บทที่ 6
การศึกษาจำนวนโครโมโซมของฟิวเชีย

โครโมโซมเป็นเส้นสายของ DNA ที่มีการขดพันกันเป็นแท่ง เมื่อเซลล์เริ่มมีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์หรือสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โครโซมโซมจึงเป็นอวัยวะที่ใช้ในการถ่ายทอดรหัสทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต การศึกษาจำนวนโครโมโซม รูปร่างและลักษณะของโครโมโซมช่วยให้เปรียบเทียบความคล้ายคลึงและแตกต่างของพืชแต่ละชนิดที่นำมาศึกษาได้ (ดวงทิพย์, 2539) การศึกษาจำนวนโครโมโซมมีประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์ ทำให้ทราบถึงจำนวนชุดของโครโมโซม(ploidy level) ของพืชที่นำมาใช้ในการผสมพันธุ์ เนื่องจากพืชบางชนิด ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นจำนวนคี่ มักเป็นหมัน นอกจากนั้นแล้วการเข้าคู่กันของโครโมโซมพ่อและแม่ ยังบอกถึงโอกาสและความสำเร็จในการผสมข้ามสายพันธุ์ได้อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

6.1 อุปกรณ์

6.1.1. ปลายรากของฟิวเชีย สายพันธุ์พ่อแม่ F001 F002 F004 F005 F006 F007 และ F009 ลูกผสมจำนวน 6 คู่ผสมคือ F004 × F001 F004 × F002 F004 × F005 F004 × F006 F004 × F007 F004 × F009 และ F004 ⊗

6.1.2 ขวดแก้วขนาดจุ 1.5 มิลลิลิตร สำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

6.1.3 สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์

6.1.4 เข็มเขี่ย

6.1.5 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound microscope และ Photomicroscope

6.1.6 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาจำนวนโครโมโซม

- สารเคมีที่ใช้สำหรับการหยุดการสร้างเส้นใยสปินเดิล (pre-treatment) ได้แก่ para- dichlorobenzene
- สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมน้ำยาในการหยุดการเจริญของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ (fixative) คือ เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติกเข้มข้น อัตราส่วน 3 :1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- สารเคมีที่ใช้ย้อมสีโครโมโซม คือ lactropropionic orcein

6.2 ขั้นตอนการศึกษา

6.2.1 เตรียมปลายราก ตัดเฉพาะส่วนปลายรากที่กำลังเจริญเติบโตเก็บปลายรากที่เวลา 9:00 10:00 11:00 หรือ 12:00 น.

6.2.2 หยุดการเจริญของเส้นใยสปินเดิลของเซลล์ โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย para - dichlorobenzene เป็นเวลา 6 7 8 9 10 หรือ 11 ชั่วโมง รักษาสภาพเซลล์ โดยนำรากออกมาจากสารละลาย para - dichlorobenzene แล้วล้างปลายรากให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำปลายรากไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative) นาน 10 นาที แล้วล้างปลายรากด้วยน้ำกลั่น

6.2.3 แยกเซลล์โดยการแช่ปลายรากลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

6.2.4 ย้อมสีในเนื้อเยื่อในสีย้อม lactropropionic orcein โดยแช่นาน 6 12 24 หรือ 48 ชั่วโมง

6.2.5 ขยี้เนื้อเยื่อปลายราก แล้วใช้เข็มเขี่ยเตะเนื้อเยื่อปลายรากให้แยกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปิดแผ่นแก้วปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้กระดาษซับวางบนแผ่นสไลด์บริเวณที่ปิดแผ่นสไลด์ กดนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์กระจายและเป็นการซับสีที่มากเกินไปออก

6.2.6 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟต โดยเลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายไม่ทับกัน และจากเซลล์ที่มีผนังเซลล์ไม่แตก นับจำนวนโครโมโซมแล้วบันทึกภาพ

ผลการทดลอง

เทคนิคในการเตรียมเซลล์เพื่อศึกษาโครโมโซม

การศึกษาโครโมโซมของฟิวเชีย เป็นการศึกษาโดยใช้เนื้อเยื่อปลายราก วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อที่ให้ผลดี โดยได้เซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะ metaphase จากการทดลองนี้ คือ เก็บตัวอย่างรากฟิวเชียในช่วงเวลา 10:00 น. – 10:30 น. เลือกเก็บปลายรากที่กำลังมีการเจริญเติบโต โดยเลือกปลายรากที่มีสีขาวขุ่น ตัดปลายรากให้มีความยาว 1 ซม. นำไปแช่ในสารละลาย PDB เพื่อหยุดวงชีพของเซลล์ เป็นเวลา 10 ชม. ในที่ที่มีอุณหภูมิเย็น 15 °ซ การทำเช่นนี้ทำให้ได้เซลล์ที่มีโครโมโซมที่หดสั้น การแช่เนื้อเยื่อปลายรากไว้ในสีนาน 48 ชม. ช่วยให้โครโมโซมติดสีชัดขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนโครโมโซมของพ่อแม่พันธุ์

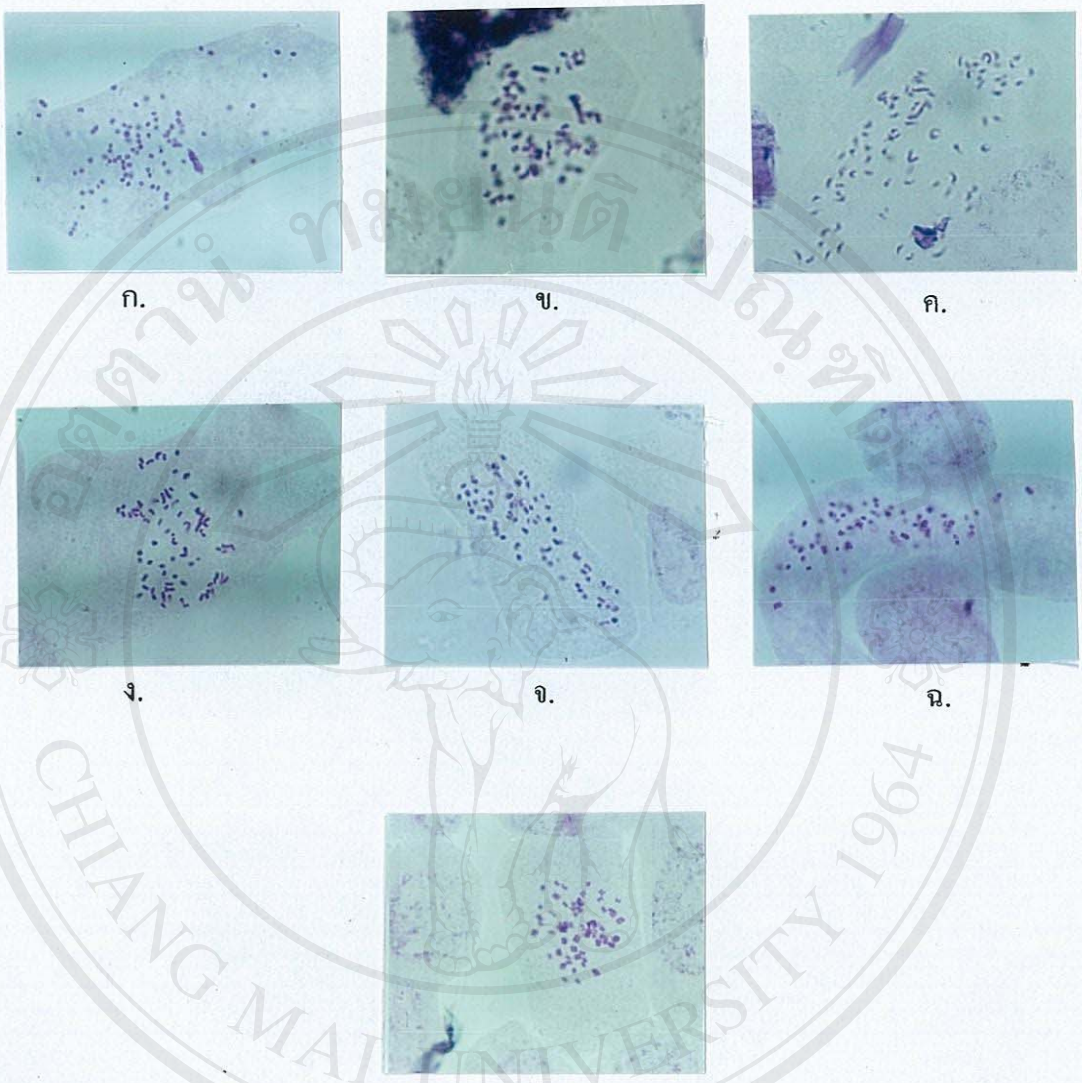
การศึกษาจำนวนโครโมโซมในระยะเมตาเฟต โดยเตรียมเซลล์จากเนื้อเยื่อปลายรากของฟิวเชียทั้ง 7 สายพันธุ์ นำโครโมโซมที่ได้มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์นับจำนวน สายพันธุ์ละ 10 เซลล์ จำนวนโครโมโซมของสายพันธุ์พ่อแม่ฟิวเชีย

ตาราง 6.1 จำนวนโครโมโซมของฟิวเชียต้นพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 7 สายพันธุ์

สายพันธุ์	จำนวนโครโมโซม ที่นับได้					Mode	$\bar{X}$ ± S.D
	จำนวนเซลล์ที่นับ						
F001	84	85	86	87	88		
	-	1	6	3	-	86	86.2 ± 0.4
F002	58	59	60	61	62		
	-	1	7	1	1	60	60.2 ± 0.7
F004	88	89	90	91	92		
	1	3	5	1	-	90	89.6 ± 0.8
F005	69	70	71	72	73		
	-	-	2	8	-	72	71.8 ± 0.42
F006	76	77	78	79	80		
	2	2	5	-	1	78	77.6 ± 0.83
F007	74	75	76	77	78		
	2	3	5	-	-	76	75.3 ± 0.82
F009	59	60	61	62	63		
	-	2	1	6	-	62	61.6 ± 0.96

จำนวนโครโมโซมของฟิวเชีย 7 สายพันธุ์ มีตั้งแต่ 60 – 90 แท่ง (ตาราง 6.1) คือ F001 มีจำนวนโครโมโซม 86 แท่ง สายพันธุ์ F002 มีจำนวนโครโมโซม 60 แท่ง สายพันธุ์ F004 มีจำนวนโครโมโซม 90 แท่ง สายพันธุ์ F005 มีจำนวนโครโมโซม 72 แท่ง สายพันธุ์ F006 มีจำนวนโครโมโซม 78 แท่ง สายพันธุ์ F007 มีจำนวนโครโมโซม 76 แท่ง สายพันธุ์ F009 มีจำนวนโครโมโซม 62 แท่ง โครโมโซมฟิวเชียทั้ง 7 สายพันธุ์ ที่ศึกษาในครั้งนี้มีขนาดเล็กมาก (ภาพ 6.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ก. ข. ค.

ง. จ. ฉ.

ช.

ก. สายพันธุ์ F001 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 86

ข. สายพันธุ์ F002 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 60

ค. .สายพันธุ์ F004 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 90

ง. .สายพันธุ์ F005 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 72

จ. .สายพันธุ์ F006 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 78

ฉ. .สายพันธุ์ F007 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 76

ช. .สายพันธุ์ F009 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 62

ภาพ 6.1 ลักษณะและจำนวนโครโมโซมของฟิวเซียพ่อแม่พันธุ์ (1178X)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนโครโมโซมลูกผสม

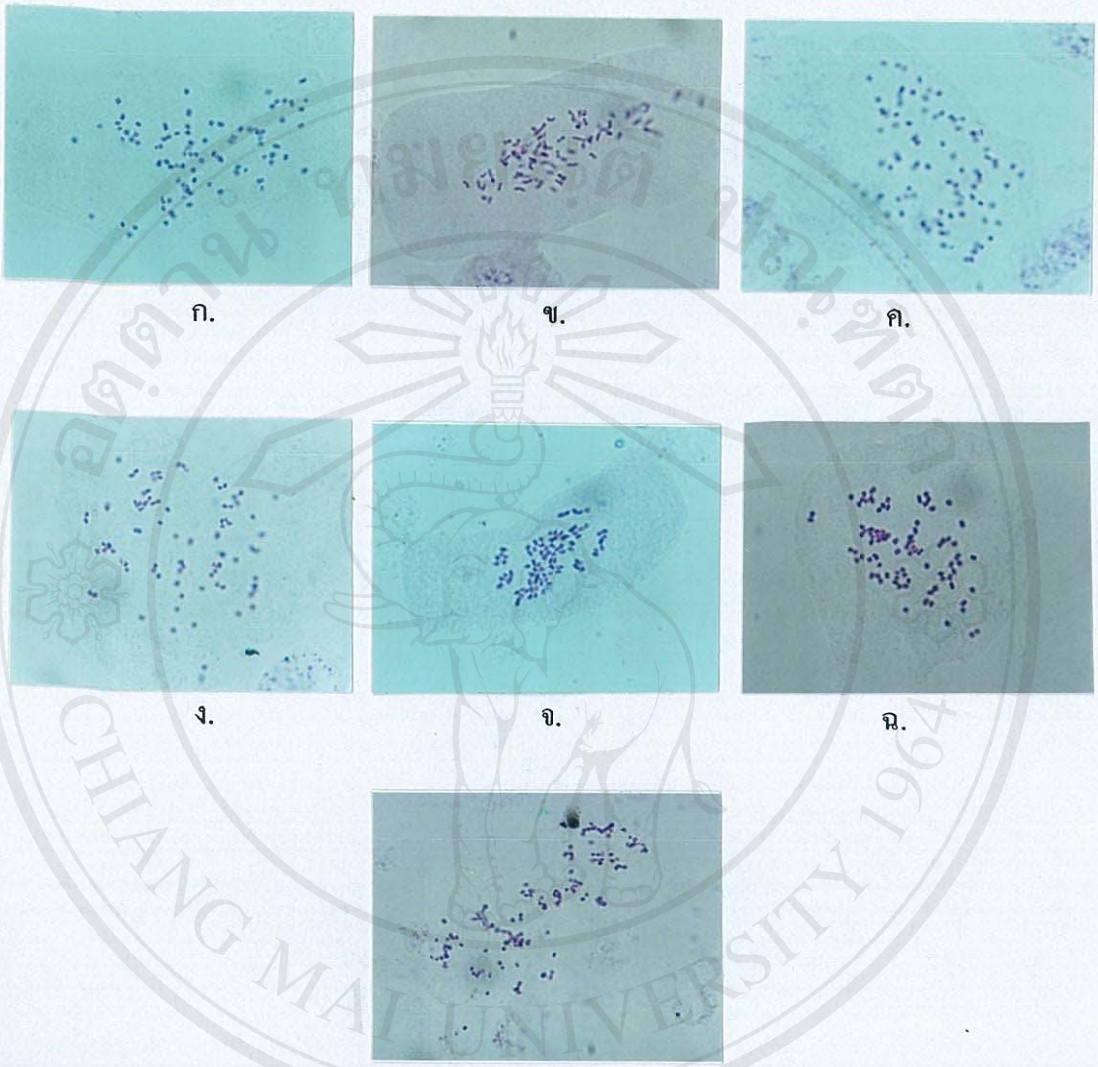
การผสมตัวเองของ F004 และใช้เป็นแม่พันธุ์ในการผสมข้ามกับ 6 สายพันธุ์ คือ F001 F002 F005 F006 F007 และ F009 ซึ่งใช้เป็นต้นพ่อ นำต้นลูกผสมที่ได้มาศึกษาจำนวนโครโมโซม

ตาราง 6.2 จำนวนโครโมโซมของลูกผสมของฟิวเชีย จำนวน 7 คู่ผสม

สายพันธุ์	จำนวนโครโมโซม ที่นับได้					Mode	$\bar{X}$ ± S.D
จ.น.โครโมโซม แม่ × พ่อ	จำนวนเซลล์ที่นับ						
F004 ⊗	87	88	89	90	91		
(90)	-	-	3	7	-	90	89.7 ± 0.40
F004 × F001	85	86	87	88	89		
(90) (86)	1	-	2	7	-	88	87.5 ± 0.97
F004 × F002	74	75	76	77	78		
(90) (60)	2	5	1	2	-	75	75.3 ± 1.05
F004 × F005	79	80	81	82	83		
(90) (72)	1	1	6	2	-	81	80.9 ± 0.87
F004 × F006	82	83	84	85	86		
(90) (78)	-	1	7	2	-	84	84.1 ± 0.36
F004 × F007	81	82	83	84	85		
(90) (76)	-	1	8	1	-	83	83.2 ± 0.42
F004 × F009	73	74	75	76	77		
(90) (62)	-	2	1	7	-	76	75.5 ± 0.56

จำนวนโครโมโซมลูกผสมของฟิวเชียที่ศึกษามีตั้งแต่ 75 – 90 แท่ง (ตาราง 6.2) คือ ลูกผสม F004 × F001 มีจำนวนโครโมโซม 88 แท่ง ลูกผสม F004 × F002มีจำนวนโครโมโซม 75 แท่ง ลูกผสมที่ได้จากการผสมตัวเองของ F004 มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับต้นแม่ คือ 90 แท่ง ลูกผสมF004 × F005 มีจำนวนโครโมโซม 81 แท่ง ลูกผสม F004 × F006 มีจำนวนโครโมโซม 84 แท่ง ลูกผสม F004 × F007 มีจำนวนโครโมโซม 83 แท่ง ลูกผสม F004 × F009 มีจำนวนโครโมโซม 76 แท่ง (ภาพ 6.2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ก. ข. ค.

ง. จ. ฉ.

ช.

ก. สายพันธุ์ F004 × F001 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 86
ข. สายพันธุ์ F004 × F002 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 75
ค. สายพันธุ์ F004 ⊗ มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 90
ง. สายพันธุ์ F004 × F005 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 81
จ. สายพันธุ์ F004 × F006 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 84
ฉ. สายพันธุ์ F004 × F007 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 83
ช. สายพันธุ์ F004 × F009 มีจำนวนโซมาติกโครโมโซม = 76

ภาพ 6.2 ลักษณะและจำนวนโครโมโซมของฟิวเชียลูกผสม (1178X)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้เทคนิคการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมของฟิวเชีย เทคนิคที่ได้ในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของฟิวเชียที่ศึกษาครั้งนี้ คือ การเก็บปลายราก เวลา 10:00 น. – 10:30 น. ได้เซลล์ที่เห็นโครโมโซมอย่างชัดเจนและสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ แต่การเก็บหลังเวลา 10:30 น. ได้เซลล์ที่เห็นเป็นลักษณะเซลล์ใหม่ 2 เซลล์อย่างชัดเจน การหยุดวงชีพเซลล์ใช้เวลา 10 ชั่วโมง ซึ่งถ้าเวลาน้อยกว่า 10 ชม. โครโมโซมที่เห็นมีลักษณะเป็นเส้นๆ และมีการซ้อนทับกัน จึงไม่สามารถนับจำนวนได้ ส่วนการแช่สีย้อมโครโมโซมนาน 48 ชม. โครโมโซมมีการติดสีได้ดี เทคนิคการเก็บปลายรากและการหยุดวงชีพเซลล์ แตกต่างจากเทคนิคการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากฟิวเชียของ กิตติกานต์(2545) ที่ศึกษาในสายพันธุ์ F001 F003 และ F017 ซึ่งเก็บปลายรากในช่วงระยะเวลา 12 : 00 น. – 13 : 00 น. หยุดวงชีพเซลล์นาน 6 ชม. และแช่สีย้อม 6 ชม. การศึกษาในครั้งนี้ได้ทดลองแช่สีโครโมโซมนาน 6 ชม. แต่พบโครโมโซมมีการติดสีจางมาก ไม่สามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาช่วงเวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างไปจากรายงานของกิตติกานต์ อาจเนื่องมาจากทำการทดลองในฤดูกาลที่ต่างกัน โดยกิตติกานต์ ศึกษาในช่วงฤดูหนาวที่มีอุณหภูมิต่ำ อาจเป็นผลทำให้พืชมีการแบ่งเซลล์ได้ช้า แต่การศึกษาครั้งนี้ทำในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนตุลาคมซึ่งมีอุณหภูมิสูงกว่าในฤดูหนาว การแบ่งเซลล์อาจเกิดได้เร็วขึ้น ดังนั้นแม้ว่าเป็นพืชชนิดเดียวกันถ้าเก็บตัวอย่างปลายรากในฤดูกาลที่ต่างกัน ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บปลายรากอาจแตกต่างกันได้

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมฟิวเชียสายพันธุ์ F001 (สีแดง / สีขาว) F002 (สีขาว / สีม่วง) F004 (สีขาว / สีขาว) F005 (สีแดง / สีขาว) F006 (สีขาว / สีม่วง) F007 (สีขาวเจือชมพู / สีแดง) และ F009 (สีขาว / สีแดง) มีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันโดยมี $2n = 60 – 90$ ซึ่งทั้ง 7 สายพันธุ์ ไม่มีสายพันธุ์ใดที่มีจำนวนโครโมโซมที่เท่ากัน แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างทางสัณฐานนั้นเกิดขึ้นจากจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันและอาจเกิดจากรูปร่างและขนาดของโครโมโซมที่แตกต่างกัน มีการศึกษาจำนวนโครโมโซมของฟิวเชีย ไว้โดย กิตติกานต์ (2545) พบว่า สายพันธุ์ F001 F003 และ F017 มีจำนวนโครโมโซม 86 84 และ 80 แท่ง ตามลำดับ ดังนั้นสายพันธุ์ F001 ที่ศึกษาครั้งนี้มีจำนวนโครโมโซม 86 แท่ง เท่ากับรายงานของกิตติกานต์ สายพันธุ์ฟิวเชียที่นำมาศึกษาอาจเป็น tetrapliod หรือมีจำนวนชุดโครโมโซมที่สูงกว่านี้ เนื่องจากไม่สามารถหาจำนวนชุดพื้นฐานของฟิวเชียได้ สายพันธุ์มีการพัฒนามามาก การค้นหาต้นดั้งเดิมจึงทำได้ยาก อาจเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์ที่ปลูกเลี้ยงไว้ได้มาจากการผสมของฟิวเชียหลายๆหมู่ (section) เข้าด้วยกัน (intersectional hybrid)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนจำนวนโครโมโซมของลูกผสมที่เกิดจากการใช้สายพันธุ์ F004 เป็นต้นแม่ ผสมข้ามกับอีก 6 สายพันธุ์ ลูกผสมที่ได้นั้นมีจำนวนโครโมโซมที่ได้รับมาจากต้นพ่อและแม่อย่างละครึ่ง และมีโอกาสที่เกิดลักษณะใหม่ๆในรุ่นลูกเกิดขึ้นได้มาก หรืออาจมีลักษณะเหมือนกับต้นพ่อและแม่ก็ได้ ดังรายงาน ของ Strzyzewska (1995) ทำการผสม *Trifolium pratense* ทีมีจำนวนโครโมโซม 2n = 14+2 กับ *Trifolium* 6 ชนิด ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 16 พบว่าผสมติดเพียงคู่ผสมเดียวคือ *T. pratense* × *T. diffusum* ลูกผสมมีลักษณะสัณฐานเหมือนกับ *T. diffusum* แต่ก็มีบางลักษณะเช่น จำนวนดอกต่อช่อที่มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างต้นพ่อและแม่ ลูกผสมมีจำนวนโครโมโซม 2n =16

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของฟิวเชียสายพันธุ์พ่อแม่ 7 สายพันธุ์ และลูกผสมจากการผสมข้าม 6 คู่ผสม และผสมตัวเอง 1 สายพันธุ์ ได้เทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างจากเซลล์ปลายราก โดยพบว่าช่วงระยะเวลาที่ปลายรากมีการแบ่งเซลล์จำนวนมากอยู่ในช่วงเวลา 10:00 – 10:30 น. ส่วนการยับยั้งการเกิด spindle fiber โดยการนำปลายรากที่เก็บมานั้นไปแช่ในสารละลาย para – dichlorobenzene และเก็บไว้ในตู้เย็นเป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง การหยุดวงชีพของเซลล์ด้วยการแช่ปลายรากในน้ำยา fixative นาน 10 นาที ทำให้เซลล์แยกออกจากกันโดยแช่ปลายรากใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และแช่ปลายรากในสีนาน 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเทคนิคเวลาที่เหมาะสมของฟิวเชียทั้งหมดที่นำมาทดลอง ต้นพ่อแม่พันธุ์มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ 62 – 90 แท่ง ส่วนต้นลูกผสมมีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ 75 – 90 แท่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved