วิจารณ์ผลการวิจัย

วิธีการในการเลี้ยง Endosperm Cell เพื่อศึกษาไมโตซิส

เทคนิคในการเลี้ยง endosperm เซลล์เพื่อศึกษาไมโตซิสนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Bajer (1955) มีข้อแตกต่างกันเล็กน้อย คือ Bajer ได้ทำ vaseline ring รอบขอบของวุ้นอาหารบน cover glass ภายในช่องเลี้ยงเพื่อเก็บรักษาความชื้นอีกชั้นหนึ่ง ในการทดลองนี้ไม่ได้ทำ vaseline ring แต่ทาวุ้นไปเต็ม cover glass จนจดขอบสไลด์ การเก็บรักษาความชื้นจึงอาจแตกต่างกับวิธีการของ Bajer เล็กน้อย แต่ผลในการให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้นานขึ้นคงไม่แตกต่างกันมากนักเนื่องจากพบว่าสามารถจะทำให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้ถึงเจ็ดวันในครั้งหนึ่งที่เซลล์นั้นอยู่ในสถานะปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยปกติเซลล์จะมีชีวิตอยู่ประมาณหนึ่งถึงสองวันแล้วตายโดยมี เชื้อราหรือแบคทีเรียขึ้น สาเหตุอื่นที่ทำให้เซลล์ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานกว่านี้อาจจะเนื่องจากการตระเตรียม medium ในการเลี้ยงไม่บริสุทธิ์พอ น้ำที่ใช้ควรจะเป็น double distilled water ทำการกลั่นในภาชนะที่ทำด้วยแก้วซ้ำสองครั้งในเวลาติดต่อกันโดยมิได้แยกออกมาให้ถูกอากาศหรือภาชนะอื่นใด

การทดลองเลี้ยงที่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคสตั้งแต่ ๔.๕ เปอร์เซนต์ถึง ๖ เปอร์เซนต์ นี้ปรากฏว่าเซลล์มีชีวิตอยู่ได้เช่นกัน แต่อัตราการหยุดชงักของไมโตซิสจะมากขึ้นตามความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปจาก ๕ เปอร์เซนต์ ปรากฏการณ์เหล่านี้จึงอธิบายถึงความสำคัญของกลูโคสหรือ osmotic pressure ของเซลล์ที่มีต่อการแบ่งนิวเคลียส

วิธีการเลี้ยง endosperm เซลล์บน glucose agar medium แต่อย่างเดียวนี้ไม่สามารถทำให้เซลล์มีการเจริญเกิดขึ้นและแบ่งตัวได้อีกครั้งหนึ่ง จากผลงานของ Bergmann (1959), Jones et al (1960) และ Steward (1963) อาจจะมีวิธีการที่สามารถจะเลี้ยง single cellและสามารถจะติดตามการเจริญด้วยกล้องจุลทัศน์ได้โดยง่าย ผลงานของ Jones et al (1960) ซึ่งสามารถจะเลี้ยงให้เซลล์เจริญใน micro-culture ด้วย liquid medium นี้แม้จะสังเกตด้วยกล้องจุลทัศน์ได้โดยง่าย แต่ลักษณะของเซลล์กลมและเล็กไม่สามารถจะศึกษาพฤติการณ์ภายในได้อย่างชัดเจน ซึ่งผิดกับวิธีที่เลี้ยงเซลล์บน agar ซึ่งทำให้เซลล์แบนราบและเปลี่ยนรูปร่างจากรูปทรงกลมเป็นรูปเลนส์นูนชนิด

plano convex ซึ่งทำให้เนื้อที่ๆเห็นมากขึ้นและส่วนลึกน้อยลงเห็นพฤติการณ์ภายในได้ชัดเจน microculture technique นี้ก็จะทำให้การศึกษาปรากฏการณ์ต่างๆภายในเซลล์ได้โดยง่าย โดยเฉพาะการแบ่งนิวเคลียสทั้งไมโตซิสและ meiosis เนื่องจากเห็นพฤติการณ์ต่างๆของโครโมโซมได้อย่างชัดเจน

ไมโตซิสของ Endosperm Cell

ไมโตซิสของ endosperm Zephyranthesนี้ดำเนินเป็นระยะเวลาต่างๆไม่เท่ากันในแต่ละเซลล์ ระยะเวลาที่แตกต่างกันนี้ขึ้นอยู่กับ mitotic activity ของแต่ละเซลล์เองโดยที่ระยะเวลาของ mitotic stage ต่างๆจะเปลี่ยนแปลงไป จากผลการศึกษาจะเห็นว่าบางเซลล์เช่น เซลล์ No.7 ระยะ anaphase-telophase จะเร็วมากเมื่อเทียบกับเซลล์ No.6 ซึ่งกินเวลา ๑๗.๓๐ และ ๔๑ นาทีตามลำดับ ความแตกต่างกันนี้ขึ้นอยู่กับพฤติกรรมในการแบ่งซึ่งเป็นผลจาก activity ภายในเซลล์และ mechanical condition ของเซลล์ในขณะนั้น นอกจากนี้การแบ่งโครโมโซมของ Zephyranthes ยังมีความผิดปกติเกิดขึ้นมาก ผลจากการศึกษานี้อาจอธิบายถึงผลงานของ Nakajima (1962) จากการเลี้ยง endosperm ของ cucumber ที่ไม่เกิด differentiation ขึ้นเลย

Contraction Stage

จากการศึกษาไมโตซิสของเซลล์ในขณะที่มีชีวิต Bajer & Molé-Bajer (1956) พบว่าเซลล์ของพืชมี contraction ของโครโมโซมเกิดขึ้นก่อนเข้าสู่ระยะ metakinesis พืชที่มีโครโมโซมใหญ่จะมี contraction แรงกว่าพวกที่มีโครโมโซมขนาดปานกลาง สำหรับพวกที่มีโครโมโซมเล็กยังไม่พบ contraction ส่วนในเซลล์ของสัตว์นั้นยังไม่พบว่ามีรายงานถึงระยะนี้ Zephyranthes นี้มีโครโมโซมขนาดปานกลาง contraction เกิดขึ้นเล็กน้อยเห็นได้ในเซลล์ที่ถ่ายด้วยอัตราเร็ว ๖ ภาพต่อนาที ในเซลล์ที่ถ่ายด้วยอัตราเร็ว ๑๒ ภาพต่อนาทีจะมองไม่ใคร่เห็นระยะนี้ เมื่อฉายดูเป็นภาพยนต์ด้วยอัตราเร็ว ๑๖๐ เท่าและ ๘๐ เท่าของ activity จริงในเซลล์ตามลำดับ ระยะเวลาของ contraction stage แตกต่างกันโดยบางเซลล์แรงกดจะกระทำทันที บางเซลล์แรงกดจะกระทำอย่างช้าๆ จากการศึกษาของ Bajer (1958a) เขาพบว่าการเกิดของ contraction stage อาจจะมีอิทธิพลต่อระยะเวลาของ metakinesis โดยเซลล์ที่มี weak

contraction ระยะ metakinesis จะกินเวลานานกว่าเซลล์ที่มี strong contraction จากผลการศึกษาเซลล์ No.8 และ No.11 เซลล์No.8 มี strong contraction แต่เนื่องจากเซลล์นี้มี long stability ของ metaphase plate ระยะเวลาที่ต่างกันจึงไม่อาจสรุปได้ว่าเนื่องจากอิทธิพลของ contraction stage ระยะเวลาของ contraction stage ในเซลล์ No.11 ที่นานนี้เนื่องจากถูกแรงกดกระทำอย่างช้าๆและเป็นระยะเวลานานนี้ระยะ metakinesis-metaphase กินเวลานานและนิวคลีโอลัสละลายไม่หมดไปในระยะ contraction stage ในเซลล์ No.5 จากกราฟ (รูปที่ ๑๖) จะเห็นว่าเกิด strong contraction ระยะ metakinesis ของเซลล์นี้เร็วกว่าเซลล์ No.11 และนิวคลีโอลัสละลายหมดไปในระยะ contraction stage

Contraction ของโครโมโซมที่กระทำมาจากขั้วของเซลล์นั้น Bajer & Molé-Bajer (1956) อธิบายว่าอาจเกิดขึ้นได้สองทาง คือ เกิดจากการเรียงตัวกันในทันทีของ spindle particle ที่เริ่มจากขั้วเซลล์มายัง plate หรือเกิดจากความแตกต่างของแรงตึงผิวระหว่าง nuclear sapและ clear space ซึ่งรวมกันหลังจาก nuclear membrane ละลาย แรงกระทำทั้งสองทำให้เกิด contraction ขึ้น การเกิดของ spindle fiber ในระยะนี้สังเกตได้อีกจาก random movement ของ particle เล็กๆ ใน nucleoplasm และ clear space เกิด interaction ระหว่าง spindle และ kinetochore (Bajer 1958a) ในการสังเกตเห็นได้ว่าหลังจาก contraction kinetochore เป็นตัวนำในการเคลื่อนที่ของโครโมโซม และจาก compression ของกลุ่มโครโมโซมอาจตัดสินได้ว่าด้านใดเป็นขั้วของเซลล์

Metakinesis และ Metaphase

ในระยะ metakinesis มีแรงกระทำสองแรงเกิดขึ้นบนโครโมโซม คือ แรงหนึ่งทำให้ kinetochore เคลื่อนที่ไปยัง metaphase plate อีกแรงหนึ่งกระทำไปทางขั้วเซลล์ Bělař (Bajer & Molé-Bajer 1956) ให้ความคิดเห็นว่า straightening ของ chromosome arm ในระยะ metakinesis นี้เป็น growth ของ spindle ไปยังขั้วเซลล์ จากการสังเกตในปัจจุบัน แรงที่กระทำไปทางขั้วเซลล์นี้สังเกตเห็นได้ชัดจากการเคลื่อนที่ของ persisting nucleolus ไปทางขั้วเซลล์ ในการ

ศึกษาครั้งนี้เห็นการเคลื่อนที่ของ persisting nucleolus ไปทางขั้วเซลล์ได้ในเซลล์ No.11, No.13 และ A_5 แรงที่กระทำให้ chromosome arm ชี้เหยียดไปทางขั้วเซลล์นี้ Bajer & Molé-Bajer (1956) คิดว่าเกิดจาก differentiation ของ mitotic spindle ในระยะ metakinesis Mitotic spindle นี้เป็น uniform structure ในระยะ contraction stage การเปลี่ยนเป็น non-uniform structure ทำให้ chromosome arm straighten จากการศึกษาด้วย polarizing microscope ของ Inoué และ Bajer (1961) เห็น differentiation ของ mitotic spindle โดยมีการเปลี่ยนแปลงของ birefringence ของ spindle ในระยะนี้ และก่อนที่โครโมโซมจะแยกออกจากกัน birefringence จะมากที่สุดที่ต่อกับ kinetochore

การละลายของ persisting nucleolus ในระยะ metakinesis ก่อนที่ metaphase plate จะสมดุลและการแยกของ kinetochore ในเซลล์ No.6, No.11 และ No.13 อาจอธิบายถึงความสำคัญของนิวคลีโอลัสที่เกี่ยวโยงกับ differentiation ของ spindle ได้ เนื่องจาก mitotic spindle ที่ดึงให้โครโมโซมเคลื่อนที่นี้ประกอบด้วย single protein และโปรตีนที่ conjugate กับ RNA (Giese 1962) ความสำคัญของ RNA ที่มีต่อ mitotic spindle นี้ Kaufmann & Das พบว่าเมื่อใช้ ribonuclease treat กับรากที่กำลังมีการเจริญของพืชหลายชนิดจะทำให้เกิดไมโตซิสที่ผิดปกติหลายแบบซึ่งเกี่ยวโยงกับ spindle คือการเกิด polyploidy, lagging chromosome และ polycentric mitoses (Brachet 1957) นอกจากนี้เซลล์ที่มี persisting nucleolusอยู่ตลอดระยะของไมโตซิส เช่น เซลล์ No.12 และ A_4 ที่ไม่เห็นการเคลื่อนที่ของโครโมโซม การที่นิวคลีโอลัสละลายไม่หมดอาจจะเนื่องจากไม่เกิด differentiation ของ spindle เนื่องจากโครโมโซมกระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณ clear space ขัดขวางการเจริญของ spindle ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากการแบนราบของเซลล์ทำให้โครโมโซมไม่สามารถมาที่ equatorial plate ได้หมด นิวคลีโอลัสที่พบว่าเกิดขึ้นในระยะ late anaphase จึงอาจเกิดขึ้นจากการสลายตัวของ spindle

ในระยะ metakinesis ยังมีปรากฏการณ์อีกอันหนึ่งคือ abrupt bending movement ของ chromosome arm Chromosome arm ชี้หักกลับมาที่ metaphase

plate แล้วเหยียดขนานกับ spindle ใหม่ พฤติการณ์นี้อธิบายได้โดยยากและอาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ spindle เอง มีข้อสนับสนุนคือในการทดลองกับ colchicine จะไม่มี abrupt bending movement ถึงแม้จะมี slow straightening ของ chromosome arm (Bajer 1958b) ในเซลล์ No.8 (รูปที่ ๓๐) การชี้เหยียดของ chromosome arm ไปทางขั้วนี้มีลักษณะคล้ายกับเป็น abrupt bending movement แต่เนื่องจากไม่ได้ติดตามดูตั้งแต่เริ่มการเคลื่อนไหวของ chromosome arm จาก metaphase plate จึงไม่อาจทราบได้ว่าเกิดขึ้นเนื่องจาก abrupt bending movement หรือไม่

การเคลื่อนที่ของ metakinetic chromosome ไปยังขั้วเซลล์แล้วกลับมานี้อาจอธิบายว่าเป็น delay moment ของ activity ของ kinetochore หรือเกิด new uniform process ของ gelification ที่ต่อกับโครโมโซมแต่เพียงด้านเดียว (Bajer & Molé-Bajer 1956) การเกิดของ spindle ที่ต่อกับ kinetochore แต่เพียงด้านเดียวนี้อาจอธิบายถึงการเคลื่อนที่ของโครโมโซมไปยังขั้วเซลล์แล้วไม่กลับมาที่ metaphase plate อีกจากที่พบในเซลล์ No.10 การแยกกันของ kinetochore ของโครโมโซมที่ขั้วในเซลล์ No.10 และ birefringence ของ spindle ดังได้กล่าวมาแล้ว ทำให้คิดว่าการแยกของ kinetochore ไม่ขึ้นกับ contraction ของ spindle แต่การเคลื่อนที่ของ kinetochore ในระยะ anaphase เกี่ยวข้องกับ spindle

ระยะ metaphase เกิดขึ้นจากการหยุดการเคลื่อนไหวของโครโมโซมชั่วระยะหนึ่งที่การเปลี่ยนแปลงของ spindle สิ้นสุดลง การวิเคราะห์ระยะ metaphase ทำให้คิดว่าเป็นระยะของความสมดุล Stabilisation ของ metaphase plate ไม่จำเป็นสำหรับ regular chromosome distribution ซึ่งสังเกตได้จาก mechanical condition ใน flattened cell (Bajer & Molé-Bajer 1956) การสังเกตจาก micrograph และภาพยนต์ระยะ metaphase ไม่อาจแยกออกได้จากระยะ metakinesis เนื่องจากการถ่ายทำเร่งความเร็วของ mitotic activity ขึ้นจากเดิม ช่วงระยะที่โครโมโซมหยุดการเคลื่อนไหวอาจจะกินเวลาเพียงเล็กน้อย พฤติการณ์ในการแบ่งของโครโมโซมนี้คล้ายกับว่าระยะ anaphase ติดต่อกับ metakinesis เลย แต่จากการศึกษาพบว่า stabilisation ของ metaphase plate นี้เป็นส่วนสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดการ

แบ่งที่ผิดปกติขึ้นได้ในเซลล์ที่มีโครโมโซมเป็นจำนวนมาก เซลล์ที่มี metaphase plate ที่ผิดปกติมากจะทำให้เกิด unequal distribution ของโครโมโซมได้โดยง่าย เช่น เซลล์ No.10 และ A_5 ลักษณะเหล่านี้ mechanical condition ของเซลล์ในขณะนั้นมีผลทำให้เกิดขึ้นได้เช่นเดียวกับ chromosome bridge และ polyploidy

Anaphase และ Telophase

การเคลื่อนที่ของโครโมโซมในระยะ anaphase จะมุ่งไปในทิศที่ตั้งฉากกับ metaphase plate ในเซลล์ที่มีการเรียงตัวของ metaphase plate เป็นสามแฉก (รูปที่ ๒๔) เมื่อพิจารณาจากลักษณะการเคลื่อนที่ของโครโมโซมเซลล์นี้ควรจะมีสามขั้วที่จะทำให้เกิดการเรียงตัวของ kinetochore ในลักษณะนี้ได้ การเคลื่อนที่ของโครโมโซมในเซลล์ของพืชจึงควบคุมด้วยศูนย์กลางอันหนึ่งที่เชื่อมโยงกับ spindle fiber

เซลล์ที่เกิด non stabilisation ของ metaphase plate จากการแบนราบของเซลล์ไปตาม agar medium ทำให้โครโมโซมไม่สามารถจะมารวมกันที่ metaphase plate หมด จึงเป็นเหตุให้การเคลื่อนที่ของโครโมโซมไปสู่ขั้วไม่พร้อมกัน โครโมโซมที่เคลื่อนที่ออกช้ากว่าอันอื่นๆหรือ lagging chromosome อาจจะเนื่องจากไม่มีเนื้อที่เพียงพอที่โครโมโซมจะเคลื่อนออกมาได้ การแผ่กระจายของโครโมโซมในบริเวณ clear space หรือ spindle เต็มไปหมดจึงเป็นสาเหตุอันหนึ่งที่ทำให้เกิดเป็น polyploid ขึ้น

ระยะ anaphase-telophase ของเซลล์ที่แตกต่างกันจึงขึ้นอยู่กับความเร็วในการเคลื่อนที่ของโครโมโซมและระยะทางที่โครโมโซมนั้นเคลื่อนที่ไป ในเซลล์ No.7 ระยะนี้สั้นมากเมื่อเทียบกับเซลล์อื่นๆ เมื่อทดลองวัดหาความเร็วในการเคลื่อนที่ของโครโมโซมเปรียบเทียบกับเซลล์ No.6 และ No.8 พบว่าเซลล์ No.7 โครโมโซมเคลื่อนที่เร็วกว่าเซลล์ No.6 และ No.8 ตามลำดับ

ระยะเวลาและพฤติการณ์ของ mitotic process ที่หาได้ในเซลล์ต่างๆนี้จึงขึ้นอยู่กับ mitotic activity ภายในเซลล์เองและ mechanical condition ของเซลล์ประกอบด้วย Mechanical condition ของเซลล์เป็นตัว modify nature ของไมโตซิส Bajer & Molé-Bajer (1956) จึงสันนิษฐานว่า distur-

bance และ modification ของไมโตซิสจะควบคุมโดยกลไกเหมือนๆกันซึ่งแฟคเตอร์หนึ่งจะข่มอันอื่นๆต่อไป ปรากฏการณ์ของ mitotic activity ภายในเซลล์อาจจะขึ้นอยู่กับจำนวนโครโมโซมอีกด้วย เนื่องจาก endosperm มีโครโมโซมเป็นจำนวนมากจึงเกิดการแบ่งที่ผิดปกติได้โดยง่าย และจากการสังเกตขนาดของนิวเคลียสและจำนวนนิวคลีโอลัสที่แตกต่างกันทำให้คิดว่าเป็น polyploid ได้

การศึกษาไมโตซิสครั้งนี้ไม่สามารถจะวิเคราะห์ผลบางประการได้ เช่น Brownian movement, cytoplasmic movement การเคลื่อนที่ของโครโมโซม อัตราความเร็วในการเคลื่อนที่ของโครโมโซมอาจหาได้เล็กน้อยเป็นค่าเฉลี่ยของบางโครโมโซม แต่เนื่องจากมีโครโมโซมเป็นจำนวนมาก ระยะทางที่โครโมโซมเคลื่อนที่ไปอาจไม่เป็นเส้นตรง การวัดจาก micrpgraph จึงอาจผิดพลาดได้โดยง่าย การศึกษาของ Bajer & Molé-Bajer (1956) โดยการฉายเป็นภาพยนต์ด้วยความเร็วต่ำไปบนจอแล้วลากเส้นตามการเคลื่อนที่ของโครโมโซม Brownian movement ของ particle จึงเป็นผลลัพธ์ที่ถูกต้อง การศึกษาจาก micrograph จึงเป็นการศึกษาปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นของการเปลี่ยนแปลงของสิ่งต่างๆโดยประมาณ ถ้าปรากฏการณ์นั้นกินระยะเวลานาน เช่นการเคลื่อนที่ของโครโมโซมไปยังขั้ว การเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส ก็จะให้ผลที่ถูกต้อง สิ่งที่ดีคือสามารถจะเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงต่างๆที่เกิดขึ้นในระยะเวลาต่างๆได้โดยง่าย และติดตามการเปลี่ยนแปลงได้โดยถูกต้อง

ความลึกลับของวิธีการในการแบ่งนิวเคลียสของเซลล์ยังมีอีกมากที่ไม่สามารถจะอธิบายได้แน่ชัด เช่น แรงกระทำในระยะ contraction stage การเคลื่อนที่ของโครโมโซมไปยังขั้วในระยะ metakinesis ตัวการในการที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ชนิดนี้ การเกิดและหน้าที่ของ spindle มีขอบเขตอย่างไร ความสำคัญของนิวคลีโอลัส การแยกของ kinetochore การเคลื่อนไหวของ kinetochore ในระยะ metakinesis-metaphase และแรงกระทำต่างๆที่เกิดขึ้นในระยะนี้ ขั้วของเซลล์ที่บังคับทิศทางการเคลื่อนที่ของโครโมโซม สิ่งต่างๆเหล่านี้เป็นต้น ซึ่งต้องอาศัยการวิจัยที่ต้องการเครื่องมือชนิดพิเศษ เช่น poralizing microscope, interference microscope อุปกรณ์และฟิล์มในการถ่ายภาพยนต์ที่ได้ผลละเอียดชัดเจน และการศึกษาทางด้านชีวเคมีประกอบ

ด้วย ทั้งนี้จะต้องสามารถเลี้ยงเซลล์ให้มีการเจริญในสภาพปกติได้จึงสามารถจะศึกษากลไก และปรากฏการณ์ต่างๆที่เกิดขึ้นได้โดยถูกต้อง

การศึกษาจาก Zephyranthes ด้วยวิธีนี้ก็สามารถจะเห็นปรากฏการณ์ต่างๆที่เกิดขึ้นได้ละเอียดดี และเนื่องจากมีความผิดปกติเกิดขึ้นมากจึงสามารถทำให้เข้าใจถึงสภาพการและสิ่งแวดล้อมของเซลล์ในการแบ่งไมโตซิสที่ปกติได้ดี และเห็นได้ชัดว่าไมโตซิสนี้อาจควบคุมได้ทั้ง internal และ external mechanism ถ้าสามารถเก็บตัวอย่างของไมโตซิสที่ปกติและผิดปกติได้มากกว่านี้ก็จะสามารถทำให้เข้าใจไมโตซิสในสภาพธรรมชาติได้ดียิ่งขึ้น