

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

การศึกษาโครโมโซมของเงินไหลมา (*Syngonium podophyllum*)

*Syngonium* (*Syngonium podophyllum*) Chromosome Investigation

โดย

นายเอกชัย

ตุ้มทอง

ได้รับความเห็นชอบจาก

.....

(อาจารย์ กัญญา แซ่เตียว)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.สมภพ จิตะวัตน์)

หัวหน้าภาควิชาพืชสวน

วันที่ 10 เดือน ..... พ.ศ. ....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาโครโมโซมของเงินไหลมา (*Syngonium podophyllum*)

*Syngonium (Syngonium podophyllum)* Chromosome Investigation



รฟ.

ดษ๗๓ก

2543

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 41718

วัน, เดือน, ปี..... 27 ก.พ. 2545

เสนอ

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

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง	การศึกษาโครโมโซมของเงินไหลมา ( <i>Syngonium podophyllum</i> ) Syngonium ( <i>Syngonium podophyllum</i> ) Chromosome Investigation
โดย	นายเอกชัย ตุ่มทอง
ภาควิชา	พืชสวน
สาขาวิชา	พืชสวน
คณะ	เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ กัญจนว แซ่เตียว

### บทคัดย่อ

การศึกษาโครโมโซมของเงินไหลมาจากเซลล์ปลายราก โดยเก็บตัวอย่างราก หูดวงชีพ เซลล์ใน 0.002M 8-hydroxyquinoline นาน 4 – 6 ชั่วโมง รักษาสภาพเซลล์ในน้ำยา Fixative ( alcohol 95% : acetic acid ; 3:1 ) นาน 5 นาที จากนั้นแช่ต่อในสารละลาย HCl นาน 5 นาที ที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วย้อมด้วยสี acetocarmine นาน 12 ชั่วโมง พบว่า เวลาที่เห็น โครโมโซมชัดเจนที่สุดคือ 9.00-10.00 น. และเงินไหลมามีจำนวนโครโมโซม  $2n = 24$

**Title** Syngonium(*Syngonium podophyllum*) Chromosome Investigation  
**By** Mr.Eakkachai Tumthong  
**Major** Horticulture  
**Department** Horticulture  
**Faculty** Agricultural Technology  
**Advisor** Miss Kanjana Saetiew

### ABSTRACT

Somatic chromosome investigation of *Syngonium podophyllum* from root tip. Root tip samples were taken at 9.00– 10.00 a.m . The tissues were pretreated in 0.002M 8-hydroxyquinoline for 4 – 6 hours . Transfer the tissues kept in Fixative ( alcohol 95% : acetic acid ;3:1 ) for 5 minutes and prior to maceration in HCl solution at 60 °C for 5 minutes. The tissues were then stained in acetocarmine for 12 hours . The result showed the chromosome number of  $2n = 24$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำนิยม

ปัญหาพิเศษเล่มนี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้ เพราะข้าพเจ้าได้รับกำลังใจและความช่วยเหลือเอื้อเฟื้อมากมายจากบุคคลหลายท่าน ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ กัญจนา แซ่เตียว ผู้ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและกรุณาให้คำแนะนำ ช่วยแก้ไขและชี้แนะแนวทางที่ถูก ติดตามความก้าวหน้า และเอาใจใส่ตลอดเวลา และที่สำคัญ คือ กำลังใจที่อาจารย์มีให้ตลอดมาในการแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การศึกษาศึกษาและสถานที่ปฏิบัติงาน

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยให้กำลังใจ และเป็นแรงสนับสนุนตลอดเวลา พี่ๆ เพื่อนๆ ที่ช่วยร่วมแรงร่วมมือ และสนับสนุนตลอดมาจนปัญหาพิเศษเล่มนี้ เสร็จจุล่งไปด้วยดี

นายเอกชัย ตุ่มทอง

มีนาคม 2544

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	13
ผลการทดลอง	16
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	20
เอกสารอ้างอิง	21



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)

## สารบัญตาราง

ตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงเวลาที่เหมาะสมและจำนวนโครโมโซมที่นับได้

17

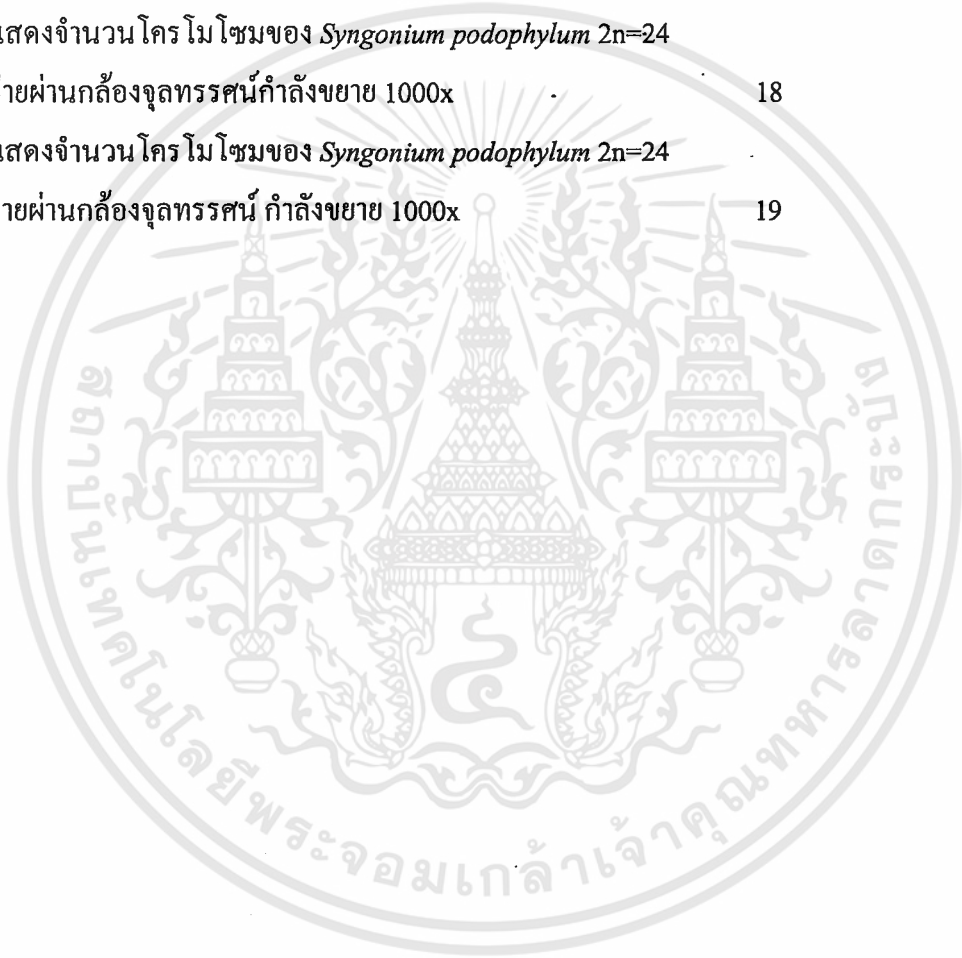


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ข)

## สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1 ต้นเงินไหลมา <i>Syngonium podophyllum</i>	15
ภาพที่ 2 แสดงจำนวนโครโมโซมของ <i>Syngonium podophyllum</i> $2n=24$ ถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000x	18
ภาพที่ 3 แสดงจำนวนโครโมโซมของ <i>Syngonium podophyllum</i> $2n=24$ ถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000x	19



## การศึกษาโครโมโซมของเงินไหลมา (*Syngonium podophyllum*)

### *Syngonium (Syngonium podophyllum) Chromosome Investigation*

#### คำนำ

เงินไหลมา (*Syngonium podophyllum*) เป็นไม้ประดับที่นิยมปลูกในเมืองไทยอย่างมากชนิดหนึ่ง เนื่องจากมีชื่อเป็นมงคล ปลูก และดูแลรักษาง่าย มีปัญหาเรื่องโรคและแมลง ทนต่อสภาพอากาศได้ดี (ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ, 2539) คนไทยโบราณเชื่อว่าหากบ้านใดปลูกต้นเงินไหลมาจะทำให้ร่ำรวยชักนำเงินทองเข้าสู่บ้าน และต้นเงินไหลมาเองก็มีเสน่ห์ในตัว เนื่องจากมีสีสันทวยงาม เส้นกลางใบเป็นสีเงิน

ปัจจุบันเงินไหลมาเป็นที่นิยมมากขึ้นของนักเลี้ยงไม้ประดับจึงมีการนำสายพันธุ์อื่นๆมาปลูกขยายมากขึ้น ได้พันธุ์ที่มีลักษณะเป็นไม้กระถาง มีหลายสีมีใบหลายขนาดรูปทรง จึงเป็นการดีที่จะศึกษาจำนวนโครโมโซมพืชชนิดนี้ไว้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ที่หลากหลายในภายหน้า

ขั้นตอนการในศึกษาจำนวนโครโมโซม จำเป็นต้องใช้ความชำนาญและเทคนิคในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือสูง มีการวางแผนการทดลองเป็นลำดับขั้น สำหรับการทดลองนี้ ศึกษาเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซมของเงินไหลมาเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพืชชนิดนี้ต่อไป

### การตรวจเอกสาร

ชื่อสามัญ                      เงินไหลมา, Tricolor Nephthytis

ชื่อวิทยาศาสตร์                *Syngonium podophyllum*

ชื่อวงศ์                            ARACEAE

#### ลักษณะทั่วไป

ลำต้น : เงินไหลมาเป็นไม้เลื้อยที่มีเถายาว ลำต้นมีความยาวประมาณ 10 – 20 เมตร มีลำต้นกลม สีเขียว ผิวลำต้นเกลี้ยงเป็นข้อห่างๆ และมีรากออกตามข้อลำต้น ลำต้นแต่ละข้อมีกาบหุ้มอยู่

ใบ : เป็นใบเดี่ยวออกตามข้อสลับกันซึ่งมีก้านใบยาวประมาณ 10–15 เซนติเมตร ต้นอ่อนใบคล้ายใบบอนขนาดเล็ก ใบเป็นแฉก 5 แฉก ขนาดใบกว้าง 3 – 5 เซนติเมตร ยาว 10 – 15 เซนติเมตร ใบเป็นแฉกลึกเข้าหาโคนใบ ส่วนปลายใบเรียวแหลม พื้นใบมีสีเขียวลายชมพูพาดตามเส้นใบ ( อุดชร ,2541 ) ถ้ามีอายุมากจะออกดอกตรงส่วนยอด ลักษณะดอกคล้ายดอกของบอน

#### การปลูก มี 2 วิธี

##### 1.การปลูกในกระถางเพื่อใช้ประดับภายในและภายนอกอาคาร

ใช้กระถางทรงสูงขนาด 10 – 16 นิ้ว ใช้ปุ๋ยคอก : แกลบ : ขุยมะพร้าว : ดินร่วน อัตรา 1:1:1:1 ผสมดินปลูก เมื่อปลูกแล้วให้ใช้ไม้หลักปักไว้ตรงกลางกระถางเป็นที่ยึดของราก และควรเป็นไม้หลักที่หุ้มด้วยกาบมะพร้าวจะเหมาะสมอย่างยิ่ง หลังจากนั้นควรตัดแต่งทรงพุ่มและให้ปุ๋ยสม่ำเสมอ และควรเปลี่ยนกระถางเมื่ออายุ 2 – 3 ปี เพราะการขยายของรากอัดแน่นเกินไปในกระถาง หรือตามความเหมาะสมของทรงพุ่ม

##### 2.การปลูกในแปลงปลูกเพื่อประดับบริเวณบ้านและสวน

ถ้าปลูกในแปลงปลูก มักปลูกตามบริเวณรอบไม้อื่นหรือทำรั้วเพื่อให้รากยึดเกาะและเลื้อยขึ้นได้ การเตรียมดินปลูกเหมือนกับการปลูกพันธุ์ไม้อื่นๆทั่วไป ขนาดหลุมปลูกประมาณ 20 x 20 x 20 เซนติเมตร ใช้ปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยหมัก : ดินร่วน 1 : 1 ผสมดินปลูก ถ้าปลูกเป็นกลุ่มบริเวณบ้านและสวน ต้องทำให้พุ่มเตี้ย ควรตัดยอดออกบ้างตามความเหมาะสมหรือให้เลื้อยตามพื้นดินก็ได้

### การดูแลรักษา

แสง : ต้องการแสงแดดรำไรหรือในที่ร่ม ความชื้นในอากาศสูง

น้ำ : ต้องการน้ำปานกลาง ควรให้น้ำทุกวัน

ดิน : ดินร่วนซุย

ปุ๋ย : ใช้ปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยหมัก อัตรา 300 – 500 กรัม / ต้น ใส่ 1 – 2 เดือน / ครั้ง ( ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ, 2539 )

### การขยายพันธุ์

ปักชำยอดหรือส่วนของต้น

### โรคและแมลงศัตรู

ไม่ค่อยมีปัญหาเรื่องโรคและแมลงศัตรูเพราะเป็นไม้ทนต่อสภาพธรรมชาติได้ดี ( ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ, 2539 )

### การเป็นมงคล

คนไทยโบราณเชื่อว่า บ้านใดปลูกต้นเงินไหลมาไว้ประจำบ้าน จะทำให้เกิดความร่ำรวย เพราะเงินไหลมาเป็นไม้มงคลนาม สามารถทำให้เงินทองไหลมาสู่บ้านและผู้อาศัย จึงทำให้เกิดความมั่งมี และยังมีความเชื่ออีกว่าต้นเงินไหลมายังช่วยสร้างความเป็นเสน่ห์แก่บ้านและผู้อาศัย เพราะลักษณะใบของต้นเงินไหลมามี สีเงิน สวยงาม สีกกลางใบคล้ายสีเงิน

### ตำแหน่งที่ปลูกและผู้ปลูก

เพื่อเป็นสิริมงคลแก่บ้านและผู้อาศัย ควรปลูกต้นเงินไหลมาไว้ทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ ผู้ปลูกควรปลูกในวันอังคาร เพราะโบราณเชื่อว่าการปลูกไม้เอาคุณทางใบให้ปลูกในวันอังคาร ( ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ , 2539 )

### Genus *Syngonium* (Tri – leaf)

เดิมมีอยู่ 7 ชนิด แต่ต่อมาเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมทำให้เพิ่มขึ้นอีก 10 ชนิด การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมมักไม่แน่นอน แต่ส่วนใหญ่มักมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านจำนวนใบและลักษณะสีต่าง

*Syngonium auritum* (Jamaica) เดิมจัดอยู่ในสกุล *Philodendron* ลักษณะใบคล้ายใบรวม ฉีกออกเป็นรูปกรี ใบกลางกว้างยาวกว่าใบข้างคู่และเรียวยาวไป ใบคู่มีขนาดเล็กเกือบมนกลมคล้ายหูใบ เนื้อหนาเป็นมันสีเขียวเข้ม ร่องกลางใบเส้นลึกลึกลึอ่อน

*Syn. Erythrophyllum* (Panama) ลักษณะใบเดี่ยวรูปลูกศรขนาดเล็ก เนื้อบางสีเขียวอมทองแดง ลายเส้นตามยาวของใบมีจุดแต้มสีเทาเงินสลับสีชมพูทั่วใบ หลังใบสีแดงเข้ม ลักษณะใบเดี่ยวนี้มีลักษณะคล้ายกับ *Syn. macrophyllum* แต่มีขนาดต่างกัน

*Syn. Hoffmannii* (America) ลักษณะใบเดี่ยวรูปลูกศร ใบทรงสามเหลี่ยม เนื้อบางสีเขียวอ่อน กลางใบเหลือบเทา เส้นโครงใบเป็นสีนวลจางทั้งใบ

*Syn. Podophyllum* ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยวที่มีลักษณะคล้าย 3 ใบมารวมกัน, 5 ใบรวม, 7 ใบรวม จนถึง 11 ใบรวม เป็นรูปกรีแซงซ้อนออกไป

*Syn. Podophyllum tri – leaf* ลักษณะเดิมเป็นใบเดี่ยวรูปลูกศร ต่อมาเกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็น 3 ใบรวมคล้ายรูปกรี ต่อมากลายเป็น 5 ใบรวม ใบแยกแต่ละใบเป็นรูปปลายหอก เนื้อบางสีเขียวสด กลางใบตามลายเส้นโครงของใบมักเปลี่ยนเป็นสีต่าง ครีมน ถ้าเปลี่ยนเป็นสีต่างมากขึ้น ตั้งชื่อพันธุ์ใหม่ว่า *Syn. Podophyllum tri color*

ลักษณะที่เปลี่ยนไปจนใบเพิ่มขึ้นมาเป็น 11 ใบรวมนั้น เกิดจากการบำรุงรักษาอย่างดี และถ้าปลูกลงดินใบจะใหญ่ขึ้นหลายเท่า สีเขียวสดใส ไม่มีสีต่าง

*Syn. Podophyllum albo – lineatum* มีลักษณะของการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด คือเมื่อแตกใบครั้งแรก ใบจะเป็นใบเดี่ยวหัวลูกศร แตกใบครั้งที่สองใบจะมีลักษณะเป็น 3 ใบรวม และเมื่อแตกใบครั้งที่สาม ใบจะมีลักษณะเป็นสี่ใบรวม เนื้อบางสีเขียวอ่อน โคร่งลายและสีต่างมากขึ้นไปตามการดูแลรักษาซึ่งจะนำไปสู่การตั้งชื่อใหม่

*Syn. Podophyllum albo-lineat* เมื่อแตกใบครั้งแรก ครั้งที่สอง และครั้งที่สาม ใบจะมีลักษณะเป็น 5 ใบรวม แต่เมื่อแตกใบครั้งที่สี่ ใบจะมีลักษณะเป็น 7 ใบรวม เนื้อบางสีเขียวเข้ม โคร่งลายเป็นเส้นสีครีม ไม่ต่างเหมือนต้นอื่น

**Syngonium** มีการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะใบแตกต่างกันไป ทำให้เกิด Variety ต่างๆ ขึ้น เคยมีการทดลองปลูกชนิดพันธุ์เดียวกัน แต่ภาชนะปลูก การให้ปุ๋ย น้ำ และสถานที่ขยายพันธุ์แตกต่างกัน ปรากฏว่ามันจะให้ใบที่มีลักษณะและลายเส้นต่างๆ กัน ทำให้คิดว่าเป็นพันธุ์ใหม่ จึงทำให้มีการตั้งชื่อใหม่ซ้ำซ้อนกัน ก่อให้เกิดความสับสน

ในประเทศไทย กำลังนิยม *Syngonium podophyllum tricolor* ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงมาจากต้นธรรมชาติ และตั้งชื่อไทยว่า วาเงินไหลมา มีราคาซื้อขายแพงขึ้น ทำให้เกิดความเชื่อถือมากยิ่งขึ้น การนำเอาไม้ประดับจากต่างประเทศมาตั้งชื่อเป็นว่านต่างๆ กำลังเป็นที่นิยมอยู่ในขณะนี้ จึงต้องระมัดระวัง เพราะไม้ประดับบางชนิดเป็นพิษถึงตายได้ ในบางประเทศใช้ราก ใบ ต้น ของไม้บางสกุลเป็นยาเบื่อ และในความเข้มข้นสูงสามารถใช้เป็นยาสลบได้เป็นชั่วโมงหรือวัน เป็นการลงโทษผู้ทำผิดกฎหมาย ( ประชิต , 2523 )

#### การศึกษาจำนวนโครโมโซมในไมโทซิส ( อมรา, 2540 )

ไมโทซิสเป็นช่วงเวลาเดียวกับวัฏจักรของเซลล์ที่โครโมโซมมีรูปร่างเห็น ได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่ละโครโมโซมประกอบด้วยสายใยโครมาติน ( chromatin ) สายใยโครมาตินประกอบด้วย DNA และ โปรตีน ส่วนของสารพันธุกรรมจะอยู่ในรูปของ DNA

ระยะแรกของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเรียกว่า โพรเฟส ( prophase ) ระยะต้นของโพรเฟสนั้น โครโมโซมปรากฏเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีขนาดขยายยาวโดยแต่ละเส้นประกอบด้วยสายใยเป็นคู่ สายใยคู่ของแต่ละโครโมโซมเรียกว่า sister chromatid ดังนั้นองค์ประกอบของสารพันธุกรรมจะเหมือนกัน nucleolus เห็นในระยะอินเตอร์เฟส ในตอนปลายระยะโพรเฟส โครโมโซมจะหดตัวสั้นมาก ระยะของโครโมโซมจากเซนโทรเมียร์ไปถึงโครโมโซมข้างหนึ่ง เรียกว่าแขน แบ่งกว้างๆ เป็น 4 ชนิด คือ metacentric , submetacentric , acrocentric และ telocentric เมื่อสิ้นสุดระยะโพรเฟสจะพบว่า ผนังนิวเคลียสเกิดการสลายตัว เข้าสู่ระยะการแบ่งเซลล์ที่เรียกว่า เมทาเฟส สังเกตเห็นโครโมโซมหนึ่งแท่งประกอบด้วยโครมาติดสองแท่ง ยึดติดที่ตำแหน่ง เซนโทรเมียร์ชัดเจน

แต่ละเซนโทรเมียร์จะมีสายของ spindle มายึดไว้ ระยะนี้มีความสำคัญมาก คือ โครโมโซมหดสั้นมากที่สุด และเป็นระยะที่เหมาะสมอย่างยิ่งในการนำโครโมโซมระยะนี้มาศึกษาทางไซโตรเจนเนติก เช่น การนับจำนวน การตรวจรูปร่างและนำมาข้ามสี

ระยะต่อมาเป็นแอนาเฟสจะปรากฏเห็น โครโมโซมแยกเป็นสองกลุ่ม แต่ละกลุ่มมีจำนวนเท่ากัน โดยเท่ากับ จำนวน diploid ของชนิดนั้นๆ

ระยะสุดท้ายของไมโทซิส คือ เทโลเฟส เริ่มเห็นผนังนิวเคลียสสร้างขึ้นล้อมแต่ละกลุ่มของโครโมโซม สำหรับเซลล์พืชจะมีผนังเซลล์ มีลักษณะเป็นผนังบางกึ่งกลางเซลล์

## การเตรียมโครโมโซม

### การเตรียมโครโมโซมจากรากพืช

ในปลายรากพืชที่ได้จากการเพาะเมล็ดหรือปลูกพืช รากที่นำมาใช้ต้องสดและมีสุขภาพดีเพื่อให้ได้เซลล์ที่มีอัตราการแบ่งตัวที่มาก นิยมใช้รากชนิดรากแขนง(lateral root) ลักษณะรากที่ดี มีความโปร่งแสงและมีสีเขียวส่วน tip หรือปลายรากมีสีเขียวอมครีม ถ้าไม่สามารถหารากได้ อาจใช้เนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่เป็น meristematic tissue เช่น จากปลายใบอ่อน หรือส่วนของดอก เช่น ผนังรังไข่หรือเมล็ดอ่อน ซึ่งวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับราก

**Pretreatment** ล้างรากพืชให้สะอาด ตัดรากให้ยาวจากปลายรากขึ้นมาประมาณ 1 เซนติเมตร แช่ในสารละลาย Pretreatment เพื่อให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวในระยะเมทาเฟส เป็นเวลาประมาณ 4-6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ขวดแก้วมีฝาปิดสนิท ล้างให้สะอาดปราศจากสารเคมีหรือผงซักฟอก ระหว่างแช่ควรเขย่าภาชนะเพื่อให้อากาศแทรกในน้ำยา เมื่อสิ้นสุดเวลาใช้คีมปลายแหลม(forceps) คีบรากออกมาแช่ในน้ำยา Fixative ต่อไป

**Fixation** เลือกรากที่มีลักษณะดี (โปร่งใสและปลายรากมีสีเขียวอ่อน) แช่ในน้ำยา Fixation นานอย่างน้อย 15 นาที ถ้าต้องการเก็บรากไว้เป็นเวลานานก่อนนำมาศึกษาโครโมโซม ให้เปลี่ยนแปลงเป็นแช่ปลายรากจาก Fixation มาเป็น 70% ethanol และเก็บไว้ในที่เย็น 0-4 °C จนกว่าจะศึกษาต่อไป

**Maceration** ( การทำให้เซลล์นุ่ม ) นำปลายรากที่อยู่ในขวดแก้วมาแช่ในสาร 1 M HCl เป็นเวลา 5 นาที (ควรทำที่อุณหภูมิ 60°C) แล้วล้างรากด้วยน้ำสะอาด ถ้าทำจำนวนมาก อาจแช่รากในน้ำที่ใส่ขวดแก้วปิดปากด้วยผ้าขาวบาง ปล่อยน้ำไหลผ่านเข้าออกโดยไม่เปิดปากขวด แล้วจึงแช่ปลายรากไว้ในขวดแก้วซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่ เมื่อต้องการจะศึกษาจึงใช้คีมปลายแหลม ( forceps ) คีบปลายรากขึ้นมาศึกษาต่อไป

**Cell suspension** นำรากชิ้นจากน้ำ วางปลายรากบนแผ่นสไลด์ ชับน้ำส่วนเกินออก ย้อมด้วยสี aceto-carmine จำนวน 1 หยด ใช้มีดตัดเอาส่วนของหุ้มรากออก ทำ squash technique คือขยี้เซลล์รากให้แบนด้วยเข็มเย็บปลายแบน ผ่านสไลด์บนเปลวไฟ (ใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์) ปิดสไลด์ด้วย coverslip ใช้เวลาย้อมสีนาน 5-10 นาที จากนั้นวางกระดาษซับบริเวณส่วนเหนือและใต้ของสไลด์ใช้นิ้วหัวแม่มือกดแรงพอประมาณเพื่อให้เซลล์กระจาย ตรวจสอบเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หรือใช้เทคนิคการแช่รากในสีย้อม aceto-carmine โดยแช่ปลายรากในภาชนะรองรับ อาจเป็นจานสีหรือหลอดทดลอง

ขนาดเล็ก ที่ใช้เวลาประมาณ 10 – 12 ชั่วโมง เพื่อให้สปีดิดเข้าไปในโครโมโซม แล้วจึงเข้าสู่วิธีการ squash technique หรือทาบ coverslip ด้วยยางลบที่ปลายดินสอ แล้วจึงตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำสไลด์ให้เซลล์คงที่อยู่ชั่วคราวโดยปิดขอบ coverslip ด้วยยาทาเล็บหรือพาราฟินที่หลอมแล้ว

**การเตรียมสารเคมีชนิดต่าง ๆ ในการศึกษาโครโมโซม**

### Pretreatment

การทำ Pretreatment กับรากพืชเพื่อจะทำให้เซลล์พืชหยุดการแบ่ง ไมโทซิสในระยะเมทาเฟส ซึ่งระยะนี้โครโมโซมจะมีขนาดสั้นมากที่สุด ทำให้การนับและการศึกษารูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจน สารที่ใช้ทำ Pretreatment มีหลายชนิด แต่ละชนิดมีผลต่อเซลล์เหมือนกันคือทำให้ spindle fiber ของเซลล์ไม่สามารถสร้างขึ้นมาได้ การทำ Pretreatment จะทำก่อนที่จะ fix เซลล์ด้วยน้ำยา fixative สารที่ใช้ทำ Pretreatment มีดังนี้

1. Colchicine : ใช้ความเข้มข้น 0.2% W/V ในน้ำ แช่ปลายรากนานประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้น fix รากในน้ำยา fixative
2. 8-hydroxyquinoline : เตรียมที่ความเข้มข้น 0.002 M ในน้ำเพื่อให้ละลายดีใช้วิธีอุ่นใน 60° C เป็นเวลานาน 10-15 นาที บางครั้งอาจนานถึง 1 ชั่วโมงจึงจะละลายหมด
3. Paradichlorobenzene : เตรียมให้ถึงระดับ ใช้เตรียมจาก 5-10 กรัม Paradichlorobenzene ในน้ำกลั่น 500 มล. ใส่สารละลายนี้ไว้ในขวดที่ปิดจุก และเก็บไว้ในตู้เย็น 60° C นานตลอด 1 คืน จึงนำมาใช้ การแช่รากอยู่นาน 15 นาที-4 ชั่วโมง จากนั้นจึง fix ราก

### Fixative solution หรือ Killing solution

น้ำยาที่เป็น fixing หรือ killing นี้ใช้เพื่อทำให้เซลล์พืชคงสภาพเดิม เช่น การดองสัตว์ให้คงสภาพไม่เน่าเปื่อย น้ำยาประเภทนี้จำเป็นต้องเตรียมใหม่ ๆ แล้วใช้ทันทีมีสูตรการผสมแบบต่าง ๆ กัน 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 (สีย้อมเซลล์)

ในการศึกษาโครโมโซมพืชทั้งจากเซลล์ปลายรากและเซลล์ microsporocyte นั้น นิยมใช้สีย้อม acetocarmine และโดยเฉพาะมีส่วนของสปีทิมเหล็กปนอยู่ในสีย้อมแล้วจะทำให้โครโมโซมติดสีย้อมมากขึ้น อาจเรียกเทคนิคนี้ว่า iron-acetocarmine วิธีเติมเหล็กให้กับสีย้อมเข้มข้นปลายสปีทิมในน้ำสีย้อมมีผลนอกจากสีย้อม acetocarmine แล้วยังมีสีย้อมประเภทอื่น ๆ ใช้ย้อมเซลล์พืชได้ในการเตรียมสีย้อมดังนี้

#### 1. aceto-carmine

อุ่น 45% acetic acid ที่ร้อนละลายสีย้อม carmine ลงไป โดยใช้อัตราส่วน 1 กรัมของ carmine ในกรด acetic 200 มล. ต้มให้เดือดนาน 1-2 นาที หรือ จนกระทั่งสีแดงของ carmine เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มขึ้น จากนั้นปล่อยให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง อาจใช้วิธีต้มให้เดือดระเหยเป็นไอแล้วกลั่นตัวเป็นหยดน้ำใน reflux condenser นาน 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นแล้วกรอง เก็บสารละลายนี้ในที่เย็นและมีมืด

#### 2. สีย้อม Lacto-propionic orcein

ใช้สีย้อม Lacto-propionic orcein แทน aceto-carmine ได้เช่นกัน วิธีเตรียม ผสม 1 กรัม ของ orcein + ส่วนผสมของ lactic acid 50 มล. และ propionic acid 50 มล. ทำที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้ผง orcein ละลายใช้เวลาตลอดคืนแล้วกรอง เตรียม working solution : เจือจาง ให้ได้ 45%-60 % ของ stock solution ในน้ำแล้วกรอง เก็บสีย้อมไว้ในที่เย็นและมีมืดสามารถใช้ได้เป็นเวลาหลายเดือน

#### 3. การเตรียมสีย้อม aceto-orcein

อุ่น glacial acetic acid แล้วละลายสีย้อม orcein ลงไปใช้ 2.2 กรัม ในกรด 100 มล. จากนั้นปล่อยให้สีย้อมเย็นแล้วเก็บเป็น stock solution ก่อนจะใช้ต้องทำการเจือจางเป็น 45% ในน้ำแล้วกรอง นิยมใช้สีย้อม aceto-orcein ย้อมเซลล์สัตว์

#### 4. การเตรียมสีย้อม alcoholic-hydrochloric-acid carmine

alcoholic-hydrochloric-acid carmine ย้อมเซลล์พืชโดยจะให้ความแตกต่างระหว่างไซโตพลาสซึมและโครโมโซมอย่างชัดเจน วิธีการเตรียมดังนี้ ผสมกรด HCl (เข้มข้น 1 มล.) ในน้ำกลั่น 15 มล. แล้วใช้ 4 กรัมของ carmine ละลายลงในน้ำกรดนี้ จากนั้นนำสารละลายและกรดนี้ตั้งไฟให้ร้อนจนเดือดเบา ๆ นาน 10 นาที ปล่อยให้เย็นจึงเติม 95 มล. ของ 85% แอลกอฮอล์ลงไปกรองสีก่อนใช้

## 5. การย้อมสีโดย Feulgen technique

Feulgen reaction เป็นปฏิกิริยาที่ชี้ว่าส่วนใดเป็น DNA และส่วนใดมิใช่ DNA จากเทคนิคนี้ทำให้เฉพาะส่วนของโครโมโซมติดสี แต่ cytoplasm และ nucleolus จะไม่ติดสี งานทดลองนี้ทำโดย Feulgen และ Rossenbeck ในปี 1924 วิธีการเตรียมสีย้อมมีดังนี้ เเทน้ำกลั่นที่เดือดแล้วขนาด 200 มล. ลงในสี basic fuchsin จำนวน 1 กรัม แล้วเขย่าภาชนะที่ใส่สารละลายนี้ นาน 5 นาที ทำให้เย็นจนถึง 50 แล้ว กรองใส่ขวดที่แสงผ่านไม่ได้หรือขวดฝาปิดสีขาว เดิม 30 มล. ของกรด HCl ลงไป จากนั้นเติม 3 กรัมของ sodium หรือ potassium metabisulphite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  or  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) เก็บสีไว้ในที่เย็นและมีมืด ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่าสีเก่าเกินไปไม่เกิดผลในการย้อม fuchsin solution ที่เตรียมได้ใหม่จะไม่มีสี

วิธีการย้อมสีเซลล์ด้วย Feulgen reaction นำปลายรากที่ fix ไว้เรียบร้อยแล้วแล้งมาแช่ใน 10% HCl ที่เย็น (เตรียม HCl conc : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 9) คอยจมส่วนรากจมในกรดดังกล่าว จึงย้ายมาแช่ใน 10% HCl ที่อุณหภูมิ 60°C ปล่อยให้ hydrolyze นาน 25 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แช่ปลายรากใน fuchsin solution นาน 20-30 นาที เมื่อต้องการจะตรวจดูโครโมโซมให้เตรียมรากบนสไลด์ หยด 40% acetic acid ลงไป แล้วบดขยี้เซลล์ให้ราบ โดย squash technique

**ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของโครโมโซมและมีบทบาทต่อการศึกษากายวิภาคศาสตร์ของเซลล์** (นิตยศรี, 2541)

1. โคลชิซิน (colchicine) เป็นสารแอลคาลอยด์ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการแบ่งเซลล์โดยยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ ทำหน้าที่ดั่งเซนโทรเมียร์ไปยังขั้วของเซลล์ โครโมโซมจึงหยุดอยู่ที่ระยะเมทาเฟสซึ่งเป็นระยะที่โครโมโซมหดสั้นสุด แต่ไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งของโครโมโซม จึงเป็นสารที่นิยมทำหน้าที่เป็น pretreat ในการศึกษาโครโมโซม

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ pretreatment อีกประเภทหนึ่ง ที่ทำให้โครโมโซมหดตัว แต่ตัวอย่างพืช เช่น ราก ในสาร pretreat กลุ่มนี้ได้แก่  $\alpha$ -bromonaphthalene, 8-hydroxyquinoline มีผลคล้ายโคลชิซิน

3. การลดปริมาณของสารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โครมาทินอาจจะมีผลต่อขนาดของโครโมโซม เซลล์ที่ได้จากการแบ่งตัวค่อนข้างถี่จะมีโครโมโซมขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่มีระยะอินเตอร์เฟสค่อนข้างยาว

4. สารอาหารต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ มีผลต่อขนาดโครโมโซมด้วย เช่น ฟอสเฟต ที่ความเข้มข้นสูงๆ จะทำให้โครโมโซมมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมที่เลี้ยงในน้ำหรือมีฟอสเฟตน้อย

5. อุณหภูมิ มีผลต่อขนาดโครโมโซมเช่นกัน เซลล์ที่มีการแบ่งตัวในที่มีอุณหภูมิต่างๆ จะมีขนาดสั้น และมีการหดตัวของโครโมโซมมากกว่าเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในที่มีอุณหภูมิสูงๆ

ในการเตรียมสไลด์เพื่อการศึกษารูปร่างและจำนวนโครโมโซม จำเป็นต้องทำให้โครโมโซมมีขนาดสั้นและมีการกระจายของโครโมโซม โดยทั่วไปนิยมใช้สารเคมีในการทำ pretreatment ร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ด้วย จะช่วยลดระยะเวลาที่ต้องแช่สารเคมีสั้นลง

### ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ดิเรก (2537) ผลของจำนวนโครโมโซมต่อลักษณะทางสัณฐานของเยอบีร่า พันธุ์ขาวใบจักร เทอร์รานิวัลิส เทอร์รามอนซา และเทอร์ราพาเรด ในอาหาร MS ปรากฏว่าดินอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีโคลชิซินผสมอยู่ 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5 วัน ทำให้เยอบีรามีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัว คือ  $2n = 4n = 100$  ดินเยอบีร่าที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นจะมีใบหนา สีเขียวเข้ม และขนาดของปากใบใหญ่กว่าปกติ แต่เจริญเติบโตไม่ค่อยดี แดกหน่ออ่อน ดอกมีสีเขียวเข้ม กลีบดอกกว้างและยาวกว่าปกติ

ปกขวัญ และคณะ (2530) ได้ทำการศึกษาโครโมโซมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชในสกุล *Ocimum* 3 ชนิด คือ แมงลักไทย (*Ocimum americanum* Linn. Syn.), *O. americanum* Linn. และ *O. canum* Sims จากอินโดนีเซียพบว่าจำนวนโครโมโซม  $2n = 64$ ,  $2n = 72$  และ  $2n = 66$  ตามลำดับ

ประวดี (2526) ได้ทำการศึกษาโครโมโซมจากปลายรากกล้วยทั้งกล้วยป่าและกล้วยปลูก จำนวน 30 เชื้อพันธุ์ โดยวิธี squash พบว่ากล้วยป่าเบอร์ 1 กล้วยป่าเบอร์ 3 กล้วยอ่างขาง กล้วยไข่ กล้วยไข่ กล้วยตานี กล้วยไข่โบราณ กล้วยทองไข่แมว กล้วยป่าเบอร์ 22 กล้วยไลและกล้วยหมาก มีโครโมโซม  $2n = 22$  กล้วยคร้าว กล้วยนิ้วมือนาง กล้วยน้ำกาบดำ กล้วยกุ้งเขียว กล้วยน้ำ กล้วยติบ กล้วยเล็บช้างกูด กล้วยติบคำ กล้วยขมเบา กล้วยขมหนัก กล้วยน้ำว่าเหือง กล้วยกุ้ง กล้วยคลองจิ่ง กล้วยพม่าแหกคุก กล้วยนางกลาย กล้วยหอมเตี้ย กล้วยน้ำว่าค่อมและไข่บอง มีโครโมโซม  $2n = 33$  กล้วยเทพรส มีโครโมโซม  $2n = 44$

ผ่องพรรณ และคณะ (2538) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของมะตูมโดยการย้อมสีออร์ซีน (orcine) เก็บรากตัวอย่างเมื่อเวลา 10.30 น. สังเกตกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด  $2n = 14$  รูปร่างโครโมโซมเป็นแบบ เมทาเซนตริก (metacentric chromosome) คือ มีเซนโทเมียร์อยู่บริเวณกึ่งกลางทำให้แขนของโครโมโซมสองข้างเท่ากัน

วาสนา (2527) จากการศึกษาลักษณะภายนอกและภายใน การเจริญเติบโต จำนวนโครโมโซม และลักษณะเรณูของพืชในสกุลบัวหลวง และผลจากการศึกษาจำนวนโครโมโซมพบว่า โครโมโซมของบัวหลวง 6 พันธุ์คือ บุนนทริก ปทุม สัตตบุษย์ สัตตบงกช ปีกกิ่งขาว และปีกกิ่งชมพู มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ  $2n = 16$

ศิริพรและฉันทนา (2540) การศึกษาโครโมโซมของว่านมหาลาจากเซลล์ปลายราก พบว่าวิธีการที่ได้ผลดี คือ การเก็บตัวอย่างรากเวลา 9.00 นาฬิกา หยดวางจรีพด้วย para-dichorobenzene นาน  $4\frac{1}{2}$  ชั่วโมง แยกเซลล์ใน HCl 1 N นาน 5 นาที แล้วย้อมด้วยสี carmine fuchsin นาน 1 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าว่านมหาลาที่มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 68$

ศิริศักดิ์ (2542) การตรวจสอบโครโมโซมปลายรากบัวหลวงพันธุ์สัตตบุษย์ โดยใช้ acetocarmine squash methods เก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 8.30-11.0 นาฬิกา หยดวางจรีพเซลล์ใน 8-hydroxyquinoline นาน 7 ชั่วโมง แช่ด้วย 1M HCl นาน 20 นาที ย้อมด้วยสี aceto osein นาน 5 นาที พบว่าโครโมโซมที่นับได้คือ  $2n = 16$

สาริณี (2537) ได้ทำการทดลองนับโครโมโซมรากของต้นกล้วยไม้หาย *Dendrobium superbiens* ดิพลอยด์และออลโพลิตราพลอยด์ ต้นละ 10 เซลล์ หยดวางจรีพเซลล์ด้วย 1-bromonathlene นาน 5-6 ชั่วโมง แช่ด้วย hydrolyse ในกรดเกลือ 1N นาน 10 นาที ย้อมด้วยสี aceto orcein พบว่าดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 38 และออลโพลิตราพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 76

สุณิสสา และคณะ (2543) จากการศึกษาวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของโครโมโซมข้าว 5 พันธุ์ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มข้าวขาว (ข้าวเหนียวสันป่าตองและหอมมะลิ 105 ) กับกลุ่มข้าวเหนียวดำ (ดำดอยสะเก็ด , CMUcol.2 และ CMUcol.3 ) พบว่าข้าวทั้ง 5 พันธุ์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ  $2n = 24$  แต่มีขนาดและชนิดของโครโมโซมเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธุ์ โดยมีวิธีการศึกษาโดยการหยดวางจรีพของเซลล์รากด้วย para-dichorobezene ล้างด้วยน้ำกลั่นนำรากแช่ไว้ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (ethnyl alcohol 95% และ acetic acid เข้มข้น ในอัตรา 3:1) 5 นาที แยกเซลล์ออกจากกันแช่รากในกรดไฮโดรคลิก 1N ที่  $60^{\circ}\text{C}$  นาน 10 นาที และย้อมด้วยสี carbol fuchsin นาน 5 ชั่วโมง

อัมพิกา (2527) ได้ศึกษาโครโมโซมของท้อ 9 พันธุ์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์เท่ากับ 16 โครโมโซมมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาแต่ละพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

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 โครโมโซมของกีวีฟรุตที่ทำการศึกษาคพบว่า กีวีฟรุตทั้ง 6 พันธุ์ มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือประมาณ  $2n = 166$  โดยมีขนาดเล็กมาก จนไม่สามารถจำแนกความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาออกจากกันได้

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



## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. ต้น Syngonium (ภาพที่ 1)
2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม
  - (1) 8-hydroxyquinoline เข้มข้น 0.002 M
  - (2) ethyl alcohol เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์
  - (3) glacial acetic acid
  - (4) acetic acid เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์
  - (5) carmine
  - (6) น้ำกลั่น
3. กล้องจุลทรรศน์ MICROSCOPE ยี่ห้อ Olympus รุ่น BH-2 สไลด์และ กระจกปิด สไลด์
4. กล้องถ่ายรูป และอุปกรณ์ถ่ายรูป

### วิธีการ

1. คัดเลือกต้น Syngonium ในกระถาง ที่เพาะเลี้ยงไว้ ที่มีลักษณะแข็งแรงสมบูรณ์
2. การเก็บตัวอย่าง ใช้มีดที่คมตัดปลายรากที่กำลังเจริญเติบโตให้ห่างจากปลายราก 1 เซนติเมตร ช่วงเวลาที่ทำการเก็บ 9.00-10.00 น. นำไปล้างน้ำให้สะอาด เช็ดดินที่ติดมาออกให้หมด
3. การเตรียม pretreatment โดยใช้สาร 8-hydroxyquinoline ที่ความเข้มข้น 0.002 M ในน้ำ เพื่อให้ละลายดีใช้วิธีอุ่นใน  $60^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลานาน 10-15 นาที บางครั้งอาจนานถึง 1 ชั่วโมงจึงจะละลายหมด หยดวงซีพของเซลล์โดยนำปลายรากมาแช่ใน 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M. นาน 4 - 6 ชั่วโมง ในตู้เย็นเพื่อทำการทดลองต่อไป
4. การเตรียมน้ำยา Fixation and Storage โดยใช้สูตร Carnoy's fluid ประกอบด้วย alcohol glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1 รักษาสภาพเซลล์ โดยแช่ในรากไปแช่ในสารละลาย 1N HCl solution นานประมาณ 5 นาที ที่อุณหภูมิ จากนั้นเทสารละลายทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น
5. การเตรียมสีย้อม โดยใช้สูตร aceto-carmine ทำได้โดย อุ่น 45% acetic acid ที่ร้อนละลายสี carmine ลงไป โดยใช้อัตราส่วน 1 กรัมของ carmine ในกรด acetic 200 มล. ต้มให้เดือดนาน 1-2 นาที หรือ จนกระทั่งสีแดงของ carmine เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มขึ้น จากนั้นปล่อยให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง ย้อมสี aceto-carmine แช่ตัวอย่างรากในสีนานประมาณ 5 นาที

6. นำปลายรากมาตัดเอาเฉพาะเนื้อเยื่อเจริญ (apical meristem) หยดสี acetocarmine กดปลายรากด้วยเข็มแบน ให้เยื่อจะเจริญกระจายทั่ว ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ใช้ปลายดินสอเคาะเบา ๆ เพื่อที่จะให้เซลล์ที่จะศึกษากระจายไปทั่ว นำไปลนไฟอ่อน ๆ แล้วกดกระดาษซับรอนพื้น

7. นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียส ในระยะเมตาเฟสที่มีการกระจายตัวของโครโมโซม แล้วบันทึกผลการทดลอง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

#### เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มการทดลอง เดือน พฤศจิกายน 2543

สิ้นสุดการทดลอง เดือน กุมภาพันธ์ 2544

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง





ภาพที่ 1 ต้นเงินไหลมา *Syngonium podophyllum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ผลการทดลอง

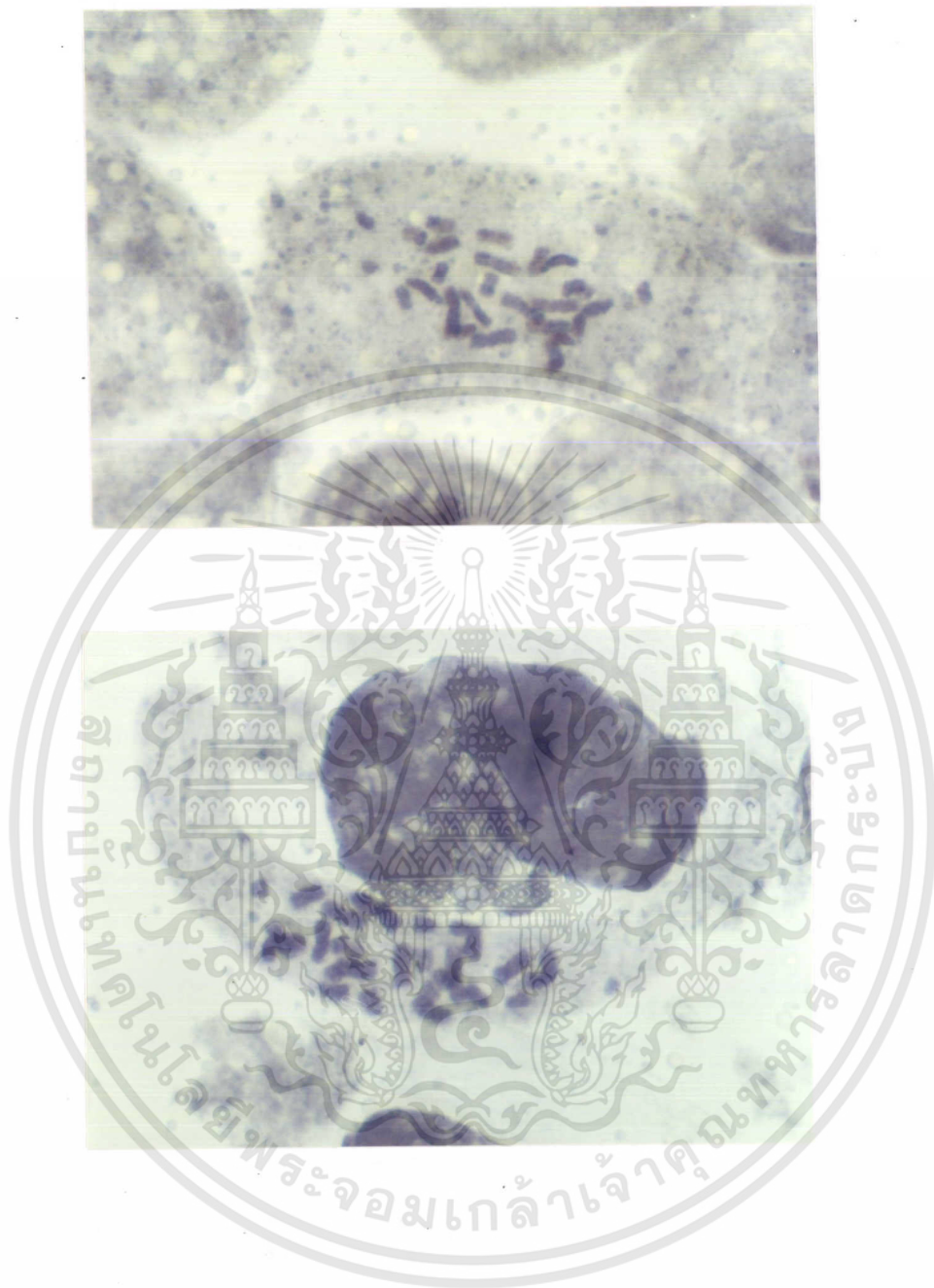
จากการทดลองนับจำนวนโครโมโซมของ *Syngonium* จากเซลล์ของปลายรากโดยวิธี squash พบว่า การเก็บตัวอย่างปลายรากนั้น ปลายรากที่สามารถจะนำไปศึกษาโครโมโซมได้ชัดเจนและสะดวกต่อการทดลอง คือ ปลายรากของต้นที่มีความแข็งแรง เป็นรากแขนง ปลายรากมีสีเขียวชุน ขนาดสมบูรณ์ ปลายรากที่พบว่ามี การแบ่งตัวของเซลล์เป็นปลายรากที่มีสีเหลืองอ่อนบริเวณที่มีการแบ่งเซลล์ คือ บริเวณจากปลายรากเข้ามา 3 - 5 มิลลิเมตร ช่วงเวลาที่เหมาะสมกับการศึกษาโครโมโซม คือ เวลา 9.00 - 10.00 นาฬิกา การหยุดวงจรเซลล์ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ที่ความเข้มข้น 0.002 M ควรแช่รากไว้นานประมาณ 4-6 ชั่วโมง การรักษาสภาพเซลล์ในน้ำยา Fixative ( alcohol 95 % + acetic acid ) ควรใช้เวลาประมาณ 5 นาที การแยกเซลล์ในสารละลาย HCl ใช้เวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °C การย้อมสีเนื้อเยื่อปลายราก พบว่า การแช่ปลายรากในสี acetocarmine เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง จะช่วยให้เนื้อเยื่อปลายรากติดสีเข้ม และทำให้โครโมโซมติดสีเข้มสามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจน (ภาพที่ 2,3)

ในการศึกษาโครโมโซม เมื่อพบเซลล์ที่มีการแบ่งตัว เลือกเซลล์ที่มีรูปร่างปกติ เห็นขอบเขตของเซลล์ชัดเจน เป็นเซลล์ที่อยู่ห่างไกลจากเซลล์ข้างเคียงและมีโครโมโซมกระจายตัวไม่ซ้อนทับกัน นับจำนวนโครโมโซมซึ่งอยู่ในระยะเมตาเฟสของการแบ่งเซลล์ ใช้จำนวนเซลล์เพื่อยืนยันอย่างน้อย 10 เซลล์ต่อราก และทำการศึกษาจากปลายราก ต้นละ 3 ราก ให้ได้จำนวน 300 เซลล์ โดยทำการทดลอง 10 ต้น หลังจากนั้นบันทึกภาพโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลการตรวจนับจำนวนโครโมโซมปลายรากของ *Syngonium* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม  $2n = 24$  ( ตาราง ที่ 1 )

ตารางที่ 1 แสดงเวลาที่เหมาะสมและจำนวนโครโมโซมที่นับได้

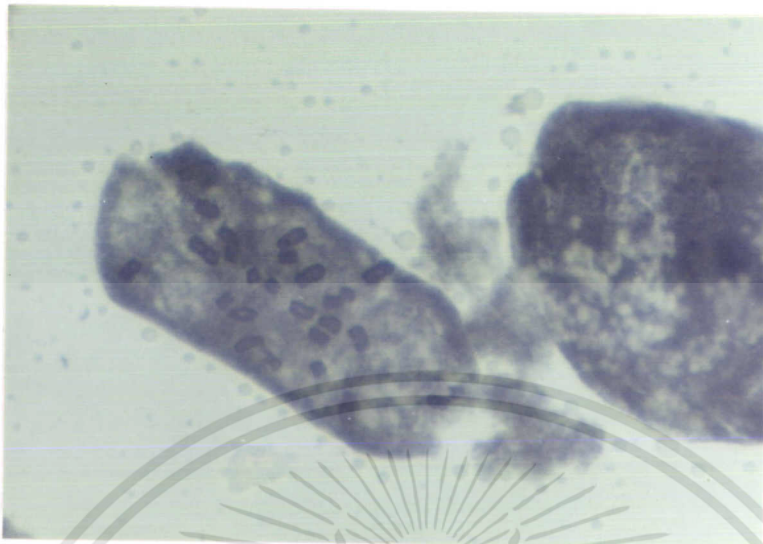
ต้นที่	เวลา	รากที่	จำนวน โครโมโซมที่นับได้ ( 2n )
1	9.00 - 10.00 น.	1 , 2 , 3	24, 24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24
2	9.00 - 10.00 น.	1 , 2 , 3	24, 24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24
3	9.00 - 10.00 น.	1 , 2 , 3	24, 24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24
4	9.00 - 10.00 น.	1 , 2 , 3	24, 24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24
5	9.00 - 10.00 น.	1 , 2 , 3	24, 24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24
6	9.00 - 10.00 น.	1 , 2 , 3	24, 24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24
7	9.00 - 10.00 น.	1 , 2 , 3	24, 24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24
8	9.00 - 10.00 น.	1 , 2 , 3	24, 24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24
9	9.00 - 10.00 น.	1 , 2 , 3	24, 24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24
10	9.00 - 10.00 น.	1 , 2 , 3	24, 24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24 ,24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 แสดงจำนวนโครโมโซมของ *Syngonium podophyllum*  $2n=24$  ถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์  
กำลังขยาย 1000x

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 แสดงจำนวนโครโมโซมของ *Syngonium podophyllum*  $2n=24$  ถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์  
กำลังขยาย 1000x

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครโมโซมมีการติดสีที่ชัดเจนและหัดตัวเป็นแห่งสั้นๆ กระจายทั่วบริเวณกลางเซลล์ มีบางแห่งที่ทับกันบ้างหรือเห็นไม่ชัดเจน ต้องใช้เทคนิคในการปรับโฟกัสของกล้องจุลทรรศน์เข้าช่วยในการนับ แต่หากได้ภาพที่เห็นโครโมโซมชัดเจนก็จะทำการบันทึกภาพ จากการนับโครโมโซมของปลาสร้อยตัวอย่างที่เก็บในเวลา 9.00-10.00 น. จำนวน 10 ต้น ต้นละ 3 ราก นับรากละ 10 เซลล์ ดังตารางที่ 1 โดยวิธีการ pretreatment ด้วยสารละลาย 8-hydroxyquinoline ที่ความเข้มข้น 0.002 M เป็นเวลา 4 – 6 ชั่วโมง จากนั้น fixative เป็นเวลา 10 นาที แต่จากการทดลองใช้เวลา 5 นาที แล้วย้อมสีด้วย acetocamine เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจะช่วยให้โครโมโซมของ syngonium ติดสี และนำสไลด์ที่เตรียมได้ตรวจหาโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบจำนวนโครโมโซม  $2n = 24$  ซึ่งมีจำนวนสอดคล้องกับ พีชชนิดอื่นในวงศ์ Araceae Moore ,R.J. ( 1972)



### เอกสารอ้างอิง

- ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ. 2539. ไม้ประดับมงคล. บริษัทเจเนอรัลบุ๊คส์ จำกัด. กรุงเทพฯ
- ดิเรก ตนพยอม. 2537. “ผลของจำนวนชุดโครโมโซมต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของเยอบีร่า”. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิศย์ศรี แสงเดือน. 2541. พันธุศาสตร์พืช. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นฤมล ประสารไมตรี. 2535. ไม้กระถาง. เพ็ญฟ้าเนอสเซอรี่. เชียงใหม่
- ประชิด วามานนท์. 2523. วารสารพืชสวน ปีที่ 15 ฉบับที่ 4. สโมสรพืชสวน ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน. กรุงเทพฯ
- ปกขวัญ หุตางกูร, นุศบรณ ณ สงขลา และสุมิตรา คงชื่นสิน. 2530. “การตรวจสอบจำนวนโครโมโซมใน *Ocium* spp. บางชนิดเพื่อการศึกษาทางอนุกรมวิธาน”. รวมผลงานวิชาการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 5. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, หาดใหญ่.
- ประวัติ สมเป็น. 2526. “โครโมโซมของปลาช่อนกล้วย”. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พ่องพรรณ จรัสจินดารัตน์, วีรินทร์ อันทะแบก และอุดมลักษณ์ นิลศิริ. 2538. งานวิจัยเรื่องจำนวนโครโมโซมมะตูม. วิทยาลัยเกษตรมหาสารคาม.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2536. พันธุศาสตร์. ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.
- วาสนา มิตรานนท์. 2527. “การศึกษาลักษณะของพฤกษศาสตร์ของสกุลบัวหลวง (*Nelumbo Adans.*) ในประเทศไทย”. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิสุทธิ ใบไม้. 2536. พันธุศาสตร์. เจ้าพระยาการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- ศิริพร หาญนนทวิวัฒน์ และฉันทนา สุวรรณชาติ. 2540. “การศึกษาโครโมโซมว่านมหาลาก”. วารสารเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร. 2542. “ผลของรังสีต่อการกลายพันธุ์ของบัวหลวงพันธุ์สัตตบุษย์ในสภาพปลอดเชื้อ”. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- สาริณี ไชยเจริญ. 2537. “การศึกษาจำนวนโครโมโซมกล้วยไม้หวาย” มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุณิสา สุนะรินทร์, คำเนิน กาละดีและฉันทนา สุวรรณธาดา. 2543 . “ สัณฐานวิทยาของโครโมโซมข้าว 5 พันธุ์”. วารสารเกษตร 16(1): 46-52.
- อมรา คัมภีวานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. เท็กซ์แอนด์เอนเจอร์นัลพับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ
- อฤชร พงษ์ไสว. 2541 . ไม้เลื้อยประดับ. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. กรุงเทพฯ
- อัมพิกา ปุณนจิต. 2527. “ชีววิทยาของดอกและจำนวนโครโมโซมของท้อเก้าพันธุ์”. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุษณีย์ ปักษาส. 2531. “การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของดอกและจำนวนโครโมโซมของกีวีฟรุต”. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Moore,R.J. 1972. **Index to plant chromosome number for 1972.** Utrechi Netherlands