บทที่ 1

บทนำ

มิวเตชันเป็นการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตและการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลานได้ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้ลักษณะของสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลงไป มิวเตชันในระดับของยีนเรียกว่ายีนมิวเตชัน ในระดับของโครโมโซมเรียกว่าโครโมโซมมิวเตชัน มิวเตชันอาจเกิดขึ้นได้เองหรือชักนำให้เกิด การเกิดมิวเตชันทำให้ได้พันธุกรรมหรือลักษณะใหม่ ๆ ในพืช และเป็นการเพิ่มการแปรผันในประชากรและอาจจะทำให้ได้พืชที่มีพันธุกรรมและลักษณะใหม่ตามต้องการในอัตราส่วนประมาณ 1-5 ในประชากร 1,000 ถึง 1,000,000 เมื่อคัดเลือกด้วยวิธีที่เหมาะสม

การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะดีตามต้องการ มีหลายวิธี และวิธีที่ใช้อยู่ทั่วไปคือการนำพืชที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมดีอยู่แล้ว แต่ยังขาดลักษณะหนึ่งลักษณะใด มาผสมพันธุ์กันแล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะตามที่ต้องการในรุ่นลูก วิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัดอยู่ว่าไม่สามารถสร้างพันธุ์พืชใหม่ให้มีพันธุกรรมตามต้องการได้ถ้าไม่มีแหล่งของยีนดังกล่าวที่ดีในประชากร วิธีหนึ่งที่สามารถใช้แก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้ดีและประสพความสำเร็จแล้วในพืชหลายชนิดคือ การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการชักนำให้เกิดมิวเตชัน มีข้อได้เปรียบคือสามารถใช้ได้กว้างขวางในพืชปลูกแทบทุกชนิด และสามารถชักนำให้เกิดลักษณะหนึ่งลักษณะใดได้โดยที่ลักษณะดังกล่าวไม่สามารถเกิดขึ้นได้เมื่อปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีอื่น และสามารถเลือกใช้ตัวชักนำให้เกิดมิวเตชันได้อย่างกว้างขวาง ตัวชักนำให้เกิดมิวเตชันที่ใช้ในปัจจุบันมี 2 ประเภท คือสารเคมีและรังสี บรรดาตัวชักนำให้เกิดมิวเตชันทั้งหมดที่ทำให้การปรับปรุงพันธุ์พืชประสบความสำเร็จแล้วพบว่า 94 เปอร์เซ็นต์เป็นผลที่ได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยรังสี จากพันธุ์พืชที่ประสพความสำเร็จทั้งหมดจำนวน 485 พันธุ์ ความสำเร็จเหล่านี้เป็นผลของการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมาถึง 40.6 เปอร์เซ็นต์ (Gottschalk and Wolff, 1983)

รังสีแกมมาเป็นรังสีประเภทคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ามีอำนาจทะลุทะลวงสูง เคลื่อนที่ด้วยความเร็วเท่ากับแสง รังสีเกิดจากนิวเคลียสที่ไม่สมดุลย์ของธาตุกัมมันตรังสี เมื่อนิวเคลียสขาดความคงตัว นิวเคลียสจะสลัดอนุภาคหรือสลายตัวโดยปล่อยรังสีแกมมาหรืออนุภาคเบตาออกมา เมื่อพลังงานของรังสีพุ่งออกมากระทบกับอะตอมของเป้าหมายจะทำให้อะตอมของเป้าหมายเสียสภาวะสมดุลย์ อะตอมที่เกาะกันแน่นจะแยกออกจากกันได้ สภาวะเช่นนี้เรียกว่าอะตอมถูกไอออนไนซ์ อะตอมที่ถูกไอออนไนซ์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโมเลกุล (อรรถ นครทรรพ, 2505) โดยเฉพาะอย่างยิ่งชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมโดยตรงคือ DNA ทั้งที่อยู่ในรูปของนิวคลีโอไทด์ โพลีนิวคลิโอไทด์ หรือรวมอยู่กับโปรตีนในรูปของโครโมโซม และผลของรังสีทางอ้อมที่มีต่อสิ่งมีชีวิตคือ รังสีจะทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำและของเหลว (radiolysis) เป็นผลให้เกิดไฮโดรเจน ($H^{\bullet}$) และไฮดรอกซี ($OH^{\bullet}$) แรดดิคัล ซึ่งฟรีแรดดิคัลเหล่านี้มีอิเลคตรอนที่ไม่มีคู่ ดังนั้นสามารถที่จะทำปฏิริยากับอะตอมหรือโมเลกุลของสารอื่นได้สูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพที่มีออกซิเจนจะทำให้เกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์แรดดิคัล ($HO_2^{\bullet}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และออกซิเจนอะตอม (2O) สารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการออกซิไดซ์สารอื่นและทำให้พันธะทางเคมีของสารอื่นแตกหัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพันธุกรรม ในที่สุดจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตในลักษณะต่าง ๆ กัน (Yarmonenko, 1988)

ข้าวบาร์เลย์พันธุ์แรกที่เป็นมิวแตนท์จากการฉายรังสีปลูกในสาธารณรัฐประชาธิปไตยเยอรมันในปี 1955 ต่อมาในปี 1985 ปรากฏว่ามีข้าวบาร์เลย์อย่างน้อย 137 พันธุ์ที่เป็นมิวแตนท์ที่ปรับปรุงพันธุ์แล้วโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปี 1967 จำนวนพันธุ์ที่เป็นมิวแตนท์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ลักษณะที่ปรับปรุงแล้วได้แก่ อายุเก็บเกี่ยวสั้น ปริมาณผลผลิต น้ำหนักเมล็ด ต้นเตี้ยแข็งแรง ทนทานต่อโรค ต้านทานต่อความแห้งแล้ง ความหนาวเย็น เมล็ดไม่แตกและงอกง่าย คุณภาพมอล์ทดี และเพิ่มปริมาณโปรตีนสะสมในเมล็ด (Gottschalk and Wolff, 1983 ; Bhatia, 1989)

ประเทศไทยเริ่มมีการทดลองปลูกข้าวบาร์เลย์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำพันธุ์เข้าจากต่างประเทศเพื่ออุตสาหกรรมผลิตเบียร์ในปี 2517 อย่างไรก็ตามพันธุ์ข้าวบาร์เลย์ส่วนใหญ่ต้องการอุณหภูมิและความชื้นค่อนข้างต่ำ ปลูกได้เฉพาะหลังการเก็บเกี่ยวข้าวทางภาคเหนือ

แม้จะมีการคัดเลือกพันธุ์ต่าง ๆ จำนวนมากที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ จนได้พันธุ์ที่แนะนำให้เกษตรกรปลูกได้ แต่ก็ยังมีจำนวนพันธุ์น้อยและยังมีปัญหาในปีที่ช่วงอากาศหนาวสั้นและคุณภาพในการผลิตมอล์ท เป็นต้น

มิวเตชัน และการเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิตเนื่องจากการสูญเสียหน้าที่และคุณสมบัติของเอ็นไซม์ โปรตีน ตลอดจนออกาเนลล์ เซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะหรือสิ่งมีชีวิตทั้งระบบที่เป็นผลจากการได้รับรังสี แบ่งผลที่เกิดขึ้นได้เป็นสองแบบคือ แบบแรกเป็นผลจากการได้รับรังสีโดยตรง (direct effect) โดยที่รังสีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือเสียหายต่อเป้าหมายโดยตรง แบบที่สองเป็นผลของรังสีโดยทางอ้อม (indirect effect) แบบนี้รังสีไม่มีผลต่อเป้าหมายโดยตรงแต่จะทำให้เกิดการแตกตัวและเปลี่ยนแปลงของน้ำและสารละลายภายในเซลล์ทำให้ได้สารใหม่ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเป้าหมายอีกทีหนึ่ง ผลของรังสีต่อเป้าหมายมีผู้รายงานว่า 9Ø เปอร์เซ็นต์เป็นผลที่เกิดโดยทางอ้อมโดยรังสีทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำและในที่สุดจะได้สารต่าง ๆ (ภาพที่ 1.) ที่มีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่เป็นเป้าหมายได้สูง ผลของรังสีทั้งทางตรงและทางอ้อมที่กระทำต่อเป้าหมายที่เป็นยีนและโครโมโซม ทำให้เกิดมิวเตชันแบบต่าง ๆ และกระทำต่อส่วนประกอบของเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และสิ่งมีชีวิตแสดงไว้ในภาพที่ 2.

รังสีทำให้เกิดมิวเตชันในระดับของยีนและจะถ่ายทอดไปสู่รุ่นต่อ ๆ ไปได้ มิวเตชันในระดับของยีนโดยเฉพาะอย่างยิ่ง point mutation เป็นมิวเตชันที่ต้องการสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยรังสี แต่ปริมาณรังสีต้องไม่สูงเกินไปเพราะจะทำให้เกิดมิวเตชันมากจนไม่สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นต่อ ๆ ไปได้เนื่องจากการไม่เจริญพันธุ์ (fertility) การตายของเซลล์ เนื้อเยื่อ หรือพืชทั้งต้น มิวเตชันในระดับโครโมโซมถ้าไม่รุนแรงก็สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อ ๆ ไปได้เช่นกัน แต่ถ้ารุนแรงจะทำให้โครโมโซมเสียหายมากจนทำให้ไม่สามารถถ่ายทอดได้เนื่องจากเกิดความผิดปกติขณะการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซีสเป็นผลให้เซลล์สืบพันธุ์ไม่เจริญพันธุ์หรือตายไป

$$\sim\!\!\rightarrow H_2O \rightarrow H_2O^+ + e^- \qquad (1)$$

$$H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH\cdot \qquad (2)$$

$$H_2O^+ + e^- \rightarrow H_2O^* \rightarrow H\cdot + OH\cdot \qquad (3)$$

$$H\cdot + O_2 \rightarrow HO_2\cdot \qquad (4)$$

$$HO_2\cdot + HO_2\cdot \rightarrow H_2O_2 + 2O \qquad (5)$$

ภาพที่ 1. ปฏิกิริยาการเกิดสารต่าง ๆ เนื่องจากการแตกตัวของน้ำ (radiolysis) โดยรังสี (Yarmonenko, 1988)

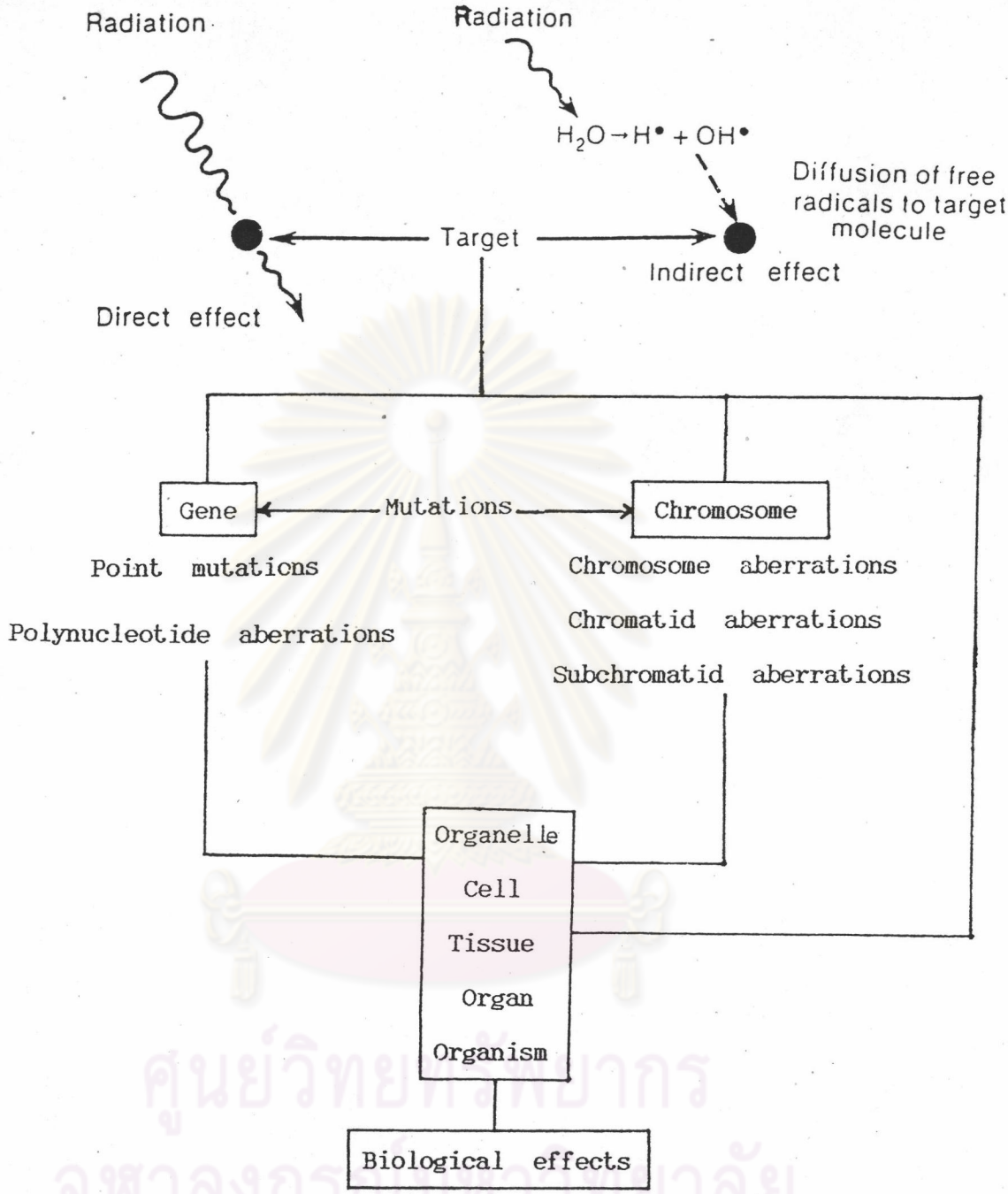
(1) ปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำเนื่องจากได้รับรังสี โมเลกุลของน้ำที่ถูกไอออนไนซ์จะสูญเสียอิเลคตรอนไป 1 ตัว

(2) โมเลกุลของน้ำที่ถูกไอออนไนซ์ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำอื่น ทำให้ได้ไฮดรอกซีแรดดิคัลที่สามารถทำปฏิกิริยาได้สูง

(3) อิเลคตรอนที่หลุดจากการแตกตัวของน้ำทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำอื่น ทำให้ได้น้ำโมเลกุลใหม่ที่มีความไม่คงตัวสูง และในที่สุดแยกโมเลกุลได้เป็นไฮโดรเจนและไฮดรอกซีแรดดิคัล

(4) ในสภาพที่มีออกซิเจน ไฮโดรเจนแรดดิคัลทำปฏิกิริยากับออกซิเจนทำให้ได้ไฮโดรเปอร์ออกไซด์แรดดิคัล

(5) ไฮโดรเปอร์ออกไซด์แรดดิคัลสองโมเลกุลทำปฏิกิริยากันเองได้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจนอะตอม



ภาพที่ 2. ไดอะแกรมแสดงผลของรังสีทั้งทางตรงและทางอ้อมที่มีต่อเป้าหมายที่เป็นยีนและโครโมโซมทำให้เกิดมิวเตชันแบบต่าง ๆ และผลของรังสีต่อออกาเนลล์ เซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะและสิ่งมีชีวิต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รังสีทำให้เกิดมิวเตชัน

อิทธิพลของรังสีทั้งทางตรงและทางอ้อม ทำให้เกิดมิวเตชันได้สองระดับด้วยกันคือ ยีนมิวเตชันและโครโมโซมมิวเตชัน

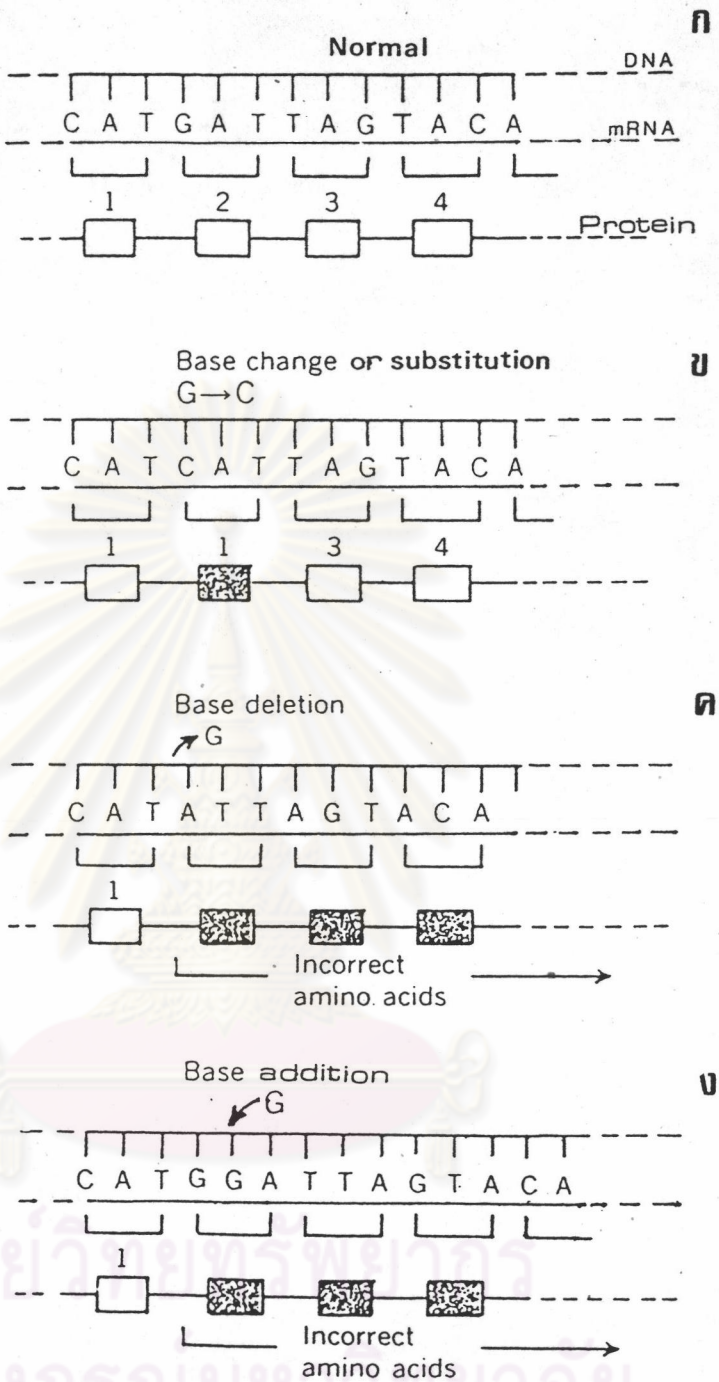
1. ยีนมิวเตชัน เป็นการเปลี่ยนแปลงหรือผิดปกติที่เกิดขึ้นในระดับของยีน แบ่งได้เป็น

1.1 Point mutation เป็นการเปลี่ยนแปลงในระดับของเบส (nucleotide)

1.1.1 Base change หรือ base substitution เป็นมิวเตชันที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสหรือการแทนที่เบสตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งด้วยเบสชนิดใหม่ เช่นจาก guanine เป็น cytosine (ภาพที่ 3 ข.) ผลจากการเปลี่ยนแปลงนี้หลังจากการสร้าง mRNA และโพลีเปปไทด์แล้วจะทำให้ได้สายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอมิโนผิดชนิดไป ปริมาณกรดอมิโนที่ผิดชนิดขึ้นกับจำนวนตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลง

1.1.2 Frameshift mutation หมายถึงมิวเตชันที่มีผลทำให้ชนิดของกรดอมิโนของสายโพลีเปปไทด์ผิดปกติเป็นจำนวนมากหรือตลอดทั้งสายนับตั้งแต่ตำแหน่งที่มีการผิดปกติของเบสที่ DNA เนื่องจากการเลื่อน (shift) ของ triplet codon ของ mRNA ที่เป็นผลจากการมีเบสหลุดหายไป (base deletion) จากโมเลกุลของ DNA (ภาพที่ 3 ค.) หรือมีเบสเพิ่มลงไป (base addition) ในโมเลกุลของ DNA (ภาพที่ 3.ง) หลังจากการลอกแบบจะทำให้ได้ mRNA ที่มีเบสเพิ่มหรือขาดหายไปเป็นผลให้เกิดการเลื่อนของ triplet codon ขณะการแปรรหัสสร้างโปรตีน

1.2 Polynucleotide aberration เป็นการเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโครงสร้างของสายโพลีนิวคลีโอไทด์ ได้แก่การหักทั้งสองสายของสายโพลีนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4 ก.) และการหักแล้วเชื่อมต่อกันใหม่ระหว่าง DNA สองโมเลกุลเช่นการเกิด crosslink (ภาพที่ 4 ข.)



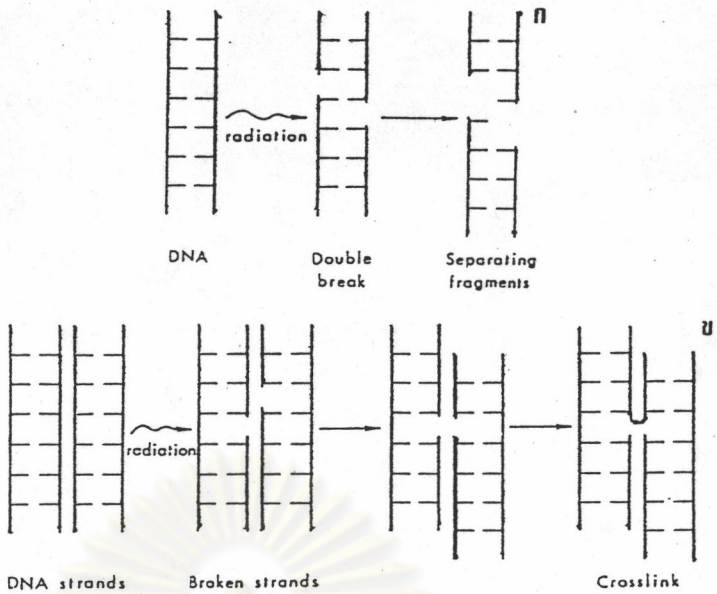
ภาพที่ 3. แสดงการเกิด point mutation แบบต่าง ๆ จากผลของรังสี (ดัดแปลงจาก Pizzarello & Witcofski, 1975)

ก. DNA ,mRNA และ protein ปกติ

ข. Base change หรือ base substitution ทำให้ได้กรดอมิโนผิดปกติ

ค. และ ง. frameshift mutation เนื่องจากการเกิด base deletion (ค) และ base addition (ง) ทำให้ได้กรดอมิโนผิดปกติจำนวนมาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4. แสดงการเกิด polynucleotide aberration เนื่องจากรังสี (กันยารัตน์ ไชยสุต, 2532)

ก. การหักของสายโพลีนิวคลีโอไทด์สองสายพร้อมกัน

ข. การหักและเชื่อมต่อกันใหม่ระหว่าง DNA สองโมเลกุล (crosslink)

2. โครโมโซมมิวเตชัน

2.1 Chromosome aberration

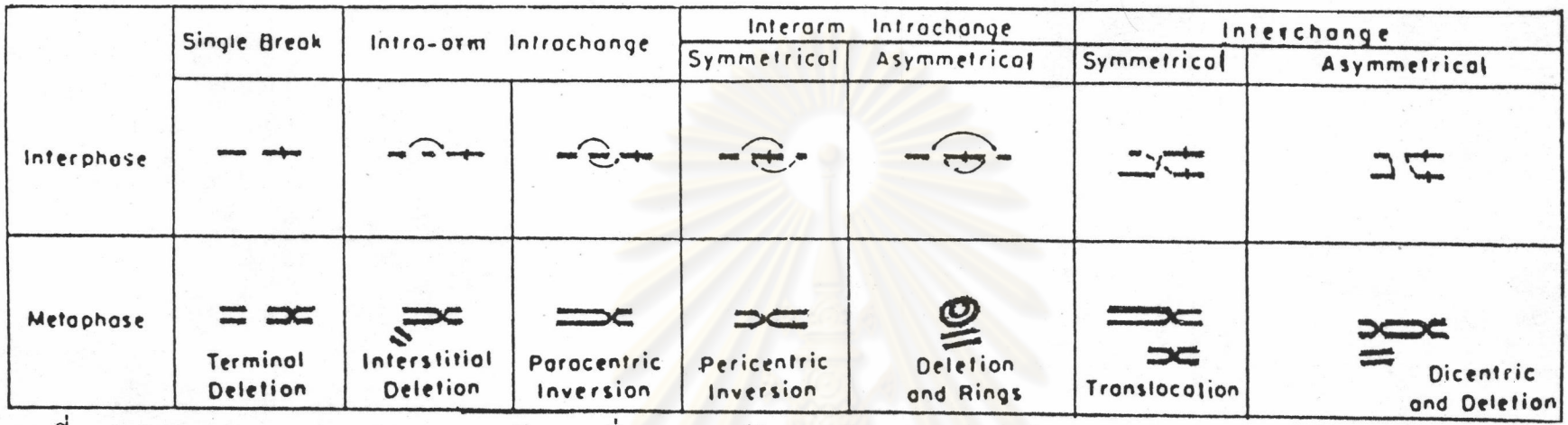
เป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม เมื่อเซลล์ได้รับรังสีขณะนิวเคลียสอยู่ในระยะ G1 และ S ของวงชีพเซลล์ รังสีทำให้โครโมโซมขาด และหรือเกิดการเชื่อมต่อกันใหม่แบบต่าง ๆ หลังจากการจำลองตัวเองแล้วจะทำให้ได้โครโมโซมที่มีโครงสร้างผิดปกติแบบต่าง ๆ เช่น terminal deletion, interstitial deletion, paracentric inversion, pericentric inversion, deletion กับ rings, translocation, และ dicentric กับ deletion (ภาพที่ 5.)

2.2 Chromatid aberration

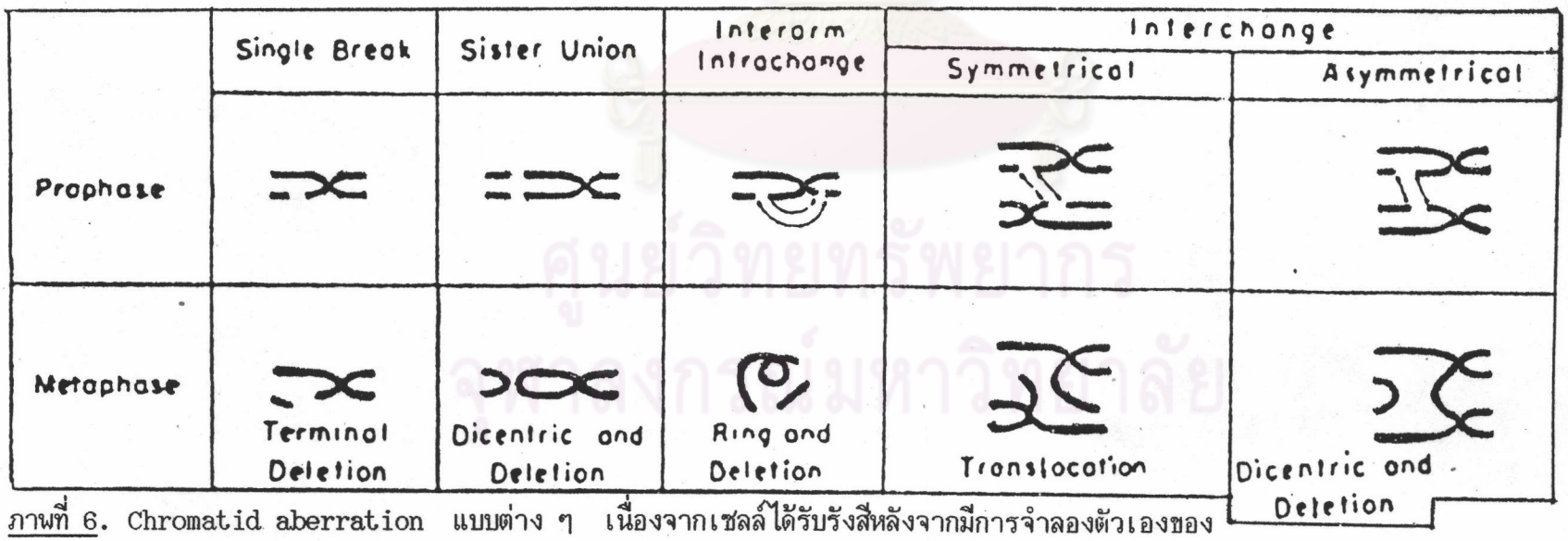
เป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม เมื่อเซลล์ได้รับรังสีหลังจากมีการจำลองตัวเองแล้ว รังสีทำให้โครมาติดขาดแบบต่าง ๆ และ หรือเกิดการเชื่อมต่อกันใหม่ของโครมาติด ทำให้ได้โครโมโซมที่มีโครงสร้างผิดปกติแบบต่าง ๆ เช่น terminal deletion, dicentric กับ deletion, ring กับ deletion และ dicentric กับ deletion (ภาพที่ 6.)

2.3 Subchromatid aberration

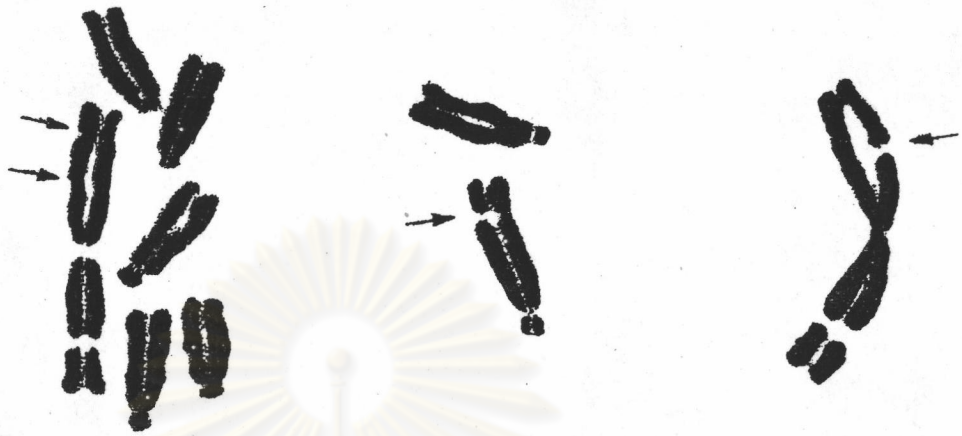
เป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม เมื่อเซลล์ได้รับรังสีขณะโครโมโซมอยู่ในระยะโปรเฟส การเปลี่ยนแปลงแบบนี้เกิดขึ้นกับส่วนของโครมาติดเท่านั้น เช่น ทำให้เกิด chromatid gap (ภาพที่ 7.)



ภาพที่ 5. Chromosome aberration แบบต่าง ๆ เนื่องจากเซลล์ได้รับรังสีขณะนิวเคลียสอยู่ในระยะ G1 และ S ทำให้ได้โครโมโซมที่มีโครงสร้างผิดปกติแบบต่าง ๆ (Casarett, 1975)



ภาพที่ 6. Chromatid aberration แบบต่าง ๆ เนื่องจากเซลล์ได้รับรังสีหลังจากมีการจำลองตัวเองของโครโมโซมแล้ว ทำให้ได้โครโมโซมที่มีโครงสร้างผิดปกติแบบต่าง ๆ (Casarett, 1975)



ภาพที่ 7. Subchromatid aberration เนื่องจากเซลล์ได้รับรังสีขณะโครโมโซมอยู่ในระยะโปรเฟสทำให้เกิด chromatid gap (ศรชี้) จาก De Robertis, Nowincki and Saez (1975)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาอิทธิพลของรังสีแกมมาที่มีต่อข้าวบาร์เลย์เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์

2. ตรวจสอบมิวเตชันด้วยวิธีการวิเคราะห์ไอโซไซม์เอสเทอร์เรส โดยเทคนิคอิเลคโตรโฟริซิส

3. ศึกษาลักษณะที่ผิดปกติใน M_1 generation

4. ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะผิดปกติเนื่องจากผลของรังสีใน M_2 generation และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีบางประการ