ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของสละ(*Salacca* sp.)

Salacca sp. Chromosome Investigation

โดย

นายคุณธน จิรธนโชติ

ได้รับความเห็นชอบจาก

.....

(อาจารย์ กัญจนา แซ่เตียว)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ. สมภพ ฐิตะวสันต์)

หัวหน้าภาควิชาพืชสวน

วันที่ 29 เดือน พ.ค. พ.ศ. ๒๕๕๑

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของสละ(*Salacca* sp.)

Salacca sp. Chromosome Investigation

โดย

นายคุณธน จิรธนโชติ

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ กัญจนา แซ่เตียว

ปร.
ค622ก
เลขหมู่ 2543
เลขทะเบียน 41659
วัน, เดือน, ปี 27 ก.พ. 2545

เสนอ

.b.....

.i.....

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง	การศึกษาจำนวนโครโมโซมของสละ (*Salacca* sp.)
	Salacca sp. Chromosome Investigation
โดย	นายคุณธน จิรธนโชติ
ภาควิชา	พืชสวน
สาขาวิชา	พืชสวน
คณะ	เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์กัญจนา แซ่เตียว

บทคัดย่อ

การศึกษาโครโมโซมปลายรากสละโดยใช้วิธี squash technique ของสละช่วงเวลาที่เหมาะสมคือ 8.00 – 9.00 น. ที่สามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนสุด ทำการตัดรากยาวประมาณ 1 ซม. หยุดวงชีพด้วย 8-hydroxyquinoline 0.002M เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำไปแช่ในน้ำยา fixation (alcohol 95% + acetic acid ; 3:1) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำปลายรากแช่ใน 1M HCl นาน 5 นาที ในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และล้างด้วยน้ำสะอาด เมื่อทำการศึกษาให้ตัดบริเวณปลายรากประมาณ 0.3-0.5 ซม. จะมีโครโมโซมอยู่มาก แล้วย้อมสี acetocarmine เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง และสละมีจำนวนโครโมโซม 2n=32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	*Salacca* sp. Chromosome Investigation
By	Mr. Kunton Jiratanachot
Major	Horticulture
Department	Horticulture
Faculty	Agricultural Technology
Advisor	Miss Kanjana Saetiew

ABSTRACT

Somatie chromosome investigation of *Salacca* sp. from root tips by squash technique method. The best time was found chromosome between 8.00-9.00 a.m. Taken young root tips 1 cm. and stop life cycle with 8- Hydroxyquinoline for 6 hours kept in Fixative (alcohol 95%+acetic acid ; 3: 1) for 5 minutes transfer the tissues to 1M HCl at 60^{o}C for 5 minutes after that washing the tissues with water. When studies chomosome cut off about 0.3-0.5 cm. behind the tip stained in acetocarmine for 2-3 hours. The result showed the chromosome number of 2n=32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษเล่มนี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์กัญจนา แซ่เตียว อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษและกรุณาให้คำแนะนำ ติดตามความก้าวหน้า และช่วยแก้ไขปัญหาอุปสรรคต่างๆ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังจนตลอดมา รวมทั้งน้ำใจของพี่ๆ นักศึกษาปริญญาโท เพื่อนๆ ที่คอยช่วยเหลือ ขอขอบคุณสโมสรนักศึกษาคณะเทคโนโลยีการเกษตร และภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเป็นสถานศึกษาและมีส่วนช่วยให้ปัญหาพิเศษของข้าพเจ้าสำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

นายคุณธน จิรธนโชติ

พฤษภาคม 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
คำนำ	1
ตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลการทดลอง	18
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	22
เอกสารอ้างอิง	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 1 แสดงเวลาที่เหมาะสมและจำนวนโครโมโซมที่นับได้ 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1 ต้นสละพันธุ์เนินวง(*Salacca* sp.)	15
ภาพที่ 2 แสดงจำนวนโครโมโซมของ *Salacca* sp. 2n=32 ถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	20
ภาพที่ 3 A.แสดงลักษณะโครโมโซมของ *Salacca* sp. เมื่อเลนส์รวมแสง (condenser) อยู่ที่ตำแหน่ง 0 B. แสดงลักษณะโครโมโซมของ *Salacca* sp. เมื่อเลนส์รวมแสง (condenser) อยู่ที่ตำแหน่ง 100	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

พืชสกุลสละกำลังได้รับความสนใจอย่างมากจากเกษตรกร เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปทางตอนใต้ของมณฑลยูนาน ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน มาเลเซีย อินโดนีเซีย ไทย ทางตอนใต้ของพม่าและฟิลิปินส์ โดยทั่วไปมีอยู่ประมาณ 18 ชนิด (ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี,2539) แต่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และมีลักษณะที่น่าสนใจได้แก่ ระกำ สละ สลัก ส้มหลุมพี (ณรงค์,2537) โดยเฉพาะสละเป็นพืชที่กำลังได้รับความนิยมจากเกษตรกรภาคตะวันออกซึ่งดูได้จากเนื้อที่ปลูกเพิ่มขึ้นในแต่ละปี ลักษณะเด่นของพืชชนิดนี้คือ เป็นพืชที่สามารถขึ้นได้ดีในเกือบทุกสภาพพื้นที่ ทั้งที่ลุ่ม ที่ดอน และบนภูเขา เป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตให้ผลผลิตในเชิงการค้าได้ค่อนข้างรวดเร็ว ประมาณว่าตั้งแต่เริ่มปลูกจนกระทั่งออกดอกครั้งแรกใช้เวลาประมาณ 2 ปี การปลูกและการดูแลรักษาง่าย โรคหรือแมลงศัตรูพืชค่อนข้างน้อย อีกทั้งยังเป็นผลไม้ที่มีรสชาติหวานกลมกล่อม มีกลิ่นหอม หวานเฉพาะตัวที่แตกต่างจากผลไม้ชนิดอื่น

ในอนาคตสละจะพัฒนาจากเดิมไม้ป่าเป็นไม้ผลเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาพืชชนิดนี้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

สละ (*Salacca* sp.) เป็นพืชในวงศ์ Arecaceae เชื่อว่าสละเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่พัฒนาขึ้นตามธรรมชาติของระกำ (ไพโรจน์, 2535 ; Polprasid and Slakphetch, 1989) โดยสละที่ปลูกในเขตจันทบุรี เกิดจากการผสมพันธุ์กันตามธรรมชาติระหว่าง *Salacca wallichiana* Mart. และ *Salacca glabrescens* (Hambali et al., 1989) พื้นที่ปลูกที่สำคัญอยู่ที่ภาคตะวันออกของประเทศ โดยเฉพาะจังหวัดจันทบุรี ที่มีการปลูกสละมากที่สุดในประเทศไทย ประมาณว่าใน ปี พ.ศ. 2539 (เดือนสิงหาคม) มีพื้นที่การประมาณ 4,000 ไร่ ส่วนจังหวัดอื่นๆที่มีการปลูกเป็นการค้าได้แก่ จังหวัดตราดและระยอง (ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี, 2539)

ชื่อสามัญ สละ , สะละ

ชื่อวิทยาศาตร์ *Salacca* sp.

ชื่อวงศ์ ARECACEAE

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น ลำต้นเป็นกลุ่มเป็นกอ (cluster stems) ส่วนของลำต้นประกอบด้วยปล้องและใบ ส่วนข้อจะปรากฏให้เห็นเมื่อลอกใบออกโดยลำต้นหรือเหง้าทอดอยู่ใต้ดินหรือบนผิวดิน มีหน่อแตกจากโคนต้นออกเป็นต้นใหม่ขึ้นรวมกับต้นเก่าเป็นกอใหญ่ ซึ่งอาจใช้หน่อมาขยายพันธุ์ต่อได้โดยการแยกกอมาปลูกใหม่

ราก รากเป็นรากฝอย (fribrous root) เช่นเดียวกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วๆไป และมีรากที่แตกออกจากลำต้นเหนือพื้นคล้ายรากข้าวโพดเพื่อช่วยพยุงค้ำจุนลำต้นเช่นกันเรียกว่า รากอากาศ (aerial root)

ใบ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก (pinnate) (ฉรงค์, 2537) ประกอบด้วย ก้านใบ (rachis) และใบย่อย (leaflet) เป็นคู่เช่นเดียวกับใบมะพร้าว ยาวประมาณ 2-3 เมตร ใบอ่อนเวลาแตกจากยอดจะห่อรวมกันเรียกว่า ใบรูปหอก แทงขึ้นในแนวดิ่งตรงกลางยอด เมื่อใบแก่เต็มที่จะขยายออกเป็นตัวใบ และคลี่ใบย่อยออก ช่วงปลายใบมีหนามเล็กๆ อยู่ที่ขอบใบ ก้านใบมีลักษณะส่วนกลางโค้งลงค่อนข้างกลม ส่วนบนเป็นรูปเว้าลงเป็นร่อง มีหนามแข็งแหลมทั้งก้านใบตลอดจนถึงกาบใบ ซึ่งเป็นส่วนของใบที่อยู่ต่ำสุดห่อหุ้มลำต้นเพื่อยึดตัวใบให้ทรงตัวอยู่ได้ กาบใบของสละจะไม่หลุดออกจากต้นยังคงติดแน่นอยู่ปล่อยให้ตัวใบแห้งเหี่ยวอีกนานกว่าจะผุไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดอก ดอกจะออกบริเวณกาบใบหรือระหว่างชั้นของโคนกาบใบ จากนั้นจึงเจริญเติบโตยืดยาวและอ่อนลู่ลงสู่พื้นดิน หรือทอดนอนไปกับพื้นดิน เรียกว่า ทะลายดอก (inflorescence) จะมีกาบดอก (spathes) หุ้มขณะดอกยังตูมอยู่หรือยังคงอยู่ในกาบดอกก่อน หลังจากที่ทะลายดอกคลี่เมื่อดอกแก่ กาบดอกก็ยังคงติดกับทะลายดอกอยู่ตลอดไป ในช่วง 1 ปี สละจะมีทะลายดอกประมาณ 9-12 ทะลาย บนทะลายดอกประกอบด้วย ช่อดอก (spadix) ซึ่งเจริญเติบโตแยกออกมาจากทะลายดอกสับกันไปมา ในแต่ละทะลายดอกจะมีช่อดอกประมาณ 3-15 ช่อดอก ช่อดอกนี้ประกอบด้วย ดอกย่อย (floret) จำนวนมากไม่มีก้านดอก ฐานดอกจะยึดแน่นกับแกนช่อดอก 1 ช่อดอกคือ 1 กระปุกผล ระยะการบานของดอกบนช่อดอกตั้งแต่ดอกแรกจนถึงดอกสุดท้ายใช้เวลาประมาณ 3 วัน

ช่อดอกต้นเพศผู้จะประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมากแต่ละดอกประกอบด้วยกลีบรอง และกลีบดอกสีแดงอย่างละ 3 กลีบ ไม่มีเกสรเพศเมีย มีเกสรเพศผู้จำนวน 5 –6 อัน ทำหน้าที่ผลิตละอองเรณู

ช่อดอกเพศเมียประกอบด้วยดอก 2 ประเภทคือ

ดอกสมบูรณ์เพศ (Hermaphrodite flower) มีทั้งเกสรเพศเมียและเกสรเพศผู้ ซึ่งแต่ละดอกจะมีกลีบรองและกลีบดอกอย่างละ 3 กลีบ กลีบดอกมีสีแดง กลีบรองมีสีชมพู รังไข่มีขนสีน้ำตาลอ่อนนุ่มปกคลุมแต่ละรังไข่ประกอบด้วย ออวุลจำนวน 3 อัน และมีเกสรตัวผู้จำนวน 5-6 อัน แต่เกสรตัวผู้ไม่สามารถผลิตละอองเรณูได้

ดอกเพศผู้ (Staminate flower) มีลักษณะคล้ายกับดอกบนช่อดอกจากต้นเพศผู้ต่างกันตรงที่ไม่สามารถผลิตละอองเรณูได้ ซึ่งภายในดอกประกอบด้วยกลีบรองสีชมพู และกลีบดอกสีแดง อย่างละ 3 กลีบ มีเกสรตัวผู้ 5-6 อัน

ช่อดอกสละเนินวงที่เกิดจากต้นเพศเมีย มีอัตราส่วนของดอกสมบูรณ์เพศต่อดอกเพศผู้เท่ากับ 1:1 ซึ่งจำนวนดอกสมบูรณ์เพศและดอกเพศผู้จะมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับความยาวของช่อดอก (เสริมสุขและไพโรจน์, 2533) ดอกสละเนินวงสามารถรับและถ่ายละอองเรณูได้ทันทีตั้งแต่วันแรกที่ดอกบานได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และสามารถติดผลได้ดีจนกระทั่งดอกบานเต็มที่ 2 วัน (ชมพู, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผล ผลสละเนินวงมีลักษณะหัวท้ายเรียวคล้ายกระสวย ผลหนึ่งมักมี 1-2 กลีบ หนามผลยาวอ่อนนิ่ม ปลายหนามงอนไปทางท้ายผล การเจริญเติบโตของผลนับตั้งแต่ออกทะลายดอก จนสามารถเก็บเกี่ยวได้ ใช้เวลาประมาณ 16-18 เดือน คือตั้งแต่ออกทะลายดอกจนดอกบานใช้เวลาประมาณ 8-9 เดือน ระยะเวลาตั้งแต่ติดผลจนเก็บเกี่ยวได้ใช้เวลาประมาณ 8-9 เดือน (เปรมปรี, 2530) การเจริญของผลเป็นแบบคล้าย simple sigmoid curve (ชมพู, 2540) โดยพบว่าในช่วง 5 เดือนแรก ผลจะเจริญเติบโตค่อนข้างช้ามาก เมื่อเข้าเดือนที่ 6 เซลล์เริ่มมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น การเจริญเติบโตของผลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งเดือนที่ 8 ผลจะเจริญเติบโตช้าลง ขนาดผลค่อนข้างคงที่ ในขณะที่น้ำหนักผลยังคงเพิ่ม เดือนที่ 9 เป็นต้นไป เปอร์เซ็นต์ total soluble solids (TSS) ในระยะผลแก่ลดลง (รมย์ริญ, 2537) ผลสละเมื่อยังอ่อนอยู่จะมีเปลือกผลสีน้ำตาลไหม้ และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงเมื่อผลแก่พร้อมเก็บเกี่ยวได้ การเปลี่ยนสีเปลือกยังขึ้นกับสภาพแวดล้อมด้วย เช่นผลที่อยู่ร่มจะมีสีออกน้ำตาลเข้มปนแดง ส่วนผลที่ถูกแดดจะมีสีแดงมากกว่า (ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี, 2539)

การติดผลของสละเนินวง

การติดผล หมายถึงการที่ดอกสมบูรณ์เพศบนช่อดอกต้นเพศเมียเปลี่ยนสภาพเป็นผลอ่อน ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีละอองเรณูมาตกลงบนปลายยอดเกสรเพศเมียและงอกหลอดละอองเรณูไปตามก้านเกสรเพศเมียเพื่อเข้าไปผสมกับออวุลซึ่งอยู่ภายในรังไข่และเกิดการปฏิสนธิขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงขึ้นภายในออวุล มีการแบ่งเซลล์และการขยายขนาดเซลล์ทำให้ขนาดของออวุลใหญ่ขึ้น ซึ่งเป็นจุดเริ่มแรกของการติดผล (พีรเดช, 2539) ในเวลา 5-7 วัน หลังการถ่ายละอองเรณูดอกจะมีการเปลี่ยนแปลงภายนอกที่สังเกตได้คือรังไข่ที่มีขนสีน้ำตาลปกคลุมจะขยายใหญ่ขึ้นและกางออกเล็กน้อย เมื่อเทียบกับดอกที่ไม่ได้รับการถ่ายละอองเรณูจะแห้งดำร่วงจากช่อดอก พืชสกุลนี้มีออวุล 3 ใบ ถ้าได้รับการผสมครบทุกใบและสามารถมีพัฒนาและเจริญเติบโตได้จะกลายเป็นผลที่มี 3 เมล็ด 3 กลีบ ซึ่งพบมากในระกำ (ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี, 2539)

การขยายพันธุ์

การขยายพันธุ์สละ สามารถทำได้หลายวิธี ตั้งแต่เพาะเมล็ด การตัดชำลำต้น การแยกหน่อข้าง และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งแต่ละวิธีจะมีวิธีปฏิบัติ ข้อเด่นและข้อด้อยแตกต่างกันดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด

ทำได้โดยการนำเมล็ดสละมาเพาะในวัสดุเพาะเมล็ด เมื่อเมล็ดงอกและเจริญเติบโตเป็นต้นแล้วย้ายปลูกลงในแปลง เป็นวิธีที่ง่าย ประหยัด และสะดวกในทางปฏิบัติ แต่มีข้อด้อยคือ

1.1 มีการกลายพันธุ์ ต้นใหม่ที่ได้ มีลักษณะไม่ตรงกับต้นแม่ เพราะสละเป็นพืชผสมข้าม มีต้นตัวผู้และต้นตัวเมียแยกกัน

1.2 ต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ด มักจะเป็นต้นตัวผู้มากกว่าต้นตัวเมีย คือการเพาะเมล็ดสละจำนวน 100 เมล็ด มีโอกาสจะเป็นต้นตัวผู้มากกว่า 50 ต้น

1.3 ไม่สามารถจำแนกเพศของต้นใหม่ได้ จนกว่าจะออกดอกชุดแรก ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3-4 ปี

2. การขยายพันธุ์ด้วยหน่อ

ในช่วง 1 ปีของการเจริญเติบโต สละจะมีการแตกหน่อข้างออกมา 3-4 หน่อ ซึ่งถ้าปล่อยทิ้งไว้ไม่ทำลาย หรือแยกออกก็จะขึ้นเป็นต้นใหม่เคียงกับต้นเดิม หากปล่อยทิ้งไว้เช่นนี้เรื่อยๆ จะทำให้กอแน่นขึ้น และจะไม่ให้ผลผลิตเลย ต้นที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยหน่อจะมีขนาดเล็ก ไม่อวบอ้วนเหมือนต้นพันธุ์ที่ได้จากการตัดชำลำต้น เมื่อนำลงปลูกในแปลงการเจริญเติบโตในระยะแรกค่อนข้างช้าแต่มีข้อเด่น คือ ไม่ต้องทำลายต้นแม่เหมือนการขยายพันธุ์โดยวิธีการตัดชำลำต้น ทั้งยังเป็นการช่วยควบคุมไม่ให้หน่อข้างมีการเจริญเติบโตแข่งกับต้นแม่

3. การตัดชำลำต้น

ส่วนใหญ่การขยายพันธุ์สละจะใช้วิธีนี้ เพราะทำให้ต้นพันธุ์ที่ตรงตามต้นแม่ทุกประการลำต้นที่เหมาะสมจะนำมาใช้ในการขยายพันธุ์จะต้องเป็นต้นตัวเมียที่มีลักษณะดีตรงตามพันธุ์อายุประมาณ 7-10 ปี เพราะจะมีลำต้นยาว และมีจำนวนตารอบดอกมากพอที่จะใช้ในการขยายพันธุ์ให้ต้นใหม่ประมาณ 25-40 ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ได้ หน่วยงานข้าราชการและเอกชนหลายแห่ง เช่น ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และกองพฤกษศาสตร์ กรมวิชาการเกษตร และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นต้น ได้ทดลองนำชิ้นส่วนต่างๆของสละและพืชสกุลระกำชนิดอื่น เช่นราก ใบอ่อน ยอด ตา หน่ออ่อน และดัพภะ เป็นต้น มาเลี้ยงในอาหารเทียมสูตรต่างๆ แม้ว่าการขยายพันธุ์พืชสกุลระกำ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะยังไม่ประสบความสำเร็จในขณะนี้ แต่หน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องก็กำลังเร่งดำเนินการเพื่อให้ได้เทคนิค และวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์สละให้เพียงพอต่อความต้องการ (สุขวัฒน์และคณะ,2539)

(ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี, 2539) ได้จำแนกสละเป็น 3 ประเภทดังนี้

1. สละหม้อ เมื่อ 50 ปีก่อน มีการปลูกอยู่แถววัดไทร วัดดอกไม้ และวัดด่าน ริมแม่น้ำเจ้าพระยา กรุงเทพฯ จะมีทางใบเล็กกว่าระกำ ปลายใบสั้น ผลยาวกว่าระกำ ปลายผลมีจะงอย สีเปลือกเข้มและรสชาติหวานกว่าระกำ เนื้อหนา ฉ่ำน้ำ เมล็ดสีอ่อนกว่าระกำทะลายหนึ่งมีประมาณ 7-8 กระปุก ผลหนึ่งมี 2-3 กลีบ ขณะนี้มีปลูกมากในจังหวัดเพชรบูรณ์

2. สละเสน ปัจจุบันคาดว่าได้สูญพันธุ์ไปแล้ว โดยต้นขึ้นเป็นกอเช่นเดียวกับระกำแต่แตกกอมากกว่าและเจริญเติบโตเร็ว ผลมีสีแดงสด เนื้อบาง จำนวนผลต่อกระปุกมีมาก

3. สละเนินวง มีถิ่นกำเนิดที่บ้านค่ายเนินวง ต.บางกะจะ อ.เมือง จ.จันทบุรี เจ้าของบ้านชื่อ มิได้เมล็ดมาจากกรุงเทพฯ คาดว่าจะเป็นเมล็ดสละหม้อแถบถนนตก สาธุประดิษฐ์ สละเนินวงมีลำต้นทอดอยู่ใต้ดิน หรือบนผิวดิน ขึ้นเป็นกอไม่แน่นมากคล้ายระกำใบยาว และอ่อนสู่มากกว่าระกำ รูปร่างคล้ายใบระกำ ออกผลเป็นทะลาย ทะลายหนึ่งมีประมาณ 1-4 กระปุก ผลอ่อนมีสีน้ำตาลไหม้ เมื่อสุกมีสีน้ำตาลแดง ผลยาว หัวท้ายเรียวคล้ายกระสวย ส่วนมากมีกลีบเดียว หนามผลยาวอ่อนนุ่ม ปลายหนามงอนไปทางท้ายผล เมื่อดิบมีรสฝาด และเปรี้ยวเช่นเดียวกับระกำ แต่เมื่อสุกมีรสเข้มข้นกว่าระกำ เนื้อแน่นและหนา มีกลิ่นหอม สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในที่ลุ่มและที่ดอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาลักษณะและความเปลี่ยนของสิ่งมีชีวิตนั้นมีความสัมพันธ์กับโครโมโซม (อมรา,2540) เนื่องจากโครโมโซมเป็นตำแหน่งที่อยู่ของยีนซึ่งเป็นตัวควบคุมพฤติกรรมต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต ถ้าสิ่งมีชีวิตใดมีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนไปจากเดิมย่อมก่อให้เกิดผลต่างๆ ตามมา การศึกษารูปร่างและลักษณะของโครโมโซมจึงเป็นสิ่งที่สำคัญยิ่ง สิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์มีจำนวนโครโมโซมและลักษณะของโครโมโซมคงที่ สิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์โดยใช้เพศมีจำนวนโครโมโซม 2 แบบในเซลล์ต่างชนิดกัน เซลล์ร่างกายมีเป็นแบบดิพพลอยด์ (2n) และเซลล์สืบพันธุ์มีเป็นแบบแฮพลอยด์ (n) สิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศมีเพียงแบบเดียว คือ อาจเป็นดิพลอยด์ หรือแฮพลอยด์ก็ได้ขึ้นกับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ

โครโมโซม(Chorosome)ประกอบด้วย(ไพศาล,2535)กรดนิวคลีอิคพวกDNA (deoxyribonucleic acid) และโปรตีนพวกฮิสโตน (histone) และโปรตามีน (protamine) ฮิสโตนนั้นอาจพบโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไป ส่วนโปรตามีนจะพบในโครโมโซมของสัตว์จำพวกนก ในขณะที่นิวเคลียสแบ่งตัวในระยะ metaphase หรือ anaphase นั้นโครโมโซมมีขนาดใหญ่และหดสั้น และสามารถส่องเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เหตุที่โครโมโซมมีขนาดใหญ่เช่นนี้ก็เพราะว่า มีการพับไปพับมาจนเกิดเป็นเส้นสายขนาดใหญ่นั้นเอง และจากการย้อมโดยใช้สีเคมีพบว่าภายในนิวเคลียสมีร่างแหซึ่งติดทึบอยู่ทั่วไป เรียกส่วนที่เป็นร่างแหว่า โครมาทิน (chromatin) เมื่อเซลล์แบ่งตัว (อมรา,2540) ร่างแหนี้จะปรากฏเป็นเส้นใยเล็กๆ อันเกิดจากการเรียงตัวของท่อเล็กที่เรียกว่า microtubule กลายเป็นเส้นใยยาวเรียกว่า สายสปินเดิล (spimdle fiber) สายสปินเดิลจะมีปลายข้างหนึ่งยึดติดกับเซนทริโอลและปลายอีกข้างหนึ่งยึดเซนโทรเมียร์ (centromere) ของโครโมโซมสายสปินเดิลจะช่วยดึงโครโมโซมให้เคลื่อนตัวได้ในขณะมีการแบ่งเซลล์

สิ่งมีชีวิตซึ่งอยู่ใน species เดียวกัน (ไพศาล,2535) จะมีโครโมโซมเท่ากันเสมอ เช่น คนมีจำนวนโครโมโซม 2 n= 46 หนู 2n = 42 กระต่าย 2n =44 และข้าวโพด 2n = 20 เป็นต้น ในเซลล์ร่างกายมักมีโครโมโซมในสภาพ 2n คือ โครโมโซมแต่ละชนิดจะมีอยู่เป็นคู่ๆ ซึ่งอาจพูดว่ามีโครโมโซมอยู่ 2 ชุด หรือ diploid ส่วนหน่วยสืบพันธุ์ (gamete) นั้นมักจะมีโครโมโซม 1 ชุด ซึ่งเรียกว่า haploid (n) พืชหลายชนิดอาจมีโครโมโซมเกิน 2 ชุดก็ได้ คือ อาจมีโครโมโซม 3 ชุด หรือ triploid , 4ชุด (4n, tetraploid) , 5ชุด (5n, pentaploid) เป็นต้น

การทำการศึกษาโครโมโซมพบว่า (อมรา,2540) ระยะของไมโทซิสช่วงเวลาเดียวของวัฏจักรเซลล์ที่โครโมโซมมีรูปร่างเห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์ในไมโทซิส คือ ระยะแรกเรียกว่าโพรเฟส (prophase) ระยะต้นของโพรเฟสนั้นโครโมโซมปรากฏเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีขนาดยาว โดยแต่ละเส้นประกอบด้วยสายใยเป็นคู่ เรียกว่า sister chromatid ในตอนปลายระยะนี้โครโมโซมจะหดสั้นมาก แต่ละโครโมโซมจะมีรอยคอดติด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สีจาง เรียกว่า เซนโทรเมียร์ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเกาะติดของสายสปินเดิลเพื่อช่วยแยกโครโมโซมออกจากการแบ่งเซลล์ระยะ โครโมโซมจากแซนโทรเมียร์ ไปถึงปลายโครโมโซมข้างใดข้างหนึ่งเรียกว่าแขน(arm)เมื่อสิ้นสุดระยะโพรเฟสจะพบว่าผนังนิวเคลียสเกิดการสลายตัวกลายเป็นส่วนประกอบของเอนโดพลามิคเรติคูลลัม (endoplasmis reticulum) และเริ่มเข้าสู่ระยะแบ่งเซลล์เรียกว่า เมทาเฟส (metaphase) โครโมโซมหดตัวหนาขึ้น สังเกตเห็นโครโมโซม 1 แท่งประกอบด้วยโครมาทิด 2 แท่ง จากนั้นเซนโทเมียร์จะแบ่งตัวเป็นสองแล้วเคลื่อนย้ายไปอยู่คนละเซลล์ พร้อมสร้างสายใยสปินเดิล ระยะนี้มีความสำคัญมาก คือโครโมโซมจะหดสั้นสุด และเป็นระยะที่เหมาะสมอย่างยิ่งในการนำโครโมโซมมาศึกษาทางไซโตจินิติด เช่น นับจำนวน ตรวจดูรูปร่างและนำมาย้อมสีแบบต่างๆต่อมาเริ่มเคลื่อนย้ายมาอยู่ตรงกลางของเซลล์เซนโทรเมียร์ของแต่ละโครโมโซมมีการแบ่งครึ่งเพื่อทำการแยกโครมาทิด ระยะต่อมาคือ ระยะแอนาเฟส (anaphase)โครโมโซมแยกออกจากกัน และเคลื่อนย้ายไปอยู่กันคนละขั้วของเซลล์จะปรากฏโครโมโซมแยกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับจำนวนดิพลอยด์ของสปีชีส์นั้นๆ ระยะสุดท้ายของไมโทรซิส คือ เทโลเฟส โครโมโซมที่แยกไปอยู่คนละขั้วเริ่มคลายการหดตัวและขยายยาว เริ่มเห็นผนังนิวเคลียสสร้างขึ้นล้อมแต่ละกลุ่มของโครโมโซม ภายหลังเมื่อมีการแบ่งของนิวเคลียสแล้วเริ่มแบ่งไซโตพลาสซึมในเซลล์สัตว์พบว่าผนังเซลล์จะคอดตรงกลางแล้วแยกออกเป็นสองเซลล์ สำหรับเซลล์พืชจะมีการสร้างผนังเซลล์ (cell plate) มีลักษณะเป็นผนังบางกั้นตรงกลางสำหรับเซลล์ ซึ่งเวลาต่อมาจะมีสาร cellulose มาสะสมจนเปลี่ยนสภาพเป็นผนังเซลล์ที่แข็งแรง เรียกว่า cell wall เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์จะได้เซลล์แม่เริ่มต้น 1 เซลล์ แบ่งได้เป็นเซลล์ลูกได้จำนวน 2 เซลล์

ความสนใจในการศึกษาจำนวนโครโมโซม (อมรา,2540) เริ่มมีมาตั้งแต่ต้นศตวรรษที่ 20 โดยเริ่มจากการศึกษาโครโมโซมพืชและแมลง ผู้ที่สนใจคือ Muller เขาทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมโดยใช้รังสี McClintock เป็นคนแรกทำศึกษาโครโมโซมในระยะการแบ่งเซลล์ไมโอซิสของข้าวโพด จนได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ. 1983

การเตรียมโครโมโซม

การเตรียมโครโมโซมจากรากพืช (จากระยะไมโทซิส) (อมรา, 2540)

ในปลายรากพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดหรือปลูกพืช รากที่นำมาใช้ต้องสดและมีสุขภาพดีเพื่อให้ได้เซลล์ที่มีอัตราการแบ่งมากๆ นิยมใช้รากชนิดรากแขนง (lateral root) ลักษณะรากที่ดีมีความเปราะโปร่งแสงและมีสีขาวส่วน tip หรือ ปลายรากมีสีขาวอมครีม ถ้าไม่สามารถหารากได้ อาจใช้เนื้อเยื่ออื่นๆ ที่เป็น meristemmatic tissuse เช่น จากใบอ่อน หรือส่วนของดอก เช่น ผนังรังไข่ และเมล็ดอ่อน ซึ่งใช้วิธีเตรียมเช่นเดียวกับราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pretreatement ล้างรากพืชให้สะอาด ตัดรากให้ตามยาวจากปลายรากขึ้นมาประมาณ 1 ซม. แช่ในสารละลาย Pretreatement เพื่อให้เซลล์หยุดการแบ่งไมโทซิสที่ระยะเมทาเฟส (โดยใช้สารละลาย colchicine ตามหัวข้อ 2) เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหรือเก็บไว้ในที่เย็นอุณหภูมิต่ำกว่า 18 องศาเซลเซียส ภาชนะที่ใช้ต้องสะอาดปราศจากสารเคมีหรือผงซักฟอง ระหว่างแช่ควรเขย่าภาชนะเพื่อให้อากาศแทรกในน้ำยา (ในกรณีที่มีรากจำนวนมากอาจใช้เครื่องปั๊มอากาศที่ใช้กับตู้ปลาก็ได้) เมื่อสิ้นสุดเวลานำรากออกมาแช่ในน้ำยา fixative ต่อไป

Fixation เลือกรากที่มีลักษณะที่ดี (โปร่งใส และ tip มีสีขาวขุ่น) แช่ในน้ำยา Fixation นานอย่างน้อย 15 นาที ถ้าต้องการเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนนำมาศึกษาโครโมโซม ให้เปลี่ยนแปลงเป็นแช่ปลายรากจาก Fixative มาเป็น ethanol 70% และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะศึกษาต่อไป

Maceration (การทำให้เซลล์นิ่ม) วางปลายรากบนแผ่นสไลด์แล้วหยด 1 M HCl เป็นเวลา 5 นาที (ควรทำที่อุณหภูมิ 60°C) แล้วล้างรากด้วยน้ำสะอาด ถ้าทำรากจำนวนมาก อาจแช่ในน้ำที่ใส่ในหลอดแก้วแล้วปิดปากหลอดด้วยผ้าขาวบาง ปล่อยให้น้ำผ่านเข้าออกและสามารถเก็บรากไว้ในน้ำนาน 1-2 วัน นำรากขึ้นจากน้ำเพื่อศึกษาขั้นต่อไป

Cell suspension นำรากขึ้นจากน้ำ วางปลายรากบนแผ่นสไลด์ซับน้ำส่วนเกินออก ย้อมด้วยสี acetocarmine จำนวน 1 หยด ใช้มีดตัดเอาส่วนของหมวกราก ขยี้รากให้แบนด้วยเข็มเขี่ยปลายแบน ผ่านสไลด์ไปบนเปลวไฟ (ใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์) ปิดด้วย coverslip ย้อมสีนานประมาณ 5-10 นาที ทำ squash technique ตรวจดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำสไลด์ให้เซลล์คงอยู่ชั่วคราวโดยปิดขอบ coverslip ด้วยน้ำยาทาเล็บหรือพาราฟีน ที่หลอมแล้ว

การเตรียมสารเคมีในการศึกษาโครโมโซม

Pretreatement

การทำ Pretreatement กับรากพืชเพื่อที่จะทำให้เซลล์หยุดการแบ่งเซลล์ไมโทซีสในระยะเมทาเฟส สารที่ใช้ทำ Pretreatement มีหลายชนิดมีผลต่อเซลล์เหมือนกันคือ ทำให้ spindle fiber ของเซลล์ไม่สามารถสร้างขึ้นมาได้ สารที่ใช้ทำ Pretreatement มีดังนี้

1. Colchicine ใช้ความเข้มข้น 0.2 % W/V ในน้ำ แช่ปลายรากนานประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นจึง fix รากในน้ำยา fixative

2. 8-hydroxyquinoline เตรียมที่ความเข้มข้น 0.002 M ในน้ำ เพื่อให้ละลายน้ำดีใช้วิธีอุ่นใน 60°C เป็นเวลานาน 10-12 นาที บางครั้งอาจนานถึง 1 ชั่วโมงจึงจะละลายหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Paradichlorobenzine เตรียมจาก 5-10 กรัม. Paradichlorobenzine ในน้ำกลั่น 500 มล. ใส่สารละลายนี้ไว้ในขวดที่ปิดจุก และเก็บไว้ในตู้อบ 60°C นานตลอด 1 คืน จึงนำมาใช้ การแช่รากอาจแช่อยู่นาน 15 นาที-4 ชั่วโมง จากนั้นจึง fix ราก

Fixative soloution หรือ Killing solution

น้ำยาที่เป็น fixing หรือ killing นี้ใช้เพื่อทำให้เซลล์พืชคงสภาพเดิม เหมือนเช่นการดองสัตว์ให้คงสภาพไม่เน่าเปื่อย น้ำยาประเภทนี้จำต้องเตรียมใหม่ๆ แล้วใช้ทันที โดยมีสูตรต่างๆ 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

Stain (สีย้อม)

ในการศึกษาโครโมโซมพืชทั้งจากเซลล์ปลายรากและเซลล์ microsporocyte นั้นนิยมใช้สี acetocarmine และโดยเฉพาะมีส่วนของสนิมเหล็กปนอยู่ด้วยแล้วมีผลทำให้โครโมโซมติดสีดีขึ้น อาจเรียกเทคนิคนี้ว่า iron – acetocarmine นอกจากนี้ยังมีสีประเภทอื่นๆ ที่ใช้ย้อมเซลล์พืช มีดังนี้

1. acetocarmine

อุ่น 45 % acetic acid ที่ร้อนละลายสี carmine ลงไปโดยใช้อัตราส่วน 1 กรัม carmine ในกรด acietic 200 มล. ต้มเดือดนาน 1-2 นาที จนกระทั่งสีแดงของ carmine เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มขึ้น จากนั้นปล่อยให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง อาจใช้วิธีต้มเดือดให้ระเหยเห็นไอแล้วกลั่นเป็นหยดน้ำใน reflux condenser นาน 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นแล้วกรอง เก็บสารละลายนี้ในที่เย็นและมืด

2. สี Lacto-propionic orcine

ใช้สี Lacto-propionic orcine แทน acetocarmine วิธีเตรียม โดยใช้ 1 กรัมของ orcine + ส่วนผสมของ lactic acid 50 มล. และ propionic acid 50 มล. ทำที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้ผง orcine ละลายใช้เวลาตลอดคืนแล้วกรอง เตรียม working solution : เจือจาง stock solution ให้ได้ 45%-60 %ของ stock solution ในน้ำแล้วกรอง เก็บสีในที่เย็นและมืด สามารถใช้ได้เป็นเวลานานหลายเดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเตรียมสี aceto- orcine

อุ่น glacial acetic acid แล้วละลายสี orcine ลงไป 2.2 กรัม ใน glacial acetic acid 100 มล. จากนั้นปล่อยให้สีเย็นแล้วเก็บเป็น stock solution ก่อนจะใช้ต้องทำกรดให้เจือจางเป็น 45 % ในน้ำกรอง และนิยมใช้สีนี้ย้อมเซลล์สัตว์

4. การเตรียมสี alcoholic-hydrochloric-acid carmine

alcoholic - hydrochloric – acid carmine ย้อมเซลล์พืชโดยจะให้ความแตกต่างระหว่างไซโตพลาสซึมและโครโมโซมได้ชัดเจน วิธีเตรียมทำโดย ผสมกรด HCl (เข้มข้น 1 มล.)ในน้ำกลั่น 15 มล. แล้วใช้ 4 กรัมของ carmine ละลายลงในน้ำกรดนี้ จากนั้นนำสารละลายสีและกรดนี้ตั้งไฟให้ร้อนจนเดือดเบาๆ นาน 10 นาที ปล่อยให้เย็นจึงเติม 95 มล. ของ 85% แอลกอฮอล์ลงไป กรองสีก่อนใช้

5. การย้อมโดย Feulgen technique

Feulgen reaction เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ชี้ให้เห็นว่าส่วนใดเป็น DNA และส่วนใดไม่ใช่ DNA เทคนิคนี้ทำให้เฉพาะส่วนของโครโมโซมติดสี แต่ cytoplasm และ nucleolus จะไม่ติดสี วิธีการเตรียมคือ เทน้ำกลั่น ที่เดือดแล้วปริมาตร 200 มล. ลงในสี basic fuchsin จำนวน 1 กรัม แล้วเขย่าภาชนะที่ใส่สารละลายสีนี้นาน 5 นาที ทำให้เย็นจนถึง 50° C แล้วกรองใส่ไว้ในขวดที่แสงผ่านไม่ได้หรือขวดฝาปิดสีชา เติม 30 มล. ของกรด HCl ลงไป จากนั้นเติม 3 กรัม ของ sodiumหรือ potassium metabisulphite เก็บสีไว้ในที่เย็นและมืด ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่าสีเก่าเกินไปไม่มีผลต่อการย้อมต้องเตรียมใหม่

วิธีการย้อมสีเซลล์ Feulgen technique นำปลายรากที่ fix ไว้เรียบร้อยแล้วมาแช่ใน 10% HCl ที่เย็นคอยจนกว่ารากจะจม จึงย้ายมาแช่ใน 10 % HCl ที่ 60° C ปล่อยให้ hydrolyze นาน 25 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แช่ปลายรากใน Feulgen solution นาน 20-30 นาที แล้วใช้วิธี squash technique

ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของโครโมโซมและมีบทบาทต่อการศึกษาทางพันธุศาสตร์ของเซลล์(นิตย์ศรี, 2541)

1.โคลซิซีน (colchicine) เป็นสารแอลคาลอยด์ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการแบ่งเซลล์โดยยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ซึ่งทำหน้าที่ดึงเซนโทรเมียร์ไปยังขั้วของเซลล์ โครโมโซมจึงหยุดอยู่ที่ระยะเมทาเฟสซึ่งเป็นระยะที่โครโมโซมหดสั้นสุด แต่ไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งของโครโมโซม จึงเป็นสารที่นิยมทำหน้าที่เป็น pretreat ในการศึกษาโครโมโซม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.สารเคมีที่ใช้ในการทำ pretreatment อีกประเภทหนึ่ง ที่ทำให้โครโมโซมหดตัว แช่ตัวอย่างพืช เช่น ราก ในสาร pretreat กลุ่มนี้ได้แก่ α -bromonapthalene, 8-hydroxyquinoline มีผลคล้ายโคซิซิน

3.การลดปริมาณของสารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โครมาทินอาจจะมีผลต่อขนาดของโครโมโซม เซลล์ที่ได้จากการแบ่งตัวค่อนข้างถี่จะมีโครโมโซมขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่มีระยะอินเตอร์เฟสค่อนข้างยาว

4.สารอาหารต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ มีผลต่อขนาดโครโมโซมด้วย เช่น ฟอสเฟตที่ความเข้มข้นสูงๆ จะทำให้โครโมโซมมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมที่เลี้ยงในน้ำหรือมีฟอสเฟตน้อย

5.อุณหภูมิ มีผลต่อขนาดโครโมโซมเช่นกัน เซลล์ที่มีการแบ่งตัวในที่มีอุณหภูมิต่ำๆ จะมีขนาดสั้น และมีการหดตัวของโครโมโซมมากกว่าเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในที่มีอุณหภูมิสูงๆ

ในการเตรียมสไลด์เพื่อการศึกษารูปร่างและจำนวนโครโมโซม จำเป็นต้องทำให้โครโมโซมมีขนาดสั้นและมีการกระจายของโครโมโซม โดยทั่วไปนิยมใช้สารเคมีในการทำ pretreatment ร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิต่ำๆ ด้วย จะช่วยลดระยะเวลาที่ต้องแช่สารเคมีสั้นลง

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประวัติ(2526)ได้ทำการศึกษาโครโมโซมจากปลายรากกล้วยทั้งกล้วยป่าและกล้วยปลูกจำนวน 30 เชื้อพันธุ์ โดยวิธี squash พบว่ากล้วยป่าเบอร์ 1 กล้วยป่าเบอร์ 3 กล้วยอ่างขาง กล้วยแข้ กล้วยไข่ กล้วยตานี กล้วยไข่โบราณ กล้วยทองขี้แมว กล้วยป่าเบอร์ 22 กล้วยไลและกล้วยหมาก มีโครโมโซม 2n = 22 กล้วยคร้าว กล้วยนิ้วมือนาง กล้วยน้ำกาบดำ กล้วยกุ้งเขียว กล้วยน้ำ กล้วยตีบ กล้วยเล็บช้างกุ กล้วยตีบคำ กล้วยขมเบา กล้วยขมหนัก กล้วยนำหว้าเหลือง กล้วยกุ้ง กล้วยคลองจัง กล้วยคลองจัง กล้วยพม่าแหกคุก กล้วยนางกลาย กล้วยหอมเตี้ย กล้วยน้ำว้าค่อมและไข่บอง มีโครโมโซม 2n = 33 กล้วยเทพรส มีโครโมโซม 2n = 44

วาสนา(2527)จากการศึกษาลักษณะภายนอกและภายใน การเจริญเติบโต จำนวนโครโมโซมและลักษณะเรณูของพืชในสกุลบัวหลวง และผลจากการศึกษาจำนวนโครโมโซมพบว่า โครโมโซมของบัวหลวง 6 พันธุ์คือ บุณฑริก ปทุม สัตตบุษย์ สัตตบงกช ปักกิ่งขาว และปักกิ่งชมพู มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n = 16

อุษณีย์(2531) ศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของดอก และจำนวนโครโมโซมของกีวีฟรุต 6 พันธุ์ ประกอบด้วยเพศผู้ 2 พันธุ์คือ Tomuri และ Matua เพศเมีย 4 พันธุ์ คือ Brouno, Abbott, Monty และ Hayward ที่ปลูก ณ สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง อ.ฝาง จ. เชียงใหม่ โครโมโซมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กีวีฟรุตที่ทำการศึกษาพบว่า กีวีฟรุตทั้ง 6 พันธุ์ มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือประมาณ 2n = 166 โดยมีขนาดเล็กมาก จนไม่สามารถจำแนกความแตกต่างทางสันฐานวิทยาออกจากกันได้

ดิเรก(2537) ผลของจำนวนโครโมโซมต่อลักษณะทางสัณฐานของเยอบีร่า พันธุ์ขาวใบจักร เทอร์รานีวาลิส เทอร์รามอนซา และเทอร์ราพาเรด ในอาหาร MS ปรากฏว่าต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีโคลซิซินผสมอยู่ 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5 วัน ทำให้เยอบีร่ามีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัว คือ 2n =4n = 100 ต้นเยอบีร่าที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นจะมีใบหนา สีเขียวเข้ม และขนาดของปากใบใหญ่กว่าปกติ แต่เจริญเติบโตไม่ค่อยดี แตกหน่อน้อย ดอกมีสีเขียวเข้ม กลีบดอกกว้างและยาวกว่าปกติ

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

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

ผ่องพรรณและคณะ(2538) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของมะตูมโดยการย้อมสีออร์ซีน (orcine) เก็บรากตัวอย่างเมื่อเวลา 10.30 น. สังเกตกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 2n=14 รูปร่างโครโมโซมเป็นแบบ เมทาเซนตริก (metacentric chromosome) คือ มีเซนโทเมียร์อยู่บริเวณกึ่งกลางทำให้แขนของโครโมโซมสองข้างมีความเท่ากัน

สาริณี(2537)ได้ทำการทดลองนับโครโมโซมรากของต้นกล้วยไม้สกุลหวาย *Dendrobium superbiens* ดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์ ต้นละ 10 เซลล์ หยุดวงชีพเซลล์ด้วย 1-bromonathlene นาน 5-6 ชั่วโมง แช่ด้วย hydrolyse ในกรดเกลือ 1N นาน 10 นาที ย้อมด้วยสี aceto orcein พบว่าดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 38 และออลโลเตตราพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 76

อัมพิกา(2527)ได้ศึกษาโครโมโซมของท้อ 9 พันธุ์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์เท่ากับ 16 โครโมโซมมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาแต่ละพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

สุณิสา และคณะ(2543) จากการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของโครโมโซมข้าว 5 พันธุ์ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มข้าวขาว (ข้าวเหนียวสันป่าตองและหอมมะลิ 105) กับกลุ่ม ข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหนียวดำ (ดำดอยสะเก็ด , CMUcol.2 และ CMUcol.3)พบว่าข้าวทั้ง 5 พันธุ์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n=24 แต่มีขนาดและชนิดของโครโมโซมเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธุ์ โดยมีวิธีการศึกษาโดยการหยุดวงชีพของเซลล์รากด้วย para-dicrorobezene ล้างด้วยน้ำกลั่นนำรากแช่ไว้ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์(ethnyl alcohol 95% และ acetic acid เข้มข้น ในอัตรา 3:1) 5นาที แยกเซลล์ออกจากกันแช่รากในกรดไฮโดรลิก 1N ที่ 60° นาน 10 นาที และย้อมด้วยสี carbol funchsin นาน 5 ชั่วโมง

ปกขวัญและคณะ(2530)ได้ทำการศึกษาโครโมโซมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชในสกุล *Ocimum* 3 ชนิด คือ แมงลักไทย (*Ocimum americanum* Linn. Syn.), O.*americanum* Linn. และ *O.canum* ims จากอินโดนีเซียพบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=64, 2n=72 และ2n=66 ตามลำดับ

Grant,W.F.(1995)ได้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมของ Lotus จากจำนวน 108 species และ 38 varieties โดยเจาะลึกเป็นรายงานว่า 5 species ได้แก่ *Lotus.hamatus*, L.*haydonii*, L.*hinoniorum*, L.*mearnsii* และ L.*utahensis* โดยทั้งหมดมีโครโมโซมเท่ากันคือ 2n=14 และอีก 6 varieties ได้แก่ L.*argophyllus* var. argenteus, L.*dendroideus* var. traskiae, 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สละพันธุ์เนินวง จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ(ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 ต้นสละพันธุ์เนินวง(*Salacca* sp.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม

- 8-hydroxyquine เข้มข้น 0.002 M
- Alcohol 95%
- glaical acetic acid
- สี carmine
- น้ำกลั่น

3. กล้องจุลทรรศน์(microscope)ยี่ห้อ Olympus รุ่น BH-2 (สไลด์, กระจกปิดสไลด์, oil immertion และกระดาษเช็ดเลนส์)

4. อุปกรณ์ถ่ายภาพ

วิธีการ

1. การเตรียมน้ำยาสำหรับตรวจนับโครโมโซม

1.1 pretreatment เตรียมโดยชั่งสาร 8-hydroxyquine เข้มข้น 0.002 M (0.145 กรัม ละลายน้ำ 500 มิลลิลิตร) เพื่อให้ละลายน้ำได้ดีขึ้นใช้วิธีอุ่นที่ 60°C เป็นเวลานาน 10-15 นาที บางครั้งอาจต้องใช้เวลานานถึง 1 ชั่วโมงจึงละลายหมด

1.2 fixation and storage โดยใช้ alcohol 95% และ glacial acitic acid ในอัตราส่วน 3:1

1.3 สีย้อม acetocarmine

- carmine	1 กรัม
- glacical acitic acid	50 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	50 มิลลิลิตร

วิธีการทำโดยใช้ glacical acitic acid 50 มิลลิลิตร ตั้งไฟให้เดือดใส่สี carmine 1 กรัม ลงไปคนช้าๆ อย่าตั้งไฟนานเพราะจะทำให้ระเหยได้ ยกลงจากเตาแล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จนอุณหภูมิลดลง 50°C เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วกรองใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็น (ศิริศักดิ์,2542) ขณะต้มถ้าใช้เหล็กสนิมลงไปแกว่งหรือหยด ferric acetic 1-2 หยด จะทำให้สีเข้มขึ้น ติดโครโมโซมได้ชัดเจนขึ้น สีที่เก็บไว้นานจะมีตะกอนควรกรองบ่อยๆ ก่อนใช้

2.การเตรียมรากสละพันธุ์เนินวงสำหรับตรวจนับโครโมโซม

ตัดปลายรากสละพันธุ์เนินวง ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ เลือกรากมีสีขาวลักษณะแข็งแรง สมบูรณ์ มีขนาดความยาวประมาณ 0.5-1 ซม. ตั้งแต่ช่วงเวลา 8.00-11.00 น. ทำการ pretreatment โดยนำส่วนของปลายรากที่ตัดไว้แช่ใน 8-hydroxyquine เข้มข้น 0.002 M ที่เตรียมไว้ เก็บที่ในอุณหภูมิ 10-14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เพื่อหยุดวงชีพเซลล์ จากนั้นนำปลายรากไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

แช่ต่อในน้ำยา fixation and storage เป็นการรักษาสภาพเซลล์นานประมาณ 5-10 นาที แล้วไปแช่ใน 1M HCl ที่อุณหภูมิ 60°C เวลา 5 นาที จะทำให้เซลล์นิ่มผนังเซลล์อ่อนตัว จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดโดยใช้ผ้าขาวบางปิดปากขวดแล้วให้น้ำไหลผ่านเข้าและออก รากที่ดีจะมีสีขาวใส เก็บรากแช่ไว้ในน้ำเพื่อทำการศึกษาต่อไป

3. การตรวจนับโครโมโซม

นำปลายรากที่ได้จากข้อ 2 ตัดส่วนเฉพาะที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ (apical meristem) ประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตรจากปลายรากเข้ามา หยดสี acetocarmine 2-3 หยด ใช้เข็มปลายแบนเขี่ยให้เซลล์กระจาย ทิ้งไว้ 10-15 นาที ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ใช้กระดาษซับสีส่วนเกินนำไปลนไฟอ่อนๆ เพื่อให้ติดสีดีขึ้น จากนั้นใช้ปลายดินสอเคาะเบาๆ หรือใช้วิธี squash technique จะทำให้เซลล์กระจายไปทั่วนำสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสชัดเจนในระยะเมทาเฟส ถ่ายภาพพร้อมบันทึกผลการทดลอง

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มทำการทดลอง เดือนพฤศจิกายน 2543
สิ้นสุดการทดลอง เดือนพฤษภาคม 2544

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

41659

ผลการทดลอง

จากการทดลองศึกษาจำนวนโครโมโซมของสละเนินวง จากปลายรากโดยเลือกรากที่มีลักษณะขาวใสเมื่อย้อมสี acetocarmine แล้วบริเวณปลายรากที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญจะติดสีเข้มสุด เวลาที่เหมาะสมในการศึกษาจำนวนโครโมโซมคือ เวลาประมาณ 8.00-9.00 น. และเมื่อนำปลายรากแช่ในเวลาใน acetocarmine 2-3 ชั่วโมงโครโมโซมจะติดสีดีขึ้นแล้วใช้วิธี squash technique เพื่อให้เซลล์กระจายตัวไม่ซ้อนทับกันง่ายต่อการตรวจนับ

ในการศึกษาจำนวนโครโมโซม ทำการทดลองโดยการตัดปลายรากของสละพันธุ์เนินวง เป็นจำนวน 3 ราก ต่อ 1 ต้นทั้งหมด 10 ต้นและในแต่ละรากจะพบเซลล์ระยะเมทาเฟสทั้งหมด 10 เซลล์เพื่อใช้ยืนยันผลการทดลองได้จำนวนทั้งหมด 300 เซลล์ หลังจากนั้นทำการบันทึกภาพโครโมโซมภายใต้ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ผลของการตรวจนับโครโมโซมปลายรากของสละพันธุ์เนินวงนั้นพบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากันทั้งหมดคือ2n=32 (ตารางที่ 1) ขนาดของโครโมโซมมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 2) โครโมโซมมีขนาดเล็กทำให้ไม่ชัดเจนในการตรวจนับเมื่อเลนส์รวมแสง (condenser) อยู่ที่ตำแหน่ง 0 (ภาพที่ 3A.) จึงเปลี่ยนตำแหน่งเลนส์รวมแสง (condenser) อยู่ที่ตำแหน่ง 100 เพื่อช่วยในการตรวจนับโครโมโซม (ภาพที่ 3B.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

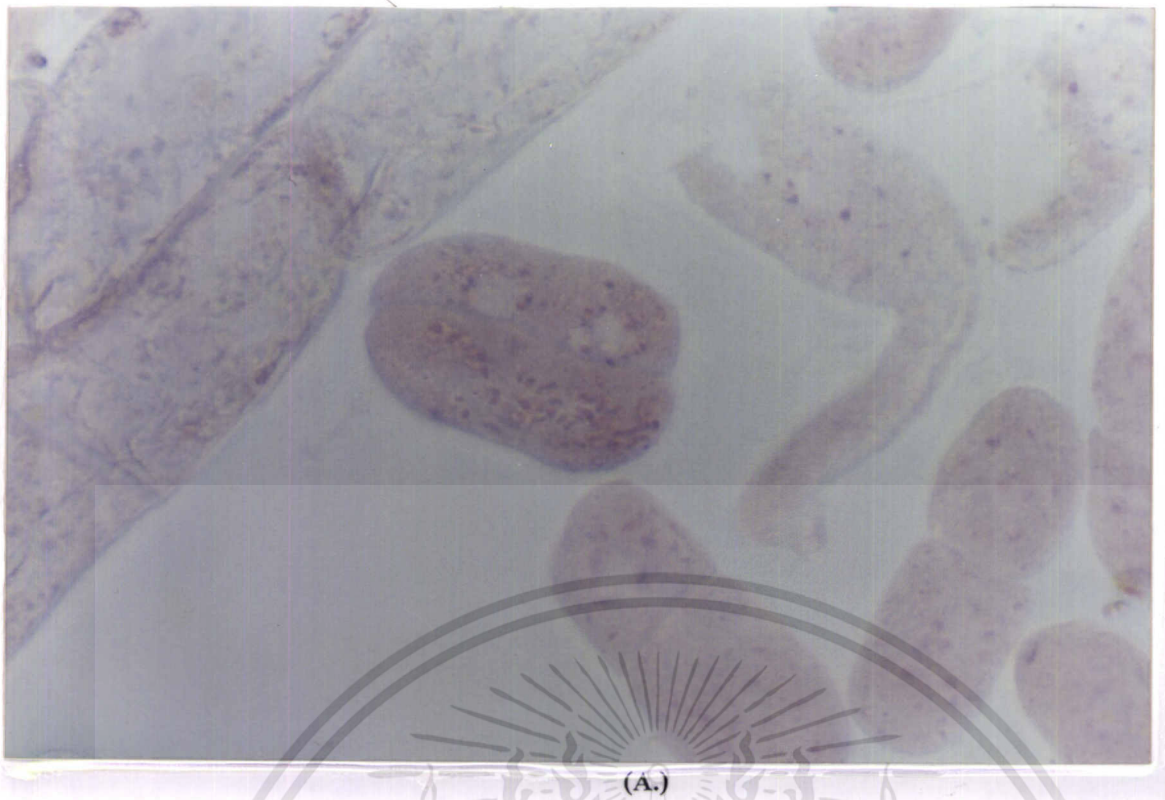
ตารางบันทึกผลที่ 1 การนับจำนวนโครโมโซมปลายรากของสละพันธุ์เนินวง

ต้นที่	เวลา	รากที่	จำนวนโครโมโซมที่นับได้ (2n)
1	8.00-9.00 น.	1,2,3	32,32,32,32,32,32,32,32,32,32
2	8.00-9.00 น.	1,2,3	32,32,32,32,32,32,32,32,32,32
3	8.00-9.00 น.	1,2,3	32,32,32,32,32,32,32,32,32,32
4	8.00-9.00 น.	1,2,3	32,32,32,32,32,32,32,32,32,32
5	8.00-9.00 น.	1,2,3	32,32,32,32,32,32,32,32,32,32
6	8.00-9.00 น.	1,2,3	32,32,32,32,32,32,32,32,32,32
7	8.00-9.00 น.	1,2,3	32,32,32,32,32,32,32,32,32,32
8	8.00-9.00 น.	1,2,3	32,32,32,32,32,32,32,32,32,32
9	8.00-9.00 น.	1,2,3	32,32,32,32,32,32,32,32,32,32
10	8.00-9.00 น.	1,2,3	32,32,32,32,32,32,32,32,32,32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2 แสดงจำนวนโครโมโซมของ *Salacca* sp. 2n=32 ถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(A.)

(B.)

ภาพที่ 3 A.แสดงลักษณะโครโมโซมของ *Salacca* sp. เมื่อเลนส์รวมแสง (condenser) อยู่ที่ตำแหน่ง 0 B. แสดงลักษณะโครโมโซมของ *Salacca* sp. เมื่อเลนส์รวมแสง (condenser) อยู่ที่ตำแหน่ง 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากที่ทำการศึกษาโครโมโซมโดยการคัดเลือกเวลาตั้งแต่ 8.00-11.00 น. เวลาที่ดีที่สุดในการศึกษานับจำนวนโครโมโซมคือ 8.00-9.00 น. เมื่อใช้เข็มเขี่ยปลายรากให้กระจายและลองทำการย้อมสี acetocarmine เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงจะช่วยให้โครโมโซมติดสีได้ดีและเห็นชัดกว่าย้อมในเวลาสั้น จากนั้นใช้ปลายดินสอเคาะเบาๆ บนกระจกปิดสไลด์มีผลทำให้เซลล์กระจายทั่วแผ่นง่ายต่อการศึกษา และบางครั้งเมื่อใช้วิธี suqash technique ผู้ทำการทดลองอาจยังไม่มีความชำนาญใช้นิ้วกดแรงเกินไปทำให้เซลล์แตกจึงต้องระวังเรื่องน้ำหนักมือ และภาพถ่ายที่ได้พบว่าโครโมโซมมีขนาดเล็กติดสีชัดเจน แต่มีบางแท่งของโครโมโซมที่ซ้อนทับกันจึงต้องอาศัยเทคนิคในการปรับโฟกัสของกล้องจุลทรรศน์เพื่อช่วยในการนับโดยใช้แสงประมาณ 5-7 เนื่องจากถ้าใช้แสงต่ำหรือสูงกว่านี้จะทำให้เห็นโครโมโซมไม่ชัดเจน และในการเตรียมสไลด์ต้องไล่ฟองอากาศออกให้หมดก่อนทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

ในการทดลองนับจำนวนโครโมโซมปลายรากสละ รากที่มีใช้ต้องมีสุขภาพดีสดมีสีขาว ตัดปลายรากยาวประมาณ 1 ซม. แช่ในน้ำยา 8 – hydroxyquinoline 0.002 M เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อหยุดวงชีพ จากนั้นนำไป fixative (alcohol 95 % + acetic acid ; 3:1) เป็นเวลา 5 นาที แช่ต่อใน 1M HCl 10 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เซลล์รากจะนิ่มขึ้น แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด ถ้าจะนำมาศึกษานำรากขึ้นมาจากน้ำ วางปลายรากบนแผ่นสไลด์ตัดบริเวณปลายราก 0.3-0.5 ซม. ย้อมด้วยสี acetocarmine 2-3 หยด หรือแช่รากในสีย้อมเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง โครโมโซมจะติดสีดีขึ้น ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์และเคาะเบาๆ ด้วยปลายดินสอหรือใช้วิธี squash technique ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า สละมีโครโมโซมเท่ากับ 2n=32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ณรงค์ โฉมเฉลา .2537. **การขยายพันธุ์สลักด้วยการตอน.** เคหเกษตร 18(1) :77-80

ชมพู กิมศรี .2540. การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของดอก การผสมเกสร และการติดผลของสละเนินวง (Salacca sp.) .วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

ดิเรก ตนพยอม. 2537. **ผลของจำนวนชุดโครโมโซมต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของเยอบีร่า** . วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2541. **พันธุศาสตร์พืช.** ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

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

ประวัติ สมเป็น. 2526. **โครโมโซมของปลายรากกล้วย** .วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เปรมปรี ณ. สงขลา .2530. **กรณีศึกษาสละที่ค่ายเนินวงจันทบุรี.** เคหการเกษตร 11 (128): 8-12.

ผ่องพรรณ จรัสจินดารัตน์ ,วีรินทร์ อันทะแขกและอดุมลักษณ์ นิลศิริ . 2538. **งานวิจัยเรื่องจำนวนโครโมโซมมะตูม.** วิทยาลัยเกษตรมหาสารคาม.

พีรเดช ทองอำไพ .2529. **ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย.** หจก. ไดนามิคการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 196 น.

ไพโรจน์ ผลประสิทธ์ .2536. **จากระกำฉึงกำละ.** กสิกร 66(5) : 553-557.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2536. **พันธุศาสตร์.** ไทยวัฒนาพาณิช, กรุงเทพฯ.

รมย์ริญ ปียารมย์ .2537. **การเพิ่มการติดผลของสละเนินวงโดยการผสมเกสรและการใช้จิบเบอเรลิค แอซิค. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วาสนา มิตรานนท์. 2527. **การศึกษาลักษณะของพฤกษาศาสตร์ของสกุลบัวหลวง(*Nelumbo* Adans.)ในประเทศไทย** .วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2536. **พันธุศาสตร์.** เจ้าพระยาการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ศิริพร หาญนันทวิวัฒน์ และฉันทนา สุวรรณธาดา. 2540. " การศึกษาโครโมโซมว่านมหาลาภ ".

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วารสารเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร. 2542. **ผลของรังสีต่อการกลายพันธุ์ของบัวหลวงพันธุ์สัตตบุษย์ในสภาพปลอดเชื้อ** . วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน , สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี. 2539. **เอกสารวิชาการเรื่องพืชสกุลระกำ**. สถาบันวิจัยพืชสวน. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 19 น.

สาริณี ไชยเจริญ. 2537. **การศึกษาจำนวนโครโมโซม ลักษณะดอกและความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย** วารสารเกษตร(วิทย) 29: 150-157 , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุขวัฒน์ จันทรปรรณิก, อัมพิกา ปุนนจิต, ศิริพร วรกุลดำรงชัย และ เสริมสุข สลักเพ็ชร. 2539. **สาระของสะละ**. กรุงเทพฯ: เจริญรัฐการพิมพ์.

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

เสริมสุข สลักเพ็ชร์ และ ไพโรจน์ ผลประสิทธิ์ .2533. **ดอกของไม้สกุลระกำ**. กสิกร 63 (1) : 56-59.

อมรา คัมภิวานนท์. 2540. **พันธุศาสตร์ของเซลล์**. เท็กซ์แอนเจอร์นัลพับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ

อัมพิกา ปุนนจิต. 2527. **ชีววิทยาของดอกและจำนวนโครโมโซมของท้อเก้าพันธุ์**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุษณีย์ ปักษาศร.2531. **การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของดอกและจำนวนโครโมโซมของกีวีฟรุต** . วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Grant-WF. 1995. "A chromosome atlas and interspecific- intergenic index for Lotus and tetragonolobus(Fabaceae)". **Journal of Botany** .

Hambali, G.G., J.P. Mogea and M. Yatazawa. 1989. ***Salcca* germ for potential economic use**, p. 260. *In* J.S. Siemonsma and N. Wulijarni-Soetjipto (eds.). Plant Resources of South-East Asia. Proceeding of the First PROSEA International Symposium May 22-25, Jakata, Indonesia,Pudoc Wageningen.

Polprasid, P. and S. Salkphetch. 1989. **Improvement of *Salacca* spp., in Thailand**, pp. 296-297. *In* J.S. Siemonsma and N. Wulijarni-Soetjipto (eds.). Plant Resources of South-East Asia. Proceeding of the First PROSEA International Symposium May 22-25, Jakata, Indonesia,Pudoc Wageningen.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้