



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเซลล์พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของไม่วงศ์ก่อบางชนิดทาง
ภาคเหนือของประเทศไทย

โดย นางสาว เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ

มีนาคม 2554

สัญญาเลขที่ MRG5280007

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเซลล์พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของไม้วงศ์ก่อบางชนิดทางภาคเหนือ
ของประเทศไทย

โดย นางสาว เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract (บทคัดย่อ)

รหัสโครงการ : MRG5280007

ชื่อโครงการ : เซลล์พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของไม่วงศ์ก่อบางชนิดทางภาคเหนือของประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย : นางสาว เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : Ploenpit.C@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 16 มีนาคม 2552 ถึงวันที่ 15 มีนาคม 2554

Abstract

Fagaceae (beech family) includes 7–12 genera and 600–1000 species distributed worldwide. In Thailand, this family comprises four genera: *Castanopsis* (D. Don) Spach. (chestnut, mostly evergreen, 33 species); *Lithocarpus* Blume (stone oak, mostly evergreen, 56 species); *Quercus* L. (oak, mostly deciduous, 29 species); and *Trigonobalanus* Forman (evergreen, one species). In this study, twenty-four species were investigated: nine *Castanopsis*, six *Lithocarpus*, eight *Quercus* species and *Trigonobalanus doichangensis*. The plants under study were from Khun Mae Kuong Forest in Doi Saket district, Chiang Mai province. All samples were collected in the field, representing three types of habitats, i.e. hill-evergreen forest and hill-evergreen forest with pine, both at relatively high elevation (1000–1800 m), and dry-deciduous forest at altitudes below 800 m. At each location, 5 – 30 m tall and 30 – 100 m apart, were randomly selected, marked with identification number, and local names recorded together with their position/map within the forest. Leaf buds, and flower buds if available, from individual trees were collected for chromosome isolation. Twigs with fully grown leaves, fruits (acorns) and flowers were collected for taxonomic identification and kept as voucher specimens. The species belonging to *Castanopsis*, *Lithocarpus* and *Quercus* were found to be generally diploid with the chromosome number $2n = 24$, and the basic number $x = 12$ was confirmed in a number of species with meiosis. On the other hand, *T. doichangensis* was found, by both mitotic and meiotic analyses, to be diploid with $2n = 14$ and $x = 7$. Chromosomal mapping of the highly repetitive 18S-25S and 5S ribosomal genes by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) was performed. Most species showed four 18S-25S rDNA sites (two pairs) and two 5S rDNA sites (one pair: para-centromeric locus). On the other hand, two species, *C. argentea* and *Q. brandisianus*, had only one pair of 18S-25S rDNA genes. In general, the ribosomal gene maps based on both sequences together can be used to support the taxonomic classification, at least at the genus level. In *Castanopsis*, the 18S-25S and the 5S genes were localized on three different chromosome pairs, and comprised species-specific maps. On the other hand, the ribosomal genes in *Lithocarpus* and *Quercus* were found only on two chromosome pairs, because one of the two 18S-25S rDNA loci was localized on the same chromosome as the 5S rDNA locus. Based on this ribosomal FISH mapping, *T. doichangensis* appears to be closely related to the oak genera *Lithocarpus* and *Quercus*. The FISH markers may be used to clarify discrepancies arising from morphological assessments.

บทคัดย่อ

ไม้วงศ์ก่อกระจายตัวอยู่ทั่วโลก ประกอบด้วย 7-12 สกุล 600-1000 ชนิด สำหรับในประเทศไทย มีอยู่ 4 สกุล ได้แก่ สกุลก่อหนาม (มีอยู่ 33 ชนิด) สกุลก่อตาหมู (มีอยู่ 56 ชนิด) สกุลก่อตลับ (มีอยู่ 29 ชนิด) และสกุลก่อสามเหลี่ยม (มีอยู่ 1 ชนิด) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ศึกษาไม้วงศ์ก่อจำนวน 24 ชนิด ได้แก่ สกุลก่อหนาม 9 ชนิด สกุลก่อตาหมู 6 ชนิด สกุลก่อตลับ 8 ชนิด และสกุลก่อสามเหลี่ยม 1 ชนิด โดยเก็บตัวอย่างพืชจากพื้นที่ป่าขุนแม่กว้ง อำเภออดอยสะแก จังหวัดเชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างพืชจากป่า 3 แบบ ได้แก่ ป่าดิบเขา ป่าดิบเขาผสมสน ซึ่งอยู่ในพื้นที่สูง (สูงจากระดับน้ำทะเล 1000-1800 เมตร) และป่าดิบแล้ง ซึ่งสูงจากระดับน้ำทะเลน้อยกว่า 800 เมตร ในแต่ละสภาพป่าสุ่มเก็บตัวอย่างต้นไม้ที่มีความสูงประมาณ 5-30 เมตร และแต่ละต้นอยู่ห่างกันประมาณ 30-100 เมตร ทำเครื่องหมายต้นไม้ที่เก็บตัวอย่างและบันทึกชื่อพื้นเมืองและตำแหน่งของต้นไม้ลงในแผนที่ เก็บตัวอย่างตาใบและตาดอก (ถ้ามี) เพื่อศึกษาโครโมโซม เก็บตัวอย่างกิ่งที่มีใบ ผล และดอก เพื่อใช้จำแนกชนิด และทำเป็นตัวอย่างแห้ง จากผลการศึกษาโครโมโซมพบว่า ไม้วงศ์ก่อในสกุลก่อหนาม สกุลก่อตาหมู และก่อตลับ มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ คือ $2n = 24$ และผลจากการศึกษาโครโมโซมจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ทำให้ยืนยันได้ว่ามีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเป็น $x = 12$ นอกจากนี้ในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสและไมโอซิสของก่อสามเหลี่ยมยังพบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 14$ และ $x = 7$ ผลจากการศึกษา 18S-25S และ 5S ไรโบโซมอลยีน ด้วยเทคนิค fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) พบว่าไม่ก่อเกือบทุกชนิดมี 18S-25S ไรโบโซมอลยีนอยู่ 4 ตำแหน่ง (2 คู่) และ 5S ไรโบโซมอลยีนอยู่ 2 ตำแหน่ง (1 คู่ อยู่ใกล้เซนโทรเมียร์) อย่างไรก็ตาม มีไม้วงศ์ก่ออยู่ 2 ชนิดคือ *C. argentea* และ *Q. brandisianus* ซึ่งมี 18S-25S ไรโบโซมอลยีนอยู่ 2 ตำแหน่ง นอกจากนี้ผลจากการศึกษาจำนวนและตำแหน่งของไรโบโซมอลยีนบนโครโมโซมยังช่วยในการจำแนกไม้วงศ์ก่อในระดับสกุลได้ โดยสกุลก่อหนาม ไรโบโซมอลยีนทั้งสามคู่อยู่บนโครโมโซมคนละคู่ ส่วนในสกุลก่อตาหมูและก่อตลับพบว่า 18S-25S ไรโบโซมอลยีน คู่หนึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งเดียวกับ 5S ไรโบโซมอลยีน จึงพบโครโมโซมที่มีไรโบโซมอลยีนอยู่เพียง 2 คู่ ผลจากจำนวนและตำแหน่งของไรโบโซมอลยีนแสดงให้เห็นว่า ก่อสามเหลี่ยมมีความสัมพันธ์กับไม้วงศ์ก่อสกุลก่อตาหมูและสกุลก่อตลับ และเทคนิค FISH อาจช่วยแก้ปัญหาในการจำแนกชนิดในกรณีที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายกันมากได้

Keywords : Karyotype, Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), Fagaceae, *Castanopsis*, *Lithocarpus*, *Quercus*, *Trigonobalanus*

บทนำ

ไม้วงศ์ก่อ (family Fagaceae) เป็นไม้ยืนต้นที่มีการกระจายตัวอยู่ทั่วโลก ยกเว้นในเขตทวีปแอฟริกาใต้ ประกอบไปด้วย 7-12 สกุล 600-1000 ชนิด (Soepadmo, 1972; Chengjiu *et al.*, 1999) สำหรับในประเทศไทยพบไม้วงศ์ก่อได้ทั่วทุกภาคของประเทศ โดยพบว่าเป็นไม้เด่นในป่าดิบเขา ซึ่งจากงานสำรวจศึกษาพรรณไม้วงศ์ก่อที่พบในประเทศไทยพบว่ามีอยู่ด้วยกัน 4 สกุล 119 ชนิด ได้แก่ สกุลก่อหนาม (*Castanopsis* (D. Don) Spach.) จำนวน 33 ชนิด สกุลก่อตาหมู (*Lithocarpus* Blume) จำนวน 56 ชนิด สกุลก่อตลับ (*Quercus* L.) จำนวน 29 ชนิด และสกุลก่อสามเหลี่ยม (*Trigonobalanus* Forman) จำนวน 1 ชนิด (Phaengkai, 2006) และในจำนวนนี้มีการค้นพบชนิดใหม่ 3 ชนิด และสายพันธุ์ใหม่ 1 สายพันธุ์ (variety) (Phaengkai 2004, Phengkai 2006) นอกจากนี้ยังมีบางชนิดที่พบได้เฉพาะในประเทศไทย ได้แก่ *Castanopsis pseudo-hystrix* Phaengkai, C. *thaiensis* Phaengkai และ *Lithocarpus loratifolius* Phaengkai (Phaengkai, 2004) จะเห็นได้ว่าไม้วงศ์ก่อในประเทศไทยมีความหลากหลายของชนิดอยู่ค่อนข้างสูง รวมถึงความหลากหลายของชนิดของไม้วงศ์ก่อทั่วโลกก็สูงด้วยเช่นกัน จึงมีผู้สนใจศึกษาด้านต่าง ๆ ของไม้วงศ์ก่ออยู่มาก แต่อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญของการศึกษาคือความยุ่งยากในการจัดจำแนกชนิด เนื่องมาจากไม้วงศ์ก่อมีความแปรผันทางด้านสัณฐานวิทยา (morphological variation) มีการปรับตัวทางด้านนิเวศ (ecological adaptation) มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆ อย่างต่อเนื่อง (clinal differentiation) มีการเกิดลูกผสมในธรรมชาติ (hybridisation) มีการถ่ายเทยีน (gene flow) และมีการเกิด introgression (Schwarz, 1964; Nixon, 1997) ซึ่งสาเหตุต่างๆ เหล่านี้ได้รับการยืนยันจากข้อมูลของการศึกษาพรรณไม้วงศ์ก่อในเขตอบอุ่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ไม้สกุลโอ๊ก (*Quercus*) สกุลบีช (*Fagus*) สกุลเกาลัด (*Castania*) ในแถบยุโรป อเมริกาเหนือ และเอเชียตะวันออก (ดังตัวอย่างงานวิจัยต่อไปนี้ Müller-Starck *et al.*, 1992; Dumolin-Lapegue *et al.*, 1997; Wang, 2003; Kanno *et al.*, 2004; Bellarosa *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2005; Lang *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของไม้วงศ์ก่อในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทยยังมีอยู่น้อย ทั้งที่ไม้วงศ์ก่อบางสกุลนั้นพบการกระจายตัวเฉพาะในแถบนี้ เช่น สกุลก่อหนาม และสกุลก่อตาหมู (Soepadmo, 1972) ซึ่งทั้งสองสกุลนี้พบในประเทศไทย นอกจากนี้ไม้วงศ์ก่อสกุลก่อตลับที่พบในประเทศไทยอยู่ในสกุลย่อย *Cyclobalanopsis* ซึ่งต่างจากสกุลก่อตลับที่พบในแถบยุโรปที่อยู่ในสกุลย่อย *Quercus* (Manos *et al.*, 2001)

ความรู้ทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular cytogenetics) ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกชนิดของพืชที่เกิดมาจากลูกผสม และ ployploidy ใช้ช่วยในการศึกษาความสัมพันธ์ของ genome ระหว่างชนิด และยังสามารถช่วยในการสืบหาบรรพบุรุษของลูกผสมที่เกิดในธรรมชาติ (Anamthawat-Jonsson *et al.*, 1990; Anamthawat-Jonsson, 2001; Bennett, 2004, Kato *et al.*, 2005) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาด้านเซลล์

พันธุศาสตร์ โดยเฉพาะเซลล์พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลนั้นนิยมทำในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งมีโครโมโซมขนาดใหญ่ สำหรับไม้ยืนต้นซึ่งมีโครโมโซมขนาดเล็กนั้นก็มีข้อมูลทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ค่อนข้างน้อย ในไม้วงศ์ก่อก็เช่นเดียวกัน มีรายงานว่าไม้จำนวนโครโมโซม $2n = 24$ เกือบทุกสกุล ยกเว้นสกุล *Nothofagus* ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม $2n = 26$ (Carr and McPherson, 1986; Ohri and Ahuja, 1990; Ohri and Ahuja, 1991) จากรายงานจำนวนโครโมโซมของไม้วงศ์ก่อนั้น ส่วนใหญ่ได้ข้อมูลมาจากไม้สกุลอื่น (*Quercus*) ในยุโรป (Mehra et al., 1972; Ohri and Ahuja, 1990; D'Emérico et al., 1995) ซึ่งพบว่านอกจากจะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันแล้ว แคริโอไทป์ของแต่ละชนิดยังมีความใกล้เคียงกันมาก จึงได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับขนาดของ genome ของไม้สกุลอื่นแต่ละชนิด และทำแผนที่ของ ribosomal genes (18S-25S และ 5S rRNA genes) เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ และความแตกต่างระหว่างชนิดของไม้สกุลนี้ในยุโรป (Zoldos et al., 1998; Zoldos et al., 1999) สำหรับในเขตทวีปเอเชียมีรายงานจำนวนโครโมโซมของไม้วงศ์ก่อ สกุลก่อหนาม 9 ชนิด สกุลก่อตาหมู 5 ชนิด สกุลก่อตลับ 4 ชนิด มีจำนวนโครโมโซม $2n = 24$ ส่วนสกุลก่อสามเหลี่ยมมีจำนวนโครโมโซม $2n = 14$ (Chokchaichamnankit et al., 2007; Chen et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานการทำแผนที่ยีน (ribosomal gene mapping) ในไม้วงศ์ก่อ สกุลก่อหนาม 8 ชนิด สกุลก่อตาหมู 4 ชนิด สกุลก่อตลับ 3 ชนิด ซึ่งจากแผนที่ยีนนี้น่าจะช่วยให้ช่วยในการจัดจำแนกชนิดของไม้วงศ์ก่อได้ และยังพบว่า *C. calathiformis* และ *L. vestitus* มีจำนวนโครโมโซมเป็น polyploid รวมถึงจำนวนตำแหน่งของ ribosomal gene ก็แสดงถึงลักษณะของ polyploid และยังพบอีกว่า *L. leticellatus* บางต้นมีจำนวนโครโมโซมเป็น $2n = 14$ (Chokchaichamnankit et al., 2008) จึงเป็นเรื่องน่าสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของไม้วงศ์ก่อในประเทศไทย

ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจนำความรู้ทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของไม้วงศ์ก่อในประเทศไทย โดยจะศึกษาจำนวนโครโมโซมของไม้วงศ์ก่อแต่ละชนิด รวมถึงการทำแผนที่ยีนบนโครโมโซมด้วย เพื่อเป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์และพัฒนาให้ใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษารูปแบบแคริโอไทป์ของไม้วงศ์ก่อแต่ละชนิด
2. เพื่อศึกษาจำนวนและตำแหน่งของ ribosomal genes บนโครโมโซมของไม้วงศ์ก่อแต่ละชนิด
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างไม้วงศ์ก่อชนิดต่างๆ ในประเทศไทย โดยใช้ความรู้ทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular cytogenetics)

วิธีการทดลอง

พื้นที่ศึกษา และตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้เก็บตัวอย่างไม้วงศ์ก่อจากพื้นที่ป่าขุนแม่กวัง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างไม้วงศ์ก่อจำนวน 76 ต้น แต่ละต้นอยู่ห่างกันประมาณ 30-100 เมตร และทำเครื่องหมายบนต้นไม้แต่ละต้นที่เก็บตัวอย่างเพื่อประโยชน์ในการเก็บตัวอย่างซ้ำในครั้งต่อไป (ต้องเก็บตัวอย่าง อย่างน้อย 2 ครั้ง เนื่องจากไม้กอแต่ละชนิดมีช่วงเวลาในการออกดอกและผลไม่ตรงกัน) โดยจะเก็บตัวอย่างกิ่ง ใบ ดอก และผล เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิด และเก็บตัวอย่างตาใบ และดอกอ่อน (ถ้ามี) เพื่อใช้ในการศึกษาโครโมโซม

การจัดจำแนกชนิดของไม้วงศ์ก่อ

ตัวอย่างกิ่ง ใบ ดอก และผล ของไม้กอแต่ละต้น นำมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้หลักการจัดจำแนกตาม Flora of Thailand ของไม้วงศ์ก่อ (Phengkhai *et al.*, 2006)

การศึกษาโครโมโซมของไม้วงศ์ก่อ

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างตาใบ และดอกอ่อน (ถ้ามี) ใส่ในน้ำกลั่นที่แช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ 0-4 °C เป็นเวลา 23-27 ชั่วโมง จากนั้นย้ายรากหรือตาใบลงใน fixative (absolute ethanol 3 ส่วน และ glacial acetic 1 ส่วน) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือที่ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการเตรียมโครโมโซม

2. การเตรียมโครโมโซม

ใช้วิธีการ Protoplast dropping ตามวิธีการของ Ananthawat-Jónsson (2003) ซึ่งมีขั้นตอนสำคัญคือ นำตัวอย่างตาใบ หรือดอกอ่อนที่อยู่ใน fixative มาล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วย่อยด้วย enzyme mixture ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ cellulase และ pectinase จากนั้นทำให้เซลล์พองด้วยสารละลาย hypotonic ได้แก่ สารละลาย 75 mM KCl แล้วจึงล้างเซลล์ด้วยสารละลาย fixative จากนั้นหยดเซลล์ลงบนสไลด์

3. การตรวจดูโครโมโซม

นำสไลด์ที่เตรียมโครโมโซมได้มาย้อมสี Giemsa แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา หรือนำสไลด์ที่เตรียมได้มาย้อมด้วย DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ซึ่งเป็นสารเรืองแสง แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

4. การจัดทำแคโรไโทป์

เมื่อตรวจดูโครโมโซมแล้วพบเซลล์ที่การกระจายตัวของโครโมโซมดี ทำการบันทึกภาพแล้วนำภาพที่ได้มาจัดทำแคโรไโทป์ โดยการวัดขนาดของโครโมโซม และคำนวณค่า Relative length และค่า Arm ratio ตามวิธีการของ Levan และคณะ (1964)

การศึกษาไรโบโซมอลยีน (ribosomal genes) บนโครโมโซม

ในขั้นตอนนี้จะใช้เทคนิค fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ตามวิธีการของ Ananthawat-Jónsson (2003) และ Chokchaichamnankit และคณะ (2008) ซึ่งมีขั้นตอนสำคัญดังนี้

1. การเตรียมโครโมโซม

ใช้วิธีการเตรียมโครโมโซมที่กล่าวข้างต้น เมื่อได้โครโมโซมที่มีคุณภาพดีบนสไลด์แล้ว จะต้องเตรียมสไลด์สำหรับ hybridization โดยการนำสไลด์ไปแช่ในสารละลาย RNase ความเข้มข้น 5 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามด้วยสารละลาย proteinase K ความเข้มข้น 4-10 µg/ml และสารละลาย formamide ความเข้มข้น 4% แล้วจึงทำสไลด์ให้แห้งด้วยแอลกอฮอล์

2. การเตรียม ribosomal DNA probes

ในการศึกษารังนี้จะใช้ ribosomal DNA 2 ชนิด คือ Clone pTa71 ซึ่งเป็น ribosomal DNA ที่มีขนาดประมาณ 9 kb ประกอบไปด้วยชิ้นส่วนของยีน 18S-rRNA 5.8S-rRNA และ 25S-rRNA รวมทั้งส่วนที่เป็น non-transcribed spacers ซึ่งได้มาจากข้าวสาลี (Gerlach and Bedbrook, 1979) และ Clone pTa794 ซึ่งเป็น ribosomal DNA ที่มีขนาด 410 bp ประกอบไปด้วยชิ้นส่วนของยีน 5S rRNA และ spacer regions ซึ่งได้มาจากข้าวสาลี (Gerlach and Dyer, 1980) นำ ribosomal DNA 2 ชนิดนี้มาติดฉลากด้วยสารเรืองแสงด้วยวิธี nick translation

เมื่อได้ probe ที่ติดฉลากแล้ว จะต้องเตรียม probe สำหรับ hybridization โดยสารละลาย probe 20 µl ที่จะใช้ต้องมีส่วนผสมของ probe 50 ng สารละลาย formamide 50% สารละลาย dextran sulphate 20% สารละลาย 2xSSC และสารละลาย SDS 0.5%

3. การทำ hybridization

นำสารละลาย probe ที่เตรียมไว้หยดลงบนสไลด์ที่เตรียมไว้แล้วนำไปไว้ในที่อุณหภูมิ 89 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้เครื่องมือ Thermocycle chamber จากนั้นนำมาล้าง probe ส่วนเกินออก แล้วย้อมด้วย DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) จึงตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อบันทึกภาพ และวิเคราะห์ผลต่อไป

ผลการทดลอง

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างไม้วงศ์ก่อจำนวน 76 ต้น เมื่อจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นไม้วงศ์ก่อทั้งสิ้น 4 สกุล จำนวน 24 ชนิด โดยอยู่ในสกุลก่อหนาม (*Castanopsis*) จำนวน 9 ชนิด (29 ต้น) สกุลก่อตาหมู (*Lithocarpus*) จำนวน 6 ชนิด (22 ต้น) สกุลก่อตลับ (*Quercus*) จำนวน 8 ชนิด (23 ต้น) และสกุลก่อสามเหลี่ยม (*Trigonobalanus*) จำนวน 1 ชนิด (2 ต้น) ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลจากการศึกษาจำนวนโครโมโซมของไม้วงศ์ก่อทั้งหมด 24 ชนิด พบว่าไม้วงศ์ก่อในสกุลก่อหนาม สกุลก่อตาหมู และสกุลก่อตลับ ทุกชนิดมีจำนวนโครโมโซม $2n = 24$ แต่มีรูปแบบแคโรไพอไทป์แตกต่างกัน (ภาพที่ 1 และ 2) นอกจากนี้ยังพบว่าก่อบางชนิดที่สามารถศึกษา

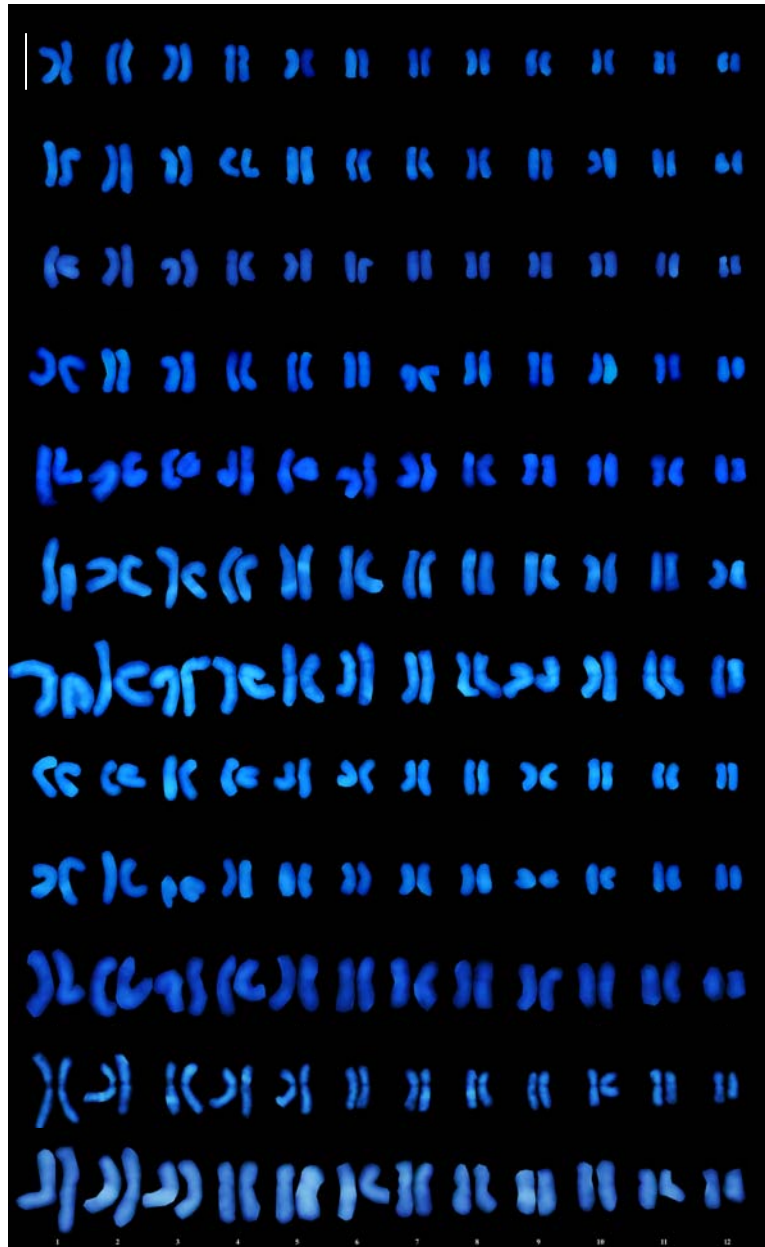
โครโมโซมจากดอกมีจำนวนโครโมโซมเป็น 12 bivalents (ภาพที่ 3) ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่าไม้ก่อทุกชนิดทั้ง 3 สกุลที่ศึกษาเป็นดิพลอยด์ และมี basic number เป็น $x = 12$ ส่วนสกุลก่อสามเหลี่ยม พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 14$ และยังพบว่าเมื่อศึกษาโครโมโซมจากดอก มีจำนวนโครโมโซมเป็น 7 bivalents (ภาพที่ 3) ซึ่งสนับสนุนว่าก่อสามเหลี่ยมเป็นดิพลอยด์ และมี basic number เป็น $x = 7$

ผลจากการศึกษาไรโบโซมอลยีน บนโครโมโซมของไม้วงศ์ก่อจำนวน 16 ชนิด พบว่าไม้วงศ์ก่อจำนวน 12 ชนิด มีจำนวน 5S rDNA เท่ากันคือ 2 ตำแหน่ง และมี 1 ชนิด คือ *Lithocarpus vestitus* มีจำนวน 5S rDNA อยู่ 3 ตำแหน่ง (ภาพที่ 4 และ 5) ส่วนอีก 3 ชนิด ผลการทดลองยังไม่ชัดเจน จึงยังสรุปไม่ได้ สำหรับการศึกษาจำนวน 18S-25S rDNA พบว่าไม้วงศ์ก่อจำนวน 11 ชนิด มีจำนวน 18S-25S rDNA อยู่ 4 ตำแหน่ง ไม้วงศ์ก่อ 2 ชนิด มีจำนวน 18S-25S rDNA อยู่ 2 ตำแหน่ง ไม้วงศ์ก่อ 1 ชนิด คือ *Castanopsis calathiformis* มีจำนวน 18S-25S rDNA อยู่ 3 ตำแหน่ง และไม้วงศ์ก่ออีก 1 ชนิด คือ *Lithocarpus vestitus* มีจำนวน 18S-25S rDNA อยู่ 6 ตำแหน่ง (ภาพที่ 4 และ 5)

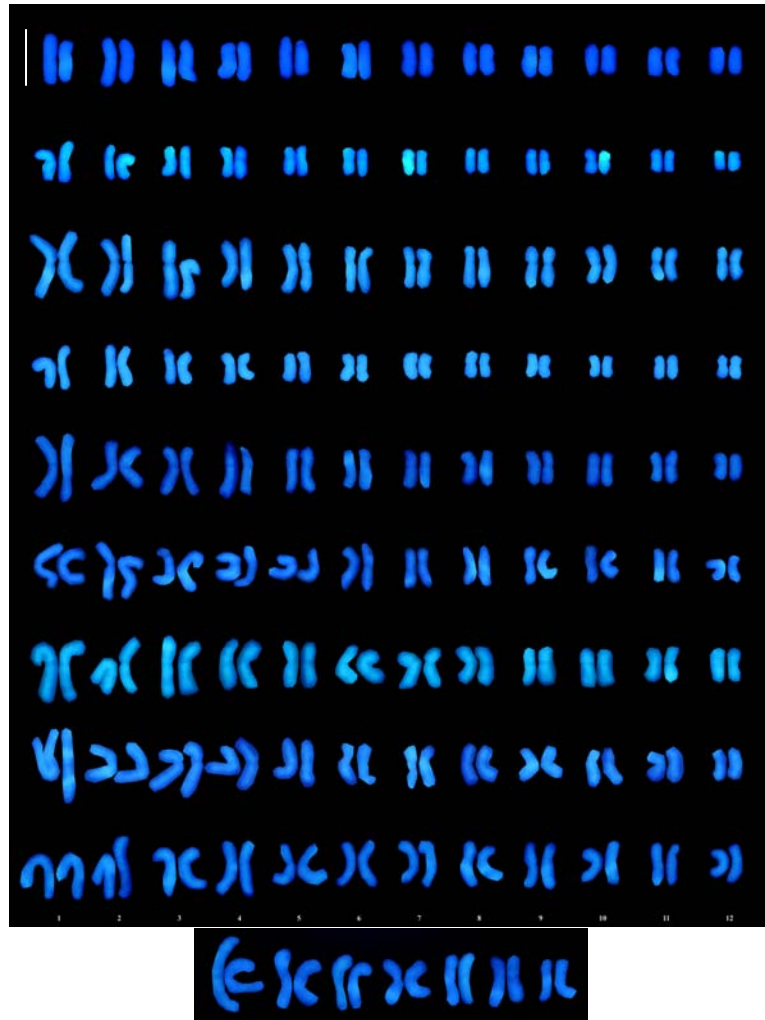
ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาจำนวนโครโมโซม และไรโบโซมอลยีน บนโครโมโซม ของไม้วงศ์
ก่อ 24 ชนิด จาก 4 สกุล

Species	Number of trees	Chromosome number (2n)	Number of 18S-25S rDNA sites	Number of 5S rDNA sites
<i>Castanopsis acuminatissima</i> (Blume) A.DC.	6	24	4	2
<i>Castanopsis argentea</i> (Blume) A.DC.	2	24	2	2
<i>Castanopsis armata</i> (Roxb.) Spach.	2	24	4	2
<i>Castanopsis calathiformis</i> (Skan.) Rehder & E.H. Wilson	3	24	3	2
<i>Castanopsis cerabrina</i> (Hickel & A. Camus) Barnett	2	24	4	2
<i>Castanopsis diversifolia</i> (Kurz) King ex Hook.f.	4	24	4	2
<i>Castanopssis fissa</i> (Champ. ex Benth.) Rehder & E.H. Wilson	2	24	NA	NA
<i>Castanopsis indica</i> (Roxb.) A.DC.	4	24	4	2
<i>Castanopsis tribuloides</i> (Sm.) A.DC.	4	24	4	NA
<i>Lithocarpus ceriferus</i> (Hickel & A. Camus) A. Camus	2	24	4	NA
<i>Lithocarpus elegans</i> (Blume) Harus ex Soepodmo	4	24	4	2
<i>L. harmandii</i> (Hickel & A. Camus) A. Camus	4	24	NA	NA
<i>Lithocarpus polystachyus</i> (A.DC.) Rehder	2	24	4	2
<i>L. recurvatus</i> Barnett	1	24	NA	NA
<i>Lithocarpus vestitus</i> (Hickel & A. Camus) A. Camus	2	24	6	3
<i>Q. helferiana</i> A.DC.	2	24	NA	NA
<i>Quercus brandisianus</i> Kurz	3	24	2	2
<i>Quercus kerrii</i> Craib	8	24	4	2
<i>Q. kingiana</i> Craib	3	24	NA	NA
<i>Quercus lenticellatus</i> Barnett	1	24	NA	NA
<i>Q. lineata</i> Blume	3	24	NA	NA
<i>Q. myrsinaefolia</i> Blume	1	24	NA	NA
<i>Q. rex</i> Hemsl.	2	24	NA	NA
<i>Trigonobalanus doichangensis</i> (A. Camus)	2	14	4	2

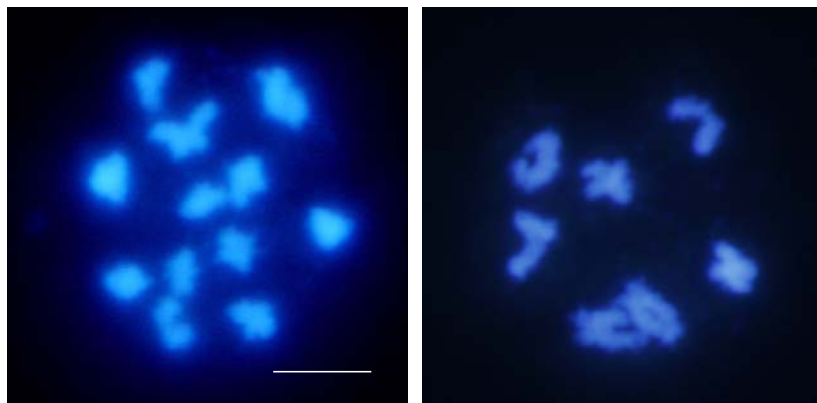
*NA = ผลการทดลองยังไม่ชัดเจน



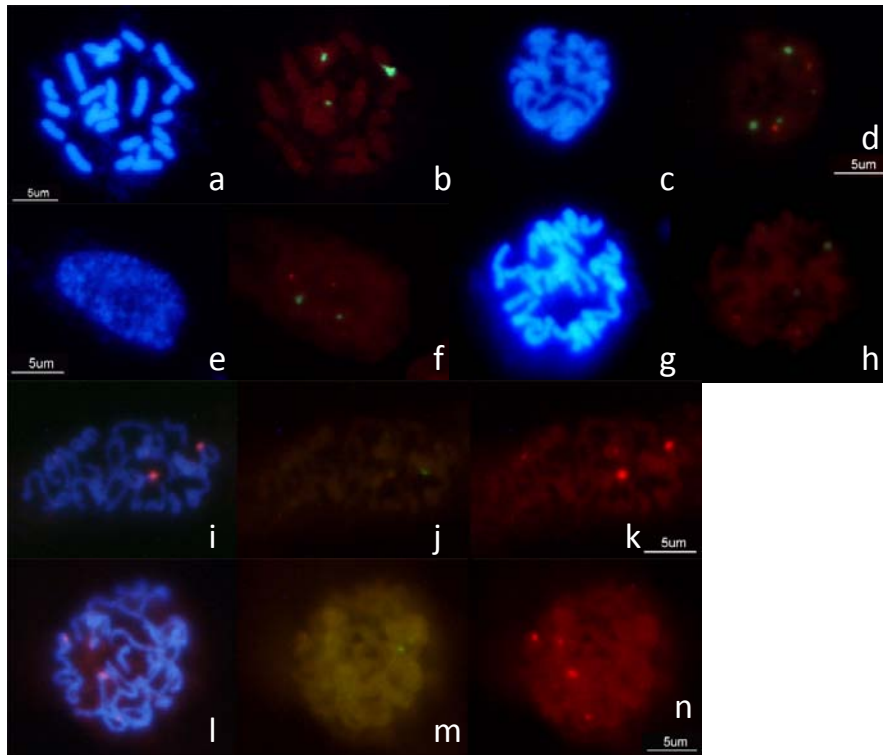
ภาพที่ 2 แครีโอไทป์ของ *Lithocarpus ceriferus*, *L. elegans*, *L. harmandianus*, *L. recurvatus*, *L. vestitus*, *Quercus brandisianus*, *Q. kerrii*, *Q. myrsinaefolius*, *Q. rex*, *Q. helferiana*, *Q. kingiana* และ *Q. lineate* เส้นสีขาวแสดงขนาด 5 ไมโครเมตร



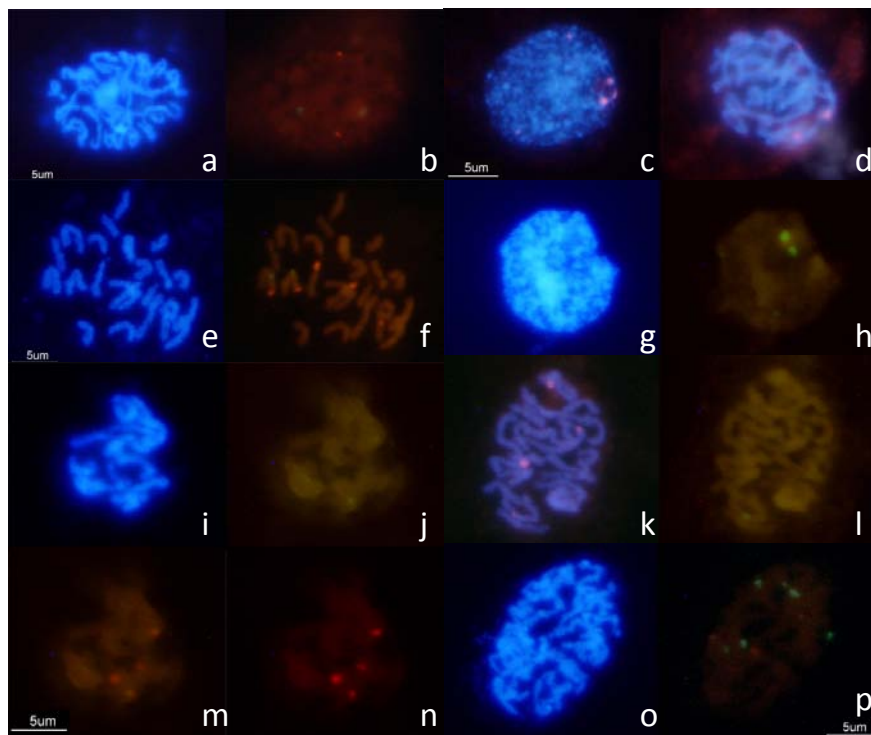
ภาพที่ 1 แคริโอไทป์ของ *Castanopsis acuminatissima*, *C. argentea*, *C. armata*, *C. calathiformis*, *C. cerabrina*, *C. diversifolia*, *C. fissa*, *C. indica*, *C. tribuloides* และ *Trigonobalanus doichangensis* เส้นสีขาวแสดงขนาด 5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 3 โครโมโซมจากดอกของ *Castanopsis indica* แสดงให้เห็นว่ามีจำนวนโครโมโซม 12 bivalents และโครโมโซมจากดอกของ *Trigonobalanus doichangensis* แสดงให้เห็นว่ามีจำนวนโครโมโซม 7 bivalents เส้นสีขาวแสดงขนาด 5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ของ 18S-25S rDNA และ 5S rDNA บนโครโมโซมของ *C. acuminatissima* (a, b) *C. Cerabrina* (c, d) *C. Argentea* (e, f) *C. Indica* (g, h) *C. armata* (i, j, k) และ *C. diversifolia* (l, m, n)



ภาพที่ 5 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ของ 18S-25S rDNA และ 5S rDNA บนโครโมโซมของ *Q. brandisianus* (a, b) *L. ceriferus* (c, d) *Q. kerrii* (e, f) *L. elegans* (g, h) *T. doichangensis* (i, j, m, n) *L. polystachyus* (k, l) และ *L. vestitus* (o, p)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาโครโมโซมของไม้วงศ์ก่อ 24 ชนิด จาก 4 สกุล พบว่าไม้วงศ์ก่อ 3 สกุล ได้แก่ สกุลก่อหนาม ก่อตลับ และก่อตาหมู มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 24$ โดยมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (basic number) เป็น $x = 12$ ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกันกับการศึกษาจำนวนโครโมโซมที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ในสกุลก่อดลับที่พบในยุโรป (Ohri and Ahuja, 1990; D'Emérico *et al.*, 1995; Zoldos *et al.*, 1999; Chokchaichamnankit *et al.*, 2007) ส่วนสกุลก่อสามเหลี่ยม มีจำนวนโครโมโซมเป็น $2n = 2x = 14$ และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเป็น $x = 7$ เช่นเดียวกับการศึกษาจำนวนโครโมโซมของก่อสามเหลี่ยมที่พบในประเทศไทย (Chen, 2007)

จากการศึกษาไรโบโซมอลยีน บนโครโมโซมของไม้วงศ์ก่อ 16 ชนิด พบว่ามีความแปรผันของตำแหน่งในแต่ละชนิด แต่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสกุลได้ โดยในสกุลก่อหนาม พบไรโบโซมอลยีนอยู่บนโครโมโซม 3 คู่ โดย 5S rDNA อยู่บริเวณใกล้เซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่หนึ่ง ส่วน 18S-25S rDNA นั้นพบอยู่บริเวณใกล้เซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่หนึ่ง และบริเวณใกล้ปลายของโครโมโซมอีกคู่หนึ่ง แต่ในสกุลก่อตาหมูก่อดลับ และก่อสามเหลี่ยม พบไรโบโซมอลยีนอยู่บนโครโมโซม 2 คู่ ถึงแม้ว่าจำนวนชนิดของก่อทั้ง 3 สกุล ที่ศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนน้อย แต่ก็บอกได้ว่า ก่อสามเหลี่ยมมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้กับสกุลก่อตาหมู และสกุลก่อดลับมากกว่าก่อหนาม นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาไรโบโซมอลยีนของก่อสกุลก่อดลับกับผลการศึกษาที่พบในยุโรป พบว่ารูปแบบของจำนวนและตำแหน่งของไรโบโซมอลยีนของก่อสกุลก่อดลับในประเทศไทยมีความคล้ายคลึงกับสกุลก่อตาหมูและก่อหนามที่พบในประเทศไทยมากกว่าก่อดลับที่พบในยุโรป ซึ่งสนับสนุนข้อมูลว่าก่อดลับที่พบในยุโรปอยู่ในสกุลย่อย *Quercus* ส่วนก่อดลับที่พบในประเทศไทยอยู่ในสกุลย่อย *Cyclobalanopsis* (Manos *et al.*, 2001)

เอกสารอ้างอิง

- Anamthawat-Jónsson, K. (2001): Molecular cytogenetics of introgressive hybridization in plants. *Methods in Cell Science* 23: 139-148.
- Anamthawat-Jónsson, K. (2003): Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysis and *in situ* hybridisation. *Methods in Cell Science* 25: 91-95.
- Anamthawat-Jónsson, K., T. Schwarzacher, A. R. Leitch, M. D. Bennett and J. S. Heslop-Harrison (1990): Discrimination between closely related *Triticeae* species using genomic DNA as a probe. *Theoretical and Applied Genetics* 79: 721-728.
- Bellarosa, R., M. C. Simeone, A. Papini and B. Schirone (2005): Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 355-370.

- Bennett, M. D. (2004): Perspectives on polyploidy in plants – ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 411-423.
- Carr, G. D. and C. McPherson (1986): Chromosome number of New Caledonian plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73: 486-489.
- Chen G, Sun WB, Han CY, Coombes A (2007) Karyomorphology of the endangered *Trigonobalanus doichangensis* (A. Camus) Forman (Fagaceae) and its taxonomic and biogeographic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* 154:321–330
- Chengjiu, H., Z. Yongtian and B. Bartholomew (1999): Fagaceae. *Flora of China* 4: 314-400.
- Chokchaichamnankit P, Anamthawat-Jonsson K, Chulalaksananukul W (2008) Chromosomal mapping of 18S-25S and 5S ribosomal genes on 15 species of Fagaceae from northern Thailand. *Silvae Genetica* 57(1): 5-13.
- Chokchaichamnankit P, Chulalaksananukul W, Phengklai C, Anamthawat-Jónsson K (2007) Karyotypes of some species of *Castanopsis*, *Lithocarpus* and *Quercus* (Fagaceae) from Khun Mae Kuang Forest in Chiang Mai province, northern Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)* 35: 38-44.
- Chung, M. Y., K-J. Kim, J-H. Pak, C-W. Park, B-Y. Sun, E. R. Myers and M. G. Chung (2005): Inferring establishment histories in populations of *Quercus dentate* (Fagaceae) from the analysis of spatial genetic structure. *Plant Systematics and Evolution* 250: 231-242.
- D'Emerico, S., P. Bianco, P. Medagli and B. Schirone (1995): Karyotype analysis in *Quercus* spp. (Fagaceae). *Silvae Genetica* 44: 66-70.
- Dumolin-Lapegue, S., B. Demesure, S. Fineschi, V. Le Corre and R. J. Petit (1997): Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475-1487.
- Gerlach, W. L. and J. R. Bedbrook (1979): Cloning and characterization of ribosomal genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* 7: 1869-1885.
- Gerlach, W. L. and T. A. Dyer TA (1980): Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Research* 8: 4851-4865.
- Kanno, M., J. Yokoyama, Y. Suyama, M. Ohyama, T. Itoh and M. Suzuki (2004): Geographical distribution of two haplotypes of chloroplast DNA in four oak species (*Quercus*) in Japan. *Journal of Plant Research* 117: 311-317.

- Kato, A., J. M. Vega, F. Han, J. C. Lamb and J. A. Birchler (2005): Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 148-154.
- Lang P., F. Dane and T. L. Kubisiak (2006): Phylogeny of *Castanea* (Fagaceae) based on chloroplast *trnT-L-F* sequence data. *Tree Genetics and Genomes* 2: 132-139.
- Levan, A., K. Fredga and A. A. Sandberg (1964): Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Manos, P. S., Z. Zhou and C. H. Cannon (2001): Systematics of Fagaceae: phylogenetic tests of reproductive trait evolution. *Journal of Plant Science* 162: 1361-1379.
- Mehra P. N., A. S. Hans and T. S. Sareen (1972): Cytomorphology of Himalayan Fagaceae. *Silvae Genetica* 21: 102-109.
- Müller-Starck G., Ph. Baradat and F. Bergmann (1992): Genetic variation within European tree species. *New Forests* 6: 23-47.
- Nixon K. C. (1997): Fagaceae. pp 436–506 in *Flora of North America North of Mexico*. Vol 3. Magnoliophyta: Magnoliidae and Hamamelidae, edited by Flora of North America Editorial Committee, Oxford University Press, New York.
- Ohri, D. and M. R. Ahuja (1990): Giemsa C-banded karyotype in *Quercus* L. (oak). *Silvae Genetica* 39: 5-6.
- Ohri, D. and M. R. Ahuja (1991): Giemsa C-banding in *Fagus sylvatica* L., *Betula pendula* Roth and *Populus tremula* L. *Silvae Genetica* 40: 72-75.
- Phengklai, C. (2004): Three new species and a new variety of Fagaceae from Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)* 32: 115-122.
- Phengklai, C., Wongprasert, T., Boonthavikoon, T., Phonsena, P. & Jongganurak, T. 2006. *Fagaceae of Thailand*. Biodiversity Research and Training Program (BRT), Bangkok Publishing House 1984 Ltd, Bangkok.
- Schwarz, O. (1964): *Quercus* L., pp. 61-64 in *Flora Europaea*, vol. 1, edited by T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. H. Valentine, S. M. Walters and D. A. Webb DA, Cambridge University Press, Cambridge.
- Soepadmo, E. (1972): Fagaceae, pp. 265-388 in *Flora Malesiana*, series I, volume 7, edited by C. G. G. J. van Steenis, Noordhoff International Publishing, Leyden.
- Wang, K-S. (2003): Genetic diversity and temporal genetic structure in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Silvae Genetica* 52: 100-106.

- Zoldos, V., D. Papes, M. Cerbah, O. Panaud, V. Besendorfer and S. Siljak-Yakovlev (1999): Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 969-977.
- Zoldos, V., D. Papes, S. C. Brown, O. Panaud and S. Siljak-Yakovlev (1998): Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter- and intra-population variation. *Genome* 41: 162-168.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
อยู่ระหว่างเขียนผลงานเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
ได้รับเชิญจากสถาบันวิจัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นวิทยากรพิเศษบรรยายในหัวข้อ “Molecular and cytogenetic analysis of Fagaceae from northern Thailand” เมื่อวันที่ 22 กันยายน 2552
เป็นวิทยากรร่วมกับ ศาสตราจารย์เกษรา อนามธวัช-จอนส์สัน และ รองศาสตราจารย์ ดร. พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง ในการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “เทคนิค FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) ในการศึกษาโครโมโซมพืช” ระหว่างวันที่ 5-7 สิงหาคม 2552 ณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
จะนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการ “The XVIII International Botanical Congress” ซึ่งจัดขึ้นที่เมืองเมลเบิร์น ประเทศออสเตรเลีย ระหว่างวันที่ 23 – 30 กรกฎาคม 2554