



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การศึกษาโครโมโซมกล้วยพันธุ์พื้นบ้านของภาคเหนือ
CHROMOSOMAL STUDIES OF
NORTHERN BANANA (*Musa* spp.) CULTIVARS

โดย

นลินี รุ่งเรืองศรี อุทัย รุ่งเรืองศรี



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่องการศึกษาโครโมโซมกล้วยพันธุ์พื้นบ้านของภาคเหนือ

CHROMOSOMAL STUDIES OF NORTHERN BANANA (*Musa* spp.) CULTIVARS

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2550

จำนวน 200,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางนลินี รุ่งเรืองศรี

ผู้ร่วมโครงการนายอุทัย รุ่งเรืองศรี

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

26 กุมภาพันธ์ 2553

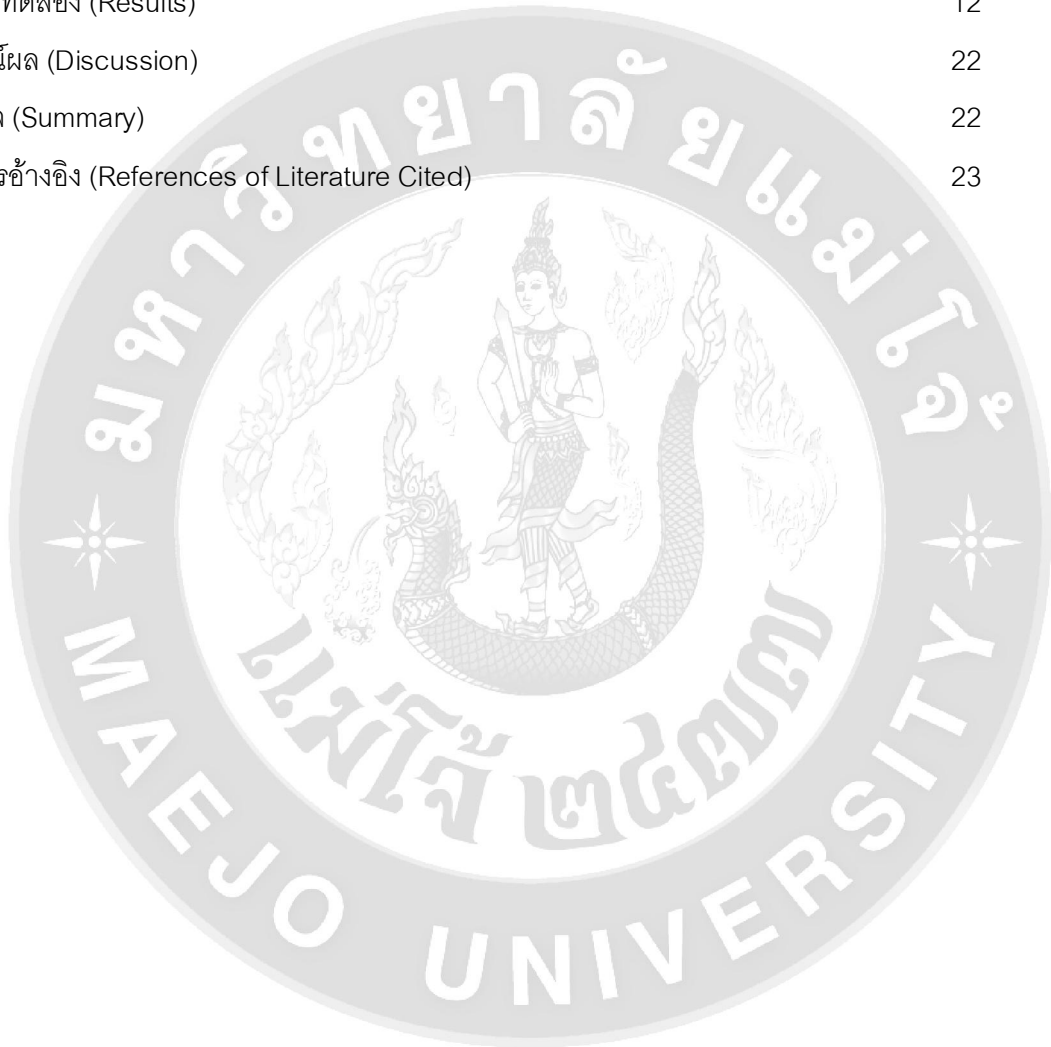
คำนิยม(Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ในปีงบประมาณ 2550 จากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ขอขอบคุณฝ่ายวิจัยรวมถึงเจ้าหน้าที่ที่คอยให้การสนับสนุน บริการและ เป็นกำลังใจตลอดทั้งโครงการ



สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
คำนำ (Introduction)	2
อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)	8
ผลการทดลอง (Results)	12
วิจารณ์ผล (Discussion)	22
สรุปผล (Summary)	22
เอกสารอ้างอิง (References of Literature Cited)	23



สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โครโมโซมกล้วยมีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของหอม	5
รูปที่ 2 การเพาะเลี้ยงกล้วยในหลอดแก้วด้วยสูตรอาหาร MS ดัดแปลงและลักษณะรากที่ได้	13
รูปที่ 3 ลักษณะปลายรากจากเหง้าของต้นกล้วยที่เจริญเต็มที่ในธรรมชาติและรากใหม่ที่เกิดจาก	13
รูปที่ 4 เซลล์และลักษณะโครโมโซมของกล้วยสาและกล้วยหอมทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	14
รูปที่ 5 โครโมโซมกล้วยป่าจากเทคนิค squash ย้อมด้วยสี aceto-orcein เซลล์ระยะ prometaphase	14
รูปที่ 6 โครโมโซมกล้วย 6 ชนิดจากเทคนิค squash ย้อมด้วย Schiff's reagent	15
รูปที่ 7 โครโมโซมกล้วยหักมุกระยะ metaphase จากเทคนิค air-dried ย้อมด้วยสี Giemsa	16
รูปที่ 8 โครโมโซมกล้วยแดงจากเทคนิค squash ย้อมด้วย DAPI	17
รูปที่ 9 โครโมโซมกล้วยหม่นจากเทคนิค squash ย้อมด้วย DAPI	17
รูปที่ 10 โครโมโซมกล้วยไข่จากเทคนิคหยดโปรโตพลาสต์ย้อมด้วย DAPI	18
รูปที่ 11 โครโมโซมกล้วยเทพรสจากเทคนิคหยดโปรโตพลาสต์ย้อมด้วย DAPI	18
รูปที่ 12 โครโมโซมกล้วยไข่และกล้วยแวงจากการหยดโปรโตพลาสต์และย้อมสี Giemsa	19
รูปที่ 13 โครโมโซมกล้วยหม่น กล้วยหักมุกเขียว กล้วยน้ำว้า จากเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์ และย้อมสี Giemsa	19
รูปที่ 14 โครโมโซมกล้วยเทพรสและกล้วยทิพรสจากการหยดโปรโตพลาสต์และย้อมสี Giemsa	20
รูปที่ 15 โครโมโซมกล้วยส้ม กล้วยครั่งและกล้วยป่าจากการหยดโปรโตพลาสต์และย้อมสี Giemsa	20
รูปที่ 16 โครโมโซมบางแท่งของกล้วยแดง $2n=22$ มี metacentric chromosome ขนาดใหญ่	21
รูปที่ 17 โครโมโซมบางแท่งของกล้วยตานี $2n=22$ มี submetacentric chromosome แท่งใหญ่	21



การศึกษาโครโมโซมกล้วยพันธุ์พื้นบ้านของภาคเหนือ
CHROMOSOMAL STUDIES OF NORTHERN BANANA
(*Musa* spp.) CULTIVARS

นลินี รุ่งเรืองศรี¹

อุทัย รุ่งเรืองศรี²

NALINEE ROONGRUANGSREE

U-TAI ROONGRUANGSREE

¹คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

²คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของกล้วยที่ปลูกในภาคเหนือโดยวิธีการต่างๆ พบว่าเทคนิคที่เหมาะสมคือการแยกโปรโตพลาสต์แล้วย้อมด้วยสีGiemsaหรือ สีฟลูออเรสเซนส์ DAPI สามารถระบุกล้วยที่มีจำนวนโครโมโซม 22 แท่ง ได้แก่ กล้วยแดง กล้วยตานี กล้วยแวก(กล้วยบัวสีส้ม) และกล้วยไข่ และกล้วยที่มีโครโมโซม 33 แท่ง ได้แก่ กล้วยหม่น กล้วยป่า กล้วยส้ม กล้วยหักมุกเขียว กล้วยน้ำว้า กล้วยเทพรส(ปลีหาย) กล้วยทิพรส(ไทห่อ) ส่วนเทคนิคฟอยเกินสามารถระบุกล้วยสา และกล้วยเขียวว่ามีโครโมโซม 22 แท่ง ส่วนกล้วยหอมทอง กล้วยนาก กล้วยงาหมู กล้วยเทพรสมีโครโมโซม 33 แท่งโดยวิธีย้อมสีรากแล้วกดสไลด์

ABSTRACT

Chromosome numbers from growing root tips of *Musa* spp. found in Northern Thailand were suitably shown by protoplast isolation technique and staining in Giemsa and fluorochrome, DAPI. Four cultivars, namely 'Kluai Daeng', 'Kluai Tani', 'Kluai Wag', and 'Kluai Khai' had 22 chromosomes while eight local varieties, 'Kluai Mon', 'Kluai Pam', 'Kluai Som', 'Kluai Hukmuk Khieu', 'Kluai Namwa', 'Kluai Tiparot' and 'Kluai Teparod' had 33 chromosomal complement. The Feulgen staining method followed by tissue squashing showed 22 chromosomes from two cultivars, 'Kluai Sa' and 'Kluai Chiang Rai', and 33 chromosomes from 'Kluai Hom Thong', 'Kluai Nak', 'Kluai Nga Moo', and 'Kluai Teparod'.

คำนำ (Introduction)

กล้วยเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญในประชาคมโลก คณะที่ปรึกษาของการวิจัยด้านการเกษตรนานาชาติ (Consultative Group on International Agricultural Research/CGIAR) ภายใต้การสนับสนุนของโครงการพัฒนาแห่งองค์การสหประชาชาติ(UNDP)ได้จัดลำดับความสำคัญของกล้วยและกล้วยว่าเป็นอาหารที่ประชากรโลกบริโภคสูงเป็นอันดับ 4 รองจากข้าว ข้าวสาลี และข้าวโพดตามลำดับ ในประเทศที่กำลังพัฒนาหลายประเทศโดยเฉพาะในทวีปแอฟริกากล้วยเป็นอาหารหลักสำหรับประชากรหลายร้อยล้านคน(<http://www.cgiar.org/impact/research/banana.html>) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าสายพันธุ์กล้วยที่มีการพัฒนาปรับปรุงให้ประชาคมโลกนั้นมีอยู่ในจำนวนน้อยสายพันธุ์ แม้จะมีการเปลี่ยนสายพันธุ์กล้วยที่ปลูกเพื่อการส่งออก ซึ่งสาเหตุสำคัญคือการระบาดของโรคคุณลักษณะที่พึงประสงค์บางประการที่ต้องปรับปรุง รวมทั้งความสูงเกินไปของต้นในแง่การเก็บเกี่ยวคือ เริ่มจากกล้วยหอมกรอสมีเซลเป็นกล้วยคาเวนดิช (ที่เชื่อว่าเดิมเป็นสายพันธุ์กล้วยหอมจากไทย) แล้วเปลี่ยนเป็นไจแอนท์ คาเวนดิช แวลเลอรี ซึ่งได้รับการปรับปรุงพันธุ์มาเรื่อยๆ เป็นพันธุ์แกรนด์เนน ส่วนในแถบเอเชียมีสายพันธุ์ใหม่ของไต้หวันซึ่งทนต่อโรคตายพราย แม้ว่าไทยจะเป็นแหล่งกำเนิดกล้วยแห่งหนึ่งของโลกเนื่องจากมีกล้วยหลากหลายชนิด แต่ประเทศไทยส่งออกกล้วยน้อยมากเมื่อเทียบกับประเทศฟิลิปปินส์ซึ่งอยู่ในภูมิภาคเดียวกัน กล้วยที่ปลูกส่วนใหญ่ในไทยจะเก็บไว้บริโภคในภายในประเทศ ดังนั้นกล้วยท้องถิ่นที่ถือกำเนิดในไทยยังเป็นแหล่งทรัพยากรพันธุกรรมที่อาจจะมีประโยชน์ต่อประชาคมโลกในอนาคตในด้านความมั่นคงทางอาหาร

ในแง่อนุกรมวิธาน กล้วยเป็นพืชในสกุล *Musa* วงศ์ *Musaceae* พบหลากหลายชนิดมากในไทย นักวิชาการได้รวบรวมตัวอย่างกล้วยไทยไว้ได้มากกว่า 300 ตัวอย่าง กล้วยกินได้ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน Section *Eumusa* ขึ้นกระจายตัวเป็นบริเวณกว้างตั้งแต่อินเดียถึงฟิลิปปินส์ จนถึงตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย ดังนั้นจึงประมาณกันว่าทั้งกล้วยและกล้วยในโลกล่าจะมีอยู่เป็นจำนวนพันๆสายพันธุ์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและความสามารถปรับตัวได้ดีกับสภาพแวดล้อมต่างๆเป็นผลจากกระบวนการวิวัฒนาการตามธรรมชาติที่พิเศษจากพืชเศรษฐกิจอื่น คือ มีทั้งการกลายพันธุ์ชนิด *mutation* และ *polyploidy* โดยที่ไม่ได้มีการปรับปรุงพันธุ์โดยมนุษย์มาก่อน จึงพบทั้งสายพันธุ์พื้นฐาน(primary clones) สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์มาโดย *somatic mutation* และสายพันธุ์ลูกผสม ทั้งนี้เชื่อว่าแหล่งกำเนิดกล้วยลูกผสมระหว่างจีโนมชนิด A (*Musa acuminata*)และจีโนม

ชนิด B (*Musa balbisiana*) อยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย จากกล้วยพันธุ์ดั้งเดิมที่สามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้วิวัฒนาการเป็นลูกผสมที่มีจีโนมผสมทั้ง A และ B ได้หลายรูปแบบและมีจำนวนจีโนมแตกต่างกัน สามารถขยายพันธุ์ได้ง่าย เช่น AA (เช่น กล้วยไข่ กล้วยเล็บมือนาง), AAA (เช่น กล้วยหอมทอง), AB (เช่น กล้วย Ney Poovan), AAB (เช่น กล้วยร้อยหวี กล้วยน้ำ), ABB (เช่น กล้วยหักมุก กล้วยน้ำว้า, ABAB (กล้วยเทพรส), AABB (กล้วยเงิน), BBB (เช่น กล้วยหิน กล้วยเล็บช้างกุด) และอื่นๆ กล้วยพื้นบ้านลูกผสมส่วนใหญ่สามารถขยายพันธุ์โดยไม่ต้องอาศัยเพศ เนื่องจากดอกตัวเมียได้กลายพันธุ์เป็นหมันและมีคุณสมบัติพิเศษที่เกิดเป็นผลได้โดยไม่ต้องมีการปฏิสนธิ(parthenocarpy)

ความหลากหลายของกล้วยปลูกหรือกล้วยกินได้ที่มีอยู่นำไปสู่ปัญหาใหญ่ในการจำแนกชนิด โดยเฉพาะในระดับที่ต่ำกว่าสปีชีส์ Simmonds และ Shepherd ได้ริเริ่มวิธีการให้คะแนนซึ่งบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์กับกล้วยป่าบรรพบุรุษ *Musa acuminata* (จีโนม A) และ *Musa balbisiana* (จีโนม B) ตั้งแต่ปีค.ศ.1955 (เบญจมาศ 2545) บุคคลทั้งสองยังได้เสนอทฤษฎีวิวัฒนาการของกล้วยซึ่งอาจจะเริ่มขึ้นเมื่อ 4 พันปีที่แล้ว ซึ่งมีความพิเศษในแง่ที่มนุษย์มีบทบาทสำคัญมากกว่าธรรมชาติ มีปรากฏการณ์ที่ร่วมกันทำให้เกิดกล้วยนานาชนิดดังนี้ (ณรงค์ 2547)

- (1) การเกิดผลโดยไม่ต้องผสมเกสร (parthenocarpy) ซึ่งทำให้กล้วยป่ามีผลขนาดใหญ่ขึ้น
- (2) การเกิดความเป็นหมัน (sterility) จากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุศาสตร์ ได้แก่กลุ่มยีนที่ควบคุมการติดเมล็ด
- (3) การคัดเลือกโดยมนุษย์ (artificial selection) เพื่อเก็บไว้ปลูกเพื่อกินผล
- (4) การขยายพันธุ์โดยใช้หน่อ (vegetative propagation)
- (5) การกลายพันธุ์(mutation) ได้ลักษณะใหม่ เช่นการเปลี่ยนแปลงในรสชาติ ขนาด สี สัน รูปร่าง ฯลฯ
- (6) การเพิ่มชุดของโครโมโซม (polyploidization)
- (7) การผสมพันธุ์ระหว่างชนิด (interspecific hybridization)

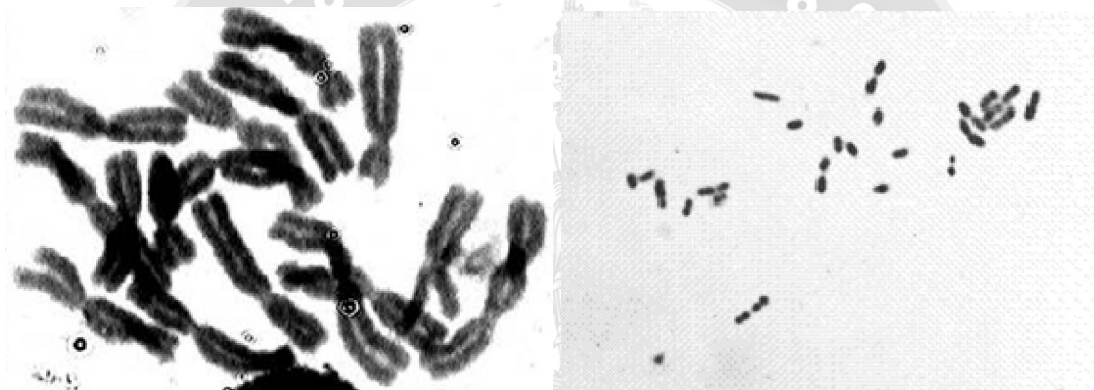
ทั้งหมดร่วมกันส่งผลให้เกิดกล้วยชนิดต่างๆในภูมิภาคนี้ ตามด้วยการแพร่กระจายของกล้วยพันธุ์ต่างๆไปยังภูมิภาคอื่นของโลกมาเป็นเวลานาน ซึ่งนักวิชาการในต่างประเทศก็ได้พยายามไขปัญหาการจำแนกอย่างกว้างขวาง

การจำแนกกล้วยเป็นปัญหาที่ค่อนข้างยากและไม่ชัดเจน ถ้าใช้เกณฑ์ด้านสัณฐานจำต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์อย่างแท้จริง ตามวิธีการของ Simmonds และ Shepherd ใช้ถือหลักเกณฑ์สากลของ 15 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ภายนอก ว่ามีลักษณะของจีโนม A และจีโนม B อยู่เท่าไร กล้วยที่มีลักษณะเหมือน *M. acuminata* ถือว่าได้ยีนมาจากกล้วยป่า ให้ 1 คะแนน มีจีโนมเป็น A กล้วยที่มีลักษณะเหมือน *M. balbisiana* ถือว่าได้ยีนมาจากกล้วยตานี ให้ 5 คะแนน มีจีโนมเป็น B ดังนั้นถ้าได้คะแนนรวม 15 – 23 คะแนน จะจัดอยู่ในกลุ่ม AA, AAA คือมียีน *M. acuminata* เต็ม 100 ถ้าได้คะแนนรวม 70 – 75 คะแนน จะจัดอยู่ในกลุ่ม BB, BBB คือมียีน *M. balbisiana* เต็ม 100 ถ้าเป็นลูกผสมก็จะมีคะแนนรวมอยู่ระหว่างช่วงที่กล่าว ซึ่งวิธีจำแนกนี้เป็นการรวมคะแนนตามเกณฑ์ที่ได้ตั้งไว้ก่อน จึงเป็นการคาดคะเนที่อาจจะไม่แม่นยำ ส่วนการศึกษาโครโมโซมเพื่อเสริมด้านอนุกรมวิธานมีอุปสรรคมาก เนื่องจากกล้วยมีโครโมโซมขนาดเล็ก ประมาณ 1-2 μm (Dolezel et al. 1998) และมีขนาดจีโนมเพียง 600 Mbp สำหรับโครโมโซม 11 แท่งในแต่ละจีโนม (Dolezel et al. 1994) ซึ่งหมายความว่าแต่ละโครโมโซมมีประมาณ 55 Mbp โดยเฉลี่ย นอกจากนี้โครโมโซมขนาดเล็กแล้วกล้วยยังเป็นพืชที่มีความแปรปรวนทางโครโมโซมอย่างมากตามธรรมชาติ ทั้งในแง่ของจำนวนและรูปร่างเนื่องจากขยายพันธุ์ได้โดยไม่ผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส จึงมีความพยายามปรับปรุงเทคนิคการเตรียมโครโมโซมกล้วยให้ได้คุณภาพที่ดีเพื่อนำมาสนับสนุนด้านอนุกรมวิธานและวิวัฒนาการของพืชชนิดนี้

โดยรวมแล้วในประเทศไทยมีการศึกษาระดับพันธุกรรมของกล้วยค่อนข้างจำกัดเมื่อเทียบกับต่างประเทศเช่น ออฟริกา อเมริกากลาง และอินเดีย จึงมีความจำเป็นต้องสะสมองค์ความรู้พื้นฐานไว้ให้ครอบคลุมพันธุ์พื้นเมืองต่างๆที่มีอยู่ในแต่ละท้องถิ่น เพื่อประโยชน์ในการจำแนก (classification) และระบุสายพันธุ์ (identification) อย่างเป็นระบบ ความรู้ในแง่จีโนมและจำนวนโครโมโซมเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นที่พอจะทำได้ การอนุรักษ์ทรัพยากรพรรณพืชนั้นจำเป็นต้องศึกษาทั้งพันธุกรรมคุณลักษณะต่างๆของสายพันธุ์ รวมทั้งสภาพแวดล้อมดั้งเดิมที่พืชแต่ละสายพันธุ์ได้มีการวิวัฒนาการมาอย่างเฉพาะถิ่นเป็นเวลานาน ในอนาคตนักปรับปรุงพันธุ์อาจมีความจำเป็นที่จะต้องค้นหาเหินใหม่ๆที่เป็นประโยชน์ เช่นยีนต้านทานโรค และอื่นๆ

วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาเทคนิคการศึกษาโครโมโซมสำหรับโครโมโซมกล้วยซึ่งมีขนาดเล็กมาก ตั้งแต่การเก็บตัวอย่างรากจากต้นกล้วยในสภาพการเจริญต่างๆ และเทคนิคการเตรียมสไลด์ตัวอย่างเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม(2N)ได้อย่างแม่นยำ และตรวจหาความแตกต่างระดับโครโมโซมในกล้วยพื้นบ้านของภาคเหนือ ทั้งนี้กล้วยพื้นเมืองของภาคเหนือหลายชนิดยังไม่ได้รับการจำแนกด้วยระบบของ Simmonds และ Sheperd อย่างทั่วถึง เพราะมีปลูกกระจายอยู่ในหลายพื้นที่ นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกตามภาษาพื้นเมืองซึ่งยังอาจจะไม่เป็นที่รู้จักในวงวิชาการ



รูปที่ 1 โครโมโซมกล้วยมีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของหอม (*Allium cepa*) ซ้าย และกล้วยหักมุก (*Musa* sp.) ขวา จากตัวอย่างที่เตรียมในสภาพเหมือนกัน

การตรวจเอกสาร (Literature Review)

ในบรรดาพืชเศรษฐกิจทั้งหลายกล้วยเป็นพืชที่มีความหลากหลายตามธรรมชาติสูงมาก ประมาณกันว่ากล้วยที่ถูกเก็บรักษาไว้ตามองค์กรและสถาบันรวมแล้วถึง 1500-3000 สายพันธุ์ ทั้งพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก การศึกษาวิจัยจีโนมกล้วยจากแหล่งต่างๆทั่วโลกในปัจจุบันได้ก้าวหน้าไปแล้วอย่างมาก ทั้งในด้านพันธุศาสตร์ วิวัฒนาการและสัณฐานวิทยาโดยคาดว่าจะกล้วยจะเป็นพืชเศรษฐกิจที่เพิ่มคุณค่าและสำคัญยิ่งขึ้นเมื่อนักวิทยาศาสตร์สามารถนำยีนที่พึงประสงค์ไปปรับปรุงพันธุ์ให้ดีกว่า โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ ซึ่งเท่ากับการรู้จักใช้ประโยชน์จากความหลากหลายได้อย่างสูงสุด (Heslop-Harrison และ Schwarzacher, 2007)

เบญจมาศ และ ประวัติ (2534) ได้ศึกษาโครโมโซมของกล้วยไทยบางชนิดโดยวิธี squash กับ 30 เซื้อพันธุ์ และรายงานจำนวนโครโมโซม $2n = 22$, $2n = 33$, และกล้วยเทพรส $2n = 44$ พบกล้วยที่มีบรรพบุรุษจากกล้วยป่า (*Musa acuminata* Colla) มีรูปร่างแบบ metacentric และ submetacentric ส่วนพวกที่มีบรรพบุรุษร่วมกับกล้วยตานี (*Musa balbisiana* Colla) มีรูปร่างโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric และ subtelocentric ซึ่งควรต้องมีการศึกษาให้แน่ชัดอีกโดยวิธีอื่น

การใช้เกณฑ์ทางสัณฐานจำแนกกล้วยออกเป็นกลุ่มจีโนม 10 กลุ่ม ใหญ่ คือ AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, ABBB, AAAB และ AABBแบบดั้งเดิมนั้นอาจจะไม่สอดคล้องกับไซโตเจเนติกส์ Pillay และคณะ (2006) ได้ศึกษาเชื้อพันธุ์กล้วยมากกว่า 300 รายการของสถาบัน International Institute of Tropical Agriculture (IITA) ที่ประเทศอูกันดา พบว่าประมาณ 8% มีจีโนมไม่ตรงกับการประเมินทางสัณฐาน โดยผู้วิจัยใช้เทคนิค flow cytometry ตรวจสอบปริมาณ DNA ซึ่งวิธีนี้สามารถระบุจำนวนชุดโครโมโซมหรือสภาพ polyploidy ได้ ประกอบกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD markers ที่จำแนกจีโนม A ออกจาก จีโนม B ได้

จำนวนโครโมโซมกล้วยแปรปรวนทั้งในสภาพธรรมชาติและในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เรียกว่า somaclonal variation (Sandoval et al. 1996, Obute and Aziagba, 2007) ซึ่งส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงในฟีโนไทป์ในบางลักษณะ เช่นความสูงและความต้านทานโรค ดังนั้นกล้วยมีวิวัฒนาการในอัตราค่อนข้างเร็ว รูปร่างโครโมโซมในกลุ่มจีโนมเดียวกันอาจจะต่างกันได้แม้จะมี

จำนวนโครโมโซมเท่ากัน เช่นในกลุ่ม AAA Cavendish พบว่าความยาวของแขนโครโมโซมบางแท่งมีความแตกต่าง (Rekha and Hiremath, 2008)

การศึกษาโครโมโซมของกล้วยมีปัญหามาเนื่องจากมีขนาดเล็กและผนังเซลล์หนา จึงมีการพัฒนาเทคนิคการทำสไลด์โดยวิธีต่างๆ โดยเฉพาะการเตรียมโครโมโซมระยะ prometaphase และ metaphase จำเป็นมากสำหรับงานระดับโมเลกุลผสมผสานกับงานระดับเซลล์ เช่น ในการทำการวิเคราะห์แบบ in situ hybridization เมื่อใช้ส่วนผสมเอนไซม์ pectinase, pectolyase และ cellulase สามารถปรับปรุงคุณภาพของโครโมโซมกล้วยได้ดียิ่งขึ้น (Doležal et al., 1998) เพื่อใช้ศึกษาจีโนมของกล้วยในรายละเอียดต่อไป



อุปกรณ์และวิธีการ(Materials and Methods)

1. พันธุ์กล้วยที่ใช้ศึกษาโครโมโซมโดยใช้ปลายราก (root tips)

1.1.กล้วยที่เพาะเลี้ยงในหลอดแก้ว สายพันธุ์กล้วยที่เก็บรวบรวมและต่อพันธุ์เลี้ยงไว้ในอาหาร ดัดแปลง Murashige & Skoog ที่เติม benzylaminopurine เข้มข้น 10^{-6} M เพื่อชักนำรากในห้องปฏิบัติการ Maejo-Leuven Biotechnology ที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ มีชื่อเรียกตามเป็นภาษาท้องถิ่น ดังนี้

1. กล้วยปลีหาย หรือ กล้วยเทพรส จากตำบลห้วยทราย อำเภอพร้าว
2. กล้วยพรม จากบ้านสันทรายหลวง อำเภอสันทราย
3. กล้วยเชียงราย จากบ้านท่าโป่ง อำเภอสันป่าตอง
4. กล้วยงาหมู จากตำบลเตาไห อำเภอสันทราย
5. กล้วยป้า จากภายในมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สาขาพืชผัก
6. กล้วยน้ำน่ม จากจังหวัดเชียงใหม่
7. กล้วยหมูสี จากตำบลเวียงแหง อ.ฝาง
8. กล้วยนาก จากตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย (ใกล้วัดแม่โจ้)
9. กล้วยคั่ว จากบ้านท่าโป่ง อำเภอสันป่าตอง
10. กล้วยตึบ จากภายในบริเวณมหาวิทยาลัยแม่โจ้
11. กล้วยโทหล่อ จากอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
12. กล้วยส้ม จากบ้านทุ่งสองแคว อ.แม่ลาน้อย จ.แม่ฮ่องสอน
13. กล้วยแดง เพาะเลี้ยงขึ้นจากปลีที่ได้จากตลาดแม่โจ้ อ.สันทราย
14. กล้วยแวก จากบ้านแม่ลาหลวง อ.แม่ลาน้อย จ.แม่ฮ่องสอน

1.2. สายพันธุ์กล้วยที่เจริญตามธรรมชาติ โดยใช้รากจากเหง้าที่ขุดมา ดังนี้

1. กล้วยป้า
2. กล้วยครั่ง
3. กล้วยไข่
4. กล้วยหักมุก
5. กล้วยแดง(กล้วยป่า)

6. กล้วยหม่น(กล้วยป่า)
7. กล้วยตึบ
8. กล้วยเทพรส
9. กล้วยโทห่ลองหรือกล้วยทิพรส
- 11.กล้วยน้ำว่า
12. กล้วยน้ำว่าค่อม
13. กล้วยตานี
14. กล้วยน้านม

2. การเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากที่มีการเจริญและแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสหรือส่วนเมอริสเต็ม เนื้อเยื่อได้รับ pretreatment ด้วยความเย็นจัด และ/หรือ สารละลาย 8-hydroxyquinoline 0.05% (w/v) 3 – 5 ชม.เพื่อให้เซลล์เข้าสู่ระยะการแบ่งเซลล์พร้อมๆกัน โดยคาดหวังว่าเซลล์จะอยู่ในระยะ เมทาเฟสเป็นจำนวนมาก ซึ่งระยะนี้โครโมโซมจะขดตัวมากที่สุด ทำให้สามารถนับจำนวนและสังเกต รูปร่างโครโมโซมได้ ต่อจากนั้นจึงนำรากใส่ในน้ำยาตรึง(fixative) ที่ประกอบด้วย ethanol: acetic acid = 3 : 1 เพื่อรักษาสภาพ และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะเตรียมสไลด์

ในเทคนิคการแยกโปรโตพลาสต์มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอีก ดังนี้ ตัดรากยาวประมาณ 1 ซม. เก็บไว้ใน 50mM phosphate buffer pH 7.0 ที่มี 0.2% β -mercaptoethanol เพื่อลดการ เปลี่ยนสีของปลายราก(จากปฏิกิริยา oxidation) ย้ายรากลงในสารละลาย pretreatment 0.05 % 8-hydroxyquinoline แช่ไว้ 3 ชม.ถึงข้ามคืน ที่อุณหภูมิห้อง ตรึงรากด้วยน้ำยา ethanol : acetic acid = 3 : 1 ที่เตรียมใหม่ เก็บที่ 4 °ซ ข้ามคืน ล้างรากด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง ก่อนเก็บไว้ใน 70%ethanol ที่ 4 °ซ (Dolezel *et al.*, 1998)

3. การย้อมสีโครโมโซมด้วยเทคนิคต่างๆ

3.1. การเตรียมโครโมโซมในเบื้องต้นโดยวิธีพื้นฐานที่เรียกว่า squash (สมศักดิ์ และ สุมน 2543) หรือกดลงบนแผ่น cover slip หลังจากที่ย้อมสี 2% aceto-orcein เพื่อสังเกต mitotic index หรือดัชนีการแบ่งเซลล์ เพื่อดูว่ามีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสมากพอหรือไม่ และตรวจดูลักษณะของ เซลล์และโครโมโซมโดยรวมในกล้องจุลทรรศน์แบบพื้นสว่าง บันทึกภาพด้วย Moticam (China

3.2. การย้อมสีโครโมโซมด้วยเทคนิค Feulgen staining ซึ่งเป็นการย้อมสี DNA โดยเฉพาะให้เป็น สีแดง โดยสาร basic fuchsin ที่เปลี่ยนเป็น Schiff's reagent ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ deoxyribose aldehyde ของ DNA วิธีการที่ใช้เป็นการดัดแปลง (Singh 1993; Fukui และ Nakayama, 1996) ดังนี้ ล้างปลายรากด้วย 0.1 M citrate buffer, pH 4.4-4.8 แล้วย่อยด้วยส่วนผสมเอนไซม์ 10% pectinase + 0.5% cellulase ใน citrate buffer ที่ 37° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายรากไปแช่ในชุดสารละลายอัลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70%, 50%, 30% และ 15% เป็นเวลา 10 นาทีตามลำดับ แช่ชิ้นส่วนในน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วจึงย้อมสีด้วย 5% basic fuchsin เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ย้ายรากไปแช่ใน metabisulfite solution 30 นาที แช่ปลายรากต่อในน้ำกลั่น 3 ชั่วโมง ตัดปลายรากประมาณ 1 มิลลิเมตร ย้อมสี aceto-orcein นาน 10 วินาที ปิดทับด้วย cover slip แล้วกดให้แบนราบกับแผ่นสไลด์ วิธีพอยเกินนี้น่าจะทำให้เห็นโครโมโซมชัดเจนหรือแยกแยะจากไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้วยได้ดีขึ้น เนื่องจากไซโตพลาสซึมของกล้วยมีความข้นหรือหนาแน่นมาก ทำให้การย้อมสีโครโมโซมมีปัญหา เทคนิคพอยเกินทำให้มั่นใจว่าเป็นการย้อมสีโครโมโซมเพราะเป็นปฏิกิริยาเคมีจำเพาะที่เกิดขึ้นกับกรดนิวคลีอิก

3.3. วิธีการใหม่ของ Dole[□]el และคณะ (1998) โดยการแยกโปรโตพลาสต์ก่อนที่จะเตรียมสไลด์ชนิด air-dried ทั้งนี้เพื่อเป็นการแยกออกจากชิ้นส่วนอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ ซึ่งจะทำให้เห็นโครโมโซมได้ง่ายขึ้น ดังนี้

ก่อนจะเตรียมทำสไลด์ แช่รากไว้ใน 75 mM KCl + 7.5 mM EDTA, pH 4, 3 ครั้ง ตัดปลายรากเป็นชิ้นเล็ก แล้วปล่อยให้ย่อยด้วยเอนไซม์ 60 นาที ที่ 30° C ใน digestion buffer 400 µl ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 1% pectinase + 0.5% cellulase + 1% pectolyase ใน 0.1 M citrate buffer กรองเอาโปรโตพลาสต์ด้วยแผ่นกรองขนาด 150 µm บั่นเหวี่ยงที่ 1000 RPM Resuspend pellet ที่ได้ด้วย 400 µl 75 mM KCl + 7.5 mM EDTA รอ 5 นาที ทำการบั่นเหวี่ยงเอา pellet แล้ว resuspend ด้วย 400 µl 70% ethanol เย็นจัด รอ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำ 1 ครั้ง แล้วเก็บเอา pellet มา resuspend ด้วย 70% ethanol เย็นจัด เก็บไว้ที่ 4 ° C เพื่อเตรียมทำสไลด์และย้อมสีต่อไป เวลาเตรียมสไลด์ดูดเอาโปรโตพลาสต์แขวนลอย (proto suspension) 7 µl หยดบนแผ่นสไลด์ รอเกือบแห้งจึงหยดน้ำยาตรึงที่เย็นจัด 7 µl เพื่อให้โปรโตพลาสต์แตก จุ่มลงใน 100 % ethanol รอให้สไลด์แห้ง

3.4. วิธีเตรียมสไลด์ตัวอย่างโดยหยดโปรโตพลาสต์ (protoplast dropping method) ของ Ananthawat-Jonsson (2001) มีขั้นตอนดังนี้ เก็บปลายรากใส่หลอดน้ำเย็นจัดและเก็บไว้ใน

ตู้เย็นข้ามคืน เพื่อให้เซลล์ที่กำลังแบ่งตัวหยุดที่ระยะเมทาเฟส ย้ายรากลงน้ำยาตรึงที่เตรียมใหม่ ทิ้งไว้ อย่างน้อย 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างตรึงนี้ให้เปลี่ยนน้ำยาตรึง 1 ครั้ง เสร็จขั้นตอนนี้แล้วอาจจะ เก็บไว้ที่ -20°C ถ้ายังไม่ทำต่อ ย้ายตัวอย่างลงเพลทแก้ว ล้างด้วยน้ำกลั่น 30 นาที ระหว่างนี้เปลี่ยน น้ำล้าง 1 ครั้ง ตักรากให้สั้นแล้วผ่าตามความยาวได้กล้องสเตอริโอ เชี่ยวเอากลุ่มเซลล์ที่อยู่เหนือ root cap เล็กน้อย แช่ชิ้นตัวอย่าง 2-3 ชิ้นใน enzyme mix 100 μl บ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 4 ชม. หรือข้ามคืนที่ 4°C ในตู้เย็น การเตรียม enzyme mix 10 ml ใช้ 800 – 1000 units of cellulase (Sigma C- 1184 from *Aspergillus niger* or Onozuka R10 from Merck #102321) และ 500 – 650 units of pectinase (Sigma P-5146 or P-4716, from *A. niger*) รวมกันใน 0.1 M citrate buffer, pH 4.6 บีบเนื้อเยื่อตัวอย่างใน enzyme mix ด้วย pipette tip แล้วกรองผ่านแผ่นกรองหลักขนาด 60 ไมครอน ลงไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มล. เติม hypotonic solution 75 mM KCl ที่เย็นจัด 1.5 มล. ขยับกรอกเบาๆ แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 30 นาที ถ้าโครโมโซมไม่กระจายควรเพิ่มเวลา บั่นเหยี่ยงที่ 7000 RPM 5 นาที เททั้งน้ำใสส่วนบน เติมน้ำยาตรึงที่เพิ่งเตรียมและเย็นจัด 1 ml ผสมเบาๆ โดยใช้ปิ เปตตัดปลาย วางไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที ขั้นตอนต่อจากนี้ใช้ pipette tip อันเดิมเพราะ อาจมี protoplasts ติดอยู่ บั่นเหยี่ยงที่ 7000 RPM 5 นาที เททั้ง supernatant ทำซ้ำอีกอย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อล้างไซโตพลาสซึมให้สะอาด เติมน้ำยาตรึงเย็นจัด 50 μl และผสมเบาๆ ด้วย tip เดิม ถ้า ตัวอย่างชุ่มมากอาจเติมน้ำยาตรึงอีก หยดโปรโตพลาสต์ลงบนสไลด์สะอาดที่เปียกและเย็นจัด ห่าง จากสไลด์อย่างน้อย 20 ซม. เมื่อสไลด์เกือบแห้ง ให้ dehydrate โดยจุ่มลงอัลกอฮอล์สัมบูรณ์ แล้ว ตากแห้ง

4. การย้อมสีสไลด์ที่ตากแห้งแล้ว โดยใช้สี Giemsa 10 % ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 6.9 ในขวด Coplin jar นาน 15 นาที แล้วล้างในบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ตามด้วยน้ำ 1 ครั้ง แล้วตากให้แห้ง หรือ ย้อมด้วย fluorochrome DAPI โดยหยดสารละลาย DAPI 100 μl บนสไลด์แล้วปิดด้วยโคเวอร์ กลาส เตรียมสีย้อม DAPI (4,6-diamidino-2-phenylidole) โดยเตรียม stock solution 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ใน น้ำ เมื่อจะใช้ เจือจางให้เป็น 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ด้วย McIlvaine's citrate buffer pH 7 (Singh, 1993)

5. การวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ภายหลังการย้อมสี Giemsa เพื่อศึกษาจำนวน และรูปร่างของโครโมโซม การนับจำนวนโครโมโซมเย็นย่นได้โดย DAPI ที่ย้อมติดดีเอ็นเอเฉพาะใน กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (Olympus รุ่น BH 50) บันทึกภาพโดยกล้องดิจิตอล (Moticam 2000, China Group) ที่มีโปรแกรมบันทึก Motic Image Plus 2.0

ผลการศึกษา (Results)

1. การเตรียมตัวอย่างรากและpretreatment

เมื่อนำรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดแก้วซึ่งน่าจะได้น้ำเยื่อที่เหมาะสมมาก คือเป็นรากที่สะอาด root cap ไม่หนามากและรากมีขนาดเล็กเหมาะที่จะตัดแยกเอา undifferentiated cells ไปศึกษาโครโมโซมเบื้องต้นโดยวิธี squash ที่ใช้สี aceto-orcein แต่ผลปรากฏว่าปลายรากของกล้วยทุกสายพันธุ์ที่เลี้ยงในหลอดแก้วมีจำนวนเซลล์ที่เข้าสู่ไมโทซิสต่ำมาก (mitotic index ต่ำ) ในจำนวนนี้พบเซลล์อยู่ในระยะโพรเฟสซึ่งโครโมโซมยังไม่ชัดเจน ทำให้ไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ แสดงว่าเซลล์ที่ปลายรากจากต้นเพาะเลี้ยงน้ำเยื่อมีอัตราการแบ่งเซลล์ต่ำและช้า จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาโครโมโซม

เมื่อทดลองใช้รากที่ได้จากเหง้าของต้นกล้วยที่ปลูกไว้หลายปีพบว่ารากมีขนาดต่างกันและแข็งแรงมาก แม้คัดเลือกเอาแต่รากที่มีสีขาวขนาดเล็กปลายรากยังคงค่อนข้างแข็ง การpretreatment ใช้ความเย็นจัดและ/หรือสารละลาย 8-hydroxyquinoline เวลาผ่าเอากลุ่ม undifferentiated cells ต้องทำภายใต้กล้องสเตอริโอ มีลักษณะเกาะกันเป็นก้อน และมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่นๆ เมื่อเตรียมสไลด์ด้วยเทคนิค squash แล้วพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะโพรเฟส ไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้และยังพบ mitotic index ที่ต่ำ ดังนั้นการ pretreatment กับตัวอย่างปลายรากของต้นธรรมชาติยังไม่สามารถ synchronize ให้เซลล์เข้าสู่ระยะเมทาเฟสพร้อมๆ กัน

เมื่อทดลองนำเหง้าจากต้นกล้วยบางพันธุ์มาเชือนผิวออกตรงบริเวณตาเหง้า เก็บไว้ในถุงพลาสติก 2-3 วัน จะมีรากใหม่สีขาวงอกออกมา เมื่อนำรากที่ pretreat และ fix แล้วมาตรวจดูด้วยเทคนิค squash พบว่ารากใหม่มี mitotic index ที่ดีขึ้น พบหลายเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส อีกวิธีหนึ่งที่ทำให้ได้รากที่กำลังเจริญ คือ การรดน้ำที่โคนต้นกล้วยมากๆ 2-3 วันก่อนจะเก็บรากที่เจริญใหม่มาศึกษาโครโมโซม



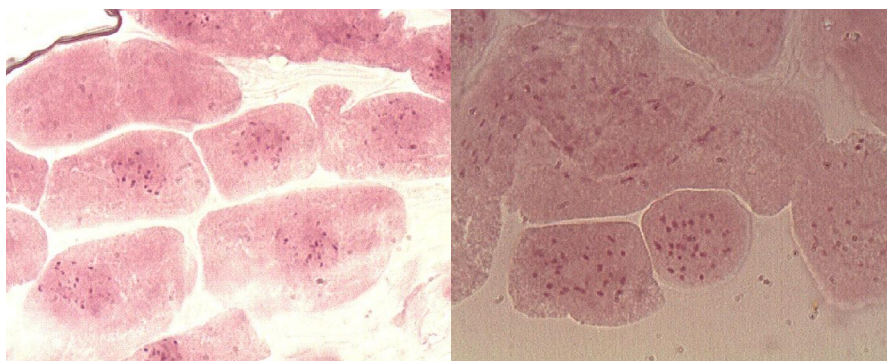
รูปที่ 2 การเพาะเลี้ยงกล้วยในหลอดแก้วด้วยสูตรอาหารMSดัดแปลง และลักษณะรากที่ได้



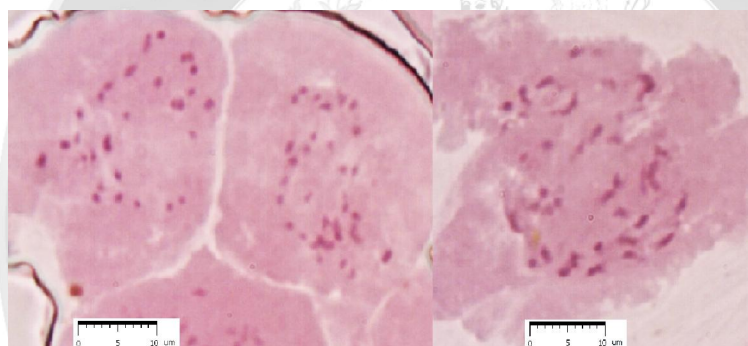
รูปที่ 3 ลักษณะปลายรากจากเหง้าของต้นกล้วยที่เจริญเต็มที่ในธรรมชาติ (ซ้าย) และรากใหม่ที่เพิ่งงอกจากเหง้าภายใน 7-15 วัน (ขวา) มีอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น

2. การเตรียมโครโมโซมกล้วยด้วยเทคนิคต่างๆ

2.1. ผลจากการเตรียมโครโมโซมจากปลายรากโดยวิธี squash จากการย้อมสีด้วยสี aceto-orcein นั้นไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์จำนวนโครโมโซมหรือการศึกษารูปร่างของโครโมโซม ถ้าย้อมสีนานไซโตพลาสซึมจะติดสีไปด้วย ข้อดีของการย้อมโครโมโซมด้วยสี aceto-orcein คือไม่ยุ่งยากและถ้าพบเซลล์ที่ดีจะสามารถสรุปจำนวนโครโมโซมได้เลย แต่ในตัวอย่างส่วนใหญ่พบ mitotic index ต่ำ แทบจะไม่พบรากงอกในระยะเวลาที่ศึกษา

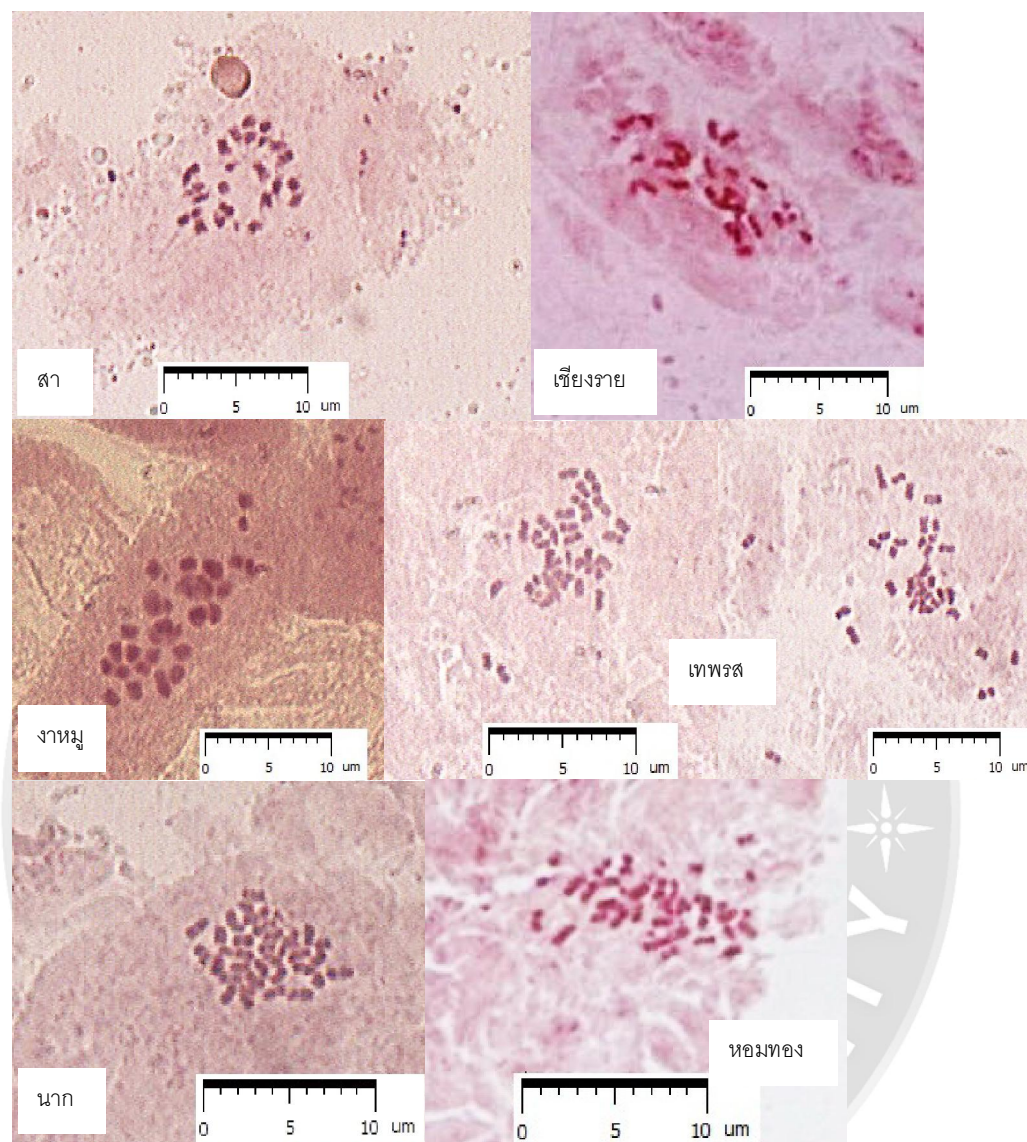


รูปที่ 4 เซลล์และลักษณะโครโมโซมของกล้วยสา (ซ้าย) และกล้วยหอมทอง (ขวา) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเตรียมโดยเทคนิคการกด(squash)แล้วย้อมด้วยสี aceto-orcein ภายหลัง pretreatment



รูปที่ 5 โครโมโซมกล้วยป่าจากเทคนิคsquashย้อมด้วยสีaceto-orcein 2% เซลล์ระยะ prometaphase ได้ $2n = 33$ สเกล = 10μm

2.2. ผลจากการเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคฟอยเกิน (Feulgen staining method) พบว่าใน 6 สายพันธุ์ที่ได้ทดลองสามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนจนนับจำนวนโครโมโซมได้ อย่างไรก็ตามแม้คุณภาพของโครโมโซมจะดีขึ้นแต่ต้องปรับ pretreatment ในสาร 8-hydroxyquinoline ให้นานมากขึ้นถึง 120 ชั่วโมง ตัวอย่างรากกล้วยได้จากการย้ายต้นกล้วยจากหลอดเพาะเลี้ยงลงปลูกในกระถางแล้วรอจนมีรากเจริญ



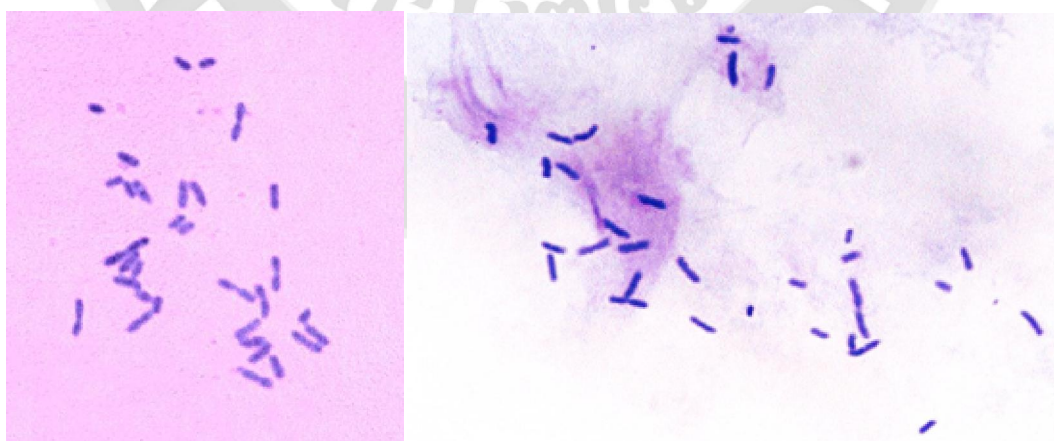
รูปที่ 6 โครโมโซมกล้วย 6 ชนิดจากเทคนิค squash ย้อมด้วยSchiff's reagent (Feulgen staining)
สเกล= 10µm

ผลจากการศึกษาจำนวนโครโมโซมในกล้วย 6 สายพันธุ์แสดงไว้ในตารางที่ 1 ข้อดีของเทคนิค squash คือทำให้มั่นใจว่ากลุ่มโครโมโซมมาจากเซลล์เดียวกันเพราะปรากฏผนังเซลล์ให้เห็น การใช้ Feulgen stain แล้วย้อมทับด้วยสี aceto-orcein ทำให้เห็นโครโมโซมชัดเจนขึ้น แต่ข้อเสียคือไม่สามารถเห็นรูปร่างโครโมโซมได้ชัดเจนเพราะกล้วยมีโครโมโซมขนาดเล็ก แม้จะกดสไลด์อย่างแรงมาก แล้วก็ตาม เทคนิค squash จึงไม่เหมาะสำหรับโครโมโซมขนาดเล็ก

ตารางที่ 1 จำนวนโครโมโซมของกล้วยพื้นเมืองจากเทคนิคการย้อมสีFeulgen

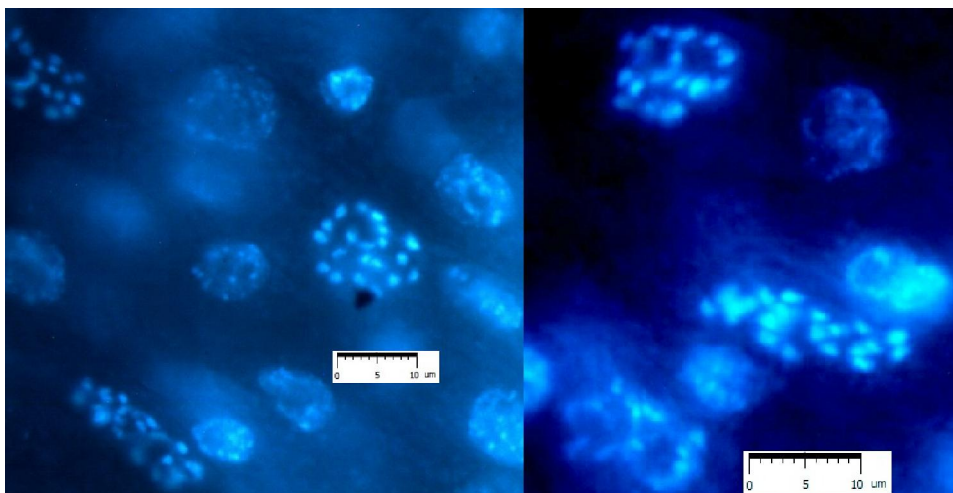
สายพันธุ์กล้วย	จำนวนโครโมโซม 2n
งาหมู	22
เซียงราย	22
สา	22
นาก	33
เทพรส	33
หอมทอง	33

2.3. ผลจากการเตรียมโครโมโซมหลังจากขยี้ปลายรากด้วยกรดอะซิติก 60%โดยวิธี air-dried แล้วย้อมด้วยสี Giemsa พบว่าสามารถแสดงให้เห็นรูปร่างของโครโมโซมกล้วยได้เป็นบางแท่งซึ่งถ้าปรับปรุงได้จะสามารถสร้างคาริโอไทป์ได้ ในรูปที่ 7 จะเห็นว่าโครโมโซมของกล้วยหักมุกมีบางแท่งที่เป็น metacentric แต่ปัญหาของเทคนิคที่ทำให้โครโมโซมหลุดออกจากเซลล์คืออยู่กระเจาากัน ทำให้ไม่สามารถระบุจำนวนโครโมโซมต่อเซลล์ได้อย่างมั่นใจ อย่างไรก็ตามยังคงมีปัญหาด้านmitotic index ที่ต่ำ ซึ่งทำให้ต้องใช้เวลามากในการส่องกล้องจุลทรรศน์

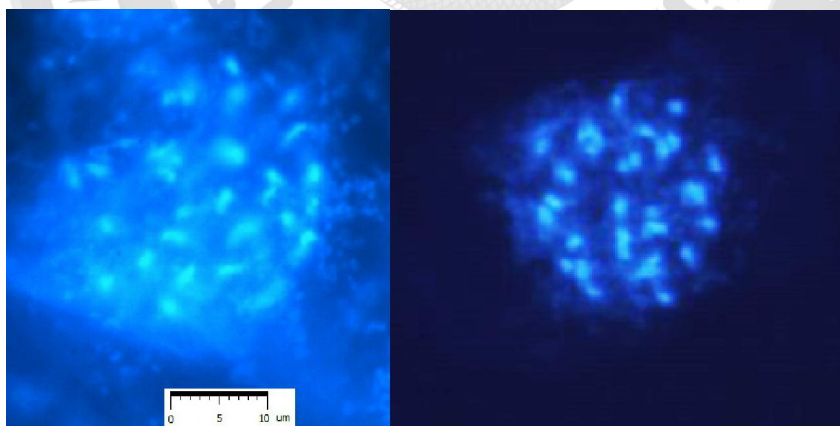


รูปที่ 7 โครโมโซมกล้วยหักมุกระยะ metaphase จากเทคนิค air-dried ย้อมด้วยสี Giemsa นับได้ประมาณ 33 แท่ง

2.4.การย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ DAPI ซึ่งเป็นสารที่จับกับบริเวณ A-T rich ใน DNA อย่างเฉพาะ ในกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์มีสมบัติเรืองแสงสีฟ้า (Excitation 340-380 nm, Emission 430 nm) เมื่อย้อมสไลด์ที่เตรียมด้วยเทคนิค squash มักเห็นโครโมโซมเป็นจุดๆ สีฟ้าภายในเซลล์ ทำให้นับจำนวนโครโมโซมได้ดังรูปที่ 8 และ รูปที่ 9

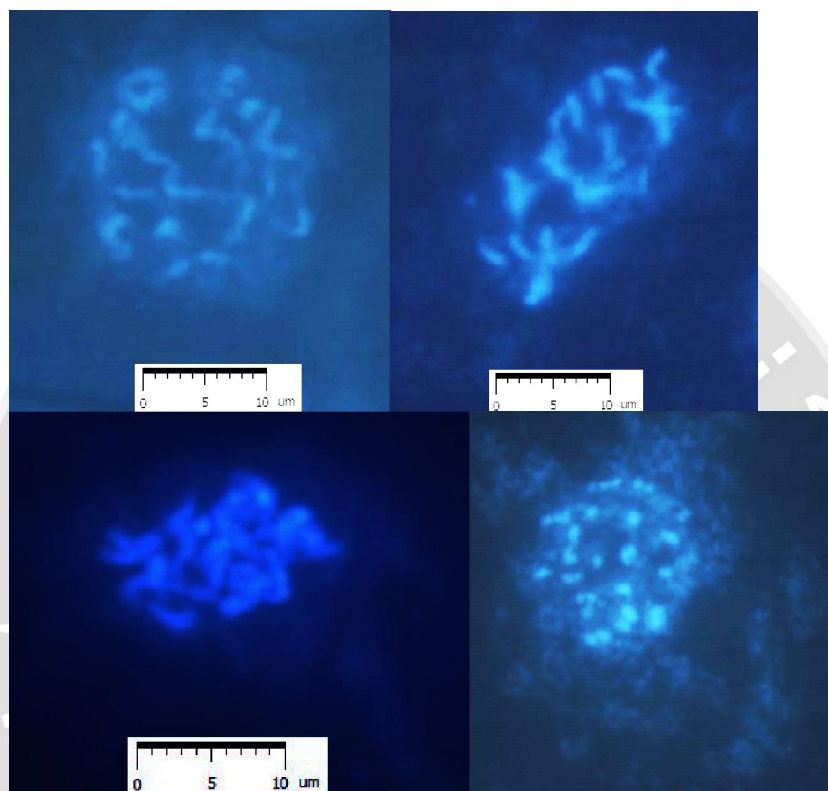


รูปที่ 8 โครโมโซมกล้วยแดงจากเทคนิค squash ย้อมด้วย DAPI สเกล = 10 μm
นับโครโมโซมได้ $2n = 22$

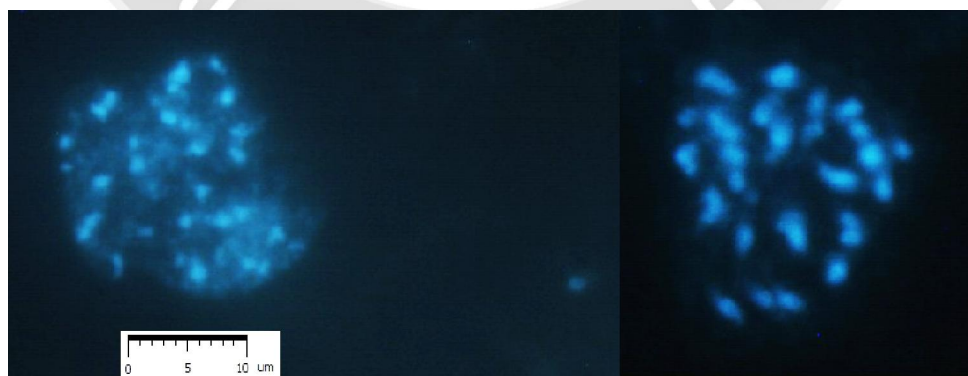


รูปที่ 9 โครโมโซมกล้วยหม่นจากเทคนิค squash ย้อมด้วย DAPI สเกล = 10 μm
นับโครโมโซมได้ $2n = 33$

ผลจากเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์แล้วย้อมด้วย DAPI จะเห็นกลุ่มโครโมโซมเพิ่มขึ้น เพราะโปรโตพลาสต์แยกกันเดี่ยวๆ จึงเห็นโครโมโซมชัดขึ้นมากกว่าเทคนิคsquash ดังรูปที่ 10 และ 11

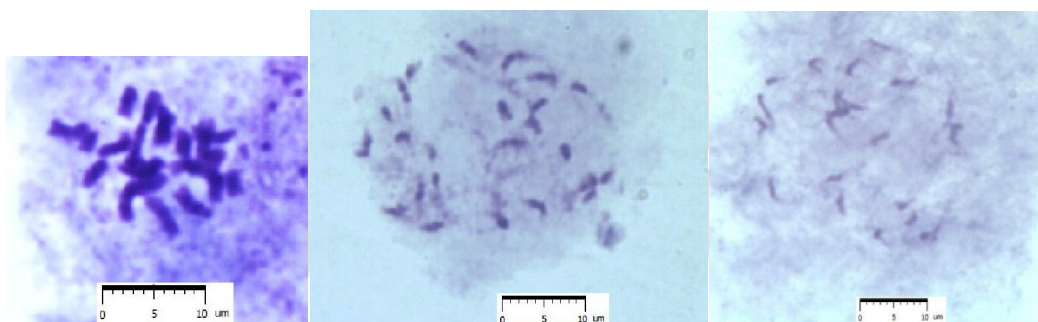


รูปที่ 10 โครโมโซมกลัวยี่จากเทคนิคหยดโปรโตพลาสต์ย้อมด้วย DAPI จำนวน $2n = 22$

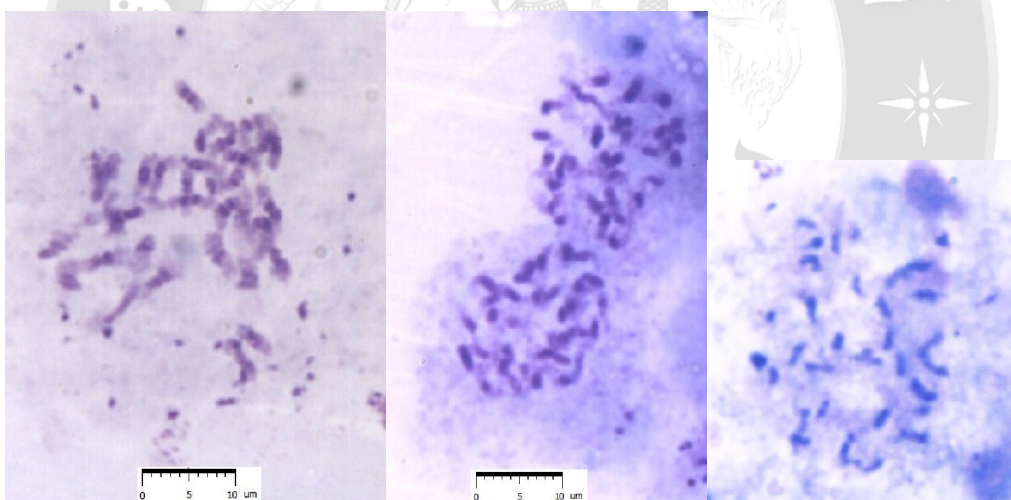


รูปที่ 11 โครโมโซมกลัวยี่เทพรสจากเทคนิคหยดโปรโตพลาสต์ย้อมด้วย DAPI จำนวน $2n = 33$

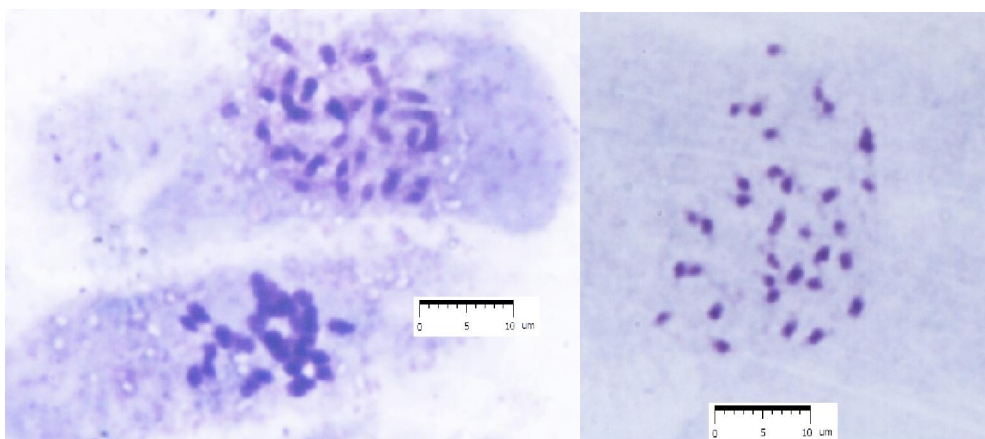
2.5.เทคนิคการหยด Protoplasts และย้อมด้วยสี Giemsa ให้ผลดีในแง่การนับจำนวนโครโมโซม $2n$ โดยเฉพาะระยะ prometaphase และ metaphase ที่ปรากฏโครโมโซมในไซโตพลาสซึมของเซลล์เดียวกัน



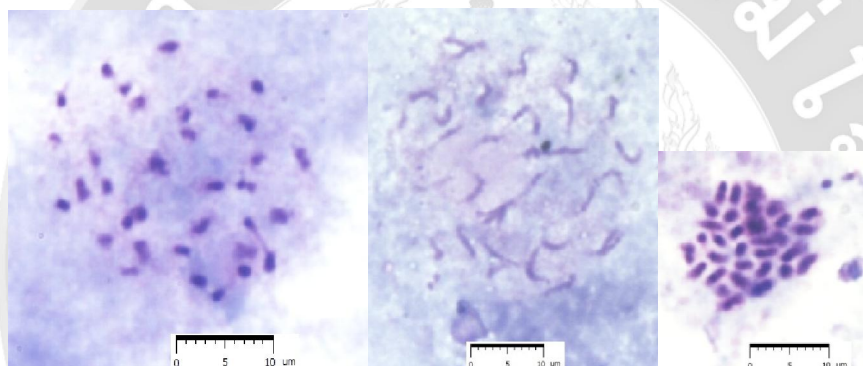
รูปที่ 12 โครโมโซมกล้วยไข่(ซ้ายสุด)และ กล้วยแวกหรือกล้วยบัวสีส้มจากเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์และย้อมสี Giemsa จำนวนโครโมโซมมี $2n=22$ สเกล = $10\ \mu\text{m}$



รูปที่ 13 โครโมโซมกล้วยหม่น กล้วยหักมุกเขียว กล้วยน้ำว้า ตามลำดับ จากเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์และย้อมสีGiemsa จำนวนโครโมโซม $2n = 33$ สเกล = $10\ \mu\text{m}$

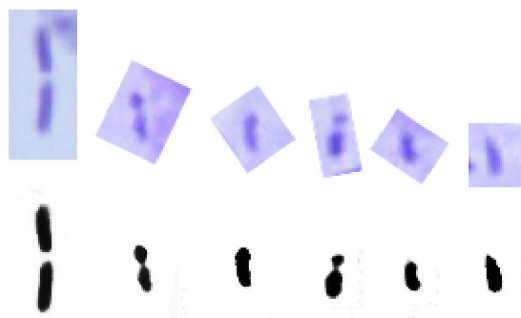


รูปที่ 14 โครโมโซมกล้วยเทพรสหรือกล้วยปลีหาย(ซ้าย) และกล้วยทิพรสหรือกล้วยโทหล่อง (ขวา) จากการหยดโปรโตพลาสต์และย้อมสีGiemsa จำนวนโครโมโซม $2n=33$ สเกล = 10 µm

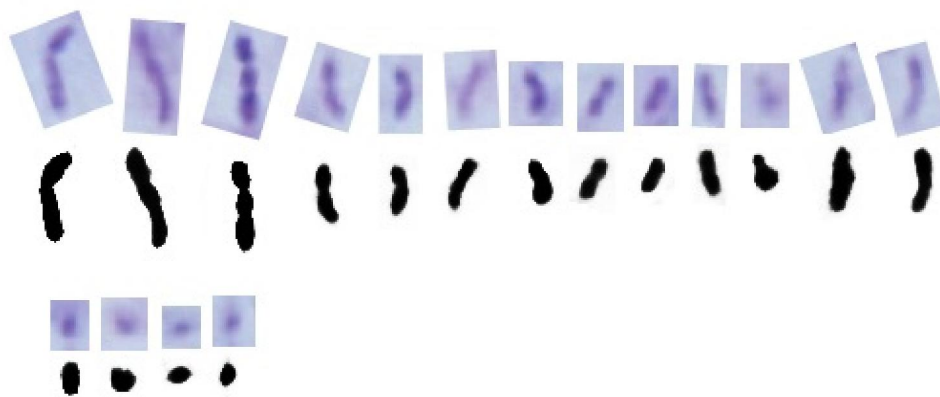


รูปที่ 15 โครโมโซมกล้วยส้ม(ซ้าย) และกล้วยครั้ง และกล้วยป้า (ขวาสุด) จากการหยดโปรโตพลาสต์และย้อมสีGiemsa นับจำนวนโครโมโซมได้ $2n = 33$ สเกล = 10 µm

3. ผลการศึกษารูปร่างของโครโมโซมในการทดลองครั้งนี้ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากข้อจำกัดของเวลา แต่พอสรุปได้ว่าเทคนิคที่เหมาะสมคือการแยกโปรโตพลาสต์และทำให้โครโมโซมหลุดออกจากโปรโตพลาสต์ดังในวิธีการของDole^Žel และคณะ(1998) จึงจะสามารถเห็นรูปร่างของโครโมโซมแต่ละแท่งชัดเจนโดยปราศจากไซโตพลาสซึม เพราะโครโมโซมจะกระจายบนพื้นสไลด์ แล้วจึงนำรูปโครโมโซมแต่ละแท่งมาทำคาริโอไทป์ เช่นในรูปที่ 16 และ 17 แสดงโครโมโซมบางแท่งของกล้วยแดงและกล้วยตานีตามลำดับ



รูปที่ 16 โครโมโซมบางแท่งของกิ้งก่ายแดง $2n=22$ มี metacentric chromosome ขนาดใหญ่



รูปที่ 17 โครโมโซมบางแท่งของกิ้งก่ายตานี $2n=22$ มี submetacentric chromosome แท่งใหญ่

วิจารณ์ผล(Discussion)

โครโมโซมกล้วยมีขนาดเล็กและโครโมโซมไม่กระจายแม้จะขูดตัวในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส เซลล์กล้วยมีไซโตพลาสซึมที่ค่อนข้างข้น การย้อมสีแบบธรรมดาไม่สามารถแยกโครโมโซมออกได้ชัดเจน ดังนั้นจึงต้องยืนยันผลโดยการย้อมสีที่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับดีเอ็นเอ เช่น Schiff's reagent ในเทคนิคฟอยเกิน (Feulgen's staining) หรือ สาร fluorochrome ซึ่งจะจับกับเบสไนโตรเจนโดยเฉพาะ การตรวจหาจำนวนโครโมโซมและการทำคาริโอไทป์จำเป็นต้องปรับเทคนิคเพื่อความถูกต้องแม่นยำ การศึกษาครั้งนี้ได้ผลในแง่การตรวจหาจำนวนโครโมโซมในแต่ละเซลล์ คือต้องใช้เทคนิคที่โครโมโซมยังรวมอยู่ในเซลล์เดียวกันโดยพยายามทำให้ไซโตพลาสซึมใสสะอาด เทคนิค protoplast dropping ของ Ananthawat-Jönsson (2001) ได้ผลดี โดยเฉพาะเมื่อย้อมด้วยสี Giemsa และ DAPI ส่วนการศึกษารูปร่างของแต่ละโครโมโซมในกล้วยต่างจีโนมของไทยนั้นคงต้องใช้วิธีแยกโปรโตพลาสต์แล้วทำให้แตกเพื่อให้โครโมโซมหลุดออกมา (Doležel et al., 1998) ในการศึกษาโครโมโซมในไมโทซิสต้องมั่นใจว่าเนื้อเยื่อกำลังเจริญและมีอัตราการแบ่งเซลล์สูง กล้วยแต่ละอย่างอาจมีชีพจักรการแบ่งเซลล์ไม่เท่ากัน พวก polyploid อาจใช้เวลานานกว่ากล้วย diploid นอกจากนี้ pretreatment ทั้งในช่วงการย้อมละลาย hypotonic KCl และสภาวะการ treat ด้วยสาร 8-hydroxyquinoline ก็มีผลสำคัญที่จะทำให้ได้ผลดี

สรุปผล (Summary)

การศึกษาโครโมโซมกล้วยโดยวิธีแยกโปรโตพลาสต์ของเนื้อเยื่อปลายรากแล้วย้อมสไลด์ด้วยสี Giemsa หรือ DAPI สามารถระบุกล้วยไทยที่พบปลูกในภาคเหนือที่มีจำนวนโครโมโซม 22 แท่ง ได้แก่ กล้วยแดง กล้วยตานี กล้วยแวก(กล้วยบัวสีส้ม) และกล้วยไข่ และกล้วยที่มีโครโมโซม 33 แท่ง ได้แก่ กล้วยหม่น(กล้วยหูก) กล้วยป้า กล้วนส้ม กล้วยหักมุกเขียว กล้วยน้ำว้า กล้วยเทพรส(ปลีหาย) กล้วยทิพรส(โทหาล้อง) ส่วนเทคนิค Feulgen staining สามารถระบุกล้วยสาและกล้วยเชียงรายว่ามีโครโมโซม 22 แท่ง ส่วนกล้วยหอมทอง กล้วยนาก กล้วยงาหมู กล้วยเทพรสมีโครโมโซม 33 แท่งโดยวิธีย้อมสีรากแล้วกดสไลด์

เอกสารอ้างอิง (References of Literature Cited)

- เบญจมาศ ศิลาชัย และประวดี สมเป็น. 2537. จำนวนและรูปร่างของโครโมโซมของกล้วยบางชนิดในประเทศไทย. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 25 : 400-407.
- เบญจมาศ ศิลาชัย. 2545. กล้วย. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ณรงค์ โคมเจลา. 2547. กล้วยปลูก. วารสารเครือข่ายพืชปลูกพื้นเมืองไทย (4) : 13 – 14.
- สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช และ สุนน มาสุธน. 2543. การศึกษาโครโมโซมพืชด้วยการย้อมเซลล์. วารสารวิทยาศาสตร์ สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย. พฤษภาคม-มิถุนายน : 178-180.
- Anamthawat-Jónsson. 2001. Molecular Cytogenetics of Introgressive Hybridization in Plants. Methods in Cell Science 23 : 139-148.
- Doležal, J. Doležalová, M. Roux, N., and I. Van denhouwe. 1998. A Novel Method to Prepare Slides for High Resolution Chromosome Studies in *Musa* spp. *InfoMusa*, 7: 3-4.
- Fukui, K., and S. Nakayama (eds.). 1996. *Plant Chromosomes: Laboratory Methods*. Boca Roton: CRC Press.
- Heslop-Harrison, J.E., and T. Schwarzacher. 2007. Domestication, Genomics and the Future for Banana. *Annals of Botany* : 1-12.
- Obute, G. C., and P. C. Aziagba. 2007. Evaluation of Karyotype Status of *Musa* L. Somaclonal Variants (Musaceae: Zingiberales). *Turk J. Bot* (31) : 143-147.
- . Pillay, M.; Ogundiwin, E., Tenkouano, A., and J. Doležal. 2006. Ploidy and Genome Composition of *Musa* Germplasm at the International Institute of Tropical Agriculture. *African Journal of Biotechnology*, 5(13): 1224-1232.
- Rekha A. and Hiremath, S. C. 2008. Chromosome Studies and Karyotype Analysis of Some Triploid Banana (*Musa* species) Cultivars of AAA Genomic Group. *J. Hortl. Sci.*: 3 (1): 30-34.
- Sandoval, J/A.; Côte, F.X., and J. Escoute. 1996. Chromosome Number Variations in Micropropagated True-to-type and Off-types Banana Plants (*Musa* AAA Grand Naine cv). *In Vitro Cell Dev. Biol.—Plant* 32: 14-17.
- Singh, Ram J. 1993. *Plant Cytogenetics*. Boca Raton: CRC Press.

