จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

การชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในบัวบกโดยใช้สารโคลซีซีน

โดย

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

จฬ
วท 15
010932

กุมภาพันธ์ ๒๕๔๔

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในบัวบกโดยใช้สารโคลชีซีน

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

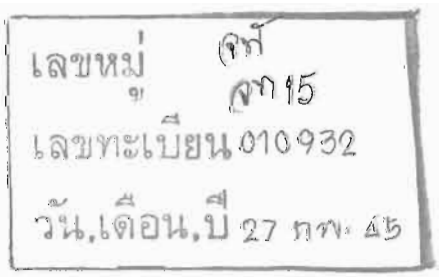
กุมภาพันธุ์ 2544

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีการเงิน 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ชื่อโครงการวิจัย การชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในบัวบกโดยใช้สารโคลชีซีน

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กุมภาพันธุ์ 2544

บทคัดย่อ

ได้ทำการชักนำต้นบัวบกชนิดดิพลอยด์ให้เป็นต้นพอลีพลอยด์โดยใช้โคลชีซิน และทำการทดลองชักนำ 2 วิธี คือหนึ่งใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซิน 1-2 % วางลงบนต้นอ่อน วิธีที่สองโดยผสมโคลชิซิน 1-2 % กับวุ้นแล้ววางลงบนปลายยอดของต้นอ่อน พบว่าการใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซิน 2 % วางบนต้นอ่อน สามารถชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ดีที่สุด ในขณะที่การใช้วุ้นผสมโคลชิซินไม่ว่าจะเป็น 1 หรือ 2 % ให้ผลการชักนำไม่ต่างกัน ต้นพอลีพลอยด์ที่เกิดขึ้นแสดงลักษณะแตกต่างจากต้นดิพลอยด์ จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมและจำนวนโครโมโซมในเซลล์ของต้นพอลีพลอยด์สูงกว่าต้นดิพลอยด์

คำสำคัญ : พอลีพลอยด์ บัวบก โคลชิซิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title Polyploid Induction in *Centella asiatica* (L.) Urban by Colchicine Treatment

Name of Investigators Associate Professor Dr. Warawut Chulalaksananukul

Year 2001

ABSTRACT

The diploids, *Centela asiatica L.Urban*, were induced to be polyploid by colchicine. The induction was performed by 2 methods. Firstly, the cotton wool was immersed in 1 to 2 % colchicine solution and was placed on the seedlings. The second method was conducted by mixing 1-2% colchicine with the agar and placed on the shoot tips of the seedlings. The results showed that the 2% colchicine solution could give the highest induction but mixing 1 and 2 % colchicine with the agar showed no difference. The phenotypes obtained from polyploidy plants were different from the diploids. The number of chloroplasts in the guard cells and chromosome number in the polyploids were higher than in the diploids.

Keyword : Polyploid, *Centela asiatica*, colchicine

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
รายการตารางประกอบ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
วัสดุอุปกรณ์	8
วิธีการทดลอง	9
ผลการทดลองและอภิปรายผล	10
เอกสารอ้างอิง	16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	วิธีการทดลองความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดพอลีพลอยด์	11
2	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆระหว่างต้นดิพลอยด์และพอลีพลอยด์	11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	เปรียบเทียบความยาวของก้านใบ	13
2	เปรียบเทียบใบและต้นของบัวบก	13
3	เปรียบเทียบจำนวนคลอโรพลาสต์ของบัวบก	14
4	เปรียบเทียบเซลล์ปากใบ ของบัวบก	14
5	เปรียบเทียบลักษณะโครโมโซมระยะเมทาเฟส	15
6	เปรียบเทียบลักษณะโครโมโซมระยะแอนาเฟส	15
7	เปรียบเทียบลักษณะโครโมโซมระยะโปรเฟส	15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

บัวบก (*Centella asiatica*, L.Urban) เป็นไม้เลื้อยล้มลุกจัดอยู่ในจำพวกผัก ใบมีลักษณะเดี่ยวรูปร่างคล้ายไต ขอบใบหยักเล็กน้อย ซึ่งจัดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ในการลดความดันเลือด ลดไข้ ลดการอักเสบ ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ฆ่าเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหารและกระตุ้นร่างกายให้สามารถสร้างภูมิต้านทานโรค น้ำบัวบกเป็นน้ำผักชนิดหนึ่งที่เกิดจากการสกัด หรือการบีบคั้นออกจากบัวบกไม่มีความเป็นกรด น้ำผักประเภทนี้สามารถเกิดการเปลี่ยนที่ไม่ต้องการทั้งในด้านรสชาติและลักษณะที่ปรากฏ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อนเพื่อลดกิจกรรมของเอนไซม์ และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจก่อให้เกิดการเสื่อมเสียแก่น้ำบัวบกได้ สีที่พบในบัวบกส่วนใหญ่เกิดจากรงควัตถุ จำพวกคลอโรฟิลล์ ซึ่งเป็นสารที่ไวต่อแสง ความร้อน ออกซิเจน และกรด ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของคลอโรฟิลล์จึงเกิดได้ง่ายทำให้สีของน้ำบัวบกเกิดจากการเปลี่ยนจากสีเขียวของคลอโรฟิลล์ไปเป็นสีเขียวมะกอกเมื่อผ่านการแปรรูปด้วยความร้อน บัวบกนับเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีคุณประโยชน์มากมายต่อมนุษย์ ปัจจุบันมีการปลูกบัวบกเพื่อคั้นน้ำบรรจุกระป๋องขายทั่วไป และนำไปใช้ประโยชน์ทางยามากมาย (Turner, N.J. and Szczawinski, A.F., 1991).

พืชส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติมักมีจำนวนโครโมโซมสองชุด คือ ต้นดิพลอยด์ หากมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมขึ้นอาจมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะต่างๆ โดยเฉพาะพอลีพลอยด์ซึ่งทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น ทำให้ขนาดเซลล์โตขึ้น แต่ขนาดของพืชทั้งต้นหรือส่วนหนึ่งส่วนใดอาจจะโตขึ้นหรือไม่ก็ได้ ขนาดของดอกและเมล็ดใหญ่กว่าปกติ ใบหนาและสีเขียวเข้มขึ้น มีปริมาณสารเคมีสะสมในส่วนต่างๆมากขึ้น (Nebel, B.A. and Ruttle, M.L.,1983)

เนื่องจากพอลีพลอยด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีน้อยมาก มนุษย์จึงหาวิธีชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในพืช คาดว่าการสร้างต้นบัวบกที่เป็นพอลีพลอยด์อาจทำให้สามารถสกัดสารจากบัวบกได้เป็นปริมาณที่มากขึ้น โดยใช้พื้นที่เท่าเดิม จะเป็นการลดค่าใช้จ่ายต่างๆ อย่างมากมาย เช่น ค่าแรงงาน ค่าดูแลรักษา สารเคมีกำจัดแมลงและปุ๋ยเพื่อการเจริญเติบโตของต้นพืช งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อชักนำให้ต้นบัวบกดิพลอยด์ ซึ่งปลูกกันโดยทั่วไปให้กลายเป็นต้นพอลีพลอยด์ โดยใช้สารโคลชีซิน เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์ไปศึกษาและขยายต่อไป

การทำให้เกิดพอลีพลอยด์ ในพืชนับว่าเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชวิธีหนึ่งที่ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด วิธีการกระตุ้นให้พืชเป็นพอลีพลอยด์โดยส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมีคือ โคลชีซินชักนำกันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เพราะใช้ได้ผลดี หาซื้อง่าย และไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติมักมีจำนวนโครโมโซมสองชุด คือ เป็นดิพลอยด์ (diploid) หากมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมขึ้นอาจจะมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะต่างๆ โดยเฉพาะพวกพอลีพลอยด์ (polyploid) ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นมักมีขนาดเซลล์โตขึ้น แต่ขนาดพืชทั้งต้นหรือส่วนใดส่วนหนึ่งอาจจะโตขึ้นหรือไม่ก็ได้ ขนาดดอกและเมล็ดใหญ่กว่าปกติ ใบหนาและสีเขียวเข้มขึ้น ลักษณะทางเศรษฐกิจหรือการเกษตรดีขึ้น มีปริมาณสารเคมีสะสมในส่วนต่างๆ มากขึ้น เช่น ข้าวไรย์ที่เป็นเททราพลอยด์ (tetraploid) มีขนาดเมล็ดใหญ่และคุณภาพดี (Allard, 1960) กล้วยไม้ที่เป็นพอลีพลอยด์ มักมีกลีบดอกหนาทำให้มีความทนทานไม่เหี่ยวง่าย (กัญญา ไชยเจริญ, 2516) แพงพวยฝรั่งที่เป็นเททราพลอยด์มีใบกว้างและหนาขึ้น เซลล์คุมมีขนาดใหญ่ขึ้น กลีบดอกใหญ่และชิดกันมากขึ้น และมีสารอัลคาลอยด์สะสมในรากมากกว่าต้นดิพลอยด์สองเท่า (ชบา อ่ำรำไพ, 2527) แตงโมที่เป็นพอลีพลอยด์มีปริมาณน้ำตาลสูงกว่าดิพลอยด์และติดเมล็ดน้อยลง (ดำรงค์ สินไชย, 2521) เป็นต้น

พืชที่เป็นพอลีพลอยด์อาจเป็นพวกแอนิวพลอยด์ (aneuploid) คือ มีโครโมโซมเพิ่มมาบางแท่งจากชุดเดิมหรืออาจเป็นพวกยูพลอยด์ (euploid) โครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นชุดซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น autopolyploid และ allopolyploid (Swanson, 1967) เมื่อดูลักษณะภายนอก (morphology) จะไม่สามารถแยกพอลีพลอยด์ทั้งสองชนิดออกจากกันได้ ต้องศึกษาลักษณะการจับคู่ของโครโมโซมที่เหมือนกัน (homologous chromosome) ถ้าเป็น autopolyploid ในระดับ triploid (AAA) จะพบ trivalent จำนวนมาก Riley (1967) ได้สรุปไว้ว่า *Tradescantia bracteata* ที่เป็น triploid จะพบ trivalent 90 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือเป็น bivalent และ univalent ส่วนพวก autotetraploid (AAAA) จะพบ quadrivalent มากกว่า trivalent bivalent และ univalent ส่วนพวก allopolyploid ซึ่งมีชุดของโครโมโซมไม่เหมือนกัน เนื่องมาจากเกิดจากพ่อแม่ที่มีชุดของโครโมโซมต่างกัน แบ่งเป็นสองชนิด คือ amphidiploid มีชุดโครโมโซมเป็น AABB จึงพบ bivalent ทั้งหมด โดย genome A จับกับ genome A และ genome B จับกับ genome B พืชที่เป็น amphidiploid ได้แก่ *Triticale* (2n=56) และ segmental allopolyploid เกิดจากการผสมพ่อแม่ที่มี genome ใกล้เคียงกันได้เป็น diploid hybrid (A_1A_2) แล้วเกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น $A_1A_1A_2A_2$ จึงเกิดมีการจับคู่ของโครโมโซมที่เหมือนกันใน genome เดียวกัน หรือระหว่างโครโมโซมที่คล้ายกันใน genome ที่ใกล้เคียงกัน คือ genome A_1 จับกับ A_1 genome A_2 จับกับ genome A_2 หรือ genome A_1 จับกับ genome A_2 ก็ได้ จึงอาจพบ multivalent แบบ quadrivalent และ trivalent ได้ ตัวอย่างพืชที่เป็น segmental allopolyploid ได้แก่ *Nicotiana tabacum* (2n=48) ส่วน allopolyploid อีกชนิดหนึ่งคือ autoallopolyploid เป็น allpolyploid ที่มีลักษณะ autopolyploid ด้วย เช่น allohexaploid (AAAABB) มีสี่ genome ที่เหมือนกัน (AAAA) และอีกสอง genome (BB) จะมีการจับคู่ของโครโมโซมระหว่าง genome เดียวกันเท่า

นั้น จะไม่พบการจับคู่กับต่าง genome ถ้าหากมี genome เป็น $A_1A_1A_2A_2BB$ ก็อาจมีการจับคู่ของโครโมโซมระหว่าง genome A_1 กับ A_2 ได้ (Swanson, 1967)

การเกิดพอลีพลอยด์ในธรรมชาติอาจเกิดจากการผสมระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียที่ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซม อันเป็นผลมาจากความผิดปกติของการแบ่งไมโทซีสของ embryo หรือ somatic cell ทำให้โครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเซลล์นี้เกิดเป็นกิ่งใหม่จะเกิดเป็นกิ่ง tetraploid ทำให้ได้พืชที่มีโครโมโซม 2 แบบ บนต้นเดียวกัน เรียกว่า Chimera

เนื่องจากพอลีพลอยด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีน้อยมาก มนุษย์จึงหาวิธีชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ มีขนาดลำต้น ใบ ดอกใหญ่ขึ้น แต่ไม่ค่อยติดเมล็ด จึงนำพอลีพลอยด์มาใช้ประโยชน์ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะพืชที่เป็นพอลีพลอยด์เมื่อใช้ผสมกับต้นอื่น ทำให้เกิดพันธุ์ใหม่ได้โดยเฉพาะถ้าต้นเดิมเป็น diploid (AB) ที่เป็นหมัน เนื่องจากโครโมโซมที่เหมือนกันขาดคู่ทำให้ไมโอซีสผิดปกติ และเมื่อชักนำให้เกิด tetraploid (AABB) จะสามารถเจริญพันธุ์ได้ดี เนื่องจากโครโมโซมที่เหมือนกันสามารถจับคู่กันได้ตามปกติ

อวัยวะของพืชที่นิยมนำมาใช้ชักนำให้เกิดเป็นพอลีพลอยด์ ได้แก่ เมล็ด ดอก ต้นอ่อน กิ่งตาข้าง วิธีที่นำมาใช้ชักนำให้พืชเป็นพอลีพลอยด์ ได้แก่

1. การเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การขยายพันธุ์พืชโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต้นใหม่ที่ได้ควรมี genotype เหมือนต้นเดิมทุกประการ เพราะการขยายพันธุ์แบบนี้เป็นผลของการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซีส แต่อาจสามารถเกิดการกลายพันธุ์ได้จากการสังเกตที่พบในการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในหลอดทดลอง ซึ่งเรียกว่า somaclonal variation แต่มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมาก บางครั้งพบว่ามีการเพิ่มจำนวนโครโมโซม ทำให้ต้นใหม่มีลักษณะต่างไปจากเดิมได้ เพราะการเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองมีสภาพแวดล้อมต่างไปจากธรรมชาติ อาจทำให้การแบ่งนิวเคลียสผิดปกติ นอกจากนี้ยังมีการเติมสารเคมีบางอย่างลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อมีโอกาสกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมมากขึ้น Murashige and Nakano (กัญญา ไชยเจริญ, 2516) เลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Nicotiana tabacum* ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ diploid และ tetraploid หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ 1 ปี พบเซลล์ tetraploid และ octaploid ประมาณครึ่งหนึ่งของเซลล์ทั้งหมด อีกครึ่งหนึ่งเป็น aneuploid เมื่อเลี้ยงต่ออีก 6 ปี พบว่ามีเซลล์ aneuploid ที่เป็น hypertetraploid

2. การผสมพันธุ์

ต้นพืช triploid อาจได้จากผสมระหว่างต้น diploid กับต้น tetraploid Riley (1967) รายงานว่าเมื่อผสม *Papaver somniferum* (2n=3x=33) Clausen and Goodspeed (Lewis, 1980) สร้าง *Nicotiana* ที่เป็น amphidiploid โดยผสม tetraploid *N. tabacum* 2n=48 กับ diploid *N. glutinosa* L.

2n=24 ได้ลูกผสม 2 ชนิด ชนิดหนึ่งเป็นหมัน (sterile) อีกชนิดสามารถเจริญพันธุ์ได้ (fertile) เมื่อศึกษาโครโมโซมใน F_2 ของต้นที่เจริญพันธุ์ได้พบว่า amphidiploid (2n=72)

3. การใช้อุณหภูมิ

มีการทดลองในพืชหลายชนิด โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ คือใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นหรือต่ำลง พบว่าสามารถชักนำให้เกิด พอลีพลอยด์ ได้เช่นนำต้น *Tradescartia paludosa* ไปไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน พบว่า spindle fiber ไม่ดึงแต่ละโครโมโซมไปยังขั้วของเซลล์ จึงเกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 2 เท่า Randolph (กัญญา ไชยเจริญ, 2516) ใช้อุณหภูมิราว 38-46 องสาเซลเซียส ชักนำ zygote ระยะ first division ให้เกิดเป็น tetraploid ได้ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ พืชที่ได้รับอุณหภูมิสูงสลับกับอุณหภูมิต่ำ โครโมโซมมีความผิดปกติมากกว่าพืชที่ได้รับอุณหภูมิสูง หรืออุณหภูมิต่ำตลอดเวลา (Riley, 1967)

4. การใช้รังสี

รังสีมีผลทำให้เกิดการหายหรือเพิ่มของโครโมโซมบางแท่ง มีผลทำให้เกิด aneuploid (ชบา อ่ำรำไพ, 2527) Raghuvanshi และ Singh (1978) นำเมล็ด *Phaseolus aureus* Roxb. ไปอาบรังสีแกมม่าที่ได้จากโคบอลต์ 60 แล้วแช่ในสารละลายโคลชิซีน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบ trisomic เกิดขึ้น รังสีนอกจากทำให้โครงสร้างของโครโมโซมเปลี่ยนไป (chromosome aberration) แล้วยังทำให้การเคลื่อนที่ของโครโมโซมช้าลง (chromosome lagging) หรือทำลาย spindle fiber นันทนา ลิ่มสกุล (2524) ฉายรังสีแกมม่าที่ได้จากโคบอลต์ 60 แก่หน่อและต้นกล้าพุทธรักษาพบว่าโครโมโซมเคลื่อนที่ช้า และเกิด chromosome bridge และ fragment แต่ยังไม่มีการรายงานว่ารังสีสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมได้

5. การใช้สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในพืช ได้แก่ Ethylmethane Sulfonate (EMS), benzeneparadichlorobenzene, alphabromonapthalene, nitrogendioxide (NO_2) ยาฆ่าแมลงบางชนิด เช่น lindane สาร alkaloid ที่สกัดได้จากพริกคือ สาร capsaicin แต่สารที่นิยมใช้ชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ ในพืชคือ ($C_{12}H_{25}O_6N$) ซึ่งเป็น alkaloid ที่สกัดได้จาก *Colchicum autumnale* ซึ่งจะยับยั้งไม่ให้เกิด spindle fiber Riley (1967) ทดลองแช่ *Allium cepa* ในสารละลายโคลชิซีน พบว่าปลายรากแบ่งตัวผิดปกติ และไม่พบ spindle fiber จึงไม่มีการเคลื่อนที่ของโครโมโซมในระยะ anaphase ทำให้ดูเหมือนว่าในหนึ่งเซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มเป็น 2 เท่า ซึ่งถ้าได้รับสารโคลชิซีนนานพออาจสามารถทำให้โครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าจากเดิมไปอีก แต่ถ้าการยับยั้ง spindle fiber ไม่สมบูรณ์ โครโมโซมบางแห่งอาจมีการเคลื่อนที่ไปยังขั้วของเซลล์ จะได้เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไม่เท่ากันเป็นแบบ aneuploid Sybenga (1972) พบว่าเมื่อใช้สารละลายโคลชิซีนความเข้มข้นต่ำ (0.05 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลานานที่อุณหภูมิห้อง จะช่วยเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ดีกว่าการใช้ความเข้มข้นสูง แต่ใช้เวลาสั้น

บัวบกมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Centella asiatica* (Linn.) Urban (2n=18) จัดอยู่ในวงศ์ Umbelliferae เป็นพืชล้มลุกขนาดเล็ก ลำต้นเลื้อยไปตามดินก้านยาว ปลายใบกลม ขอบหยิก ออกรากที่ข้อลำต้น ชอบขึ้นตามพื้นดินที่เปียกชื้น พบทั่วไปในทวีปอเมริกา อัฟริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย เช่น ประเทศไทย อินเดีย อินโดนีเซีย เป็นต้น (สมใจ ชัยเจริญกิจ และคณะ, 2530) ส่วนของต้นพืชทั้งต้น มีสรรพคุณในการบำรุงร่างกาย รักษาโรคผิวหนังหลายชนิด เช่น แผลเรื้อรัง และแผลโรคเรื้อน แผลอักเสบจากความร้อนไหม้ บาดแผลจากการผ่าตัด ขับปัสสาวะ บำรุงหัวใจ แก้บิด และแก้ท้องอืด (Norman *et al*, 1992) น้ำสกัดจากบัวบกใช้ทารักษาโรคเท้าช้าง รอยฟกช้ำ และการอักเสบ (สมใจ ชัยเจริญกิจ และ คณะ, 2530) เมล็ดตากแห้งบดเป็นผงใช้แก้บิด แก้ไข้ และแก้ปวดศีรษะ

บัวบกมีสาร vallerin ที่มีรสขม และสารผสมที่เป็น triterpenoid glycoside ที่พบมากที่สุด คือ asiaticoside ($C_{48}H_{78}O_{19}$) ซึ่งพบได้ทุกส่วนของบัวบก และพบมากในใบ เมื่อ hydrolysis ให้ asiatic acid, gulcose, rhamnose, madasiatic acid, madecassic acid, madescassoside และursenoic acid (Tong, 1972).

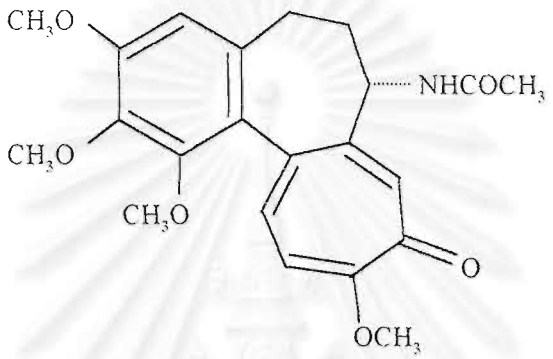
นอกจากนี้ยังมี alkaloid น้ำมันหอมระเหย น้ำตาล วิตามิน และ pectin ในปริมาณเล็กน้อย สาร asiaticoside มีฤทธิ์ละลายส่วนที่เป็นไขปกคลุมจุลินทรีย์ Bacillus ที่เป็นสาเหตุของโรคเรื้อน และวัณโรคผิวหนัง จึงมีคุณสมบัติต่อต้านแบคทีเรีย antibacterial activity ใช้บำบัดแผลเนื่องจาก lupus erythematosus และ herpes simplex โดยปรับสภาพให้ผิวหนังเพิ่มความหนาโดยเร็ว และเพิ่มการไหลเวียนของเลือด ไปเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อประสาน กระตุ้นการเจริญเติบโตของผม และเลี่ยบด้วย (ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิตย์, 2530) บัวบกที่สกัดด้วย 95 % ethanol สามารถยับยั้งเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* และ *T. rubrum* (Norman, 1992) บัวบกยังมีสรรพคุณทางเภสัชวิทยาอีกหลายอย่าง จึงมีการสกัดสาร asiaticoside และ glycoside ตัวอื่นๆ ผลิตเป็นยารูปแบบต่างๆ เช่น แป้ง ครีม ขี้ผึ้ง เม็ด หรือใช้ใบบดพอกบาดแผล เป็นต้น นอกจากใช้เป็นสมุนไพรแล้ว ใบบัวบกยังใช้รับประทานเป็นผักสด ใบบัวบกมีสารวิตามินบีมาก รากมีกรดอะมิโนชนิดไม่จำเป็นต่อร่างกาย (nonessential amino acid) หลายตัว และใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางที่ใช้ในประเทศอินเดีย

ขณะนี้ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus) ใบบัวบก แต่มีรายงานในพืชวงศ์เดียวกันคือ Carrot (*Daucus carota*) ซึ่งมีการศึกษากันมาก พบว่าอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติมฮอร์โมน 2,4 Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) 1 mg/l สามารถกระตุ้นให้

เกิดแคลลัสได้ (Hall, 1992) การทดลองนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับแนวทางในการชักนำให้เกิดแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซีน

คุณสมบัติและบทบาทของสารโคลชิซีน

โคลชิซีนเป็นสารประกอบอัลคาลอยด์ (alkaloid) สกัดได้จากเมล็ดและหัวของพืชพาก *Colchicum autumnale* เป็นสารที่มีพิษต่อร่างกาย โดยปกติจะรู้จักกันในฐานะยาที่ใช้รักษาโรคเก๊าต์ (gout) สารโคลชิซีนมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังนี้



การใช้สารโคลชิซีนกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม ที่เรียกว่าออโตพอลีพลอยด์นั้น ในบางครั้งจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของพืชมากพอที่จะทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากสารโคลชิซีนจะมีผลไปยับยั้งกลไกของ spindle fiber ทำให้โครโมโซมไม่มีการแยกตัวออกเป็น 2 ชุด ดังนั้นหลังขบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซีส จะพบว่าในนิวเคลียส มีโครโมโซมเป็น 2 เท่าของเซลล์เดิม และหากยังใช้สารโคลชิซีนต่อไป การเพิ่มปริมาณโครโมโซมที่จะเกิดขึ้นซ้ำกันหลายครั้งจนทำให้จำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มมากขึ้นๆ แต่ทั้งนี้ในพืชแต่ละชนิดย่อมมีขีดจำกัดของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้สารโคลชิซีน หากความเข้มข้นมากหรือระยะเวลานานเกินไปก็จะทำให้พืชตายได้ และนอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์เนื้อเยื่อเจริญที่ถูกเหนี่ยวนำอาจไม่เกิดพอลีพลอยด์หมดทุกเซลล์ การเปลี่ยนแปลงอาจเกิดขึ้นบางส่วน หรืออาจเกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมในระยะต่างๆ กัน

วิธีการใช้สารโคลชิซีนกับพืช ทำได้หลายวิธีแต่ละวิธีอาจเหมาะสมกับแต่ละชนิดหรือแต่ละส่วนของพืช ดังได้กล่าวแล้วว่าสารโคลชิซีนจะมีผลต่อการแยกตัวของโครโมโซมในขณะมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นจึงใช้กับเซลล์บริเวณที่กำลังมีการแบ่งตัว เช่น เมล็ดที่กำลังงอก ยอด และ ตา

การใช้สารโคลชิซีนกับเมล็ด กระทำได้โดยการแช่เมล็ดลงในสารละลายโคลชิซีนก่อนที่จะนำไปปลูก ด้วยวิธีการนี้จะพบว่าเมล็ดงอกช้า และเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง ในพืชบางชนิดอาจพบว่าวิธีนี้ไม่ได้ผล

การใช้สารโคลชิซีนกับต้นอ่อน วิธีนี้มักให้ผลดีกว่าวิธีแรกเนื่องจากรากไม่ถูกทำลายด้วยสารโคลชิซีน วิธีการให้สารกับยอดของต้นอ่อนอาจทำได้หลายวิธี เช่น จุ่มยอดของต้นพืชลงในสารละลายโคลชิซีนโดยตรง หยดสารละลายโคลชิซีนลงบนยอดอ่อนหลายๆ ครั้ง ใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซีนวางบนยอดอ่อน ผสมสารโคลชิซีนกับวุ้นหรือลาโนลิน (lanolin) แล้วนำไปวางไว้บนยอดอ่อน ฉีดสารละลายโคลชิซีนเข้าไปในต้นพืชด้วยเข็มฉีดยา หรืออาจใช้วิธีพ่นสารละลายลงไปบนยอดอ่อน

ลักษณะพืชที่เป็นพอลีพลอยด์

โดยทั่วไปพืชที่เป็นพอลีพลอยด์จะมีการเจริญเติบโตช้า และการแก่ของผลช้ากว่าปกติ นอกจากนี้ส่วนที่ถูกสารโคลชิซีนส่วนแรกที่เจริญจะบิดเบี้ยว ซึ่งเป็นผลจากอัตราการเจริญของเซลล์ไม่เท่ากัน เมื่อเจริญต่อไปจะพบว่าลำต้นจะแข็งแรง ใบกว้างและหนาสีเขียวเข้ม ดอก ผล และเมล็ดใหญ่ ละอองเกสรเรณู และปากใบ (stomata) ใหญ่ขึ้น จำนวนโครโมโซมต่อเซลล์เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนประกอบทางเคมีของพืชที่เป็นเททราพลอยด์ (tetraploid) จะสูงกว่าพืชพวกดิพลอยด์ ตัวอย่างเช่น ปริมาณน้ำตาลในหัวผักกาด อโทรปีน (atropine) และอัลคาลอยด์อื่นๆ ในใบของลำโพง (*Datura sp.*) นิโคตินในใบยาสูบ วิตามินซี (ascorbic acid) ในผักกะหล่ำ และมะเขือเทศ เป็นต้น จากรายงานมีผู้ทดลองใช้สารโคลชิซีนกับพืชชนิดต่างๆ ด้วยความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กันดังนี้

ชนิดพืช	ชิ้นส่วนพืช	ความเข้มข้นของโคลชีซีนและระยะเวลา	เอกสารอ้างอิง
Dendrobium	แคลลัส โปรโทคอร์ม ต้นอ่อน	0.05, 0.2 %	1
Cosmos (*Cosmos bipinatus* Cov.)	ยอดต้นอ่อน	0.2 %	15
Legume (*Cyamopsis psoraloides* DC.)	ยอดต้นอ่อน	0.25 % 6 ชม. 1 วัน, 6 ชม. 2 วัน และ 3 ชม. 3 วัน 0.5 % 3 ชม. 3 วัน	7
Legume (*Phaseolus aureus* Roxb.)	ยอดต้นอ่อน	1 % 4 ชม.	12
Legume (*Phaseolus vulgaris* L.)	ยอดต้นอ่อน	0.25 % 6 ชม. 1 วัน, 6 ชม. 2 วัน	8
Lilium (*Lilium formosanum*)	ยอดต้นอ่อน	0.5 % 6 ชม. 1 วัน	10
Marigold	ยอดต้นอ่อน เมล็ด	0.1, 0.6, 0.4 และ 0.2 % 2 ชม 0.02-0.16 % เวลา 1-14 ชม.	14

ชนิดพืช	ชิ้นส่วนพืช	ความเข้มข้นของโคลชีซีน และระยะเวลา	เอกสารอ้างอิง
Nicotiana sps.	ยอดต้นอ่อน	0.2 % 7 ชม และ 10 วัน 0.4 % เวลา 10 วัน	18
Petunia	ยอดต้นอ่อน	1 % ในลาโนลิน	14
Pinks	ยอดต้นอ่อน	0.4 % เวลา 7 ชม.	14
Watermelon (*Citrullus vulgaris*, Schrad)	ยอดต้นอ่อน	0.2 % จำนวน 6, 8 และ 10 ครั้ง ครั้งละ 1 หยด เช้า-เย็น	4

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์การทดลอง

1. กระถางปลูกต้นไม้
2. ปุ๋ยวิทยาศาสตร์สูตร NPK 25:7:7
3. กล้องจุลทรรศน์และอุปกรณ์การถ่ายรูป
4. สำลี
5. วุ้นชนิดผง
6. สไลด์และกระจกปิด
7. จานเพาะเชื้อ
8. กรรไกร
9. ปากคีบ
10. บีกเกอร์
11. อ่างควบคุมอุณหภูมิ

สารเคมี

1. สารโคลชีซีน
2. กรดไฮโดรคลอริก
3. กรดอะซีติก
4. เอธิลอัลกอฮอล์
5. สีย้อม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. tween 20
7. 1 % AgCl
8. alphabromonapthalene
9. Schiff's reagent
10. propionocarmine

พืชทดลอง บัวบกพื้นเมือง คือ *Centella asiatica* (Linn.) Urban

วิธีการทดลอง

1. เตรียมต้นพืช

ตัดไหล (stolon) ของบัวบกที่ใช้เป็นต้นพันธุ์ นำไปชำลงในภาชนะ เมื่อมีการงอกของต้นอ่อนแบ่งบัวบกออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ต้นแล้วทำการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมปล่อยให้มีการเจริญตามธรรมชาติ

กลุ่มที่ 2 หยดด้วยสารโคลชิซิน 1 เปอร์เซนต์ผสมวุ้นลงบนยอดอ่อนครอบภาชนะดินเผาเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำซ้ำเป็นเวลา 6 วัน

กลุ่มที่ 3 หยดด้วยสารโคลชิซิน 2 เปอร์เซนต์ผสมวุ้นลงบนยอดอ่อนครอบภาชนะดินเผาเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำซ้ำเป็นเวลา 6 วัน

กลุ่มที่ 4 ใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซิน 1 เปอร์เซ็นต์วางบนยอดอ่อนครอบด้วยภาชนะดินเผาเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำซ้ำเป็นเวลา 6 วัน

กลุ่มที่ 5 ใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซิน 2 เปอร์เซ็นต์วางบนยอดอ่อนครอบด้วยภาชนะดินเผาเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำซ้ำเป็นเวลา 6 วัน

2. การศึกษาเซลล์ปากใบ

นำยอดอ่อนที่เกิดขึ้นภายหลังการชักนำด้วยสารโคลชีซิน นำมาศึกษาลักษณะของ stomata โดยศึกษาจาก epidermal cell ที่ได้จาก epidermis ชั้นล่าง นำตัวอย่างใส่เข้าไปในหยด tween 20 (0.2 %) วางบนสไลด์ ศึกษาขนาดและความหนาแน่นของ stomatal guard cell เพื่อยืนยันถึงต้นพอลีพลอยด์

3. การศึกษาจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบ

นับจำนวนคลอโรพลาสต์ที่อยู่ใน guard cell โดยหยดสาร 1 % AgCl ลงบนสไลด์พร้อมตัวอย่างของผิวใบที่ลอกมาได้ นับจำนวนของคลอโรพลาสต์เปรียบเทียบกัน

4. การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของบัวบก

ตัดปลายรากยาวประมาณ 1 ซม. นำลงในขวด ที่มีสารละลายอิ่มตัวของ alpha-bromonaphthalene นำไปแช่ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 23-25 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่ใน กรดอะซีติก 90 % ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำรากมาล้างด้วยเอทานอล 70% แล้วนำรากที่ล้างจนปราศจากแอลกอฮอล์มาใส่ใน 1 N HCl มาล้างด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วนำไปใส่ใน Schiff's reagent ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที นำรากส่วนที่ติดสีแดงเข้มวางลงบนสไลด์ หยดสี propionocarmine 1-2 หยด ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ ใช้ปลายดินสอที่มียางลบเคาะเบาๆ เพื่อทำให้เซลล์กระจายตัว นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. การชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์

ตารางที่ 1 วิธีการทดลองความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดพอลีพลอยด์

วิธีการ	ความเข้มข้นโคลชีซิน (%)	ระยะเวลาที่ให้สาร (วัน)	จำนวนพืชทดลอง (ต้น)	จำนวนพืชที่รอด (ต้น)	จำนวนที่เป็นพอลีพลอยด์ (ต้น)
- ผสมวุ้นหยด	1	6	20	12	4
	2	6	20	10	4
- สำลีชุบสาร	1	6	20	12	4
	2	6	20	16	12

จากการใช้สารโคลชีซีนชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในบัวบกโดยวิธีต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นวิธีชุบสำลีวางบนยอดอ่อนหรือผสมวุ้นหยดประมาณ 3 - 4 ครั้งที่ยอดของต้นอ่อนสามารถชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในใบบัวบกได้ แต่พบว่าการใช้สารละลายโคลชีซินที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์ โดยใช้สำลีชุบสารละลายโคลชีซิน วางบนยอดอ่อนครอบด้วยอลูมินั่มฟอยด์สามารถชักนำให้เกิดต้นพอลีพลอยด์ดีที่สุด

2. เปรียบเทียบรูปร่างสัณฐานระหว่างต้นดิพลอยด์และพอลีพลอยด์

จากการเปรียบเทียบลักษณะระหว่างต้นที่เป็นดิพลอยด์และต้นที่เป็นพอลีพลอยด์ ในอายุเดียวกัน พบว่าต้นที่เป็นพอลีพลอยด์มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างจากต้นดิพลอยด์อย่างเห็นได้ชัด

ต้นพอลีพลอยด์มีการเจริญเติบโตช้ากว่าเล็กน้อย ต้นที่เป็นพอลีพลอยด์มีขนาดของลำต้นใหญ่กว่า ใบมีสีเขียวเข้มกว่า ระยะเวลาของการเกิด stolon ช้ากว่า ขนาดและความหนาของใบมากกว่าต้นที่เป็นดิพลอยด์ ลักษณะของต้นสูงกว่าขนาดของใบใหญ่กว่า เซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่กว่า และมีปริมาณของเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบมากกว่าต้นที่เป็นดิพลอยด์ ความแตกต่างของขนาดของลำต้น จำนวนใบ ขนาดของใบและ stoma ระหว่างต้นดิพลอยด์และพอลีพลอยด์มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 2. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆระหว่างต้นดิพลอยด์และพอลีพลอยด์

ลักษณะ	ต้นดิพลอยด์	ต้นพอลีพลอยด์	ความแตกต่าง
ความยาวก้านใบ (ซม.)	3.66	5.37	ns
ขนาดลำต้น (มม.)	1.51	2.15	s
จำนวนใบ (ซม.)	4	12	s
ความกว้างและความยาวของใบ (ซม.)	2.78, 1.51	3.57, 1.92	s
ความกว้างและความยาว stoma (μ)	17.48, 22.43	24.37, 29.03	s
จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม (เม็ด/เซลล์)	12	20	s

S = significant ($P<0.05$)

ns = not significant

3. การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์

ส่วนการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของต้นบัวบกมีข้อจำกัด พบว่าการศึกษาลักษณะและจำนวนโครโมโซมจากยอดอ่อนและปลายรากของต้นที่เป็นพอลีพลอยด์ ไม่สามารถศึกษาได้อย่างละเอียดเนื่องจากจำนวนโครโมโซมมีขนาดเล็กมาก ดังแสดงในรูปแต่จากการคาดคะเนความยาวของแนว equatorial plane ที่โครโมโซมมาเรียง และการนับจำนวนของคลอโรพลาสต์ยืนยันได้ว่าต้นที่ได้ศึกษาเป็นต้นบัวบกที่เป็นพอลีพลอยด์

จึงเห็นได้ว่าการใช้สารโคลชีซิน 2 เปอร์เซนต์ที่ยอดของต้นอ่อนไม่ว่าจะเป็นวิธีใดสามารถชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในต้นบัวบกได้ต้นที่เป็นพอลีพลอยด์ได้สามารถเก็บไว้เพื่อขยายพันธุ์ต่อ

ไปหลายๆรุ่น เพื่อดูความเสถียรของพอลีพลอยด์ในรุ่นต่อๆไป และจะได้ศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีในใบของต้นดิพลอยด์และพอลีพลอยด์ต่อไป

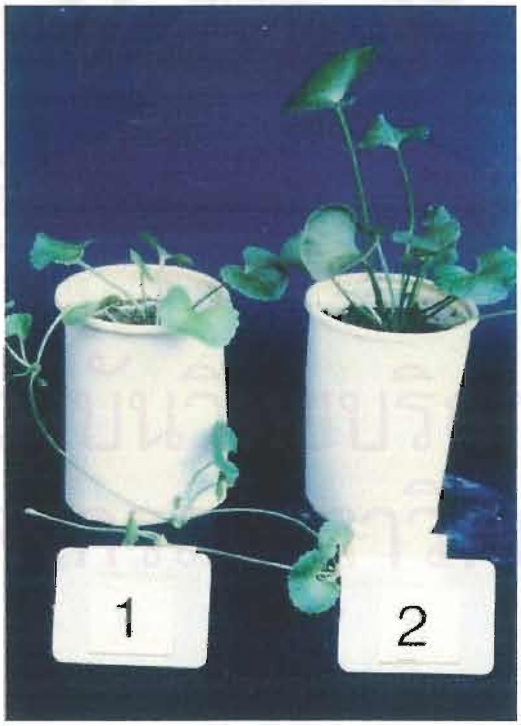
4. การนับจำนวนคลอโรพลาสต์

จำนวนคลอโรพลาสต์สามารถใช้ในการประเมินความเป็นพลอยดี เปรียบเทียบระหว่างต้นพืช จากการนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในบริเวณ guard cell ดังแสดงในตารางที่ 2 สามารถยืนยันได้ว่าต้นบัวบกที่ชักนำนั้นเป็นต้นพอลีพลอยด์เพราะจำนวนของคลอโรพลาสต์มีจำนวนประมาณ 2 เท่าของต้นดิพลอยด์

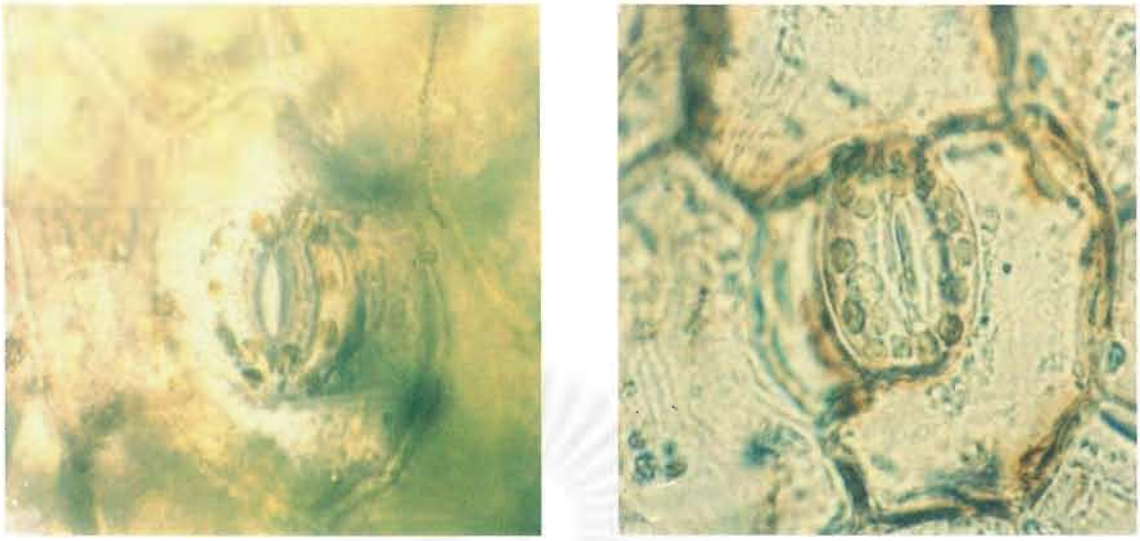
โดยสรุปแล้วการใช้สารโคลชีซีนชุบด้วยสำลีเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ แต่ไม่สามารถตรวจสอบจำนวนโครโมโซมในต้นพืชทุกต้นได้ด้วยวิธีทาง cytogenetic เนื่องจากโครโมโซมมีขนาดเล็กมากและจำนวนต้นที่เชื่อว่าเป็นพอลีพลอยด์มีจำนวนน้อยมาก อย่างไรก็ตามจากการสังเกตจากภาพของการศึกษาโครโมโซมพอประมาณได้ว่าเป็นพอลีพลอยด์ และจากการศึกษาจำนวนคลอโรพลาสต์เปรียบเทียบแล้วทำให้เชื่อว่าเป็นต้นที่เป็นพอลีพลอยด์ แต่ไม่สามารถยืนยันถึงจำนวนโครโมโซมที่แน่นอนได้ ขณะนี้งานวิจัยได้เริ่มต้นในการผลิตต้นพอลีพลอยด์ด้วยวิธีที่ได้ศึกษาเพื่อให้ได้ต้นพืชมีจำนวนมากพอที่จะนำไปศึกษาสารองค์ประกอบที่สำคัญเปรียบเทียบระหว่างต้นดิพลอยด์และพอลีพลอยด์ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 เปรียบเทียบความยาวของก้านใบบัวบก 1.พอลีพลอยด์ 2. ดิพลอยด์

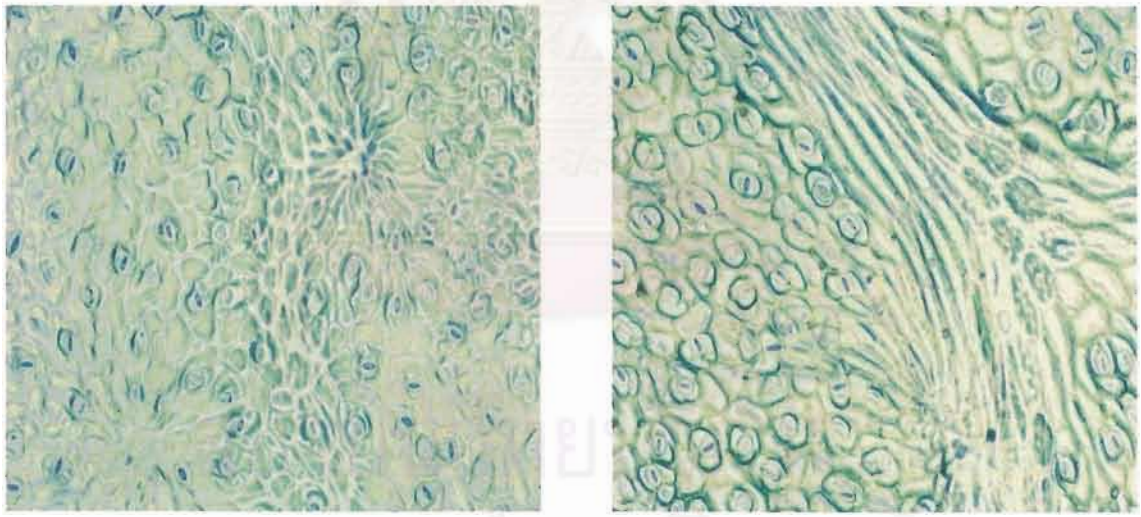


รูปที่ 2 เปรียบเทียบใบและต้นของบัวบก 1. ดิพลอยด์ 2. พอลีพลอยด์



1 2

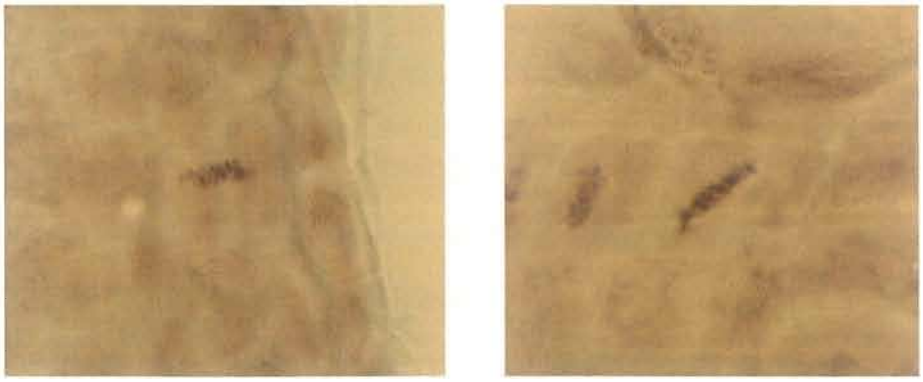
รูปที่ 3 เปรียบเทียบจำนวนคลอโรพลาสต์ของบัวบก 1. ดิพลอยด์ 2.พอลีพลอยด์



1 2

รูปที่ 4 เปรียบเทียบเซลล์ปากใบ 1. ดิพลอยด์ 2. พอลีพลอยด์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



1 2

รูปที่ 5 เปรียบเทียบลักษณะโครโมโซมระยะเมทาเฟส 1. ดิพลอยด์ 2. พอลีพลอยด์

1 2

รูปที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะโครโมโซมระยะแอนาเฟส 1. ดิพลอยด์ 2. พอลีพลอยด์

1 2

รูปที่ 7 เปรียบเทียบลักษณะโครโมโซมระยะโปรเฟส 1. ดิพลอยด์ 2. พอลีพลอยด์

เอกสารอ้างอิง

1. กัญญา ไชยเจริญ. 2516. การใช้สารโคลชิซีนเพื่อชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ของเดนโดรบิอุม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
2. ชบา อ่ำรำไพ. 2517. การใช้โคลชิซีนชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในแพงพวยฝรั่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
3. ดำรงค์ สินไชย. 2521. การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
4. ดำรงค์ สินไชย. 2525. การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้ วารสารสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ปีที่ 14 เล่มที่ 2 เดือน ก.ค.-ธ.ค.: 1-35.
5. นันทนา ลิ่มสกุล. 2525. ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อพุทธรักษาลูกผสม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
6. Allard R.W. (1960) Principle of Plant Breeding. Japan. Toppan Printing.
7. Biswas, A.K. and Bhattacharyya, N.K. (1971) Induced Polyploid in Legumes I. *Cyamopis psoraloides* D.C. Cytologia 36: 469-479.
8. Biswas, A.K. and Bhattacharyya, N.K. (1976) Induced Polyploidy in Legumes III. *Phaseolus vulgaris* L. Cytologia 41: 105-110.
9. Bragd, M. (1955). Production of Polyploids by Colchicine. Euphytica. 4 :76.
10. Eamaweller, S.L. and Brieley P. (1940) Colchicine Induced Tetraploidy in Lilium. J. Hered. 31: 223-230.
11. Fujii, M.T. and Guerra, M. (1997). Improved Hematoxylin Staining for Algal Cytogenetics. Biotech and Histochem. 73 (2): 78.
12. Kabi, M.C. and Bhaduri P.N. (1975) Nodulating Behaviour of Colchicine Induced Polyploids of *Phaseolus aureus* Cytologia. 43: 467-475.
13. Lewis, W.H. (1980). Polyploid : Biological Relevance. Basic of Life Sciences, 13. Plenum Press, New York.
14. Nebel, B.A. and Ruttle, M.L. (1983). Colchicine and Its Place in Fruit Breeding. New York Agr. Exp. Sta. Circ. 183 : 19.
15. Newcomer, E.M. (1941) Colchicine Induced Tetraploid Cosmos. J. Hered. 32: 161-164.
16. Raghuvanshi S.S. and Singh D.N. (1979) Comparative Ploidy Response of Different Varieties of *Impatiens balsamina* L. Cytologia 44.

17. Riley H.P. (1967) In Genetics and Cytogenetics, Hafner Publishing Company, New York and London.

18. Smith, H.H. (1939) The Induction of Polyploid in Nicotiana species and Species Hybrids by Treatment with Colchicine. J. Hered. 30: 291-306.

19. Swanson C.P., Merz T. and Young W.J. (1967) In Cytogenetics, Foundation of Modern Genetics Series, No. 8. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

20. Sybenga J. (1972) In General Cytogenetics, American Elsevier Publishing Co. Inc, New York.

21. Tojyo, I. (1966). Studies on the Polyploid in Mulberry tree 1. Breeding of Artificial Autotetraploids. Japan Exp. Sta. Bull. Sericult. 20 (3) :187.

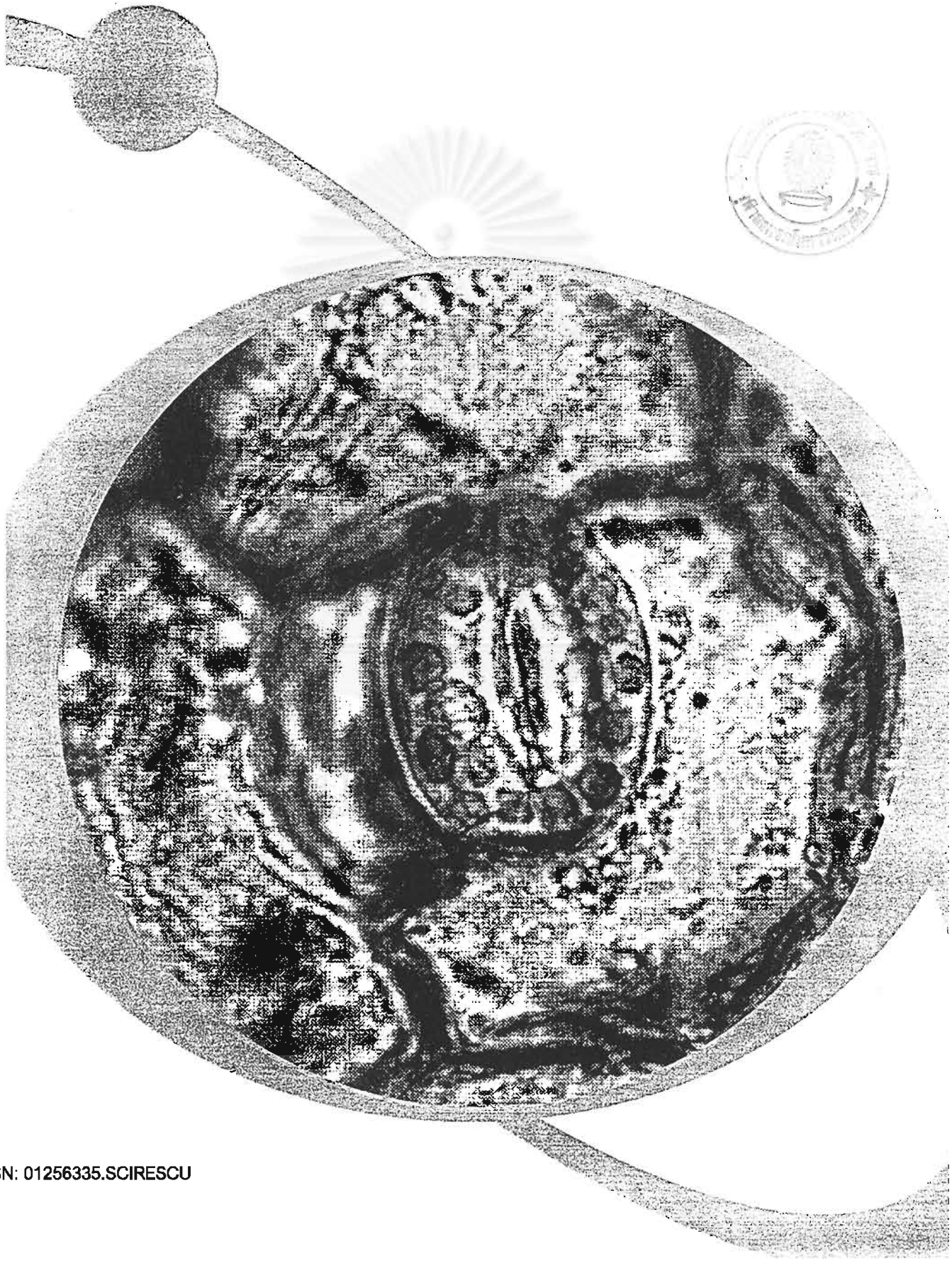
21. Turner, N.J. and Szczawinski, A.F. (1991). Common Poisonous Plants and Mushrooms of North America. Timber Press, portland, Oregon : 278.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Journal of
Volume 24, Number 2, 1999

Scientific Research

Chulalongkorn University
วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่ 24 ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2542



ISSN: 01256335.SCIRESCU

การชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในต้นบัวบก โดยใช้สารโคลชิซีน

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และ วิสา ฉิมน้อย (2542)
วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย **24 (2)**

ได้ทำการชักนำต้นบัวบกชนิดดิพพลอยด์ให้เป็นต้นพอลิพลอยด์โดยใช้โคลชิซีน และทำการทดลองชักนำ 2 วิธี คือหนึ่งใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซีน 1-2% วางลงบนต้นอ่อน วิธีที่สองโดยผสมโคลชิซีน 1-2% กับวุ้นแล้ววางลงบนปลายยอดของต้นอ่อน พบว่าการใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซีน 2% วางบนต้นอ่อน สามารถชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ดีที่สุด ในขณะที่การใช้วุ้นผสมโคลชิซีนไม่ว่าจะเป็น 1 หรือ 2% ให้ผลการชักนำไม่ต่างกัน ต้นพอลิพลอยด์ที่เกิดขึ้นแสดงลักษณะแตกต่างจากต้นดิพพลอยด์ จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมและจำนวนโครโมโซมในเซลล์ของต้นพอลิพลอยด์สูงกว่าต้นดิพพลอยด์

คำสำคัญ บัวบก, โคลชิซีน, พอลิพลอยด์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INTRODUCTION

The herbaceous Asiatic pennywort plant, *Centella asiatica* (L.) Urban, is classified as a vegetable and thought to have some herbal properties in the reduction of blood pressure, fever, bacterial and fungal infection, and inhibition of cancerous cells.[1] There also have been reports on the effect of this plant in healing stomach infection and stimulation of immune response in humans.[2]

Polyploidy is one of the successful methods in the improvement of economic crops such as wheat, oats, cotton, coffee, apples, roses, and bananas.[3] The process can occur naturally or through human manipulation. In general, polyploid plants exhibit superior phenotypes to those of diploids such as stronger stems, and thicker and larger leaves, flowers, fruits, and seeds. Polyploid induction can be used as a means to create and select new and better breeds for further use.[4] In order to produce polyploid plants, the chemical colchicine is widely used because of its effectiveness, abundance and being non-toxic to cells.[5] By producing polyploid *C. asiatica,* the production of better-quality herbal substances from its extract will be possible and more economically feasible.[6]

Specific objectives for this experiment were to determine the effective concentration and appropriate method of colchicine application in the polyploid induction of *C. asiatica*. Characterization of the obtained polyploid plants was also conducted. The overall objective of this research was to produce polyploid *C. asiatica* stock plants for future breeding and propagation programs.

MATERIALS AND METHODS

Colchicine Treatment

One hundred *C. asiatica* plants were divided into four treatmentsets and a control set, at 20 plants each. In the first treatment, a drop of agar containing 2% colchicine was placed on seedling shoot tips. The second treatment received a similar treatment to the first except the concentration of colchicine used was 1%. In the third treatment, cotton balls saturated with 1% colchicine were placed on seedling shoot tips. The last treatment was similar to the third one but with 2% colchicine. The cotton balls were then covered with aluminum foil. All treatments were left for 6 days.

Number of Guard Cell Chloroplasts

Sample tissues of leaf epidermis were placed on microscope slides and the size and density of guard cells were measured. To confirm that the obtained plants were indeed polyploid, 1% $AgNO_3$ solution was added to the peeled surfaces of the samples in order to count the number of guard cell chloroplasts.

Cytological Observation

Root tips of the *C. asiatica* plants were dissected and stained for chromosomal studies using hematoxylin staining.[7] Tip sections of 1-1.5 cm in length were fixed in Carnoy's solution (ethanol: acetic acid = 3:1). The samples were left in the fixative at room temperature for 2 hours and then preserved at 4°C in 70% ethanol solution. In order to conduct cytological studies, the preserved tips were washed twice with distilled water for 5 minutes each and transferred onto microscope slides and several drops of 45% acetic acid were added. A coverslip was placed on each slide over the root tip sections which were then gently squashed. The slides were immediately immersed in liquid nitrogen in order to release the coverslip, and were left to air dry for 30 minutes at room temperature. The slides were subsequently dipped in 5 M HCl at room temperature for 20 minutes, and were again air dried. The samples were later stained with acetohematoxylin (1g of iron alum dissolved in 100 ml of 45% acetic acid). The sections were left to stain for 5 minutes and were again gently squashed under a coverslip for further chromosomal analyses.

Comparison of Morphology between Diploid and Polyploid *C. asiatica*

Morphological data on the plant height, stem diameter, leaf number, width and length of leaf were collected from 20 each of the diploid and polyploid *C. asiatica* plants and were statistically evaluated using the paired t-test at a significance level of 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Polyploid Induction

Table 1 shows that using colchicine-saturated cotton balls and agar-containing colchicine and applying both to the seedlings could successfully induce polyploidy in *C. asiatica*. However, the application method using cotton balls saturated with 2% colchicine solution was the most effective means for the induction. Although colchicine is generally known to arrest mitosis at metaphase by disrupting spindle fiber formation, its mode of action in organogenesis is still unknown.

Method	Colchicine Concentration (%)	% of survived plants	% of obtained polyploids
Control	-	100	-
1. Agar solution drop	1	60	20
method	2	50	20
2. Cotton plug method	1	60	20
	2	80	60

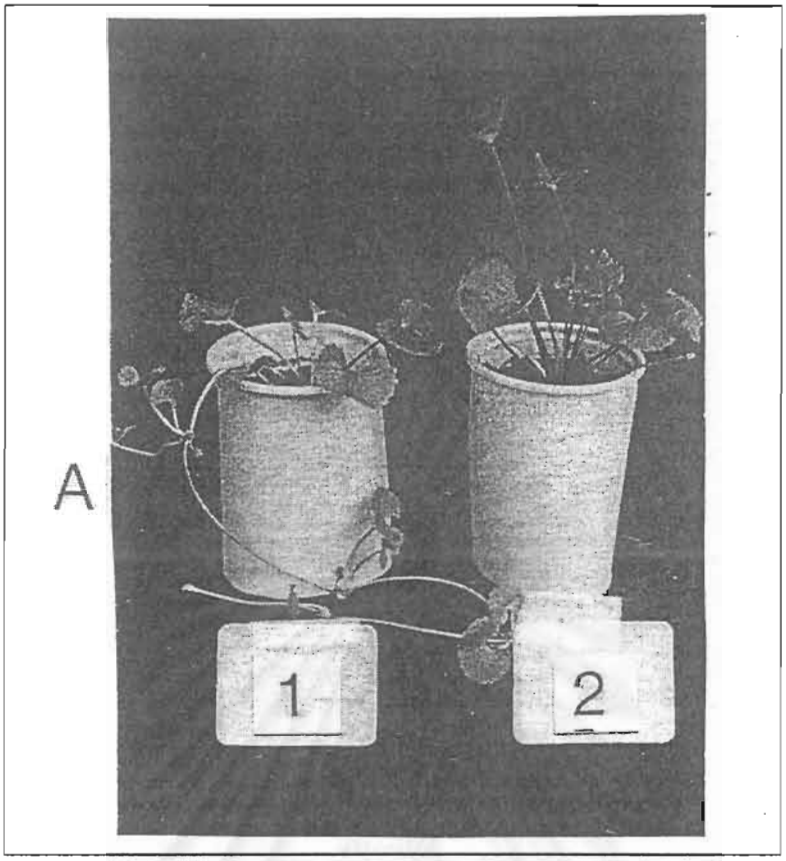
Table 1. Polyploid induction in *C. asiatica* by colchicine treatment

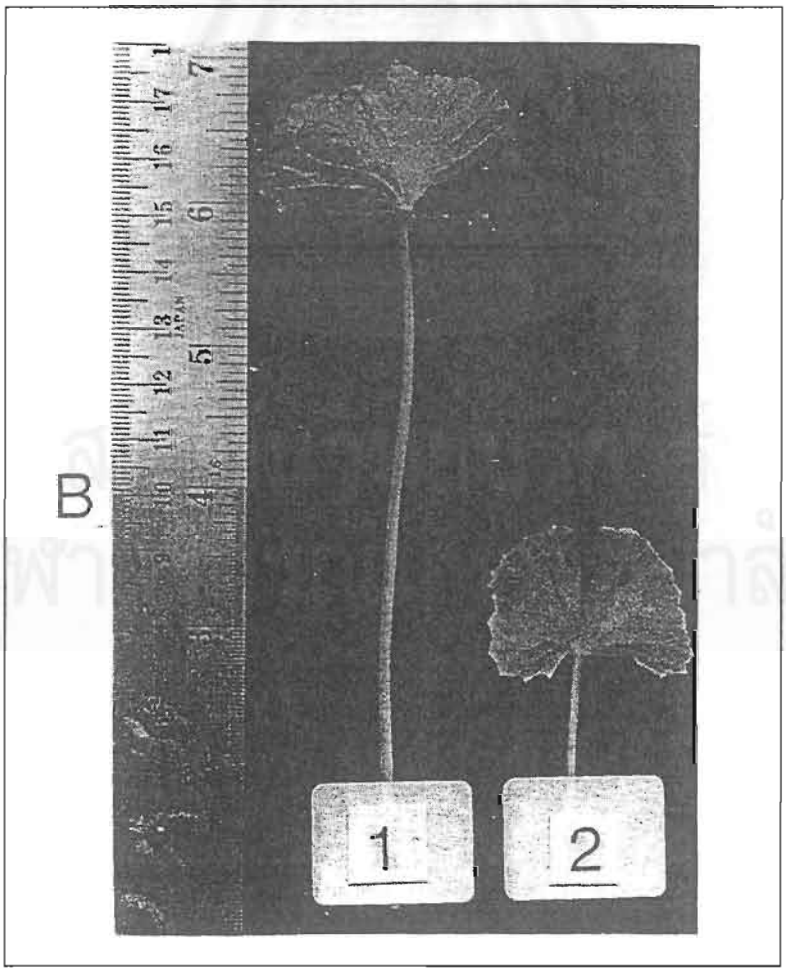
Comparison of Morphology between Diploid and Polyploid *C. asiatica*

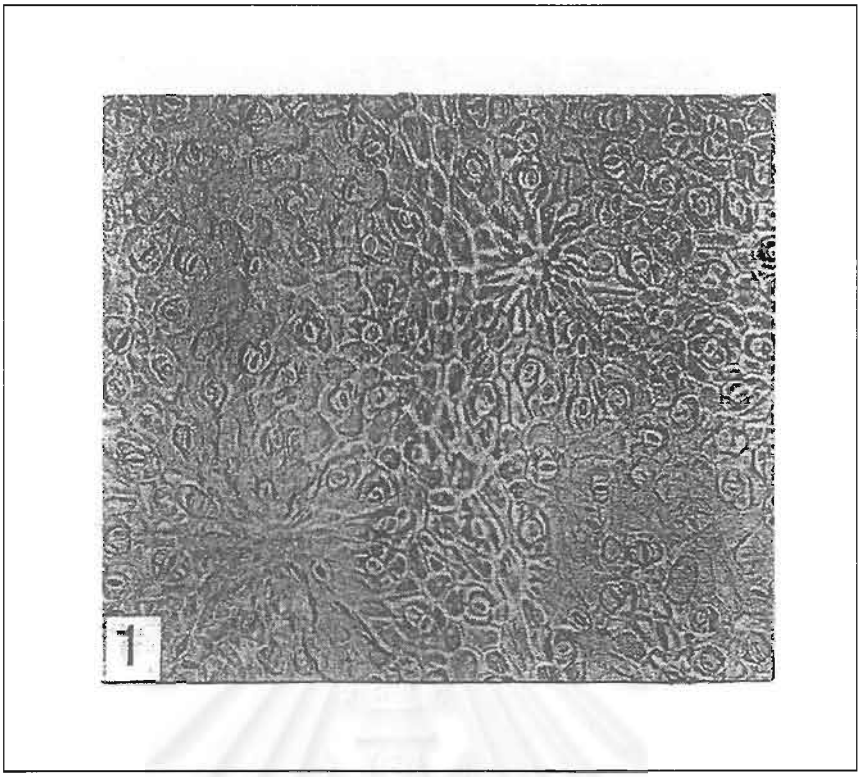
Comparison of morphology between diploid and polyploid *C. asiatica* at the same age revealed that phenotype of the polyploids was different from that of the parental diploid plants. The polyploid plants exhibited slightly slower growth than the diploid plants. Figure 1 shows that the petiole length of the polyploid was taller, the sizes of the leaves and the guard cells were larger, and the leaf color was dark green. Table 2 shows that the petiole length, diameter, leaf number, width and length of leaves in diploid and polyploid *C. asiatica* were statistically different at $P<0.05$. Guard cells of the diploid and polyploid plants were also of different sizes. The averages of the width and length of guard cell pairs, along with the number of chloroplasts, of the polyploids are significantly larger than those of the diploids ($P<0.05$).

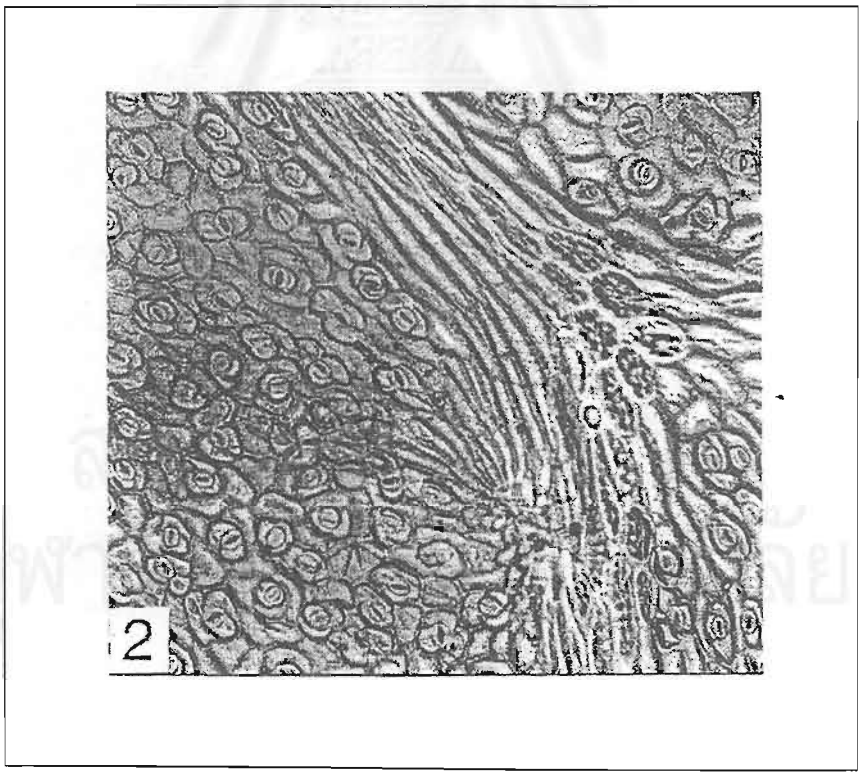
Cytological Study

The chromosomal characteristics of *C. asiatica* were not well defined, due to their small sizes and number and inadequate condensation. This makes them quite difficult to study using the Feulgen squash technique. Therefore, the acetohematoxylin method described by Fujii and Guerra[7] was applied instead. Figure 2 compares the metaphase, anaphase, and prophase stages between the diploid and polyploid *C.asiatica*. Although the number of chromosomes could not be accurately counted, it was clearly visualized that the obtained plants were indeed polyploid.

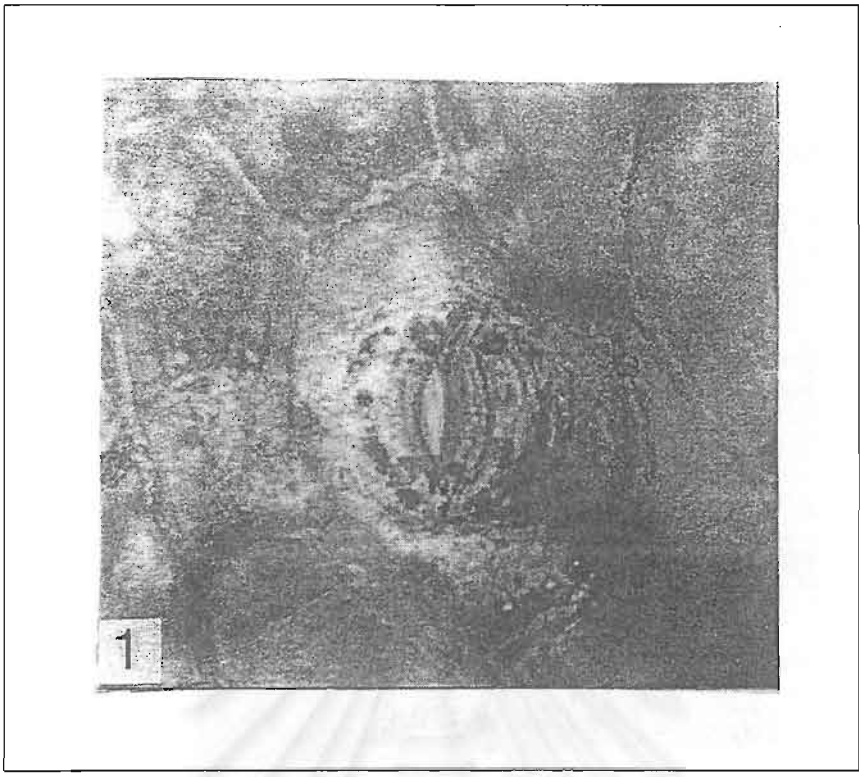

A
1
2

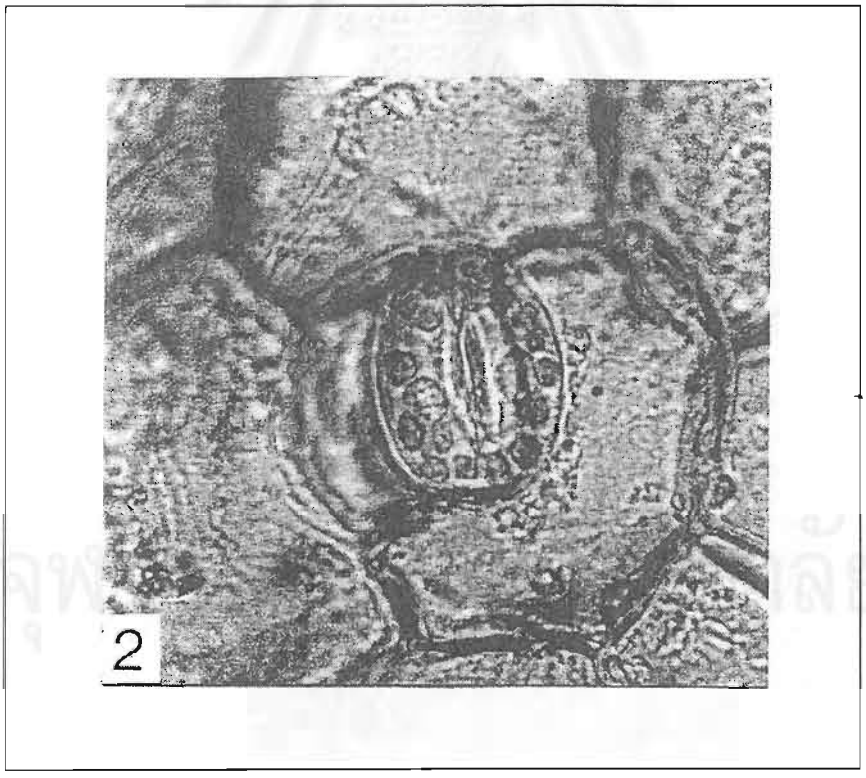

B
1
2





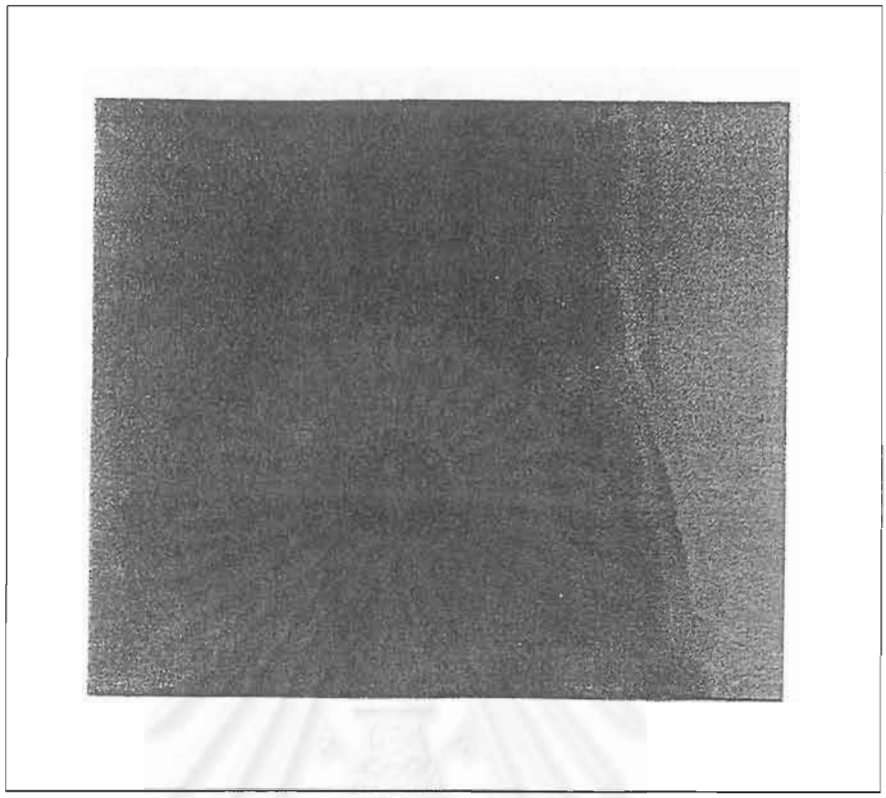
C

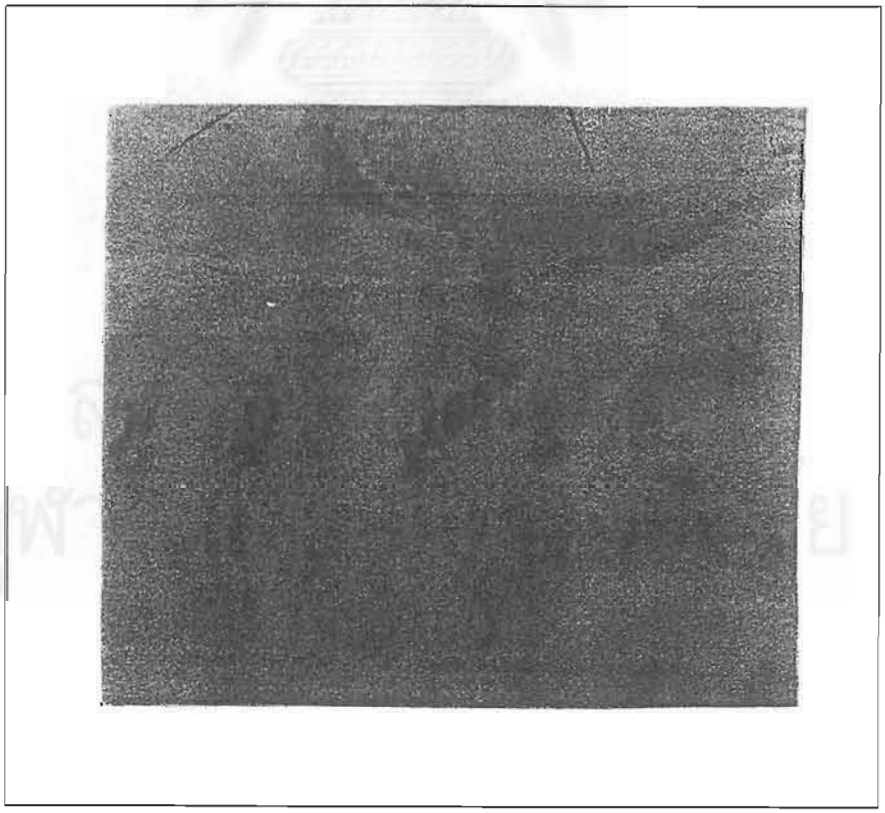




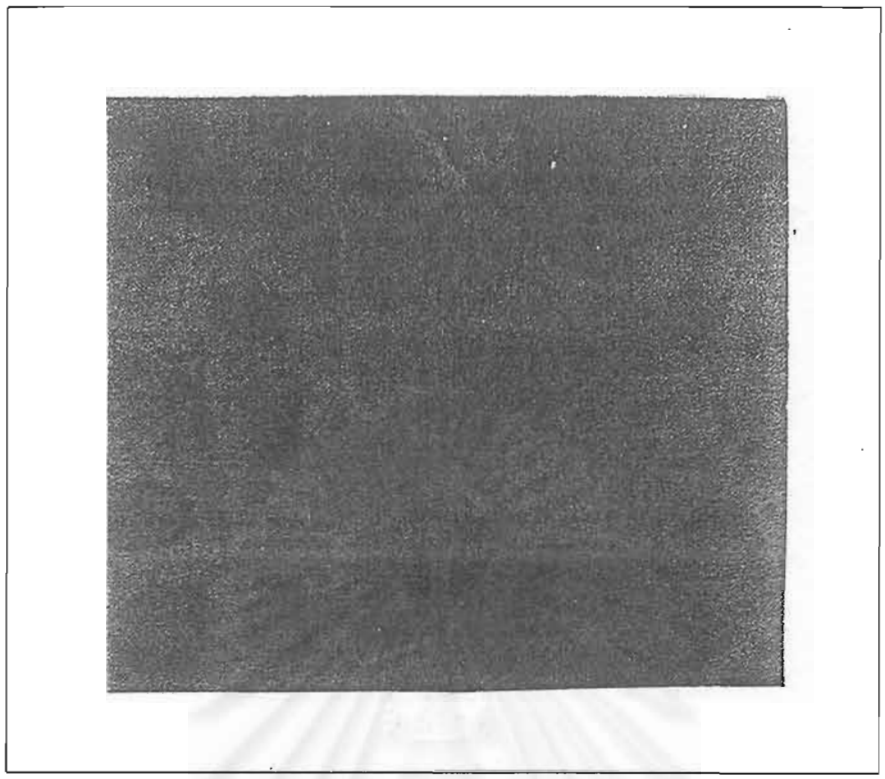
D

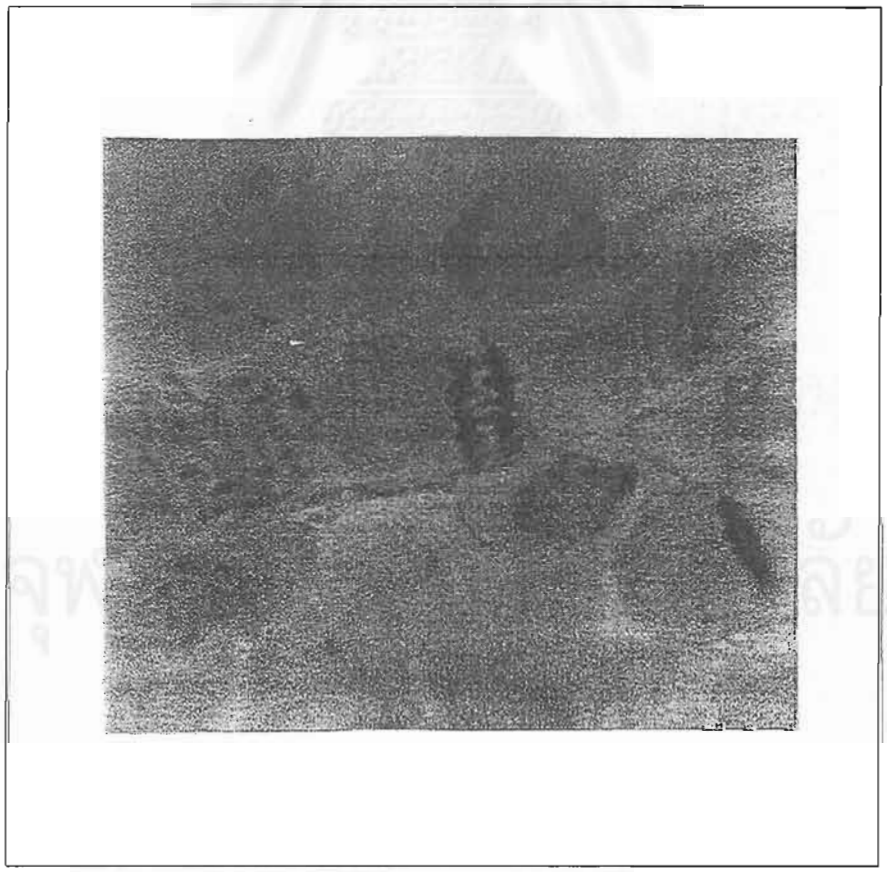
Figure 1. Morphological comparison between diploid (1) and polyploid (2) *C. asiatica* A) petiole length B) leaves C) guard cells D) chloroplast numbers.





A





B

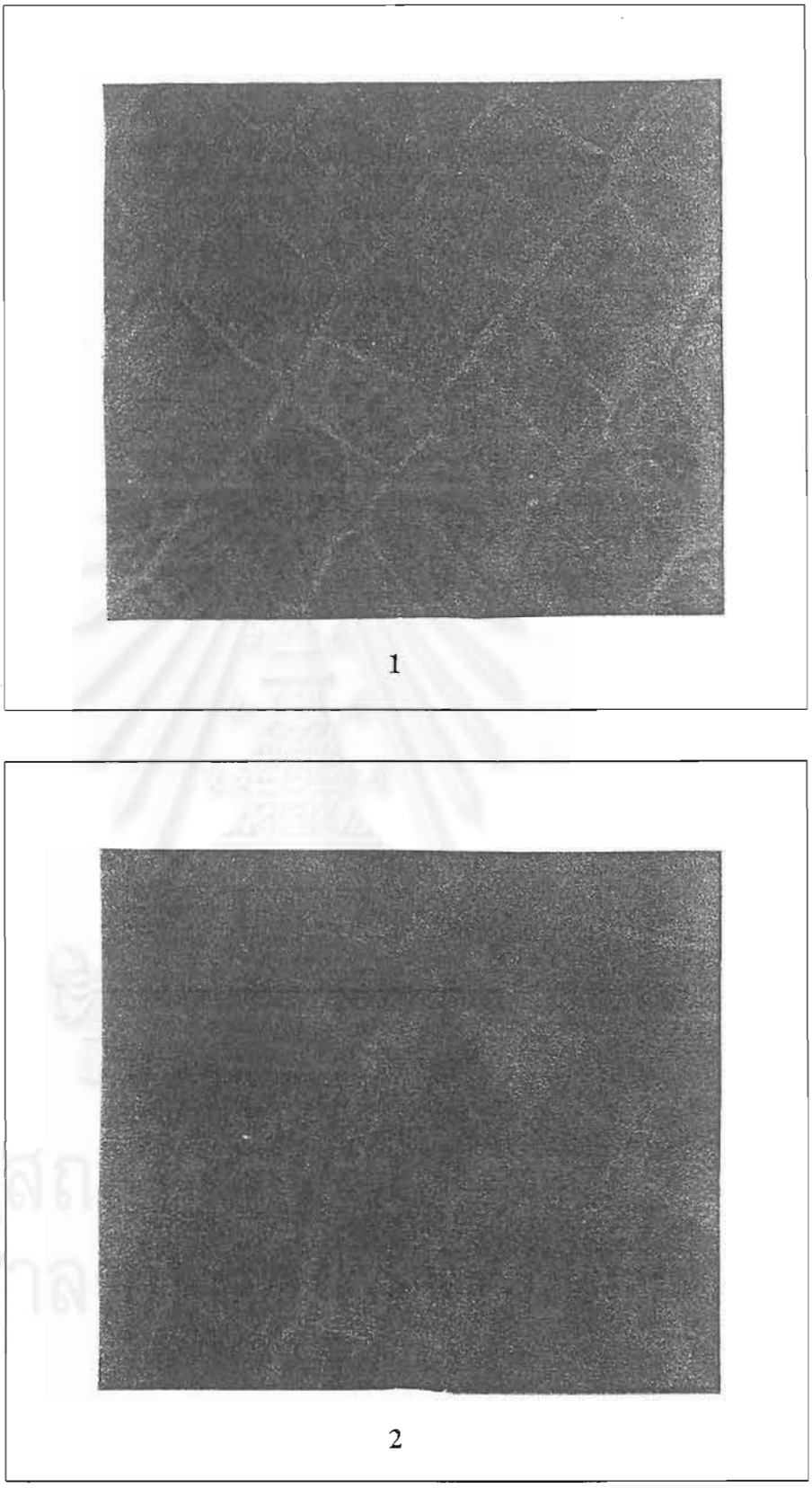


Figure 2. Cytological comparison between diploid (1) and polyploid (2) *C. asiatica* A) metaphase B) anaphase C) prophase

Chloroplast Counting

The number of chloroplasts could be used to estimate the number of chromosome sets from leaf epidermal cells.[8] By counting the chloroplast number in guard cells (Figure 1D), it could be confirmed that the plants obtained from the experiment were polyploid, possessing twice the number of diploid chloroplasts (Table 2).

In conclusion, the application of 2% colchicine-saturated cotton balls was the most effective method of polyploid induction of *C. asiatica*. The resulting polyploid plants can then be used in future plant breeding programs where the polyploid stability can be followed in many successive generations. In addition, the chemical compositions of the leaves from the diploid and the polyploid *C. asiatica* can be further analyzed.

Characteristic	Diploid	Polyploid	Statistical Significance At P<0.05
Petiole length (cm)	3.66	5.37	ns
Stem diameter (mm)	1.51	2.15	s
Leaf number	4	12	s
Width & Length of Leaf (cm)	2.78,1.51	3.57,1.92	s
Width & Length of Stoma (μ)	17.48, 22.43	24.37, 29.03	s
Chloroplast number	12	20	s

s = significant
ns = not significant

Table 2. Morphological characteristics (size and density of guard cells) of diploid and polyploid *C. asiatica*.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by the Rachadapiseksompoj Research Fund, Chulalongkorn University.

REFERENCES

1. Farnsworth, N. R., and Bunyapraphatsara. N. (1992) Thai medical plants. Prachachon Co., Ltd., Bangkok.
2. Turner, N. J., and Szczawinski, A. F. (1991) Common Poisonous Plants and Mushrooms of North America, Timber Press, Portland, Oregon: 278.
3. Bragd, M. (1955) Production of Polyploids by Colchicine, Euphytica **4**: 76.
4. Tojyo, I. (1966) Studies on the Polyploidy in Mulberry tree 1: Breeding of Artificial Autotetraploids, Japan Exp. Sta. Bull. Sericult. **20 (3)**: 187.
5. Nebel, B. A., and Ruttle, M. L. (1983) Colchicine and Its Place in Fruit Breeding, New York Agr. Exp. Sta. Circ. **183**: 19.
6. Lewis, W.H. (1980) Polyploid: Biological Relevance, Basics of Life Sciences, 13. Plenum Press, New York.
7. Fujii, M. T., and Guerra, M. (1997) Improved Hematoxylin Staining for Algal Cytogenetics, Biotech. and Histochem. **73 (2)**: 78.
8. Jahier, J. (1992) Techniques de Cytogenetique Vegetale. INRA editions, Paris.

Received: January 19, 1999
Accepted: May 24, 1999