

การชักนำให้เกิดพอลิพลอยดีในพืชด้วยสารโคลชิซิน

Induction of Polyploidy in Plants with Colchicine

อลงกลด แทนอมทอง¹

สราวุธ แก้วศรี²

บทคัดย่อ

การใช้สารโคลชิซินชักนำทำให้เกิดพอลิพลอยดีในพืชมีหลายปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่ พันธุกรรมของพืช ชิ้นส่วนของพืชที่ใช้ และความเข้มข้นของสารโคลชิซิน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้สารโคลชิซินที่ความเข้มข้นน้อยจะต้องมีระยะเวลาให้สารนานขึ้น แต่ในกรณีที่ใช้สารโคลชิซินในความเข้มข้นสูงควรมีระยะเวลาในการให้สารที่น้อย จึงจะมีโอกาสที่ได้ต้นพืชพอลิพลอยดีจำนวนมาก เนื่องจากระดับของความเข้มข้นและระยะเวลาของการให้สารละลายโคลชิซินแก่พืชต้องอยู่ในระดับที่เพียงพอ สำหรับการชักนำให้เกิดพอลิพลอยดีหรือเพียงพอที่จะยับยั้งการสร้างใยสปินเดิล การใช้สารโคลชิซินในระดับความเข้มข้นที่สูงมากเกินไปจะมีผลทางลบกับพืชโดยอาจส่งผลให้พืชเจริญเติบโตช้า มีรูปร่างที่ผิดปกติหรือเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายได้ สารโคลชิซินที่เข้าสู่เนื้อเยื่อพืชแล้วจะไปยับยั้งกระบวนการพอลิเมอไรเซชันทำให้พืชไม่สามารถสร้างไมโครทิวบูลได้ ส่งผลให้ใยสปินเดิลเกิดไม่สมบูรณ์หรือขาดหายไป โครโมโซมระยะเมทาเฟสจึงไม่แยกออกจากกัน เซลล์ที่เกิดขึ้นในสภาพนี้จึงมีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า

คำสำคัญ : การชักนำ โคลชิซิน พอลิพลอยดี

ABSTRACT

Many factors, namely plant genetics, parts of plants used and concentration levels of Colchicine are involved in an induction of polyploidy in plants. Data revealed that using of the low concentrations of Colchicine require longer dosing intervals while the high concentrations need lower dosages. These two schemes provide a high rate of polyploidy in plants. Colchicine concentrations play essential role in the induction of polyploidy in plants and inhibition of the formation of spindle fiber. Excessive concentrations of Colchicine can cause negative effects on plants, which may result in retarded growth of plants, have an unusual shape and/or the tissues may turn brown and then die. Colchicine that absorbed into plant tissues will inhibit the process of polymerization. So the plants cannot produce microtubules and then resulting to the incompleteness and disorder of spindle fibers. Accordingly, the metaphase chromosomes are not separated from

¹ศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²อาจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

each other. The cells that occur in this state will have a doubled chromosome number.

Keywords : Induction, Colchicine, Polyploidy

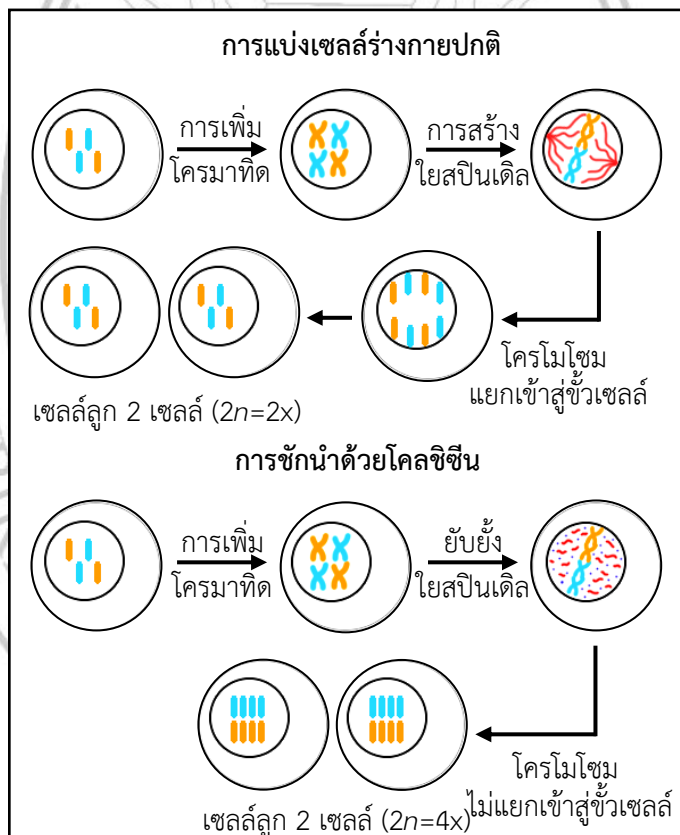
บทนำ

การเกิดพอลิพลอยด์ (Polyploidy) เป็นกระบวนการที่สำคัญในวิวัฒนาการของพืชในพืชดอก (Angiosperm) ที่เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ (Dicotyledon) เป็นพอลิพลอยด์ประมาณร้อยละ 43 (12,000 ชนิด) สำหรับในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Monocotyledon) เป็นพอลิพลอยด์ประมาณ ร้อยละ 58 (5,000 ชนิด) พบชนิดพืชที่เป็นพอลิพลอยด์จำนวนมากที่อยู่ในวงศ์ผักไม้ (Polygonaceae) วงศ์กุหลาบหิน (Crassulaceae) วงศ์กุหลาบ (Rosaceae) วงศ์ชบา (Malvaceae) วงศ์เล็บครุฑ (Araliaceae) วงศ์หญ้า (Gramineae) วงศ์วานแมงป่อง (Iridaceae) และวงศ์กล้วย (Musaceae) ในพืชยืนต้น (Perennial plant) ทั้งที่เป็นไม้ยืนต้น (Tree) หรือ ไม้พุ่ม (Shrub) มีโอกาสที่จะเป็นพอลิพลอยด์มากกว่าพืชล้มลุก (Annual Plant) ในพืชเมล็ดเปลือย (Gymnosperm) โดยเฉพาะในปรง (Cycad) และแปะก๊วย (Ginko) จะเป็นพอลิพลอยด์ทั้งหมด สามารถพบได้ในสน Golden Larch (*Pseudolarix amabilis*) ต้น Coast Redwood (*Sequoia sempervirens*) สนมังกร (*Juniperus chinensis*) และบางชนิดในสกุลพญาไม้ (*Podocarpus* spp.) นอกจากนี้ยังพบมากในสกุลมะเขือ (*Gnetales* spp.) ในพืชไม่มีท่อลำเลียง (Bryophyte) พบได้ในมอส (Moss)

เทคนิคการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (Chromosome) ในพืชด้วยการใช้สารโคลชิซิน (Colchicine) มีบทบาทที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์พืชในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมา มีพืชหลายชนิดที่ถูกชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ มีจุดประสงค์เพื่อให้ได้พืชที่มีคุณลักษณะใหม่ เช่น ทำให้ใบของพืชมีขนาดใหญ่ขึ้น ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้นหรือบานได้นานขึ้น ผลมีขนาดใหญ่ขึ้นหรือไม่มีเมล็ด แต่ในบางครั้งพบว่าทำให้ได้พืชที่มีลักษณะที่ผิดปกติออกมาที่ไม่สามารถเจริญเติบโตหรือมีรูปร่างที่ผิดปกติ ปัจจัยทางด้านพันธุกรรมของพืชจะมีผลโดยตรงต่อการอยู่รอดของชีวิต และการเจริญพัฒนาของชิ้นส่วนพืชที่จะส่งผลอย่างมากต่อการเกิดพอลิพลอยด์ เนื่องจากความสามารถในการเกิดต้นพอลิพลอยด์ในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ โดยส่วนใหญ่จะเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัวและสามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ เช่น โพรโตคอร์ม (Protocorms) แคลลัส (Callus) ปลายยอด (Apex) ตาข้าง (Lateral Bud) เป็นต้น ความเข้มข้นและระยะเวลาในการให้สารโคลชิซินจะต้องเพียงพอและเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ เนื่องจากสารโคลชิซินที่มีความเข้มข้นสูงอาจส่งผลในทางลบต่อเนื้อเยื่อพืชและสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่ำมากเกินไปจะไม่สามารถยับยั้งการสร้างใยสปินเดิล (Spindle fiber) ได้

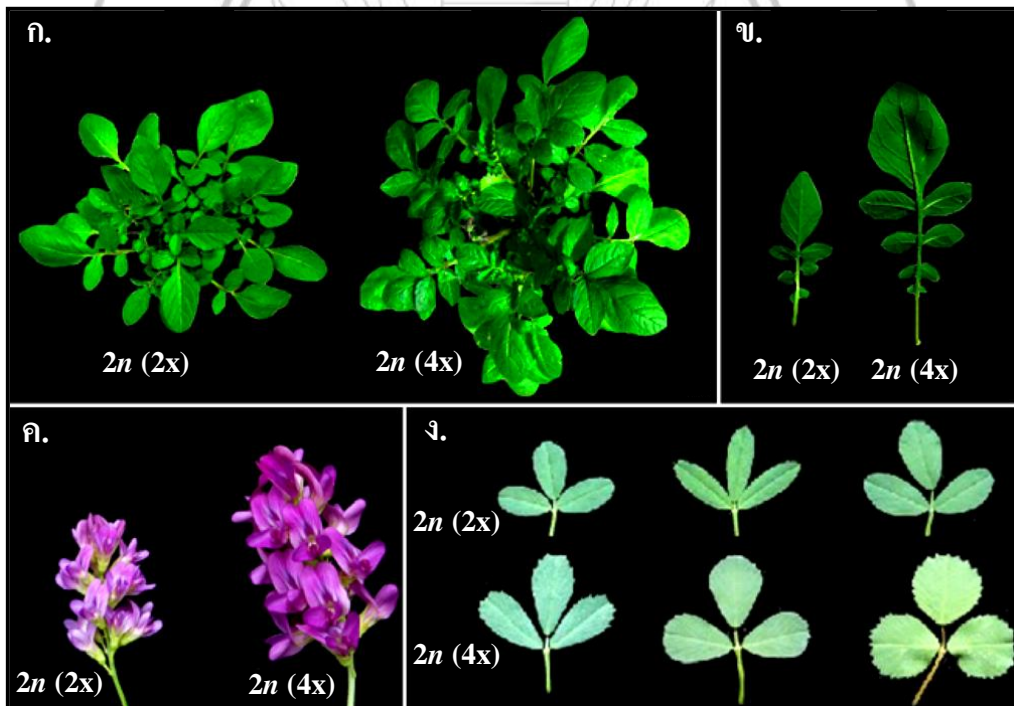
การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในพืช

พืชพอลิพลอยด์เป็นพืชที่มีจำนวนชุดโครโมโซม (จีโนม, Genome) มากกว่า 2 ชุด ซึ่งเป็นจำนวนที่มากกว่าพืชปกติที่มีจำนวนโครโมโซมเพียง 2 ชุด ทั้งนี้คำว่า “Ploidy” หรือ “Ploidy level” หมายถึงจำนวนชุดของโครโมโซม และใช้สัญลักษณ์แทนเป็น “x” พืชที่มีจำนวนชุดโครโมโซม 2 ชุด เรียกว่า ดิพลอยด์ (Diploid, $2n=2x$) มี 3 ชุด เรียกว่า ทริพลอยด์ (Triploid, $2n=3x$) ถ้ามี 4 ชุด เรียกว่า เตตระพลอยด์ (Tetraploid, $2n=4x$) เป็นต้น นอกจากนั้นในพืชยังต้องทำการระบุด้วยว่าจำนวนโครโมโซมนั้นได้มาจากเซลล์ที่อยู่ในระยะต้นสปอโรไฟต์ (Sporophyte) หรือต้นแกมีโทไฟต์ (Gametophyte) ในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในพืชสามารถทำได้โดยใช้สารเคมีหลายชนิด เช่น สารโคลชิซิน อะมิโปรฟอสเมทิล (Amiprophos-methyl หรือ APM) ไตรฟลูราลิน (Trifluralin) ไนตรัสออกไซด์ (Nitrous oxide หรือ N_2O) โปโดฟิลลิน (Podophyllin) และออริซาลิน (Oryzalin) แต่พบว่าสารโคลชิซินเป็นสารที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากให้ผลค่าเฉลี่ยในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ได้สม่าเสมอมากที่สุด (ภาพประกอบ 1)



ภาพประกอบ 1 การแบ่งเซลล์ร่างกายปกติที่เริ่มจาก 1 เซลล์ เมื่อสิ้นสุดได้ 2 เซลล์ ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่าเดิม (ภาพบน) และการใช้สารโคลชิซินชักนำในการแบ่งเซลล์ร่างกาย ทำให้มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (ภาพล่าง)

การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ถูกนำไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชหลายชนิด ตัวอย่างเช่น การชักนำให้เกิดอโเททระพลอยด์ ($2n, 4x = AAAA$) เพื่อสร้างพืชชนิดใหม่ ทำในไม้ดอก ไม้ผล หรือพืชสมุนไพรที่นำส่วนของรากมาใช้ประโยชน์เพื่อให้ดอก ผล หรือรากมีขนาดใหญ่มากขึ้น และได้ผลผลิตรวมตลอดจนปริมาณสารสำคัญมากขึ้น มีการเพิ่มขนาดของดอก เช่น ในพืชไซคลาเมน (*Cyclamen persicum*) กรดน้ำ (*Scoparia montevidiensis*) และกล้วยไม้เหลืองจินทบูรดำเต็มคอ (*Dendrobium friedericksianum*) เป็นต้น เพิ่มขนาดของเหง้าและรากของพืชสมุนไพร เช่น ในพืชอังกื้ม (ภาษาจีนแต้จิ๋ว) (*Scutellaria baicalensis*) และขิง (*Zingiber officinale*) เป็นต้น เพิ่มขนาดของใบ เช่น มันฝรั่ง (*Solanum commersonii*) และถั่วอัลฟัลฟา (*Medicago sativa*) เป็นต้น (ภาพประกอบ 2) ทำให้ไม่มีเมล็ด เช่น ในแตงโม (*Citrullus lanatus*) องุ่น (*Vitis vinifera*) และกล้วย (*Musa* spp.) เป็นต้น (ภาพประกอบ 3) และเพิ่มขนาดของผลและเมล็ด เช่น ข้าวโพด (*Zea mays*) (ภาพประกอบ 3) เป็นต้น




ภาพประกอบ 2 การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ ($2n=4x$) ในพืชที่ทำให้ขนาดของใบและดอกมีขนาดใหญ่ มากกว่าต้นปกติ ($2n=2x$) ที่พบได้ในมันฝรั่ง (*Solanum commersonii*, ภาพ ก. ข.) และถั่วอัลฟัลฟา (*Medicago sativa*, ภาพ ค. ง.)

การชักนำให้จำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เพื่อเพิ่มความสมบูรณ์ (Fertile) ในการสืบพันธุ์ของพืชลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามชนิด (Interspecific Hybridization) ซึ่งโดยปกติการผสมข้ามชนิดในพืชมักจะได้พืชลูกผสมที่เป็นหมัน (Sterile) เนื่องจากโครโมโซมของต้นพ่อและต้นแม่ไม่เข้าคู่กัน (Synapsis) ในขั้นตอนของการแบ่งเซลล์ไมโอซิส (Meiosis) ดังนั้นการ

เพิ่มชุดจำนวนโครโมโซมจึงทำให้เซลล์มีโครโมโซมคู่เหมือน (Homologous Chromosome) เพิ่มขึ้น 1 ชุด โครโมโซมจึงเข้าคู่กันได้ส่งผลให้พืชสามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gamete) ที่ปกติและติดผลได้ เช่น มะเขือ (*Solanum melongena*) กล้ายไม้ ขิง ลิลลี่ (*Lilium* spp.) และมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) เป็นต้น หรือแม้แต่การเพิ่มชุดโครโมโซมของพืชที่เกิดจากการเลี้ยงอับละอองเกสร หรือไมโครสปอร์ (Microspore) ที่มีจำนวนโครโมโซมชุดเดียว (มอโนพลอยด์, Monoploid) ให้เป็นต้นพืชที่มีโครโมโซม 2 ชุด ที่เหมือนกัน ทำให้ได้พืชที่เป็นพันธุ์แท้อย่างรวดเร็วกว่าการผสมพันธุ์โดยวิธีปกติ

พอลิพลอยดีในพืช

ตัวอย่างพอลิพลอยดีในพืช	
ชนิด	จำนวนโครโมโซม
ข้าวสาลี	$2n(6x) = 42$
ยาสูบ	$2n(4x) = 48$
กล้าย	$2n(3x) = 33$
มันฝรั่ง	$2n(4x) = 48$
สตรอเบอรี่	$2n(8x) = 56$

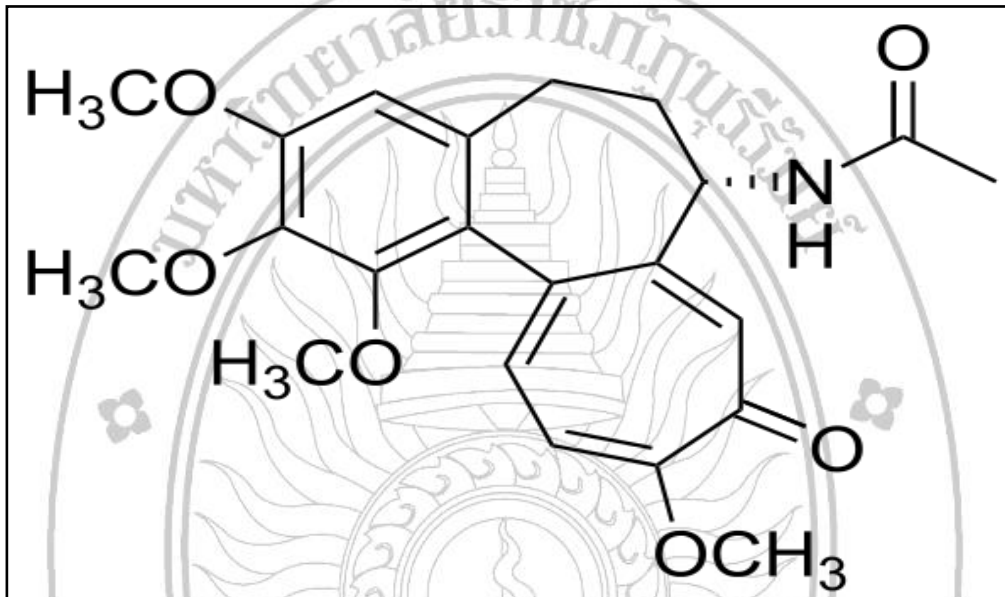


ภาพประกอบ 3 การชักนำให้เกิดพอลิพลอยดีในพืชทำให้เกิดการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ในพืชหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในปัจจุบัน

การใช้สารโคลชิซินในพืช

โคลชิซินเป็นสารอัลคาลอยด์ (Alkaloid) มีชื่อเรียกว่าอะเซทิลไตรเมทิล โคลชิซิน (Acetyltrimethyl Colchicines) มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{25}NO_6$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 399.43 (ภาพประกอบ 4) โคลชิซินบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นเกล็ดหรือผงสีเหลือง ละลายได้ดีทั้งในน้ำและแอลกอฮอล์ สลายตัวได้ในที่มีแสงสว่าง สกัดได้จากส่วนหัวและเมล็ดของพืช Autumn Crocus (*Colchicum autumnale*) และต้นดองดึง (*Gloriosa superba*) ที่สามารถพบได้ในประเทศไทย โดยมีการนำเข้ต้นดองดึงจากต่างประเทศเพื่อนำมาสกัดสารโคลชิซินและสารอัลคาลอยด์จากส่วนหัวและเมล็ด ดองดึงจัดเป็นพืชสมุนไพร ใช้ส่วนของต้นที่เป็นเหง้าและหัวใต้ดินต้มน้ำรับประทาน

แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ คนในชนบทนิยมใช้เป็นยารักษาโรคพยาธิภายในให้แก่สัตว์เลี้ยงจำพวกโคและกระบือ โดยให้กินต้นสดทั้งต้น สารโคเลชิซินมีพิษคล้ายสารหนูก่อนอันตรายได้ด้วยการสัมผัส ถ้าเข้าตาจะทำให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงและตาบอดชั่วคราว หากรับประทานเข้าไปจะมีพิษรุนแรงกับระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะบริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้ ถ้าได้รับในปริมาณที่มากส่งผลทำให้เสียชีวิตได้



ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างของสารโคเลชิซิน

วิธีการใช้สารโคเลชิซินทั้งในสภาพแปลงทดลองและในสภาพปลอดเชื้อ ได้แก่ การแช่สารละลายโคเลชิซิน เช่น พริก (*Capsicum annum*) และฝ้าย (*Gossypium arboreum*) เป็นต้น การหยดสารละลายลงบนบริเวณยอดหรือตาข้างของต้นอ่อน เช่น ฝ้าย และแตงโม เป็นต้น สำหรับจุดประสงค์ของการใช้สารโคเลชิซินกับพืชในสภาพที่ปลอดเชื้อมีหลายประการ เช่น เพื่อลดข้อจำกัดบางอย่างซึ่งไม่สามารถทำได้ในสภาพแปลงทดลอง โดยพบว่า การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในสภาพแปลงทดลองส่วนใหญ่จะได้ต้นที่เป็นเทตระพลอยด์น้อยและทำให้เกิดต้นที่เป็นไคเมร่า (Chimera, มีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมในหลายรูปแบบอยู่ในพืชต้นเดียวกัน) จำนวนมาก หากมีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้สารโคเลชิซินพบว่า จะสามารถลดปัญหาเหล่านี้ลงได้โดยการเลือกชนิดของเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืชที่กำลังเจริญและมีการแบ่งเซลล์อยู่เป็นจำนวนมาก เช่น การใช้แคลลัส กลุ่มเซลล์ หรือตายอดที่อยู่ในระยะเพิ่มจำนวนพบว่า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพและปริมาณต้นพืชได้โดยพบต้นเทตระพลอยด์เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 40-50 นอกจากนี้ยังช่วยให้ชิ้นส่วนของพืชได้รับสารโคเลชิซินที่สม่ำเสมอและยังสามารถใช้สารนี้แก่ชิ้นส่วนพืชได้ครั้งละจำนวนมาก ดังนั้นการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืชจึงเป็นการเพิ่มโอกาสที่จะได้ต้นพืชที่เป็นพอลิพลอยด์มากขึ้นด้วย ประกอบกับการคัดเลือกและการเพิ่มจำนวนพืชพอลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อยังสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็วเนื่องจากการตรวจสอบ

จำนวนโครโมโซมจากรากของต้นในสภาพปลอดเชื้อให้ผลที่ไม่แตกต่างกับต้นพืชที่ปลูกในสภาพแปลงทดลอง

การชักนำให้เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้สารโคลชิซินจะสามารถให้ผลดีกับพืชหลายชนิดและการเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายแบบ เช่น ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของอ้อย (*Saccharum officinarum*) การเลี้ยงแคลลัสของแกลดีโอลัส (*Gladiolus hybrida*) พันธุ์ป่า การเลี้ยงกลุ่มตายอดที่กำลังเพิ่มจำนวนของอัลโตรเมียเลีย (*Alstroemeria* spp.) การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ และการเพาะเลี้ยงปลายยอดของขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) เปราะหอม (*Kaempferia galanga*) และจิง เป็นต้น

การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ด้วยการใช้สารโคลชิซินร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถที่จะแบ่งสารโคลชิซินออกได้เป็น 2 แบบ คือ แบบแรก การเขย่าชิ้นส่วนพืชในสารละลายโคลชิซินที่มีการเติมสาร Dimethyl Sulfoxide (DMSO) เมื่อครบกำหนดระยะเวลาจึงล้างชิ้นส่วนพืชด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นทำการย้ายชิ้นส่วนของพืชลงเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติ ซึ่งการให้โคลชิซินอาจให้ในที่มีดและอุณหภูมิต่ำหรือให้อยู่ในที่มีดที่อุณหภูมิห้อง และ แบบที่สอง การให้สารโคลชิซินในอาหารเหลวหรืออาหารแข็งที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เมื่อครบกำหนดเวลาจึงล้างชิ้นส่วนพืชด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจากนั้นทำการย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตามปกติ

ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ

1. พันธุกรรมพืช

พันธุกรรมของพืชมีผลต่อการรอดชีวิตและการเจริญพัฒนาของชิ้นส่วนพืชซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการเกิดพอลิพลอยด์เป็นอย่างมาก จากการศึกษาของพีเทอร์สัน (Peterson) และคณะ ในปี ค.ศ. 2003 ทำการให้สารโคลชิซินกับแคลลัสของหญ้ามิสแคนทัส (*Miscantkus sinensis*) เป็นหญ้าที่มีช่วงอายุหลายปีในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ใช้ประโยชน์จากเส้นใยและเป็นเชื้อเพลิงพบว่าหญ้ามิสแคนทัสในแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเกิดเทตระพลอยด์ที่แตกต่างกัน พบได้เช่นเดียวกันในการศึกษาของวูและมูนีย์ (Wu and Mooney) ในปี ค.ศ. 2002 พบว่าส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulate*) ลูกผสมในสายพันธุ์ต่าง ๆ มีอัตราการเกิดเทตระพลอยด์ที่แตกต่างกัน รวมถึงการศึกษาของนิตยศรี แสงเดือน และอำไพ สิ้นพัฒนนนท์ ในปี พ.ศ. 2541 พบว่าตาข้างของหม่อน (*Morus* spp.) จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์น้อย คุณไผ่ และใหญ่บุรีรัมย์ ที่ได้รับสารโคลชิซินมีอัตราการเกิดเทตระพลอยด์ที่แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์น้อยเกิดต้นเทตระพลอยด์มากที่สุด (ร้อยละ 40) สำหรับสายพันธุ์คุณไผ่และใหญ่บุรีรัมย์ เกิดต้นเทตระพลอยด์ที่ใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 30)

2. ชนิดของชิ้นส่วนพืช

ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้ชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์พบว่าส่วนใหญ่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ (Meristematic Tissue) ที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัวเป็นจำนวนมากและสามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ เช่น แคลลัส โปรโตคอร์ม ปลายยอด และตาข้าง เป็นต้น การใช้สารโคลชิซินความเข้มข้นต่ำกับแคลลัสของพืชจะชักนำให้เกิดเทตระพลอยด์ได้สูงถึงร้อยละ 40-70

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการใช้สารโคลชิซินกับส่วนอื่นของพืช และพบว่าเมื่อพืชได้รับสารโคลชิซินจะทำให้มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำและมีความสามารถในการเป็นต้นที่ลดลง ตัวอย่างเช่นในแคลลัสของพืชซึ่งงิมที่ถูกชักนำให้เกิดเทระพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซินความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นระยะเวลา 0, 3, 5, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง พบว่าแคลลัสมีแนวโน้มการรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสารโคลชิซินนานขึ้น

ในการใช้สารโคลชิซินกับปลายยอดและตาข้างซึ่งเป็นชิ้นส่วนของพืชที่จะสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ นอกจากนี้ยังเป็นชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่จึงทนทานต่อสารโคลชิซินได้ดีทำให้อัตราการรอดชีวิตค่อนข้างสูงและเกิดยอดใหม่ได้เร็ว แต่จะเกิดเป็นต้นพอลิพลอยด์เพียงจำนวนเล็กน้อย (ร้อยละ 1-5) เช่น ในกุหลาบ (*Rosa spp.*) และชิง เป็นต้น จากการศึกษาของโรส (Rose) และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 เลี้ยงชิ้นส่วนที่มีตาข้างของราชวดีเสด (*Buddleia globosa*) ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.10 เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากโคลชิซิน พบว่าร้อยละของการรอดชีวิตและการเกิดต้นมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสารโคลชิซินนานขึ้น

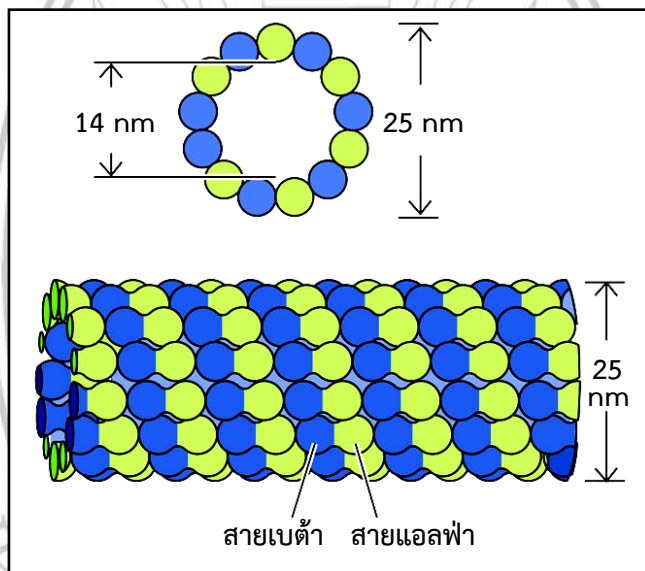
3. ความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารโคลชิซิน

มีรายงานการศึกษาถึงความเข้มข้นสารโคลชิซินที่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างไยสปินดีลของเซลล์ปลายรากกุหลาบ (*Rosa wichuraiana*) โดยพบว่าสภาพสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่ำที่ไม่สามารถยับยั้งการสร้างไยสปินดีลได้อย่างสมบูรณ์ จะทำให้เซลล์ยังคงสภาพเป็นดิพลอยด์ ในขณะที่ความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เพียงพอต่อการยับยั้งการสร้างไยสปินดีลจะทำให้เซลล์รากที่เป็นดิพลอยด์เปลี่ยนเป็นเทระพลอยด์โดยไม่ทำให้เซลล์พืชตาย สำหรับสารโคลชิซินที่มีความเข้มข้นสูงมากเกินจะไปยับยั้งการสร้างไยสปินดีล มีผลทำให้เกิดเซลล์เทระพลอยด์เช่นเดียวกันแต่จะส่งผลให้พืชเจริญเติบโตช้าและมีรูปร่างที่ผิดปกติ

มีการศึกษาการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในกล้วยไม้โดยใช้สารออริซาลิน พบว่ามีคุณสมบัติเช่นเดียวกันกับสารโคลชิซิน ในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซินร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถทำได้ด้วยการใช้สารโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลานานหรือการใช้สารโคลชิซินความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลานาน การใช้สารโคลชิซินความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลานานร่วมกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของพืชจะใช้สารโคลชิซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 - 0.05 เป็นระยะเวลา 14 - 60 วัน จากนั้นจึงทำการย้ายชิ้นส่วนของพืชไปเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารโคลชิซินเพื่อให้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นต้นต่อไป ด้วยวิธีการนี้สามารถที่จะชักนำให้เกิดเทระพลอยด์ได้ในพืชหลายชนิด เช่น ตังเซียม (ภาษาจีนแต้จิ๋ว) (*Salvia miltiorrhiza*) สควิลเลีย (*Scutellaria baicalensis*) และเกรปฟรุต (*Citrus paradise*) สำหรับการใช้สาร โคลชิซินที่ความเข้มข้นสูงร้อยละ 0.5 ร่วมกับ DMSO ร้อยละ 2 กับปลายยอดหม่อนเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง และที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิดเทระพลอยด์

กลไกการยับยั้งการสร้างใยสปินเดิล

สารโคลชิซินจะเข้าไปยับยั้งการสร้างไมโครทิวบูล (Microtubule) ที่มีโครงสร้างเป็นโปรตีนไมโครทิวบูลเป็นองค์ประกอบของใยสปินเดิลมีลักษณะเป็นท่อยาว มีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางขอบนอก 25 นาโนเมตร และขอบใน 14 นาโนเมตร ผนังของไมโครทิวบูลประกอบด้วย 13 โปรโตฟิลาเมนต์ (Protofilament) เรียงกันเป็นวงกลม แต่ละโปรโตฟิลาเมนต์เกิดจากโปรตีนทูบูลิน (Tubulin) มาเรียงต่อกันในแนวยาว โปรตีนทูบูลินมี 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดแอลฟา (Alpha) และเบต้า (Beta) ทั้งสองชนิดมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-5 นาโนเมตร และมีน้ำหนักโมเลกุล 50,000 ดาลตัน โดยโปรตีนทูบูลินแต่ละชนิดจะมาจับต่อกัน เรียกว่ากระบวนการพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) กลายเป็นไมโครทิวบูล ส่วนปลายของไมโครทิวบูลที่มีการเจริญยืดยาวออกไปเรียกว่า “ปลายบวก” ซึ่งจะมีการรวมกันของโปรตีนทูบูลินเกิดขึ้น ส่วนปลายที่อยู่ตรงกันข้ามเรียกว่า “ปลายลบ” เป็นปลายที่มีการสลายของไมโครทิวบูล (ภาพประกอบ 5)



ภาพประกอบ 5 องค์ประกอบของใยสปินเดิลที่ประกอบด้วยไมโครทิวบูลเป็นโครงสร้างหลัก มีลักษณะเป็นท่อยาว ผนังของไมโครทิวบูลประกอบด้วย 13 โปรโตฟิลาเมนต์ เรียงกันเป็นวงกลม แต่ละ โปรโตฟิลาเมนต์เกิดจากโปรตีนทูบูลินชนิดแอลฟา และเบต้ามาเรียงต่อกันในแนวยาว

ในการใช้สารโคลชิซินกับพืช โคลชิซินจะไปยับยั้งกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน โดยจะจับกับโปรตีนทูบูลินและยับยั้งการเพิ่มของโปรตีนทูบูลินที่ด้านปลายบวกทำให้ไม่สามารถสร้างไมโครทิวบูลได้ส่งผลให้ใยสปินเดิลไม่สมบูรณ์หรือมีการขาดหายไป โครโมโซมระยะเมทาเฟสจึงไม่แยกออกจากกัน และไม่มีการเคลื่อนที่ไปยังขั้วตรงกันข้ามในระยะแอนาเฟสทำให้เซลล์ที่เกิดในสภาพนี้ มีจำนวนชุดโครโมโซม เพิ่มมากขึ้นเป็น 2 เท่า (ภาพประกอบ 6)

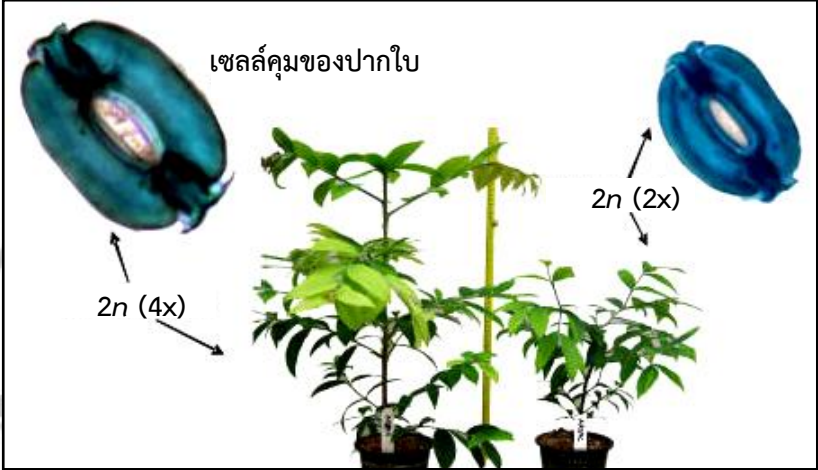


ภาพประกอบ 6 โคลชิซีนจะไปยับยั้งกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน โดยจะจับกับโพรตีนทุบูลิน และยับยั้งการเพิ่มของโพรตีนทุบูลิน ทำให้ไม่สามารถสร้างไมโครทิวบูลได้ส่งผลให้ไยสปินเดลไม่สมบูรณ์

ผลของการเกิดพอลิพลอยดีในพืช

1. มีการเพิ่มขนาดของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ เซลล์จะมีขนาดใหญ่มากขึ้นส่งผลให้ส่วนต่าง ๆ ของพืชมีขนาดใหญ่เพิ่มมากขึ้นด้วย เช่น ขนาดของใบที่ใหญ่มากขึ้น สำหรับเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบพอลิพลอยดีในพืช คือ ขนาดของเซลล์คุม (Guard Cell) ของปากใบ (Stomata) (ภาพประกอบ 7) นอกจากนี้พบว่าขนาดของละอองเรณู (Pollen) ก็ใช้ในการเปรียบเทียบได้เช่นเดียวกัน
2. พืชมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญเติบโตในสภาพปกติจะพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของพืชพอลิพลอยดีจะช้ากว่าพืชดิพลอยดี ส่งผลทำให้มีการเกิดดอกช้าลง มีการแตกกิ่งก้านและหน่ออ่อนลง
3. รูปร่างของอวัยวะของพืชมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากพืชมีการเพิ่มขนาดของเซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลง อาจทำให้รูปร่างของพืชมีการเปลี่ยนแปลง ได้แก่ ใบมีความใหญ่หนา และเขียวเข้มมากขึ้น เช่น ที่พบในตำลึง (*Coccinia grandis*) ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatic*) และข้าวโพด เป็นต้น ในพืชบางชนิดการที่ใบมีความหนามากขึ้นจะทำให้พืชมีความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น เช่น ในพืชสกุลกล้วยพบว่ากล้วยหอมที่เป็นพอลิพลอยดีจะมีความแข็งแรงกว่ากล้วยไข่และกล้วยเล็บมือนางที่เป็นดิพลอยดี
4. พืชที่เป็นพอลิพลอยดีจะมีละอองเรณูลดน้อยลงแสดงความเป็นหมันมากขึ้น พบทั้งในดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย เช่น ที่พบในแตงโม และกล้วย เป็นต้น

5. เกิดการผสมพันธุ์ภายในชนิดเดียวกันไม่ได้ (Self-incompatible) ถ้าพืชที่เป็นพอลิพลอยด์นั้นเกิดจากต้นพ่อและแม่ที่เป็นหมันและผสมตัวเองไม่ได้ ลูกที่เป็นพอลิพลอยด์จะมีโอกาสสูงมากที่จะผสมตัวเองไม่ได้ อาจเรียกว่าเกิดสิ่งกีดขวางของยีน (Genetic Barrier) เช่น คะน้า (*Brassica alboglabra*) หอม (*Alliumcepa* var. *aggregatum*) และพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) เป็นต้น



ภาพประกอบ 7 ต้น Queensland kauri (*Agathis robusta*) ที่เป็นพอลิพลอยด์ ($2n=4x$) จะมีขนาดของเซลล์คุมของปากใบที่ใหญ่มากขึ้นกว่าต้นปกติ ($2n=2x$)

เอกสารอ้างอิง

- Adams, K. L. and Wendel, J. F. 2005. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 8: 135-141.
- Blakeslee, A. F. and Avery, A. G. 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with colchicine. **Journal of Heredity** 28: 393-411.
- Bretagnolle, F. A. and Thompson, J. D. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. **New Phytologist** 129: 1-22.
- Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature** 6: 836-846.
- Dewey, D. R. 1980. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: Lewis, W. H. (ed). **Polyploidy: biological relevance**. Plenum Press, New York, p. 445-470
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L. and Van Huylenbroeck, J. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 104: 359-373.
- Dorsey, E. 1936. Induced polyploidy in wheat and rye. **Journal of Heredity** 27: 155-160.
- Levin, D. A. 2002. **The role of chromosomal change in plant evolution**. Oxford University Press, Oxford.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R. and Clarindo, W. R. 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta** 243(2): 281-96.