ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2141

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของข้าวลูกผสมซึ่งได้รับการผสมจากข้าวพันธุ์ป่า (*Oryza minuta*) และข้าวพันธุ์ปลูก (*Oryza sativa*)

The Experiments to Identify the Chromosome Numbers of Hybrid between Two Rice Species *(Oryza minuta)* and (*Oryza sativa*)

T099938

โดย

นางสาวกนกพร นาคชาตรี

นางสาวเยาวภา ภัทรดิลกรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนะพงศ

ลำดับที่ 99938
วัน,เดือน,ปี 17 JUN 2009
b 11647892

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(พืชไร่)

พุทธศักราช 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของข้าวลูกผสมซึ่งได้รับการผสมจากข้าวพันธุ์ป่า (*Oryza minuta*) และข้าวพันธุ์ปลูก (*Oryza sativa*)

The Experiments to Identify the Chromosome Numbers of Hybrid between Two Rice Species *(Oryza minuta)* and (*Oryza sativa)*

โดย

นางสาวกนกพร นาคชาตรี

นางสาวเยาวภา ภัทรดิลกรัตน์

ได้พิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนะพงศ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรอง

.....

(รศ.ดร.สมยศ เดชภิรัตนมงคล)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง : การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของข้าวลูกผสมซึ่งได้รับการผสมจากข้าวพันธุ์ป่า (*Oryza minuta*) และข้าวพันธุ์ปลูก (*Oryza sativa*)

โดย : น.ส. กนกพร นาคชาตรี

: น.ส. เยาวภา ภัทรดิลกรัตน์

ภาควิชา : เทคโนโลยีการผลิตพืช

คณะ : เทคโนโลยีการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนะพงศ

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของข้าวลูกผสมซึ่งได้รับการผสมจากข้าวพันธุ์ป่า *(Orazy minuta)* และข้าวพันธุ์ปลูก *(Orazy sativa)* โดยเตรียมเซลล์จากปลายรากด้วยวิธี squash technique และย้อมสีด้วย acetocarmine จากนั้นนับจำนวนโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า จากการศึกษาพบว่าสามารถเห็นจำนวนโครโมโซมได้ประมาณ 30 ไบวาเลนท์ขึ้นไป โดยเห็นเป็นกลุ่มของโครโมโซมและเป็นจุด ๆ เนื่องจากข้าวที่นำมาศึกษาเป็นข้าวลูกผสมระหว่างข้าวป่า *(Orazy minuta)* และข้าวปลูก *(Orazy sativa)* ซึ่งตามทฤษฎีจะมีโครโมโซม 36 คู่ จะต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูงกว่านี้

คำสำคัญ: จำนวนโครโมโซม ข้าวลูกผสม ข้าวพันธุ์ป่า ข้าวพันธุ์ปลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title : The Experiments to identify the Chromosome Number of Hybrid between Two Rice Species *Oryza minuta* and *Oryza sativa*

Author : Miss Kanokporn Nakchartee

: Miss Yaowapa Pattaradilokrat

Department : Plant Production Technology

Faculty : Agricultural Technology

Advisor : Mr.Wichai Limkanchanapong

ABSTRACT

This study aims to count the chromosome numbers of root apex meristem cells from hybrid between two rice species *Oryza minuta* and *Oryza sative.* The root apex cells were prepared by using a chromosome squash technique and stained with acetocarmine. The chromosome numbers were then examined on light microscopy at 1000X magnification. The process showed that the root cells from the hybrids contained more than 30 chromosomes bivalent that appeared in group or spot of bivalent chromosome. Due to the rice varieties used in this experiment derived from the hybrid between *Oryza minuta* and *Oryza sativa*, of which 36 chromosomes should be identify theoritically, this will require the utilisation of a light microscopy with higher magnification.

Keywords: chromosome numbers, hybrids, *Orazy minuta*, *Orazy sativa*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนช่วยเหลือจากหลายฝ่ายด้วยกัน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนะพงศ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ซึ่งกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ติดตามความก้าวหน้าและช่วยแก้ไขปัญหา อุปสรรคตลอดจนข้อบกพร่องต่าง ๆ จนปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์กาญจนา กล้าแข็ง นักวิชาการศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ ความช่วยเหลือ สำหรับปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาและเป็นกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณศรีจันทร์ หลักทอง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ให้ความสะดวกในการเข้าใช้ห้องปฏิบัติการตลอดระยะเวลาการทำปัญหาพิเศษ คุณพัชรี ชูอำไพ เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ห้องภาควิชาเทคโนโลยีภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ซึ่งกรุณาตรวจทานและแก้ไขข้อบกพร่องแบบเอกสารวิชาปัญหาพิเศษ คุณสมมารถ อยู่สุขยิ่งสถาพร นักวิทยาศาสตร์ ซึ่งให้ความเอื้อเฟื้อด้านอุปกรณ์คอมพิวเตอร์และเทคนิคการถ่ายภาพ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ ที่คอยช่วยเหลือและเป็นแรงใจ รวมถึงทุกท่านที่มิได้เอ่ยนาม และคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเป็นสถานศึกษาและมีส่วนช่วยให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กนกพร นาคชาตรี
เยาวภา ภัทรดิลกรัตน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญภาพ	(2)
สารบัญภาคผนวก	(2)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	11
ผลการทดลองและวิจารณ์	14
สรุป	17
เอกสารอ้างอิง	18
ภาคผนวก	21
ประวัติผู้เขียน	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงโครโมโซมที่ตรวจพบในรากข้าวลูกผสมระหว่างข้าวป่า *(O.minuta)* และข้าวปลูก (*O.sativa*) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	15
2	แสดงโครโมโซมที่ตรวจพบในรากข้าวลูกผสมระหว่างข้าวป่า *(O.minuta)* และข้าวปลูก (*O.sativa*) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	15
3	แสดงโครโมโซมที่ตรวจพบในรากข้าวลูกผสมระหว่างข้าวป่า *(O.minuta)* กับข้าวปลูก (*O.sativa*) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	16
4	แสดงโครโมโซมที่ตรวจพบในรากข้าวลูกผสมระหว่างข้าวป่า *(O.minuta)* กับข้าวปลูก (*O.sativa*) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	16

สารบัญภาคผนวก

ภาพผนวกที่		หน้า
1	แสดงวิธีทำ squash technique	22
2	แสดงการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ของปลายรากหอม	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศไทย เกษตรกรส่วนใหญ่มีอาชีพทำนาผลผลิตที่เหลือจากการบริโภคภายในประเทศแล้วจะส่งออกขายยังต่างประเทศ ในปี พ.ศ. 2548 ประเทศไทยส่งออกข้าวเป็นปริมาณ 7.537 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าถึง 93,548 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) ซึ่งพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการผลิตเหล่านี้ค่อนข้างไม่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลซึ่งขณะนี้ถือเป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญของประเทศไทย การป้องกันและกำจัดสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ศัตรูธรรมชาติของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล การใช้สารเคมี และการใช้พันธุ์พืชต้านทาน เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปแล้วว่าการใช้สารเคมีนอกจากจะสิ้นเปลืองแล้วยังมีผลข้างเคียงต่อเกษตรกรและสิ่งแวดล้อมอีกด้วย วิธีที่ได้ผลและปลอดภัยวิธีหนึ่ง คือ การใช้พันธุ์ต้านทานร่วมกับวิธีอื่น ๆ อย่างเหมาะสม (ปรีชา และ ธีระ, 2528) ดังนั้นจึงได้มีความพยายามที่จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวหลายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย เพื่อให้มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ข้าวพันธุ์ปลูก (*Oryza sativa*, 2n=24, AA) เป็นข้าวที่มีการปลูกเพื่อขายเป็นสินค้าออกแต่ไม่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จึงได้มีความพยายามปรับปรุงพันธุ์โดยการชักนำลักษณะความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเข้าสู่ข้าวพันธุ์นี้ โดยการผสมกับพันธุ์ป่า (*Oryza minuta*, 2n=48, BBCC) ซึ่งมีลักษณะความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยหวังว่าจะได้ลูกผสมที่ให้ผลผลิตสูงกว่าข้าวปลูกและต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเหมือนข้าวป่า แต่เนื่องจากการผสมระหว่างข้าวต่างชนิดนี้ ทำให้เมล็ดที่เกิดขึ้นไม่สามารถเติบโตเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์และงอกได้ในสภาพธรรมชาติและเนื่องจากการผสมระหว่างข้าวต่างชนิดนี้เอง ทำให้ต้นลูกผสมมีชุดโครโมโซมเป็น ABC และเป็นหมันไม่สามารถให้ลูกในรุ่นต่อไปได้เพราะโครโมโซมไม่สามารถที่จะเข้าคู่กันได้ จึงต้องมีการชักนำให้ลูกผสมมีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น AABBCC โดยการใช้สารละลายโคลซิซีน

การตรวจนับจำนวนโครโมโซมของข้าวจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญ เพื่อที่จะทราบได้ว่าข้าวที่ได้มีโครโมโซมเท่าไรเป็นไปตามทฤษฎีหรือไม่

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมของข้าวลูกผสมซึ่งได้รับการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวป่า (*Oryza minuta*) และข้าวปลูก (*Oryza sativa*)
2. เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาและปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อประโยชน์ด้านอื่น ๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

การศึกษาลักษณะและความเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิตนั้น มีความสัมพันธ์กับโครโมโซม (อมรา, 2540) เนื่องจากโครโมโซมเป็นตำแหน่งที่อยู่ของยีนซึ่งเป็นตัวควบคุมพฤติกรรมต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต ถ้าสิ่งมีชีวิตใดมีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนไปจากเดิมย่อมก่อให้เกิดผลต่าง ๆ ตามการศึกษารูปร่างลักษณะของโครโมโซมจึงเป็นสิ่งที่สำคัญยิ่ง สิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์มีจำนวนและลักษณะของโครโมโซมคงที่ สิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์โดยใช้เพศมีจำนวนโครโมโซม 2 แบบ ในเซลล์ต่างชนิดกัน เซลล์ร่างกายเป็นแบบดิพพลอยด์ (2n) และเซลล์สืบพันธุ์เป็นแบบแฮพพลอยด์ (n) สิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศมีเพียงแบบเดียว คือ อาจเป็นดิพพลอยด์หรือแฮพพลอยด์ก็ได้ขึ้นอยู่กับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ

โครโมโซม (chromosome) ประกอบด้วย (ไพศาล, 2535) กรดนิวคลีอิคพวก DNA (deoxyribonucleic acid) และโปรตีนพวกฮิสโตน (histone) และโปรตามีน (protamine) ฮิสโตนนั้นอาจพบโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตทั่ว ๆ ไป ส่วนโปรตามีนจะพบในโครโมโซมของสัตว์จำพวกนก ในขณะที่นิวเคลียสแบ่งตัวในระยะ metaphase หรือ anaphase นั้น โครโมโซมมีขนาดใหญ่และหดสั้น สามารถส่องเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา เหตุที่โครโมโซมมีขนาดใหญ่เช่นนี้ก็เพราะว่ามีการพับไปพับมาจนเกิดเป็นเส้นสายขนาดใหญ่นั้นเอง และจากการย้อมสีโดยใช้สารเคมีพบว่าภายในนิวเคลียสมีร่างแหซึ่งติดทึบอยู่ทั่วไป เรียกส่วนที่เป็นร่างแหว่า โครมาทิด (chromatin) เมื่อเซลล์แบ่งตัว (อมรา, 2540) ร่างแหนี้จะปรากฏเป็นเส้นใยเล็ก ๆ อันเกิดจากการเรียงตัวของท่อเล็กที่เรียกว่า microtubule กลายเป็นเส้นใยยาวเรียกว่า สายสปินเดิล (spindle fiber) สายสปินเดิลจะมีปลายข้างหนึ่งยึดติดกับเซนทริโอนและปลายอีกข้างหนึ่งยึดติดเซนโทรเมียร์ (centromere) ของโครโมโซม สายสปินเดิลจะช่วยดึงโครโมโซมให้เคลื่อนตัวได้ในขณะที่มีการแบ่งตัว

สิ่งมีชีวิตซึ่งอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน (ไพศาล, 2535) มีโครโมโซมเท่ากันเสมอ เช่น คนมีจำนวนโครโมโซม 2n=46 หนู 2n=42 กระต่าย 2n=44 และข้าวโพด 2n=20 เป็นต้น ในเซลล์ร่างกายมักมีโครโมโซมในสภาพ 2n คือ โครโมโซมแต่ละชนิดจะมีอยู่เป็นคู่ ๆ ซึ่งอาจพูดว่ามีโครโมโซมอยู่ 2 ชุด หรือ diploid ส่วนหน่วยสืบพันธุ์ (gamete) นั้นมักจะมีโครโมโซม 1 ชุด ซึ่งเรียกว่า haploid (n) พืชหลายชนิดอาจมีโครโมโซมเกิน 2 ชุด ก็ได้ คือ อาจมีโครโมโซม 3 ชุด หรือ triploid, 4 ชุด (4n, tetraploid), 5 ชุด (5n, pentaploid) เป็นต้น

การศึกษาโครโมโซมพบว่า (อมรา, 2540) ระยะของไมโทซิสช่วงเวลาเดียวของวัฏจักรเซลล์ที่โครโมโซมมีรูปร่างเห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์ในไมโทซิส (ภาพผนวกที่ 2) คือ ระยะแรกเรียกว่า โพเฟส (prophase) ระยะต้นของโพเฟสนั้นโครโมโซมปรากฏเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยแต่ละเส้นประกอบด้วยสายใยเป็นคู่เรียกว่า sister chromatin ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตอนปลายระยะนี้โครโมโซมจะหดสั้นมาก แต่ละโครโมโซมจะมีรอยคอดติดสีจางเรียกว่า เซนโทรเมียร์ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเกาะติดของสายสปินเดิลเพื่อช่วยแยกโครโมโซมออกจากการแบ่งเซลล์ ระยะโครโมโซมจากเซนโทรเมียร์ไปถึงปลายโครโมโซมข้างใดข้างหนึ่งเรียกว่า แขน (arm) เมื่อสิ้นสุดระยะโพเฟสจะพบว่าผนังนิวเคลียสเกิดการสลายตัวกลายเป็นส่วนประกอบของเอนโดพลามิคเรติคูลลัม (endoplasmic reticulum) และเริ่มเข้าสู่ระยะแบ่งเซลล์อีกครั้งเรียกว่า เมทาเฟส (metaphase) โครโมโซมหดตัวหนาขึ้น สังเกตเห็นโครโมโซม 1 แท่ง ประกอบด้วยโครมาทิด 2 แท่ง จากนั้นเซนโทรเมียร์จะแบ่งตัวเป็นสองแล้วเคลื่อนย้ายไปอยู่คนละเซลล์ พร้อมสร้างสายใยสปินเดิล ระยะนี้มีความสำคัญมาก คือ โครโมโซมจะหดสั้นที่สุดและเป็นระยะที่เหมาะสมอย่างยิ่งในการนำโครโมโซมมาศึกษาทางไซโตจินิติค เช่น นับจำนวน ตรวจรูปร่างและนำมาย้อมสีแบบต่าง ๆ ต่อมาเริ่มเคลื่อนย้ายมาอยู่ตรงกลางของเซลล์ เซนโทรเมียร์ของแต่ละโครโมโซมมีการแบ่งครึ่งเพื่อทำการแยกโครมาทิด ระยะต่อมา คือ ระยะแอนนาเฟส (anaphase) โครโมโซมแยกออกจากกันและเคลื่อนย้ายไปอยู่คนละขั้วของเซลล์ดิพลอยด์ของสปีชีส์นั้น ๆ ระยะสุดท้ายของไมโทซิส คือ เทโลเฟส (telophase) โครโมโซมที่แยกไปอยู่คนละขั้วเริ่มคลายการหดตัวและขยายยาว เริ่มเห็นผนังนิวเคลียสสร้างขึ้นล้อมรอบของแต่ละกลุ่มของโครโมโซม ภายหลังเมื่อมีการแบ่งเซลล์ของนิวเคลียสแล้วเริ่มแบ่งไซโตพลาสซึมในเซลล์สัตว์พบว่าผนังเซลล์จะคอดตรงกลางแล้วแยกออกเป็นสองเซลล์ สำหรับเซลล์พืชจะมีการสร้างผนังเซลล์ (cell plate) มีลักษณะเป็นผนังบางกั้นตรงกลางสำหรับเซลล์ ซึ่งเวลาต่อมาจะมีสาร cellulose มาสะสมจนเปลี่ยนสภาพเป็นผนังเซลล์ที่แข็งแรงเรียกว่า cell wall เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์จะได้เซลล์แม่เริ่มต้น 1 เซลล์ แบ่งได้เป็นเซลล์ลูกจำนวน 2 เซลล์

ความสนใจในการศึกษาจำนวนโครโมโซม (อมรา, 2540) เริ่มมีมาตั้งแต่ต้นศตวรรษที่ 20 โดยเริ่มจากการศึกษาโครโมโซมพืชและแมลง ผู้ที่สนใจคือ Muller โดยทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมโดยใช้รังสี McClintock เป็นคนแรกที่ทำการศึกษาโครโมโซมในระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของข้าวโพดจนได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ. 1983

นอกจากนี้มีผู้ให้คำจำกัดความของโครโมโซม (กันยารัตน์, 2532) คือ โครงสร้างทางพันธุกรรม (heredity structure) ที่เป็นที่อยู่ของหน่วยกรรมพันธุ์ โครโมโซมทำหน้าที่เก็บรักษา (storage) ถ่ายถอด (transmission) และแสดงออก (expression) ของข้อมูลพันธุกรรม โครโมโซมถูกพบครั้งแรกโดย Strasburger ในปี ค.ศ. 1870 ต่อมาในปี ค.ศ. 1888 Waldeyer จึงเรียกส่วนของนิวเคลียสที่ติดสีนี้ว่า chromosome ซึ่งแปลว่า color body ตามความหมายของ Waldeyer โครโมโซมก็คือ โครงสร้างที่ประกอบด้วยโครมาทิดที่พร้อมจะติดสีย้อมที่เป็นเบส (basic dye) เพราะโครมาทิดจะขวั้นกันแน่นระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์ และคุณสมบัติประการสุดท้ายของโครโมโซมก็คือ โครโมโซมต้องมีรูปร่าง ขนาดและจำนวนคงที่ในแต่ละเซลล์ เมื่อดูโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธรรมดาจะเห็นโครโมโซมเป็นเส้นบาง ๆ (linear thread) หรือเป็นแท่ง (rod shape) บนโครโมโซมจะพบภาพต่าง ๆ กัน

ประโยชน์ของการศึกษาโครโมโซมในโซมาติกเซลล์ (กันยารัตน์, 2532)

ใช้บอกจำนวนโครโมโซมในสิ่งมีชีวิตได้ คือ บอกจำนวน somatic number = 2n เมื่อรู้จำนวนโซมาติกนัมเบอร์แล้วสามารถหาจำนวนโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์ (genetic number = n) ซึ่งเท่ากับครึ่งหนึ่งของโซมาติกนัมเบอร์เสมอ นอกจากศึกษาจำนวนโครโมโซมแล้วยังนำโครโมโซมมาจัดคาริโอไทป์ ดูบี-โครโมโซม ศึกษาการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิส การนับจำนวนโครโมโซมมีความสำคัญต่อการศึกษาเซลล์พันธุ์ศาสตร์ การปรับปรุงพันธุ์พืช อนุกรมวิธานและวิวัฒนาการ

การเตรียมโครโมโซม

1. การเตรียมโครโมโซมจากรากพืช (จากระยะไมโทซิส) (อมรา, 2540)

ปลายรากพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดหรือปลูกพืช รากที่นำมาใช้ต้องสดและมีสุขภาพดี เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีอัตราการแบ่งเซลล์มาก ๆ นิยมใช้รากแขนง (lateral root) ลักษณะรากที่ดีมีความเปราะ โปร่งแสงและมีสีขาวขุ่น ส่วน tip หรือปลายรากมีสีขาวอมครีม ถ้าไม่สามารถหารากได้อาจใช้เนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่เป็น meristemmatic tissues เช่น จากใบอ่อนหรือส่วนของดอก เช่น ผนังรังไข่และเมล็ดอ่อน ซึ่งใช้วิธีเตรียมเช่นเดียวกับราก

Pretreatment ล้างรากพืชให้สะอาด ตัดรากตามยาวจากปลายรากขึ้นมาประมาณ 1 เซนติเมตร แช่ในสารละลาย pretreatment เพื่อให้เซลล์หยุดการแบ่งไมโทซิสที่ระยะเมทาเฟส (โดยใช้สารละลาย colchicines ตามหัวข้อที่ 2) เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องหรือเก็บไว้ในที่เย็นอุณหภูมิต่ำกว่า 18 องศาเซลเซียส ภาชนะที่ใช้ต้องปราศจากสารเคมีหรือผงซักฟอก ระหว่างแช่ควรเขย่าภาชนะเพื่อให้อากาศแทรกในน้ำยา (ในกรณีที่มีรากเป็นจำนวนมากอาจใช้เครื่องปั๊มอากาศตู้ปลาก็ได้) เมื่อสิ้นสุดเวลานำรากออกมาแช่ในน้ำยา fixative ต่อไป

Fixation เลือกรากที่มีลักษณะที่ดี (โปร่งและ tip สีขาวขุ่น) แช่ในน้ำยา fixation อย่างน้อย 15 นาที ถ้าต้องการเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนนำมาศึกษาโครโมโซมให้เปลี่ยนแปลงการแช่ปลายรากจากน้ำยา fixative มาเป็น ethanol 70% และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะศึกษาต่อไป

Maceration (การทำให้เซลล์นิ่ม) โดยวางปลายรากบนแผ่นสไลด์หลังจากนั้นหยด 1N HCl เป็นเวลา 5 นาที (ควรทำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) แล้วล้างรากด้วยน้ำสะอาด ถ้ารากที่ทำมีจำนวนมากอาจแช่ในหลอดแก้วที่มีน้ำอยู่ปิดปากหลอดด้วยผ้าขาวบางและปล่อยให้น้ำไหลเข้าออกจะสามารถเก็บรากไว้ในน้ำนาน 1-2 วัน หลังจากนั้นนำรากขึ้นจากน้ำเพื่อศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cell suspension นำรากขึ้นจากน้ำวางปลายรากบนแผ่นสไลด์ ซับน้ำส่วนที่เกินออก ย้อมด้วยสีอะซิโตนคาร์มีน จำนวน 1 หยด ใช้มีดตัดเอาส่วนของหมวกราก ขยี้รากให้แบนด้วยเข็มเขี่ยปลายแบน ผ่านสไลด์ไปบนเปลวไฟ (ใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์) ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ย้อมสีนาน 5-10 นาที ทำ squash technique (ภาพผนวกที่ 1) ตรวจดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำสไลด์ให้เซลล์คงอยู่ชั่วคราวโดยการปิดขอบกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บหรือพาราฟินที่หลอมแล้ว

2. การเตรียมสารเคมีในการศึกษาโครโมโซม (อมรา, 2540; Adrian, 1979; Kamemoto and Sagrik, 1976)

Pretreatment

การทำ Pretreatment กับรากพืชเพื่อที่จะทำให้เซลล์หยุดการแบ่งเซลล์แบบเซลล์ไมโทซิสในระยะเมทาเฟส สารที่ใช้ในการทำ pretreatment มีหลายชนิดมีผลต่อเซลล์เหมือนกัน คือ ทำให้สายสปินเดินของเซลล์ไม่สามารถสร้างขึ้นมาได้ สารที่ใช้ทำ pretreatment มีดังนี้

1. Colchicines ใช้ความเข้มข้น 0.2% w/v ในน้ำ แช่ปลายรากนานประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นจึง fix รากในน้ำยา fixative

2. 8-hydroxyquinoline เตรียมที่ความเข้มข้น 0.002 M ในน้ำ เพื่อให้ละลายน้ำดีใช้วิธีอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10-12 นาที บางครั้งอาจนานถึง 1 ชั่วโมง จึงจะละลายหมด

3. Para-dichlorobenzene เตรียมจาก 5-10 กรัม para-dichlorobenzene ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ใส่สารละลายนี้ไว้ในขวดที่ปิดจุกและเก็บไว้ในตู้อบ 60 องศาเซลเซียส นานตลอด 1 คืน จึงนำมาใช้ การแช่รากอาจแช่อยู่นาน 15 นาที ถึง 4 ชั่วโมง จากนั้นจึง fix ราก

Fixative solution หรือ Killing solution

น้ำยาที่เป็น fixing หรือ killing นี้ ใช้เพื่อทำให้เซลล์พืชคงสภาพเดิมเหมือนเช่นการดองสัตว์ให้คงสภาพไม่เปื่อยเน่า น้ำยาประเภทนี้จำต้องเตรียมใหม่แล้วใช้ทันที โดยมีสูตรต่าง ๆ ดังนี้

1. Carnoy's fluid ประกอบด้วย absolute ethanol หรือ methanol : glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stain (สีย้อม)

ในการศึกษาโครโมโซมพืชทั้งจากเซลล์รากและเซลล์ Microsporocyte นั้น นิยมใช้สี acetocarmine โดยมีส่วนของสนิมเหล็กปนอยู่ด้วยแล้วมีผลทำให้โครโมโซมติดสีดีขึ้นอาจเรียกเทคนิคนี้ว่า iron-acetocarmine นอกจากนี้ยังมีสีประเภทอื่น ๆ ที่ใช้ย้อมเซลล์พืช มีดังนี้

1. acetocarmine อุ่น 45% acetic acid ที่ร้อนละลายสี carmine ลงไปโดยใช้อัตราส่วน 1 กรัม carmine ในกรด acetic 200 มิลลิลิตร ต้มเดือดนาน 1-2 นาที จนกระทั่งสีแดงของ carmine เปลี่ยนสีแดงเข้มขึ้นจากนั้นปล่อยให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง อาจใช้วิธีต้มเดือดให้ระเหยเห็นไอแล้วกลั่นเป็นหยดน้ำใน reflux condenser นาน 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นแล้วกรอง จากนั้นเก็บสารละลายนี้ในที่เย็นและมืด

2. สี Lacto-propionic orcine แทน acetocarmine วิธีเตรียมโดยใช้ 1 กรัม ของ orcine รวมกับส่วนผสมของ lactic acid 50 มิลลิลิตร และ propionic acid 50 มิลลิลิตร ทำที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้ผง orcine ละลายใช้เวลาตลอดคืนแล้วกรอง เตรียม working solution : เจือจาง stock solution ให้ได้ 45-60% ของ stock solution ในน้ำแล้วกรอง เก็บสีในที่เย็นและมืด สามารถใช้ได้เป็นเวลานานหลายเดือน

3. การเตรียมสี aceto-orcine อุ่น glacial acetic acid แล้วละลายสี orcine 2.2 กรัม ในกรด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปล่อยให้สีเย็นแล้วเก็บเป็น stock solution ก่อนจะใช้ต้องทำกรดให้เจือจางเป็น 45% ในน้ำกรอง นิยมใช้สีนี้ย้อมเซลล์สัตว์

4. การเตรียมสี Alcoholic-hydrochloric-acid carmine ย้อมเซลล์พืชโดยจะให้ความแตกต่างระหว่างไซโตพลาสซึมและโครโมโซมได้ชัดเจน วิธีเตรียมทำโดย ผสมกรด HCl (เข้มข้น 1 มิลลิลิตร) ในน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร แล้วใช้ 4 กรัม ของ carmine ละลายลงในน้ำกรดนี้ จากนั้นนำสารละลายสีและกรดนี้ตั้งไฟให้ร้อนจนเดือดเบา ๆ นาน 10 นาที ปล่อยให้เย็นจึงเติม 95 มิลลิลิตร ของ 85% แอลกอฮอล์ลงไปกรองสีก่อนใช้

5. การย้อมโดย Feulgen technique เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ชี้ว่าส่วนใดเป็น DNA และส่วนใดไม่ใช่ DNA เทคนิคนี้ทำให้ส่วนของโครโมโซมติดสีแต่ cytoplasm และ nucleolus จะไม่ติดสี วิธีการเตรียม คือ เทน้ำกลั่นที่เดือดแล้วปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงใน สี basic fuchsine จำนวน 1 กรัม แล้วเขย่าภาชนะที่ใส่สารละลายนี้นาน 5 นาที ทำให้เย็นจนถึง 50 องศาเซลเซียส แล้วกรองใส่ไว้ในขวดที่แสงผ่านไม่ได้หรือขวดปิดสีชา เติม 30 มิลลิลิตร ของกรด HCl ลงไปจากนั้นเติม 3 กรัม ของ sodium หรือ potassium metabisulphite เก็บสีไว้ในที่เย็นและมืด ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่าสีเก่าเกินไปไม่มีผลต่อการย้อมต้องเตรียมใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการย้อมสีเซลล์ Feulgen technique นำปลายรากที่ fix ไว้เรียบร้อยแล้วมาแช่ใน 10% HCl ที่ 60 องศาเซลเซียส ปล่อยให้ hydrolyze นาน 25 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แช่ปลายรากใน Feulgen technique นาน 20-30 นาที แล้วจึงใช้วิธี squash technique

ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของโครโมโซมและมีบทบาทต่อการศึกษาทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ (นิตย์ศรี, 2541)

1. โคลซิซีน (colchicines) เป็นสารแอลคาลอยด์ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการแบ่งเซลล์โดยยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ ซึ่งทำหน้าที่ดึงเซนโทรเมียร์ไปยังขั้วของเซลล์ โครโมโซมจึงหยุดที่ระยะเมทาเฟสซึ่งเป็นระยะที่โครโมโซมหดสั้นที่สุด แต่ไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งของโครโมโซมจึงเป็นสารที่นิยมทำหน้าที่ pretreat ในการศึกษาโครโมโซม

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Pretreatment อีกประเภทหนึ่งที่ทำให้โครโมโซมหดตัว แช่ตัวอย่างพืช เช่น รากในสาร pretreat กลุ่มนี้ได้แก่ แอลฟา-bromonapthalenr, 8-hydroxyquinoline มีผลคล้ายโคลซิซีน

3. การลดปริมาณของสารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โครมาทิดอาจจะมีผลต่อขนาดของโครโมโซมเซลล์ที่ได้จากการแบ่งตัวค่อนข้างที่จะมีโครโมโซมขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่มีระยะอินเตอร์เฟสค่อนข้างยาว

4. สารอาหารต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์มีผลต่อขนาดโครโมโซมด้วย เช่น ฟอสเฟตที่ความเข้มข้นสูง ๆ จะทำให้โครโมโซมมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมที่มีการเลี้ยงในน้ำหรือมีฟอสเฟตน้อย

5. อุณหภูมิมีผลต่อขนาดโครโมโซมเช่นกัน เซลล์ที่มีการแบ่งตัวในที่ ๆ มีอุณหภูมิต่ำ ๆ จะมีขนาดสั้นและมีการหดตัวของโครโมโซมมากกว่าเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในที่มีอุณหภูมิสูง ๆ

ในการเตรียมสไลด์เพื่อการศึกษารูปร่างและจำนวนโครโมโซม จำเป็นต้องทำให้โครโมโซมมีขนาดสั้นและมีการกระจายของโครโมโซม โดยทั่วไปนิยมใช้สารเคมีในการทำ Pretreatment ร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิต่ำ ๆ ด้วยจะช่วยลดระยะเวลาที่ต้องแช่สารเคมีสั้นลง

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ดิเรก (2537) ผลของจำนวนต่อลักษณะทางสัณฐานของเยอบีร่า พันธุ์ขาวใบจักร เทอร์รานีวาลิส เทอร์รามอนซา และ เทอร์ราพาเรด ในอาหาร MS ปรากฏว่าต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีโคลซิซีนผสมอยู่ 0.4% เป็นเวลา 5 วัน ทำให้เยอบีร่ามีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัว คือ 2n=4n=100 ต้นเยอบีร่าที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นจะมีใบหนา สีเขียวเข้มและขนาดของปากใบใหญ่กว่าปกติแต่เจริญเติบโตไม่ค่อยดี แตกหน่อน้อย ดอกมีสีเขียวเข้ม กลีบดอกกว้างและยาวกว่าปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปกขวัญ และ คณะ (2530) ได้ทำการศึกษาโครโมโซมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชในสกุล *Ocimum* 3 ชนิด คือ แมงลักไทย (*Ocimum americanum* Linn. *Syn.*), *O.americanum* Linn. และ O.canum ims จากอินโดนีเซียพบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=64, 2n=72 และ 2n=66 ตามลำดับ

ผ่องพรรณ และ คณะ (2538) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของมะตูมโดยการย้อมสีออร์ซีน (orcine) เก็บรากตัวอย่างเมื่อเวลา 10.30 นาฬิกา สังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 2n=14 รูปร่างโครโมโซมเป็นแบบ เมทาเซนตริก (metacentric chromosome) คือ มีเซนโทเมียร์อยู่บริเวณกึ่งกลางทำให้แขนของโครโมโซมสองข้างมีความเท่ากัน

พิมพ์ใจ และ คณะ (2539) การศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชกลุ่มกระเจียวไทย 17 ชนิด: การศึกษาโครโมโซมดิพพลอยด์ (2n) จากเซลล์ปลายราก และแฮพพลอยด์ (n) จากเซลล์ในอับละอองเกสรตัวผู้ของพืชกลุ่มกระเจียวไทย 17 ชนิด พบว่ามีจำนวนโครโมโซมจำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม โดยเก็บตัวอย่างพืช 10 ต้นต่อชนิด ศึกษาโดยใช้วิธี squash technique หยุดวงชีพเซลล์ใน para-dichlorobenzene นาน 4-6 ชั่วโมง แช่ด้วย HCl 1N นาน 4 นาที ย้อมด้วยสี cardol fuchsine นาน 1 คืน พบว่าจำนวนโครโมโซมจำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ 1. กลุ่มที่มีโครโมโซม 2n=42 และ 2n=21 ได้แก่ ขมิ้นแดงหรือกระเจียวส้ม (*Curcuma roscoeana* Wall.) เพชรเชียงใหม่ (C.*petiolata* Wall.) ขมิ้นขาวหัวเล็ก (*Curcumasp.*) 2. กลุ่มที่มีโครโมโซม 2n=63 ได้แก่ ขมิ้นอ้อย (C.*zedoaria* Roxb.) ว่านชักมดลูก (C.*xanthorrliza* Roxb.) พลอยชมพู (C.*elata* Roxb.) และว่านมหาเมฆ (C.*aeruginosa* Roxb.) 3. กลุ่มกระเจียวดอกขาว ได้แก่ *Curcuma attenuata* Wall. และ *Curcuma sp.* มีโครโมโซม 2n=84 และ n=42 4. กลุ่มที่มีโครโมโซม 2n=32 และ n=16 ได้แก่ เกล็ดหยก (Curcuma *sp.*) บัวลาย (Curcuma *sp.*) และปทุมมาพันธุ์คัดเลือก (C.*alismatifolia* Gagnep.) 5. กลุ่มที่มีโครโมโซมแตกต่างกันไป ได้แก่ บัวโกเมน (*Curcuma sp.*) 2n=24 และ n=12 และที่มีจำนวนโครโมโซมหลายแบบ ได้แก่ เทพรำลึก (C.*thorelii* Gagnep.) มีโครโมโซม 2n=34, 36 และ n=17, 18 และหิ่งห้อยหรือกระเจียวขาว (C.*parviflora* Wall.) 2n=28, 34, 36 และ 56 และ n=14, 17, 18 และ 28 แท่ง จากการศึกษาพบว่าโครโมโซมของพืชสกุลนี้มีขนาดเล็กมากประมาณ 0.5–0.2 ไมโครเมตร

ลัดดา และ กัญญา (2538) การนับจำนวนโครโมโซมพืชสกุลขิง: การศึกษาโครโมโซมพืชวงศ์ขิงจำนวน 10 ชนิด จากปลายราก (2n) พบว่ามีโครโมโซมแตกต่างกัน โดยจำนวนโครโมโซมของ *Kampferia rotunda* แตกต่างจากผู้ที่เคยศึกษามาก่อน ส่วน *Boesenbergia* K. *marginata* ยังไม่มีรายงานมาก่อน โดยเก็บตัวอย่างพืช 10 ชนิด ศึกษาโดยใช้วิธี feulgen squash หยุดวงชีพเซลล์ใน para-dichlorobenzene (PDB) นาน 4 ชั่วโมง แช่ด้วย HCl 1N นาน 4 นาที ย้อมด้วยสี carbon fuchsine นาน 2 ชั่วโมง จากการศึกษาพบจำนวนโครโมโซมดังนี้ *Boesenbergia rotunda*, 2n=36, B.*curtisii* (ก้านขาว), 2n=24, *Hedychium coronarium*, 2n=34, H.*flavescens*, 2n=50,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Curcuma thorelii, 2n=36, *Curcuma sp.*, 2n=42, *Costus speciosus* (ใบปกติ), 2n=18, C.*speciosus* (ใบลาย), 2n=36, *Kampferia marginata*, 2n=55 และ K.*rotunda*, 2n=33 โดยจำนวนโครโมโซมของ K.*rotunda* แตกต่างจากที่มีผู้เคยศึกษามาก่อน ส่วน *Boesenbergia* ทั้งสองชนิด และ K.*marginata* ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

ศิริพร และ ฉันทนา (2540) การศึกษาโครโมโซมของว่านมหาลาภจากเซลล์ปลายราก พบว่าวิธีการที่ได้ผลดี คือ การเก็บตัวอย่างรากเวลา 9.00 นาฬิกา หยุดวงจรชีพด้วย para-dichlorobenzene นาน 4½ ชั่วโมง แช่เซลล์ใน 1N HCl นาน 5 นาที แล้วย้อมด้วยสี carmine fuchsine นาน 1 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าว่านมหาลาภมีจำนวนโครโมโซม 2n=68

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

สาริณี (2537) ได้ทำการทดลองนับโครโมโซมรากของต้นกล้วยไม้หวาย Dendrobium superbiens ดิพพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์ ต้นละ 10 เซลล์ หยุดวงชีพเซลล์ด้วย 1-bromonathlene นาน 5-6 ชั่วโมง แช่ด้วย hydrolyses ในกรดเกลือ 1N นาน 10 นาที ย้อมด้วยสี aceto-orcein พบว่าดิพพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 38 และออลโลเตตราพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 76

สุนิสา และ คณะ (2543) จากการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของโครโมโซมข้าว 5 พันธุ์ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มข้าวขาว (ข้าวเหนียวสันป่าตองและหอมมะลิ 105) กับกลุ่มข้าวเหนียวดำ (ดำดอยสะเก็ด CMUcol.2 และ CMUcol.3) พบว่าข้าวทั้ง 5 พันธุ์ มีโครโมโซมเท่ากัน คือ 2n=24 แต่มีขนาดและชนิดของโครโมโซมเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธุ์ มีวิธีการศึกษาโดยการหยุดวงชีพของเซลล์รากด้วย para-dichlorobenzene ล้างด้วยน้ำกลั่นนำรากแช่ไว้ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (ethyl alcohol 95% และ acetic acid เข้มข้นในอัตรา 3:1) 5 นาที แยกเซลล์ออกจากกัน แช่รากใน HCl 1N ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และย้อมด้วยสี carbol fuchsine นาน 5 ชั่วโมง

อุษณีย์ (2531) ศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของดอกและจำนวนโครโมโซมของกีวีฟรุต 6 พันธุ์ ประกอบด้วยเพศผู้ 2 พันธุ์ คือ Tomuri และ Matua เพศเมีย 4 พันธุ์ คือ Brouno, Abbott, Monty และ Hayward ที่ปลูก ณ สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ โครโมโซมของกีวีฟรุตที่ทำการศึกษาพบว่า กีวีฟรุตทั้ง 6 พันธุ์ มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ ประมาณ 2n=166 โดยมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถจำแนกความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาออกจากกันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Grant, W.F. (1995) ได้ทำการศึกษาโครโมโซมพืชสกุล Lotus จากจำนวน 108 species และ 38 varieties โดยเจาะลึกเป็นรายงานว่า 5 species ได้แก่ *L.hamatus*, *L.haydonii*, *L.hinoniorum*, *L.mearnsii* และ *L.utahensis* โดยทั้งหมดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ 2n=14 และอีก 6 พันธุ์ (varieties) ได้แก่ *L.argophyllus var. argenteus*, *L.dendroideus var. traskiar*, *L.Heermanii var. orbicularis*, *L.junceus var. biolettii*, *L.strigosus var. hirtellus*, *L.Strigosus var. tomentellus* พบว่ามีจำนวนโครโมโซมจำนวน 2n=14 เช่นกัน และ *L.uliginosus subsp. vestitus* มีโครโมโซม 2n=12

Moore, R.J. (1972) ได้ทำการรวบรวมผลงานวิจัยจำนวนโครโมโซมของพืชชนิดต่าง ๆ โดยแบ่งเป็น division และเจาะลึกเป็นบางพันธุ์ของพืช พบว่าพืชในตระกูล Araceae ซึ่งเป็นตระกูลของ Syngonium มีผู้วิจัยไว้ว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=24

Roy, Tessy and Joseph (1999) การศึกษา Karyomer phorphological ในจีนัส *Curcuma*. Linn. : การตรวจนับโครโมโซมปลายรากโดย aceto-orcein squash หยุดวงชีพเซลล์ใน para-dichlorobezene ที่อิ่มตัวด้วยอัตราส่วน 1:1 กับ 8–hydroxyquinoline นาน 3–4 ชั่วโมง แช่ด้วย HCl 1N นาน 5 นาที ย้อมด้วยสี aceto-orcein นาน 1 คืน พบว่าทั้ง 6 สปีชีส์ คือ *Curcuma. comasa* Roxb. C.*haritha Mangaly & Subu* และ C.*malabarica* มีจำนวนโครโมโซม 2n=42 ขณะที่ C.*aerugenosa*, C.*caesisa* และ C.*raktacanta* มีจำนวนโครโมโซม 2n=63 มีความยาวโครโมโซมในช่วง 0.24–0.99 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมระหว่างข้าวพันธุ์ป่า (*O.minuta*) และข้าวพันธุ์ปลูก (*O.sativa*) ขาวดอกมะลิ 105

2. สารเคมีและสีย้อมที่ใช้ในการศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ ได้แก่ กรดน้ำส้ม (glacial acetic acid), แอลกอฮอล์ 95%, ผลึกของเฟอริกคลอไรด์, กรดไฮโดรคลอริก 5% หรือ 1N, สีย้อมอะซิโตนคาร์มีน (acetocarmine), 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M

3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับการเพาะเมล็ด ได้แก่ กระดาษเพาะ, ฟองน้ำ, กรรไกรหรือคัตเตอร์ และเพลท

4. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับตรวจนับจำนวนโครโมโซม ได้แก่ เข็มเขี่ยปลายแบน, ปากคีบขนาดเล็กปลายแหลม, แผ่นสไลด์, กระจกปิดสไลด์, ตะเกียงแอลกอฮอล์, กล้องจุลทรรศน์, oil immertion, กระดาษเช็ดเลนส์, เทอร์โมมิเตอร์, เครื่องชั่งไฟฟ้า, hot plate, ตู้เย็น, ตู้ควบคุมอุณหภูมิ, มีดผ่าตัดหรือปลายเข็มฉีดยา และคอมพิวเตอร์สำหรับบันทึกภาพ

5. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับเตรียมสารเคมี ได้แก่ บีกเกอร์แก้ว, กระบอกตวง, ขวดแก้วสำหรับใส่สาร, แท่งแก้วคน และน้ำกลั่น

การศึกษาโครโมโซมจากปลายรากข้าว

การเตรียมตัวอย่างรากเพื่อศึกษาโครโมโซม

นำเมล็ดข้าวมาแช่ในสารฆ่าเชื้อรา (clorox) โดยผสมน้ำในอัตราส่วน 1:50 เป็นเวลา 1-5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อราที่อาจติดมากับเมล็ด

เพาะเมล็ดข้าวใน Petri-dish โดยให้มีน้ำชุ่มชื้นตลอดเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ หรือรากงอกยาวราว 2 เซนติเมตร

การเก็บตัวอย่างรากเพื่อทำ Pretreating agent

การทำ pretreatment ช่วยให้การศึกษารูปร่างและจำนวนโครโมโซมเป็นไปได้ง่ายขึ้น ทำให้เซลล์ที่กำลังแบ่งตัวชะงักอยู่เป็นเวลานานโดยไม่ทำให้โครโมโซมเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

ล้างรากให้สะอาดและตัดรากข้าวด้วยใบมีดคมให้มีความยาว 1 เซนติเมตร โดยตัดในน้ำเพื่อไม่ให้รากช้ำแล้วนำไปแช่ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline เพื่อให้เซลล์หยุดการแบ่งไมโทซิสที่ระยะเมทาเฟสเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 15-18 องศาเซลเซียส โดยชั่งสาร 8-hydroxyquinoline 0.058 กรัม ละลายน้ำ 200 มิลลิลิตร เพื่อให้สารละลายได้ดีขึ้นใช้วิธีอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที หรืออาจนานถึง 1 ชั่วโมง จึงจะละลายหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรึงราก Fixation

น้ำยาสำหรับตรึงเซลล์ใช้น้ำยา Acetic alcohol fixative 3:1 ของ absolute ethanol: glacial acetic acid ที่เติมผลึกของ ferric chloride ประมาณ 0.5 กรัม ต่อน้ำยา acetic alcohol fixation 500 มิลลิลิตร เพื่อช่วยให้การติดสีของโครโมโซมดีขึ้น

การตรึงเซลล์ (Fixation) เพื่อทำให้เซลล์หยุดกระบวนการต่าง ๆ และคงสภาพอยู่ในระยะนั้น ๆ โดยที่โครงสร้างของสารต่าง ๆ ในเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง การตรึงทำได้ 2 แบบ

นำตัวอย่างรากที่ผ่านการทำ pretreatment มาตรึงใน fixative solution ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน หรือนำมาแช่ในสารละลาย fix solution เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำรากมาแช่สารต้องล้างน้ำให้สะอาดก่อน

สำหรับ Acetic alcohol fixation solution นี้ จะต้องเตรียมขึ้นใหม่ ๆ และใช้ทันทีเพราะน้ำยานี้เมื่อทิ้งไว้จะเกิดปฏิกิริยาสร้างเอสเทอร์ขึ้นอย่างรวดเร็ว

การย้อมรากเพื่อตรวจดูโครโมโซม

การเตรียมสีย้อม

สีอะซิโตนคาร์มีนจะให้ผลดีกว่าสีออร์ซีน สำหรับการศึกษาโครโมโซมของข้าวพบว่าโครโมโซมที่ได้ชัดเจนกว่า

การเตรียมสีอะซิโตนคาร์มีน เตรียมกรดอะซิติก 45% โดยใช้ส่วนผสมของกรดอะซิติก 45 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 55 มิลลิลิตร แล้วผสมกับคาร์มีน 0.5 กรัม คนจนละลายดีจึงนำไปต้มให้เดือดอ่อน ๆ จนปริมาณลดลงเกือบครึ่งหนึ่ง ทิ้งไว้ให้สีย้อมเย็น กรองด้วยกระดาษกรองแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

การย้อมโครโมโซม

นำรากมาแช่สารละลาย HCl ที่ความเข้มข้น 5% หรือ 1N 1 หยด อุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาดหรือน้ำกลั่น ใช้กระดาษซับน้ำออก

หลังจากนั้นนำปลายรากมาตัดเอาเฉพาะส่วนปลายรากสีขาวขุ่น ยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร วางบนสไลด์ที่สะอาด ส่วนของปลายรากสีขาวขุ่นเป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญ (apecal meritem) อยู่เป็นจำนวนมาก เซลล์บริเวณนี้มีการแบ่งเซลล์ไมโทซิสตลอดเวลา

หยดสีย้อม acetocarmine ลงไปที่ปลายราก 1-2 หยด ใช้เข็มเขี่ยขยี้ปลายรากให้ละเอียดเพื่อทำให้เซลล์แยกออกจากกันได้มากที่สุด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ หลังจากนั้นกดด้วยปลายนิ้วหัวแม่มือ (squash technique) เพื่อให้เซลล์ที่ศึกษากระจายไปทั่ว แล้วจึงนำสไลด์ผ่านเปลวไฟเพื่อไล่ฟองอากาศออกหรือใช้ปลายดินสอที่มียางลบเคาะบนสไลด์เบา ๆ สลับกับการผ่านเปลวไฟ แล้วจึงนำสไลด์มาตรวจนับจำนวนของโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลาและสถานที่

เริ่มทำการทดลองเดือนมิถุนายน 2548 สิ้นสุดการทดลองเดือนพฤษภาคม 2549 ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

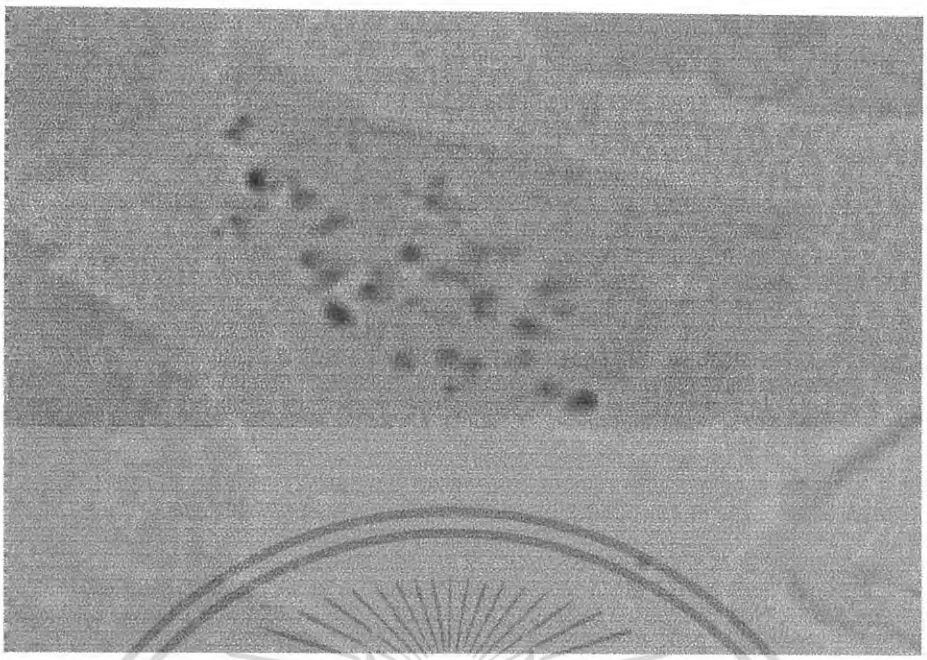
จากทฤษฎีที่ว่าข้าวปลูก *(Oryza sativa)* ที่มีชุดโครโมโซม 2n=24 AA เมื่อนำมาผสมกับข้าวป่า *(Oryza minuta)* ที่มีชุดโครโมโซม 2n=48 BBCC ทำให้ต้นลูกผสมที่ได้นั้นมีชุดโครโมโซมเป็น ABC ซึ่งเป็นหมันจึงต้องมีการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้สารละลายโคลซิซีนให้เป็น AABBCC ซึ่งสอดคล้องกับวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาปริญญาโท (วัชรีวรรณ 2540) ที่สามารถนับจำนวนโครโมโซมในแอนเทอร์ของข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ข้าวป่า (*O.minuta*) กับพันธุ์ข้าวปลูก (*O.sativa*) พบว่าเป็น 36 ยูนิวาเลนท์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 8,000 เท่า ในการนับจำนวนโครโมโซมซึ่งแสดงให้เห็นว่าการที่พบโครโมโซมเป็น 36 ยูนิวาเลนท์ นั้นช่วยยืนยันว่าลูกผสมที่เกิดขึ้นได้จากการผสมข้ามชนิดจริงโดย 12 โครโมโซม (จีโนม A) ที่ได้จากแม่ไม่สามารถเข้าคู่กับอีก 24 โครโมโซม (จีโนม BC) ที่ได้จากพอ แต่ถ้าลูกผสมนั้นเกิดจากการผสมตัวเองของพันธุ์แม่จะต้องพบ 12 ยูนิวาเลนท์

จากการนำเมล็ดข้าวลูกผสมมาเพาะเป็นต้นกล้าอายุประมาณ 7 วัน และทำการหยุดการแบ่งเซลล์ของต้นกล้าข้าวลูกผสมตามวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้น ในช่วงเวลา 8.00-9.00 น. หลังจากนั้นแช่ปลายรากข้าวด้วย HCl ซึ่งเป็นน้ำยาย่อยสลายที่ความเข้มข้น 1N ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้สามารถที่จะตรวจนับจำนวนโครโมโซมได้

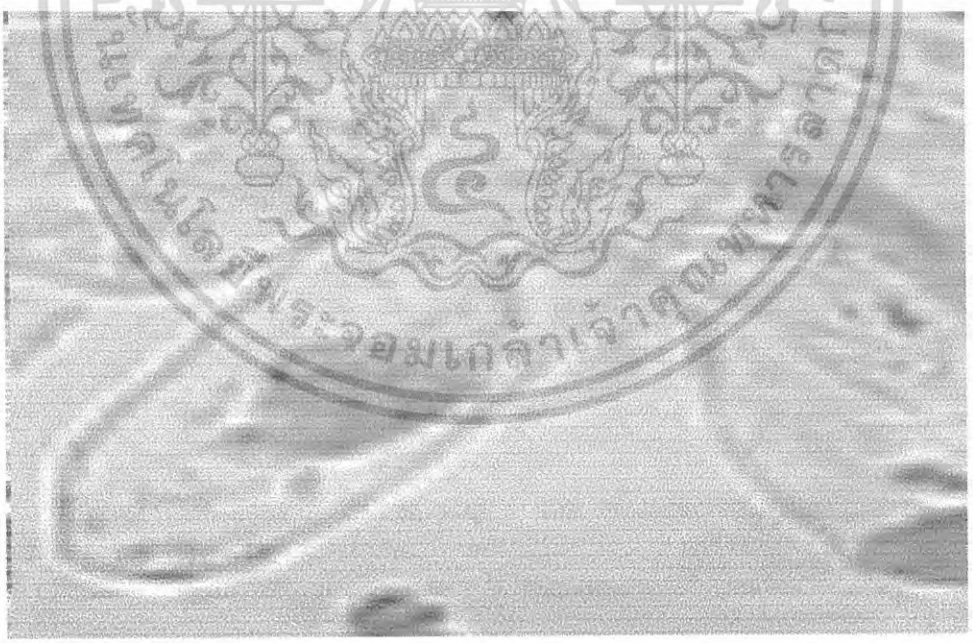
ผลของการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ข้าวป่า (*O.minuta*) กับพันธุ์ข้าวปลูก (*O.sativa*) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าสามารถเห็นจำนวนโครโมโซมประมาณ 30 ไบวาเลนท์ขึ้นไป การตรวจนับจำนวนโครโมโซมเป็นไปได้ยากและไม่สามารถนับได้ชัดเจน เพราะว่าเห็นเป็นกลุ่มของโครโมโซมและอยู่กันเป็นจุด ๆ นอกจากนี้โครโมโซมของข้าวลูกผสมยังมีขนาดเล็กมาก

จากวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาปริญญาโท (วัชรีวรรณ 2540) ซึ่งสามารถนับจำนวนโครโมโซมในแอนเทอร์ของข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ข้าวป่า (*O.minuta*) กับพันธุ์ข้าวปลูก (*O.sativa*) ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายถึง 8,000 เท่า จึงจะสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้อย่างชัดเจน และจากการที่กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในการนับจำนวนโครโมโซมมีกำลังขยายต่ำเพียง 1,000 เท่า จึงทำให้ไม่สามารถตรวจนับโครโมโซมได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 1-4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

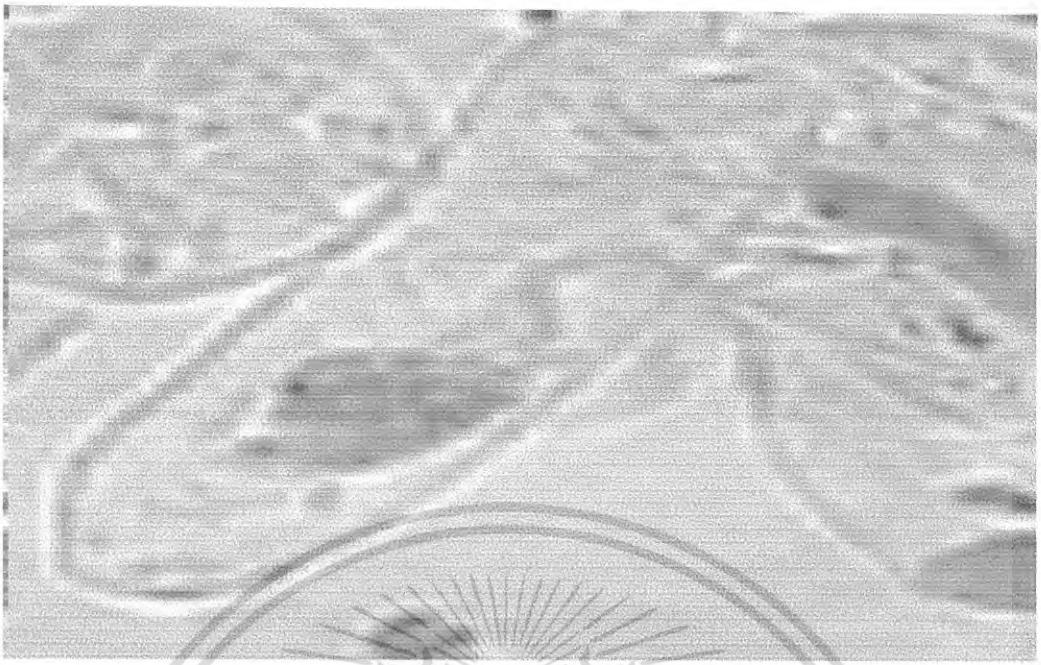


ภาพที่ 1 โครโมโซมที่ตรวจพบในรากข้าวลูกผสมระหว่างข้าวป่า (*O.minuta*) กับข้าวปลูก (*O.sativa*) กำลังขยาย 1,000 เท่า

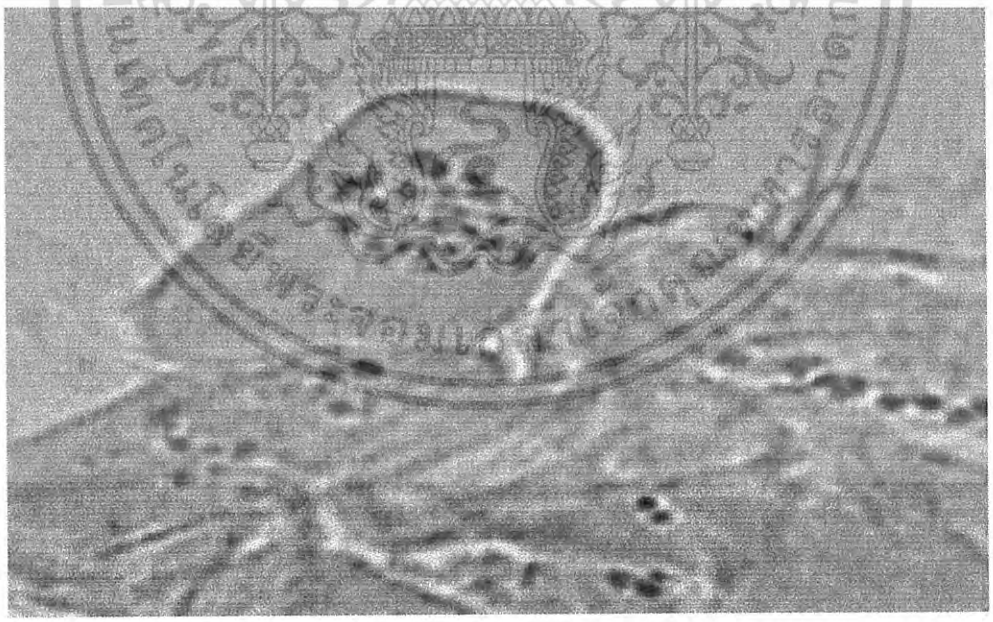


ภาพที่ 2 โครโมโซมที่ตรวจพบในรากข้าวลูกผสมระหว่างข้าวป่า (*O.minuta*) กับข้าวปลูก (*O.sativa*) กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 โครโมโซมที่ตรวจพบในรากข้าวลูกผสมระหว่างข้าวป่า (*O.minuta*) กับข้าวปลูก (*O.sativa*) กำลังขยาย 1,000 เท่า



ภาพที่ 4 โครโมโซมที่ตรวจพบในรากข้าวลูกผสมระหว่างข้าวป่า (*O.minuta*) กับข้าวปลูก (*O.sativa*) กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

การตรวจนับโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ข้าวป่า (*Oryza minuta*) กับข้าวปลูก (*Oryza sativa*) เวลาที่เหมาะสมในการศึกษาจำนวนโครโมโซม คือ ช่วงเวลา 8.00-9.00 น. การหยุดการแบ่งเซลล์ไมโทซิสที่ระยะเมทาเฟสควรแช่ข้าวในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการรักษาสภาพเซลล์ด้วย glacial acetic : alcohol 95% ในอัตราส่วน 1:3 เป็นเวลานาน 5 นาที และทำให้เซลล์นิ่มโดยใช้ HCl ความเข้มข้น 1N ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้เซลล์แยกตัวออกมาเดี่ยว ๆ ไม่เกิดการซ้อนทับของเซลล์ หลังจากนั้นย้อมสีโดยใช้สี acetocarmine เวลาในการย้อมประมาณ 10 นาที จะทำให้เซลล์และโครโมโซมติดสีได้ดีขึ้น การกดและขยี้เซลล์ต้องใช้แรงที่พอเหมาะแล้วนำสไลด์ผ่านเปลวไฟเพื่อไล่ฟองอากาศออกหรือใช้ปลายดินสอที่มียางลบเคาะเบา ๆ ที่สไลด์สลับกับการผ่านเปลวไฟแล้วจึงนำสไลด์ไปศึกษา

ผลการนับจำนวนโครโมโซมของข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ข้าวป่า (*Oryza minuta*) กับพันธุ์ข้าวปลูก (*Oryza sativa*) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าสามารถเห็นจำนวนโครโมโซมได้ประมาณ 30 ไบวาเลนท์ขึ้นไป การตรวจนับจำนวนโครโมโซมเป็นไปได้ยากและไม่สามารถนับได้ชัดเจนเพราะว่าเห็นเป็นกลุ่มของโครโมโซมและเป็นจุด ๆ เนื่องจากข้าวที่นำมาศึกษาเป็นข้าวลูกผสมระหว่างข้าวป่า *(Orazy minuta)* และข้าวปลูก *(Orazy sativa)* ซึ่งตามทฤษฎีจะมีโครโมโซม 36 คู่ จะต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูงกว่านี้

99938

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา กล้าแข็ง ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ เผดิม ระติสุนทร สาธิต ทยาพัชร พรรณี รอดแรง บุญ และกัมปนาท มุขดี.2537. การผลิตข้าว polyploid จากการผสมข้ามชนิด ใน: เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการเรื่องการพัฒนางานวิจัยข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2537 ระหว่างวันที่ 29-31 มีนาคม 2537 ณ โรงแรมไพลิน สุโขทัย. 15 หน้า.

กันยารัตน์ ไชยสุต.2532. เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล ZEPHYRANTHES. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.กรุงเทพฯ. 260 หน้า.

คณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์.2544. พันธุศาสตร์ปฏิบัติการ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 113 หน้า.

นิตย์ศรี แสงเดือน.2541. พันธุศาสตร์พืช. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 295 หน้า.

ชัยฤกษ์ มณีพงษ์.2525. เซลล์พันธุศาสตร์. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 205 หน้า.

ปกขวัญ หุตางกูร บุศบรรณ ณ สงขลา และสุมิตรา คงชื่นสิน.2530. การตรวจสอบจำนวนโครโมโซมใน *Ocium spp.* บางชนิดเพื่อศึกษาทางอนุกรมวิธาน. รวมผลงานวิชาการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 5. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หาดใหญ่.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ.2541. พันธุศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 398 หน้า.

ผ่องพรรณ จรัสจินดารัตน์ และคณะ.2538. งานวิจัยเรื่องจำนวนโครโมโซมมะตูม. วิทยาลัยเกษตรมหาสารคาม.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ.2536. พันธุศาสตร์. ไทยวัฒนาพานิช. กรุงเทพฯ.

ภูวดล บุตรรัตน์.2528. เทคนิคทางพฤกษศาสตร์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.

เมธานี เตาะสกุล วิภา หงษ์ตระกูล และนิตย์ศรี แสงเดือน.2544. การศึกษาโครโมโซมเพื่อบ่งชี้เพศในปรง. สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12 พันธุ์ศาสตร์ยุคปฏิวัติยีน. เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น. กรุงเทพฯ. หน้า 181-184.

ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์ พวงเพ็ญ ศิริรักษ์ และสุธรรม มะยะกูล.2539. จำนวนโครโมโซมพืชวงศ์ขิงบางชนิดของไทย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 18(2):153-159.

วิสุทธิ์ ใบไม้.2536. พันธุศาสตร์. เจ้าพระยาการพิมพ์. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศิรพร หาญนันทวิวัฒน์ และฉันทนา สุวรรณธาดา.2541. การศึกษาโครโมโซมของว่านมหาลาภ. วารสารเกษตร วารสารวิชาการของคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ปีที่ 14 ฉบับที่ 3 ตุลาคม 2541.

สาริณี ไชยเจริญ.2537. การศึกษาจำนวนโครโมโซมกล้วยไม้หวาย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุณิสา สุนะรินทร์ ดำเนิน กาละดี และฉันทนา สุวรรณธาดา.2543. สัณฐานวิทยาของโครโมโซมข้าว 5 พันธุ์. วารสารเกษตร 16(1):46-52.

อดิศร กระแสชัย.2539. บทปฏิบัติการ Cytogenetics in Agriculture. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 11-18.

อมรา คัมภิวานนท์.2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. เท็กซ์แอนด์แอนด์เจอร์นัลพับพิเคชั่น. กรุงเทพฯ.

อัมพิกา ปุนนจิต.2527. ชีววิทยาของดอกและจำนวนโครโมโซมของท้อเก้าพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุษณีย์ ปักษาศร.2531. การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของดอกและจำนวนโครโมโซมของกีวีฟรุต. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Cook, J.W. and L.D.London.1952. Colchicine. The Alkaloid Chem and Physiol. 2:261-329.

Dnyansagar, V.R.1982. Cytology and Genetics. Tata McGraw Hill,Publishing Company Limited. India. 404 pp.

Dyer, A.F.1979. Investigating Chromosomes. Edward Arnold (Publishers) Ltd. London. 138 pp.

Eigsti, O.J. and P. Dustin, Jr.1955. Colchicinr in Agriculture. Medicine. Biology and Chemistry. Iowa State College Press. Iowa. 470 p.

Grant, W.F.1995. A chromosome atlas and interspecific-intergenic index for Lotus and tetragonolobus (Fabaceae). Journal of Botany.

Hermsen, J.G Th. And A.J.E. de Bour.1971. The effect of colchicine treatment on Solanum acaule and S.bulbocastanum; a complete analysis of ploidy chimerasin S.bulbocastanum. Euphytica 20:171-180.

Khan, S.H. 1975. A Technique for staining rice chromosomes. Cytologia 40:595-598.

Lin, B.Y.1977. A squash Technique for Studying the Cytology of Maize Endosperm and other Tissues. Stain Technology. Vol.52 No.4 : 197-201.

Moore, D.R.1976. Plant Cytogenetics. Chapman and Hall. London.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peter, J.R. 1996. Genetics Fourth Edition. HarpenCollins College Publishers.,New York. 784 pp.

Singh, R.J.1993. Plant Cytogenetics. CRC Press. Inc. U.S.A. 391 pp.

Snustand, D.peter and Michael J.Simmas.1997. Priniciples of Genetics:Second edition. John Wiley Sons. Inc. New York.

Sybenga, J.1992. Cytogenetic in plant breeding. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.Germany. 469 pp.

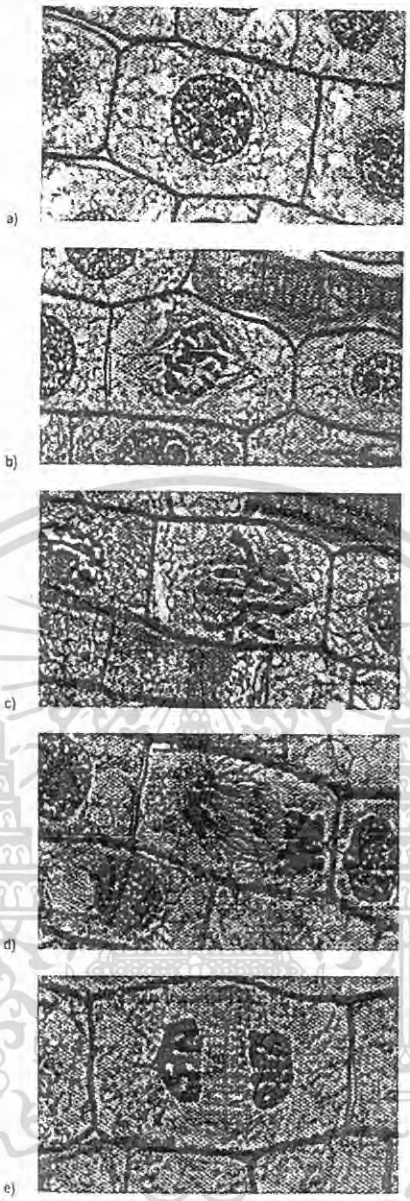
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 1 แสดงวิธีทำ squash technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 2 แสดงการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ของปลายรากหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล : นางสาวกนกพร นาคชาตรี

วันเดือนปีเกิด : 11 ตุลาคม 2526

ที่อยู่ในสำเนาทะเบียนบ้าน : 99/212 ม.1 แขวงสายไหม เขตสายไหม กรุงเทพมหานคร 10220

โทรศัพท์ : 0-9162-1597, 0-7809-2089

ที่อยู่ปัจจุบัน : 86/105 ม.5 หมู่บ้านพัธนชัยวิลล่า ต.คลองมะเดื่อ อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร 74110

โทรศัพท์ : 0-3484-8540, 0-9162-1597

การศึกษา : พ.ศ. 2529-2531 ระดับอนุบาล โรงเรียนอนุบาลสดุดี จ.สมุทรปราการ

: พ.ศ. 2532-2537 ระดับประถมศึกษา โรงเรียนอาษาวิทยา จ.สมุทรปราการ

พ.ศ. 2538-2540 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนวัดทรงธรรม จ.สมุทรปราการ

พ.ศ. 2541-2543 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนวัดทรงธรรม จ.สมุทรปราการ

พ.ศ. 2545 ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชไร่)

คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อ-นามสกุล : นางสาวเยาวภา ภัทรดิลกรัตน์

วันเดือนปีเกิด : 21 กรกฎาคม 2526

ที่อยู่ในสำเนาทะเบียนบ้าน : 15/15 หมู่บ้านจามจุรี ถ.บ้านปากแรต 1 ต.บ้านโป่ง อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี 70110

โทรศัพท์ : 0-3222-1543

ที่อยู่ปัจจุบัน : 15/15 หมู่บ้านจามจุรี ถ.บ้านปากแรต 1 ต.บ้านโป่ง อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี 70110

โทรศัพท์ : 0-5818-7776

การศึกษา : พ.ศ. 2533-2538 ระดับประถมศึกษา โรงเรียนอุดมวิทยา จ.ราชบุรี

พ.ศ. 2539-2541 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ บดินทรเดชา กรุงเทพมหานคร

พ.ศ. 2542-2544 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี) กรุงเทพมหานคร

พ.ศ. 2545 ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชไร่) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้