

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของว่านสีทึดพันธุ์พื้นบ้านและพันธุ์ลูกผสม

Chromosome Investigation of Local Variety and Hybrids of Amaryllis

ประภัศร อารยะกิจเจริญชัย^{1/} และ ฉันทนา สุวรรณธาดา^{1/}

Praphatsorn Arayakitcharoenchai^{1/} and Chuntana Suwanthada^{1/}

Abstract : Suitable technique of root tip preparation for somatic chromosome investigation of amaryllis via squash method was described. Root tip samples were best taken during 09.30–10.00 a.m. The tissue was then pretreated in PDB for 48 hours at 10 °C prior to 5 minutes of fixation in fixative solution. Maceration was done in 1 N HCl solution for 5 minutes. Tissue staining in carbol fuchsin for 24 hours was carried out before squashing. Chromosome investigations of the red small – flowered local variety (R), Apple Blossom (P), Orange Sovereign (O) and their hybrids revealed the chromosome numbers being $2n = 22$ in R, $2n=44$ in P and O, $2n = 33$ in R x P, $2n = 34$ in R x O and $2n = 36$ in O x R.

บทคัดย่อ : การศึกษาโครโมโซมของว่านสีทึดจากเซลล์ปลายรากพบว่าเทคนิคที่เหมาะสมในการศึกษา คือ เก็บตัวอย่างรากระหว่าง 09.30-10.00 น. หยดวางจีฟเซลล์ใน PDB ที่อุณหภูมิ 10 °C นาน 48 ชั่วโมง รักษาสภาพเซลล์ในน้ำยานาน 5 นาที และแยกเซลล์ใน HCl 1 N นาน 5 นาที ย้อมเนื้อเยื่อรากด้วยสี carbol fuchsin นาน 24 ชั่วโมง ผลการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า พันธุ์พื้นบ้านดอกเล็กสีแดง (R) มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ พันธุ์ Apple Blossom (P) และ Orange Sovereign (O) มีจำนวนโครโมโซม $2n = 44$ ลูกผสม R x P, R x O และ O x R มีจำนวนโครโมโซม $2n = 33$, $2n = 34$ และ $2n = 36$ ตามลำดับ

Index words : ว่านสีทึด โครโมโซม
Amaryllis, chromosome

^{1/}ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

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

คำนำ

ว่านสีทิสเป็นไม้ดอกประเภทหัวที่มีการเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนและกึ่งร้อน ปัจจุบันได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายและเป็นไม้ตัดดอกที่มียอดขายสูงในตลาดประมูลดอกไม้ในต่างประเทศ นอกจากนี้ว่านสีทิสยังใช้เป็นไม้กระถางและไม้ประดับสนามได้อีกด้วย ไม้ดอกชนิดนี้แม้ว่าจะเจริญเติบโตและให้ดอกได้ดีในสภาพธรรมชาติของประเทศไทย และเป็นที่นิยมของตลาดภายในประเทศแต่ก็ยังมีความจำกัดตรงที่ความนิยมดังกล่าวมุ่งไปยังพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ให้ดอกขนาดใหญ่และมีสีต้นสวยงาม แต่พันธุ์เหล่านี้ยังคงมีปัญหาในด้านการขนส่งผลผลิตสู่ตลาด เนื่องจากดอกมีขนาดใหญ่และน้ำหนักมาก ดังนั้นการสร้างพันธุ์ใหม่โดยการผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ลูกผสมจากว่านสีทิสพันธุ์ดอกใหญ่กับพันธุ์พื้นบ้านดอกเล็ก ซึ่งนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเป็นเวลานาน จนมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมมากกว่าพันธุ์การค้าจากต่างประเทศ โดยมุ่งหวังที่จะได้ลูกผสมที่มีความสวยงามและมีขนาดของช่อดอกเล็กลง ตลอดจนมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมโรคและแมลง จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว

การศึกษาการผสมพันธุ์ว่านสีทิสดังกล่าวพบว่าสามารถสร้างลูกผสมในแนวทางดังกล่าวได้ การศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเป็นการศึกษาเทคนิคเพื่อศึกษาโครโมโซมของว่านสีทิสจากเนื้อเยื่อปลายราก จึงเป็นการศึกษาพื้นฐานที่สนับสนุนการศึกษาวิจัยในการพัฒนาพันธุ์ว่านสีทิสในอนาคตได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1.1 พืชทดลอง

ว่านสีทิสพันธุ์พื้นบ้านดอกเล็กสีแดง (R) ว่านสีทิสพันธุ์ดอกใหญ่จากต่างประเทศ คือ พันธุ์ Apple Blossom (P) และพันธุ์ Orange Sovereign (O) และลูกผสม $R \times P$, $R \times O$ และ $O \times R$

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางเซลล์วิทยา

1.2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการหยุดวงจรเซลล์(pre-treatment) ได้แก่ para - dichloro benzene (PDB)

1.2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixative) คือ ethyl alcohol 95 % และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1

1.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับทำให้เซลล์แยกออกจากกันคือ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล (N)

1.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับย้อมสีโครโมโซม คือ carbol fuchsin

วิธีการ

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลอง ตามวิธี Feulgen squash method (ภูวคณ, 2528; Dyer, 1979) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 เตรียมรากพืชโดยนำหัวของพืชทดลองมาตัดรากเก่าทิ้งแล้วนำไปชำในกระบะที่บรรจุวัสดุเพาะ หลังจากนั้น 5-7 วัน รากจะงอกออกมาจากฐานของหัว

2.2 เก็บตัวอย่างรากในช่วงเวลาระหว่าง 09.30 - 10.00 นาฬิกา (น) โดยเลือกรากที่มีความยาว 3 - 5 มิลลิเมตร (มม) ใช้รากที่ปลายรากมีสีขาวขุ่น

2.3 หยุดวงจรของเซลล์โดยนำปลายรากที่ได้มาแช่ในสารละลาย PDB ที่อุณหภูมิในน้ำเป็นเวลานาน

24-48 ชั่วโมง

2.4 รักษาสภาพเซลล์ โดยนำรากที่แช่ในสารละลาย PDB ออกมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที แล้วล้างรากให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น

2.5 แยกเซลล์ โดยการแช่รากลงใน HCl เข้มข้น 1 N ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

2.6 ย้อมสีเนื้อเยื่อใน carbol fuchsin เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

2.7 นำปลายรากที่ผ่านการย้อมสีแล้ววางบนแผ่นสไลด์ขี้นปลายรากด้วยเข็มเขี่ยแล้วหยดสี carbol fuchsin 1 หยด ตรงบริเวณที่มีปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อปลายรากให้เซลล์กระจาย ใช้ปากคีบจับส่วนของรากที่ไม่ต้องการออกแล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ วางกระดาษซับบนแผ่นสไลด์แล้วกดแผ่นกระจกปิด สไลด์เพื่อให้เซลล์กระจาย ชับสีที่มากเกินไปออก

2.8 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส และเป็นเซลล์ที่มีการกระจายตัวของโครโมโซม นับจำนวนโครโมโซมแล้วบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลอง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชทดลองพบว่า การเก็บตัวอย่างรากของพืชทดลองทุกพันธุ์ ถ้ากระทำในช่วงเวลาระหว่าง 09.30-10.00 น. จะได้ตัวอย่างปลายรากที่มีเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟส และเมื่อนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนการเตรียมดังกล่าวในข้อ 2 แล้วจะพบเนื้อเยื่อที่มีเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเป็นจำนวนมาก โครโมโซมติดสีชัดเจนและกระจายตัวดีสามารถนับจำนวน

โครโมโซมได้แม่นยำและเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อตรวจหาและตรวจนับโครโมโซม ผลการตรวจนับจำนวนโครโมโซมของว่านสี่ทิศที่ทดลองมีดังนี้

ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นบ้าน (R)

มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ (ภาพที่ 1a)

ว่านสี่ทิศพันธุ์ Apple Blossom (P)

มีจำนวนโครโมโซม $2n = 44$ (ภาพที่ 1b)

ว่านสี่ทิศพันธุ์ Orange Sovereign (O)

มีจำนวนโครโมโซม $2n = 44$ (ภาพที่ 1c)

ว่านสี่ทิศลูกผสม $R \times O$

มีจำนวนโครโมโซม $2n = 34$ (ภาพที่ 2a)

ว่านสี่ทิศลูกผสม $R \times P$

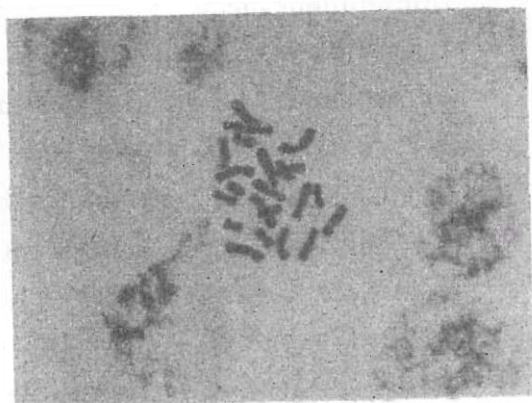
มีจำนวนโครโมโซม $2n = 33$ (ภาพที่ 2b)

ว่านสี่ทิศลูกผสม $O \times R$

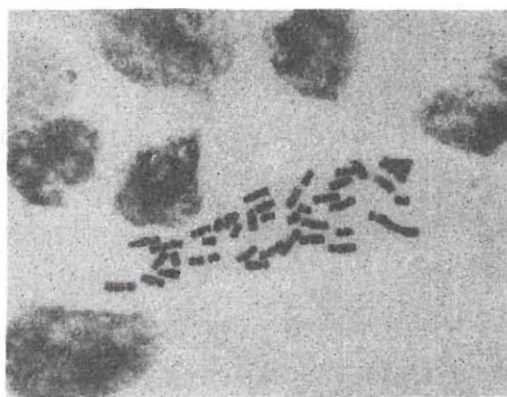
มีจำนวนโครโมโซม $2n = 36$ (ภาพที่ 2c)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

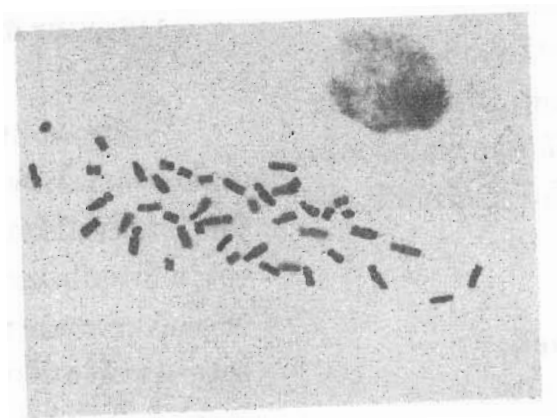
การทดลองครั้งนี้ได้เทคนิคที่เหมาะสมในการศึกษาโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของว่านสี่ทิศ ซึ่งสามารถนำไปใช้สำหรับการตรวจหาโครโมโซมของว่านสี่ทิศชนิดและพันธุ์ต่างๆ ตลอดจนลูกผสมที่เกิดจากการผสมและปรับปรุงพันธุ์ สามารถเตรียมตัวอย่างรากเพื่อการศึกษาโครโมโซมได้แม่นยำและไม่เสียเวลามากในการเตรียม นอกจากนี้เทคนิคที่ได้จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมปลายรากของว่านสี่ทิศที่ทำการทดลอง พบว่า พันธุ์พื้นบ้าน ดอกเล็กสีแดง (R) มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ สอดคล้องกับรายงานของวนิดา (2523) ที่รายงานไว้ว่าว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองที่พบในประเทศไทย เช่น แดงปากช่อง มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ และพบว่าพันธุ์ Apple Blossom (P) และพันธุ์ Orange Sovereign (O) มีจำนวนโครโมโซม $2n = 44$ และลูก



a.



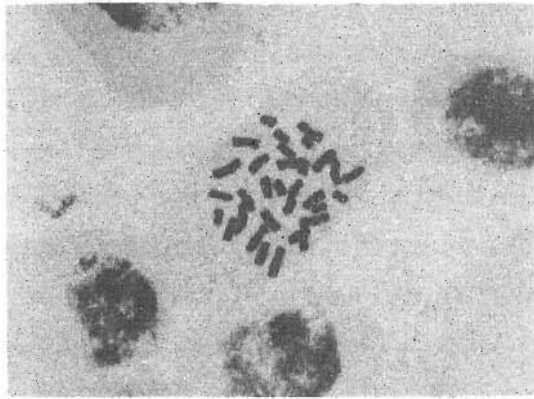
b.



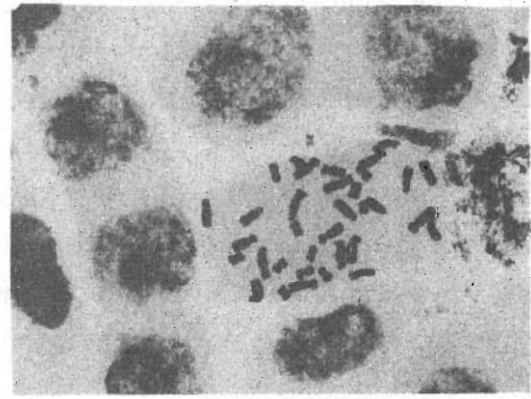
c.

Figure 1 Somatic chromosome of amaryllis.

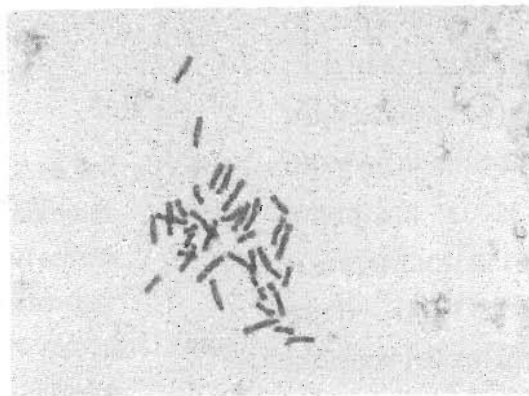
- a. local red small - flowered $2n=22$ (471 X)
- b. Apple Blossom $2n=44$ (471 X)
- c. Orange Sovereign $2n=44$ (471 X)



a.



b.



c.

Figure 2 Somatic chromosome of the hybrids.

- a. R x P $2n=33$ (471 X)
- b. R x O $2n=34$ (471 X)
- c. O x R $2n=36$ (471 X)

ผสมที่ได้จากการผสมของพันธุ์ R, P และ O นั้นลูกผสมจากคู่ผสมต่างๆ มีจำนวน โครโมโซม $2n$ เป็น 33, 34 และ 36 ในลูกผสมของ $R \times P$, $R \times O$ และ $O \times R$ ตามลำดับ จากการศึกษา น่าจะสามารถนำไปใช้กับพืชชนิดอื่นที่มีความใกล้เคียงกันหรือไม่ดอกไม้ประดับประเภทหัว ที่มีโครงสร้างของหัวคล้ายคลึงกันได้

จากการศึกษาของ Arroyo (1982), Khaleel and Siemsen (1989), Laksmi (1980), Okubo (1993) และ Traub (1958) เสนอไว้ว่าจำนวนโครโมโซมพื้นฐานของ amaryllis เป็น $x = 11$ และจากผลการศึกษาที่ได้ครั้งนี้ พบว่าพันธุ์พืชพันธุ์พื้นบ้านดอกเล็กสีแดงมีจำนวนโครโมโซม เป็น $2n = 2x = 22$ ซึ่งกล่าวได้ว่าพันธุ์พืชพื้นบ้าน ดอกเล็ก สีแดงนี้มีระดับ ploidy เป็น diploid ส่วนพันธุ์ดอกใหญ่ 2 พันธุ์ (P และ O) นั้นมีจำนวนโครโมโซม $2n = 44$ จึงน่าจะเป็น tetraploid ($2n = 4x = 44$) และเมื่อพิจารณาจากจำนวนโครโมโซมของลูกผสมที่ได้จากการผสมของพันธุ์ดอกเล็กและพันธุ์ดอกใหญ่นั้น พบว่า ลูกผสมที่ได้เป็น triploid และ triploid ที่เป็น aneuploid กล่าวคือ มี $2n = 33, 34$ และ 36 คือ คู่ผสมของ $R \times P$ เป็น triploid มี $2n = 3x = 33$ และลูกผสมของ $R \times O$ เป็น triploid ที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นมา 1 แท่ง ในลักษณะ trisomy ($2n = 3x + 1 = 34$) ส่วนคู่ผสม $O \times R$ นั้นเป็น triploid ที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นมา 3 แท่ง แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น $2n = 3x + 1 + 1 + 1$ หรือ $2n = 3x + 2 + 1$ หรือ $2n = 3x + 3$ จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมให้ละเอียดกว่านี้

การผันแปรในลักษณะของ aneuploidy ดังที่พบจากการทดลองนี้ เมื่อใช้ต้นที่เป็น tetraploid เป็นพ่อแม่พันธุ์นั้น เป็นสิ่งที่น่าสนใจในการผสมพันธุ์ว่านสีทึบ เนื่องจากน่าจะได้รับความผันแปรในลักษณะทางสัณฐานที่มีคุณค่า ดังเช่น

ที่พบรายงานโดย Traub (1958) และ Khaleel and Siemsen (1989) ว่ามี amaryllis ที่เป็น $2n = 4x = 43, 45$ และการผันแปรในลักษณะดังกล่าว น่าจะเกิดได้ง่ายในว่านสีทึบ เมื่อใช้ต้นพ่อแม่พันธุ์ที่เป็น tetraploid ดังจะเห็นได้จากการทดลองนี้ว่าเกิด aneuploidy ได้ถึง 2 ลักษณะ อนึ่งจากการศึกษาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าโครโมโซมของว่านสีทึบมีขนาดค่อนข้างใหญ่ติดสี ย้อมชัดเจนและโครโมโซมหดสั้น ได้มากจนสามารถเห็นลักษณะรูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจน ทั้งนี้ยกเว้นโครโมโซมของลูกผสมจาก $O \times R$ ที่โครโมโซมหดตัวน้อยกว่าจากตัวอย่างอื่นๆ ดังนั้นจึงทำให้น่าที่จะสามารถศึกษา karyotype ของโครโมโซมของลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ได้ไม่ยากควรที่จะมีการศึกษาเกี่ยวกับความผันแปรดังกล่าวได้และนำไปใช้ประโยชน์ ในการพัฒนาพันธุ์ว่านสีทึบต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- ภูวดล บุตรรัตน์. 2528. เทคนิคทางพฤกษศาสตร์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี, สงขลา. 213 น.
- วนิดา โสภณเวทยา. 2523. การใช้ colchicine ชักนำให้เกิด polyploid ในหัวว่านสีทึบ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 49 น.
- Arroyo, S. 1982. The chromosome of *Hippeastrum*, *Amaryllis* and *Phycella* (Amaryllidaceae). Hort. Abstr. 52 (11): 715.
- Dyer, A. F. 1979. Investigating Chromosome. Edward Arnold Ltd., London. 138p.

- Khaleel, T.F. and D. Siemsen. 1989. Cytoembryology of Amaryllis hybrids. Hort. Abstr. 59(11): 1,059.
- Laksmi, N. 1980. Cytotaxonomical studies in eight genera of Amaryllidaceae. Cytologia 45: 663-673.
- Okubo, H. 1993. Hippeastrum. In The Physiology of Flower Bulbs. A. A. de Hertogh and M. le Nard. eds., Elsevier, Amsterdam. p. 321-334.
- Traub, H.T. 1958. The Amaryllis Manual. The Macmillon Company, New York. 338 p.
-