



กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ
พ.ศ. 2556 – 2557 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งมา ณ ที่นี้

บทคัดย่อ

พืชสมุนไพร พืชถิ่นเดียว พืชหายาก และพืชใกล้สูญพันธุ์เป็นที่ต้องการของนักเก็บพรรณไม้ทั้งในและนอกท้องถิ่น การเก็บพืชจากธรรมชาติมากเกินไปประกอบกับภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง อีกทั้งการทำลายป่าเพื่อสร้างถนน และความต้องการพื้นที่เพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ ทำให้พืชบางชนิดสูญพันธุ์ และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง การศึกษาและอนุรักษ์พืชจึงจำเป็นเร่งด่วนเพื่อการจัดการทรัพยากรพืชและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเอกลักษณ์ระดับเซลล์ของพืชสมุนไพร พืชถิ่นเดียว พืชหายาก และพืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย 5 ชนิดใน 4 วงศ์ ได้แก่ ธนนไชย (*Buchanania siamensis* Miq.) วงศ์ ANACARDIACEAE เทียนนางคาร์ (*Impatiens kerriae* Craib) วงศ์ BALSAMINACEAE ญานางแดง (*Bauhinia strychnifolia* Craib) วงศ์ LEGUMINOSAE ปุดเดือน (*Hedychium longicornutum* Griff. ex Baker) และเปราะราศี (*Kaempferia larsenii* Sirirugsa) วงศ์ ZINGIBERACEAE ส่วนของพืชที่ใช้ในการศึกษาเก็บตัวอย่างจากพืชที่เกิดในธรรมชาติจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย เตรียมโครโมโซมในการศึกษาด้วยวิธีสควอช หรือ โปรโทพลาสต์ตรอป โดยใช้รากจากต้นกล้าหรือยอดอ่อนสำหรับศึกษาโครโมโซมร่างกาย และ/หรือเก็บช่อดอกอ่อนเพื่อศึกษาลักษณะการจับคู่ของโครโมโซม ด้วยวิธีอะซิโตคาร์มินสเมียร์ ตรวจดูโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง Olympus BX50 กำลังขยาย 1,000 X บันทึกภาพโครโมโซมที่กระจายดีในเซลล์ร่างกายระยะเมทาเฟส และโครโมโซมที่จับคู่กันในเซลล์ที่กำลังแบ่งแบบไมโอซิสระยะต่าง ๆ ระบุจำนวน และการจับคู่ของโครโมโซม ผลการศึกษาพบว่าเอกลักษณ์เซลล์มีลักษณะการจับคู่ของโครโมโซม 4 ชนิด และจำนวนโครโมโซมของพืช 3 ชนิดรายงานเป็นครั้งแรก ได้แก่ ธนนไชย (11II: $2n=22$), เทียนนางคาร์ (18II: $2n=36$), ญานางแดง (13II: $2n=26$) และเปราะราศี (11II) ส่วนปุดเดือน และเปราะราศี มีจำนวนโครโมโซม $2n = 34$ และ $2n = 22$ ตามลำดับ เช่นเดียวกับรายงานที่มีมาก่อน และไม่พบความแปรผันของโครโมโซมของพืชชนิดเดียวกันจากแหล่งต่าง ๆ กัน ธนนไชยและเปราะราศีมีโครโมโซมจับคู่กันเป็น 11II และจำนวน $2n=22$ เท่ากัน แต่ขนาดของโครโมโซมแตกต่างกันชัดเจน นอกจากนี้ ในเซลล์กำเนิดเรณูของธนนไชยพบผลิตภัณฑ์เซลล์เชื่อมออกซาลेटรูปดอกไม้ และเทียนนางคาร์พบผลิตภัณฑ์ และหยดน้ำมันปริมาณมากเป็นเอกลักษณ์เซลล์พืชทั้งสองชนิด และหยดน้ำมันในเซลล์กำเนิดเรณูของเทียนนางคาร์ อาจมีประโยชน์ในแง่สมุนไพร ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไป การจับคู่โครโมโซมไม่เพียงแต่จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาจำนวนโครโมโซม แต่เป็นประโยชน์ในการระบุความสัมพันธ์ พันธุ์ และ ปริมาณผลผลิตที่เป็นผล เมล็ด และการสืบทอดลูกหลานต่อไปของพืชชนิดนั้น การเป็นลูกผสมหรือเป็นพืชที่เกิดในธรรมชาติ ซึ่งสามารถนำข้อมูลนี้ไปใช้ในการอนุรักษ์และบริหารจัดการทรัพยากรพืชได้ พืชทุกชนิดที่นำมาศึกษา ยกเว้นปุดเดือน มีการจับคู่กันเป็นไบวาเลนต์ แสดงว่าพืชทุกชนิดมีความสมบูรณ์พันธุ์ ที่จะสืบทอดสายพันธุ์สู่ลูกหลานต่อไปได้เป็นอย่างดี และมีผลผลิตเป็นเมล็ดและผลจำนวนมากอย่างสมบูรณ์ ทุกชนิดที่นำมาศึกษาเป็นพืชพืชถิ่นเดียว พืชหายาก และ/หรือพืชใกล้สูญพันธุ์เนื่องจากมีถิ่นที่อยู่และกระจายตัวอยู่ในบริเวณที่จำกัด และมีการผสมพันธุ์ในเชื้อสายเดียวกัน ซึ่งถ้าหากมีการขยาย อนุรักษ์ และปรับปรุงพันธุกรรมจะทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืน จำนวนและ/หรือรูปร่างลักษณะโครโมโซมของพืชแต่ละชนิดมีความจำเพาะเป็นเอกลักษณ์เซลล์พืช ซึ่งเป็นข้อมูลพันธุกรรมที่มีประโยชน์ในการ ปกป้อง และระบุพันธุ์ การวิเคราะห์ยีนโม การปรับปรุงสายพันธุ์ หาสายสัมพันธ์ของพืช ดูภาพการณีสู่พันธุ์ และการอนุรักษ์พันธุ์ของพืชดังกล่าว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการจัดการและวางนโยบายการพัฒนาการใช้ทรัพยากร และสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: โครโมโซม, พืชถิ่นเดียว, พืชสมุนไพร, พืชหายาก, พืชใกล้สูญพันธุ์

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)

Medicinal endemic rare and threatened plants are attractive to both local and foreign collector. Over collection from natural resources and global climate change and also deforestation for road development and land use demands are causing the extinction of some species and loss of genetic diversity, intensive study and conservation of available species are needed for sustainable use and resource management. This research project aims to study cytogenetic Identification of medicinal endemic rare and threatened plants of 5 species from 4 Families in Thailand. Those are *Buchanania siamensis* Miq. (ANACARDIACEAE), *Impatiens kerriae* Craib (BALSAMINACEAE), *Bauhinia strychnifolia* Craib (LEGUMINOSAE), *Hedychium longicornutum* Griff. ex Baker and *Kaempferia larsenii* Sirirugsa (ZINGIBERACEAE). Plant materials of each species used in this study were from living plants collection from wild habitats in various parts of Thailand. Chromosome preparations were made from young root of seedling or young shoot or buds for mitotic analysis and young inflorescences for meiotic figures. The mitotic chromosomes were prepared by Feulgen squash and/or protoplast dropping method. Meiotic chromosomes were prepared using aceto-carmin smear technique. The chromosomes have been examined under 1,000 x magnifications in Olympus BX50 light microscope. Well spread mitotic metaphases and various stages of meiotic pairing were photographed. The results reveal that cytogenetic based identification as meiotic figure of 4 species and chromosome number of 3 species are reported for the first time: *Bu. siamensis* Miq. (11II: $2n=22$), *I. kerriae* Craib (18II: $2n=36$), *B. strychnifolia* Craib (13II: $2n=26$) and *k. larsenii* Sirirugsa (11II). On the other hand; *H. longicornutum* and *K. larsenii* Sirirugsa have $2n = 34$ and $2n = 22$ respectively which resemble to those of previous study. It was not found chromosomal variation in a species from geographic difference. Chromosome pairing and chromosome number of *Bu. siamensis* and *K. larsenii* Sirirugsa are similar as 11II and $2n=22$ but their sizes are different. Moreover, calcium oxalate crystals of druse and raphide are found in pollen mother cell of *Bu. siamensis* and *I. kerriae*, respectively. A large amount of oil droplet is also commonly in microsporocyte of *I. kerriae*. Crystals and oil droplet are cellular identification of these two species. More interesting is that oil droplet may be bioactive compound which need further study. Meiotic figures are not only useful for chromosome number investigation but also for fertility, fruit, seed and progeny productions, hybrid or wild species indication which will be supported to conservation strategy and plant resource management. Almost species studied except *H. longicornutum* show chromosome pairing in bivalent. These indicate that *B. strychnifolia*, *Bu. siamensis*, *I. kerriae* and *K. larsenii* are wild species with high fertility and productivity. They are endemic rare and/or threatened species according to their habitats which may particularly narrow ecological niches, small distributional ranges and also close



inbreeding. Hence plant propagation conservation and improvement are needed for sustainable use. Chromosome number and meiotic figure of each species are used as cell identification which is very useful for plant species protection and identification genome analysis plant improvement phylogeny and conservation. This will be practical for environmental policy and sustainable management of natural resources.

Key words: chromosome, endemic plant, medicinal plant, rare plant, threatend plant

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
ส่วนประกอบตอนต้น	
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	8
ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง	
1. บทนำ	9
2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	9
3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	10
4. ผลการวิจัย	13
5. อภิปรายและวิจารณ์ผล	20
6. สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ	22
7. บรรณานุกรม	23
ส่วนประกอบตอนท้าย	
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยและคณะนักวิจัยโครงการที่ 2	25



สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชื่อพืช สถานภาพและการใช้ประโยชน์ของพืชที่ใช้ในการศึกษา	12
2	ผลการศึกษาโครโมโซมของ ธนนไชย เทียนนางคาร์ ขยัน ปุดเดือน และเปราะราศี	13
3	เปรียบเทียบผลการศึกษาจำนวนและการจับคู่โครโมโซมจากการศึกษาครั้งนี้และ การศึกษาที่มีมาก่อน	21

สารบัญภาพ (List of Illustration)

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะช่อดอก โครโมโซมจากเซลล์ปลายยอดและจากเซลล์กำเนิดเรณูของธัญไชย	14
2	ลักษณะดอก ผล ต้น และโครโมโซมในเซลล์กำเนิดเรณูของเทียนนางคาร์	15
3	ลักษณะช่อดอก ลำต้น และโครโมโซมในเซลล์กำเนิดเรณูของหญ้านางแดง	16
4	ลักษณะช่อดอก ราก ลำต้นเทียม และโครโมโซมในเซลล์ปลายรากของปุดเดือน	17
5	ลักษณะใบ ดอก โครโมโซมในเซลล์ปลายรากและเซลล์กำเนิดเรณูของเปราะราศี	18
6	ผลึกออกซาเลตรูปดอกไม้และรูปเข็มที่พบในธัญไชยและเทียนนางคาร์และหยदन้ำมันในเซลล์กำเนิดเรณูของเทียนนางคาร์	19



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

II	หมายถึง การจับคู่ของโครโมโซมคู่เหมือนแบบไบวาเลนต์
Meiotic figure	หมายถึง การจับคู่ของโครโมโซม
2n	หมายถึง จำนวนโครโมโซมในเซลล์ร่างกาย

1. บทนำ

ปัจจุบันมีการส่งเสริมให้ใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการรักษาโรค เพื่อทดแทนยาแผนปัจจุบัน เป็นการลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ และเพิ่มรายได้ให้กับท้องถิ่นให้มากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ โดยถือเป็นวาระแห่งชาติ มีตัวยาที่อยู่ในตำรับยาใน ร่างคู่มือการใช้ยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ.2554 จำนวน 247 ชนิด ที่ยังไม่มีข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ครบถ้วน นอกจากนั้นพบว่า มีสมุนไพรต่างชนิดที่เรียกชื่อเหมือนกัน แต่มีสรรพคุณแตกต่างกันเป็นจำนวนมากทำให้มีความสับสนในการนำพืชสมุนไพรเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ซึ่งอาจเกิดผลเสียแก่ผู้บริโภคได้ คณะผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะทำการศึกษาลักษณะระดับเซลล์ของพืชสมุนไพร พืชอาหาร พืชถิ่นเดียวและพืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย เพื่อช่วยในการระบุชื่อพืช และเป็นข้อมูลเอกลักษณ์ของพืชที่ใช้อ้างอิงในการปกป้องและอนุรักษ์พันธุกรรมพืช เป็นข้อมูลที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิต และเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องตามหลักพฤกษศาสตร์ ที่ส่งเสริมคุณภาพวัตถุดิบพืชที่จะนำไปใช้เป็นพืชเศรษฐกิจได้อย่างมีมาตรฐานสากล ซึ่งจะนำไปใช้ในการจัดการและวางนโยบายการพัฒนาการใช้ทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน โดยทำการวิจัยร่วมกับคณะนักวิจัยที่อยู่ภายใต้แผนงานวิจัยเอกลักษณ์ระดับเซลล์ และโมเลกุล ของพืชสมุนไพรพืชอาหารพืชถิ่นเดียวและพืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย

การศึกษาเอกลักษณ์ระดับเซลล์ (cytogenetic based identification) ทำได้โดยศึกษาโครโมโซม ซึ่งต้องศึกษาจากเนื้อเยื่อที่กำลังแบ่งเซลล์เท่านั้น เช่น ปลายยอด ปลายราก ยอดอ่อน ใบอ่อน หรือดอกอ่อน ศึกษาจำนวน ลักษณะ หรือการจัดคู่ของโครโมโซม ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และชิ้นส่วนพืชที่นำมาศึกษา รายงานผลการศึกษาเป็นจำนวนโครโมโซม (chromosome number) และ/หรือ ลักษณะการจัดคู่ของโครโมโซม (meiotic figure) หรือแคโรไโทป์ (karyotype) หรือศึกษาด้วยวิธี Flow cytometry ผลการศึกษาจะเป็นข้อมูลที่ใช้ในการระบุชื่อพืช และเป็นข้อมูลเอกลักษณ์ของพืชที่ใช้อ้างอิงในการปกป้องและอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตและเป็นวัตถุดิบที่มีมาตรฐานสากล หาสายสัมพันธ์และวิวัฒนาการระหว่างพืช การติดตามสถานะสิ่งแวดล้อม ตลอดจนการศึกษาในสาขาอื่น ๆ

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อน ซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพโดยเฉพาะพันธุ์พืชจำนวนมาก ประเมินว่าน่าจะมีพันธุ์พืชไม่น้อยกว่า 15,000 ชนิด ซึ่งในปัจจุบันมีการค้นพบพืชชนิดใหม่ของโลกจากป่าในหลายจังหวัดของประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง ขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของสภาวะโลกร้อน การบุกรุกทำลายป่า การนำทรัพยากรมาใช้อย่างไม่คำนึงถึงคนรุ่นหลังและการอนุรักษ์ ทำให้แหล่งอาศัยของพืชถูกทำลายอย่างต่อเนื่อง และพืชจำนวนมากอยู่ในสถานะใกล้สูญพันธุ์ ในจำนวนนั้นมีพืชหลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยาและหลายชนิดยังไม่ได้ทำการศึกษาวิจัย มีประมาณการว่า ถ้าการทำลายป่าในประเทศเขตร้อนยังคงดำเนินต่อไปในอัตราที่เป็นอยู่ในขณะนี้ พืชอย่างน้อย 60,000 ชนิด (ประมาณ 1/4 ของจำนวนพืชทั้งโลก) อาจจะสูญพันธุ์ภายใน 50 ปี ข้างหน้า (Hamann, 1988)

จากการสำรวจข้อมูลเบื้องต้นของโครงการความหลากหลายทางชีวภาพและการอนุรักษ์พันธุ์พืชใกล้สูญพันธุ์ พืชเฉพาะถิ่น พืชอาหาร พืชสมุนไพร และพืชที่มีศักยภาพเป็นไม้ดอกไม้ประดับในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช ในพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดกาญจนบุรี พบว่า ยังมีพืชสมุนไพรพืชอาหาร พืชถิ่นเดียวและพืชใกล้สูญพันธุ์ ของประเทศไทยเป็นจำนวนมากที่ยังไม่เป็นที่รู้จัก และ

เห็นคุณค่าของคนในท้องถิ่น ตลอดจนยังไม่มีการศึกษาวิจัยและอนุรักษ์พันธุ์กรรมพร้อม ๆ กับการขยายพันธุ์เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างแท้จริงและยังไม่มีมีการระบุชื่อวิทยาศาสตร์อย่างถูกต้องตามหลักพฤกษศาสตร์ ภูมิปัญญาชาวบ้านยังไม่มีเผยแพร่จากหมอยาประจำถิ่น (พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง และคณะ, 2554)

แม้ว่าการศึกษาเอกลักษณ์ทางเซลล์พันธุศาสตร์พืชมีความสำคัญในการระบุชื่อพืช บ่งชี้ความสมบูรณ์พันธุ์ และเป็นข้อมูลเอกลักษณ์ของพืชที่ใช้อ้างอิงในการปกป้องและอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช เป็นข้อมูลที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มผลผลิตและเป็นวัตถุดิบที่มีมาตรฐานสากล หาสายสัมพันธ์และวิวัฒนาการระหว่างพืช การติดตามสถานะสิ่งแวดล้อม และการศึกษาในสาขาอื่น ๆ โดยเฉพาะการหาตำแหน่งยีน และเครื่องหมายจำเพาะทางพันธุกรรม แต่การศึกษาเอกลักษณ์ทางเซลล์พันธุศาสตร์พืชในประเทศไทยยังไม่แพร่หลายและมีการรวบรวมผลการศึกษโครโมโซมพืชในประเทศไทยไว้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 ใน Report on chromosome number of plants in Thailand (Soontornchainaksaeng, 2005) คณะผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะทำการศึกษาร่วมกับคณะนักวิจัยที่อยู่ภายใต้แผนงานวิจัยเอกลักษณ์ระดับเซลล์ และโมเลกุลของพืชสมุนไพรพืชอาหารพืชถิ่นเดียวและพืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องตามหลักพฤกษศาสตร์ ที่ส่งเสริมคุณภาพวัตถุดิบพืชที่จะนำไปเป็นพืชเศรษฐกิจได้อย่างมีมาตรฐานสากล ซึ่งจะประโยชน์ในการจัดการและวางนโยบายการพัฒนาการใช้ทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน

พืชที่นำมาศึกษาเป็นพืชหายากและมีศักยภาพเป็นพืชเศรษฐกิจ 5 ชนิด ได้แก่ ธนนิไชย (*Buchanania siamensis* Miq.) วงศ์ ANACARDIACEAE เทียนนางคาร์ (*Impatiens kerriae* Craib) วงศ์ BALSAMINACEAE ขยันทัน (*Bauhinia strychnifolia* Craib) วงศ์ LEGUMINOSAE ปุดเดือน (*Hedychium longicornutum* Griff. ex Baker) และเปราะราศี (*Kaempferia larsenii* Sirirugsa) วงศ์ ZINGIBERACEAE พบว่า มีการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากมาก่อน 2 ชนิดคือ ปุดเดือน ($2n = 34$: Eksomtramage *et al.*, 2002) และเปราะราศี ($2n = 22$: Saensouk, & Saensouk, 2004) และไม่พบว่ามีผู้ศึกษา meiotic figure มาก่อนทั้ง 5 ชนิด

3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สํารวจและสืบค้นข้อมูลพืชสมุนไพร พืชถิ่นเดียว พืชหายาก และพืชใกล้สูญพันธุ์ออกเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร พืชหายาก พืชใกล้สูญพันธุ์ และพืชถิ่นเดียวของประเทศไทย 5 ชนิดได้แก่ ธนนิไชย เทียนนางคาร์ ขยันทัน ปุดเดือน และเปราะราศี (ตารางที่ 1) พร้อมกับโครงการที่อยู่ภายใต้แผนงานวิจัยเอกลักษณ์พันธุ์กรรมระดับเซลล์พืชสมุนไพร พืชถิ่นเดียว พืชหายาก และพืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย โดยเก็บดอกอ่อน ตาอ่อน ราก และ/หรือต้นกล้าของพืชที่ใช้ในการศึกษานำมาปลูกไว้ที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อศึกษาเอกลักษณ์ระดับเซลล์ด้วยเทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์

3.2 ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อที่กำลังแบ่งเซลล์เท่านั้น ซึ่งอาจเป็นปลายยอด ปลายราก ยอดอ่อน ใบอ่อน หรือดอกอ่อน ศึกษาจำนวน ลักษณะ หรือการจับคู่ของโครโมโซมจากเซลล์ไมโครสปอร์โรไซท์หรือเซลล์ก้านเรณู ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และชิ้นส่วนพืชที่นำมาศึกษาดังนี้

3.2.1 การศึกษาโครโมโซมในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสด้วยวิธี Feulgen squash (Soontornchainaksaeng & Jenjittikul, 2010)

1) นำปลายราก ยอดอ่อน หรือหน่ออ่อนของพืชมาใส่ในสารละลายอิมมัลชัน para-dichlorobenzene (PCB) และ/หรือ ice-water ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4-27 ชั่วโมง ขึ้นกับชนิดของพืช

- 2) ย้ายรากจากสารละลายในข้อ 1 มาแช่ในสารละลาย acetic alcohol อย่างน้อย 2 ชั่วโมงเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะทำการศึกษา
- 3) นำชิ้นส่วนพืชแช่ในสารละลาย 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 8-12 นาที ขึ้นอยู่กับขนาดของพืชและระยะเวลาในการเก็บใน acetic alcohol
- 4) ตัดเฉพาะปลายราก หรือเลือกเฉพาะส่วนยอด วางบนสไลด์ หยดสี aceto-orcein ขยี้ชิ้นส่วนพืชด้วยปลายปากคิ๊บ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ เคาะเบาๆ ด้วยปลายดินสอ ซับสีส่วนเกินด้วยกระดาษซับ
- 5) นำสไลด์ที่เตรียมไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ่ายรูปเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายดีด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย 100x
- 6) วิเคราะห์ผลด้วยการนับจำนวนและศึกษารายละเอียดอื่นๆ ของโครโมโซมอย่างน้อยชนิดละ 10 เซลล์

3.2.2 การศึกษาโครโมโซมในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสด้วยวิธี Protoplast dropping (Anamthawat-Jonsson, 2003)

- 1) นำยอดอ่อน หรือหน่ออ่อนของพืชมาใส่ใน ice-water เป็นเวลา 24-29 ชั่วโมง ขึ้นกับชนิดของพืช
- 2) ย้ายยอดหรือหน่อจากสารละลายในข้อ 1 มาแช่ในสารละลาย acetic alcohol อย่างน้อย 2 ชั่วโมงเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะทำการศึกษา
- 3) นำยอดหรือหน่อมาแช่ในน้ำกลั่นอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นย่ำชิ้นส่วนพืชลงใน enzyme mixture อย่างน้อย 4 ชั่วโมง
- 4) ขยี้ชิ้นส่วนพืชด้วยปลายปิเปตแล้วดูดเฉพาะสารละลาย กรองด้วย membrane ที่มีขนาดของรู 42 ไมโครเมตร
- 5) เติมสารละลาย 75 mM KCl ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที
- 6)ปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- 7) เทส่วนของเหลวใสทิ้ง ละลาย pellet ด้วย fixative ผสมให้เข้ากัน ทั้งไว้ประมาณ 5-10 นาที
- 8) ทำซ้ำ ข้อ 6) – 7) 2-3 ครั้ง
- 9) ละลายส่วนที่ตกตะกอน (pellet) ด้วย fixative ในปริมาณที่เหมาะสม เก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะทำการศึกษา
- 10) เตรียมสไลด์เพื่อศึกษาเอกลักษณ์ระดับเซลล์เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

3.2.3 การศึกษาการจับคู่ของโครโมโซมจากเซลล์ไมโครสปอร์ไรโซต์ด้วยวิธี Propiono – carmine smear (Soontornchainaksaeng *et al.*, 2003)

- 1) เก็บดอกอ่อน แช่ในสารละลาย Carnoy's solution เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
- 2) ล้างดอกอ่อนด้วย 70% alcohol 2-3 ครั้ง แล้วเก็บรักษาใน 70% alcohol ที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะทำการศึกษา



3) เชื้อเฉพาะอับเรณูวางบนสไลด์ หยดสี aceto-carminc นำสไลด์ผ่านเปลวไฟพอร้อน ขยี้ขึ้นอับเรณูด้วยปากคีบ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ เคาะเบาๆ ด้วยปลายดินสอ ซับสีส่วนเกินด้วยกระดาษซับ

4) นำสไลด์ที่เตรียมไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ่ายรูปเซลล์ที่มีการจับคู่ของโครโมโซมชัดเจน ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย 100x

5) วิเคราะห์ผลด้วยการนับจำนวนและลักษณะการจับคู่ของโครโมโซม อย่างน้อยชนิดละ 10 เซลล์

ตารางที่ 1 ชื่อพืช สถานภาพและการใช้ประโยชน์ของพืชที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อวิทยาศาสตร์ วงศ์	ชื่อไทย	สถานภาพ			การใช้ประโยชน์
		พืชหายาก	พืชใกล้สูญพันธุ์	พืชถิ่นเดียว	
<i>Buchanania siamensis</i> Miq. ANACARDIACEAE	ธนนไชย	✓		✓	สมุนไพร อาหาร และไม้ประดับ
<i>Impatiens kerrii</i> Craib BALSAMINACEAE	เทียนนาง คาร์	✓	✓		ไม้ประดับ
<i>Bauhinia strychnifolia</i> Craib LEGUMINOSAE- CAESALPINIOIDEAE	ขยันทัน		✓	✓	สมุนไพร, อาหาร และไม้ประดับ
<i>Hedychium longicornutum</i> Griff. ex Baker ZINGIBERACEAE	ปุดเดือน	✓	✓		สมุนไพรและไม้ ประดับ
<i>Kaempferia larsenii</i> Sirirugsa ZINGIBERACEAE	เปราะราศี	✓	✓	✓	สมุนไพร อาหาร และไม้ประดับ

3.3 ศึกษาเอกลักษณ์พันธุกรรมระดับเซลล์ รายงานผลการศึกษาเป็นจำนวนโครโมโซม (chromosome number) และ/หรือ ลักษณะการจับคู่ของโครโมโซม (meiotic figure)

3.4 เผยแพร่ผลการศึกษาโดยการรายงาน และตีพิมพ์ผลงานที่มีการศึกษาสมบูรณ์แล้ว

3.5 เผยแพร่ความรู้สู่ชุมชนร่วมกับโครงการที่ 1

4. ผลการวิจัย

ผลการศึกษาเอกลักษณ์เซลล์ของ ธนนไชย เทียนนางคาร์ หย้านางแดง ปุดเดือน และเปราะราศี สรุปลไว้ในตารางที่ 2 และรูปที่ 1 – รูปที่ 5 นอกจากนี้ ในเซลล์กำเนิดเรณูของธนนไชยพบผลึกแคลเซียมออกซาลेट (รูปที่ 6) รูปดอกไม้ (druse) และเทียนนางคาร์พบผลึกรูปเข็ม (raphide) และหยดน้ำมันปริมาณมากเป็นเอกลักษณ์เซลล์พืชทั้งสองชนิด และหยดน้ำมันในเซลล์กำเนิดเรณูของเทียนนางคาร์ อาจมีประโยชน์ในแง่สมุนไพร ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาโครโมโซมของ ธนนไชย เทียนนางคาร์ ขยัน ปุดเดือน และเปราะราศี

วงศ์ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อไทย	สถานภาพ/ การใช้ประโยชน์	แหล่งที่เก็บ (จังหวัด/อำเภอ)	เอกลักษณ์เซลล์	
			2n	meiotic figure
ANACARDIACEAE <i>Buchanania siamensis</i> Miq. ธนนไชย**	หายาก, ถิ่นเดียว/ สมุนไพร, ไม้ประดับ	ร้อยเอ็ด	22	
		สุรินทร์	22	11II
		อุบลราชธานี	22	
BALSAMINACEAE <i>Impatiens kerriae</i> Craib เทียนนางคาร์***, ****	หายาก, ใกล้สูญพันธุ์/ ไม้ประดับ	เชียงใหม่/		
		-ดอยอ่างขาง	36	18II
		-ดอยเชียงดาว	36	18II
LEGUMINOSAE <i>Bauhinia strychnifolia</i> Craib ขยัน	ใกล้สูญพันธุ์, ถิ่นเดียว/ สมุนไพร, อาหาร, ไม้ ประดับ	กาฬสินธุ์	26	13II
		บุรีรัมย์	26	13II
		อุบลราชธานี	26	13II
ZINGIBERACEAE <i>Hedychium longicornutum</i> Griff. ex Baker ปุดเดือน	หายาก, ใกล้สูญพันธุ์/ สมุนไพร, ไม้ประดับ	นราธิวาส/		
		- สุคิริน	34	*
		- สุโงปาดิ	34	*
ZINGIBERACEAE <i>Kaempferia larsenii</i> Sirirugsa เปราะราศี	หายาก, ใกล้สูญพันธุ์, ถิ่นเดียว/ สมุนไพร, ไม้ประดับ	อุบลราชธานี/		
		-พิบูลมังสาหาร	22	
		-โขงเจียม	22	11II

หมายเหตุ	*	พืชออกดอกน้อยมาก
	**	พบผลึกแคลเซียมคาร์บอเนตรูปดอกไม้ (druse) ในเซลล์กำเนิดเรณู
	***	พบผลึกแคลเซียมคาร์บอเนตรูปเข็ม (druse) ในเซลล์กำเนิดเรณู
	****	พบหยดน้ำมัน (oil droplet) ในเซลล์กำเนิดเรณู
	2n	หมายถึง จำนวนโครโมโซมในเซลล์ร่างกาย
	Meiotic figure	หมายถึงการจับคู่ของโครโมโซม
	II	หมายถึง bivalent