บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

สะเดาช้าง (neem) หรือไม้เทียม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs จัดอยู่ในวงศ์ Meliaceae มีถิ่นกำเนิดแถบเกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซีย ในประเทศไทยพบทั่วไปในจังหวัดทางภาคใต้ตั้งแต่จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี ลงไป พบมากที่จังหวัดตรัง พัทลุง นครศรีธรรมราช และสงขลา (วรรณลาภ โพธิชัย, 2536) สะเดาช้างจัดเป็นไม้ยืนต้นโตเร็ว มีความสูงถึง 30-40 เมตร ลำต้นมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 80-120 เซนติเมตร สะเดาช้างอายุ 15 ปี มีเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 130 เซนติเมตร สะเดาช้างเจริญได้ดีในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์และระบายน้ำดี มีปริมาณฝนตกเฉลี่ยไม่น้อยกว่า 1,800 มิลลิเมตรต่อปี (Liew and Teo, 1998) สะเดาช้างเป็นพืชที่ให้ประโยชน์ต่อมนุษย์หลายอย่าง เช่น ลำต้นใช้ก่อสร้างอาคารบ้านเรือน เป็นเชื้อเพลิง ดอกและใบอ่อนใช้เป็นอาหาร เนื้อในเมล็ดมีสารประกอบหลัก คือ 1-tigloyl-3-acetylazadirachtol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการกินของแมลง สามารถสกัดเป็นสารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช ได้เช่นเดียวกับสะเดาไทย (*A. indica* A. Juss. var. *siamensis* Vale.) และสะเดาอินเดีย (*A. indica* A. Juss.) (Ermel *et al*., 1996 ; อ้างโดย ปาริชาต ปาลินทร, 2543) นอกจากนี้สารสกัดจากเมล็ดสะเดาเป็นสารที่ปลอดภัยต่อเกษตรกร ผู้บริโภค ตลอดจนสิ่งแวดล้อม

การขยายพันธุ์สะเดาช้าง นิยมใช้เมล็ดพันธุ์ แต่มีข้อเสีย คือ ต้นที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดพันธุ์มีความแปรปรวนสูง ไม่เหมือนต้นแม่เดิม นอกจากนี้พบว่าเมล็ดพันธุ์สะเดาช้างสูญเสียความงอกเร็ว จึงต้องเพาะทันทีหลังจากเก็บมาจากต้น Liew และ Teo (1998) รายงานว่า เมล็ดพันธุ์สะเดาช้างสูญเสียความงอก 50-70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเก็บเกี่ยว 2-3 สัปดาห์ ซึ่งทำให้การปลูกสร้างสวนป่าจากสะเดาช้างทำได้ลำบากเนื่องจากการเจริญเติบโตของต้นไม่สม่ำเสมอ การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถใช้แก้ปัญหาที่เกิดจากการขยายพันธุ์โดยเมล็ดพันธุ์ได้ โดยการชักนำพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนีซีสหรือออร์กาโนเจนีซีส เพื่อให้ได้ต้นที่เหมือนต้นแม่เดิมทุกประการ และสามารถดัดแปลงทำเป็นเมล็ดเทียมได้ (Murthy and Saxena, 1998) นอกจากนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้มากภายในระยะเวลาสั้น ๆ ทำให้ได้ส่วนขยายพันธุ์จำนวนมากในการปลูกสร้างสวนป่าสะเดาช้าง เทคโนโลยีเซลล์พืชเข้ามามีบทบาทในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืช โปรโตพลาสต์จัดเป็นเซลล์เดี่ยวที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการขยายพันธุ์ หากมีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่ตรงตามพันธุ์ และยังเปิดโอกาสให้มีการใส่ข้อมูลพันธุกรรม ทั้งในรูปดีเอ็นเอ และอวัยวะตัวนำข้อมูลพันธุกรรม เช่น คลอโรพลาสต์ ไมโตคอนเดรีย นิวเคลียส และโครโมโซม เพื่อการปรับปรุงพันธุ์อีกด้วย ในการศึกษานี้จะได้

แยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์สะเดาช้างเพื่อเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์สะเดาช้างให้มีลักษณะที่ตรงตามความต้องการของมนุษย์ เช่น ให้มีลักษณะที่ผลิตสารออกฤทธิ์กำจัดแมลงได้มาก ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ปลูก ให้เนื้อไม้ที่มีคุณภาพ

การตรวจเอกสาร

1. การเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ

กระบวนการสร้างพืชต้นใหม่มี 2 กระบวนการ คือ เอ็มบริโอเจนีซีสและออร์กาโนเจนีซีส ซึ่งทั้ง 2 กระบวนการนี้ พืชต้นใหม่ที่ได้อาจเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงหรือเกิดขึ้นโดยผ่านการสร้างแคลลัส ต่างกันตรงที่กระบวนการสร้างพืชต้นใหม่โดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสพืชต้นใหม่มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะต่าง ๆ เหมือนกับการสร้างเอ็มบริโอในเมล็ด ส่วนกระบวนการออร์กาโนเจนีซีสมีการสร้างยอดหรือรากหรือทั้งยอดและรากพร้อมกัน Liew และ Teo (1998) รายงานการชักนำพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการออร์กาโนเจนีซีสจากชิ้นส่วนตาข้างของต้นกล้าสะเดาช้างอายุ 5 เดือนที่ปลูกในถุงพลาสติก โดยตัดยอดยาวประมาณ 2 เซนติเมตร นำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว แล้วตัดตาข้างออกมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวอีกหนึ่งครั้ง นำมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) เติม BA (6-benzyladenine) ร่วมกับ NAA (1-naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า BA เข้มข้น 3.3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำยอดรวมที่มีความปกติได้มากที่สุด คือ 4 ยอดต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้ยังมีการชักนำพืชต้นใหม่โดยกระบวนการออร์กาโนเจนีซีสจากชิ้นส่วนใบสะเดาช้าง (สมปอง เตชะโต และอรอุมา รุ่งน้อย, 2542) ส่วนในสะเดาอินเดียมีรายงานการชักนำพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการออร์กาโนเจนีซีสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ยอด (Eeswara *et al*.,1998) ชิ้นส่วนอับละอองเกสร (Gautam *et al*., 1993) ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยง (Su *et al*., 1997) ส่วนการชักนำพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสในสะเดาช้างมีรายงานโดย Te-chato และ Rungnoi (2000) ได้ชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนใบคู่ที่ 2 นับจากยอด บนอาหารสูตร MS หรือ NN (Nitsch and Nitsch) เติมออกซิน และไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารสูตร MS, MH (medium for Hevea), SH (Schenk and Hildebrandt) และ WPM (woody plant medium) เติมออกซินและไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำเอ็มบริออยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นไปชักนำการงอก พบว่า อาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN (kinetin) เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมากที่สุด อาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ให้น้ำหนักสด และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อชิ้นส่วนสูงสุด อาหารสูตร SH เติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร สูงสุด โซมาติกเอ็มบริโอสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะรูปกลมบนอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ เมื่อย้ายเอ็มบริโอในระยะที่สร้างใบเลี้ยงไปเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญ

เติบโต เอ็มบริโอสามารถสร้างยอด และรากเริ่มต้นขึ้นมาได้ หลังจากพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์นำยอดไปชักนำรากบนอาหารสูตร ½ MS เติม NAA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ Murthy และ Saxena (1998) รายงานการชักนำพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสของสะเดาอินเดียจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงและแกนของต้นอ่อนสะเดาอินเดีย บนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ (thidiazuron) หรือ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า TDZ เข้มข้นตั้งแต่ 1-10 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรง ในขณะที่ TDZ เข้มข้นตั้งแต่ 20-50 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอโดยผ่านการสร้างแคลลัส หลังจากนำแคลลัสที่ชักนำบนอาหารเติม TDZ เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ มาชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวเติมและไม่เติม TDZ เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หลังจากย้ายเลี้ยงทุกสัปดาห์ เป็นเวลานาน 2-3 สัปดาห์ พบว่า มีการสร้างแคลลัส หรือกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตส่งเสริมการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ และเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้ต้นขนาดเล็กที่มีรากสมบูรณ์ 60-70 เปอร์เซ็นต์

2. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ หมายถึง เซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ โครงสร้างของผนังเซลล์ประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เซลล์พืชทุกชนิดนอกจากมีเยื่อหุ้มเซลล์แล้วยังประกอบด้วยผนังเซลล์ แต่ละเซลล์เชื่อมกันด้วยมิดเดิลลาเมลลา ซึ่งประกอบด้วย สารพวกเพคติน ดังนั้นในการแยกโปรโตพลาสต์จึงต้องมีเอนไซม์ 2 กลุ่ม คือ เพคติเนส ใช้สำหรับย่อยมิดเดิลลาเมลลา กลุ่มเซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส ใช้สำหรับย่อยผนังเซลล์ (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ มี 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ วิธีกล วิธีนี้ใช้มีดที่มีความคมเฉือนใบให้มีขนาดเล็กมาก (หั่นฝอย) ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือค่อนข้างสูง ทำให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาจากเซลล์ได้ แต่วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากขั้นตอนยุ่งยาก และได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อย ความมีชีวิตต่ำ และมีเศษเซลล์จำนวนมากยากต่อการศึกษาทางด้านสรีรวิทยา อีกวิธีหนึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และนิยมกันแพร่หลาย คือ การใช้เอนไซม์ วิธีนี้ค้นพบโดย Cocking (1960) อ้างโดย สมปอง เตชะโต (2536) การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการใช้เอนไซม์อาจแยกเป็นสองขั้นตอน หรือใช้ขั้นตอนเดียวโดยผสมเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าด้วยกัน เอนไซม์ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่ย่อยให้เซลล์แต่ละเซลล์หลุดเป็นอิสระ คือ มาเซอร์โรไซม์ เมื่อแต่ละเซลล์หลุดออกมาเป็นอิสระแล้ว ทำการย่อยผนังเซลล์ด้วยเซลลูเลส องค์ประกอบของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมจะช่วยให้ได้โปรโตพลาสต์เป็นจำนวนมาก (สมปอง เตชะโต, 2536) Perales และ Schieder (1993) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบแอปเปิ้ลที่ได้จากหลอดทดลองด้วยสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเฮมิเซลลูเลส เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส เข้มข้น

1.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายอยู่ในสารละลาย MES เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 อินคิวเบทร่วมกับใบหั่นฝอยในสภาพมืดเป็นเวลา 17 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ $6x10^6$-$1.6x10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด นอกจากนี้ความสำเร็จในการแยกโปรโตพลาสต์ยังขึ้นอยู่กับแหล่งของชิ้นส่วนพืช โดยโสภา ทวีคณะโชติ และ สมปอง เตชะโต (2543) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบจริงส้มจุกคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลอง ด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเพคโตไลเอสวาย-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ อินคิวเบทเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง พบว่า จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบจริงคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และชนิดและความเข้มข้นของออสโมติคัม มยุรี วุฒิสิทธิ์ (2539) รายงานผลของออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล็อกซีเนีย พบว่า การใช้สารละลายซอร์บิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนสูงสุด $3.36x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และโปรโตพลาสต์มีลักษณะกลม เต่ง และแตกน้อย การใช้ซอร์บิทอล เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ทำให้โปรโตพลาสต์มีลักษณะกลมและแตกมาก ส่วนที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ส่งผลให้โปรโตพลาสต์หดตัว มีลักษณะเบี้ยว การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ สำหรับระยะเวลาและความสำเร็จในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการและมีความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด ปัจจัยที่สำคัญได้แก่ วิธีการเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ Jullien และคณะ (1998) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบสะระแหน่ในหลอดทดลอง ในอาหารที่ประกอบด้วยธาตุอาหารหลักสูตร B_5 และวิตามินของ Morel และ Wetmore (1951) อ้างโดย Jullien และคณะ (1998) ด้วยความหนาแน่น $5x10^4$ พบว่าอาหารเหลวเติม 2,4-D เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ และ BA เข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงสุดและอาหารแข็งส่งเสริมการแบ่งเซลล์ในระยะต่อมาจนกระทั่งพัฒนาเป็นแคลลัสขนาดเล็ก แคลลัสพัฒนาเป็นยอดได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารเติม NAA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสและพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนใบสะเดาช้าง
2. เพื่อศึกษาการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบ แคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่นของสะเดาช้าง