บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมพืช

การตรวจสอบมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตถือได้ว่าเป็นวิธีการประเมินอันตรายที่ตรงไปตรงมาเพราะเป็นการประเมินพิษของสารประกอบรวมของของเสียทั้งหมดในดิน ในน้ำ หรือในอากาศได้โดยไม่มีความจำเป็นต้องรู้องค์ประกอบทางเคมี (Chandra *et al.*, 2005) โดยหากมลพิษดังกล่าวสามารถทำให้สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ก็ถือได้ว่าเป็นสภาวะอันตรายจึงไม่จำเป็นต้องสนใจว่ามีสารชนิดใดปะปนอยู่ สิ่งมีชีวิตที่มีรายงานว่าสามารถนำมาใช้เป็นตัวตรวจสอบมีหลายประเภท เช่นไส้เดือนดิน หนู ปลานิล เซลล์เม็ดเลือดขาวของคน และเซลล์เพาะเลี้ยงอื่นๆเป็นต้น (Espinoza-Navarro and Bustos-Obregon, 2005; Ciranni *et al.* 1995; Cavas and Gozukara, 2003; Hongping *et al.* 2006; Lu *et al.*, 2004)

ด้วยเหตุผลที่มีรายงานจากนักวิจัย (Grant,1978; Fiskesjo, 1985 ; Kristen, 1997; Saxena *et al.*, 2005 Dimitrov *et al.*, 2006)พบว่ามีพืชบางชนิดมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมได้เช่นเดียวกันกับสัตว์ที่กล่าวมา ทั้งนี้เนื่องจากมีผลการศึกษาบ่งชี้ว่าการใช้พืชเป็นตัวตรวจสอบจะให้ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกับการทดลองในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและ eukaryote อื่น ๆ และประการสำคัญคือพืชจะมีความไวต่อสารทดสอบสูง (Fusconi *et al.*, 2006)

ชนิดพืชที่นิยมใช้ประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม

พืชที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ประเมินมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมีมากมายหลายชนิด เช่น หอมหัวใหญ่ (*Allium cepa*) ถั่วปากอ้า (*Vicia faba*) พืชกลุ่ม Tradescantia ข้าวโพด (*Zea mays*) ถั่วลันเตา (*Pisum sativum*) และข้าว (*Oryza sativa*) และพืชอื่นๆที่ได้รับการทดสอบแล้วว่ามีความไวต่อสารทดสอบ ตรวจหาโครโมโซมได้ง่าย โครโมโซมขนาดใหญ่และมีจำนวนไม่มากนัก ซึ่งมีรายละเอียดการตรวจสอบดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดพืช ชนิดสารทดสอบและวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมพืช

ชนิดพืช	สารที่ทดสอบ	วิธีการที่ตรวจสอบ	ผู้ศึกษา
Allium cepa	N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, ethyl methanesulfonate	Telophase root tip chromosome aberration assay	Rank and Nielsen, 1997

ชนิดพืช	สารที่ทดสอบ	วิธีการที่ตรวจสอบ	ผู้ศึกษา
Hordium vulgare	Environmental aneuploid inducing agents	Test the ability to induce microtubule disruption in mitotic meristematic root cells	Voutsinas, 1997
Hordium vulgare	Calcium, Zine, Selenium against Cadmium	- Chromosomal aberration assay - Micronucleus assay	Zhang and Xiao, 1998
Allium cepa	Soil of inhibited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident	- Mitotic index - Chromosomal aberration	Kovalchuk *et al.*, 1998
Allium cepa, Vicia faba, Tradescantia	Contaminated Soil	- Micronucleus assay	Cotelle *et al.*, 1999
Allium cepa	Cypermethrin and fenvalerate (insecticides)	- Mitotic index - Mitotic aberration - EC_{50}	Chauhan *et al.*, 1999
Allium cepa	Sewage, and industrial effluent from Amritsar, India	- Anaphase aberration - Micronucleus assay	Grover and Kaur, 1999
Pisum sativum	Environmental mutagen	- Chromosome aberration assay	Grant, 2001
Allium cepa	Neem extract from leaves, kernels and seed coats	- Chromosome aberration assay	Soliman, 2001
Allium cepa	Pentachlorophenol, 2-4-D and butachlor in environmental pollutant	- Chromosome aberration assay (EC_{50}, c-mitosis, stickiness, chromosome breaks, mitotic index)	Farah *et al.*, 2002

ชนิดพืช	สารที่ทดสอบ	วิธีการที่ตรวจสอบ	ผู้ศึกษา
Allium cepa	Industrial wastewater	- Chromosome aberration assay - Micronucleus assay	El-Shahaby *et al.*, 2003
Tradescantia spp.	Volatile organic compounds in a chemical factory	- Micronucleus assay - Chemical analysis	Kim *et al.*, 2003
Allium sativa *Vicia faba*	Suffer dioxide (SO_2) and its hydrates	- Micronucleus assay - Cell kinetics pycnosis and anaphase aberration assay	Yi and Meng, 2003
Oryza sativa	Aluminium	- Mitotic activity - 4C DNA content - Pollen sterility	Mohanty *et al.*, 2004
Allium cepa *Vicia faba*	Industrial effluents	- Chromosome and nuclear abnormalities	Abdel Migid *et al.*, 2005
Allium cepa	Leachates from solid waste of two industries	- Mitotic index - Chromosomal/mitotic aberrations - Micronuclei assay	Chandra *et al.*, 2005
Allium cepa	Heavy metal and cyanide contaminated river water in Bulgaria	- Mitotic index - Chromosome aberration - c-mitosis effect	Ivanova *et al.*, 2005
Hordeum vulgare	Cadmium pollution	- Random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles	Liu *et al.*, 2005
Allium sativum	Pyrethroid insecticide Cypermetrin 1, 2, 4, 8 and 16 ppm	- ศึกษา EC_{50} - Mitotic index - Mitotic and chromosomal aberration	Saxena *et al.*, 2005

ชนิดพืช	สารที่ทดสอบ	วิธีการที่ตรวจสอบ	ผู้ศึกษา
Hordeum vulgare	Sulfer dioxide hydrates (common air pollutant)	- Sister chromatid exchange test - Micronucleus	Yi *et al.* 2005
Pisum sativum	$CdCl_2$ 2.5, 25 and 250 μM	- Root length - Mitotic activity and aberrations - Nucleus ploidy	Fusconi *et al.*, 2006
Zea mays	Chemicals and radiations	- Gene mutation - Chromosome aberration - Mitotic aberration - Aneuploid, polyploidy - Stromatal aberration	Grant and Owens, 2006
Trifolium repens	Air quality in Italian province of Novara	- Amplified fragment length polymorphism (AFLP) molecular markers	Pirano *et al.*, 2006
Allium cepa	Chemical for food preservation (sodium benzoate, boric acid citric acid, potassium citrate, sodium citrate)	- Mitotic index - Chromosomal aberration	Turkyglu, 2006
Allium cepa	Aqueous extract of five medicinal plants	- Root growth inhibition - EC_{50} - Mitotic index - Chromosome aberration assay	Akinboro and Bakare, 2007

วิธีการประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมพืช

การประเมินความเป็นพิษของสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อสารพันธุกรรมพืชนั้นมีหลากหลายวิธีการนับแต่วิธีการที่ไม่ซับซ้อน เช่น **Mitotic inhibition assay** ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบการยับยั้งการแบ่งเซลล์บริเวณปลายราก ของพืชโดยค่าที่ใช้บ่งชี้ความผิดปกติคือ mitotic index ซึ่ง

หมายถึงปริมาณเซลล์ที่อยู่ในช่วงที่มีการแบ่งเซลล์และค่า phase index ซึ่งแสดงถึงปริมาณเซลล์ที่อยู่ในระยะใดระยะหนึ่งต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ศึกษา 100 หรือ 1000 เซลล์

Chromosome aberration assay เป็นวิธีการนับจำนวนเซลล์ที่พบความผิดปกติของนิวเคลียส เช่น micronucleus binucleus trinucleus และเซลล์ที่มีความผิดปกติของโครโมโซมชนิดต่างๆ ได้แก่ chromosome disturb, anaphase หรือ telophase bridge, chromosome fragment และ lagging chromosome โดยนับเซลล์ที่มีความผิดปกติทุกรูปแบบต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด 100 หรือ 1000 เซลล์ (สุพรรณญิกา และวิมล, 2550) (ข้อมูลจากตารางที่ 1)

สำหรับวิธีการประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมพืชวิธีอื่นๆนั้น อาจจะต้องการเครื่องมือเครื่องใช้สารเคมีและผู้เชี่ยวชาญในการดำเนินการดังนั้นจึงเป็นวิธีที่ยุ่งยากซับซ้อนกว่าเช่น

Comet assay หรืออาจเรียกชื่ออื่นๆว่าวิธี single cell gell assay (SCG) หรือ microgel electro phoresis (MGE) เป็นวิธีการที่เชื่อว่าตรวจสอบการแตกหักของโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตได้รวดเร็วมีการนำมาใช้ครั้งแรกประมาณปี 1995 เป็นต้นมา หลักการของวิธีนี้คือการแยกเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ออกเป็นเซลล์เดี่ยว และทำให้เซลล์เหล่านี้กระจายตัวอยู่ใน agarose gel ที่เคลือบไว้บาง ๆบนแผ่นสไลด์ จากนั้นทำให้เซลล์แตกแล้วนำไปแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis และย้อมดีเอ็นเอด้วย fluorescent DNA binding dye ซึ่งหากมีดีเอ็นเอที่คลายเกลียวและดีเอ็นเอที่แตกหักดีเอ็นเอเหล่านี้จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอรูปแบบอื่น เมื่อศึกษาเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนจะได้ภาพของนิวเคลียสที่มีลักษณะคล้ายดาวหาง โดยพบว่าถ้าวัดความยาวของส่วนหางได้ค่ามากแสดงว่าเกิดการแตกหักของโครโมโซมจำนวนมาก (Shama and Sharma, 1999) ตัวอย่างการใช้เทคนิค Comet assay เพื่อตรวจสอบระดับการถูกทำลายของสารพันธุกรรมในพืชได้แก่การทดลองของ Seth *et al.* (2008) ศึกษาพิษของแคดเมียมความเข้มข้น 10, 20 และ 40 μM ที่มีผลต่อสารพันธุกรรมของรากหอม *Allium cepa* และพบว่าแคดเมียมที่ 40 μM มีค่า tail length และ tail moment เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และรวมถึงการมีผลทำให้ mitotic index ลดลงและเพิ่มค่า mitotic aberrations อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) ด้วย

Gichner *et al.* (2008) ศึกษาผลของแคดเมียม ethyl methanesulfonate (EMS) และ γ-rays ที่มีผลต่อสารพันธุกรรมของมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L. Cultivar Korela) โดยตรวจด้วยเทคนิค Comet assayพบว่าความเข้มข้นของแคดเมียมมีผลต่อการถูกทำลายของ DNA เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ราก และไม่พบการทำลาย DNA เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ของใบเมื่อใช้เวลาการทดสอบ 24 ชม. แต่ถ้าเพิ่มเวลาการทดสอบเป็น 2 สัปดาห์จะมีการเพิ่มของปริมาณ DNA ที่ถูกทำลายซึ่งรวมไปถึงการเกิด necrotic และ apoptotic DNA fragment ด้วยหรืออาจกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของแคดเมียมที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเติบโตของพืชสำหรับ ethyl methane-sulfonate และ γ-rays ก็มีผลทำให้เกิดการทำลาย DNA เช่นกัน

มีการศึกษาการถูกทำลายของ DNA ในเซลล์ของใบวัชพืช 10 ชนิดเมื่อได้รับ ethyl methanesulfonate (EMS) ความเข้มข้น 2-10 μM พบการถูกทำลายของ DNA ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยค่า tail moment และ head extent parameter (Gichner and Muhlfeldova, 2002)

Ruciriska *et al.*, 2004. ศึกษาผลของตะกั่ว (Pb^{2+}) 150 และ 350 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ามีผลยับยั้งการเจริญของราก 50% และ 70% และประเมินการถูกทำลายของ DNA ด้วยเทคนิค Comet assay พบค่า tail area เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับปริมาณตะกั่วภายในรากและมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับการถูกทำลายของราก

Gene loci testing เป็นการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งซึ่งเป็นผลมาจากการที่มลพิษนั้นมีคุณสมบัติทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้มากน้อยเพียงใด โดยข้อจำกัดของการตรวจสอบในรูปแบบนี้ได้แก่การที่ผู้ประเมินจะต้องมีข้อมูลว่ายีนที่ศึกษาจะแสดงฟีโนไทป์อย่างไรและถ้ายีนดังกล่าวเกิดการกลายจะแสดงฟีโนไทป์ใด รวมถึงวิธีการตรวจสอบฟีโนไทป์ดังกล่าวด้วย ตัวอย่างเช่น การศึกษาการกลายพันธุ์ในข้าวโพดที่เรียกว่า waxy locus test และ Yg-2 locus test สำหรับ waxy locus test อาศัยความรู้ที่ว่า waxy gene ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 9 ยีนเด่น Wx จะทำให้มีการสร้างแป้งที่มีส่วนประกอบของ amylose กับ amylopectin ส่วนข้าวโพดที่มีจีโนไทป์ wxwx จะไม่มีการสร้าง amylose เมื่อนำละอองเรณูมาย้อมด้วยสารไอโอดีนจะพบว่าละอองเรณูที่มี amylose จะติดสีน้ำเงินดำแต่ถ้าไม่มี amylose จะติดสีน้ำตาลหรือแดง และด้วยเหตุที่ละอองเรณูนั้นมีสภาพเป็น haploid cell ซึ่งจะแสดงลักษณะออกมาตามชนิดของอัลลีลที่มีอยู่ ทำให้สามารถตรวจสอบชนิดของแป้งได้ง่ายซึ่งจะชี้ให้เห็นว่ามีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นมากน้อยเพียงใด ยีนอีกตำแหน่งหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้แก่ยีน Yg-2 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 9 ในข้าวโพดเช่นเดียวกัน ยีนดังกล่าวควบคุมลักษณะสีใบซีดเหลืองหรือใบสีเขียว ในต้นที่มีจีโนไทป์ Yg-2/Yg-2 มีใบสีเขียวเช่นเดียวกับต้นที่มีจีโนไทป์ Yg-2/yg-2 ในการวัดผลของมลพิษต่อการกลายของยีนดังกล่าวจะใช้เมล็ดข้าวโพดที่มีจีโนไทป์ Yg-2/yg-2 ให้สัมผัสกับมลพิษในสิ่งแวดล้อมโดยการแช่เมล็ด จากนั้นเพาะเมล็ดให้งอกและเลี้ยงใน growth chamber ที่อุณหภูมิ 28°C จนมีใบ 4-5 ใบ นำใบที่โตเต็มที่มาส่องดูภายใต้แสง UV ก็จะสามารถตรวจสอบได้ว่ามีใบสีเหลืองหรือสีเขียว นอกจากข้าวโพดแล้วยังสามารถนำพืชในสกุล *Tradescantia* มาใช้ในการตรวจสอบการกลายของยีนได้ด้วยวิธี Staminal hair method โดยอาศัยหลักที่การเปลี่ยนแปลงสีของเกสรตัวผู้ของพืชดังกล่าวจะมีความไวต่อสารก่อกลายพันธุ์ ถ้าเกสรตัวผู้มียีนที่ปกติจะมีสีน้ำเงิน แต่ถ้ายีนตำแหน่งนี้เกิดการกลายจะมีผลให้เกสรตัวผู้มีสีชมพู เป็นต้น (Sharma and Sharma, 1999)

การตรวจ sisterchromatid exchange : SCE ซึ่งเป็นการตรวจสอบการหักและการต่อชิ้นส่วนสลับกันระหว่างซิสเตอร์โครมาทิดของโครโมโซมเดียวกันวิธีการนี้สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้มลพิษในสิ่งแวดล้อมได้ สำหรับหลักการเริ่มด้วยการบ่มปลายรากในสารละลายที่มี Bromodeoxyuridine (BrdU), fluorodeoxyuridine (FdU) และ uridine (Urd) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำรากมาทดสอบ

กับสารที่คาดว่าจะมีฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์อีก 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาแช่ในน้ำที่มี thymidine (Thd) และ uridine (Urd) นำปลายรากที่ได้ไป pretreatment ตรึงเซลล์แล้วจึงย่อยผนังเซลล์ออก จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย hypotonic และหยดบนแผ่นสไลด์แล้วย้อมสี Giemsa เก็บผลโดยการตรวจนับ SCEs ต่อโครโมโซมในเซลล์ระยะเมทาเฟสที่มีโครโมโซมกระจายตัวดีอย่างน้อย 30 เซลล์ในแต่ละกลุ่มการทดลอง (Yi *et al.*, 2005)

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารปนเปื้อนหรือสารก่อกลายพันธุ์ได้ โดยพบว่าถ้าสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมจะทำให้เกิดขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอ หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในดีเอ็นเอ ซึ่งอาจทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะเปลี่ยนแปลงไป จะมีผลให้การเกิดแถบดีเอ็นเอ (DNA bands) ของพืชทดสอบภายหลังการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction : PCR) มีความแตกต่างจากดีเอ็นเอของพืชในกลุ่มควบคุม (Piraino *et al.*, 2006)

นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วยังมีวิธีอื่นๆอีก ได้แก่ การตรวจหา 4C DNA content ซึ่งใช้การย้อมสี Feulgen แล้ววัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย microspectrophotometer หรืออาจประเมินความผิดปกติของสารพันธุกรรมโดยการประมาณค่าปริมาตรของนิวเคลียส (nucleus volume) จากสูตร $4/3\ \pi r^3$ เมื่อ r คือความยาวของรัศมีนิวเคลียส (Mohanty *et al.*, 2004) เป็นต้น

การประเมินความเป็นพิษของสารปนเปื้อนด้วย genotoxicity testing ในพืช

โดยหลักการแล้วการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมจะเห็นผลได้ชัดเจนในเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งเซลล์ในขณะที่พืชทดสอบสัมผัสกับสารพิษ ซึ่งอาจได้แก่ บริเวณปลายราก และใบอ่อน หรือบริเวณดอกอ่อน เป็นต้น ดังนั้นวิธีการเตรียมพืชจึงขึ้นอยู่กับชนิดพืชที่เลือกใช้ เช่น หอม กระเทียม ซึ่งเป็นพืชหัว หรือพืชที่ใช้เมล็ด เช่น ข้าว ข้าวบาเล่ย์ ข้าวโพด และถั่วลันเตา โดยนิยมใช้วิธีกระตุ้นให้งอกรากในน้ำก่อนแล้วจึงนำไปทดสอบ แต่สำหรับพืชในสกุล *Tradescantia* จะใช้ส่วนของลำต้นแช่ในน้ำเพื่อให้รากงอกออกมาตามข้อ หรืออาจตรวจดูความผิดปกติของโครโมโซมภายในดอกอ่อนก็ได้เช่นกัน

ในการประเมินความเป็นพิษนั้นโดยทั่วไปจะใช้เวลาทดสอบซึ่งหมายถึงระยะเวลาที่พืชทดสอบสัมผัสกับสารที่ต้องการทดสอบนานประมาณ 24-48 ชั่วโมงเวลาทดสอบได้ดังกล่าวจะมีผลให้เนื้อเยื่อของพืชได้สัมผัสกับสารพิษยาวนานประมาณ 1-2 รอบของการแบ่งเซลล์ซึ่งจะทำให้สามารถสังเกตความผิดปกติของสารพันธุกรรมได้ดังกล่าวแล้ว อย่างไรก็ตามพบว่าสารบางชนิดอาจมีพิษรุนแรงต่อพืชทดสอบถึงระดับที่ทำให้พืชหยุดการแบ่งเซลล์ไปชั่วขณะในกรณีนี้ควรปล่อยให้รากฟื้นตัว (recovery) ในน้ำสะอาดเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงก่อนการเก็บผลการทดลอง

การตรวจสอบสารพิษที่ปนเปื้อนในอากาศ สำหรับวิธีดำเนินการกับพืชทดสอบจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและชนิดของสิ่งแวดล้อมที่ต้องการประเมินสารพิษที่ปนเปื้อน ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบ

สารระเหยประเภท toluene ที่ปนเปื้อนอยู่ในอากาศในบริเวณต่าง ๆ ของโรงงานผลิตสารเคมีรวม 3 จุด การทดลองนี้ใช้ส่วนลำต้นของว่านหัวใจม่วงที่มีช่อดอก แช่ในบีกเกอร์ที่มีสารละลายที่เป็นสารอาหารพืช (Hoagland) โดยนำบีกเกอร์ที่ใส่ต้นไม้ทดลองไปวางไว้ที่จุดกำหนดเป็นเวลา 2, 6 และ 9 ชั่วโมงที่ความสูงจากพื้น 1.40 เมตร ภายหลังจากปล่อยให้พืชทดสอบฟื้นตัวใน growth chamber เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงตัดดอกมาศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมและนิวเคลียส (Kim *et al.*, 2003)

การตรวจสอบสารพิษที่ปนเปื้อนในดิน มีการศึกษาดินจากบริเวณเมือง Metz ประเทศฝรั่งเศส โดยใช้พืช 3 ชนิด ได้แก่ ถั่วปากอ้า หอม และพืชในสกุล *Tradescantia* เป็นพืชทดสอบ ผู้วิจัยนำตัวอย่างดินมาจาก 2 แหล่งคือดินจากแหล่งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (ตัวอย่าง A) และดินจากแหล่งของเสียจากโรงงานถ่านหิน (ตัวอย่าง B) การเตรียมตัวอย่างดินใช้วิธีละลายดินด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ดิน 100 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตรจากนั้นเก็บสารละลายไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงนำน้ำดังกล่าวมาทดลองเลี้ยงพืชทดสอบแล้วจึงตัดปลายรากไปตรวจความผิดปกติของสารพันธุกรรมและการแบ่งเซลล์ (Cotelle *et al.*, 1999)

การตรวจสอบสารพิษที่ปนเปื้อนในน้ำ ในการเตรียมตัวอย่างน้ำเพื่อทดสอบการปนเปื้อนของมลพิษในน้ำ ทำได้โดยการเก็บตัวอย่างน้ำ นำมาวัดค่า pH และค่า EC (electrical conductivity) แล้วนำน้ำตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงพืชทดสอบตามเวลาที่กำหนด แล้วจึงดำเนินการเก็บผลการทดลอง โดยอาจวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำด้วย เช่น Cd และ Pb เป็นต้น (El-Shahaby *et al.*, 2003) หรืออาจใช้วิธีศึกษาผลของโลหะหนักและสารพิษอื่นๆ โดยไม่มีการวิเคราะห์ปริมาณสาร เช่น การศึกษาผลของโลหะหนักและ cyanide ที่ปนเปื้อนในแม่น้ำ 2 สายในประเทศ Bulgaria โดยใช้หอมเป็นพืชทดสอบ ซึ่งใช้วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำจากหลายๆ จุดของแม่น้ำ 2 สายคือแม่น้ำ Assarelska Reka และ Luda Yana นำน้ำตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงหอมแล้วจึงตัดปลายรากมาตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม (Ivanova *et al.*, 2005)

ผลของแคดเมียมต่อพืช

แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่พบอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในดิน และในน้ำ ส่วนใหญ่ของแคดเมียมที่พบดังกล่าวมักมาจากกระบวนการในโรงงานอุตสาหกรรม การใช้ปุ๋ยฟอสเฟตและยาฆ่าแมลงในระบบเกษตรกรรม รวมถึงกิจกรรมของมนุษย์ในปัจจุบันที่ทิ้งของเสียที่มีองค์ประกอบของแคดเมียมออกสู่สิ่งแวดล้อมในรูปของขยะ เช่น แบตเตอรี่จากรถยนต์ จากโทรศัพท์มือถือ ของเล่นเด็ก และจากเครื่องเล่นเกมส์เป็นต้น

สำหรับพืช แคดเมียมไม่ได้เป็นธาตุอาหารจำเป็นสำหรับพืช แต่หากมีแคดเมียมอยู่ในสิ่งแวดล้อม พืชจะดูดเข้าไปโดยเร็วทางรากซึ่งจะมีผลรบกวนกระบวนการนำเข้า การขนส่งและการใช้ธาตุอาหารอื่นๆ ของพืชด้วย (Das *et al.*, 1997) ความเป็นพิษของแคดเมียม พืชอาจแสดงออกทางสรีระเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์แสงการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ ซึ่งจะส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีน ไขมัน และ DNA

จากการศึกษาพิษของแคดเมียมต่อเซลล์บริเวณปลายรากพืชพบว่ามีผลทำให้รากเป็นสีน้ำตาลบิดตัว ลดจำนวนรากแขนงและลดอัตราการเจริญของเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายรากและรวมถึงการเจริญของปลายยอดด้วย และนอกจากนี้อาจพบความผิดปกติของสารพันธุกรรมเกิดขึ้น เช่น การเกิด c-mitosis, anaphase bridge, sticky chromosome, chromosome disturb และ micronucleus, (Wojcik and Tukendorf, 1999; Zhang and Yang, 1994; Fiskesjo, 1997; Panda and Panda, 2002)

Fusconi *et al.*, 2006 ศึกษาผลของแคดเมียมความเข้มข้น 0.0, 2.5, 25และ 250 μM โดยใช้รากของต้นอ่อนพืชตระกูลถั่ว *Pisum sativum* เป็นพืชทดลองตัดรากหลังการให้สาร 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าแคดเมียมเป็นสาเหตุของการลดลงของความยาวรากโดยมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้น และมีการยับยั้งเกือบสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นของแคดเมียมเท่ากับ 250 μM โดยเซลล์ส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะ prophase สำหรับการให้สารละลายแคดเมียม 24 และ 48 ชั่วโมงจะให้ผลในทิศทางเดียวกัน และนอกจากนี้ผลการศึกษาที่ความเข้มข้นระดับต่ำคือ 0.0, 0.25, 0.5 และ 1.0 μM ยังพบว่าจะไม่มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์แต่จะทำให้เกิดความผิดปกติชนิด sticky metaphase และ anaphase bridge และเพิ่มอัตราการเกิด 4-C nucleus

ความสำคัญของสะเดา

ในประเทศไทยมีพืชจำพวกสะเดาอยู่ 3 ชนิด คือสะเดาไทย (*Azadirachta siamensis* หรือ *A. indica* var. siamensis) สะเดาอินเดีย (*A. indica)* และสะเดาช้าง *(A. excels)* สำหรับสะเดาไทยเข้าใจกันว่าเป็นพืชพื้นเมืองของไทยที่อาจกลายพันธุ์มาจากสะเดาอินเดียจึงมีลักษณะโดยรวมคล้ายกับสะเดาอินเดีย แต่ก็ยังมีบางลักษณะที่มีความแตกต่างกัน การกระจายตัวของสะเดาไทยพบได้มากในภาคกลางและภาคเหนือตอนล่าง ส่วนสะเดาอินเดียพบมากบริเวณชายทะเล เช่นชะอำ บางแสน พัทยา สำหรับสะเดาช้างพบว่ามีการเติบโตได้ดีทางภาคใต้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันสามารถพบสะเดาไทยและสะเดาอินเดียกระจัดกระจายอยู่ทั่วไปทั้งภาคเหนือ ภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือรวมถึงมีการนำสะเดาช้างไปปลูกเชิงธุรกิจได้ทั้งภาคเหนือและภาคอีสานโดยเฉพาะบริเวณที่มีความชุ่มชื้นสูง (ขวัญชัย , 2542)

ประโยชน์ของสะเดา

เนื่องจากเข้าใจกันว่าสะเดาเป็นพืชพื้นเมืองของอินเดียและมีการแพร่กระจายไปในกลุ่มประเทศในทวีปเอเชีย ดังนั้นชาวอินเดียจึงรู้จักใช้ประโยชน์จากสะเดามาหลายร้อยปีแล้ว โดยใช้เป็นยารักษาโรค ใช้บำรุงสุขภาพ ทำสบู่ ทำเครื่องสำอาง ทำอาหารสัตว์ และเป็นสารป้องกันกำจัดแมลงเป็นต้น นอกเหนือไปจากการใช้เนื้อไม้เพื่อเป็นที่อยู่อาศัย ทำเฟอร์นิเจอร์ ทำเสาเข็ม ประตู วงกบ ใช้ต่อเรือ ทำของเล่น อุปกรณ์การเกษตร และการทำภาชนะใส่ของ (ขวัญชัย, 2542; Schmutterer *et.al.* 1981; Schmutterer and Ascher, 1984, 1987; Jacobson, 1986) และนอกเหนือจากสิ่งที่กล่าวมายังมีรายงานการใช้สารสกัดจากใบสะเดาลดพิษที่ทำให้สารพันธุกรรมของปลาเกิดการแตกหัก (antimutagenic activity) อันเกิดจากสาร Pentachlorophenol (PCP) และ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) (Farah *et al.*,

2005) และรวมถึงการลดพิษของ $CdCl_2$ โดย azadirachtin ซึ่งตรวจสอบโดยการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซม และลักษณะของนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง ความผิดปกติของรูปร่างสเปิร์ม ปริมาณและคุณภาพของโปรตีนในปลาได้อีกด้วย (Chandra and Khuda-Bukhsh, 2004)

ใบสะเดา โดยทั่วไปใช้รับประทานเป็นพืชผักได้ ส่วนของใบมีรสขมประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น nimbin, nimbinene, nimbandiol, nimbolide, 6-desacetyl nimbinene และ quercetin สารเหล่านี้มีประโยชน์ในทางยารักษาโรค คนในประเทศอินเดียใช้ใบต้มน้ำอาบหลังจากเป็นโรคหัด อีสุกอีใส ใช้เป็นสารฟอกเลือด รักษาโรคหัวใจ วัณโรค ท้องร่วง โรคหิด เบาหวาน มาลาเรีย โรคผิวหนัง โรคเก๊าท์ และดีซ่าน นอกจากนี้ใบสะเดายังใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์หรือให้สัตว์ เช่น วัวและแพะกินใบสะเดาทันทีหลังจากการคลอดลูกเพื่อให้สัตว์เพิ่มปริมาณน้ำนม ใช้ป้องกันกำจัดแมลงในตู้เสื้อผ้าในเตียงนอน ในตู้หนังสือ และโรงเก็บเมล็ดพันธุ์ (Seliman, 2001)

สารสกัดใบสะเดามีรายงานว่าสามารถยับยั้งการสร้างสาร aflatoxin ด้วย ในวิถีชีวิตของคนอินเดียบางกลุ่มใช้ชาสะเดาเป็นยาบำรุงหรือใช้เป็นยาเม็ดคุมกำเนิดสำหรับผู้ชายที่ต้องการลดความสมบูรณ์ทางเพศ (ขวัญชัย, 2542; Shama, 1993; CSIR, 1955)

กิ่ง ชาวอินเดียที่มีฐานะยากจนใช้กิ่งอ่อนของสะเดาแทนแปรงและยาสีฟันซึ่งจะช่วยให้ฟันแข็งแรงและไม่เป็นโรคเหงือก (Seliman, 2001)

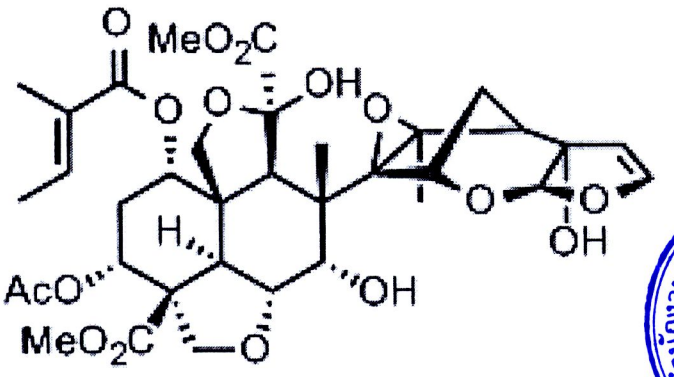
ผลและเมล็ด ผลของสะเดามีรสหวานจึงเป็นอาหารที่ดีของนก และยังใช้เป็นยาฆ่าเชื้อโรคได้ สำหรับน้ำมันสะเดาที่สกัดได้จากเมล็ดใน (seed kernel) ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสบู่ ยาสีฟัน ยารักษาเส้นผม และเป็นยาคุมกำเนิด ยารักษาโรคผิวหนัง โรคเรื้อน โรคปวดตามข้อ แผลเป็นหนอง แก้พิษแมลงสัตว์กัดต่อย และใช้เป็นสารฆ่าแมลงบางชนิด (Sharma, 1993)

ในกระบวนการ หลังการสกัดน้ำมันจากเมล็ดสะเดาแล้ว ส่วนที่เหลือเป็นกากที่เมื่อนำไปสกัดด้วยแอลกอฮอล์ หรือน้ำจะได้สาร azadirachtin (aza) ซึ่งใช้ทำเป็นสารฆ่าแมลง กากที่เหลือในขั้นตอนนี้เรียกว่า neem cake ซึ่งสามารถนำมาผสมกับกากน้ำตาลเป็นอาหารสัตว์ ใช้เป็นปุ๋ยหรือส่วนผสมของปุ๋ย เป็นสารฆ่าแมลง สารฆ่าโรคพืชและไส้เดือนฝอยบางชนิด

สารเคมีในสะเดา

ส่วนต่างๆของสะเดา ได้แก่ ใบ ผล เมล็ด และเปลือก มีสารเคมีอยู่หลายชนิด โดยมีการศึกษาพบตั้งแต่ช่วงกลางของศตวรรษที่ 20 รายงานครั้งแรกเป็นของ Siddiqui (1942) พบว่าสามารถแยกสารนิมบิน (nimbin) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดรสขมโดยแยกได้จากน้ำมันสะเดา และหลังจากนั้นก็มีการแยกสารอื่นๆได้ตามมาอีกมากกว่า 135 ชนิด สารเหล่านี้อาจจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ isoprenoids และ nonisoprenoids สำหรับกลุ่ม isoprenoids ได้แก่ diterpenoid และ triterpenoids ซึ่งประกอบด้วย protomeliacins, limonoids, azadirone, อนุพันธุ์ gedunin และอนุพันธุ์, vilasinintype และ C-secomeliacin เช่น nimbin, salanin และ *azadirachtin* ส่วนกลุ่ม nonisoprenoids ได้แก่โปรตีน และคาร์โบไฮเดรท, sulphurous compounds และ polyphenolics เป็นต้น (Biswas *et al.*, 2002)

สาร azadirachtin ($C_{35}H_{44}O_6$) เป็นสารที่ออกฤทธิ์สูงสุดในการป้องกันและกำจัดแมลง (Singh *et al.*, 1993) และเป็นสารที่พบมากในส่วนของเมล็ด (seed kernel) สาร azadirachtin (aza) มีหลายอนุพันธุ์ และอนุพันธุ์ที่มีมากในสะเดาคือ aza. A



Azadirachtin

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สูตรโครงสร้างของ azadirachtin (Raizada *et al.*, 2001)

จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างของ aza ชี้ให้เห็นว่าเป็นสารที่มีคุณสมบัติบางอย่างคล้าย steroid และเป็นสารอยู่ในกลุ่มที่มีศักยภาพในการเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมและเป็นสารก่อมะเร็ง (Rozenkranz and Klopman, 1995 a,b) โดยมีรายงานผลการศึกษายืนยันข้อความดังกล่าว เช่น Khan and Awasthy, 2001, 2003 พบว่าสารสกัดจากใบสะเดาสามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในระยะ metaphase I ของสัตว์ตระกูลหนูและนอกจากนี้ยังมีผลต่อรูปร่างของหัวสเปิร์มและลดจำนวนสเปิร์มในหนูอีกด้วย (Khan and Awasthy, 2001, 2003) และนอกจากมีรายงานพิษของสารสกัดสะเดาต่อสารพันธุกรรมพืชด้วยเช่นซึ่งส่วนใหญ่พบว่าสารสกัดสะเดามีผลทำให้การแบ่งเซลล์ปลายรากพืชลดลงและทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในขณะแบ่งเซลล์ (Soliman, 2001) และรวมถึงมีผลในการยับยั้งการงอกในพืชหลายชนิดเช่น อัลฟาฟา ถั่ว แครอท และแรดิช เป็นต้น

ข้อจำกัดของสารสกัดสะเดา

สารสกัดสะเดาเป็นสารธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ไม่คงทน สลายตัวได้ง่ายเมื่อเก็บไว้นาน และสลายตัวได้เร็วเมื่อถูกแสงอาทิตย์ โดยมีรายงานว่าช่วงเวลาครึ่งชีวิต (half life) ของ azadirachtin ที่ละลายอยู่ในน้ำ < 1-12 วัน ในดิน 20 วัน และในใบพืช <1 วัน ดังนั้นการที่ใช้เป็นสารฆ่าแมลงจึงต้องฉีดพ่นบ่อยครั้งมากกว่าสารเคมีฆ่าแมลงชนิดสารสังเคราะห์และที่สำคัญสารสกัดสะเดาจะใช้ได้ผลดีกับแมลงบางกลุ่มเท่านั้นซึ่งได้แก่หนอนกระทู้ชนิดต่างๆ หนอนหนังเหนียว หนอนชอนใบ หนอนม้วนใบ หนอนบุ้ง หนอนแก้ว หนอนหัวกะโหลก เพลี้ยอ่อน และเพลี้ยไก่แจ้ เป็นต้น (ขวัญชัย, 2542; Rodcharoen *et al.*, 1997)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 26 พ.ค. 2555
เลขทะเบียน 250457
เลขเรียกหนังสือ

ผลของสารสกัดสะเดาต่อแมลง

ดังได้กล่าวมาแล้วว่าในสารสกัดสะเดามีสารอยู่หลายชนิดแต่สารที่โดดเด่นที่มีคุณสมบัติในการกำจัดแมลงได้แก่ *azadirachtin* ซึ่งเป็นสารที่มีผลต่อแมลงในทุกระยะของชีวิตแมลง โดยเฉพาะระยะตัวอ่อนของแมลง สาร aza จะทำให้ตัวอ่อนของแมลงตาย และนอกจากนี้ aza ยังมีสูตรโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับฮอร์โมนลอกคราบของแมลง (ecdysone hormone) และมีผลยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนลอกคราบของแมลงทำให้ตัวอ่อนของแมลงลอกคราบไม่ได้และตายในที่สุด โดยสรุปสารสกัดสะเดามีผลต่อแมลงหลายประการคือลดการวางไข่เนื่องจากผลของความไม่สมบูรณ์เพศ ยับยั้งการเจริญเติบโตของไข่ หนอนและดักแด้ ทำให้ตัวอ่อนของแมลงไม่ลอกคราบ เป็นสารไล่ตัวหนอนและตัวเต็มวัย ยับยั้งการกินอาหารทำให้ไม่เติบโต และพัฒนาการผิดปกติ ยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัย ทำให้การผลิตไข่น้อยลง ระงับการสร้างสารไคติน รบกวนการสื่อสารเพื่อการผสมพันธุ์และการผสมพันธุ์ ทำให้หนอนไม่กลืนอาหาร (Jacobson *et al.*, 1987; Quadri, 1973; Pradhan *et al.*, 1962; Singh, 1987; Koul, 1985 ; Remblod and Sieber, 1981; Gujar and Mehrotra, 1984)

ความเป็นพิษของสารสกัดสะเดาต่อสารพันธุกรรมพืช

ในการค้นหาสารกำจัดแมลงที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ความนิยมมักมุ่งตรงไปที่พืชโดยใช้พืชหรือสารสกัดจากพืชสำหรับป้องกันแมลงทำลายในแปลงหรือป้องกันการทำลายแมลงในโรงเก็บเมล็ดพันธุ์สำหรับประเทศในเขตร้อน (tropical region) ดังนั้นจึงเป็นเหตุให้มีการประยุกต์ใช้พืชสมุนไพรเพื่อการกำจัดแมลงมีความนิยมมากว่าศตวรรษ (Boeke *et al.*, 2004)

ดังได้กล่าวมาแล้วว่าพืชสปีชีส์หนึ่งที่ให้ผลดีในการต้านแมลงคือสะเดา (*Azadirachta indica* A. Juss) โดยทุกส่วนของพืชชนิดนี้มีสารที่ให้รสขม ซึ่งมักมีผลทำให้ลดการกินอาหารและรบกวนการสร้างฮอร์โมนในแมลง (Schmutterer *et al.*, 1990) และด้วยเหตุนี้การนำสารสกัดสะเดามาใช้ในระบบเกษตรอินทรีย์จึงได้รับความนิยมกันในวงกว้างมากขึ้น

ถึงแม้ว่าในทางพิษวิทยา Azadirachtin จะเป็นสารที่ถูกจัดอยู่ในประเภท non-mutagen ที่มีการสลายตัวเร็วและมีพิษต่ำต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย (non target organism) รวมถึงการมีผลรบกวนต่อระบบนิเวศต่ำด้วย (Suadarm, 1996) แต่นักวิทยาศาสตร์ก็ยังไม่มีความมั่นใจในพิษตกค้างโดยเฉพาะกับพืชผักที่ถูกนำมาบริโภคและความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมพืชและระบบนิเวศจึงได้มีรายงานการตรวจสอบถูกตีพิมพ์เผยแพร่ตัวอย่างเช่น

การศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 5 ชนิดซึ่งรวมถึงสารสกัดสะเดาด้วย โดยใช้วิธี *Allium cepa* assay ความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ใช้เท่ากับ 1.00, 5.00, 10.00, 25.00, และ 50% สำหรับการวิเคราะห์ระดับหยาบ (macroscopic analyse) และความเข้มข้น 1.00, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20% สำหรับการวิเคราะห์ระดับละเอียด (microscopic analyse) พบว่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารทดสอบมีความสัมพันธ์กับการยับยั้งการเจริญของรากและสารสกัดทุกชนิดมีผลลดกระบวนการแบ่งเซลล์และชักนำให้เกิดการรบกวนต่อ spindle fiber ในรากหอม (Akinbore and Bakare, 2007)

Soliman (2001) ศึกษาสารสกัดจากใบ เมล็ดใน (kernel) และเปลือกหุ้มเมล็ดของสารสกัดสะเดาความเข้มข้น 10,000, 20,000, 40,000, 60,000 และ 80,000 ppm ที่มีผลต่อสารพันธุกรรมในเซลล์รากหอมโดยให้เซลล์ปลายรากอยู่ในสารทดสอบ 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าสารสกัดจากเมล็ดในของสะเดามีประสิทธิภาพสูงสุดโดยจากค่า phase index ชี้ให้เห็นว่าระยะ prophase มีปริมาณลดลงขณะเดียวกันจำนวนเซลล์ในระยะ metaphase และ anaphase, telophase มีประมาณเพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่มควบคุม และสารสกัดดังกล่าวยังมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมและนิวเคลียส เช่น การเกิด micronucleus, multinucleate, bridge, stickiness, non-congression metaphase, laggards, polyploidy and disturb โดยชนิดของความผิดปกติที่พบมากที่สุดคือ bridge