

การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้ดินช้างผสมโขลง

Chromosome Investigation of *Eulophia graminea* Lindl.

จารุภัทร ประราศรี^{1/} และ จันทนา สุวรรณธาดา^{1,2/}

Jarupat Prarasi^{1/} and Chuntana Suwanthada^{1,2/}

Abstract: Root-tip preparation techniques for somatic chromosome investigation of *Eulophia graminea* Lindl. were studied. The studies comprised of 1) root-tip sampling at 8.00, 9.00, 10.00, 11.00 and 12.00 am, 2) pre-treatment durations in para-dichlorobenzene (PDB) of 0, 30 minutes, 1, 2 and 3 hours and 3) staining durations in carbol fuchsin of 1, 6, 12, 24, 36 and 48 hours. The results showed suitable technique of root-tip preparation for chromosome investigation being root tip sampling at 11.00 am followed by fixation without PDB treatment then stained with carbol fuchsin for 1 hour. Chromosome counts from squashed cells revealed the root tip chromosome number of *E. graminea* Lindl. as $2n = 56$.

Keywords: *Eulophia graminea* Lindl., chromosome

บทคัดย่อ: การศึกษาเทคนิคในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้ดินช้างผสมโขลง เพื่อศึกษาโครโมโซม ประกอบด้วย 1) การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างปลายรากโดยทดลองเก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 8.00, 9.00, 10.00, 11.00 และ 12.00 น. 2) การหาความยาวนานที่เหมาะสมในการหยุดวงจรเซลล์ โดยแช่ปลายรากในสารละลาย para-dichlorobenzene (PDB) นาน 0, 30 นาที 1, 2 และ 3 ชั่วโมง และ 3) การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการย้อมสีปลายรากด้วยสารละลาย carbol fuchsin นาน 1, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง จากผลการทดลองสามารถสรุปวิธีปฏิบัติที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของช้างผสมโขลงเพื่อศึกษาโครโมโซม คือ เก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 11.00 น. แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ โดยไม่ต้องผ่านการหยุดวงจรเซลล์ใน PDB จากนั้นย้อมปลายรากด้วยสี carbol fuchsin นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงขยี้เนื้อเยื่อจากการตรวจนับโครโมโซม พบว่า เซลล์ปลายรากของช้างผสมโขลงมีโครโมโซม $2n = 56$

คำสำคัญ: กล้วยไม้ช้างผสมโขลง โครโมโซม

^{1/} ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{2/} ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ 50220

^{1/} Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^{2/} Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Doi Saket, Chiang Mai 50220, Thailand

คำนำ

ข้าวผสมไขลง (*Eulophia graminea* Lindl.) เป็นกล้วยไม้ดินที่พบในบริเวณป่าโปร่งหรือป่าผลัดใบทั่วประเทศ (อบจันทร์, 2547) แต่ในปัจจุบันไม่ค่อยจะพบกล้วยไม้ชนิดนี้มากนักในสภาพธรรมชาติ เนื่องจากมีการนำออกไปจากแหล่งเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ โดยไม่มีการทดแทน ทำให้ปริมาณของข้าวผสมไขลงในป่าลดน้อยลงเรื่อย ๆ นอกจากการรุกรานโดยมนุษย์แล้วการลดลงของข้าวผสมไขลงยังมีผลมาจากสภาพทางนิเวศวิทยาของแหล่งกระจายพันธุ์อีกด้วย ดังมีรายงานว่ากล้วยไม้ดินชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิตในสภาพที่แห้งแล้งได้และต้นพืชที่เกิดจากเมล็ดที่กระจายไปตกในพื้นที่ป่าที่มีความแห้งแล้งยาวนานจะตายไปก่อนที่จะสร้างลำลูกกล้วย (ฉันทนา และคณะ, 2547) สภาวะดังกล่าวจึงทำให้กล้วยไม้ดินชนิดนี้มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในอนาคต

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ได้รวบรวมข้าวผสมไขลงที่สำรวจพบในพื้นที่ป่าภายในศูนย์ฯ และพื้นที่อื่น ๆ ในเขตป่าสงวนแห่งชาติป่าขุนแม่กวงไว้เพื่อการอนุรักษ์พันธุ์กรรมของกล้วยไม้ชนิดนี้ และเพื่อการศึกษาการใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ การศึกษาโครโมโซมของข้าวผสมไขลงครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานอนุรักษ์และศึกษาพันธุ์โดยเป็นการศึกษาเทคนิคในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากเพื่อศึกษาโครโมโซมวิธีการพื้นฐานที่จะได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้ชนิดนี้ในสายพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อเป็นข้อมูลเสริมข้อมูลจำเพาะทางด้านพฤกษศาสตร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในกลุ่มและระหว่างกลุ่มของข้าวผสมไขลงที่เก็บรวบรวมมาจากพื้นที่ที่มีสภาพทางนิเวศวิทยาแตกต่างกัน

วิธีการทดลอง

ศึกษาโครโมโซมของพืชทดลองคือข้าวผสมไขลงสายพันธุ์ที่พบเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติใน

ป่าเต็งรังของศูนย์ฯ โดยศึกษาจากเซลล์ของเนื้อเยื่อปลายรากด้วยวิธี Feulgen's squash ซึ่งดัดแปลงโดยดวงทิพย์ (2539) เริ่มจากการเก็บตัวอย่างปลายรากอ่อนในเวลา 8.00, 9.00, 10.00, 11.00 และ 12.00 น. ตัดส่วนปลายมา 3-5 มิลลิเมตร แล้วหยดวงซีพของเซลล์เนื้อเยื่อปลายรากเหล่านั้นในสารละลาย para-dichlorobenzene (PDB) ที่อุณหภูมิเป็นเวลา 30 นาที, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการม้วนวิธีควบคุมที่ไม่หยดวงซีพของเซลล์ จากนั้นตรึงเซลล์ในน้ำยาคาร์บอนนาน 5 นาที ล้างปลายรากให้สะอาดก่อนนำไปย่อยแยกเซลล์ใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำแล้วย้อมสีเนื้อเยื่อในสารละลาย carbol fuchsin นาน 1, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำปลายรากที่ผ่านการย้อมสีแล้ววางบนแผ่นกระจก ใช้เข็มเขี่ยตัดเอามาเฉพาะปลายรากให้มีความยาว 1-2 มิลลิเมตร หยดสีลงไปอีก 1 หยด ขยี้ปลายรากแล้วใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อให้เซลล์กระจาย ปิดด้วยแผ่นปิดกระจก วางกระดาษซับบนแผ่นปิดกระจก กดด้วยหัวแม่มือเพื่อให้เซลล์กระจายแล้วขั้วสีที่มากเกินไปออก นำแผ่นกระจกไปศึกษาเซลล์ปลายรากใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟส นับจำนวนโครโมโซม แล้วบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาเทคนิคในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของข้าวผสมไขลงเพื่อศึกษาโครโมโซมครั้งนี้เป็นการนำวิธีการศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อพืชโดยวิธีขี้มาดัดแปลงโดยการแบ่งระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมเนื้อเยื่อออกเป็นช่วงที่แตกต่างกัน เพื่อให้ได้กรรมวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการปฏิบัติ ผลการทดลองมีดังนี้

การเก็บตัวอย่างปลายราก

การเก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 8.00, 9.00, 10.00, 11.00 และ 12.00 น. แล้วนำแต่ละกรรมวิธีไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาโครโมโซมนั้นพบว่ากรรมวิธีที่เก็บปลายรากที่เวลา 8.00, 9.00 และ

10.00 น. นั้นได้เซลล์ปลายรากที่อยู่ในระยะเริ่มต้นของเมตาเฟส เห็นได้ว่าโครโมโซมมีการหดตัวเล็กน้อย ส่วนกรรมวิธีที่เก็บปลายรากเวลา 11.00 น. ได้เซลล์ที่มีโครโมโซมหดตัวเป็นแท่งเห็นได้ชัดเจน และกรรมวิธีที่เก็บปลายรากที่เวลา 12.00 น. พบว่าเซลล์อยู่ในระยะอินเตอร์เฟส ดังเห็นได้จากภาพที่ 1

การหยุดวงจรเซลล์

การทดลองนี้เป็นการทดลองที่สืบเนื่องมาจากข้อ 1 โดยการเก็บตัวอย่างปลายรากตามกรรมวิธีที่ได้ผลดีที่สุดข้อ 1 คือเวลา 11.00 น. แล้วนำไปทดลองหยุดวงจรเซลล์ในสารละลาย PDB ที่อุณหภูมิประมาณ 15 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการวิธีควบคุมที่ไม่แช่ตัวอย่างปลายรากใน PDB จากนั้นนำเนื้อเยื่อปลายรากดังกล่าวไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อแล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลการทดลองปรากฏว่าทุกกรรมวิธีรวมทั้งกรรมวิธีควบคุมให้เซลล์ที่มีโครโมโซมที่สั้น เห็นรูปร่างชัดเจน และสามารถนับจำนวนได้แน่นอน ดังแสดงในภาพที่ 2

การย้อมสีโครโมโซม

การทดลองเพื่อหาระยะเวลาความยาวนานที่เหมาะสมของการแช่ปลายรากในสีที่ใช้ย้อมโครโมโซมเป็นการทดลองต่อเนื่องจากข้อ 1 และ 2 โดยใช้วิธีการเก็บตัวอย่างปลายรากและการหยุดวงจรเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 1 และ 2 มาเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ กล่าวคือเก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 11.00 น. นำเนื้อเยื่อไปย้อมด้วยสี carbol fuchsin นาน 1, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยไม่ผ่านกรรมวิธีการหยุดวงจรเซลล์ได้ผลคือทุกกรรมวิธีให้เซลล์ปลายรากที่มีโครโมโซมติดสีเข้มสม่ำเสมอและเห็นชัดเจน (ภาพที่ 3)

จากผลที่ได้จากการทดลองที่รายงานไว้ข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่าเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากเพื่อศึกษาโครโมโซมของช้างผสมโคลง คือการเก็บตัวอย่างปลายราก และเก็บในช่วงเวลา 11.00 น. จากนั้นแช่ปลายรากในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที

ย้อมด้วยสี carbol fuchsin นาน 1 ชั่วโมง วิธีการนี้นอกจากจะเป็นวิธีการที่ได้ผลดีแล้วยังช่วยลดขั้นตอนของการเตรียมเนื้อเยื่อได้ โดยที่ไม่ต้องหยุดวงจรเซลล์ก็สามารถเห็นโครโมโซมชัดเจน และนับวันได้แม่นยำ อนึ่งในการย้อมสีเนื้อเยื่อนั้น แม้จะสรุปได้ว่ากรรมวิธีการย้อมสีนาน 1 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ยาวนานที่สุดในการทดลองครั้งนี้เป็นช่วงเวลาที่ดียิ่งที่สุด แต่ก็ยังอาจจะลดระยะเวลาการย้อมสีให้สั้นลงอีกได้ จึงควรมีการทดลองต่อไปในแง่

จำนวนโครโมโซม

การศึกษาโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก พบว่าช้างผสมโคลงมีจำนวนโครโมโซม $2n = 56$ (ภาพที่ 4) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับที่ Goldblatt (1981, 1984) และ Felix and Guerra (2000) ได้เสนอผลของการศึกษาโครโมโซมของช้างผสมโคลง ที่ศึกษาโดย Mehra and Sehgel (1975) Biswas (1978, 1980) ว่ากล้วยไม้ชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม $2n = 54$ และ 56

สรุป

การทดลองเพื่อหาเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของช้างผสมโคลง เพื่อศึกษาโครโมโซม พบว่าวิธีที่เหมาะสมที่สุด คือ การเก็บตัวอย่างปลายรากในเวลา 11.00 น. แช่ปลายรากในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที และจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่าช้างผสมโคลงมีจำนวนโครโมโซม $2n = 54$

เอกสารอ้างอิง

ฉันทนา สุวรรณธาดา จารุกัทร ประภาศรี ประภัสสร อารยะกิจเจริญชัย และ รณณรงค์ อินทภูติ. 2547. การเจริญเติบโตและการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้ช้างผสมโคลง. หน้า 40. ใน: บทคัดย่อการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 4. 4-7 พฤษภาคม 2547, โรงแรมเจบีหาดใหญ่, สงขลา.

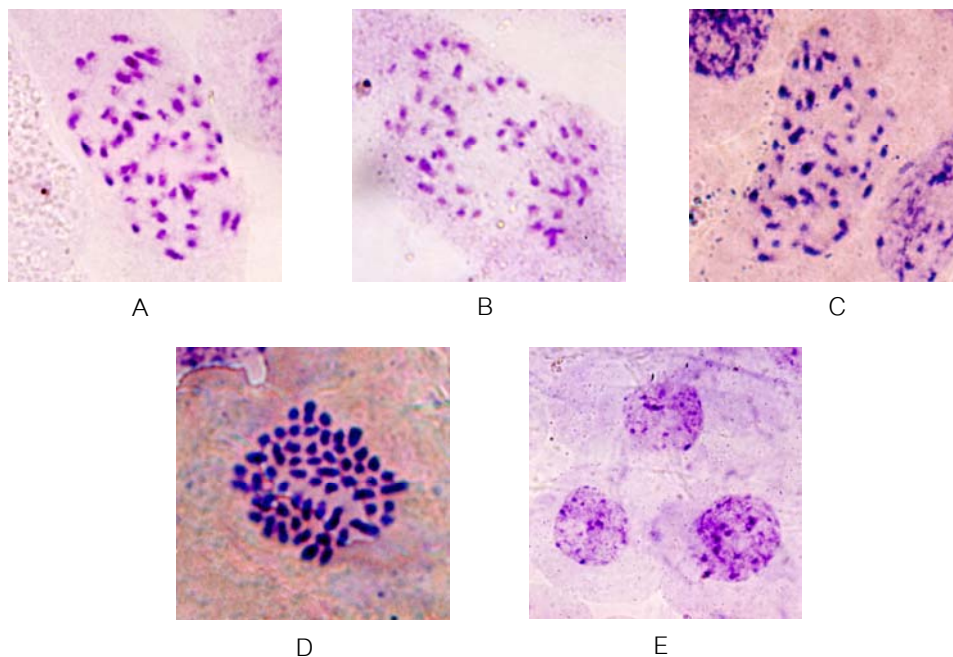


Figure 1 Somatic chromosomes of root-tip cells collected at different durations of time.

A = 8.00 am (1,180 X), B = 9.00 am (1,025 X), C = 10.00 am (1,050 X),
D = 11.00 am (1,575 X), E = 12.00 am (675 X)

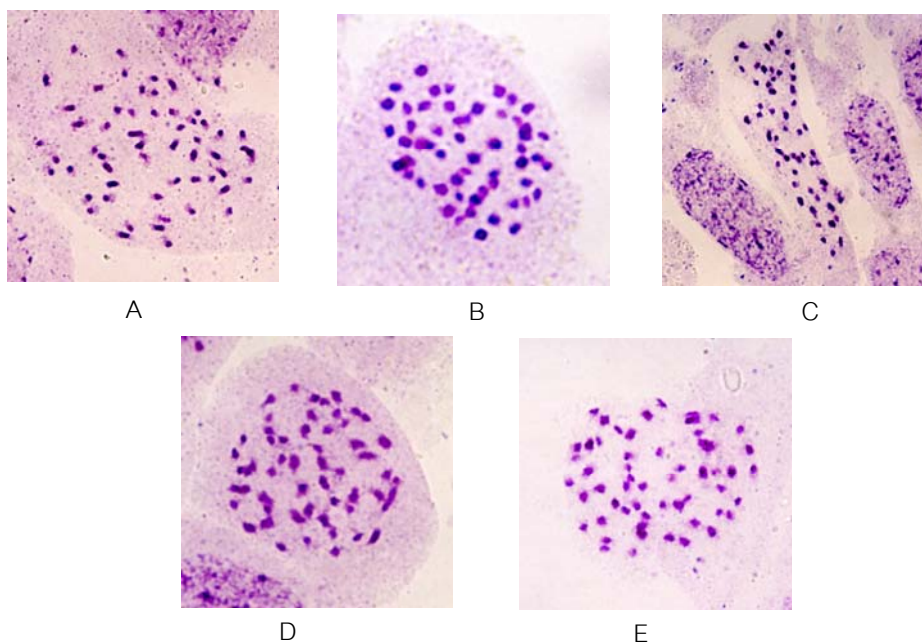


Figure 2 Somatic chromosomes of root-rip cells pre-treated at different durations of time.

A = control (750 X), B = 30 minute (1,240 X), C = 1 hour (725 X),
D = 2 hours (1,180 X), E = 3 hours (985 X)

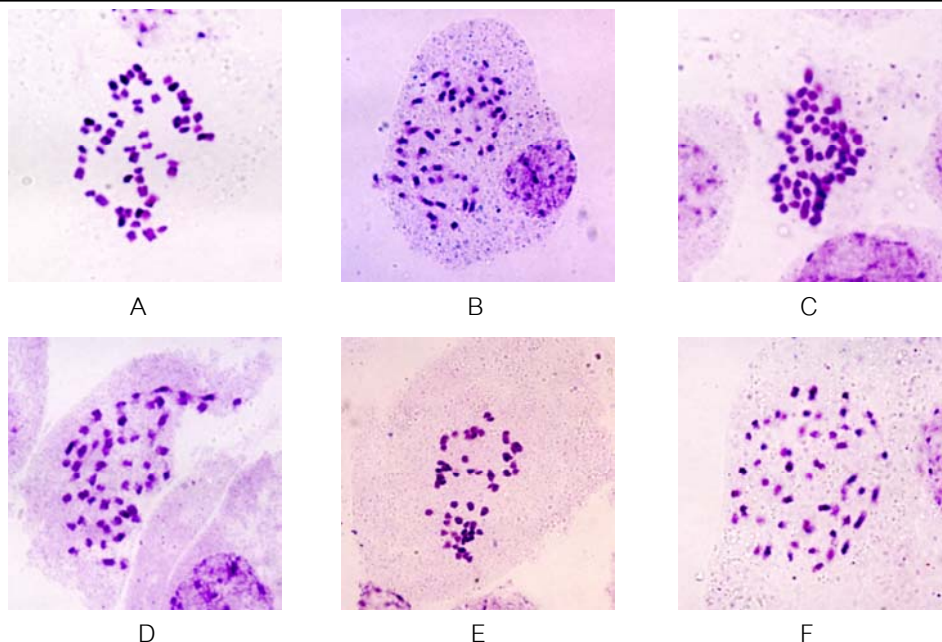


Figure 3 Somatic chromosomes of root-tip cells stained at different durations of time.

A = 1 hour (1,180 X), B = 6 hours (860 X), C = 12 hours (1,125 X),
D = 24 hours (985 X), E = 36 hours (675 X), F = 48 hours (890 X)

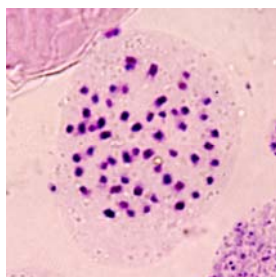


Figure 4 Somatic chromosomes of root-tip cells (1,075 X).

ดวงทิพย์ วิทยศักดิ์. 2539. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
กายวิภาควิทยา และเซลล์วิทยาของว่านสี่ทิศ.
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 105 หน้า.
อบจันทร์ ไททอง. 2547. กล้วยไม้เมืองไทย. สำนักพิมพ์
บ้านและสวน, กรุงเทพฯ. 461 หน้า.
Felix, L. P. and M. Guerra. 2000. Cytogenetics and
cytotaxonomy of some Brazilian species of
Cymbidioid orchids. Genetics and
Molecular Biology 23(4): 957-978.

Goldblatt, P. (ed.). 1981. Index to plant chromosome
numbers 1975 -1978. Monographs in
Systematic Botany 5. Missouri Botanical
Garden, St. Louis, MO.
Goldblatt, P. (ed.). 1984. Index to plant chromosome
numbers 1979 -1981. Monographs in
Systematic Botany 8. Missouri Botanical
Garden, St. Louis, MO.