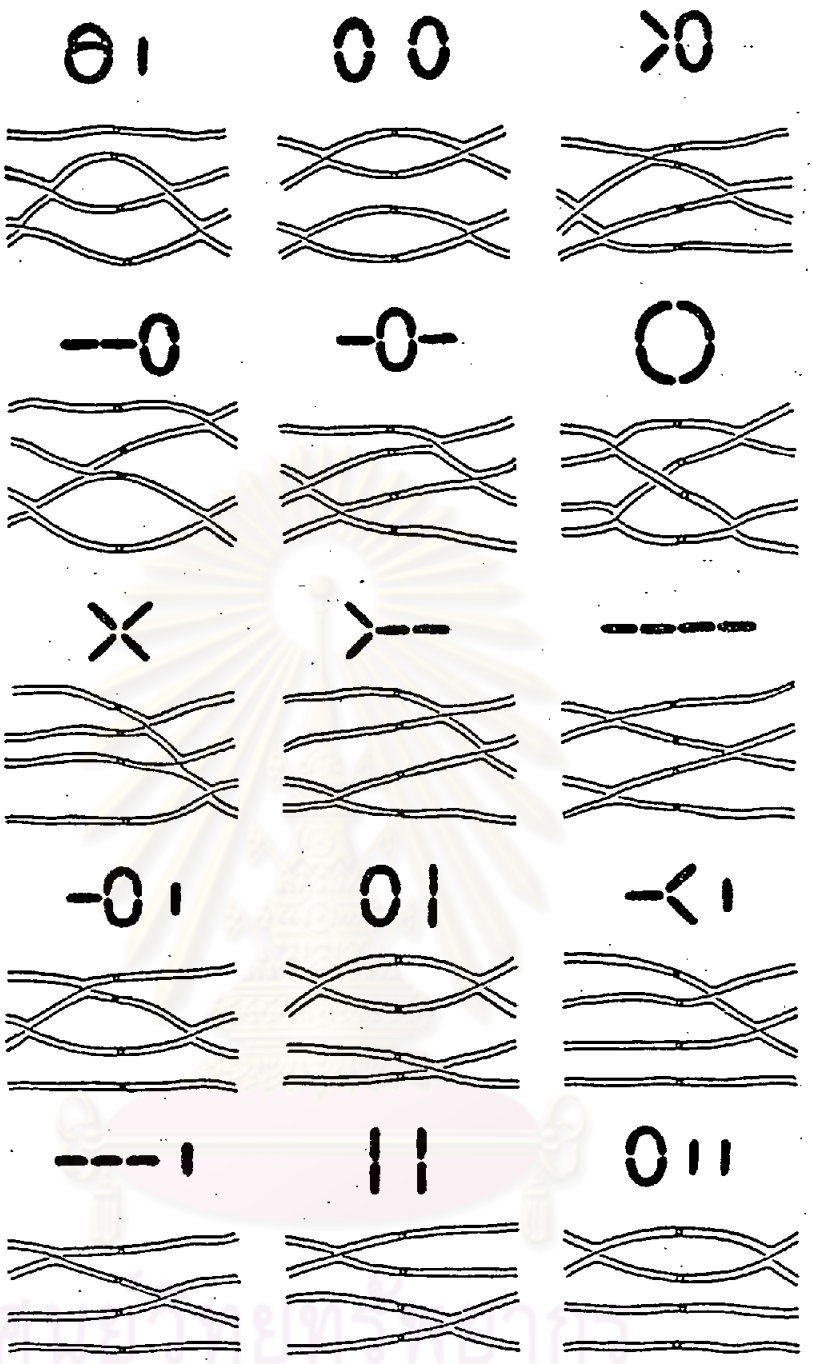
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

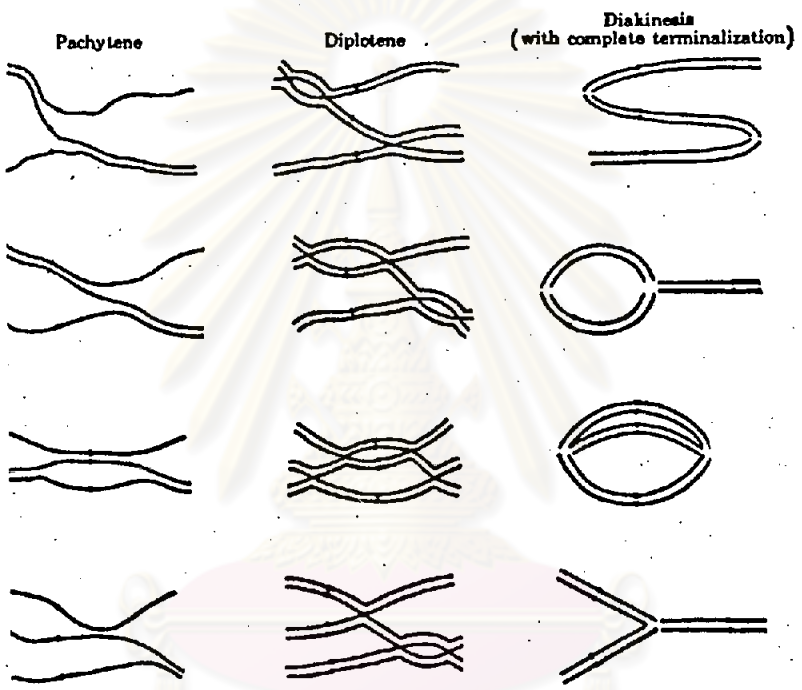
บทนำ

สิ่งมีชีวิตปกติมีจำนวนโครโมโซมสองชุดคือเป็น diploid เมื่อมีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเรียกสิ่งมีชีวิตนั้นว่า polyploid ซึ่งอาจเป็น aneuploid คือมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มบางแท่ง หรืออาจเป็น euploid โดยมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มทั้งชุด (genome) จากจำนวน genome ที่มีมากกว่า 2 genome ทำให้แบ่งชนิดของ polyploid ออกเป็น autopolyploid และ allopolyploid (Swanson, 1967) polyploid ทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่สามารถแยกจากกันได้เมื่อดูลักษณะภายนอก (morphology) ต้องอาศัยลักษณะของโครโมโซมโดยเฉพาะดูจากรูปร่างของ multivalent ถ้าเป็น autopolyploid ในระดับ triploid (AAA) จะพบ trivalent เป็นจำนวนมากดังรายงานของ King (Riley, 1967) พบว่า Tradescantia bracteata ที่เป็น triploid พบ trivalent 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็น bivalent และ univalent ส่วนพวก autotetraploid (AAAA) จะพบ quadrivalent มากกว่า trivalent, bivalent และ univalent จำนวนและรูปร่างของ multivalent ในแต่ละเซลล์อาจแตกต่างกันได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการจับคู่ของโครโมโซมที่เหมือนกัน (homologous chromosome), ตำแหน่งของ chiasma ดังรูปที่ 1 และ 2 รวมทั้งชนิดของพืชด้วย (Riley, 1967)

ส่วน allopolyploid ชุดของโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นไม่เหมือนกันเพราะเกิดมาจากพ่อ-แม่ที่มี genome ต่างกัน จากลักษณะของ genome สามารถแบ่ง allopolyploid ได้เป็น amphidiploid, segmental allopolyploid และ autoallopolyploid ถ้าเป็น amphidiploid (Intergeneric hybrid) มีชุดของโครโมโซมเป็น AABB เพราะเกิดมาจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของ diploid hybrid (AB) ดังนั้นจึงพบว่า homologous chromosome จับคู่กันเป็น bivalent โดย genome A จับกับ genome A และ genome B จับกับ genome B ตัวอย่างพืชที่เป็น amphidiploid ได้แก่ Raphano - brassica (2n=36) พบโดย Karpechenko (Swanson, 1967) และ Triticale (2n= 56) ซึ่งพบโดย Müntzing (Riley, 1967) ส่วน segmental allopolyploid (Interspecific hybrid) เกิดจากการผสมของพ่อ-แม่ที่มี genome ใกล้เคียงกันได้



รูปที่ 1 แสดงการจับคู่ของ 4 homologous chromosome และตำแหน่ง chiasma ใน tetraploid ทำให้เห็นรูปร่างโครโมโซมแบบต่าง ๆ คือ quadrivalent, trivalent, bivalent และ univalent (Riley, 1967)



รูปที่ 2 แสดงการจับคู่ของ 3 homologous chromosome และตำแหน่งของ chiasma ใน triploid ทำให้เกิด trivalent แบบต่าง ๆ (Riley, 1967)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็น diploid hybrid (A_1A_2) เมื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น $A_1A_1A_2A_2$ จึงมีการจับคู่ของโครโมโซมที่เหมือนกันภายใน genome เดียวกัน หรือระหว่าง genome ที่ใกล้เคียงกัน คือ genome A_1 กับ A_1, genome A_2 กับ A_2 หรือ genome A_1กับ A_2 ก็ได้ จึงอาจพบ multivalent แบบ quadrivalent และ trivalent ได้ ตัวอย่างพืชที่เป็น segmental allopolyploid ได้แก่ Nicotiana tabacum (2n = 48) ซึ่งพบโดย Clausen et al (Riley, 1967) allopolyploid ชนิดสุดท้ายคือ autoallopolyploid เป็น allopolyploid ที่มีลักษณะเป็น autopolyploid ด้วย เช่น allohexaploid (AAAABB) มี 4 genome ที่เหมือนกัน (AAAA) และอีก 2 genome ที่เหมือนกัน (BB) polyploid แบบนี้จะไม่มีการจับคู่ของโครโมโซมระหว่าง genome ที่ต่างกัน นอกจากการจับคู่ของโครโมโซมระหว่าง genome ที่เหมือนกันเท่านั้น บางทีอาจพบว่ามี genome ที่เป็น $A_1A_1A_2A_2BB$ ก็อาจมีการจัดคู่ของโครโมโซมระหว่าง genome A_1 กับ A_2 ได้ (Swanson, 1967)

การเกิด polyploid ในพืชอาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือมนุษย์ชักนำให้เกิด สาเหตุการเกิด polyploid ตามธรรมชาติมี 3 อย่าง คือ

1. Zygotic Chromosome Doubling

เกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมใน zygote หรือเกิดจากการผสมของ male และ female gamete ที่ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมได้เป็น tetraploid zygote การเกิด polyploid ทั้ง 2 วิธีนี้ไม่ค่อยพบในธรรมชาติ Winge (Lewis, 1980) เป็นคนแรกที่เสนอความเห็นว่าการเพิ่มจำนวนโครโมโซมใน zygote เกิดโดยโครโมโซมที่มาจาก female gamete และ male gamete แบ่งตัวตามยาว ทำให้จำนวนโครโมโซมใน zygote เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า embryo ที่มีโครโมโซมของพ่อและแม่เพิ่มขึ้นเป็น tetraploid นี้สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

2. Meristematic chromosome doubling

Digby (Lewis, 1980) พบ polyploid แบบนี้ใน Primula kewensis Watson. ซึ่งเป็นลูกผสมของ P.verticillata Forssk. (2n = 18) กับ P.floribunda Wall. (2n = 18) ในรุ่นแรก ๆ ลูกผสมที่ได้เป็นหมัน แต่จากการศึกษาโครโมโซมในระยะ meiotic prophase พบว่ามีการจับคู่ของ homologous chromosome ขั้นตอนการสร้าง spore และการสร้าง gamete เป็นปกติ 26 ปีต่อมา Newton และ Pellow (Lewis, 1980) พบว่าลูกรุ่นหลัง ๆ ของ P.Kewensis Watson. ซึ่งเป็นลูกผสมที่ Digby เคย

ศึกษา มีกิ่งที่สามารถเจริญพันธุ์ได้อยู่บนต้นที่เป็นหมัน เมื่อนับโครโมโซมปรากฏว่าเป็น tetraploid กิ่ง tetraploid นี้สามารถเจริญให้ลูกหลานที่เป็น tetraploid ต่อไปเป็นจำนวนมาก

3. Gametic chromosome non-reduction

ขณะที่มีการสร้าง spore(sporogenesis) ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมหรือไม่มีการแบ่งไซโตปลาสซึม ทำให้ได้ gametophyte ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ sporophyte polyploid ที่เกิดจาก non reduced gamete นี้อาจเกิดมาจาก diploid (2X) female gamete ผสมกับ haploid (X) male gamete ได้ triploid (3X) และจากต้น triploid (3X) ที่ได้นี้สร้าง female gamete โดยไม่มีการลดจำนวนโครโมโซม (3X) แล้วกลับไปผสมกับ haploid (X) gamete ที่ได้จากต้นพ่อที่เป็น diploid จึงเกิดลูกที่เป็น tetraploid (4X) Lewis (1980) รายงานว่า tetraploid (4X) อาจเกิดจากการผสมของ gamete ที่มาจากพ่อและแม่ที่ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมทั้งคู่ แต่ Swanson (1967) รายงานว่า tetraploid แบบของ Lewis เกิดขึ้นน้อยเนื่องจาก male gamete ที่เป็น diploid จะเคลื่อนที่เข้าผสมกับ egg ช้ากว่า male gamete ที่เป็น haploid Franke (Lewis, 1980) พบว่ามีพืช 31 families ที่ gamete ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมโดยเฉพาะพืชพวก Solanum ซึ่งพบโดย DenNijs และ Peloquin (Lewis, 1980) Vajrabhaya และ Randolph(1960) รายงานว่าลูกผสมของ Dendrobium ชนิดต่าง ๆ เกิดเป็น polyploid ได้เนื่องจากเกิด non reduced gamete หรือเพิ่มจำนวนโครโมโซมในระยะ early embryony

ตัวอย่างพืชที่เป็น polyploid ตามธรรมชาติได้แก่ Zea mays, Datura, Gossypium และ Triticum vulgare (Burnham, 1962) นอกจากนี้ Sybenga (1972) รายงานว่าพบ polyploid ในธรรมชาติอีกได้แก่ Lotus corniculatus, Medicago sativa, Anthoxanthum odoratum, Dactylis glomerata, Solanum tuberosum และ Hordeum bulbosum

เนื่องจาก polyploid ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีน้อยมาก มนุษย์จึงหาวิธีชักนำให้เกิด polyploid ในพืช เพราะพืชที่เป็น polyploidมีขนาดต้น ใบ ดอกใหญ่ขึ้น แต่ไม่ค่อยมีเมล็ด จึงนำ polyploid มาใช้ประโยชน์ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะพืชที่เป็น polyploid เมื่อใช้ผสมพันธุ์กับต้นอื่นทำให้เกิดพันธุ์ใหม่ได้ โดยเฉพาะถ้าต้นเดิมเป็น diploid (AB) ที่เป็นหมัน เนื่องจากโครโมโซมที่เหมือนกันขาดคู่ทำให้ meiosis ผิดปกติ เมื่อชักนำให้เป็น tetraploid (AABB)จะสามารถเจริญพันธุ์ได้ เนื่องจากโครโมโซมมีคู่ที่จะ synapsis ได้ปกติใน meiosis นอกจากนี้พืชที่เป็น polyploid ยังมีประโยชน์ทางด้านเศรษฐกิจ ตัวอย่างเช่นกล้วยไม้ที่เป็น polyploid มีกลีบดอกหนา ทำให้ทนทานไม่เหี่ยวง่าย จึงสามารถส่งไปขายประเทศที่อยู่ไกลได้

อวัยวะของพืชที่นิยมนำมาใช้ชักนำให้เป็น polyploid ได้แก่ เมล็ด ดอก ต้นอ่อน กิ่ง ตาข้าง วิธีการที่นำมาใช้ชักนำให้พืชเป็น polyploid ได้แก่

1. <u>การเลี้ยงเนื้อเยื่อ</u>

การขยายพันธุ์พืชโดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต้นใหม่ที่ได้ควรมี genotype เหมือนต้นเดิมทุกประการ เพราะการขยายพันธุ์แบบนี้เป็นผลของการแบ่งนิวเคลียสแบบ mitosis แต่พบว่าอาจมีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมทำให้ต้นใหม่มีลักษณะต่างไปจากเดิมได้ เพราะการเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองมีสภาพแวดล้อมที่ต่างไปจากธรรมชาติ อาจทำให้การแบ่งนิวเคลียสผิดปกติ นอกจากนี้การเติมสารเคมีบางอย่างลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ มีโอกาสกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมได้มากขึ้น Bertsch (ไชยเจริญ, 2516) ได้แสดงความคิดเห็นว่าการขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจเกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ เซลล์ diploid อาจเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น tetraploid และเมื่อเซลล์ tetraploid เหล่านี้แบ่งตัวจะเจริญไปเป็นต้น tetraploid ได้ ไชยเจริญ (2516) รายงานว่า Murashige and Nakano เลี้ยงเนื้อเยื่อของ <u>Nicotiana tabacum</u> ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ diploid และ tetraploid หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ ๆ ปี พบเซลล์ tetraploid และ octoploid ประมาณครึ่งหนึ่งของเซลล์ทั้งหมด อีกครึ่งหนึ่งเป็น aneuploid ซึ่งเป็น subtetraploid และเมื่อเลี้ยงต่อไปอีก 6 ปี พบว่ามีแต่เซลล์ aneuploid เท่านั้น และเป็นเซลล์ hypertetraploid Lindstrom และ Kovs (Riley, 1967) เลี้ยงเนื้อเยื่อตาข้างของมันฝรั่งที่เป็น haploid (n=12) โดยทาตรงรอยตัดด้วย petrolatum ภายใน 2 สัปดาห์ได้ callus ที่เป็น binucleate cell บางเซลล์มีการรวมกันของนิวเคลียส และ

เมื่อเซลล์เหล่านี้เจริญเป็นต้นพบว่าได้ต้นที่เป็น diploid 30 เปอร์เซนต์อีก 70 เปอร์เซนต์เป็น aneuploid และมีบางส่วนเป็น tetraploid คือมีจำนวนโครโมโซม 48 แท่ง พบการจับคู่ของ homologous chromosome เป็นแบบ quadrivalent Greenleaf (Riley, 1967) พบว่าเมื่อตัดเนื้อเยื่อของลูกผสม Nicotiana sylvestris X N.tomentosa หรือลูกผสมของ N.sylvestris X N.tomentosiformis มา เลี้ยงโดยทาตรงรอยตัดด้วย indole 3 acetic acid + 1% anhydrous lanolin พบว่าได้ adventitous bud ที่เป็น tetraploid 13.7 เปอร์เซนต์ octoploid 1 เปอร์เซนต์ และบางกิ่งเป็น aneuploid

2. การผสมพันธุ์ (Hybridization)

Polyploid ระดับ triploid อาจได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างต้น diploid กับต้น tetrapolid Riley (1967) รายงานว่าเมื่อผสม Papaver somniferum (2n = 2x =22) กับ P.setigerum (2n = 4x = 44) ได้ลูกผสมเป็น triploid (2n = 3x = 33) Clausen และ Goodspeed (Lewis, 1980) สร้าง Nicotiana ที่เป็น amphidiploid โดยผสม tetraploid N. tabacum L. (2n = 48) กับ diploid N.glutinosa L. (2n =24) ได้ลูกผสม 2 ชนิด ชนิดหนึ่งเป็นหมัน (sterile) อีกชนิดสามารถเจริญพันธุ์ได้ (fertile) เมื่อศึกษาโครโมโซมใน F_2 ของต้นที่เจริญพันธุ์ได้พบว่าเป็น amphidiploid (2n = 72) นอกจากนี้การผสมข้ามสายพันธุ์ก็สามารถให้ลูกผสม (intergeneric hybrid) ที่สร้าง non-reduced gamete ได้ Mangelsdorf และ Newell (Lewis, 1980) พบว่าลูกผสมระหว่าง Tripsacum dactyloides (L.) L. (2n = 36) กับ Zea mays L. (2n = 20) เป็น male sterile แต่เป็น female fertile ซึ่ง deWett และ Harlen (Lewis, 1980) รายงานว่าไข่ (egg) ที่สามารถเจริญพันธุ์ได้นั้นเป็น non-reduced gamete

3. การใช้อุณหภูมิ

มีการทดลองในพืชหลายชนิดโดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ คือให้อุณหภูมิสูงขึ้นหรือต่ำลง พบว่าสามารถชักนำให้เกิด polyploid ได้เช่น Sax (Riley, 1967) นำต้น Tradescantia paludosa ไปไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน พบว่า spindle fiber

ไม่ดึงแต่ละโครโมโซมไปยังขั้วของเซลล์ จึงเกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมเป็น 2 เท่า และบางเซลล์โครโมโซมมีความผิดปกติเกี่ยวกับโครงสร้างและรูปร่าง ซึ่งคล้ายกับความผิดปกติของโครโมโซมที่ได้รับรังสีเอกซ์ Burnham (1962) รายงานว่า Sax ทดลองนำกิ่ง Rhoeo sp. ไปไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ได้ microspore ที่เป็น polyploid จำนวนมาก ไชยเจริญ (2516) รายงานถึงผลงานของ Randolph ว่าได้ประสบความสำเร็จในการใช้อุณหภูมิราว 38 - 45 องศาเซลเซียส ชักนำให้เกิด polyploid ในข้าวโพด (Zea mays Linn.) โดยทำในระยะ first division ของ zygote ผลปรากฏว่าได้ zygote ที่เป็น tetraploid ประมาณ 5 เปอร์เซนต์ Lutcov (ไชยเจริญ, 2516) ใช้อุณหภูมิ 0-1.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กับ Raphanobrassica พบว่ามี diploid และ tetraploid pollen 6.62 และ 2.34 เปอร์เซนต์ตามลำดับ แต่ถ้าใช้เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง 45 นาที พบว่า spore mother cell แบ่งให้ spore dyads แทน spore quartet ประมาณ 37.6 เปอร์เซนต์ถึง 55.8 เปอร์เซนต์ Riley (1967) รายงานว่าพืชที่ได้รับอุณหภูมิสูงสลับกับอุณหภูมิต่ำ โครโมโซมมีความผิดปกติมากกว่าพืชที่ได้รับอุณหภูมิสูงหรือต่ำตลอดเวลา

4. การใช้รังสี

รังสีมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมคือมีการขาดหายหรือเพิ่มของโครโมโซมบางแท่ง มีผลทำให้เกิด aneuploid ขึ้น Raghuvanshi และคณะ (1978) นำเมล็ด Phaseolus aureus Roxb . ไปอาบรังสีแกมมาที่ได้จากโคบอลล์ 60 แล้วแช่ในสารละลายโคลชิซีน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์ พบ trisomic เกิดขึ้น แต่ยังไม่มีรายงานว่ารังสีสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม (euploid) นอกจากรังสีสามารถทำให้เกิด chromosome aberration คือเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง รูปร่าง และขนาด ชีโนณะวณิก (2524) ทดลองฉายรังสีแกมม่าที่ได้จากซีเซียม 137 กับหัวและเมล็ดบัวจีนสีเหลืองเข้ม Zephyranthes citrina L. พบว่ามี ring chromosome, dicentric chromosome,fragment chromosome ลิ่มสกุล (2524) ฉายรังสีแกมม่าที่ได้จากโคบอลท์ 50 แก่หน่อและต้นกล้าพุทธรักษา พบว่ารังสีทำให้โครโมโซมเคลื่อนที่ช้า (chromosome lagging) เกิด chromosome bridge และ fragment

5. การใช้สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ชักนำให้เกิด polyploid ในพืชได้แก่โคลชิซีน (colchicine), ethylmethane- sulphonate (EMS), N-ethyl-N-nitrosourea (NEU), N-methyl-N-nitro-N-Nitrosoquanidine (NG), benzene paradichlorobenzene, alpha-bromonaphthalene, 8-oxyquinoline 5-aqacytidine, nitrogendioxide (NO_2), ยาฆ่าแมลงบางชนิดเช่น lindane สารเคมีเหล่านี้มีผลต่อโครโมโซมในด้านโครงสร้าง, รูปร่างและจำนวนเช่น 5-aqacytidine สามารถชักนำให้เกิด tertiary constriction นอกจากนี้ยังมีสาร alkaloid ที่สกัดได้จากพืชบางชนิดซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม เช่น สาร capsaicin $C_9H_{14}O_2$ เป็นสารที่ทำให้พริกมีรสเผ็ด Abraham and Koshy (1979) ทดลองแช่ Allium cepa ในสารละลาย capsaicin ซึ่งสกัดได้จากพริก Capsicum annuum พบว่าการแบ่งเซลล์ ปลายรากผิดปกติคือในระยะ metaphase โครโมโซมจับตัวกันเป็นก้อน (clumping of chromosome) โครโมโซมขาดหรือหักเป็นท่อน (breakage and fragmentation) และในระยะ anaphase พบ chromosome bridge อีกด้วย ปัจจุบันพบว่าน้ำเสียก็มีผลทำให้โครโมโซมเกิดการเปลี่ยนแปลง โดย Ravindram 1978 พบว่า Ornithogalum virens ที่ขึ้นอยู่บริเวณแหล่งน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม มีการแบ่งเซลล์ของ microsporocyte ผิดปกติ คือไม่มีการจับคู่ของ homologous chromosome จึงพบแต่ univalent และมีความผิดปกติของโครโมโซมในรูปแบบต่าง ๆ เช่น dicentric lagging, unequal separations, chromosome elimination และเมื่อทดลองแช่ Allium cepa ในน้ำเสีย 24 ชั่วโมง พบว่าโครโมโซมรวมเป็นก้อนโครโมโซมหักเป็นท่อน และพบ chromosome bridge

แต่สารเคมีที่นิยมใช้ชักนำให้เกิด polyploid ในพืชคือโคลชิซีน ($C_{12}H_{25}O_6N$) ซึ่งเป็น alkaloid ที่สกัดได้จากรากของ Colchicum autumnale สารโคลชิซีนจะไปยับยั้งไม่ให้เกิด spindle fiber Riley (1967) รายงานว่า O'Mara ทดลองแช่ Allium cepa ในสารละลายโคลชิซีน พบว่าเซลล์ปลายรากแบ่งตัวผิดปกติและไม่พบ spindle fiber จึงไม่มีการเคลื่อนที่ของโครโมโซมในระยะ anaphase ทำให้ได้เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเซลล์เหล่านี้แบ่งตัวต่อไปโดยไม่มีอิทธิพลของสารโคลชิซีนมาเกี่ยวข้องก็จะได้เซลล์ที่เป็น tetraploid ไปเรื่อย ๆ แต่ถ้าเซลล์นั้นได้รับสารโคลชิซีนนานเกินพอจะทำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น octoploid เซลล์ที่ไม่แบ่งตัวขณะได้รับสารโคลชิซีน

ก็จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง เซลล์พวกนี้ยังคงเป็น diploid จึงทำให้ได้อวัยวะที่มีเซลล์เป็นทั้ง diploid, tetraploid และ octoploid ปนกันอยู่ในสภาพของ mixoploid ถ้าการยับยั้ง spindle fiber ไม่สมบูรณ์ โครโมโซมบางแท่งอาจมีการเคลื่อนที่ไปยังขั้วของเซลล์ เซลล์ใหม่ที่ได้จะมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากันเป็นแบบ aneuploid นอกจากนี้ Sybenga (1972) พบว่าเมื่อใช้สารละลายโคลชิซีนความเข้มข้นต่ำ (0.05 เปอร์เซนต์) เป็นเวลานานที่อุณหภูมิห้อง จะช่วยเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ดีกว่าใช้ความเข้มข้นสูง แต่ใช้เวลาสั้น อวัยวะของพืชที่นิยมนำมาชักนำให้เกิด polyploid โดยใช้โคลชิซีนได้แก่เมล็ด, ยอดอ่อน, ต้นกล้า ผลงานของนักวิทยาศาสตร์ที่ประสบความสำเร็จในการใช้สารโคลชิซีนชักนำให้เกิด polyploid ในพืชชนิดต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่าง polyploid ของพืชสกุลต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นโดยใช้สารโคลชิซีน

ปี	ชื่อผู้ทดลอง	พืชที่นำมาชักนำให้เป็น polyploid
1937	Blakeslee และ Avery	Datura stramomium, Portulaca grandiflora Hook
1938	Nobel และ Ruttle	Tagetes sp., Petunia sp. Lycopersicon esculentum Mill.
1941	Cross และ Johnson	Catharanthus roseus G.Don
1941	Emsweller และ Ruttle	Lilium sp. Antherrhinum majus
1941	Schnell	Catharanthus roseus G.Don
1945	Beachell	Oryza sativa Linn.
1951	Loung	Oryza sativa Linn.
1952	Batra	Cucumis melo Linn.

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ปี	ชื่อผู้ทดลอง	ชื่อพืชที่นำมาชักนำให้เป็น polyploid
1953	Kloen และ Speckmann	Beta vulgaris Linn.
1955	Evan	Trifolium pratense
		Medicago sativa
1956	Armstrong และ Robertson	Trifolium hybridum
1967	Siddiq	Sorghum vulgare Pers
1969	Raghuvanshi และ Chauhan	Catharanthus roseus G.Don
1970	Reddi	Sorghum cernuum
1973	ไชยเจริญ (2516)	Dendrobium hybrid
1974	Chaiyasut	Helianthus annuus Linn.
1976	Gupta และ Koak	Zinnia elegans Jacq.
1978	โสมานันท์ (2521)	Aranda hybrid, Arachnis
		hybrid
1979	Madhusodanum และ Arora	Matricaria chamomilla L.
1982	สินไชย (2525)	Cirtrullus vulgaris Schrad.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Cross และ Johnson (1941) ได้ใช้สารละลายโคลชิซีนหยดลงบน apical meristem ของ Catharanthus roseus G.Don พบว่าจำนวนโครโมโซมเพิ่มจาก 16 แท่ง เป็น 32 แท่ง ต้น tetraploid ที่ได้มีลำต้นใหญ่กว่า diploid ใบหนาและดอกใหญ่ขึ้น เซลล์ในชั้น tunica และ corpus มีจำนวนเพิ่มขึ้น โดย tunica - 1 มีเซลล์เพิ่ม 68 เปอร์เซนต์ ชั้น tunica - 2 เพิ่ม 43 เปอร์เซนต์ และชั้น corpus เพิ่ม 59 เปอร์เซนต์

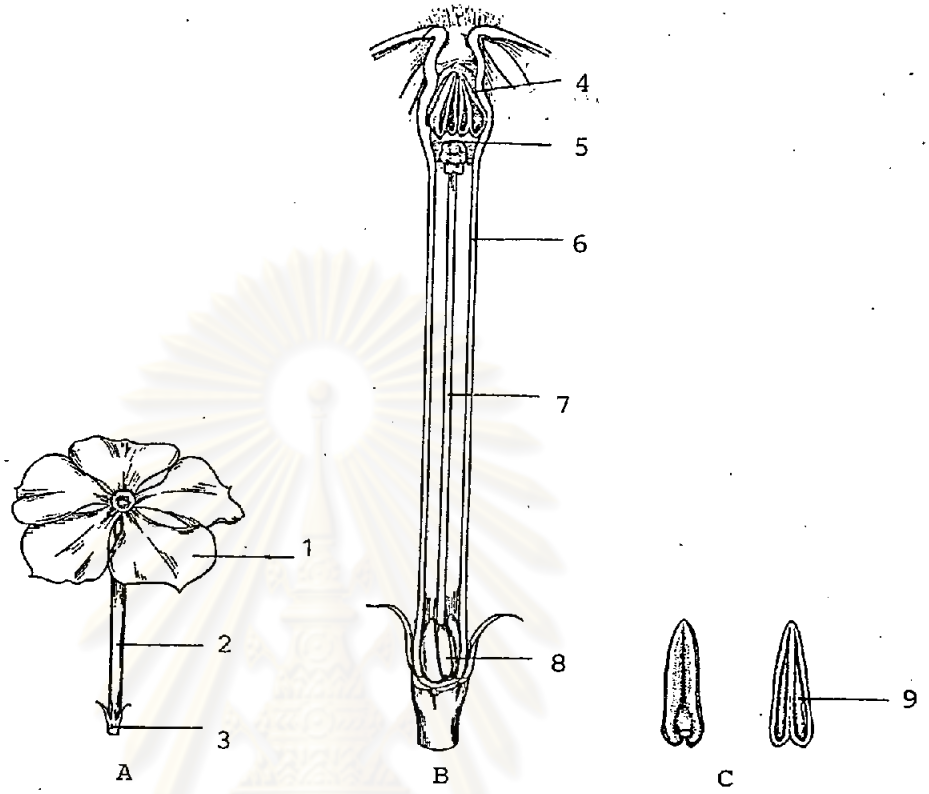
Schnell (1941) ทดลองใช้สารละลายโคลชิซีนกับเมล็ดและ apical meristem ของ Catharanthus roseus G.Don ได้ต้น tetraploid ที่มีลักษณะของลำต้น, ใบ, ดอก เหมือนกับ tetraploid ที่ Cross ศึกษา นอกจากนี้ Schnell ยังพบว่า tetraploid ที่ได้มีละอองเรณูใหญ่กว่า diploid ขนาดของเซลล์คุมปากใบใหญ่ขึ้น

Raghuvanshi และ Chauhan (1969) ทดลองใช้สารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์ หยดลงบน apical meristem ของ Catharanthus roseus G.Don ทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน ปรากฏว่าได้ต้น tetraploid ที่มีขนาดลำต้น, ใบ, ดอก ใหญ่กว่า diploid แต่เมล็ดส่วนใหญ่ฝ่อ (sterile) แต่เมื่อศึกษาโครโมโซมในระยะ first metaphase พบว่ามี quadrivalent เป็นจำนวนน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก โครโมโซมของ Catharanthus มีขนาดเล็กเมื่อมาจับคู่กัน (synapsis) จึงผละออกจาก กันเร็ว นอกจากนี้ยังพบ univalent บ้างแต่ univalent เหล่านั้นสามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้ว ของเซลล์ได้เป็นปกติ

Dnyansagar และ Sudhakaran (1970) นำเมล็ด Catharanthus roseus G.Don แช่ในสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0.3 และ 0.4 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ได้ต้น tetraploid ที่มีขนาดต้นใหญ่ขึ้นแต่อัตราการเจริญช้าลง ใบกว้าง และหนาขึ้น เซลล์คุมปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น ละอองเรณูมีขนาดใหญ่ขึ้นแต่การมีชีวิตลดลง นอกจากนี้ ปริมาณ alkaloid ที่สกัดได้จากรากเพิ่มสูงขึ้นกว่า diploid เกือบ 2 เท่า เมื่อศึกษา โครโมโซมใน microsporocyte ของ C_1 และ C_2 พบ irregular meiosis ในระยะ anaphase และได้เซลล์หลายเซลล์ (polyads) แทนที่จะได้สี่เซลล์ (quartet)

แพงพวยฝรั่งอยู่ในวงศ์ Apocynaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Catharanthus roseus G.Don มีชื่อพ้องคือ Vinca rosea L., Lochnera rosea Reichb (Taylor และ Farnsworth, 1975) มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ Madagascar แล้วแพร่กระจายไปยังอินเดีย, อินโดนีเซีย, ฟิลิปปินส์, ออสเตรเลีย, ไทย, อาฟริกาใต้, บราซิล และอเมริกาเหนือ มีชื่อ

สามัญภาษาอังกฤษว่า Madagascar periwinkle (Farnsworth, 1961) มีชื่อพื้นเมืองภาษาไทยที่ใช้เรียกในแต่ละท้องถิ่นว่า ผักปอดบก(ทางภาคเหนือ), ต้นนมอิน (สุราษฎร์ธานี) ต้นขี้หมู (เกาะสมุย, เกาะพงัน) แต่โดยทั่วไปเรียกแพงพวยบกหรือแพงพวยผรั่ง (สมิตินันทน์, 2523) ลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กสูงประมาณ 40 - 120 เซนติเมตร แตกกิ่งใกล้พื้นดิน ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตัวแบบตรงกันข้าม (opposite) รูปร่างใบเป็นรูปไข่คว่ำ (obovate) หรือรูปรี (elliptic) ขนาดกว้างประมาณ 1 - 3.5 เซนติเมตร ยาว 3.9 - 9 เซนติเมตร ฐานใบค่อนข้างแหลมเข้าหาก้านใบคล้ายรูปสามเหลี่ยมที่กลับยอดลง (cuneate) ปลายใบกลมมน (obtuse) หรือกลมมนและมีรอยเว้าแหลมตื้น ๆ ตรงกลาง (retuse) หรืออาจพบว่ากลมมนและมีปลายแหลมเป็นติ่งเล็ก ๆ ตรงรอยเว้า (mucronulate) เส้นใบย่อยมีจำนวนมากแยกจากเส้นกลางใบทำมุม 35 องศา ถึง 45 องศา ก้านใบ (petiole) ยาวประมาณ 0.4 - 1 เซนติเมตร ดอกเป็นดอกเดี่ยวอยู่เป็นกระจุกที่ซอกใบหรือปลายกิ่ง ก้านดอก (peduncle) ยาวประมาณ 0.1 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง (sepal) มี 5 กลีบ แต่ละกลีบมีขนาดเล็กยาวประมาณ 0.3 - 0.7 เซนติเมตร รูปร่างเหมือนใบหอกคือโคนกว้าง ปลายเรียวแหลมเข้าหากัน (lanceolate) ลักษณะดอกเป็นแบบ salverform คือ กลีบดอกตอนโคนติดกันเป็นหลอดเล็กยาว (corolla tube) ส่วนปลายแผ่กว้างเป็นกลีบ ๆ (corolla lobe) 5 กลีบเท่า ๆ กัน แต่ละกลีบ (limb) รูปร่างคล้ายรูปไข่คว่ำ(obovate) กว้างประมาณ 2.2 เซนติเมตร ยาว 2.5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางดอกประมาณ 2.5 ถึง 5 เซนติเมตร สีของกลีบดอกด้านนอกเป็นสีขาว ส่วนสีกลีบดอกด้านในและสีใจกลางดอกแตกต่างกันไปตาม variety ถ้ากลีบดอกด้านในสีม่วงใจกลางดอกสีม่วงเข้มเป็น var.roseus กลีบดอกด้านในสีขาวใจกลางดอกสีเหลืองเป็น var.albus กลีบดอกด้านในสีขาวใจกลางดอกสีส้มแดงเป็น var.ocellatus corolla tube ลักษณะเป็นทรงกระบอกยาวประมาณ 2.5 - 3 เซนติเมตร ส่วนปลายของหลอดใต้บริเวณที่เชื่อมติดกับกลีบดอกพองออกเป็นกระเปาะซึ่งเป็นที่อยู่ของเกสรตัวผู้ (stamen) ซึ่งไม่มีก้านชูเกสรตัวผู้ (sessile) มีแต่อับเรณู (anther) ลักษณะคล้ายหัวลูกศร (sagittate) มีทั้งหมด 5 อัน ติดกับผนังของ corolla tube ส่วนที่พองเป็นกระเปาะตามทางยาว แต่ละอันอยู่ชิดกัน ล้อมรอบเกสรตัวเมียไว้ คือ เกสรตัวเมีย (style) เป็นเส้นกลมเล็กยาว (filiform) ยอดเกสรตัวเมีย (stigma) มี 1 อัน รูปร่างคล้ายถ้วยปลายตัดแบนมีน้ำเหนียว ๆ stigma จะอยู่บริเวณ corolla tube ที่พองออกเป็นกระเปาะ (ดังรูปที่ 3) รังไข่ (ovary) เป็นแบบ superior มี 2 carpel



รูปที่ 3 แสดงส่วนประกอบของดอกแพงพวยฝรั่ง

A รูปร่างดอก

1. กลีบดอก (petal)
2. corolla tube
3. กลีบเลี้ยง (sepal)

B ดอกผ่าตามยาว

4 อับเรณู (anther)
5 ยอดเกสรตัวเมีย (stigma)
6 corolla tube
7 คอเกสรตัวเมีย (style)
8 รังไข่ (ovary)

C อับเรณู

9 อับเรณูผ่าตามยาว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 locule ลักษณะผลเป็นแบบ follicles เกิดเป็นคู่บนฐานรองดอก (receptacle) เดียวกัน (Taylor and Farnsworth, 1975) ฝักอ่อนมีสีเขียวอ่อนแล้วเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มเมื่ออายุมากขึ้น เมื่อแก่จัดเปลือก (pericarp) สีเขียวจะค่อย ๆ จางลงจนเกือบขาว และเปลือกค่อนข้างบางทำให้เห็นเมล็ดแก่สีดำอยู่ภายในได้ชัดเจน (โพธิสุวรรณ, 2519) ลักษณะฝักเรียวยาวประมาณ 1.5 - 4 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2 - 0.3 เซนติเมตร กลางฝักด้านบนมีร่องตามยาวจากหัวจรดท้ายเมื่อฝักแก่จะแตกด้านเดียวตามแนวนี้ (follicles) เมล็ดเรียงตัวตามยาว 2 แถว อยู่ภายในฝักติดกับผนังแบบ parietal placentation ฝักหนึ่งมีประมาณ 12 - 20 เมล็ด ลักษณะเมล็ดเรียวยาวกว้างประมาณ 0.1 เซนติเมตร ยาว 0.2 เซนติเมตร (Taylor และ Farnsworth,1975) แพงพวยฝรั่งเป็นพืชที่ผสมตัวเอง (self fertilization) สามารถขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเมล็ดและปักชำ (โพธิ-สุวรรณ, 2519)

แพงพวยฝรั่งเริ่มมีบทบาททางเภสัชกรรมเมื่อปี ค.ศ. 1958 โดย Dr.Beer และ Dr.Cutts (ชวเดช, 2520) ได้ทดลองให้กระต่ายกินใบแพงพวยฝรั่ง ปรากฏผลว่าไม่ทำให้น้ำตาลในเลือดลดลง จึงเปลี่ยนไปใช้วิธีฉีดสารที่สกัดจากใบแพงพวยฝรั่งเข้าไปในกระต่าย ก็ไม่ทำให้น้ำตาลในเลือดลดลง ต่อมา 2-3 วัน กระต่ายตายเนื่องจากโรคที่เกิดจากการติดเชื้อบักเตรีชูโดโมแนส (Pseudomonas) นักวิจัยลงความเห็นว่าสารในแพงพวยฝรั่งทำให้ปริมาณเม็ดโลหิตขาวลดลง ทำให้กระต่ายสูญเสียความต้านทานต่อเชื้อโรค จึงแสดงแนวโน้มในการเป็นยารักษามะเร็งเม็ดโลหิตขาว ต่อมา Dr.Beer ได้สกัด alkaloid ชื่อ vincaleu-koblastine (VLB) จากใบ, ราก และลำต้นของแพงพวยฝรั่งได้สำเร็จ และนำ VLB ไปผลิตเป็น vinblastine สำหรับใช้เป็นยาฉีดให้แก่ผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเพื่อระงับและป้องกันการเจริญเติบโตของเนื้อร้ายได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง ในปี 1964 Margaret B. Krexing (โปราณานนท์ และ พัฒนวิบูลย์, 2521) รายงานว่าผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งรายหนึ่งเมื่อได้รับการฉีด vinblastine 2 อาทิตย์ต่อครั้ง สามารถหายจากโรคมะเร็งได้นาน 2 ปี 6 เดือน ต่อมา Dr.Gordon H. Svobada แห่ง Eli Lilly ค้นพบตัวยาใหม่ที่ดีกว่า vinblastine คือ vincristine เมื่อฉีดยานี้ให้คนไข้ที่ต้านทานต่อ vinblastineและเริ่มเกิดอาการของโรคขึ้นใหม่ ปรากฏว่าคนไข้เดิมรายนี้หายจากโรคมะเร็งได้นานถึง 3 ปี 6 เดือน สำหรับผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลือง ม้ามและตับ (Hodgkin's disease) มีเนื้องอกที่หลอดลมยาว 10 นิ้ว ได้รับการรักษาโดยใช้ยาหลายอย่างโรคไม่หายแต่กลับทำให้เกิดอาการปวดมากขึ้น น้ำหนัก

010633

ลดลง เมื่อฉีด vinblastine ให้คนไข้สัปดาห์ละ 2 ครั้ง กลับมีอาการดีขึ้น เนื้องอกเริ่มเหี่ยวและภายในเวลา 4 เดือน คนไข้หายจากการเป็นมะเร็ง แต่ต่อมา 2 ปีครึ่ง คนไข้กลับเป็นมะเร็งอีกเนื่องจากดื้อยา vinblastine แพทย์จึงเปลี่ยนไปฉีด vincristineผลปรากฏว่าคนไข้หายจากมะเร็งได้ (ชวเดช, 2520)

alkaloid ที่สกัดได้จากแพงพวยฝรั่งมีถึง 75 ชนิด 26 ชนิด เป็น dimeric indole alkaloid 6 ชนิดจาก 26 ชนิด เป็น indole-indoline alkaloid ซึ่งมีประสิทธิภาพในการรักษามะเร็ง (Taylor และ Farnsworth, 1975) รายชื่อ indole - indoline alkaloid ที่ใช้รักษามะเร็งแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายชื่อ indole - indoline alkaloid ที่ใช้รักษามะเร็ง

Alter Name	Generic Name	สูตรเคมี	อวัยวะที่นำมาสกัดอัลคาลอยด์
vincaleukoblastine	vinblastine	$C_{46}H_{58}N_4O_9.(C_2H_5)_2O$	ใบ ราก
leurocristine	vincristine	$C_{46}H_{56}N_4O_{10}$	ใบ ราก
leurosine	vinleurosine	$C_{46}H_{58}N_4O_9.8H_2O$	ใบ ราก
leurosivine (H_2SO_4)	-	$C_{41}H_{54}N_3O_9.H_2SO_4$	ราก
leurosidine	vinrosidine	-	ใบ ราก
lovidine (H_2SO_4)	-	-	ใบ

ปริมาณของ vinrosidine และ rovidine มีน้อยมาก ส่วน vinblastine และ vincristineมีปริมาณมากและมีคุณสมบัติในการรักษาโรคมะเร็งได้เป็นอย่างดี vinblastine ใช้เป็นยารักษามะเร็งต่อมน้ำเหลือง (Hodgkin's disease) และ embryonal testicular tumors มีฤทธิ์กดการทำงานของไขกระดูก ทำให้สร้างเม็ดเลือดขาวน้อยกว่าปกติ (leukophonin) และปริมาณเกล็ดเลือดน้อยกว่าปกติ (trombocytopenia) vinblastine ไปมีผลต่อระบบประสาท ส่วน vinblastine ใช้เป็นยารักษามะเร็งเม็ดโลหิตขาว (lymphatic leukemia), มะเร็งต่อมน้ำเหลืองและเนื้องอกอื่น ๆ โดยเฉพาะ

อย่างยิ่งนิยมใช้รักษาโรคมะเร็งในเด็ก โดยให้ร่วมกับ prednisone ซึ่งเป็นพิษต่อไขกระดูกและเซลล์ปกติอื่น ๆ น้อยมาก จึงเป็นยาที่เหมาะสำหรับรักษามะเร็งในผู้ป่วยที่ไขกระดูกทำงานไม่ปกติ vincristine มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งมากกว่า vinblastine ผู้ที่ได้รับยา vincristine ในขนาดยาค่อนข้างสูงจะทำให้การทำงานของประสาทและกล้ามเนื้อผิดปกติ ความรู้สึกของประสาทสัมผัสผิดปกติ ปลายประสาทอักเสบ มีผลต่อประสาทอัตโนมัติ เช่น ท้องผูกอย่างแรง อาจมีอาการผมร่วงอยู่เสมอ

ทั้ง vinblastine และ vincristine ซึมผ่านเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้อย่างรวดเร็ว เป็นยาที่มีฤทธิ์เฉพาะเจาะจงต่อวงชีพของเซลล์ มีความสามารถสูงในการจับกับ microtubule protein และ mitotic spindle ยาทั้งสองจึงสามารถยับยั้งขบวนการต่าง ๆ ที่อาศัยการทำงานของ microtubular system เช่นการแบ่งเซลล์, การคงรูปร่างของเซลล์ หลังจากให้ vinblastine และ vincristine แล้ว mitotic cycle จะหยุดชะงัก โดยเฉพาะเมื่อให้ยาในขณะที่เซลล์อยู่ในระยะ S phase และ G_1 phase จะมีผลมาก โดยยาจะยับยั้งการการสร้าง DNA, RNA และ protein (Taylor และ Farnsworth, 1975) การให้ยาทั้ง 2 จะให้ในรูป vinblastine sulfate และ vincristine sulfate โดยการฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ บางกรณีอาจฉีดเข้าเส้นโลหิตแดงที่หล่อเลี้ยงก้อนเนื้องอกอยู่ โดยขนาดยาที่ให้อาจสูงกว่าขนาดยาที่ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ แต่มีผลทำลายเนื้องอกพอ ๆ กัน

เนื่องจาก alkaloid ที่มีอยู่ในต้นแพงพวยฝรั่งมีปริมาณน้อย ดังนั้นการนำทั้งต้นมาบำบัดรักษาโดยตรงจึงเป็นการไม่สะดวกและไม่เพียงพอจึงจำเป็นต้องสกัดแยก alkaloid แต่ละชนิดออกมาให้อยู่ในสภาพที่เป็นสารบริสุทธิ์และมีปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ แต่ปริมาณ alkaloid ที่สกัดได้ยังมีปริมาณน้อยมาก คือ แพงพวยฝรั่ง 500 กิโลกรัม (น้ำหนักสด) สกัด alkaloid ได้เพียง 1 กรัม (ชวเดช, 2520) ด้วยเหตุนี้จึงคิดนำเอาวิธีทางพันธุศาสตร์มาสร้างแพงพวยฝรั่งที่จะผลิต alkaloid ได้ในปริมาณสูงขึ้น โดยใช้สารโคลชิซีนชักนำแพงพวยฝรั่งให้เป็น polyploid

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะชักนำแพงพวยฝรั่งให้เป็น polyploid โดยใช้สารละลายโคลชีซีนที่มีความเข้มข้นและปริมาณต่าง ๆ กัน ประโยชน์ของงานวิจัยนี้สามารถนำเอาขั้นตอนและวิธีการที่ใช้โคลชิซีนชักนำให้เกิด polyploid ในแพงพวยฝรั่งนี้ไปประยุกต์ใช้กับพืชชนิดอื่นได้ นอกจากนี้ยังคาดว่าแพงพวยฝรั่งที่เป็น polyploid จะสร้าง alkaloid ได้มากกว่า diploid และสามารถสกัดมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรมได้มากขึ้น ซึ่งเป็นการยกระดับแพงพวยฝรั่งจากไม้ประดับมาเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ