่ช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ ทั้งทรัพย์สินเงินทองที่ส่งเสียให้เล่าเรียน และขอบคุณเพื่อนๆ ที่ช่วยเหลือด้านข้อมูลต่างๆจนทำให้การทดลองนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

กฤษฎา มนัสพาสน์เกษม

25 พฤษภาคม2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญภาพ	II
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	1
ตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีทำการทดลอง	13
ผลและวิจารณ์	16
สรุปผลการทดลอง	21
เอกสารอ้างอิง	22

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากดาวเรือง(*Tagetes erecta* Linn.)ที่ไม่แช่สาร 8-hydroxyquinoline ที่ตัดรากที่เวลาต่างกัน (ที่กำลังขยาย 1000x) 18

ภาพที่ 2 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากดาวเรือง(*Tagetes erecta* Linn.)ที่แช่สาร 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ตัดรากที่เวลาต่างกัน (ที่กำลังขยาย 1000x) 19

ภาพที่ 3 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากดาวเรือง(*Tagetes erecta* Linn.)ที่แช่สาร 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ตัดรากที่เวลาต่างกัน (ที่กำลังขยาย 1000x) 19

ภาพที่ 4 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากดาวเรือง(*Tagetes erecta* Linn.)ที่แช่สาร 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ที่กำลังขยาย 1000x) 20

คำนำ

ดาวเรือง *(Tagetes erecta)* เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Composite เป็นไม้ดอกที่คนไทยรู้จักกันดีชนิดหนึ่งเนื่องจากปลูกง่าย โตเร็ว คงทนต่อสภาพแวดล้อม มีสีสันสดใสสะดุดตา ดอกมีลักษณะกลมสวยงาม กลีบดอกจัดเรียงเป็นระเบียบ กลีบดอกยึดแน่นกับฐานดอก ดาวเรืองยังเป็นพืชที่มีอายุการเก็บเกี่ยวสั้นประมาณ 60-70 วัน ก็สามารถตัดจำหน่ายได้ และเป็นไม้ดอกสามารถทำรายได้ให้กับผู้ปลูกสูงในปัจจุบัน การปลูกดาวเรืองนอกจากจะปลูกเพื่อตัดดอกขายแล้ว สามารถปลูกลงกระถางหรือถุงพลาสติกเพื่อใช้ประดับตามอาคารบ้านเรือนและสถานที่ต่าง ๆ รวมทั้งมีการปลูกเพื่อเก็บเมล็ดส่งโรงงานอาหารสัตว์อีกด้วยแหล่งปลูก ปัจจุบันจากผลการค้นคว้าและวิจัยพืชที่ให้สารจากธรรมชาติพบว่าดาวเรืองเป็นพืชที่มีสารเบตาแคโรทีน ซึ่งสมบัติของสารเบตาแคโรทีนนี้จะทำหน้าที่เป็นโปรวิตามินเอ เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะเปลี่ยนเป็นวิตามินเอ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นแอนติออกซิแดนต์ในการป้องกันการเกิดมะเร็งในตับและปอดของร่างกาย เนื่องจากดาวเรืองเป็นพืชที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงจึงทำให้มีความแตกต่างทั้งในด้านสายพันธุ์ ปริมาณสารแคโรทีน สารแซนโทฟิลล์และชนิดพันธุ์ ด้วยเหตุผลนี้จึงทำการทดลองโดยการนับจำนวนของโครโมโซมที่มีอยู่ภายในเซลล์รากของดาวเรือง เพื่อนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานและช่วยในการวางแผนในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อหาสายพันธุ์ที่เหมาะจะนำมาผสมเพื่อปรับปรุงพันธุ์ดาวเรืองต่อไป

วัตถุประสงค์การทดลอง

ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสม สำหรับการเตรียมโครโมโซมในระยะ metaphase เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมของดาวเรือง

ตรวจเอกสาร

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Tagetes erecta* Linn.
วงศ์	Compositae
ชื่อสามัญ	ดาวเรือง
	ดำปู้จู้หลวง (ภาคเหนือ)
	Marigold
ถิ่นกำเนิด	ประเทศเม็กซิโก

ดาวเรือง เป็นไม้ดอกที่คนไทยรู้จักกันดีชนิดหนึ่งเนื่องจากปลูกง่าย โตเร็ว คงทนต่อสภาพแวดล้อม มีสีสันสดใสสะดุดตา ดอกมีลักษณะกลมสวยงาม กลีบดอกจัดเรียงเป็นระเบียบ กลีบดอกยึดแน่นกับฐานดอก ไม่หลุดง่าย อายุการใช้งานนานประมาณ 7-10 วัน นอกจากนี้ ดาวเรืองยังเป็นพืชที่มีอายุการเก็บเกี่ยวสั้น ประมาณ 60-70 วัน ก็สามารถตัดจำหน่ายได้ รวมทั้งดาวเรืองยังเป็นพืชที่ขึ้นได้ดีทุกสภาพพื้นที่และทุกฤดูกาลของประเทศ และเป็นไม้ดอกสามารถทำรายได้ให้กับผู้ปลูกสูงในปัจจุบันการปลูกดาวเรืองนอกจากจะปลูกเพื่อตัดดอกขายแล้ว สามารถปลูกลงกระถางหรือถุงพลาสติกเพื่อใช้ประดับตามอาคารบ้านเรือนและสถานที่ต่าง ๆ รวมทั้งมีการปลูกเพื่อเก็บเมล็ดส่งโรงงานอาหารสัตว์อีกด้วย แหล่งปลูก ดาวเรืองที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพะเยา ลำปาง นนทบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี สมุทรสาคร อุดรธานี และกรุงเทพฯ

ประโยชน์ ใบ เป็นยาเย็น ใช้ทาแผลเน่าเปื่อย ฝีต่าง ๆ น้ำคั้นจากใบใช้หยอด แก้ เจ็บหู*ดอก* แก้ริดสีดวงทวาร เป็นยาฟอกเลือดขับลม ละลายเสมหะ ไอ หลอดลม อักเสบ ปรุงกับตับไก่เป็นยาบำรุงสายตา ดอกแห้งบดเป็นผงผสมกับอาหารไก่ ช่วยให้ไข่ แดง สีเข้มขึ้น ดอกสดเป็นอาหาร และทำดอกไม้ประดิษฐ์

ปัจจุบันจากผลการค้นคว้าและวิจัยพืชที่ให้สารจากธรรมชาติพบว่า ดาวเรืองเป็นพืชที่มีประโยชน์ นอกเหนือจากการใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ ทำสารไล่แมลงแล้วยังพบว่าเป็นพืชที่ให้สารเบตาแคโรทีน จากธรรมชาติโดยตรงของดอกดาวเรือง ซึ่งสมบัติของสารเบตาแคโรทีนนี้จะทำหน้าที่เป็นโปรวิตามินเอ เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะเปลี่ยนเป็นวิตามินเอ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นแอนติออกซิแดนต์ในการป้องกันการเกิดมะเร็งในตับและปอดของร่างกาย เนื่องจากดาวเรืองเป็นพืชที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงจึงทำให้มีความแตกต่างทั้งในด้านสายพันธุ์ ปริมาณสารแคโรทีน สารแซนโทฟิลล์และชนิดพันธุ์ โดยเฉพาะในสายพันธุ์ดาวเรืองที่ให้สารแคโรทีนสูงจะมีค่าของสารแซนโทฟิลล์ไม่ต่ำกว่า 18 กรัมต่อกิโลกรัมของกลีบแห้งจึงจะมีผลต่อการให้วิตามินเอ ลักษณะของพันธุ์ดาวเรืองโดยเฉพาะ คือ ดอกสีส้มเข้ม กลีบใหญ่ หนา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ไม่น้อยกว่า 2.5 นิ้ว จึงจะให้สารเบตาแคโรทีนและ

สารแซนโทฟิลล์สูงซึ่งจะแตกต่างจากดอกดาวเรืองพื้นบ้าน และพันธุ์การค้าให้ดอกสีเหลืองที่ให้ประมาณสารต่ำ (กิตติพงษ์, 2542)

ลักษณะทางพันธุศาสตร์

ใบ ใบประกอบแบบขนนก ออกตรงข้าม ใบตอนบนออกสลับ กว้าง 5-7 เซนติเมตร ยาว 5-12 เซนติเมตร ใบย่อย 11-17 ใบ รูปรี หรือรูปหอกแกมขอบขนาน กว้าง 0.5-1.5 เซนติเมตร ยาว 1.5-2.5 เซนติเมตร ปลายแหลม โคนสอบแคบ ขอบจักเป็นฟันเลื่อย

ดอก ดอกสีเหลือง หรือส้ม ออกเป็นช่อพระจุก เดี่ยวที่ปลายยอด ริ้วประดับเชื่อมกันเป็นรูประฆัง ปลายจักเป็นซี่ฟัน ดอกวงนอกกลีบดอก เป็นรูปรางน้ำ กว้าง 0.6-1.5 เซนติเมตร ยาว 1.5-2.5 เซนติเมตร โคนเป็นหลอดเล็ก ปลายแผ่เป็นรูปไข่กลับ ดอกวงในกลีบดอกเป็นหลอด ปลายจักเป็น 5 ซี่ บางพันธุ์กลีบดอก ทั้งหมดเป็นรูปรางน้ำ

ชนิดของดาวเรือง

ดาวเรืองที่ปลูกกันอยู่โดยทั่วไปแบ่งเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. ดาวเรืองอเมริกัน (American Marigolds) เป็นดาวเรืองที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตะวันตกเฉียงใต้ของทวีปอเมริกา ลำต้นสูงตั้งแต่ 10-40 นิ้ว ดอกสีเหลือง ส้ม ทอง และขาว กลีบ ดอกซ้อนกันแน่น ดอกมีขนาดใหญ่ประมาณ 3-4 นิ้ว ดาวเรืองชนิดนี้มีหลายพันธุ์ ได้แก่

<u>พันธุ์เตี้ย</u> สูงประมาณ 10-14 นิ้ว ได้แก่ พันธุ์ ปาปาย่า (papaya) ไพน์แอปเปิล (pineaple) ปัมพ์กิน (Pumpkin) เป็นต้น

<u>พันธุ์สูงปานกลาง</u> สูงประมาณ 14-16 นิ้ว ได้แก่ พันธุ์อะพอลโล (Apollo) ไวกิ่ง (Ziking) มูนช๊อด (Moonshot) เป็นต้น

<u>พันธุ์สูง สูงประมาณ</u> 16-36 นิ้ว ได้แก่ พันธุ์ดับเบิล อีเกิล (Double Egle) ดับบลูน (Doubloon) ซอฟเวอร์เรน (Sovereign) เป็นต้น

2. ดาวเรืองฝรั่งเศส (French Marigolds) ดาวเรืองฝรั่งเศสเป็นดาวเรืองต้นเล็ก ต้มเป็นพุ่มเตี้ย ๆ สูงประมาณ 6-12 นิ้ว ดอกสีเหลือง ส้ม ทอง น้ำตาลอมแดง และสีแดง ดอกมีขนาดเล็กประมาณ 1.5 นิ้ว นิยมปลูกประดับในแปลงมากกว่าปลูกเพื่อตัดดอก เนื่องจากมีก้านดอกสั้น นอกจากนี้ยังเป็นดาวเรืองที่สามารถลดปริมาณไส้เดือนฝอยที่ทำให้เกิดอาการรากปมในรากพืชได้ ตัวอย่างดาวเรืองฝรั่งเศส ได้แก่

พันธุ์ดอกชั้นเดียว ดอกมีขนาด 1.5-2 นิ้ว ได้แก่ พันธุ์เรด มาเรตต้า (Red Marietta) นอธตี้ มาเรตต้า (Naughty Marietta) เอสปานา (Espana) ลีโอปาร์ด (Leopard) เป็นต้น

พันธุ์ดอกซ้อน ดอกมีขนาดตั้งแต่ 1.5-3 นิ้ว ได้แก่ พันธุ์ควีน โซเฟีย (Queen Sophia) สการ์เลต โซเฟีย (Scarlet Sophia) โกลเด้น เกต (Golden Gate) เป็นต้น

3. ดาวเรืองพันธุ์ลูกผสม (Mule Mariglds หรือ Afro American Marigolds)เป็นดาวเรืองลูกผสมระหว่างดาวเรืองอเมริกันและดาวเรืองฝรั่งเศส โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำลักษณะความแข็งแรง ดอกใหญ่ และมีกลีบซ้อนมากของดาวเรืองอเมริกัน รวมเข้ากับลักษณะต้นเตี้ยทรงพุ่มกะทัดรัดของดาวเรืองฝรั่งเศส ดาวเรืองลูกผสมให้ดอกเร็วมาก คือเพียง 5 สัปดาห์หลังจากเพาะเมล็ดดอกมีขนาด 2-3 นิ้ว ดอกดกและอยู่กับต้นได้ดี ดาวเรืองชนิดนี้มีข้อเสียก็คือเมล็ดจะลีบ ไม่สามารถนำมาเพาะให้เป็นต้นใหม่ได้จึงเรียกว่า ดาวเรืองล่อ เช่นเดียวกับการผสมม้ากับลา มีลูกออกมาเรียกว่า ล่อ ซึ่งเป็นหมันจึงทำให้เมล็ดมีราคาแพงมาก และ การปลูกดาวเรืองด้วยเมล็ดชนิดนี้ จึงควรใช้เมล็ดเป็นปริมาณ 2 เท่าของจำนวนที่ต้องการ เนื่องเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำ ดาวเรืองลูกผสมที่นิยมปลูกมีอยู่หลายพันธุ์ คือ พันธุ์นักเก็ด (Nugget) ไฟร์เวิร์ก (Fireworks) เรด เซเว่น สตาร์(Red Sevenstar) และโชว์โบ๊ต (Showboat) (ปรัชญา, 2546)

การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis)

การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส เป็นการแบ่งเซลล์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ของร่างกาย ในการเจริญเติบโต ในสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ หรือในการแบ่งเซลล์ เพื่อการสืบพันธุ์ ในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว และหลายเซลล์บางชนิด เช่น พืช ไม่มีการลดจำนวนชุดโครโมโซม เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์จะได้ 2 เซลล์ใหม่ที่มีโครโมโซมเท่าๆ กัน และเท่ากับเซลล์ตั้งต้น พบที่เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด, ปลายราก, แคมเบียมของพืชหรือเนื้อเยื่อบุผิว, ไขกระดูกในสัตว์, การสร้างสเปิร์ม และไข่ของพืช มี 5 ระยะ คือ อินเตอร์เฟส (interphase), โพรเฟส (prophase), เมทาเฟส (metaphase), แอนาเฟส (anaphase) และ เทโลเฟส (telophase) (อมรา, 2540)

วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle)

วัฏจักรของเซลล์ หมายถึง ช่วงระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ในขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัว ซึ่งประกอบด้วย 2 ระยะ ได้แก่ การเตรียมตัวให้พร้อม ที่จะแบ่งตัว และกระบวนการแบ่งเซลล์

1. ระยะอินเตอร์เฟส (interphase) ระยะนี้เป็นระยะเตรียมตัว ที่จะแบ่งเซลล์ในวัฏจักรของเซลล์ แบ่งออกเป็น 3 ระยะย่อย

2. ระยะ M (M-phase) ระยะ M (M-phase) เป็นระยะที่มีการแบ่งนิวเคลียส และ แบ่งไซโทพลาสซึม ซึ่งโครโมโซม จะมีการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน ก่อนที่จะถูกแบ่งแยกออกจากกัน ประกอบด้วย 4 ระยะย่อย คือ โพรเฟส เมทาเฟส แอนาเฟส และเทโลเฟส

ในเซลล์บางชนิด เช่น เซลล์เนื้อเยื่อเจริญของพืช เซลล์ไขกระดูก เพื่อสร้างเม็ดเลือดแดง เซลล์บุผิว พบว่า เซลล์จะมีการแบ่งตัว อยู่เกือบตลอดเวลา จึงกล่าวได้ว่า เซลล์เหล่านี้ อยู่ในวัฏจักรของเซลล์

ตลอด แต่เซลล์บางชนิด เมื่อแบ่งเซลล์แล้ว จะไม่แบ่งตัวอีกต่อไป นั่นคือ เซลล์จะไม่เข้าสู่วัฏจักรของเซลล์อีก เข้าสู่ G0 จนกระทั่งเซลล์ชราภาพ (cell aging) และตายไป (cell death) ในที่สุด แต่เซลล์บางชนิดจะพักตัวหรืออยู่ใน G0 ชั่วระยะเวลาหนึ่ง ถ้าจะกลับมาแบ่งตัวอีก ก็จะเข้าวัฏจักรของเซลล์ต่อไป

ขั้นตอนต่างๆ ของโมโทซิส

1. ระยะอินเตอร์เฟส (interphase)

เป็นระยะที่เซลล์เติบโตเต็มที่ เซลล์มีการเปลี่ยนแปลง ทางเคมีมากที่สุด หรือมีเมแทบอลิซึมสูงมาก จึงเรียก Metabolic stage ใช้เวลานานที่สุด ดังนั้น ถ้าศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส จากกล้องจุลทรรศน์ จะพบเซลล์ปรากฏ อยู่ในระยะนี้มากที่สุด โครโมโซม มีลักษณะเป็นเส้นใยยาวขดไปมา เรียกว่า เส้นใย โครมาทิน (chromatin) มีการสังเคราะห์ DNA ขึ้นมาอีก 1 เท่าตัว หรือมีการจำลองโครโมโซมอีก 1 ชุด แต่ยังติดกันอยู่ ที่ปมเซนโทรเมียร์ (centromere) หรือ ไคเนโตคอร์ (kinetochore) ดังนั้นโครโมโซม 1 แท่ง จะมี 2 ขา เรียกแต่ละขานั้น เรียกว่า โครมาทิต (chromatid) โดยโครมาทิดทั้งสองขา ของโครโมโซมท่อนเดียวกัน เรียกว่า sister chromatid ดังนั้น ถ้าโครโมโซมในเซลล์ 8 แท่งก็จะมี 16 โครมาทิด หรือในคนเรา มีโครโมโซม 46 แท่ง ก็จะมี 92 โครมาทิด ระยะนี้ โครโมโซมจะมีความยาวมากที่สุด แบ่งออกได้ 3 ระยะ

ระยะ G1 เป็นระยะก่อนการสร้าง DNA ซึ่งเซลล์มีการเจริญเติบโตเต็มที่ ระยะนี้ จะมีการสร้างสารบางอย่าง เพื่อใช้สร้าง DNA ในระยะต่อไป

ระยะ S เป็นระยะสร้าง DNA (DNA replication) โดยเซลล์มีการเจริญเติบโต และมีการสังเคราะห์ DNA อีก 1 ตัว หรือมีการจำลองโครโมโซม อีก 1 เท่าตัว แต่โครโมโซมที่จำลองขึ้น ยังติดกับท่อนเก่า ที่ปมเซนโทรเมียร์ (centromere) หรือไคเนโตคอร์ (kinetochore) ระยะนี้ใช้เวลานานที่สุด

ระยะ G2 เป็นระยะหลังสร้าง DNA ซึ่งเซลล์มีการเจริญเติบโต และเตรียมพร้อม ที่จะแบ่งโครโมโซม และไซโทพลาสซึมต่อไป

2. ระยะโปรเฟส (prophase)

ระยะนี้โครมาทินจะหดตัว โดยการบิดเป็นเกลียวสั้นลง ทำให้เห็นได้ชัดเจนมากขึ้นว่าโครโมโซม 1 แท่งมี 2 โครมาทิน เยื่อหุ้มนิวเคลียส และนิวคลีโอลัสสลายไป เซนทริโอล (centrioles) ในเซลล์สัตว์ และโพรติสท์บางชนิด เช่น สาหร่าย รา จะเคลื่อนที่ แยกไปอยู่ตรงข้ามกัน ในแต่ละขั้วเซลล์ และสร้างเส้นใยโปรตีน (microtubule) เรียกว่า ไมโทติก สปินเดิล (mitotic spindle) และสปินเดิลไฟเบอร์ (spindle fiber) ไปเกาะที่เซนโทรเมียร์ ของทุกโครมาทิน ดังนั้น รอบๆ เซนโทรโอล จึงมีไมโทติก สปินเดิลไฟเบอร์ ยื่นออกมาโดยรอบมากมาย เรียกว่า แอสเทอร์ (Aster) สำหรับใช้ในเซลล์พืช ไม่มีเซนทริโอล แต่มีไมโทติก สปินเดิล การกระจายออก จากขั้วที่อยู่ตรงข้ามกัน (polar cap) ข้อควรทราบพิเศษ ระยะโปรเฟสนี้ พบว่า ในเซลล์สัตว์ จะมีเซนทริโอล 2 อัน หรือมีแอสเทอร์ 2 อัน

3. ระยะเมทาเฟส (metaphase)

ระยะนี้ไมโทติก สปินเดิลจะหดตัว ดึงให้โครมาทิดไปเรียงตัวอยู่ในแนวกึ่งกลางเซลล์ (equatorial plate) โครมาทิดหดสั้นมากที่สุด จึงสะดวกต่อการเคลื่อนที่ ของโครมาทิดมาก ระยะนี้เหมาะมากที่สุด ต่อการนับจำนวนโครโมโซม, จัดเรียงโครโมโซมเป็นคู่ๆ หรือที่เรียกว่าแคริโอไทป์ (karyotype) หรือเหมาะต่อการศึกษารูปร่าง ความผิดปกติ ของโครโมโซม ดอนปลายของระยะนี้ มีการแบ่งตัว ของเซนโทรเมียร์ ทำให้โครมาทิดพร้อมที่จะแยกจากกัน

4. ระยะแอนาเฟส (anaphase)

ระยะนี้ไมโทติก สปินเดิล หดสั้นเข้า ดึงให้โครมาทิดแยกตัวออกจากกัน แล้วโครมาทิด จะค่อยๆ เคลื่อนไปยังแต่ละขั้ว ของเซลล์ โครโมโซม ในระยะนี้จะเพิ่มจาก 2n เป็น4n เป็นระยะเวลาที่ใช้สั้นที่สุดระยะนี้จะเห็นโครโมโซม มีรูปร่างคล้ายอักษรตัววี (V), ตัวเจ (J) และตัวไอ (I) ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ ว่าอยู่กึ่งกลางของโครโมโซม หรือค่อนข้างปลาย หรือเกือบปลายสุด

5. ระยะเทโลเฟส (telophase)

เป็นระยะสุดท้ายของการแบ่งเซลล์ โดยโครมาทิดที่แยกออกจากกัน จะเรียกเป็น โครโมโซมลูก (daughter chromosome) ซึ่งจะไปรวมกลุ่มในแต่ละขั้วของเซลล์ มีการสร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบโครโมโซม และนิวคลีโอลัสปรากฏขึ้น ไมโทติก สปินเดิล สลายไป มีการแบ่งไซโทพลาสซึมออกเป็น 2 ส่วน คือ 1. ในเซลล์สัตว์ จะเกิดโดย เยื่อหุ้มเซลล์จะคอดกิ่วจาก 2 ข้าง เข้าใจกลางเซลล์ จนเกิดเป็นเซลล์ 2 เซลล์ใหม่ 2. ในเซลล์พืช จะเกิดโดย กอลจิคอมเพลกซ์สร้างเซลลูโลส มาก่อตัวเป็นเซลล์เพลท (cell plate) หรือแผ่นกั้นเซลล์ ตรงกลางเซลล์ ขยายไป 2 ข้างของเซลล์ ซึ่งต่อมาเซลล์เพลท จะกลายเป็นส่วนของผนังเซลล์ ผลสุดท้าย จะได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ ที่มีขนาดเท่ากันเสมอ โดยนิวเคลียสของเซลล์ใหม่ มีองค์ประกอบ และสมบัติเหมือนกัน และมีสภาพเหมือนกับนิวเคลียส ในระยะอินเตอร์เฟสของเซลล์เริ่มต้น

ระยะการแบ่งและการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ

1. อินเตอร์เฟส (Interphase)

เพิ่มจำนวนโครโมโซม (Duplication) ขึ้นมาอีกชุดหนึ่ง และติดกันอยู่ที่เซนโทรเมียร์ (1โครโมโซม มี 2 โครมาทิด) มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีมากที่สุด (metabolic stage) เซนตริโอล แบ่งเป็น 2 อัน ใช้เวลานานที่สุด โครโมโซมมีความยาวมากที่สุด

2. โปรเฟส (Prophase)

โครมาทิดหดสั้น ทำให้มองเห็นเป็นแท่งชัดเจน เยื่อหุ้มนิวเคลียส และนิวคลีโอลัสหายไป เซนตริโอลเคลื่อนไป 2 ข้างของเซลล์ และสร้างไมโทติก สปินเดิลไปเกาะที่เซนโทรเมียร์ ระยะนี้จึงมีเซนตริโอล 2 อัน

3. เมตาเฟส (Metaphase)

โครโมโซมเรียงตัวตามแนวกึ่งกลางของเซลล์ เหมาะต่อการนับโครโมโซม และศึกษารูปร่างโครงสร้างของโครโมโซม เซนโทรเมียร์จะแบ่งครึ่ง ทำให้โครมาทิดเริ่มแยกจากกัน โครโมโซมหดสั้นมากที่สุด สะดวกต่อการเคลื่อนที่

4. แอนาเฟส (Anaphase)

โครมาทิดถูกดึงแยกออกจากกัน กลายเป็นโครโมโซมอิสระ โครโมโซมภายในเซลล์เพิ่มเป็น 2 เท่าตัว หรือจาก 2n เป็น 4n (tetraploid) มองเห็นโครโมโซม มีรูปร่างคล้ายอักษรรูปตัว V , J , I ใช้เวลาสั้นที่สุด

5. เทโลเฟส (Telophase)

โครโมโซมลูก (daughter chromosome) จะไปรวมอยู่ขั้วตรงข้ามของเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียส และ นิวคลีโอลัสเริ่มปรากฏ มีการแบ่งไซโทพลาสซึม เซลล์สัตว์ เยื่อหุ้มเซลล์คอดเข้าไป บริเวณกลางเซลล์ เซลล์พืช เกิดเซลล์เพลท (Cell plate) กั้นแนวกลางเซลล์ ขยายออกไปติดกับผนังเซลล์เดิม ได้ 2 เซลล์ใหม่ เซลล์ละ 2n เหมือนเดิมทุกประการ

การเตรียมชิ้นส่วนเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม

เพื่อความสะดวกในการศึกษาเบื้องต้น ควรเลือกใช้พืชที่โครโมโซมขนาดใหญ่ และมีจำนวนน้อย โดยทำการเพาะเมล็ดให้งอกในกระดาษที่ใช้ทดสอบความงอกของเมล็ด หรือวัสดุที่ใกล้เคียงกันเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อราและบักเตรีที่ติดมากับเมล็ด

หลีกเลี่ยงการเพาะเมล็ดหรือตัวอย่างพืชอื่นๆ ในวัสดุที่มีดิน ทราย เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย เพราะเม็ดทรายที่ติดมากับรากพืชจะทำให้ cover slip แตกในระหว่างการกด cover slip หรือไม่ก็ต้องแน่ใจก่อนว่าไม่มีเม็ดทรายติดมา

รากพืชที่จะนำมาศึกษาโครโมโซม จะต้องเป็นรากที่กำลังมีการเจริญเติบโต โดยสังเกตจากรากที่มีสีขาวและปลายราก มีสีขาวขุ่นเล็กน้อย รากที่มีปลายรากสีคล้ำถือว่าเป็นรากที่ไม่ดี (Dyer, 1979)

ขั้นตอนการเตรียมพืชเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม

pretreatment

การทำ preteatment กับรากพืชเพื่อจะทำให้เซลล์พืชหยุดการแบ่งไมโตซิสในระยะเมทาเฟสซึ่งระยะนี้โครโมโซมจะมีขนาดสั้นบางที่สุด ทำให้การนับและการศึกษารูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจน สารที่ใช้ทำ pretreatment มีหลายชนิด แต่ละชนิดมีผลต่อเซลล์เหมือนกันคือทำให้ spindle fiber ของเซลล์ไม่สามารถสร้างขึ้นมาได้ การทำ pretreatment จะทำตอนที่จะ fix เซลล์ด้วยน้ำยา

สารที่ใช้ทำ pre-treating agents มีดังนี้

1. Colchicine ใช้ความเข้มข้น 0.01-0.02 % w/v colchicine มีลักษณะเป็นผงและจะละลายน้ำ หลังจากเตรียมสารแล้วควรเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิไม่เกิน 10 องศาเซลเซียส

2. 8-hydroxyquioline เตรียมที่ความเข้มข้น 0.002 M (0.29 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร)

3. paradichlorobenzene เตรียมให้ถึงระดับ ใช้เตรียมจาก 5-10 กรัม paradichlorobenzene ในน้ำกลั่น 500 มล. ใส่สารละลายนี้ไว้ในขวดที่ปิดจุก และเก็บไว้ในตู้อบ 60 องศาเซลเซียส นาน ตลอด 1 คืน จึงนำมาใช้ การแช่รากนาน 1 ชั่วโมง

4. α-bromo-naphthalene ใช้ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้น 1% ที่เตรียมจาก 1 มิลลิลิตร α-bromo-naphthalene ใน 100 ml ของ absolute ethanol เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง

น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (Fixative)

จุดประสงค์ของการใช้น้ำยาดังกล่าวก็เพื่อที่จะหยุดการทำงานของเซลล์ให้เร็วที่สุดโดยที่เซลล์ดังกล่าวจะต้องมีสภาพเหมือนกับเซลล์ที่ยังมีชีวิต เนื่องจาก fixative ไปมีผลทำให้ protein เกิด denature ขึ้น ดังนั้นอาจมีผลทำให้โครงสร้างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปได้บ้าง Fixative ที่ใช้ได้ผลดีตัวอย่างเช่น

1. Carnoy's fluid ประกอบด้วย absolute ethanol หรือ ethanol : glacial acetic acid ในอัตรา 3:1
2. Farmer's fluid ประกอบด้วย absolute ethanol : chloroform : glacial acetic acid ในอัตรา 6:3:1

น้ำยาย่อยสลาย (Macerating fluid)

ในการศึกษาโครโมโซมของพืชนั้นต้องการที่จะให้เซลล์ที่ปลายรากพืชแยกตัวออกมาเป็นเซลล์เดี่ยวๆให้มากที่สุดเพื่อเป็นการลดจำนวนเซลล์ที่จะซ้อนกันหลายๆชั้น ดังนั้นจึงต้องใช้กรดช่วยทำลายที่ยึดระหว่างเซลล์ ชนิดกรดและความเข้มข้นที่ใช้คือ 1 N HCl ที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจจะใช้ water bath หรือ ตู้อบความร้อน สามารถที่จะเก็บตัวอย่างพืชที่ผ่านการ maccerate มาแล้วไว้ได้ประมาณ 2 วัน โดยนำไปแช่น้ำแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส

การย้อมสี (Staining)

ในการศึกษาโครโมโซมพืชทั้งจากเซลล์ปลายรากและเซลล์ microsporocytc นั้น นิยมใช้สี acetocarmine และโดยเฉพาะมีส่วนของสนิมเหล็กปนอยู่ในสีด้วยแล้วจะทำให้โครโมโซมติดเข้มมากขึ้น อาจเรียกเทคนิคนี้ว่า iron-acetocarmine วิธีเติมเหล็กให้กับสีใช้ปลายเข็มเขี่ยปลายสนิมจุ่มในน้ำสีก็มีผล นอกจากนี้สี acetocamine แล้วยังมีสีประเภทอื่นๆใช้ย้อมเซลล์พืชได้ ในการเตรียมสีดังนี้

1. สี acetocarmine

อุ่น 45 % acetic acid ที่ร้อนละลายสี camine ลงไป โดยใช้อัตราส่วน 1 กรัมของ camine ในกรด acetic 200 มล. ต้มให้เดือดนาน 1-2 นาที หรือ จนกระทั่งสีแดงของ camineเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มขึ้น จากนั้นปล่อยให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง อาจใช้วิธีต้มให้เดือดระเหยเป็นไอแล้วกลั่นตัวเป็นหยดน้ำใน reflux condenser นาน 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นแล้วกรอง เก็บสารละลายนี้ในที่เย็นและมืด

2. สี Lacto-propionic orcein

ใช้สี Lacto-propionic orcein แทน acetocarmine ได้เช่นกัน วิธีเตรียม ผสม 1 กรัม ของ Orcein + สวนผสมของ Lactic acid 50 มล. และ propionic acid 50 มล. ทำที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้ผง Orcein ละลายใช้เวลาตลอดคืนแล้วกรอง เตรียม working solution เจือจาง ให้ได้ 45 %-60 %ของ stock soluttion ในน้ำแล้วกรอง เก็บสีไว้ในที่เย็นและมืด สามารถใช้ได้เป็นเวลาหลายเดือน

3. สี aceto-orcein

อุ่น glacial acetic acid แล้วละลายสี orcein ลงไปใช้ 2.2 กรับ ในน้ำ 100 มล. จากนั้นปล่อยให้สีเย็นแล้วเก็บเป็น stock solution ก่อนจะใช้ต้องทำกรดให้เจือจางเป็น 45 % ในน้ำแล้วกรอง นิยมใช้สี aceto-orcein ย้อมเซลล์สัตว์

4. สี alcolholic-hydrochloric-acid carmine

alcolholic-hydrochloric-acid carmine ย้อมเซลล์พืชโดยจะให้ความแตกต่างระหว่างไซโตพลาสซึมและโครโมโซมจอย่างชัดเจน วิธีการเตรียมดังนี้ ผสมกรด HCl เข้มข้น 1 มิลลิตร ในน้ำกลั่น 15 มล. ชั่ง carmine 4 กรัม ละลายลงในสารละลายกรด จากนั้นนำสารละลายสีและกรดตั้งไฟให้ร้อนจนเดือดเบา ๆ นาน 10 นาที ปล่อยให้เย็นจึงเติม 95 มล. ของ 85% แอลกอฮอล์กรองสีกอนใช้

5. การย้อมสี Feulgen technique

Feulgen reaction เป็นปฏิกิริยาที่ชี้ว่าส่วนใดเป็น DNA และส่วนใดไม่ใช้ DNA จากเทคนิคนี้ทำให้เฉพาะส่วนของโครโมโซมติดสี แต่ cytoplasm และ nucleolus จะไม่ติดสี งานทดลองนี้ทำโดย Feulgen และ Rossenbeck (1924) วิธีการเตรียมสีย้อมมีดังนี้ เทน้ำกลั่นที่เดือดแล้วขนาด 200 มล. ลงในสี basic fuhsin จำนวน 1 กรัม แล้วเขย่าภาชนะที่ใส่สารละลายสีนี้นาน 5 นาที ทำให้เย็นจนถึง 50 แล้ว

กรองใส่ขวดที่แสงผ่านไม่ได้หรือขวดฝาปิดสีชา เติม 30 มล. ของกรด HCl ลงไป จากนั้นเติม 3 กรัม ของ sodium หรือ potassium metabisulphite ($Na_2S_2O_5$ หรือ $K_2S_2O_5$) เก็บสีไว้ในที่เย็นและมืด ถ้าละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง แสดงว่าสีเก่าเกินไปไม่เกิดผลในการย้อม fuchsin solusion ที่เตรียมได้ใหม่จะไม่มีสี

6. การย้อมสีเซลล์ด้วย Feulgen reaction

นำปลายรากที่ fix ไว้เรียบร้อยแล้ววางแช่ใน 10% HCl ที่เย็น (เตรียม HCl conc : น้ำ กลั่นใน อัตราส่วน 1: 9) คอยจนส่วนของรากจมในกรด ดังกล่าว จึงย้ายมาแช่ใน10% HCl ที่อุ่น 60 องศาเซลเซียส ปล่อยให้ hydrolyze นาน 25 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แช่ปลายรากใน fuchsin solution นาน 20-30 นาที เมื่อต้องการจะตรวจดูโครโมโซมให้เตรียมรากบนสไลด์ หยด 40% acetic acid ลงไปแล้วบดขยี้เซลล์ให้แบนราบ (อมรา, 2540)

การเตรียม Slide

นำรากที่ผ่านการ macerate แล้วมาว่างบน slide โดยที่ต้องระวังอย่าให้รากแห้งในทุกๆขั้นตอน ใช้เข็มเขี่ยตัดเฉพาะส่วนปลายรากไว้ประมาณ 1 มิลลิเมตร เอาส่วนที่เหลือทิ้งไป หมดสีหยดเล็กๆที่ปลายลากดังกล่าว โดยที่ก่อนหยดสีถ้าหากว่าหยดน้ำส่วนของปลายรากพืชดังกล่าวให้ใช้กระดาษทิชชู่ซับเอาหมดน้ำออกก่อน ถ้าสีที่หยดที่หยดมีขนาดใหญ่เกินไปก็ให้ใช้กระดาษทิชชู่ซับออกบ้าง จากนั้นให้ใช้เข็มเขี่ย 2 อัน เขี่ยแยกเนื้อปลายรากให้ออกจากกันแล้วใช้ด้ามของเข็มเขี่ยค่อยๆ เคาะบนเนื้อเยื่อ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆแล้วค่อยๆ วาง cover slip บนหยดสี โดยที่ก่อนว่าง cover slip ถ้าเห็นว่ามีส่วนชิ้นเนื้อเยื่อที่ไม่แยกออกจากกันซึ่งจะมองเห็นได้ชัดเจนแล้ว ก็ให้ใช้ forcep คีบออกเสียก่อน จากขั้นตอนนี้สามารถนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ทันทีว่ามีเซลล์ที่ต้องการหรือไม่และติดสีเพียงใด หากว่าสียังติดไม่ดีพอก็ให้ทิ้งไว้สักครู่หนึ่ง ขั้นตอนนี้สามารถที่จะทำให้เซลล์กระจายตัวออกจากกันให้มากยิ่งขึ้น โดยการใช้ด้ามเข็มค่อยๆเขี่ย เคาะด้านบนของ cover slip หลายๆครั้ง การ squash เพื่อทำให้เซลล์แบนเป็นระนาบเดียวกัน ทำได้โดยการนำกระดาษกรองหรือกระดาษทิชชู่ซึ่งพับไว้หลายๆ ชั้น วางบน cover slip แล้วค่อยๆ ใช้หัวแม่มือกดลงตรงๆ โดยที่ต้องระวังไม่ให้ cover slip เคลื่อนที่ไปด้านข้างได้ แล้วนำไปตรวจดูสภาพภายในกล้องจุลทรรศน์ต่อไปได้

ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของโครโมโซมและมีบทบาทต่อการศึกษาทางพันธุศาสตร์ของเซลล์

1. โคลซิซิน (colchicine) เป็นสารแอลคาลอยด์ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการแบ่งเซลล์โดยยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ ทำหน้าที่ดึงเซนโทรเมียร์ไปยังขั้วของเซลล์ โครโมโซมจึงหยุดอยู่ที่ระยะเมตาเฟสซึ่งเป็นระยะที่โครโมโซมหดสั้นสุด แต่ไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของโครโมโซม จึงเป็นสารที่นิยมทำหน้าที่เป็น pretreatment ในการศึกษาโครโมโซม

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ pretreatment อีกประเภทหนึ่งทำให้โครโมโซมหดตัว แช่ตัวอย่างพืช

เช่น รากในสาร pretreatment กลุ่มนี้ได้แก่ α-bromonapthalene, 8-hydroxyquioline มีผลคล้ายโคลซิซีน

3. การลดปริมาณของสารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โครมาทิน อาจจะมีผลต่อขนาดของโครโมโซม เซลล์ที่ได้จากการแบ่งตัวค่อนข้างถี่จะมีโครโมโซมขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่มีระยะอินเตอร์เฟสค่อนข้างยาว

4. สารอาหารต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ มีผลต่อขนาดโครโมโซมด้วย ตัวอย่างเช่น ฟอสเฟต ที่ความเข้มข้นสูงๆ จะทำให้โครโมโซมมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมที่เลี้ยงในน้ำหรือมีฟอสเฟตต่ำ

5. อุณหภูมิ มีผลต่อขนาดโครโมโซมเช่นกัน เซลล์ที่มีการแบ่งตัวในที่มีอุณหภูมิต่ำๆ จะมีขนาดสั้น และมีการหดตัวของโครโมโซมมากกว่าเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในที่มีอุณหภูมิสูงๆ

ในการเตรียมสไลด์เพื่อการศึกษารูปร่าง และ จำนวนโครโมโซมจำเป็นต้องทำให้โครโมโซมมีขนาดสั้น และมีการกระจายของโครโมโซม โดยทั่วไปจะนิยมใช้สารเคมีในการทำ pretreatment ร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิต่ำๆด้วย จะช่วยลดระยะเวลาที่ต้องแช่สารเคมีสั้นลง(นิตย์ศรี, 2541)

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อัมพิกา (2527) ได้ศึกษาโครโมโซมของห้อ 9 พันธุ์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเป็น ดิพลอยด์เท่ากับ 16 แท่ง โครโมโซมมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างทางสัณฐาณวิทยาแต่ละพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

ปกขวัญและคณะ (2530) ได้ทำการศึกษาโครโมโซมและลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของพืชในสกุล Ocimum 3 ชนิด คือ แมงลักไทย *O. americanum* Linn. และ *O. canum* จากอินโดนีเซียพบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 64, 2n = 72 และ 2n = 66 ตามลำดับ

ดิเรก (2537) ผลของจำนวนโครโมโซมต่อลักษณะทางสัณฐานของเยอบีร่า พันธุ์ขาวใบจักร เทอร์รานีวาลิส เทอร์รามอนซา และเทอร์ราพาเรด ปรากฏว่าต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีโคลซิซินผสมอยู่ 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5 วัน ทำให้เยอบีร่ามีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัว คือ 2n = 4n = 100 ต้น เยอบีร่าที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นจะมีใบหนา สีเขียวเข้ม กลีบดอกกว้างและยาวกว่าปกติ

สาริณี (2537) ได้ทำการศึกษาทดลองนับโครโมโซมรากของต้นกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์ ต้นละ 10 เซลล์ หยุดวงชีพเซลล์ด้วย 1-bromonapthlene นาน 5-6 ชั่วโมง และ hydrolyse ในกรด HCl 1 N นาน 10 นาที ย้อมด้วยสี aceto orcein พบว่าดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 38 แท่ง และออลโลเตตราพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 76 แท่ง

ผ่องพรรณและคณะ (2538) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของมะตูม เก็บรากตัวอย่างเมื่อเวลา 10.30 นาฬิกา และการย้อมสีออร์ซีน (orcine) พบว่ามะตูมมีจำนวนโครโมโซม 2n = 14 รูปร่างโครโมโซมเป็นแบบ เมทาเซนตริก (metacentric chromosome) คือ มีเซนโทเมียร์อยู่บริเวณกึ่งกลางทำให้แขนของโครโมโซมมีความยาวเท่ากัน

ศิริพรและฉันทนา (2540) การศึกษาโครโมโซมของว่านมหาลาภจากเซลล์ปลายราก พบว่าวิธีการที่ได้ผลดีคือ การเก็บตัวอย่างรากเวลา 9.00 นาฬิกา หยุดวงชีพจรด้วย para-dichorobenzene นาน 4 ½ ชั่วโมง แยกเซลล์ใน HCl 1 N นาน 5 นาที แล้วย้อมด้วยสี carmine fuchsin นาน 1 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าว่านมหาลาภมีจำนวนโครโมโซม 2n = 68

ศิริศักดิ์ (2542) การตรวจสอบโครโมโซมปลายรากบัวหลวงพันธุ์สัตตบุตย์ใช้ acetocarmine squash methods เก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 8.30-11.00 นาฬิกา หยุดวงชีพเซลล์ใน 8-hydroxyquinoline นาน 7 ชั่วโมง แช่ด้วย 1 N HCl นาน 20 นาที ย้อมด้วยสี aceto orcein นาน 5 นาที พบว่าโครโมโซมที่นับได้คือ 2n = 16

Kalpanna and Tripathi (2003) ได้ทดลองชักนำเพิ่มจำนวนโครโมโซมของถั่ว pigeon โดยใช้สารโคลชิซิน พบว่าต้นถั่วที่เป็น autotetraploid มีความแข็งแรงในทางสัณฐานบางลักษณะ เช่น ใบ ดอก และละอองเรณู มากกว่าต้นพืชปกติ พืช autotetraploid มีการติดผลน้อยกว่าพืช diploid

ผลและวิจารณ์

การศึกษาโครโมโซมของดาวเรืองจากเนื้อเยื่อปลายรากโดยเก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 7.0.0-8.00 น. ตัดรากที่มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อตรวจนับโครโมโซมดาวเรือง โดยจะแบ่งออกตามระยะการแช่ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ได้ผลการทดลองดังนี้

<u>เนื้อเยื่อเจริญปลายรากดาวเรืองที่ไม่ได้แช่สาร 8-hydroxyquinoline (control)</u>

เมื่อตัดปลายรากที่เวลา 7.00 น. พบว่าเซลล์รากพืชส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะอินเตอร์เฟส นิวเคลียสจะมีขนาดใหญ่ขนาดของเซลล์ทั้งด้านกว้างและด้านยาวจะมีความยาวเกือบเท่ากัน (ภาพที่ 1a) ตัดปลายรากที่เวลา 7.30 น. มีบางเซลล์ที่มีโครโมโซมอยู่ในระยะแอนนาเฟส สังเกตได้จาก การที่โครโมโซมถูกดึงไปทั้ง 2 ฝั่งของเซลล์ (ภาพที่ 1b และc) ตัดปลายรากที่เวลา 8.00 น. จะเห็นว่าเซลล์ได้มีการแบ่งเซลล์เสร็จสิ้นลงไปแล้ว (ภาพที่ 1d)

<u>เนื้อเยื่อเจริญปลายรากดาวเรืองที่แช่ใน 8-hydroxyquinoline นาน 3 ชั่วโมง</u>

ตัดปลายรากที่เวลา 7.00 น. เซลล์จะอยู่ในระยะอินเตอร์เฟส สังเกตได้จากเซลล์และนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 2a) ตัดปลายรากที่เวลา 7.30 น. เนื่องจากเทคนิคการ squash ยังทำได้ไม่ดี จึงมีการซ้อนทับของเซลล์ ทำให้สังเกตเห็นระยะการแบ่งเซลล์ได้ไม่ชัดเจน ตัดปลายรากที่เวลา 8.00 น. เซลล์ได้มีการแบ่งเซลล์เสร็จสิ้นไปแล้ว posttelophase เริ่มสร้าง cell plate ขึ้นมากั้นระหว่างเซลล์ พบเยื่อหุ้มนิวเคลียสและนิวเคลียสมีขนาดเล็ก เหมือนกับเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟส (ภาพที่ 2b)

<u>เนื้อเยื่อเจริญปลายรากดาวเรืองที่แช่ใน 8-hydroxyquinoline นาน 6 ชั่วโมง</u>

ตัดปลายรากที่เวลา 7.00 น. เซลล์อยู่ในช่วงระยะโปรเฟสทำให้มองเห็นแต่โครโมโซมที่กำลังหดสั้นลง และส่วนประกอบภายในเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มมีการสลายไป แต่ไม่เหมาะที่จะนับโครโมโซม (ภาพที่ 3a) ตัดปลายรากที่เวลา 7.30 น. และ8.00 น. เนื่องจากการ squash ยังทำได้ไม่ดี จึงมีการซ้อนทับของเซลล์ และมีบางเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ในช่วงอินเตอร์เฟส ทำให้ไม่สามารถนับโครโมโซมได้ (ภาพที่ 3b)

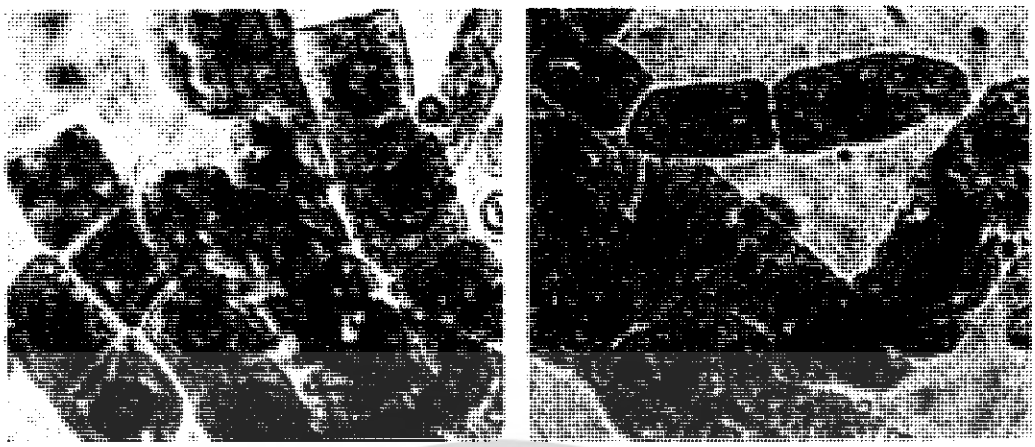
<u>เนื้อเยื่อเจริญปลายรากดาวเรืองที่แช่ใน 8-hydroxyquinoline นาน 12 และ24 ชั่วโมง</u>

เมื่อทำการเก็บเนื้อเยื่อปลายรากของดาวเรืองที่เวลา 7.00 – 8.00 นาฬิกา และนำมาแช่สาร 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเนื้อเยื่อที่ได้รับการแช่สารที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ทำให้รูปร่างของเซลล์เกิดการหดตัวของเซลล์เมมเบรน เข้าสู่บริเวณด้านในเซลล์ส่งผลให้รูปร่างเซลล์ผิดปกติ (ภาพที่ 4)

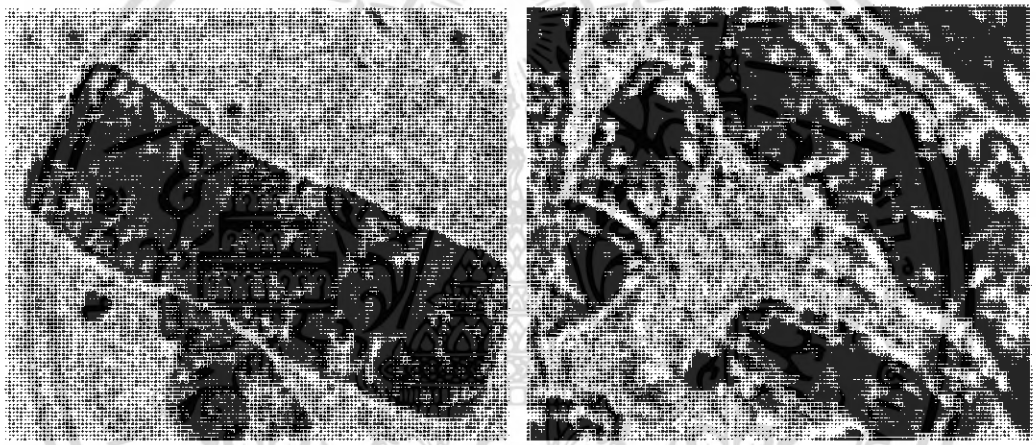
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผิดปกติของรูปร่างเซลล์ อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการได้รับสาร 8-hydroxyquinoline นานเกินไป ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kuras *et al.* (In Press) ได้ทำการศึกษาผลของ น้ำสกัดจากเปลือกไม้ของต้น Uncaria (*Uncaria tomentosa*) เป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ไมโตซีสจากเนื้อเยื่อเจริญปลายรากของหอมหัวใหญ่ พบว่าการแช่รากในน้ำสกัดจากเปลือก Uncaria เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นสูง (8 mg/ml และ 16 mg/ml) ชักนำให้รูปร่างเซลล์พืชผิดปกติ เกิดการหดตัว รวมทั้งมีผลให้นิวเคลียสหดตัว และรูปร่างผิดไปจากปกติ

73521



(a) (b)



(c) (d)

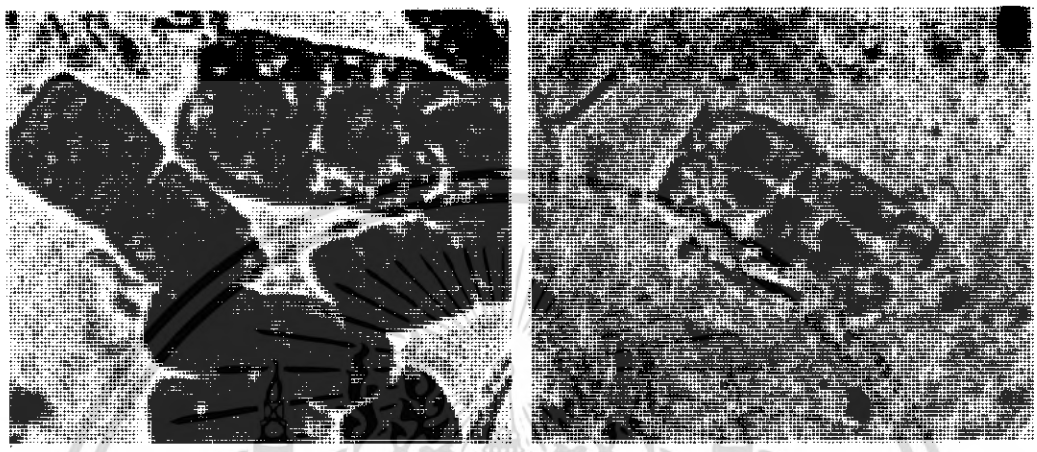
ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากดาวเรืองที่ไม่แช่สาร 8-hydroxyquinoline และเกิดรากที่เวลาต่างๆ (ที่กำลังขยาย 1000x)

a) รากที่เก็บเมื่อเวลา 7.00 น.

b) รากที่เก็บเมื่อเวลา 7.30 น.

c) รากที่เก็บเมื่อเวลา 7.30 น.

d) รากที่เก็บเมื่อเวลา 8.00 น.

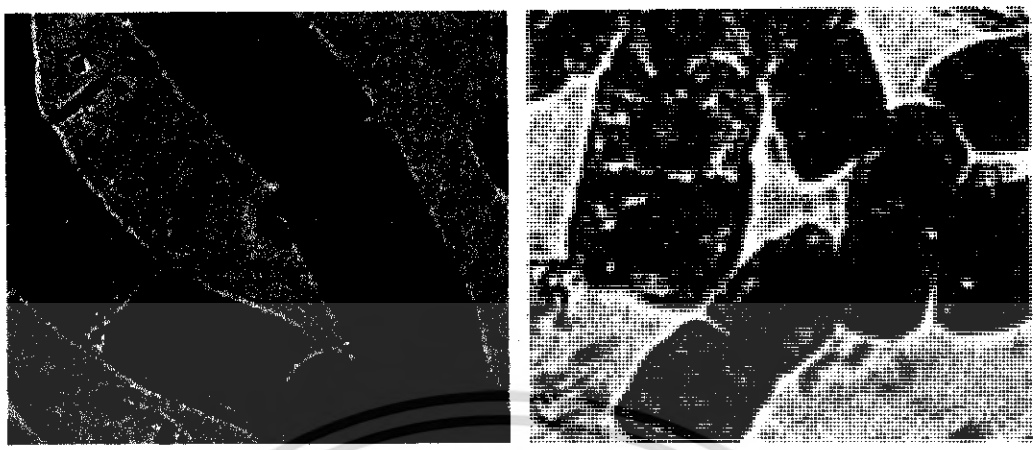


(a) (b)

ภาพที่ 2 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากคาวเรืองที่แช่สาร 8-hydroxyquinoline 3 ชั่วโมง และเกิดรากที่เวลาต่างๆ (ที่กำลังขยาย 1000x)

a) รากที่เก็บเมื่อเวลา 7.00 น.

b) รากที่เก็บเมื่อเวลา 8.00 น.



(a) (b)

ภาพที่ 3 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากดาวเรืองที่แช่สาร 8-hydroxyquinoline 6 ชั่วโมง และเกิดราที่เวลาต่างๆ (ที่กำลังขยาย 1000x)

a) รากที่เก็บเมื่อเวลา 7.00 น.

b) รากที่เก็บเมื่อเวลา 8.00 น.

(a)

ภาพที่ 4 เนื้อเยื่อเจริญปลายรากดาวเรืองที่แช่สาร 8-hydroxyquinoline 24 ชั่วโมง (ที่กำลังขยาย 1000x)

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซม พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมกับการเพื่อเซลล์เพื่อการศึกษาจำนวนโครโมโซม คือเวลา 7.30 นาฬิกาและการหยุด วงชีพเซลล์ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ที่ความเข้มข้น 0.002 M ภายในเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นทีการย้อมสีเนื้อเยื่อปลายรากพบว่าการอุ่นรากในสีย้อม alcoholic-hydrochloric-acid carmine เป็นเวลา ประมาณ 5 นาที ทำให้ปลายรากติดสีเข้ม

เอกสารอ้างอิง

กิตติพงษ์ พาละออ. 2540. การศึกษาจำนวนโครโมโซมในแคลลัสและต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดาวเรือง. วิทยานิพนธ์ ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 29 น.

ติเรก ตนพยอม. 2527. ผลของจำนวนชุดโครโมดซมต่อลักษณะสัณฐานวิทยาขิงเยอบีร่า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2541. พันธุ์ศาสตร์พืช. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 265 หน้า.

ปกขวัญ หุตางกูร และคณะ. 2530. การตรวจสอบจำนวนโครโมโซมใน *Ocium* spp. บางชนิดเพื่อการศึกษาทางอนุกรมวิธาน. รวมผลงานวิชาการสัมมนาสัมมนาวิชาการพันธุ์ศาสตร์ ครั้งที่ 5. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, หาดใหญ่.

ปริชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2546. ไม้ตัดดอก. นาคา อินเตอร์มีเดีย, กรุงเทพ. 142 น.

ผ่องพรรณ จรัสจินดารัตน์ และคณะ. 2538. งานวิจัยเรื่องจำนวนโครโมโซมมะตูม. วิทยาลัยเกษตร มหาสารคาม.

ศิริพร หาญนันทวิวัฒน์ และคณะ. 2541. การศึกษาโครโมโซมของว่านมหาลาภ. วารสารเกษตร วารสารวิชาการของคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 250-254

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร. 2542. ผลของรังสีต่อการกลายพันธุ์ของบัวหลวงพันธุ์สัตตบุตย์ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สาริณี ไชยเจริญ. 2538. การศึกษาจำนวนโครโมโซมลักษณะดอกและความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ดิพพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงทพฯ

อมรา คัมภิวานนท์. 2540. พันธุ์ศาสตร์ของเซลล์. เท็กแอนด์เจอร์นัลพับพิเคชั่น. กรุงเทพฯ. 253 หน้า

อัมพิกา ปุนนจิต. 2527. ชีววิทยาของดอกและจำนวนโครโมโซมของท้อเก้าพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dyer , A.F. 1979. Investigation Chromosomes. Edwand Arnold, London. 138 p.

Kalpanna, S. and S.N. Tripaithi. 2003. Colchicine induced autotetraploid of pigeon pea (*Cajanus cajan*). Proceeding of the National Academy of Science India. Section B, Biological Science 73(2):187-193.

Kuras, M., J. Augustgnowicz, E. Sliwinska, R. Ilasz, T. Tykarska, A. Zobel and K. Gullewicz. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of Allium test induced by bank water of Uncaria tomentosa (Wild) DC. Journal of Ethnopharmacology. (*In Press*)