ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของทานตะวัน

The Study of Chromosome Number in Leaf Tips of *Helianthus annuus* Linn.

โดย

นางสาวชิดชไม เจริญสัจจะ

นางสาวสิริกัญญา วิเชียรฉาย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

.....

(อาจารณ์มณทินี ธีรารักษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

(๒๘/๓๐/๒๕๕๑)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร.สมชาย กล้าหาญ)

หัวหน้าภาควิชาพืชสวน

(๒๙/๓๐/๕๖)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของทานตะวัน

The Study of Chromosome Number in Leaf Tips of *Helianthus annuus* Linn.

โดย

นางสาวชิดชไม เจริญสัจจะ

นางสาวสิริกัญญา วิเชียรฉาย

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชสวน)

พุทธศักราช 2550

ลาดฯ.
ส5544ก
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 73588
วัน,เดือน,ปี 20 ก.ค. 2550

b 11794665
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง	:	การศึกษาจำนวนโครโมโซมของทานตะวัน
โดย	:	นาวสาวชิดชไม เจริญสัจจะ
		นางสาวสิริกัญญา วิเชียรฉาย
สาขาวิชา	:	พืชสวน
ภาควิชา	:	พืชสวน
คณะ	:	เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	อาจารย์มณทินี ธีรารักษ์

บทคัดย่อ

การศึกษาโครโมโซมของทานตะวันจากเซลล์ปลายใบ ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่าง คือ 8.30-10.00 น. นำปลายใบทานตะวันเพื่อนำมาตรวจนับโครโมโซมโดยตัดปลายใบยาวประมาณ 0.50-1.00 ซม. รักษาสภาพเซลล์โดยแช่ในสารละลาย ethanol : acetic acid (3:1) หยุดวงชีพเซลล์โดยแช่ในสารลาย Asculin นาน 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ย่อยสลายผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย cellulose RS 2.0% , pectolyase Y_{23} 0.3 % , macerozyme R_{10} 1.5% ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 55-60 นาที นำไปย้อมด้วยสี giemsa ความเข้มข้น 2.0% นาน 15-20 นาที สังเกตภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการตัดปลายใบ คือ 9.00-9.30 นาฬิกา หยุดวงชีพด้วย asculin นาน 6 ชั่วโมง พบว่าเซลล์บางเซลล์อยู่ในระยะโพรเฟส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title : The Study of Chromosome Number in Leaf Tips of *Helianthus annuus* Linn.

By : Miss Chidchamai Chanleansaeja

Miss Sirikanya Wichianchai

Major : Horticulture

Department : Horticulture

Faculty : Agriculture Technology

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Advisor : Miss Montinee Teerarak

Abstract

Somatic chromosome of *Helianthus annuus* Linn from leaf tip tissues was investigated. The time collecting of leaf tip was at 8.30-10.00 am. The leaf tips of plantlets used for chromosome counting were cut off 0.50-1.00 centimeters long. The leaf tips were fixed in ethanol:acetic acid (3:1) pretreated with asculin for 0, 3, 6 hours and digested cell wall by enzymes containing 2% cellulose RS, 1.5% macerozyme R_{10} and 0.3% pectolyase Y_{23} at 37 °C for 55-60 minutes and subsequently staind with 2% Giemsa solution for 15-20 minutes. The chromosomes were observed under light microscope at 1000 magnification. The results showed that the time of cutting off leaf tips was 9.00-9.30 a.m. and pretreatment with asculin for 6 hours since there were mostcells observed at prophase stage.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดี เนื่องจาก ได้รับการสนับสนุนและช่วยเหลือจากหลายฝ่ายด้วยกัน อาจารย์มณทินี ธีรารักษ์ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งช่วยให้คำแนะนำปรึกษาตลอดจนการตรวจสอบแก้ไข และคุณกฤษณา พินิจ ที่แนะนำและช่วยเหลือการทดลอง จนการทดลองสำเร็จไปได้ด้วยดี ขอกราบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ช่วยเหลือในเรื่องต่างๆทั้งทรัพย์สินเงินทองที่ส่งเสียให้เล่าเรียนและขอบคุณเพื่อนๆที่ช่วยเหลือด้านข้อมูลต่างๆจนทำให้การทดลองนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

นางสาวชิดชไม เจริญสัจจะ
นางสาวสิริกัญญา วิเชียรฉาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	i
สารบัญภาพ	ii
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	1
ตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	10
ผลและวิจารณ์	14
สรุปผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 รูปของใบทานตะวันในระยะที่ 1 15
ภาพที่ 2 รูปของใบทานตะวันในระยะที่ 2 15
ภาพที่ 3 เนื้อเยื่อเจริญปลายใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* Linn.) 16
เก็บที่เวลา 8.30 น แช่สาร asculin เป็นเวลา 0 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000x)
ภาพที่ 4เนื้อเยื่อเจริญปลายใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* Linn.) 17
เก็บที่เวลา 9.00 น แช่สาร asculin เป็นเวลา 0 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000x)
ภาพที่ 5 เนื้อเยื่อเจริญปลายใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* Linn.) 18
เก็บที่เวลา 9.00 น แช่สาร asculin เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000x)
ภาพที่ 6 เนื้อเยื่อเจริญปลายใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* Linn.) 19
เก็บที่เวลา 9.00 น แช่สาร asculin เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000x)
ภาพที่ 7 เนื้อเยื่อเจริญปลายใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* Linn.) 21
เก็บที่เวลา 9.30 น แช่สาร asculin เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000x)
ภาพที่ 8 เนื้อเยื่อเจริญปลายใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* Linn.) 22
เก็บที่เวลา 10.00 น แช่สาร asculin เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

การศึกษาโครโมโซมของพืช เป็นสิ่งที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชซึ่งในที่นี้เป็นการศึกษาโครโมโซมของทานตะวัน ทานตะวันเป็นพืชที่มีสีสรรสวยงาม ซึ่งส่วนต่างๆ ของทานตะวันยังมีประโยชน์ในหลายๆด้าน เช่น ส่วนของเมล็ดนำมาสกัดได้น้ำมันพืชสำหรับใช้บริโภค รวมทั้งการนำดอกทานตะวันมาจัดเป็นกระเช้า ช่อดอกไม้ร่วมกับดอกไม้ชนิดอื่นๆ จากประโยชน์ในหลายๆด้านของทานตะวัน จึงควรที่จะได้รับการปรับปรุงพันธุกรรมพืชในหลายด้าน อาทิเช่น ผลผลิต คุณภาพดอก ความต้านทานโรค ต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่มาเหมาะสม เป็นต้น และในอนาคตทานตะวันอาจเป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งการศึกษาโครโมโซมของทานตะวันนี้ จึงเป็นแนวทางสำคัญในการวิจัยเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมโครโมโซมของเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายใบทานตะวัน
2. เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมทานตะวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

ทานตะวันมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Helianthus annuus* Linn. ชื่อสามัญ คือ sunflower เป็นพืชในวงศ์ Compositae มีถิ่นกำเนิดทางทิศตะวันตกของสหรัฐอเมริกา รัฐแคนซัส เป็นไม้ล้มลุกมีเมล็ดใหญ่ ปลูกง่ายสามารถเพาะลงดินปลูกได้โดยตรง ชอบอากาศร้อน แดดจัด และดินค่อนข้างแห้งแล้ง ทานตะวันมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน เนื่องจากได้รับการผสมและการปรับปรุงพันธุ์ มีหลายพันธุ์ ทั้งต้นเตี้ย 60 เซนติเมตร ใช้เป็นไม้กระถางได้ดี จนถึงพันธุ์สูงขนาด 3-4 เมตร เช่น พันธุ์ Mammoth ต้นสูง 3 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางจานดอก 30 เซนติเมตรขึ้นไป อายุจากวันปลูกถึงเก็บเกี่ยว 80 วัน เมล็ดมีคุณค่าทางอาหารสูง พันธุ์ Teddy Bear สูง 24 เซนติเมตร ดอกใหญ่ 12.5 เซนติเมตร สีเหลืองทอง พันธุ์ Dwarf Sungold สูง 1.5 เมตร ดอกใหญ่ 12.5 เซนติเมตร กลีบดอกเล็กละเอียดสีเหลือง ปกคลุมเกสรของดอกจนมิด จัดเป็นทานตะวันดอกซ้อน พันธุ์ Color Fashion ให้ดอกสีเหลือง น้ำตาล และสีมะฮอกกานี ใจกลางดอกสีน้ำตาล ต้นสูง 150 เซนติเมตร พันธุ์ Sunspot สูง 60 เซนติเมตร ดอกใหญ่ 25 เซนติเมตร สีเหลือง ต้นแข็งแรง (นันทิยา, 2535) การเจริญเติบโตของทานตะวันแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ พวกต้นเดี่ยวมีดอกใหญ่เพียงดอกเดียว เมล็ดนำมาสกัดทำน้ำมันหรือรับประทาน และพวกลำต้นแตกกิ่งก้านได้ มีลำต้นเตี้ยกว่าให้ดอกขนาดเล็กหลายดอกตามกิ่งย่อยเหมาะสำหรับทำเป็นไม้กระถาง ส่วนรูปร่างของดอกทานตะวันแบ่ง ได้ 2 แบบ คือ พวกดอกชั้นเดียวและดอกซ้อนมีกลีบซ้อนเล็กละเอียดเรียงซ้อนกันแน่นจนมองไม่เห็นจานเมล็ด (ตถาพร, 2539)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ราก เป็นระบบรากแก้วหยั่งลึกลงไปประมาณ 150-270 เซนติเมตร มีรากแขนงค่อนข้างแข็งแรงแผ่ขยายไปด้านข้างได้ยาวถึง 60-150 เซนติเมตร เพื่อช่วยค้ำจุนลำต้นได้ดี และสามารถใช้ความชื้นระดับผิวดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ลำต้น ส่วนใหญ่ไม่มีแขนง แต่บางพันธุ์มีการแตกแขนง ขนาดของลำต้น ความสูง การแตกแขนงขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อม ความสูงของต้นอยู่ระหว่าง 1-10 เซนติเมตร การโค้งของลำต้นตรงส่วนที่เป็นก้านช่อดอกมีหลายแบบ แบบที่ต้องการคือ แบบที่ส่วนโค้งตรงก้านช่อดอกคิดเป็นร้อยละ 15 ของความสูงของลำต้น พันธุ์ที่มีการแตกแขนง อาจมีความยาวของแขนงสูงกว่าลำต้นหลักแขนงอาจแตกมาจากส่วนโคนหรือยอด หรือตลอดลำต้นก็ได้

ใบ เป็นใบเดี่ยวเกิดตรงกันข้าม หลังจากที่มีใบเกิดแบบตรงกันข้ามอยู่ 5 คู่แล้ว ใบที่เกิดหลังจากนั้นจะมีลักษณะวน จำนวนใบบนต้นอาจมีตั้งแต่ 8-70 ใบ รูปร่างของใบแตกต่างกันตามพันธุ์ สีของใบอาจมีตั้งแต่เขียวอ่อน เขียว และเขียวเข้ม ใบที่เกิดออกมาจากตายอดใหม่ ๆ ก้านใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะอยู่ในแนวตั้งจนกระทั้งใบมีความยาว 1 เซนติเมตร ปลายยอดจะค่อย ๆ โค้งลงจนเมื่อใบแก่แล้วก็จะโค้งลงมาเป็นรูปตัวยู (U) การสร้างใบจะมีมากจนกระทั่งดอกบาน หลังจากนั้นการสร้างใบจะลดน้อยลง

ดอก เป็นรูปจาน เกิดอยู่บนตายอดของลำต้นหลัก หรือแขนงลำต้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางของดอกอยู่ระหว่าง 6-37 เซนติเมตร ซึ่งขึ้นกับพันธุ์และสภาพแวดล้อม ดอกมีลักษณะเป็นแบบช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อยเป็นจำนวนมาก ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ดอกย่อยที่อยู่รอบนอกจานดอกเป็นดอกที่ไม่มีเพศ (เป็นหมัน) มีกลีบดอกสีเหลืองส้ม และ ดอกย่อยที่อยู่ในจานดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรตัวผู้ที่พร้อมจะผสมได้ก่อนเกสรตัวเมีย และสายพันธุ์ผสมเปิดส่วนใหญ่ผสมตัวเองน้อยมาก ในแต่ละจานดอกจะมีดอกย่อยอยู่ประมาณ 700-3,000 ดอก ในพันธุ์ที่ให้น้ำมัน ส่วนพันธุ์อื่น ๆ อาจมีดอกย่อยถึง 8,000 ดอก การบานหรือการแก่ของดอกจะเริ่มจากวงรอบนอกเข้าไปสู่ศูนย์กลางของดอก ดอกบนกิ่งแขนงจะมีขนาดเล็ก แต่ถ้าเป็นแขนงที่แตกออกมาตอนแรก ๆ ดอกจะมีขนาดใหญ่เกือบเท่ากับดอกบนลำต้นหลัก ส่วนใหญ่พันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้า มักจะเลือกต้นชนิดที่มีดอกเดี่ยว เพื่อความสมบูรณ์ของดอก และให้เมล็ดที่มีคุณภาพดี

เมล็ด (หรือผล) ประกอบด้วยเนื้อใน ซึ่งถูกห่อหุ้มไว้ด้วยเปลือกที่แข็งแรง เมื่อผลสุกส่วนของดอกที่อยู่เหนือรังไข่จะร่วง ผลที่มีขนาดใหญ่จะอยู่วงรอบนอก ส่วนผลที่อยู่ข้างในใกล้ ๆ กึ่งกลางจะมีผลเล็กลง เมล็ดทานตะวัน แบ่งเป็น 3 ประเภทใหญ่ คือ เมล็ดใช้สกัดน้ำมัน จะมีเมล็ดเล็ก สีดำ เปลือกเมล็ดบางให้น้ำมันมาก เมล็ดใช้รับประทาน จะมีเมล็ดโตกว่าเมล็ดที่ใช้สกัดน้ำมัน เปลือกหนาไม่ติดกับเนื้อในเมล็ด เพื่อสะดวกในการกะเทาะแล้วใช้เนื้อในรับประทานโดยอบหรือปรุงแต่งขนมหวาน หรือทำเป็นแป้งประกอบอาหาร หรือใช้เมล็ดคั่วกับเกลือแล้วแทะเปลือกออกรับประทานเนื้อข้างในเป็นอาหารว่างเช่นเดียวกับเมล็ดแตงโม และเมล็ดใช้เลี้ยงนก ใช้เมล็ดเป็นอาหารเลี้ยงนก หรือไก่โดยตรง (ศรีสุดา และพัฒนา, 2541)

ประโยชน์ของทานตะวัน

แต่เดิมทานตะวันเป็นเพียงไม้ดอกไม้ประดับเท่านั้น ต่อมาได้นำเมล็ดมาเป็นของขบเคี้ยว และสกัดเป็นน้ำมัน จึงทำให้กลายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่ง การใช้ประโยชน์จากทานตะวันมีหลายลักษณะดังนี้

1. เมล็ด ใช้บริโภคโดยตรง เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนแทนเนื้อสัตว์ได้ในเมล็ดมีธาตุเหล็กสูง ไม่แพ้ธาตุเหล็กจากไข่แดงและตับสัตว์เมื่อบดทำแป้งจะได้แป้งสีขาว มีไขมันสูง มีโปรตีนมากกว่าร้อยละ 50 ของปริมาณแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เปลือกของลำต้น มีลักษณะเหมือนเยื่อไม้ นำมาทำกระดาษสีขาวได้คุณภาพดี ลำต้นใช้ทำเชื้อเพลิงได้ เมื่อไถกลบจะเป็นปุ๋ยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้แก่ดินได้ดี

3. ราก ใช้ทำแป้งเค้ก สปาเก็ตตี้ ในรากมีวิตามินบี 1 และธาตุอีกหลายชนิด แพทย์แนะนำให้ใช้รากทานตะวันประกอบอาหารสำหรับผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวาน

4. น้ำมัน น้ำมันที่สกัดจากเมล็ดจะให้ปริมาณน้ำมันสูงถึงร้อยละ 35 และได้น้ำมันที่มีคุณภาพสูง ประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว เช่น กรดลิโนเลอิค หรือกรดลิโนเลนิค สูงถึงร้อยละ 60-70 ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อร่างกายในการช่วยลดคลอเรสเตอรอลที่เป็นสาเหตุของโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือดได้ และยังประกอบด้วยไวตามิน เอ ดี อี และเค ซึ่งคุณภาพของไวตามินอีจะสูงกว่าในน้ำมันพืชอื่น ๆ เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานจะไม่เกิดกลิ่นหืน ทั้งยังทำให้สีกลิ่น และรสชาติไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากใช้เป็นน้ำมันพืชแล้วยังนิยมใช้ในอุตสาหกรรม ทำเนยเทียม สี น้ำมันชักเงา สบู่ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

5. กาก กากที่ได้จากการสกัดน้ำมันออกแล้ว จะนำไปใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ได้ ในกากเมล็ดทานตะวันที่กะเทาะเปลือกและบีบน้ำมันออกแล้ว จะมีโปรตีนร้อยละ 42 และใช้เป็นแหล่งแคลเซียมสำหรับปศุสัตว์ได้ดีแต่จะมีปริมาณกรดอะมิโนอยู่เล็กน้อย และขาดไลซีน จึงต้องใช้อย่างรอบคอบ เมื่อจะเอาไปผสมเป็นอาหารสัตว์ที่มิใช่สัตว์เคี้ยวเอื้อง (ศรีสุดา และพัฒนา, 2541)

การศึกษาการแบ่งเซลล์แบบ *Mitosis*

mitosis เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยจะได้เซลล์ใหม่ที่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมและระดับของโครโมโซมเหมือนกับเซลล์เดิมทุกประการ เว้นแต่ในกรณีที่เกิดการกลายพันธุ์สามารถแบ่งระยะของการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน ออกได้เป็น 2 ระยะใหญ่ๆ ได้ดังนี้ (อดิสร, 2539)

1. interphase เป็นระยะการแบ่งเซลล์ที่ยาวที่สุด ประมาณ 90 % ของระยะการแบ่งเซลล์ทั้งหมด ยกเว้นในเอมบริโอบางชนิด เนื่องจากว่ามีระยะที่ยาวนานจึงทำให้พบเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟสนี้ได้มาก เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ระยะเวลาของการแบ่งเซลล์ทั้งหมดจะแปรผันไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งส่วนใหญ่ก็เนื่องมาจากความสั้นยาวของระยะอินเตอร์เฟส ระยะเวลาของรอบการแบ่งเซลล์จะสั้นในสิ่งมีชีวิตที่มีนิวเคลียสขนาดเล็ก ในเอมบริโอและในเนื้อเยื่อเจริญทั้งหลาย ในพืชพวกที่เป็น diploid ระยะเวลาของรอบการแบ่งเซลล์จะเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์มีปริมาณ DNA เพิ่มมากขึ้น และสำหรับในปริมาณ DNA หนึ่งๆนั้น ในพืชใบเลี้ยงคู่ที่เป็นพืชฤดูเดียว (annuals) และพืชที่มีระดับโครโมโซมเป็น diploid จะมีระยะเวลาของรอบการแบ่งเซลล์สั้นกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่เป็นพืชหลายปี (perennials) และพวกที่มีระดับโครโมโซมเป็น polyploids นั่นก็คือ พวก annual ที่มีอายุสั้นๆ และมี nucleus ขนาดเล็กจะมีรอบของการแบ่งเซลล์สั้นที่สุด และจะยาวที่สุดในพวกที่เป็น perennials ที่มี nucleus ขนาดใหญ่ (สิทธิรัตน์, 2544) interphase เป็นระยะการแบ่งเซลล์ที่มีความสำคัญ เนื่องจากว่าเป็นระยะที่เกิด DNA replication ขึ้น ซึ่งแบ่งออกเป็นระยะย่อยได้ 3 ระยะ

G_1 คือ ระยะที่นิวเคลียสและไซโตปลาสซึมขยายตัว มีการสังเคราะห์โปรตีนและ RNA เซลล์ที่แบ่งตัวเร็วมากอาจไม่มีระยะนี้เลยก็ได้ เช่น เซลล์ของส่าเหล้า (yeast) เป็นต้น แต่เซลล์ที่แบ่งตัวช้า เช่น เซลล์ของรากข้าวโพด อาจกินเวลาถึง 151 ชั่วโมงก็ได้

S คือ ระยะที่มีการสังเคราะห์ DNA และโปรตีนฮิสโตน สำหรับ DNA นั้นมีปริมาณเพิ่มจากเดิมเป็นสองเท่า ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าในระยะนี้แต่ละโครโมโซมมีการแบ่งตัวเป็น 2 เส้น แต่ละเส้นเรียกว่า โครมาติด (chromatid) ระยะนี้อาจกินเวลามากหรือน้อย แล้วแต่ชนิดของเซลล์และสิ่งมีชีวิตเช่นกัน

G_2 คือ ระยะสุดท้าย ไม่มีการสังเคราะห์ DNA แต่มีการสังเคราะห์โปรตีนในระดับต่ำ ระยะนี้กินเวลาน้อยที่สุด

2. mitosis เป็นระยะการเกิดการแบ่งเซลล์

โครโมโซม (chromosome) ประกอบด้วย (ไพศาล, 2535) กรดนิวคลีอิกพวก DNA (deoxyribonucleic acid) และโปรตีนพวกฮิสโตน (histone) และโปรตามีน (protamine) ฮิสโตนนั้นอาจพบในโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไป ส่วนโปรตามีนจะพบในโครโมโซมของสัตว์จำพวกนก ในขณะที่นิวเคลียสแบ่งตัวในระยะ metaphase หรือ anaphase นั้นโครโมโซมมีขนาดใหญ่และหดสั้น และสามารถส่องเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เนื่องจาก มีการพับไปพับมาจนเกิดเป็นเส้นสายขนาดใหญ่ และจากการย้อมโดยใช้สีเคมีพบว่าภายในนิวเคลียสมีร่างแหซึ่งติดอยู่ทึบทั่วไป เรียกส่วนที่เป็นร่างแหว่า โครมาทิน (chromatin) เมื่อเซลล์แบ่งตัว (อมรา, 2540) ร่างแหนี้จะปรากฏเป็นเส้นใยเล็กๆ อันเกิดจากการเรียงตัวของท่อเล็กที่เรียกว่า microtubule กลายเป็นเส้นใยยาวเรียกว่า สายสปินเดิล (spindle fiber) สายสปินเดิลจะมีปลายข้างหนึ่งยึดติดกับเซนทริโอล และปลายอีกข้างหนึ่งยึดเซนโทรเมียร์ (centromere) ของโครโมโซมสายสปินเดิลจะช่วยดึงโครโมโซมให้เคลื่อนตัวได้ในขณะที่มีการแบ่งเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการเตรียมโครโมโซม

การเตรียมโครโมโซมจากรากพืช ในระยะไมโทซิส นำปลายรากพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ควรใช้รากที่สดและสมบูรณ์เพื่อให้มีอัตราการแบ่งเซลล์มากๆนิยมใช้รากแขนง (lateral root) รากที่ดีควรมีความโปร่งใสและมีสีขาวส่วน tip หรือปลายรากมีสีขาวอมครีม ถ้าไม่สามารถหารากได้อาจใช้เนื้อเยื่ออื่นๆที่เป็น meristemmatic tissues เช่น จากใบอ่อน หรือส่วนของดอก เช่น ผนังรังไข่ และเมล็ดอ่อน ซึ่งใช้วิธีเตรียมเช่นเดียวกับราก (อมรา, 2540) โดยมีขั้นตอนดังนี้

Pretreatement เพื่อจะทำให้เซลล์หยุดการแบ่งไมโทซีสในระยะเมทาเฟส ซึ่งระยะนี้โครโมโซมจะมีขนาดหดสั้นมากที่สุด ทำให้การนับและการศึกษารูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจน

Fixative เพื่อที่จะหยุดการทำงานของเซลล์ให้เร็วที่สุด โดยที่เซลล์ดังกล่าวจะต้องมีสภาพเหมือนกับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เนื่องจาก fixative ไปมีผลทำให้โปรตีนเกิดการเสื่อมสภาพขึ้น ดังนั้นอาจมีผลทำให้โครงสร้างของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ ซึ่งน้ำยาประเภทนี้จำเป็นต้องเตรียมใหม่ๆแล้วใช้ทันที มีสูตรการผสมแบบต่างๆกันดังนี้

- Carnoy's fluid ประกอบด้วย absolute ethanol หรือ methanol:glacial acetic aci ในอัตราส่วน 3:1

- Farmar's fluid ประกอบด้วย absolute ethanol:glacial acetic acid ในอัตราส่วน 6:3:1

Maceration เป็นการทำให้เซลล์นิ่ม โดยการย่อยสลาย pectin ที่อยู่ในชั้น middle lamella ของผนังเซลล์ซึ่งทำหน้าที่ต่อเชื่อมเซลล์ในลักษณะคล้ายคลึงกับซีเมนต์ที่ใช้ยึดแผ่นอิฐ เพื่อเป็นการลดจำนวนเซลล์ที่อยู่ซ้อนทับกับให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ สารเคมีที่ใช้ คือ HCl

Stain (สีย้อมเซลล์) ในการศึกษาโครโมโซมพืชจากเซลล์ปลายรากและเซลล์ microsporocyte นั้น นิยมใช้สี acetocarmine เพราะมีส่วนของสนิมเหล็กปนอยู่ จะทำให้โครโมโซมติดสีเข้มมากขึ้น (Shama และ Shama, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคการศึกษาจำนวนโครโมโซม (สมศักดิ์ และสุมน, 2543)

1. **เทคนิคทั่วไป** เป็นวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ศึกษาโครโมโซม โดยการย้อมโครโมโซมด้วยสีอะซีโตออร์ซีนหรืออะซีโตคาร์มีน โดยมีวิธีการเตรียมสีดังนี้

- สีอะซีโตออร์ซีน ทำได้โดย อุ่น glacial acetic acid แล้วละลายสี orcein 2.2 กรัม ในน้ำ 100 มล. ปล่อยให้เย็นแล้วเก็บเป็น stock solution ก่อนจะใช้ต้องเจือจางเป็น 45% ในน้ำกรอง นิยมใช้ aceto- orcein ย้อมเซลล์สัตว์ (อมรา, 2540)

- สีอะซีโตคาร์มีน ทำได้โดย อุ่น 45% acetic acid ที่ร้อน ละลายสี carmine โดยใช้อัตราส่วน 1 กรัมของ carmine ในกรด acetic 20 มล. ต้มให้เดือดนาน 1-2 นาที หรือ กระทั่งสีแดงของ carmine เข้มขึ้น ปล่อยให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง อาจทำด้วยวิธีต้มให้เดือดระเหยเป็นไอแล้วกลั่นตัวเป็นหยดน้ำใน reflux condenser นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง เก็บสารละลายนี้ในที่เย็นและมืด (อมรา, 2540)

นำปลายรากที่เก็บในแอลกอฮอล์แช่ในกรดเกลือความเข้มข้น 1 N ที่อุณหภูมิห้องระยะเวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับความแข็งของปลายรากพืช เพื่อทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่มและเซลล์แยกออกจากกันได้ง่าย หลังจากนั้นตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายรากวางบนสไลด์ หยดสีอะซีโตออร์ซีนหรืออะซีโตคาร์มีน ความเข้มข้น 0.1 % บดขยี้ด้วยเข็มเขี่ยปลายแบน และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ กดกระจกและซับสีส่วนเกินออก นำไปทำเป็นสไลด์ถาวรต่อไป การทำสไลด์ถาวร ทำได้โดยการนำสไลด์ที่เตรียมไว้ไปผ่านความเย็นด้วยวิธีใดวิธีหนึ่ง ดังนี้ คือ แช่ในช่องน้ำแข็งของตู้เย็นข้ามคืน ผ่านคาร์บอนไดออกไซด์เหลว วางบนก้อนน้ำแข็งแห้ง หรือจุ่มในไนโตรเจนเหลว เพื่อตรึงให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อติดแน่นบนสไลด์ แกะกระจกปิดสไลด์ออกอย่างรวดเร็วและทำให้แห้งด้วยลม หรือแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% และ 95% ตามลำดับ ปล่อยให้สไลด์แห้งแล้วหยด euparal, Canada balsam หรือ permount ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. เทคนิคฟอยล์เกน เป็นปฏิกิริยาที่บ่งบอกให้รู้ว่าส่วนใดเป็น DNA ส่วนใดไม่ใช่ DNA โดยทำให้ส่วนที่เป็นโครโมโซมติดสี แต่ cytoplasm และ nucleolus จะไม่ติดสี งานทดลองนี้ทำโดย Feulgen และ Rossenbeck ในปี 1924 โดย เทน้ำกลั่นที่เดือดปริมาณ 200 มล. ลงในสี basic feulgen จำนวน 1 กรัม แล้วเขย่านาน 5 นาที ทำให้เย็น กรองใส่ขวดที่แสงไม่สามารถผ่านได้หรือขวดฝาปิดสีชา เติม 30 มล. ของกรด HCl ลงไปจากนั้นเติม sodium metabisulphite หรือ potassium metabisulphite ($Na_2S_2O_5$ or $K_2S_2O_5$) 3 กรัม เก็บสีไว้ในที่เย็นและมืด ถ้าสีเปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่าสีเก่าเกินไปทำให้ย้อมได้ไม่ดี fuchsin solution ที่เตรียมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหม่จะไม่มีสี (อมร , 2540) เทคนิคฟอยส์เกนจะมีขั้นตอน คือ แช่ในกรดเกลือความเข้มข้น 1 N ที่อุณหภูมิ 60องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที – 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่มและดึงเบสพิวรีน (depurination) ออกจากดีเอ็นเอ ซับกรดออกและนำปลายรากไปแช่ในสารละลายชิฟท์ (Schiff' s reagent) ในที่มืด จนกระทั่งเนื้อเยื่อเจริญปลายรากติดสีม่วงแดงเข้ม ล้างด้วยน้ำหลายๆ ครั้ง ตัดเนื้อเยื่อเฉพาะที่ติดสีม่วงแดงของปลายรากบนสไลด์ หยดด้วยกรดน้ำส้มความเข้มข้น 50 % บดขยี้ด้วยเข็มเขี่ยปลายแบน ปิดกระจกปิดสไลด์และกดกระจกเพื่อซับกรดส่วนเกินออกแล้วนำไปทำสไลด์ถาวร

3. เทคนิคการย่อยเซลล์ เป็นวิธีที่ศึกษาโครโมโซมด้วยการใช้เอนไซม์แยกเซลล์ออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ย่อยผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียส เพื่อให้โครโมโซมกระจายหรือแยกออกจากกันได้ดีขึ้น เอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยเซลลูเลส และเอนไซม์เพคทิเนทเพื่อย่อยเพคติน เอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วย เซลลูเลส อาร์เอส ความเข้มข้น 2.0 % เพคโทไลเอส วาย-23ความเข้มข้น 0.3% และ มาเซโรไซม์ อาร์ 10 ความเข้มข้น 1.5 % นำปลายรากที่เก็บในแอลกอฮอล์ 70 % ล้างด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง แช่ในสารละลายของเอนไซม์ดังกล่าวบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของรากหรือเนื้อเยื่อ นำรากที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์แล้วแช่ในน้ำกลั่นเพื่อล้างเอาเอนไซม์ออกและหยุดการทำงานของเอนไซม์ คีบปลายรากด้วยปากคีบ หรือดูดด้วยปิเปตพาสเจอร์ วางบนสไลด์และหยดน้ำยาคงสภาพเซลล์จำนวน 1-2 หยด บดขยี้รากด้วยเข็มเขี่ยปลายแบนหรือปากคีบเพื่อให้เซลล์กระจาย ผึ่งสไลด์ข้ามคืนให้แห้งนำไปย้อมด้วยสีเกียมซา (giemsa) ความเข้มข้น 2.0% ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (0.01M Na_2HPO_4 และ 0.01M NaH_2PO_4) ที่มีอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 10 นาที ก็จะได้ สไลด์ถาวรเพื่อศึกษาโครโมโซม

การศึกษาโครโมโซมพืชจากเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายใบ

Yamamoto และTominaga (2003) ตรวจสอบโครโมโซมของ *Citrus clementina* จากปลายใบอ่อน หยุดวงชีพเซลล์ใน 8-hydroxyquinoline นาน 4 ชั่วโมงในที่มืด ย่อยเซลล์พืชในเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย 2% Cellulase Onozuka RS, 1.5% Macerozyme R200, 0.3% Pectolyase Y-23 และ 1mM EDTA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ย้อมด้วยสี Giemsa นาน 15 นาที พบว่าดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 9

Jonsson (2004) ได้ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการศึกษาโครโมโซมในระยะเมตาเฟตของปลายใบพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการวิเคราะห์ Karyotype และ ตำแหน่งของยีน ด้วยเทคนิค FISH (fluorescence *in situ* hybridisation) โดยใช้เอนไซม์ย่อยใบอ่อน เปรียบเทียบกับโครโมโซมปลายราก โครโมโซมปลายใบอ่อนมีแนวโน้มที่จะยาวขึ้น ดังนั้น Karyotype จึงมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความแตกต่างกัน และดัชนีในระยะเมทาเฟตจะมีค่าสูง ซึ่งในระยะนี้จะมีการกระจายตัวของโครโมโซมอย่างสม่ำเสมอทำให้สามารถนับได้อย่างแม่นยำ และได้มีการกล่าวถึงพืชในตระกูล *Betula* L. จากการศึกษาโครโมโซมพืชด้วยเทคนิค FISH พบว่า โครโมโซมปลายใบให้ผลดีกว่าเมื่อเทียบกับผลที่ได้จากโครโมโซมปลายราก

การศึกษาโครโมโซมในทานตะวัน

Voronina และ Petrova (1991) ได้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมของทานตะวันจากเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้มรังไข่ของดอก พบว่า มีโครโมโซมที่เป็นดิพลอยด์ เท่ากับ 34 โดยโครโมโซมจะรวมกันเป็นกลุ่มภายในเนื้อเยื่อพืช

Srivastava (2004) ได้นำเมล็ดทานตะวันจำนวน 100 เมล็ด มาปลูกที่ Allahabad,Uttar Pradesh และ India โดยนำเมล็ดมาแช่ในสารละลายโคลซิซิน ที่ความเข้มข้น 0.1-0.7% นาน 2-5 วัน โดยที่ทรีทเมนต์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายโคลซิซิน 0.4% เกิดการชักนำ polyploidy และยังมีผลกระทบต่อการชักนำของ autotetraploidy ทำให้ความสูงลดลง ความยาวใบ ความกว้าง เส้นผ่านศูนย์กลางดอก และทำให้ดอกออกช้า การวิเคราะห์เซลล์แสดงให้เห็นว่าพืชส่วนมากมีโครโมโซม 4n ในรุ่น C1 และ C2 ลักษณะที่แยกออกของ multivalents ใน autotetraploidy ทำให้ละอองเกสรไม่สมบูรณ์ และยังเกิดการเปลี่ยนแปลงของเมล็ด คือ มีความผิดปกติผิกปกติ เมล็ดไม่ค่อยสมบูรณ์ โครโมโซมมีความล่าช้าในการเข้าสู่ระยะแอนาเฟต และ ระยะเทโลเฟต โครโมโซมมีการแบ่งตัวในระยะแอนาเฟตไม่เท่ากัน และมีการแบ่งตัวเป็น 1 และ 2 ในระยะ เมตาเฟต ในรุ่น C1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีทำการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1.เมล็ดทานตะวัน พันธุ์ บิ๊ก สไมล์ บริษัท ที เอส เอ จำกัด

2.วัสดุปลูก

- กระถางพลาสติก
- วัสดุปลูก

3.สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม

1. asculin 0.04%
2. alcohol 95%
3. alcohol 70%
4. glacial acetic acid
5. 1N HCl
6. สีย้อม giemsa
7. น้ำกลั่น
8. เอนไซม์
   - cellulose RS 2.0% (Kikoman)
   - pectolyase Y_{23} 0.3 % (Seishin Pharmaceutical Co.Ltd.)
   - macerozyme R_{10} 1.5% (Yakult, Japan)

4. คีบปลายแหลม (forcep)

5.เข็มเขี่ยปลายแหลม, แบน 2 อัน

6. แผ่นสไลด์

8. กระดาษทิชชู่

9. ขวดเก็บตัวอย่าง

10. มีดกรรไกร

11. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น SZ-PT ยี่ห่อ OLYMPUS

12. กล้องถ่ายรูป รุ่น DSC-W30 ยี่ห่อ SONY

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีทำการทดลอง

การเตรียมน้ำยาสำหรับตรวจนับโครโมโซม

1. pretreatment คือการทำให้เซลล์พืชหยุดการแบ่งไมโทซีสในระยะเมทาเฟส ในการทดลองนี้ใช้ asculin เตรียมได้ดังนี้
   - เตรียมสาร asculin เข้มข้น 0.04% โดยชั่ง asculin จำนวน 0.04 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร
2. fixation and storage คือ การทำให้เซลล์พืชคงสภาพเดิม
   - โดยใช้ glacial acetic acid และ alcohol 95% ในอัตราส่วน 1:3
3. สีย้อม giemsa เตรียมได้ดังนี้
   - ใช้สี giemsa เข้มข้น 1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 49 มิลลิลิตร

การเตรียมปลายใบทานตะวันและการตรวจนับโครโมโซม

1. ปลูกทานตะวันในกระถางพลาสติก ที่มีดินผสม จนกระทั่งทานตะวันงอกประมาณ 3 สัปดาห์

2. โดยเก็บจากใบทานตะวัน ส่วนใบทานตะวันในระยะที่1 มีสีเขียวอ่อนปนเหลือง มีเส้นขนจำนวนมาก ใบมีลักษณะม้วนงอ มีความยาวประมาณ 0.5-1 ซม. ในระยะที่ 2 ลักษณะของใบในระยะนี้มีสีเขียวเข้ม เห็นเส้นใบชัดเจน ใบแผ่กางออกไม่ม้วนงอมีความยาวประมาณ 1-1.5 ซม. จากนั้นทำการตัดปลายใบทานตะวันยาวประมาณ 0.5- 1 ซม. ในเวลาประมาณ 8.30 -10.00 นาฬิกา

3. นำปลายใบมาทำ Pretreatement โดยแช่ใน asculin 0.04% นาน 0, 3, 6 ชั่วโมง

4 นำปลายใบที่ไม่ได้แช่สาร และแช่สาร asculin แช่ในสาร fixation ประกอบด้วย glacial acetic acid และ alcohol 95% ในอัตราส่วน 1:3 โดยแช่ในสารละลายที่เตรียมใหม่เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

5. ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ในเอนไซม์ ประกอบด้วย cellulose RS 2.0% , pectolyase Y_{23} 0.3 % , macerozyme R_{10} 1.5% นาน 55-60 นาที ตามวิธีของ สมศักดิ์ และสุมน (2543)

6. หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

7. เตรียม glacial acetic acid และ alcohol 95% ในอัตราส่วน 3:1 แล้วนำไปแช่เย็น

8. นำปลายใบขึ้นจากน้ำแล้ววางบนสไลด์ ซับน้ำส่วนเกินออก หยด glacial acetic acid และ alcohol 95% ในอัตราส่วน 3:1 ที่ได้จากการเตรียม ในข้อ. 7

9. ทิ้งให้แห้ง แล้วนำไปแช่สีย้อม Giemsa นาน 15-20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 . ทิ้งไว้ให้แห้งนำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะเมทาเฟสที่มีการกระจายตัวของโครโมโซม แล้วบันทึกผลการทดลองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000x ถ่ายรูปที่บันทึกผลได้ด้วยกล้องถ่ายรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลโดยเก็บผลจากจำนวนโครโมโซมที่นับได้ในแต่ละใบ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า บันทึกภาพโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เวลาและสถานที่

เวลา	เริ่มการทดลอง	เดือนมิถุนายน 2549
	สิ้นสุดการทดลอง	เดือนพฤษภาคม 2550
สถานที่	ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลและวิจารณ์

จากการศึกษาเนื้อเยื่อเจริญที่บริเวณปลายใบทานตะวัน เมื่อเก็บใบทานตะวันในระยะที่ 1 (ภาพที่ 1) พบเซลล์เป็นส่วนใหญ่แต่ไม่มีโครโมโซม และเมื่อเก็บใบทานตะวันในระยะที่ 2 (ภาพที่ 2) พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีโครโมโซมอยู่ในระยะโพรเฟส จึงนำใบระยะที่ 2 ของทานตะวันไปศึกษาพฤติกรรมของโครโมโซมพืชในการแบ่งแบบไมโตซิสที่เวลาต่างๆ ดังต่อไปนี้

ส่วนเนื้อเยื่อปลายใบทานตะวันที่เก็บ เวลา 8.30 นาฬิกา โดยไม่แช่สารละลาย asculin พบว่าเซลล์เนื้อเยื่อปลายใบส่วนใหญ่อยู่ในระยะโพรเฟส เซลล์ที่เห็นมีการขยายตัวติดสีชัดเจน (ภาพที่ 3a-b) โครโมโซมติดสีเข้ม ส่วน ลักษณะโครโมโซมในภาพที่ 3c มีการแบ่งเซลล์ที่ไม่ชัดเจน

จากการเก็บเนื้อเยื่อปลายใบทานตะวันที่เก็บเวลา 9.00 นาฬิกา โดยไม่แช่สารละลาย asculin พบว่าเนื้อเยื่อปลายใบส่วนใหญ่อยู่ในระยะโพรเฟส (ภาพที่ 4a-c) โดยที่โครโมโซมมีลักษณะเป็นจุดสีเข้มตรงกลางเซลล์

เมื่อเก็บเนื้อเยื่อปลายใบทานตะวันที่เวลา 9.00 นาฬิกา และนำมาแช่สารละลาย asculin เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผลที่ได้คือเซลล์มีการแบ่งตัวในระยะอินเตอร์เฟส และบางส่วนของเซลล์อยู่ในระยะโพรเฟส นิวเคลียสมีการขยายตัว ขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ (ภาพที่ 5a-c)

จากการเก็บเนื้อเยื่อปลายใบทานตะวันที่เวลา 9.00 นาฬิกา และนำมาแช่สารละลาย asculin นาน 6 ชั่วโมงพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีการแบ่งตัวอยู่ในระยะโพรเฟส สังเกตจากเซลล์มีขนาดใหญ่ โครมาทินติดสีได้ชัดเจน (ภาพที่ 6a-f)

เมื่อเก็บเนื้อเยื่อปลายใบทานตะวันที่เวลา 9.30 นาฬิกา นำมาแช่ในสารละลาย asculin เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าพบเซลล์มีการแบ่งตัวในระยะโพรเฟส (ภาพที่ 7a-b) ดังนั้นควรเก็บเนื้อเยื่อปลายใบช้ากว่าเวลา 9.30 นาฬิกา

จากการเก็บเนื้อเยื่อบริเวณปลายใบทานตะวันในเวลา 10.00 นาฬิกา แช่สารละลาย asculin เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าเซลล์มีการแบ่งตัวในช่วงของระยะอินเตอร์เฟส (ภาพที่ 8a-c)

จากการเก็บเนื้อเยื่อบริเวณปลายใบทานตะวันในช่วงเวลา 9.00-10.00 น. พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะโพรเฟส ในการศึกษาการเตรียมโครโมโซมพืชเพื่อนับจำนวนโครโมโซมการทำ karyotype หรือการเตรียมโครโมโซมสำหรับเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization. ควรเก็บปลายใบอ่อนของทานตะวันช้ากว่าเวลา 10.00 น. จากการศึกษาทดลองของ Todorova (1976) พบว่าจำนวนโครโมโซมของทานตะวันเท่ากับ 2n = 34 แท่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 1 รูปของใบทานตะวันในระยะที่ 1

ภาพที่ 2 รูปของใบทานตะวันในระยะที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3 เนื้อเยื่อเจริญปลายใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* Linn.) เก็บที่เวลา 8.30 นาฬิกา แช่สาร asculin เป็นเวลา 0 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000x)

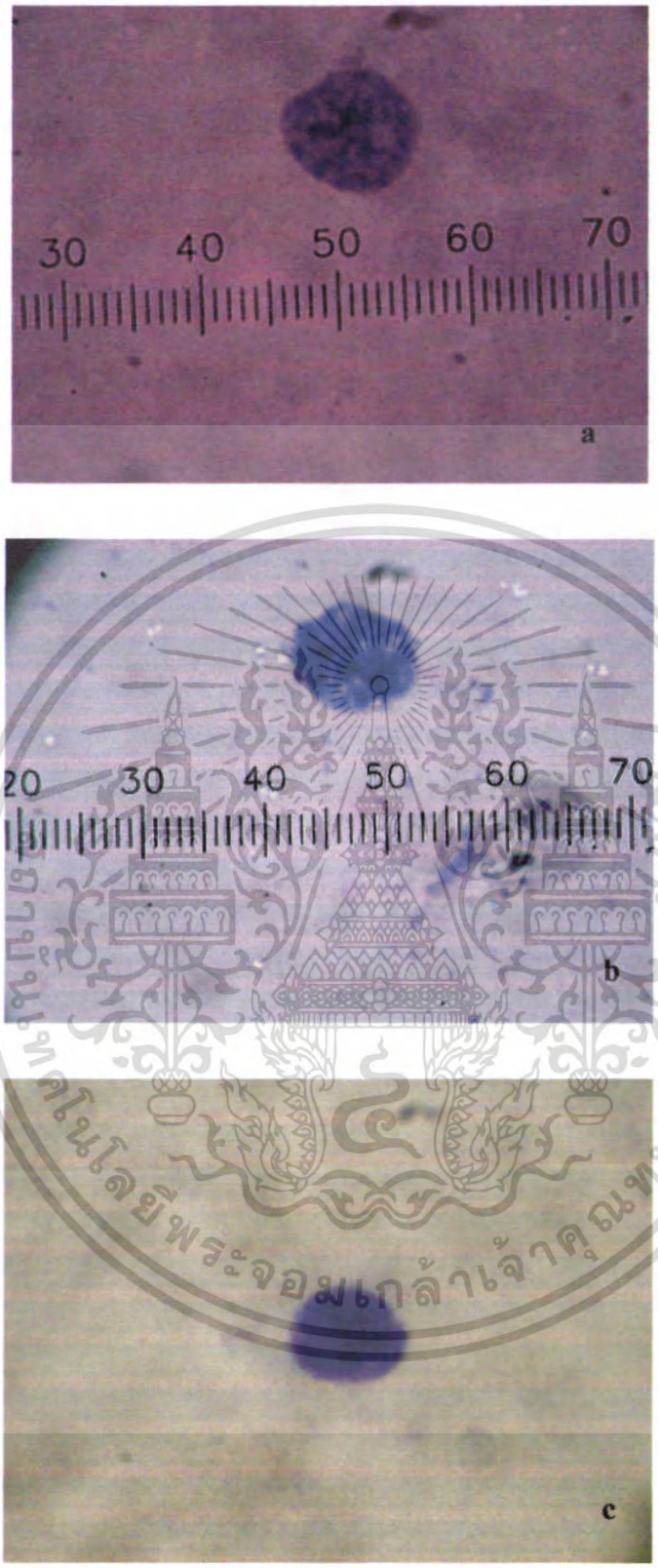
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ภาพที่ 4 เนื้อเยื่อเจริญปลายใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* Linn.) เก็บที่เวลา 9.00 นาฬิกา แช่สาร asculin เป็นเวลา 0 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000x)

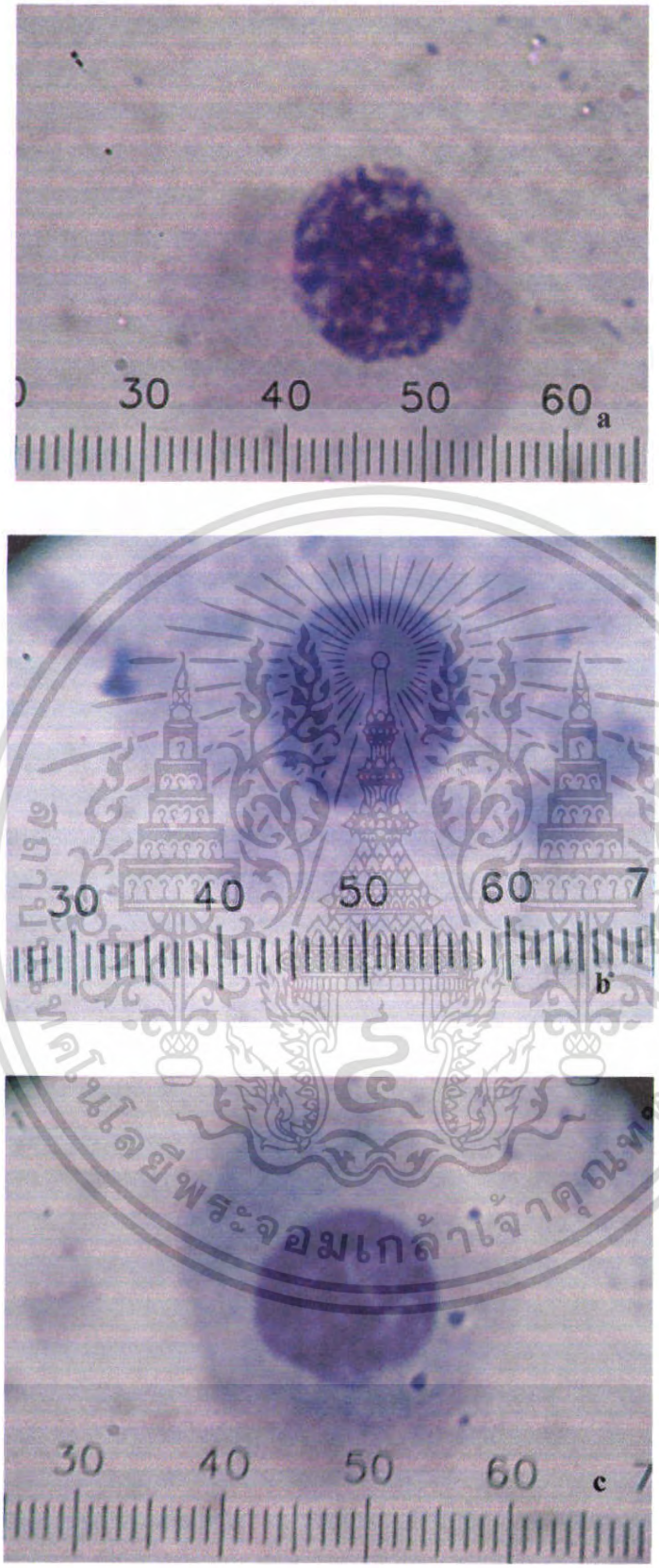
73588

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 เนื้อเยื่อเจริญปลายใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* Linn.) เก็บที่เวลา 9.00 นาฬิกา แช่สาร asculin เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

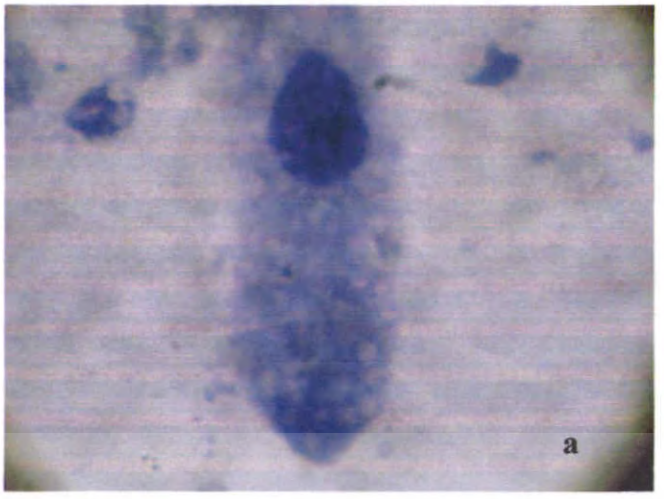


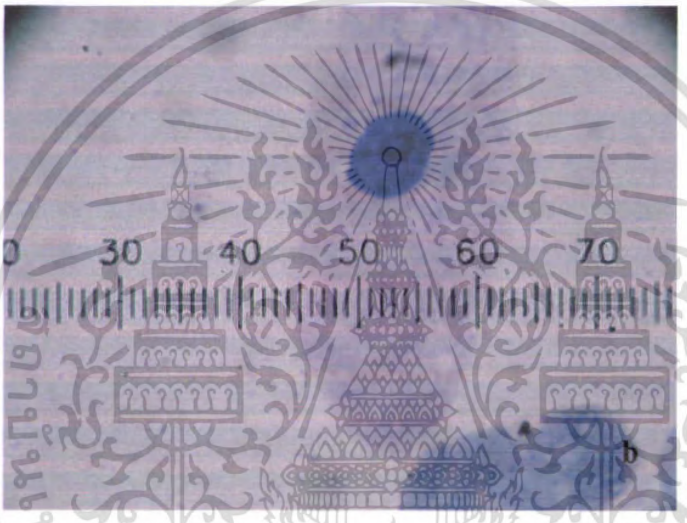
ภาพที่ 6 เนื้อเยื่อเจริญปลายใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* Linn.) เก็บที่เวลา 9.00 นาฬิกา แช่สาร asculin เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 6 (ต่อ)

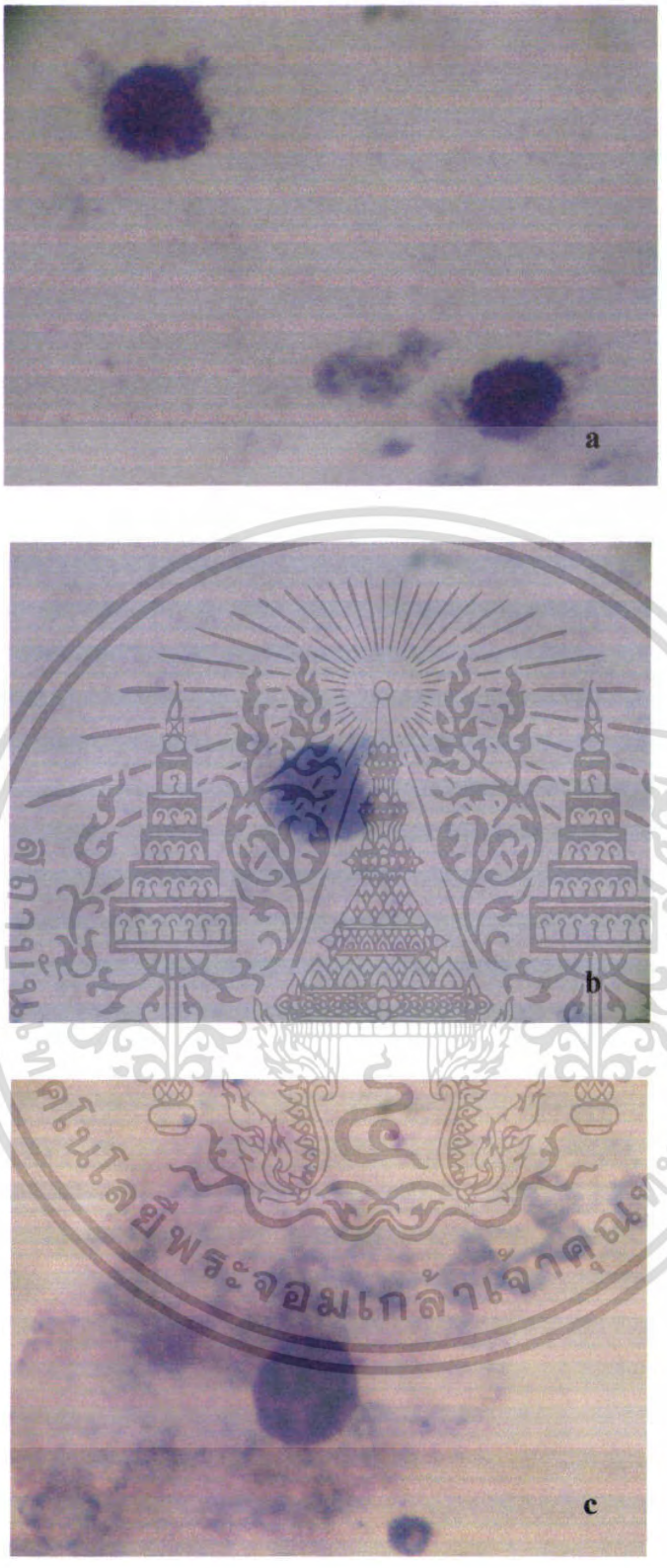
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





ภาพที่ 7 เนื้อเยื่อเจริญปลายใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* Linn.) เก็บที่เวลา 9.30 นาฬิกา แช่สาร asculin เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 เนื้อเยื่อเจริญปลายใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* Linn.) เก็บที่เวลา 10.00 นาฬิกา แช่สาร asculin เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเนื้อเยื่อบริเวณปลายใบทานตะวัน โดยเริ่มต้นจากการตัดปลายใบประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร เก็บปลายใบทานตะวันในระยะที่ 2 เพราะเซลล์ส่วนใหญ่มีโครโมโซมอยู่ในระยะโพรเฟส ในช่วงระยะเวลา 8.30, 9.00, 9.30, 10.00 นาฬิกา และนำมาแช่ในสารละลาย asculin ที่ความเข้มข้น 0.04% นาน 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ย้อมด้วยสี giemsa นาน 15-20 นาที ใช้วิธีย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ ประกอบด้วย เซลลูเลส อาร์เอส ความเข้มข้น 2.0% เพคโทไลเอส วาย-23 ความเข้มข้น 0.3% และ มาเซโรไซม์ อาร์ 10 ความเข้มข้น 1.5% จากนั้นนำสไลด์ที่เตรียมได้มาตรวจหาโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์จากเนื้อเยื่อบริเวณปลายใบทานตะวันที่แช่ด้วยสารละลาย asculin นาน 6 ชั่วโมง ที่เก็บเมื่อเวลา 9.00-9.30 นาฬิกา เซลล์มีการแบ่งตัวในระยะโพรเฟส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ตถาพร ไม้สน. 2539. การทดสอบเปรียบเทียบพันธุ์ทานตะวันตัดดอก. ปัญหาพิเศษ. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นันทิยา สมานนท์. 2535. คู่มือการปลูกไม้ดอก. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 205 หน้า.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2535. พันธุศาสตร์. ไทยวัฒนาพาณิช, กรุงเทพฯ.

ศรีสุดา เตชะสาน และพัฒนา นรมาศ. 2541. การปลูกทานตะวัน. กองเกษตรสัมพันธ์ กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ

สิทธิรัตน์ รัตนคเชนทร์. 2544. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของดองดึง. ปัญหาพิเศษ. ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช และสุมน มาสุธน. 2543. การศึกษาโครโมโซมพืชด้วยการย่อยเซลล์. วราสารวิทยาศาสตร์ 3 (54) : 178-138

อดิสร กระแสชัย. 2539. บทปฏิบัติการ Cytogenetic in Agriculture. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 11-18

อมรา คัมภิวานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. เท็กซ์แอนด์เจอร์นัลพับพิเคชั่น. กรุงเทพฯ.

Jonsson, K.A. 2004. Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysisi and *in situ* hybridization. Methods in Cell Science. 25 (3-4) : 91-95

Sharma, A.M. and A. Sharma. 1999. Analysis, Manipulation and Engineering. Plant Chromosome. 371p

Srivastava, R.S. 2004. Effect of colchicine on some quantitative characters of sunflower [Helianthus annuus (L.) var. Morden]. Plant Breeding and Genetics. 64 (4) : 333-334

Todorova, G., I. 1976. Interspecific relationships in the genus Helianthus L. Plant Breeding and Genetics. 170p

Voronina, I.P. and T.F. Petrova. 1991. New cytogenetic method for studying regenerants of sunflower. Plant Breeding and Genetics. 184 (90-91)

Yamamoto, M. and S. Tominaga. 2003. Chromosome identification in haploid Clementine (*Citrus clementina* hort. Ex Tanaka) by fluorescent staining. Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Japan. Scientia Horticulturae. 101 : 201-206

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้