บทความวิชาการ

การทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี *Allium cepa* test

เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ*

บทคัดย่อ

การใช้สารเคมีที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบัน ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของสารในสิ่งแวดล้อมและมีแนวโน้มว่าจะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ จึงมีความจำเป็นในการตรวจสอบความเป็นพิษของสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยวิธี *Alliium cepa* test เป็นวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษเบื้องต้นโดยใช้หัวหอมใหญ่เป็นพืชทดสอบ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน มีความไวในการตรวจพบความเป็นพิษ รวมทั้งให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธีการอื่น จึงมีการนำวิธีการนี้ไปใช้อย่างกว้างขวางเพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม สารกำจัดศัตรูพืช สารสกัดจากธรรมชาติและอนุภาคนาโน

คำสำคัญ: *Allium cepa* test ไมโทติกอินเด็กซ์ ความผิดปกติของโครโมโซม

*ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: ploenpit.c@chula.ac.th

Genotoxicity Evaluation by *Allium cepa* test

Ploenpit Chokchaichamnankit[†]

ABSTRACT

Recently, there is an increasing of chemical utilization that results in chemical residuced to the environments and tend to effect the ecosystem. Hence, it is neccessary to evaluate the toxicity of contaminants that contaminated in the environment by using *Allium cepa* test which is the basic method for evaluating the toxicity. In this method, the onions are used as test plants because of simple method, high sensitivity and good correlation to the other methods. Therefore, *Allium cepa* test has been widely used for genotoxicity evaluation of chemical residuced, pesticide, natural extracts, and nano paticles.

Keywords: *Allium cepa* test, mitotic index, chromosome aberration

[*]Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Corresponding author, email: ploenpit.c@chula.ac.th

บทนำ

ปัจจุบันมีการใช้สารเคมีมากขึ้น ทั้งการใช้สารเคมีในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ การใช้สารเคมีทางการเกษตร รวมถึงการใช้สารเคมีในชีวิตประจำวัน จึงส่งผลให้มีรายงานการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมในปริมาณมาก ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบนิเวศ และเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศรวมทั้งมนุษย์ ดังที่มีรายงานการตกค้างของสารเคมีทางเภสัชกรรมในท่อน้ำทิ้งและแหล่งน้ำในกรุงเทพมหานครในปี พ.ศ. 2554 และ 2555 โดยพบว่าสารบางชนิดมีปริมาณที่อาจส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ [1] และยังมีรายงานการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ในแหล่งน้ำในบริเวณพื้นที่ที่ทำเกษตรกรรม ทั้งแหล่งน้ำธรรมชาติและแหล่งน้ำที่ใช้เพื่อการอุปโภคบริโภคของคนในชุมชน [2, 3] นอกจากนี้ยังพบการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชในผลิตผลทางการเกษตรที่วางจำหน่ายในท้องตลาด และพบว่าสารที่ตกค้างหลายชนิดมีปริมาณสูงกว่าค่ามาตรฐานความปลอดภัย [4, 5] นอกจากนี้ในช่วงเวลาประมาณ 10 ปีที่ผ่านมาเทคโนโลยีระดับนาโนได้รับการพัฒนาและถูกนำไปประยุกต์ใช้ทั้งด้านอุตสาหกรรม การแพทย์ และการเกษตรมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้อนุภาคนาโนปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม [6, 7, 8]

การปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมดังที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้เกิดความตระหนักถึงผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ รวมทั้งมนุษย์ เนื่องจากสารเคมีที่พบตกค้างในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่มีความเป็นพิษ โดยอาจมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในระดับเซลล์ ด้วยการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์หรือทำให้เซลล์ตาย ซึ่งความเป็นพิษแบบนี้เรียกว่า cytotoxic หรืออาจมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในระดับสารพันธุกรรมด้วยการก่อให้เกิดความเสียหายกับโครโมโซมและดีเอ็นเอ ซึ่งความเป็นพิษแบบนี้เรียกว่า genotoxic [9, 10] จึงมีงานวิจัยเป็นจำนวนมากเกี่ยวกับการตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่างๆ และสารที่ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม รวมถึงความเป็นพิษของอนุภาคนาโน

การตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่างๆ สามารถใช้ข้อมูลความรู้จากหลากหลายสาขาวิชา เซลล์พันธุศาสตร์เป็นสาขาวิชาหนึ่งที่นำมาใช้ในการตรวจสอบความเป็นพิษของสารก่อมะเร็ง (carcinogen) สารก่อการกลายพันธุ์ (mutation) และ genotoxin ซึ่งเป็นสารที่ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรม [11, 12] เนื่องจากความรู้ด้านเซลล์พันธุศาสตร์สามารถใช้ศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมภายในเซลล์หลังจากเซลล์ได้รับการกระตุ้นจากสารที่กล่าวมาข้างต้น จึงสามารถใช้เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของสารเคมี รวมถึงสารที่ตกค้างอยู่ในธรรมชาติได้ [13]

สำหรับสิ่งมีชีวิตที่นำมาใช้เพื่อทดสอบความเป็นพิษนั้นมีอยู่หลายชนิด เช่น จุลินทรีย์ สาหร่าย สัตว์น้ำ พืช รวมถึงเซลล์ของหนูแฮมสเตอร์ และเซลล์ของมนุษย์ [14] แต่สำหรับการตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่างๆ ในเบื้องต้น นิยมใช้พืชเป็นตัวอย่างในการทดสอบ เนื่องจากพืชสามารถสัมผัสกับสารได้โดยตรง และมีความไวในการตรวจพบความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในระดับพันธุกรรม โดยพืชที่นิยมใช้มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น หอมใหญ่ *(Allium cepa)* ถั่วปากอ้า *(Vicia faba)* ข้าวโพด *(Zea mays)* ยาสูบ *(Nicotiana tabacum)* พืชในสกุลว่านกาบหอย *(Tradescantia)* [10] และเนื่องจากในการใช้พืชเป็นตัวอย่างเพื่อทดสอบความเป็นพิษนั้น มักศึกษาจากความผิดปกติของโครโมโซม โดยใช้ความรู้ด้านเซลล์พันธุศาสตร์ ดังนั้นพืชที่มีโครโมโซมขนาดใหญ่ และมีจำนวนโครโมโซมน้อย จึงเป็นตัวเลือกที่ดี เนื่องจากสามารถศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมได้ง่าย โดยจากตัวอย่างพืชที่กล่าวมานั้น หอมใหญ่เป็นพืชที่จัดหา

ได้ง่าย ปลูกง่าย มีโครโมโซมขนาดใหญ่และมีจำนวนน้อย จึงเป็นพืชที่มีความเหมาะสมและเป็นที่นิยมมากที่สุดในการนำมาใช้เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารต่างๆ [10, 11, 12]

ที่มาและข้อดีของการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี *Allium cepa* test

ในปี ค.ศ. 1938 Levan [15] ได้นำหอมใหญ่มาทดสอบด้วยสาร colchicine แล้วศึกษาพฤติกรรมของโครโมโซมขณะที่เกิดการแบ่งเซลล์ ซึ่งจากผลการทดลองทำให้เขาอธิบายได้ว่า colchicine ส่งผลกระทบต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ โดยไปยับยั้งการสร้าง mitotic spindle ในขณะที่เกิดการแบ่งเซลล์ และจากนั้นเป็นต้นมาได้มีการใช้หอมใหญ่เพื่อศึกษาผลกระทบของสารเคมีต่างๆ ต่อพฤติกรรมของโครโมโซมขณะที่เกิดการแบ่งเซลล์ โดยในปี ค.ศ. 1985 Fiskesjo [13] ได้พัฒนาวิธีการที่เรียกว่า *Allium cepa* test ซึ่งเป็นการใช้หอมใหญ่เป็นพืชตัวอย่างในการตรวจสอบความเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดยวิธีการนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษในเบื้องต้นที่มีข้อดีหลายประการ ได้แก่ มีค่าใช้จ่ายในการทดสอบต่ำ วิธีการทดสอบไม่ยุ่งยากซับซ้อน มีความไวในการตรวจพบความเป็นพิษ เนื่องจากรากหอมสัมผัสกับสารที่ทดสอบได้โดยตรง ตรวจสอบความเป็นพิษจากความผิดปกติของโครโมโซมได้ง่าย เนื่องจากโครโมโซมมีขนาดใหญ่และมีจำนวนน้อย และที่สำคัญผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธีการอื่น ไม่ว่าจะเป็นการทดสอบด้วยสิ่งมีชีวิตอื่น หรือการทดสอบด้วยเซลล์ของมนุษย์ [10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18]

หลักการและวิธีการของ *Allium cepa* test

การทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี *Allium cepa* test ทำได้โดยนำหัวหอมใหญ่ไปเพาะในสารที่ต้องการทดสอบ เป็นเวลา 24 48 72 หรือ 96 ชั่วโมง โดยใช้น้ำเป็นชุดควบคุม แล้วศึกษาผลกระทบของสารทดสอบต่อสารพันธุกรรม จากอัตราการเจริญของราก และอัตราการแบ่งเซลล์ รวมถึงความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์จากปลายรากหอมที่เพาะในสารที่ต้องการทดสอบ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม [12, 13, 16, 17, 18]

สำหรับหัวหอมใหญ่ที่ใช้ในการทดลอง สามารถใช้หัวหอมใหญ่ที่หาซื้อได้โดยทั่วไป แต่หัวหอมแต่ละหัวที่ได้มาจะมีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน และอาจมีขนาดและความสามารถในการงอกของรากแตกต่างกัน รวมถึงอาจมีการใช้สารป้องกันเชื้อรา ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผลการทดลอง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ให้มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด โดยการคัดเลือกหัวหอมที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากที่สุดสำหรับทุกชุดการทดลอง และใช้หัวหอมในแต่ละชุดการทดลองจำนวนมากกว่าจำนวนที่ต้องการทดสอบจริง เช่น ใช้หัวหอม 12 หัว ในแต่ละชุดการทดลอง แต่เก็บผลการทดลองเพียง 10 หัว โดยไม่เก็บผลการทดลองจากหัวหอม 2 หัวที่มีการเจริญของรากน้อยที่สุด [16] สำหรับจำนวนหัวหอมที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน คือ 10 หัว สำหรับแต่ละชุดการทดลองเพื่อศึกษาอัตราการเจริญของราก ซึ่งจะช่วยให้การเปรียบเทียบผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติมีข้อผิดพลาดน้อยที่สุด และ 3-5 หัว สำหรับแต่ละชุดการทดลองเพื่อศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์และความผิดปกติของโครโมโซม [16, 18] โดยหัวหอม 1 หัว ในแต่ละชุดการทดลองสามารถใช้ศึกษาได้ทั้งอัตราการเจริญของราก อัตราการแบ่งเซลล์ และความผิดปกติของโครโมโซม

การเลือกความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบ จะเริ่มต้นจากความเข้มข้นของสารจำนวน 5 ระดับความเข้มข้นก่อน หากผลการทดลองที่ได้พบว่าสารที่ใช้ทดสอบมีความเป็นพิษที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของรากหอมไม่ชัดเจน อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบมีช่วงห่างระหว่างระดับความเข้มข้นมากหรือน้อยเกินไป ต้องทำการทดลองซ้ำ โดยปรับความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบใหม่ให้มีความเข้มข้นและช่วงห่างระหว่างระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยใช้ข้อมูลจากการทดลองแรก อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบผลการทดลองให้ชัดเจนว่าสารที่ใช้ทดสอบมีความเป็นพิษที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของรากหอมอาจต้องเพิ่มชุดควบคุมบวก (positive control) โดยใช้ glyphosate หรือ methylsulfonylmethane (MSM) ซึ่งเป็นสารที่ทราบแน่ชัดว่าส่งผลกระทบต่อการเจริญของรากหอม รวมถึงส่งผลให้เกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรม [12, 16]

การเพาะรากหอมในสารที่ต้องการทดสอบ สามารถนำหัวหอมมาแช่ในสารที่ใช้ทดสอบเป็นเวลา 48 หรือ 72 ชั่วโมง โดยให้เฉพาะส่วนโคนของหัวหอมเท่านั้นที่สัมผัสกับสารที่ใช้ทดสอบและต้องเปลี่ยนสารที่ใช้ทดสอบทุก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด จึงศึกษาอัตราการเจริญของราก อัตราการแบ่งเซลล์และความผิดปกติของโครโมโซม [9,13,16] อย่างไรก็ตามหากเริ่มต้นทดสอบด้วยหัวหอมที่ยังไม่มีการเจริญของราก ความสามารถในการงอกที่ไม่เท่ากันของหัวหอมแต่ละหัว อาจส่งผลต่ออัตราการเจริญของรากแล้วทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความผิดพลาด เพื่อเป็นการลดความแปรผันของปัจจัยดังกล่าวจึงมีการปรับวิธีการทดลอง โดยการนำรากหอมไปเพาะในน้ำเป็นเวลา 1-2 วัน หรือจนกระทั่งรากมีความยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร แล้วจึงย้ายรากหอมไปแช่ในสารที่ใช้ทดสอบเป็นเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงศึกษาอัตราการเจริญของราก อัตราการแบ่งเซลล์และความผิดปกติของโครโมโซม [11,12,18] การศึกษาอัตราการเจริญของรากและอัตราการแบ่งเซลล์ เป็นการศึกษาความเป็นพิษในระดับเซลล์ หรือ cytotoxic ส่วนการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมเป็นการศึกษาความเป็นพิษในระดับพันธุกรรม หรือ genotoxic

การศึกษาการเจริญของราก ทำได้โดยการวัดความยาวของรากที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากที่นำรากหอมไปแช่ในสารที่ใช้ทดสอบครบตามกำหนดเวลาที่ใช้ทดลอง (24 48 หรือ 72 ชั่วโมง) แล้วเปรียบเทียบความยาวของรากที่เปลี่ยนแปลงไปกับชุดควบคุม (แช่รากในน้ำ) เพื่อวิเคราะห์ผลการทดลองว่าเมื่อรากหอมได้รับสารที่ใช้ทดสอบแล้ว สารดังกล่าวส่งผลต่ออัตราการเจริญของรากหรือไม่ ทั้งนี้อาจศึกษาอัตราการเจริญของรากในรูปของค่า effective concentration (EC_{50}) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้รากหอมมีความยาวลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบอัตราการเจริญของรากด้วยวิธีการทางสถิติได้ง่ายขึ้น [13, 16, 17, 18]

การศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์และความผิดปกติของโครโมโซม สามารถใช้ตัวอย่างเดียวกับการศึกษาอัตราการเจริญของราก โดยหลังจากวัดความยาวรากแล้ว เก็บตัวอย่างรากจากชุดการทดลองต่าง ๆ รวมทั้งชุดควบคุมลงในสารละลาย fixative (ประกอบด้วยเอทานอลและกรดอะซิติกในอัตราส่วน 3:1) เพื่อศึกษาการแบ่งเซลล์ต่อไป [9, 16] โดยการนำรากที่อยู่ในสารละลาย fixative มาเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาการแบ่งเซลล์ตามวิธีการของ Sharma และ Sharma [19] ดังนี้ นำรากจากสารละลาย fixative ไปแช่ในสารละลาย 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นนำรากมาวางบนสไลด์แล้วตัดปลายรากยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร หยดสารละลาย 1% aceto orcein ลงบนราก ใช้เข็มเขี่ยทำให้ปลายรากแยกออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วปล่อยให้รากอยู่ในสารละลาย 1% aceto orcein เป็นเวลา

ประมาณ 5-10 นาที ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์และกดเบาๆ แล้วนำสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์และความผิดปกติของโครโมโซมจากปลายรากหอมของแต่ละชุดการทดลองนั้น จะศึกษาจากเซลล์จำนวน 500-10,000 เซลล์ ที่ได้จากตัวอย่างราก 3-5 ราก ของหัวหอม 1 หัว และศึกษาจากหัวหอม 1-5 หัว [9, 12, 18]

การศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์ ทำได้โดยการสุ่มนับเซลล์บนสไลด์ให้ได้จำนวน 500-10,000 เซลล์ และแยกกลุ่มของเซลล์ที่นับได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เซลล์ที่อยู่ในระยะอินเทอร์เฟส และเซลล์ที่อยู่ในระยะของการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิส ซึ่งประกอบด้วยระยะโพรเฟส เมทาเฟส แอนาเฟส และเทโลเฟส จากนั้นนำจำนวนเซลล์ที่นับได้มาคำนวณหาค่า mitotic index (MI) โดยการนำจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิส หารด้วยจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้ดังนี้

$$mitotic\ index = \frac{total\ number\ of\ cells\ in\ mitosis}{total\ number\ of\ cells\ observed} \times 100$$

จากนั้นใช้วิธีการทางสถิติเปรียบเทียบค่า mitotic index ที่ได้จากแต่ละชุดการทดลองรวมทั้งชุดควบคุมก็จะทำให้ทราบว่าสารที่ใช้ทดสอบส่งผลกระทบต่ออัตราการแบ่งเซลล์หรือไม่ หากค่า mitotic index ของชุดทดลองสูงกว่าชุดควบคุม แสดงว่าสารที่ใช้ทดสอบไปกระตุ้นการแบ่งเซลล์ แต่หากค่า mitotic index ของชุดทดลองต่ำกว่าชุดควบคุม แสดงว่าสารที่ใช้ทดสอบไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้อาจพบความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ ซึ่งสามารถเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีความผิดปกติของแต่ละชุดการทดลองด้วยการคำนวณค่า abnormality index โดยการนำจำนวนเซลล์ที่พบความผิดปกติ หารด้วยจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้ดังนี้

$$abnormality\ index = \frac{total\ number\ of\ abnormal\ cells}{total\ number\ of\ cells\ observed} \times 100$$

จากนั้นใช้วิธีการทางสถิติเปรียบเทียบค่า abnormality index ที่ได้จากแต่ละชุดการทดลองก็จะทำให้ทราบว่าสารที่ใช้ทดสอบส่งผลกระทบต่ออัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมหรือไม่ หากค่า abnormality index ของชุดทดลองสูงกว่าชุดควบคุม แสดงว่าสารที่ใช้ทดสอบมีผลต่อการเกิดความผิดปกติของโครโมโซม ซึ่งความผิดปกติของโครโมโซมที่พบมีได้หลายแบบ เช่น chromosome bridge, laggard chromosome, chromosome fragment และ micronucleus เป็นต้น โดยความผิดปกติของโครโมโซมที่แตกต่างกันเหล่านี้ อาจช่วยอธิบายถึงกลไกของสารที่ใช้ทดสอบไปทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมได้ [9, 10, 12, 17, 18]

รูปแบบความผิดปกติของโครโมโซมที่พบจากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี *Allium cepa* test

เซลล์ที่มีโครโมโซมผิดปกติ คือ เซลล์ที่โครโมโซมมีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม หรือเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างไปจากเดิม โดยความผิดปกติของโครโมโซมอาจเกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ ซึ่งเกิดขึ้นได้ในอัตราที่น้อยมาก หรืออาจเกิดจากการถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีหรือปัจจัยแวดล้อม ซึ่งการกระตุ้นดังกล่าวอาจส่งผลให้เกิดการขาดของดีเอ็นเอ หรือการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติกับโครงสร้างของโครโมโซม นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เกิดการแยกกันอย่างผิดปกติของโครโมโซม ส่งผลให้เซลล์มีจำนวนโครโมโซมที่ผิดปกติ สำหรับการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์จากปลายรากหอมที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี *Allium cepa* test นั้น เริ่มนำมาใช้โดย Fiskesjo [13] ซึ่งจะพบความผิดปกติของโครโมโซมได้ในระยะต่างๆ ของการแบ่งนิวเคลียส โดยสารที่ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ clastogen และ aneugen สำหรับ clastogen เป็นสารที่ทำให้เกิดการขาดของโครโมโซม ซึ่งส่งผลให้เกิดความผิดปกติแบบต่างๆ ที่จะนำไปสู่การเกิดความผิดปกติ กับโครงสร้างของโครโมโซม เช่น chromosome bridges และ chromosome breaks ส่วน aneugen เป็นสารที่ก่อให้เกิดผลกระทบกับกระบวนการแบ่งเซลล์ รวมถึงทำให้เกิดการทำงานผิดพลาดของ spindle fiber ซึ่งส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบต่างๆ ที่จะนำไปสู่การเกิดความผิดปกติของจำนวนโครโมโซม เช่น c-metaphase, stickiness และ laggards chromosome [10, 13, 20]

สำหรับลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมที่พบได้จากการตรวจสอบความเป็นพิษของสารด้วยวิธี *Allium cepa* test มีดังนี้ (รูปที่ 1)

1. chromosome bridges เป็นความผิดปกติของโครโมโซมที่พบได้ในระยะแอนาเฟส โดยมีลักษณะของโครโมโซมที่เชื่อมอยู่ระหว่างขั้วเซลล์ทั้งสองคล้ายสะพาน ซึ่งเกิดจากโครโมโซมที่มีโครงสร้างเป็น dicentric คือมีเซนโทรเมียร์อยู่ 2 ตำแหน่งใน 1 โครโมโซม ความผิดปกติของโครโมโซมแบบนี้ เกิดขึ้นได้จากการขาดของโครโมโซม แล้วส่งผลให้เกิด unequal translocation หรือ inversion [13, 18, 20, 21, 22, 23]

2. chromosome fragments หรือ acentric fragments เป็นความผิดปกติที่พบว่าโครโมโซมไม่มีเซนโทรเมียร์ ซึ่งเกิดขึ้นจากการขาดของโครโมโซม [13, 22]

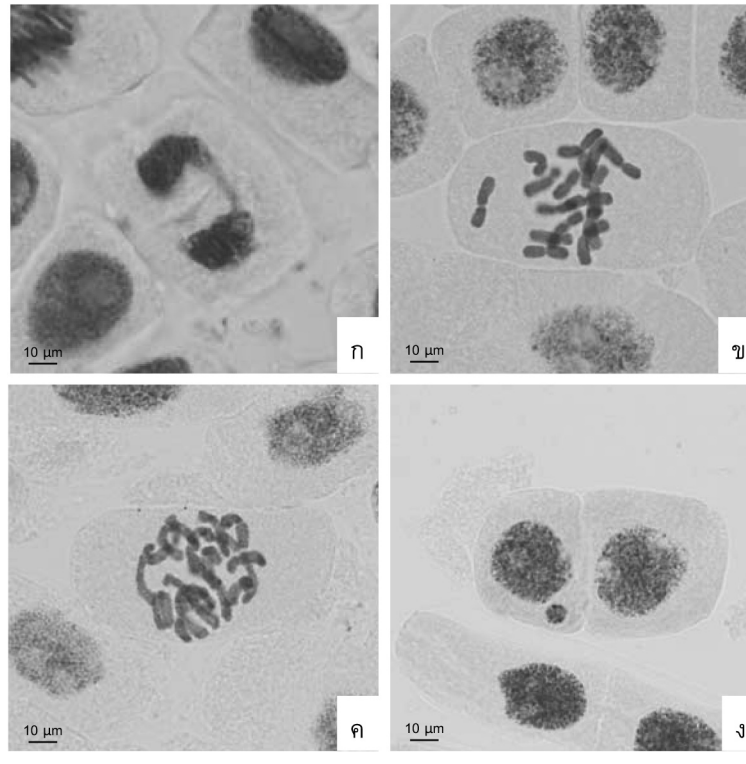
3. lagging chromosome หรือ laggards เป็นความผิดปกติของโครโมโซมที่พบได้ในระยะเมทาเฟสและแอนาเฟส โดยมีลักษณะเป็นโครโมโซมที่แยกออกจากกลุ่มของโครโมโซมอื่นในนิวเคลียส เกิดขึ้นจากการไม่เคลื่อนที่ของโครโมโซม เนื่องจากไม่มี spindle fiber มาจับที่โครโมโซมดังกล่าว [20, 21, 23]

4. stickiness เป็นความผิดปกติของโครโมโซมที่มีลักษณะการเกาะติดกันของโครโมโซม เป็นผลจากความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดขึ้นในขณะที่เกิดการขดตัวของดีเอ็นเอ โดยอาจเกิดจากดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบของโครโมโซมถูกทำลาย และอาจนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด ความผิดปกติของโครโมโซมแบบนี้แสดงให้เห็นว่าสารที่ใช้ทดสอบมีความเป็นพิษในระดับสูง [13, 20, 22, 23]

5. c-mitosis เริ่มใช้ครั้งแรกโดย Levan ในปี ค.ศ. 1938 [15] โดยใช้เพื่ออธิบายว่า colchicine จะยับยั้งการสร้าง spindle fiber ความผิดปกติแบบนี้มักพบในระยะเมทาเฟส โดยโครโมโซม

ไม่มีทิศทางหรือตำแหน่งที่แน่นอนในเซลล์ เนื่องจากไม่มี spindle fiber มาจับ ทำให้เห็นโครโมโซมกระจายตัว ความผิดปกติแบบนี้เป็นความผิดปกติที่ไม่รุนแรง แต่อาจนำไปสู่การเกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบอื่น [7, 9, 15, 20, 23]

6. micronucleus เป็นความผิดปกติของโครโมโซมที่มักพบในระยะอินเทอร์เฟสและโพรเฟส โดยมีลักษณะเป็นนิวเคลียสขนาดเล็กที่แยกออกจากนิวเคลียสขนาดใหญ่ ซึ่งอาจเกิดจาก lagging chromosome หรือการขาดของ chromosome bridges ที่ทำให้เกิดเป็น chromosome fragments เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะเทโลเฟส lagging chromosome และ chromosome fragments ไม่สามารถเข้าไปรวมอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ลูกได้ เนื่องจากไม่ถูกจับด้วย spindle fiber จึงทำให้เกิดเป็นนิวเคลียสขนาดเล็กในเซลล์ลูก [18, 20, 21, 22, 23]



รูปที่ 1 ความผิดปกติของโครโมโซมแบบต่างๆ ได้แก่ (ก) chromosome bridges (ข) laggards (ค) c-mitosis และ (ง) micronucleus

ตัวอย่างการนำ *Allium cepa* test ไปใช้ประโยชน์

วิธี *Allium cepa* test เป็นการตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อความผิดปกติของสารพันธุกรรม ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบในเบื้องต้นที่ไม่มีความซับซ้อน ค่าใช้จ่ายต่ำ รวมถึงข้อดีอื่นๆ จึงมีการนำวิธีการนี้ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย ดังตัวอย่างต่อไปนี้

การตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อม ทั้งการปนเปื้อนของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมในแหล่งน้ำ การปนเปื้อนของสารพิษในน้ำทิ้งจากแหล่งชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม การปนเปื้อนของเถ้าถ่านในอากาศที่เกิดจากการเผาไหม้ของถ่านหิน ซึ่งจากการศึกษาในหลายรายงานพบว่าสารที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมีผลยับยั้งการเจริญของรากหอม ยับยั้งการแบ่งเซลล์ รวมถึงทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบต่างๆ ได้แก่ chromosome bridges, chromosome breaks, chromosome fragments, lagging chromosome, c-mitosis, stickiness และ micronucleus [21, 22, 24, 25, 26]

การตรวจสอบความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ สารกำจัดแมลง สารกำจัดเชื้อรา และสารกำจัดวัชพืช เช่น alachlor, benlate, flusilazole, illoxan, dichlorophen, dichlorovos, ethion, cypermethrin, fenvalerate, monocrotophos, phosalone, oxydementonmethyl, chlorpyrifos, alpha-thrin, efekto virikop และ springbok เป็นต้น พบว่าสารทั้งหมดที่ทำการทดสอบมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ของปลายรากหอม และทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบต่างๆ ต่อไปนี้ chromosome bridges, chromosome breaks, lagging chromosome, stickiness, c-metaphase, multipolar anaphase, ring chromosome, และ micronucleus [27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34] นอกจากการทดสอบความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชโดยตรงแล้ว ยังมีการทดสอบความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างอยู่ในผักและผลไม้ที่วางขายในตลาด พบว่าสารกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างที่สกัดได้จากผักและผลไม้มีผลทำให้พบความผิดปกติของโครโมโซมแบบ micronucleus มากขึ้น [4]

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากพืชซึ่งใช้เป็นพืชสมุนไพร เช่น *Campomanesia xanthocarpa* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในบราซิล ที่ใช้รักษาอาการท้องเสียและอาการติดเชื้อในกระเพาะอาหาร เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบ พบว่ามีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ของรากหอม รวมถึงทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบ chromosome bridges, chromosome breaks และ c-mitosis [35] Forskolin ซึ่งเป็นสารสกัดจาก *Coleus forskohlii* ที่ใช้เป็นพืชสมุนไพรในประเทศอินเดีย เพื่อรักษาอาการเกี่ยวกับความดันโลหิต เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบ พบว่ามีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์และส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมมากขึ้น โดยพบความผิดปกติของโครโมโซมแบบ chromosome bridges, chromosome breaks, chromosome fragments, lagging chromosome, stickiness, c-mitosis และ micronucleus [36]

การทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคนาโน ได้แก่ chitosan-coated silver nanoparticles, copper nanoparticles และ zinc nanoparticles พบว่า copper nanoparticles และ zinc nanoparticles มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ของรากหอม ส่วน chitosan-coated silver nanoparticles ที่มีความเข้มข้นสูงมีผลกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของรากหอม นอกจากนี้อนุภาคนาโนข้างต้นที่มีความเข้มข้นสูงยังส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมเพิ่มขึ้นด้วย โดยความผิดปกติของโครโมโซมที่พบคือ chromosome bridges, lagging chromosome, c-mitosis, stickiness และ micronucleus [6, 7, 8]

สรุป

การทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี *Allium cepa* test เป็นวิธีที่มีข้อดีอยู่หลายประการ ได้แก่ ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบต่ำกว่าวิธีการอื่น การจัดหาตัวอย่างหัวหอมในการทดสอบทำได้ง่าย วิธีการทดสอบไม่ยุ่งยากซับซ้อน มีความไวในการตรวจพบความเป็นพิษ และผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธีการอื่น นอกจากนี้การตรวจสอบผลของความเป็นพิษทำได้ 2 ระดับ คือ ระดับเซลล์และระดับโครโมโซม ถึงแม้ว่าการตรวจสอบความเป็นพิษในระดับโครโมโซม ผู้ทดลองต้องมีความรู้ทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพฤติกรรมของโครโมโซม ในขณะที่เกิดการแบ่งเซลล์ แต่การตรวจสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ ที่ตรวจสอบจากอัตราการเจริญของรากนั้น ไม่จำเป็นต้องใช้ความเชี่ยวชาญเฉพาะทางของผู้ทดลอง ดังนั้นวิธีการนี้จึงเป็นทางเลือกที่ดีเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม สารสกัดจากธรรมชาติ หรือสารเคมีอื่นๆ และใช้ข้อมูลที่ได้เพื่อเลือกวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษในเชิงลึกที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Tewari, S., Jindal, R., Kho, Y. L., Eo, S., and Choi, K. 2013. Major Pharmaceutical Residues in Wasterwater Treatment Plants and Receiving Waters in Bangkok, Thailand, and Associated Ecological Risks. *Chemosphere.* 91: 697-704.
2. Jaipieam, S., Visuthismajarn, P., Sutheravut, P., Siriwong, W., Thoumsang, S., Borjan, M., and Robson, M. 2009. Organophosphate Pesticide Residues in Drinking Water from Artesian Wells and Health Risk Assessment of Agricultural. *Human and Ecological Risk Assessment.* 15: 1304-1316.
3. Sangchan, W., Bannwarth, M., Ingwersen, J., Hugenschmidt, C., Schwadorf, K., Thavornyutikarn, P., Pansombat, K., and Streck, T. 2014. Monitoring and Risk Assessment of Pesticides in a Tropical River of an Agricultural Wastershed in Northern Thailand. *Environmental Monitoring and Assessment.* 186: 1083-1099.
4. Feretti, D., Serbini, I., Sani, C., Deretti, E., Moretti, M., and Monarca, S. 2007. *Allium cepa* Chromosome Aberration and Micronucleus Tests Applied to Study Genotoxicity for Extracts from Pesticide-treated Vegetables and Grapes. *Food Additives and Contaminants.* 24: 561-572.
5. Sapbamrer, R., and Hongsibsong, S. 2014. Organophosphorus Pesticide Residues in Vegetables from Farms, Markets, and Supermarket Around Kwan Phayao Lake of northern Thailand. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 67: 60-67.
6. Pensnya, D. S. 2013. Cytogenetic Effects of Chitosan-capped Silver Nanoparticles in the *Allium cepa* Test. *Caryologia: Internatioal Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetis.* 66: 275-281.

7. Nagaonkar, D., Shende, S., and Rai, M. 2015. Biosynthesis of Copper Nanoparticles and Its Effect on Actively Dividing Cells of Mitosis in *Allium cepa. Biotechnology Progress* Epub doi: 10.1002/btpr.2040.
8. Taranath, T. C., Patil, B. N., Santosh, T. U., and Sharath, B. S. 2015. Cytotoxicity of Zinc Nanoparticles Fabricated by *Justicia adhatoda* L. on Root Tips of *Allium cepa* L.-A Model Approach. *Environmental Science and Pollution Research* Epub doi: 10.1007/s11356-014-4043-9.
9. Fiskesjo, G. 1994. *Allium* test II: Assessment of a Chemical's Genotoxic Potential by Recording Aberrations in Chromosomes and Cell Divisions in Root Tips of *Allium cepa* L. *Environmental Toxicology and Water Quality.* 9: 235-241.
10. Leme, D. M., and Marin-Morales, M. A. 2009. *Allium cepa* Test in Environmental Monitoring: A Review on Its Application. *Mutation Research.* 682: 71-81.
11. Rank, J., and Nielsen, M. H. 1993. A Modified *Allium* Test as a Tool in the Screening of the Genotoxicity of Complex Mixtures. *Hereditas.* 118: 49-53.
12. Tedesco, S. B., and Laughinghouse, H. D. 2012. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. Available from: http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/bioindicator-of-genotoxicity-the-allium-cepa-test. 2 February 2015.
13. Fiskesjo, G. 1985. The *Allium* Test as Standard in Environmental Monitoring. *Hereditas.* 102: 99-112.
14. Fiskesjo, G. 1995. *Allium* test. In: O'Hare, S., and Atterwill, C. K., Editors. Methods in Molecular Biology Vol. 43 *in vitro* Toxicity Testing Protocols. Totowa, NJ. Humana Press Inc. p. 119-127.
15. Levan, A. 1938. The Effect of Colchicine on Root MitosIs in *Allium. Hereditas.* 24: 471-486.
16. Fiskesjo, G. 1993. *Allium* test I: A 2-3 Day Plant Test for Toxicity Assessment by Measuring the Mean Root Growth of Onions (*Allium cepa* L.). *Environmental Toxicology and Water Quality.* 8: 461-470.
17. Rank, J. 2003. The Method of *Allium* Anaphase-telophase Chromosome Aberration Assay. *Ekologija (Vilnius)* 1: 38-42.
18. Barberio, A., Voltolini, J. C., and Mello, M. L. S. 2011. Standardization of Bulb and Root Sample Sizes for the *Allium cepa* Test. *Ecotoxicology.* 20: 927-935.
19. Sharma, A. K., and Sharma, A. 1999. Plant Chromosomes : Analysis, Manipulation and Engineering. Amsterdam, The Netherlands. Harwood academic publishers. p. 89-91.
20. Khanna, N., and Sharma, S. 2013. *Allium cepa* Root Chromosomal Aberration Assay : A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research.* 1: 105-119.

21. Akinsemolu, A. A., Nwangburuka, C. C., and Ogunwenmo, K. O. 2015. Evaluation of Tobacco Industrial Wastewater for Genotoxic Characteristics on *Allium cepa* L. Root Cell Mitosis. *Journal of Advances in Biology and Biotechnology.* 2: 165-173.
22. Olorunfemi, D., Duru, E., and Okieimen, F. 2012. Induction of Chromosome Aberrations in *Allium cepa* L. Root Tips on Exposure to Ballast Water. *Cytologia.* 65: 147-151.
23. Rieger, R., Michaelis, A., and Green, M. M. 1976. Glossary of Genetics and Cytogenetics. New York. Springer-Verlag. p. 91, 110, 326, 356, 517.
24. Fiskesjo, G. 1985b. *Allium* Test on River Water from Braan and Saxan Before and After Closure of Chemical Factory. *Ambio.* 14: 99-103.
25. Nielsen, M. H., and Rank, j. 1994. Screening of Toxicity and Genotoxicity in Wasterwater by the Use of the *Allium* Test. *Hereditas.* 121: 249-254.
26. Chakraborty, R., Mukherjee, A. K., and Mukherjee, A. 2009. Evaluation of Genotoxicity of Coal Fly Ash in *Allium cepa* Root Cells by Combining Comet Assay with the *Allium* Test. *Environmental Monitoring and Assessment.* 153: 351-357.
27. Asita, A. O., and Makhalemele, R. 2008. Genotoxicity of Chlorpyrifos, Alpha-thrin, Efekto Virikop and Springbok to Onion Root Tip Cells. *African Journal of Biotechnoloty.* 7: 4244-4250.
28. Rao, B. V., Sharma, C. B. S. R., and Rao, B. G. S. 1987. Cytological Effects of Organophosphorus Insecticides on *Allium cepa* Root Meristems. *Cytologia.* 52: 365-371.
29. Chauhan, L. K. S., Saxena, P. N., and Gupta, S. K. 1999. Cytogenetic Effects of Cypermethrin and Fenvalerate on the Root Meristem Cells of *Allium cepa. Environmental and Experimental Botany.* 42: 181-189.
30. Lamsal, K., Ghimire, B. K., Sharma, P., Ghimiray, A. K., Kim, S. W., Yu, C. Y., Chung, I. M., Lee, Y. S., Kim, J., and Shakya, S. R. 2010. Genotoxicity Evaluation of the Insecticide Ethion in Root of *Allium cepa* L. *African Journal of Biotechnology.* 9: 4204-4210.
31. Shaikh, S., Nazam, N., Lone, M. I., and Ahmad, W. 2012. Dichlorophen and Dichlorovos Mediated Genotoxic and Cytotoxic Assessment on Root Meristem Cells of *Allium cepa. Science Diliman.* 24: 13-22.
32. Yuzbasioglu, D., Unal, F., and Sancak, C. 2009. Genotoxic Effects of Herbicide Illoxan (Diclofop-methyl) on *Allium cepa* L. *Turkish Journal of Biology.* 33: 283-290.
33. Dane, F., and Dalgic, O. 2005. The Effects of Fungicide Benomyl (Denlate) on Growth and Mitosis in Onion (*Allium cepa* L.) Root Apical Meristem. *Acta Biological Hungarica.* 5: 119-128.
34. Ozakca, D. U., and Silah, H. 2013. Genotoxicity Effects of Flusilazole on the Somatic Cells of *Allium cepa. Pesticide Biochemistry and Physiology.* 107: 38-43.

35. Pastori, T., Flores, F. C., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Silva, C. B., Canto-Dorow, T. S., and Tedesco, S. B. 2013. Genotoxic Effects of *Campomanesia xanthocarpa* Extracts on *Allium cepa* Vegetal System. *Pharmaceutical Biology.* 51: 1249-1255.
36. Mohammed, K. P., Aarey, A., Tamkeen, S., and Jahan, P. 2015. Forskolin : Genotoxicity Assessment in *Allium cepa. Mutation Research.* 777: 29-32.

ได้รับบทความวันที่ 26 มีนาคม 2558
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 24 เมษายน 2558