อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

# การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำโดยการใช้สารโคลชิซิน

## (Colchicine Breeding of *Jatropha curcus* Linn)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 29 ส.ค. 2554
เลขทะเบียน 15411350 ค.9
เลขเรียกหนังสือ ว 58
ว99
.C5
ด211ร
2554

ผศ.ดร.ดวงพร เปรมจิต
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทรศัพท์ 055-961000 ต่อ 2736 โทรสาร 055-962904
E-mail: duangpornp@nu.ac.th

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2551 สัญญาเลขที่ AG-AR-040/2551

ขอบคุณผู้ร่วมวิจัย รศ.ดร. ศิริพงษ์ เปรมจิต จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ช่วยแนะนำและระดมความเห็นในการแก้ปัญหาระหว่างการวิจัย ตลอดจนผู้ช่วยวิจัย จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ น.ส. พรรนิดา สิงห์ทอง

## บทคัดย่อ

การชักนำออโตเทตราพลอยด์ในสบู่ดำดำเนินการศึกษาโดยใช้สารที่มีผลต่อการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสสองชนิดคือสารโคลชิซินและอัลฟา-โบรโมแนปธาลีน โคลชิซินเตรียมในรูปของสารละลายที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 5 % ขณะที่อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนใช้ในรูปสารละลายเข้มข้น ทำการหยดสารละลายทุกความเข้มข้นลงบนยอดของต้นอ่อนอายุ 9 วันเป็นระยะเวลาหนึ่งเดือน พบว่ายอดของสบู่ดำที่ผ่านการทรีตด้วยโคลชิซีน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 80-100% ส่วนอัลฟา-โบรโมแนปธาลีนมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 5 % และเมื่อนำเนื้อเยื่อใบไปตรวจระดับพลอยดีด้วย Flow Cytometry พบว่า โคลชิซีนทุกความเข้มข้นไม่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซมสบู่ดำได้ แต่อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนสามารถชักนำต้นออโตเทตราพลอยด์ (2n=4x)

**Abstract**

Induction of autotetraploid plants of *Jatropha curcas* L, was conducted by using two mitotic inhibited chemicals, colchicines and α-bromonapthalene. Colchicine solution was prepared in concentrations, 0, 0.5, 1, 2 and 5 %, while α-bromonapthalene was used in the form of saturated solution. The treated solution was dropped onto apical meristems of 9-days-old seedling of *J. curcas* L for one month. Results showed that survival rate of seedling treated with colchicines were 80-100 %, and only 5% was observed in seedling treated with α-bromonapthalene. Ploidy level of treated plants was analyzed by flow cytometry. The colchicines in all using concentrations have no effect on double chromosome of *J. curcas* L. Autotetraploid plant of *J. curcas* (2n=4x) was obtained from seedling treated with α-bromonapthalene.

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| **กิตติกรรมประกาศ** | I |
| **บทคัดย่อภาษาไทย** | II |
| **บทคัดย่อภาษาอังกฤษ** | III |
| **สารบัญตาราง** | VI |
| **สารบัญภาพ** | VII |
| **บทที่ 1 บทนำ** | |
| 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ | 3 |
| 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย | 3 |
| 1.4 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง | 4 |
| 1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการ | 5 |
| **บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย** | |
| แผนการทดลองที่ 1 การชักนำออโตเทตราพลอยด์จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของสบู่ดำโดยการทรีตสารโคลชิซีน | 7 |
| แผนการทดลองที่ 2 ชักนำการแปรผันทางพันธุกรรมของเมล็ดสบู่ดำโดยโคลชิซีนและสารเคมีอื่นๆ | 8 |
| แผนการทดลองที่ 3 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ตรวจลักษณะความแปรผันทางพันธุกรรม | 9 |
| แผนการทดลองที่ 4 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ | 9 |
| แผนการทดลองที่ 5 การศึกษาขนาดปากใบ | 10 |
| แผนการทดลองที่ 6 ผลผลิตสบู่ดำในปีที่ 1 | 10 |

## สารบัญ(ต่อ)

หน้า


**บทที่ 3 ผลการทดลอง**

3.1. การชักนำออโตเทตราพลอยด์จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของสบู่ดำ โดยการทรีตสารโคลชิซีน 11

3.2 ชักนำออโตเทตราพลอยด์จากตายอด 18

3.3. การตรวจระดับพลอยดีของต้นสบู่ดำที่ตายอดผ่านการทรีตสารโคลชิซีนหรือ α-bromonapthalene 22

3.4 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ 27

3.5 การศึกษาขนาดปากใบ 27

**บทที่ 4 อภิปรายผลการทดลอง**

4.1 การชักนำออโตเทตราพลอยด์จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของสบู่ดำ โดยการทรีตสารโคลชิซีน 29

4.2 การชักนำออโตเทตราพลอยด์จากตายอดของสบู่ดำโดยการทรีตสารโคลชิซีนและ α-bromonapthalene 29

สรุปผลการทดลอง 30

**เอกสารอ้างอิง** 31

# สารบัญตาราง

**ตาราง** **หน้า**


3.1 แสดงความเข้มข้นของโคลชิซีน จำนวนวันที่แช่ จำนวนแคลลัสที่รอดชีวิต ในการเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.2 μM และ IBA 4.9 μM อายุ 4 สัปดาห์ 16

3.2 แสดงความแปรผันของชุดโครโมโซมของแคลลัสสบู่ดำที่ผ่านการทรีตโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน 17

3.3 แสดงความสูงของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลก และ พันธุ์กลายด้วย α-bromonapthalene เมื่ออายุ 153 วัน 21

3.4 แสดงระดับพลอยดีของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วยโคลชิซีนความเข้มข้นต่างๆ 23

3.5 แสดงระดับพลอยดีของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วย α-bromonapthalene 26

3.6 แสดงปริมาณคลอโรฟิลล์ ในสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลกและต้นออโตเทตราพลอยด์ 27

3.7 แสดงขนาดความกว้าง และความยาวของปากใบสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลกและต้นออโตเทตราพลอยด์ 28

# สารบัญภาพ


| ภาพ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | แสดงวิธีการชักนำออโตเทตราพลอยด์ | 8 |
| 3.1 | ผลของความเข้มข้นของฮอร์โมน BA, IBA และ NAA ต่อการพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อสบู่ดำ | 12 |
| 3.2 | ภาพแสดงแคลลัสของสบู่ดำปกติและสบู่ดำที่ผ่านการทรีตสารโคลชิซีน | 14 |
| 3.3 | ภาพแสดงการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสสบู่ดำที่เป็น mixoploid ในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน TDZ (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ | 15 |
| 3.4 | แสดงลักษณะใบแท้ของสบู่ดำปกติและใบม้วนเป็นวงเมื่อทรีตด้วยสารโคลชิซีน 0, 2% และ 5% | 18 |
| 3.5 | แสดงผลของ α-bromonapthalene ต่อเนื้อเยื่อตายอดสบู่ดำ อายุ 60 วัน | 20 |
| 3.6 | แสดงลักษณะ ดอกตัวผู้ ดอกตัวเมีย pollen grain ของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลก | 21 |
| 3.7 | แสดง Histogram ของ relative nuclear DNA content ของ *J. curcas* L. ดิพลอยด์นิวคลีไอระยะ G1 ปรากฏ peak ที่ channel 200 | 24 |
| 3.8 | แสดง Histogram ของ relative nuclear DNA content ของ *J. curcas* L. ต้นที่ทรีตด้วยสารละลายโคลชิซีนทุกความเข้มข้น นิวคลีไอระยะ G1 ปรากฏ peak ที่ channel 200 | 25 |
| 3.9 | แสดง Histogram ของ relative nuclear DNA content ของ *J. curcas* L. ต้นออโตเทตราพลอยด์ที่เกิดจากการทรีตด้วย α-bromonapthalene นิวคลีไอระยะ G1 ปรากฏ peak ที่ channel 400 | 26 |
| 3.10 | ภาพแสดงขนาดปากใบของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลกและต้นออโตเทรตราพลอยด์ | 28 |

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การขยายตัวทางเศรษฐกิจ การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล สภาวะโลกร้อน การเพิ่มขึ้นของประชากร ทำให้มีความต้องการใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้น (Shang-Shyng Yang et al., 2008) ขณะที่พลังงานปิโตรเลียมลดลง จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ราคาน้ำมันในตลาดโลกเพิ่มสูงขึ้น หลายประเทศจึงหันมาหาแหล่งพลังงานทดแทนจากแหล่งอื่น พลังงานทดแทนประเภทพลังงานหมุนเวียนจากพลังงานชีวมวล ที่ได้จากผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งสามารถลดการนำเข้าน้ำมันทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมีมูลค่าเพิ่มขึ้น เป็นมิตรต่อสิ่งแวดแวดล้อม และลดการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะเรือนกระจก พืชพลังงาน เช่น อ้อย ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น สามารถนำมาผลิต ไบโอเอทานอล เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน และเรพซีด เป็นต้น เป็นพืชพลังงานที่ใช้ในการผลิต ไบโอดีเซล (Shang-Shyng Yang et al., 2008) นอกจากนี้ยังมี สบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn) ที่เป็นพืชพลังงานอีกชนิดหนึ่งที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ชาวโปรตุเกสเป็นผู้นำเข้ามาปลูกในประเทศไทย เมื่อสมัยกรุงศรีอยุธยาเป็นราชธานี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำมาหีบน้ำมันใช้ทำสบู่ สบู่ดำเป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Euphobiaceae พืชที่จัดอยู่ในวงศ์นี้ได้แก่ ยางพารา มันสำปะหลัง มะยม มะขามป้อม และโป๊ยเซียน สบู่ดำ เป็นไม้ที่มีความสูง 2-7 เมตร จากการบันทึกของนักพฤกษศาสตร์รายงานว่ามีอายุยืนยาวถึง 20 ปี ผิวลำต้นเกลี้ยง

เกลา เป็นไม้อวบน้ำ เนื้ออ่อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 4-6 เซนติเมตร ลักษณะใบคล้ายใบฝ้าย มี 4 แฉก ขนาดใบใกล้เคียงกับขนาดฝ่ามือของมนุษย์ ก้านใบยาวประมาณ 10-12 เซนติเมตร ออกดอกเป็นช่อ ดอกมีขนาดเล็กสีเหลือง กลิ่นหอมอ่อนๆ มีเกสรตัวผู้กับเกสรตัวเมียอยู่ในช่อเดียวกัน ผลอ่อนมีสีเขียวอ่อนผิวเรียบ เมื่อสุกมีสีเหลืองคล้ายลูกจันทน์ ในหนึ่งผลจะมี 2-3 พู ผลแก่เต็มที่มีสีน้ำตาลถึงดำ ขนาดใกล้เคียงกับลูกปิงปอง เมล็ดที่นำมาหีบน้ำมันจะมีสีขาวใส ยาวประมาณ 1.7-1.9 เซนติเมตร และกว้าง 0.8-0.9 เซนติเมตร น้ำหนักสดเมล็ด 100 เมล็ด ประมาณ 69.8 กรัม สบู่ดำพบเห็นได้ง่ายในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ บางแห่งเรียกว่า หมากเยา หรือมะเยา เสียงของเยา ส่วนใหญ่ชาวบ้านนิยมใช้ปลูกเป็นแนวรั้ว เหตุผลคือสัตว์เลี้ยงประเภทวัว ควาย ไม่กัดกินใบ แม้แต่สายตาก็ไม่ชำเลืองมองเพราะมียางสีขาว รสเฝื่อน จากผลการวิจัยของกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ปี 2525 สรุปว่า สบู่ดำ อายุ 1 ปี 2 ปี และ 3 ปี ให้ผลผลิตเฉลี่ย 102, 200 และ 300 กิโลกรัม ต่อไร่ น้ำหนักเมล็ด 100 กิโลกรัมให้น้ำมัน25ลิตร น้ำมันสบู่ดำสามารถนำมาทดแทนการใช้น้ำมันดีเซลได้ แต่การปลูกสบู่ดำในเชิงการค้าหรือธุรกิจปัจจุบันยังไม่คุ้มค่าจนกว่าจะสามารถเพิ่มผลผลิตได้1,500-2,000กิโลกรัมต่อไร่ขึ้นไปเท่านั้น

การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำแบบดั้งเดิมมีข้อจำกัดเพราะพันธุ์สบู่ดำมีน้อยและยังคาดว่ามาจากแหล่งกำเนิดเดียวกันดังนั้นพืชชนิดนี้จึงมีฐานพันธุกรรมไม่กว้าง เทคนิคที่เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจคือการใช้สารโคลชิซีนมาชักนำออโตโพลิพลอยด์ (autopolyploid)ที่เรียกว่าโคลชิพลอยด์ (colchiploid) สามารถนำมาปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำที่คาดว่าให้ผลผลิตสูงขึ้นได้และลดข้อจำกัดเรื่องฐานพันธุกรรมลงไป พันธุ์สบู่ดำที่ให้ผลผลิตน้ำมันสูงพอที่จะปลูกเชิง

พาณิชย์นั้นยังมีความต้องการสูงทั้งในปัจจุบันและอนาคตเพื่อใช้เป็นไบโอดีเซล ในประเทศไทยงานปรับปรุงพันธุ์จึงยังคงมีความสำคัญและไม่ล้าสมัยเมื่อคำนึงถึงปริมาณดีเซลที่ลดลงและจำเป็นต้องนำไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชมาทดแทนอย่างแน่นอนและการสร้างสบู่ดำสายพันธุ์ใหม่โดยวิธีที่นำเสนอมานี้จะเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาผลผลิตน้ำมันสบู่ดำต่ำได้

## 1.2 วัตถุประสงค์

ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของสบู่ดำด้วยสารละลายโคลชิซินและสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์อื่นๆ เพื่อสร้างฐานความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กว้างขึ้นและคัดเลือกต้นสบู่ดำโคลชิพลอยด์ที่คาดว่าจะให้ผลผลิตน้ำมันสูงขึ้น

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ชักนำโคลชิพลอยด์จากเมล็ดหรือต้นอ่อนโดยใช้สารโคลชิซีน หรือ สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งสปินเดิลไฟเบอร์หลังจากนั้นนำไปปลูกและศึกษาลักษณะทาง Morphology ของต้นรุ่น C1 ตรวจโครโมโซมจากใบอ่อนหรือรากหรือวัดปริมาณดีเอนเอเพื่อทราบถึงการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีและคัดต้นที่เป็น autotetraploid

1.4 **การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ** (information) **ที่เกี่ยวข้อง**

ในการชักนำออโตโพลีพลอยด์ด้วยสารโคลชิซีนในพืชหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จดังต่อไปนี้

มีรายงานการผลิตขิง (*Zingiber offinale* ) ที่เป็นออโตเทตราพลอยด์โดยใช้เนื้อเยื่อปลายยอดแช่ในสารโคลชิซีนหรือ dimethylsulfoxide และได้ผลสำเร็จเป็นอย่างดี ลักษณะของขิงออโตเทตราพลอยด์จะมี ยอด ความยาวใบ ความกว้างใบ ขนาดของ rhizome ใหญ่กว่าดิพลอยด์ และบางต้นให้ผลผลิตรวมสูงกว่าแต่ rhizome มีขนาดเล็กกว่า มีการทดสอบพันธุ์หลายรอบการเพาะปลูกจนมีผลผลิตคงที่ ผลการทดลองครั้งนี้ให้ออโตเทตราพลอยด์หลายสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีต่างกัน ออโตเทตราพลอยด์พันธุ์ Buderim Gold ได้คัดเลือกไปเป็นพันธุ์ทางการค้าใช้ป้อนโรงงานอุตสาหกรรม ส่วนพันธุ์ Queensland มีกลิ่น รส และไฟเบอร์ เหมาะสำหรับขายในรูปหัวสด (Smith M.K. 2004)

Jin-Hu Wu and Pauline M., 2002 ทำการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซมใน embryogenic callus lines ของส้ม

Paspalum ปกติมีระดับพลอยดีเป็นดิพลอยด์แต่กลับเป็นหมันผสมตัวเองไม่ติดเพิ่มความสมบูรณ์สายพันธุ์ออโตเทตราพลอยด์โดยชักนำด้วยโคลชิซีนได้ต้นออโตเทตราพลอยด์ไม่เป็นหมัน (Quarin C.L, Espinoza F, Eric J. M, Silvina C.P, Osca A. B., 2001)

Mathur A, Mathur A.K, Ahuja P.S, and Tyagi B.R, 1987 ทำการชักนำออโตเทตราพลอยด์ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของ *Rauvolfia serpentia* สามารถนำต้นที่เกิดออโตเทตราพลอยด์ไปเลี้ยงในแปลงและในกรีนเฮาส์มีเปอร์เซ็นต์การรอด 80-90%

มีรายงานการพัฒนาเมล็ดเทตราพลอยด์ (tetraploid grain) ของข้าวฟ่างพบว่ามีผลผลิตสูงขึ้นและพันธุ์มีความคงตัวดี (Doggett H and Majisu B.N. 1972)

ออโตเทตราพลอยด์ของ Red clover มีความต้านทานต่อเชื้อ *Sclerotinia trifoliorum* มากกว่าดิพลอยด์ ( Reidar V. 1960)

ออโตเทตราพลอยด์ของบัวจีนให้ดอกสีชมพูขนาดใหญ่ขึ้น (กันยารัตน์ ไชยสุต 2532)

## 1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการ

พอลิพลอยด์ (Polyploid) เป็นคำที่หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่าดิพลอยด์ เป็นจำนวนชุด เช่น triploid (2n=3x) tetraploid (2n=4x) pentaploid (2n=5x) หรือ hexaploid (2n= 6x) เป็นต้น พบว่าพืชเศรษฐกิจ เช่นข้าวโอ๊ตมีการกระจายตัวของสายพันธุ์ที่เป็นพอลิพลอยด์และพืชเหล่านี้มีคุณสมบัติดีเหนือกว่าดิพลอยด์ เช่น มีความต้านทานโรค เมล็ดขนาดใหญ่ รวมทั้งขนาดลำต้น ใบ ดอก พอลิพลอยด์ที่ชักนำจากการเพิ่มชุดของโครโมโซมที่เกิดจากจีโนมเดียว ( single genome) จะเรียกว่า ออโตโพลิพลอยด์ (autopolyploid) (Stebbins, 1971) การเพิ่มขึ้นของโครโมโซมมีผลต่อพืชทั้งทางสัณฐานวิทยา (morphology) และ สรีระวิทยา (physiology) ของพืช รายงานการศึกษาทางเซลล์พันธุศาสตร์ของสบู่ดำ (*J. curcus* Linn) พบรายงานจำนวนโครโมโซมใน Complement เท่ากับ 22 (2n=22) และมี basic number (X) = 11 จึงมีระดับ ploidy เป็นดิพลอยด์ (2n=2x=22) เมื่อศึกษา meiotic configuration ของโครโมโซมใน microsporocyte พบว่ามี 7 ringII + 4 rodII (Puangpaka S and Thaya J, 2003) ดังนั้นการเพิ่มโครโมโซมทั้งชุดโดยโคลชิซีนจะให้ออโตเทตราพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซม

2n=4x=44 และคาดว่าต้นสบู่ดำออโตโพลิพลอยด์จะให้ผลผลิตสูงเพียงพอ พันธุ์ที่จะสามารถผลิตเป็นการค้าและคุ้มทุนนั้นจะต้องมีผลผลิตถึง 1,500-2,000 กิโลกรัมต่อไร่ วิธีการที่นำเสนอมาจึงเป็นวิธีที่น่าสนใจวิธีหนึ่งเพื่อสร้างสายพันธุ์ที่มีผลผลิตสูงในเวลาสั้นและเป็นวิธีที่สามารถดำเนินการได้อย่างไม่ซับซ้อนยุ่งยากคือการชักนำโคลชิพลอยด์ ซึ่งใช้สารละลายโคลชิซีนมาชักนำให้เกิด autotetraploid นั้นเป็นความหวังว่าจะได้ต้นสบู่ดำที่มีเมล็ดขนาดใหญ่ขึ้นตลอดจนมีปริมาณน้ำมันสูงขึ้น

# บทที่ 2
# วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้ได้วางแผนงานการชักนำออโตเทตราพลอยด์เป็นสองส่วนคือการชักนำแบบ *in vitro* mutation และ ชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมจากตายอดของต้นกล้า สารเคมีที่ใช้ได้แก่ โคลชิซีน และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีน(α-bromonapthalene) สายพันธุ์สบู่ดำที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยงิ้วงาม จังหวัดพิษณุโลก มีชื่อสายพันธุ์คือสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลกเป็นสายพันธุ์ควบคุมและเป็นตัวอย่างในการชักนำความแปรผันทางพันธุกรรม จากนั้นทำการตรวจความแปรผันทางพันธุกรรมของสบู่ดำที่ผ่านการชักนำเพิ่มชุดโครโมโซม โดยการตรวจปริมาณ DNA โดย Flow Cytometry เพื่อคัดเลือกออโตเทตราพลอยด์

**แผนการทดลองที่ 1 การชักนำออโตเทตราพลอยด์จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของสบู่ดำโดยการทรีตสารโคลชิซีน (*In vitro* induction of autotetraploid of *J. curcas* L. by colchicine treatment)**

**1.1 การชักนำแคลลัส (Callus induction)**

นำใบจากต้นสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) สายพันธุ์ พิษณุโลก โดยใช้ใบคู่ที่ 3 และ 4 ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยล้างผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วนำใบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อซับให้แห้ง ตัดใบให้มีขนาดประมาณ 1x1 ตารางเซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.37 μM ทำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ โดยเพาะเลี้ยงและเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ (Sujatha and Mukta, 1996 )

**1.2 การชักนำมิวเทชันของเนื้อเยื่อแคลลัสโดยสารโคลชิซีน**

นำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 1.1 มาตัดให้มีชิ้นขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แช่ในโคลชิซีนความเข้มข้น 0, 025, 0.05, 0.1, 0.2 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าซึ่งหมุน 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3, 5, 7 วัน เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.2 μM และIBA ความเข้มข้น 4.9 μM โดยเพาะเลี้ยงและเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ ศึกษาการรอดชีวิต และการเจริญเติบโต (Sartnee et. al., 1995)

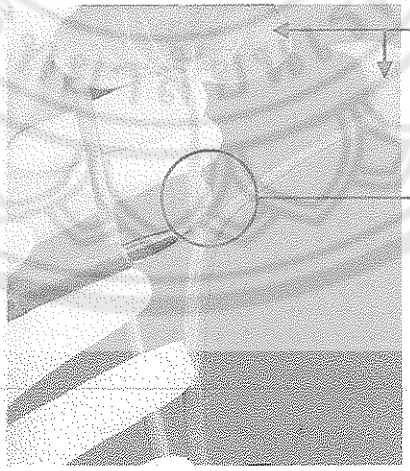
**แผนการทดลองที่ 2 ชักนำการแปรผันทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยโคลชิซีนและสารเคมีอื่นๆ**

**2.1 ชักนำการแปรผันทางพันธุกรรมของสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลกโดยโคลชิซีน**

ในการทดลองนี้ได้เพาะเมล็ดสบู่ดำเป็นเวลา 9 วัน สังเกตเห็นตายอด ใช้สำลีชิ้นเล็กๆ แนบกับยอดเจริญระหว่างใบเลี้ยง เพื่อช่วยไม่ให้สารละลายแห้งเร็วเกินไปแล้วทำการหยดสารโคลชิซีนในความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงบนปลายยอดที่มีเนื้อเยื่อเจริญหยด 2 หยด วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นเมื่อต้นกล้าสูงประมาณ 1 ฟุตนำลงเพาะในถุงดำครบ 60 วันลำต้นแข็งแรงดีแล้วจึงนำลงปลูกในแปลงทดลองคณะเกษตรศาสตร์ ฯ ม.นเรศวร ทำการเก็บข้อมูล

**2.2 ชักนำการแปรผันทางพันธุกรรมของสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลกโดย α-bromonapthalene**

α-bromonapthalene เป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งไมโตติกอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาชักนำมิวเทชันเพื่อเพิ่มชุดโครโมโซม ในการทดลองนี้ได้นำสารชนิดนี้มาใช้ทรีตให้แก่ตายอดของสบู่ดำ เพาะเมล็ดสบู่ดำภายในเวลา 9 วัน สังเกตเห็นตายอดระหว่างใบเลี้ยงทั้งสอง จากนั้นทำการหยดสารแต่ละชนิดลงบนปลายยอดที่มีเนื้อเยื่อเจริญทุกสองวันจนครบ 30 วันนำลงเพาะในถุงดำครบ 60 วันลำต้นแข็งแรงดีแล้วจึงนำลงปลูกในแปลงทดลองคณะเกษตรศาสตร์ ฯ ม.นเรศวร ทำการเก็บข้อมูลลักษณะลำต้น ลักษณะใบ ปากใบ pollen grain จำนวนดอก จำนวนผล ปริมาณคลอโรฟิลล์ และ ตรวจโครโมโซมหรือวัดปริมาณ DNA




**ภาพที่ 2.1. แสดงการชักนำออโตเทตราพลอยด์โดยการทรีตสารที่บริเวณตายอดสบู่ดำ**

**แผนการทดลองที่ 3 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ตรวจลักษณะความแปรผันทางพันธุกรรม**

**3.1. การตรวจโครโมโซมของ สบู่ดำ (*Jatropha curcas L.*)**

เทคนิคที่นำมาใช้ในการศึกษาโครโมโซมแบ่งออกเป็น 2 วิธี ดังต่อไปนี้

**3.1.1 เทคนิค Hypotonic solution**

นำใบอ่อนสบู่ดำ ขนาด 3-5 มิลลิเมตร แช่ใน 2mM 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 3 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำกลั่น ฟิกซ์ด้วย Methanol : Acetic acid อัตราส่วน 3:1 บ่มที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำกลั่นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แช่ในเอนไซม์ Cellulase : Pectinase อัตราส่วน 3:1 เปอร์เซ็นต์ ที่มี hypotonic solution (75 mM KCl+7.5 mM $Na_2$ – EDTA, pH 4.0) 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากบ่มทำให้เซลล์ยุ่ย โดยใช้ pipetting mixing แล้วเติม hypotonic solution 900 ไมโครลิตร แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยง 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสออก แล้วล้าง pellet ด้วย hypotonic solution 2 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยง 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที หลังจากล้างครั้งสุดท้ายนำ pellet 60 ไมโครลิตร หยดสูง 30 เซนติเมตร ลงบนสไลด์ ทำให้แห้งด้วย air-dried 1 คืน ย้อมด้วย 2% Giemsa 15 นาที ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Kitajima et. al., 2001)

**3.2. การวิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่อง Flow Cytometry (Partec ®)**

เก็บตัวอย่างใบอ่อนสบู่ดำใบที่ 1-3 จากต้นอายุ 1 ปี ที่ปลูกในแปลงทดลองทั้งต้นที่ไม่ทรีตและทรีตด้วยสารโคลชิซินและอัลฟา-โบรโมแนปธาลีน เก็บลงในกล่องที่มีอุณหภูมิ 4 $^{o}$C นำไปเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ โดยนำใบมาตัดด้วยมีดโกนคมๆ เป็นชิ้นเล็กๆ ในสารละลาย Lysis buffer จากนั้นกรองนิวคลีไอผ่านนีลอนขนาด Mesh 30 ไมโครเมตร บรรจุส่วนที่กรองลงใน appendorf® เซนตริฟิวจที่ 100 x g เป็นเวลา 5 นาที เติม Lysis buffer 100 ไมโครลิตร ลงในส่วน pellet ทำการย้อมนิวคลีไอด้วย propidium iodide (PI) 75 ไมโครโมล จากนั้นกรองนิวคลีไอออกครั้ง เก็บสารละลายที่ได้ในที่มืด วิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่อง Flow Cytometry (Partec ®)

**แผนการทดลองที่ 4 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์**

ชั่งใบสบู่ดำ 1 กรัม บดในโกร่งให้ใบละเอียด ค่อย ๆ เติมสารละลาย Acetone 80 เปอร์เซ็นต์ ลงไปจนครบ 20 มิลลิลิตร กรองกากใบออก นำสารละลายคลอโรฟิลล์ที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 645 และ 663 นาโนเมตร (Arnon, 1949)

**แผนการทดลองที่ 5 การศึกษาขนาดปากใบ**

การใช้ด่างในการลอกปากใบ ตัดตัวอย่างใบขนาด 1x1 เซนติเมตร แช่ตัวอย่างในสารละลาย NaOH 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ใช้ใบมีดโกนขูดเนื้อเยื่อบนชิ้นตัวอย่างออกเบาๆ เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อชั้นผิวด้านที่ไม่ต้องการและมีโซฟิลล์ออก ให้เหลือแต่เนื้อเยื่อชั้นผิวด้านที่ต้องการเท่านั้น ย้ายชิ้นตัวอย่างที่ขูดแล้วไปแช่ในน้ำเพื่อล้างด่างที่ใช้ออกให้หมดนำตัวอย่างแช่ใน Tween 80 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ นำชิ้นตัวอย่างวางลงบนสไลด์บนด้วยกระจกปิดสไลด์ ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

**แผนการทดลองที่ 6 ผลผลิตสมุ่ดำในปีที่ 1**

การเก็บผลผลิตสมุ่ดำในปีที่ 1 ดำเนินการศึกษาในระยะเวลาระหว่าง 26 /6/51- 26/12/51 โดยทำการเก็บผลที่เป็นสีเหลืองถึงดำมาอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน กระเทาะเปลือกออก เก็บเฉพาะเมล็ดไว้ทำการศึกษาต่อ

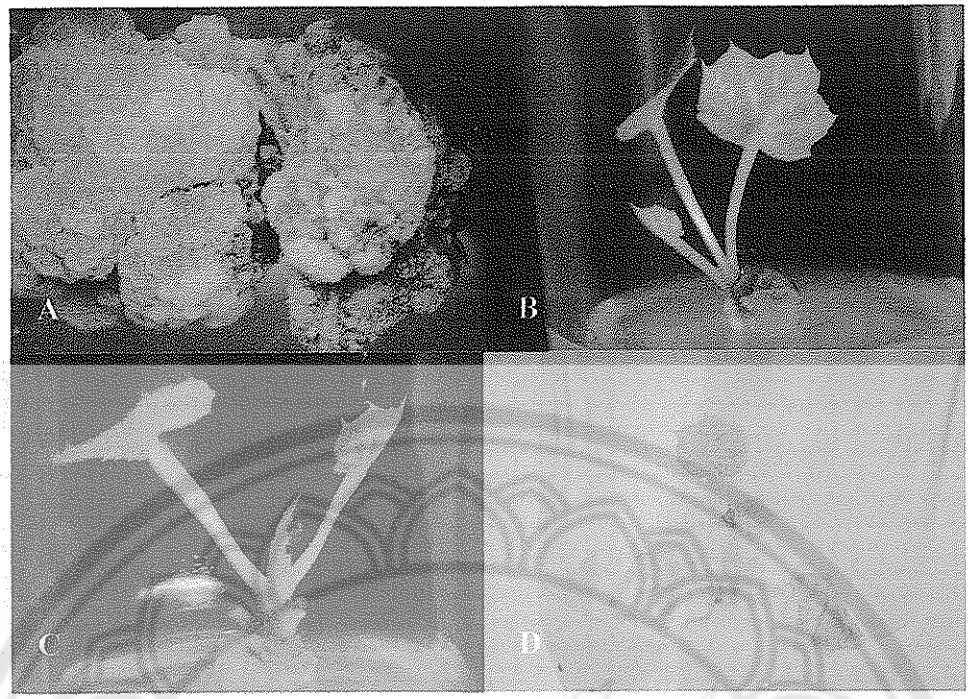
# บทที่ 3

# ผลการทดลอง

## 3.1. การชักนำออโตเทตราพลอยด์จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของสนุ่ดำโดยการทรีตสารโคลชิซีน

### 3.1.1 การพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อสนุ่ดำในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ *in vitro*

จากการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษานี้คือ แผ่นใบ (leaves) ก้านใบ (petioles) และ ตาข้าง (axillary buds) โดยเพาะเลี้ยงแผ่นใบในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA, IBA, NAA ที่สัดส่วนความเข้มข้นแตกต่างกันจำนวน 11 สูตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1000-3000 lux 18/6 ชั่วโมง ต่อวัน เนื้อเยื่อแผ่นใบ ก้านใบ และตาข้างเริ่มพัฒนาเป็นกลุ่มแคลลัสนูนที่บริเวณรอยแผลที่ถูกตัดในเวลาการบ่ม 4 สัปดาห์ หลังจากครบ 8 สัปดาห์เนื้อเยื่อได้มีการเปลี่ยนไปเป็น แคลลัสที่มีขนาดใหญ่ ทำการเก็บรักษาแคลลัสให้คงสภาพไม่ให้มีกระบวนการ Oganogenesis บนอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA( 1 mg/L) โดยทำการ sub-cultured ทุกระยะเวลา 4 สัปดาห์ แต่เนื้อเยื่อตาข้างพัฒนาไปเป็นยอด (shoots)บนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ( 1 mg/L) หรือ BA (3 mg/L ) และ IBA (1 mg/L) ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 80 % และชิ้นเนื้อเยื่อตาข้างหนึ่งชิ้นให้ยอดหนึ่งยอด นอกจากนั้น เนื้อเยื่อตาข้างพัฒนาเป็นรากในอาหารสูตร ½ MS ที่เติม IBA ( 3 mg/L) โดยมีจำนวนรากเฉลี่ย 4.9 และ 3.3 ราก ตามลำดับ (ภาพที่ 3.1) นำแคลลัสที่ชักนำได้ในขั้นตอนนี้ไปทำการทดลองต่อไป



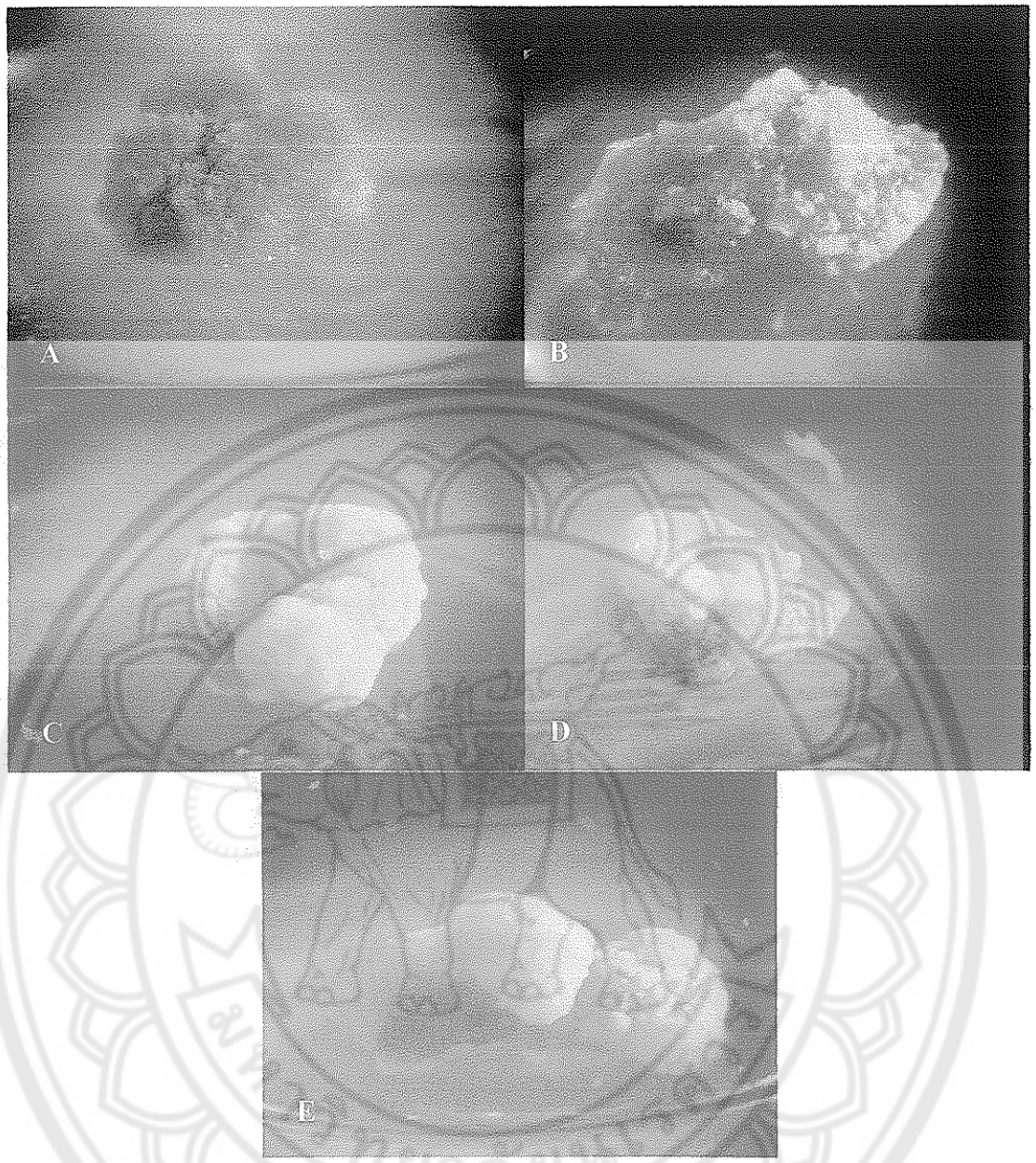

ภาพที่ 3.1 ผลของความเข้มข้นของฮอร์โมน BA, IBA และ NAA ต่อการพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อสบู่ดำ A หมายถึง แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA(1 mg/L) อายุ 8 สัปดาห์ B หมายถึง ยอดที่เกิดจากตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BA (3 mg/L) และ IBA (1 mg/L) อายุ 3 สัปดาห์ C หมายถึง ยอดที่เกิดจากตายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BA (3 mg/L) และ IBA (1 mg/L) อายุ 3 สัปดาห์ D หมายถึง ชักนำราก บนอาหาร ½ MS ที่เติมฮอร์โมน IBA ( 3 mg/L) อายุ 7 สัปดาห์

### 3.1.2 การชักนำออโตเทตราพลอยด์ของเนื้อเยื่อแคลลัสสมู่ดำโดยสารโคลชิซีน

นำแคลลัสอายุ 6 สัปดาห์ มาแช่ในโคลชิซีนในความเข้มข้น 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน BA (2.2 μM) และ IBA (4.9 μM) ทำการ sub-culture ทุกๆ 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสปกติมีสีเขียว แต่แคลลัสที่ทรีตด้วยโคลชิซีนมีลักษณะสีเหลืองและเขียวอ่อน และสีน้ำตาล (ภาพที่ 3.2) โดยแคลลัสที่รอดหลังการทรีตสารจะมีสีเหลือง ส่วนที่ตายมีสีน้ำตาล อัตราการรอดชีวิตโดยภาพรวมทุกความเข้มข้นมีค่า 4.17-79.17 % ในระยะเวลา 4 สัปดาห์(ตารางที่ 3.1) โดยโคลชิซีนที่ความเข้มข้น 0.2 % ที่ระยะเวลา 5 วันมีอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสสูงที่สุดคือ 79.17 % โคลชิซีนที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1% ที่เวลา 3 วันมีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุดคือ 4.17 % แต่เป็นที่น่าสังเกตุว่าที่ทุกความเข้มข้นระยะเวลาการบ่มสั้น (3 วัน) มีอัตราการอยู่รอดของแคลลัสต่ำกว่าที่ระยะเวลายาวกว่า (5 และ 7 วัน)

ผลการตรวจระดับพลอยดี (Ploidy level) ของแคลลัสที่ทรีตด้วยโคลชิซีนด้วยเครื่อง Flow Cytometry โคลชิซีนเข้มข้น 0.1% และ 0.2% เป็นระยะเวลา 3 วัน สามารถชักนำให้เกิด mixoploid แคลลัสที่ชักนำด้วยโคลชิซีนเข้มข้น 0.025% 0.05% ระยะเวลา 3วัน 5วัน 7วัน และที่ความเข้มข้น 0.1% 0.2% ระยะเวลา 5 วัน และ7 วันไม่สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชุดโครโมโซมได้ (ตารางที่ 3.2)

แคลลัสที่ตรวจพบว่าเป็น mixoploid ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน thidiazuron (TDZ) เข้มข้น0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ เนื้อเยื่อเหล่านี้พัฒนาไปเป็นยอดจำนวน 1 ยอด ดังแสดงในภาพที่ 3.3




**ภาพที่ 3.2 ภาพแสดงแคลลัสของสบู่ดำปกติและสบู่ดำที่ผ่านการทรีตสาร โคลชิซีน**

A หมายถึง แคลลัสของสบู่ดำปกติ B-E หมายถึง แคลลัสของสบู่ดำที่ผ่านการทรีตสาร โคลชิซีน 0.025%, 0.05%,0.1% และ 0.2% อายุ 4 สัปดาห์

ภาพที่ 3.3 ภาพแสดงการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสสบู่ดำที่เป็น mixoploid ในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน TDZ (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

**ตารางที่ 3.1** แสดงความเข้มข้นของโคลชิซีน จำนวนวันที่แช่ จำนวนแคลลัสที่รอดชีวิต ในการเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.2 μM และ IBA 4.9 μM อายุ 4 สัปดาห์

| Colchicine Concentrations (%) | Soak period (days) | Number of callus | Survival of callus (%) |
|---|---|---|---|
| 0 | 7 | 24 | 100.00 |
| 0.025 | 3 | 24 | 12.50 |
| 0.025 | 5 | 24 | 8.33 |
| 0.025 | 7 | 24 | 25.00 |
| 0.05 | 3 | 24 | 4.17 |
| 0.05 | 5 | 24 | 58.33 |
| 0.05 | 7 | 24 | 16.67 |
| 0.1 | 3 | 24 | 4.17 |
| 0.1 | 5 | 24 | 33.33 |
| 0.1 | 7 | 24 | 50.00 |
| 0.2 | 3 | 24 | 45.83 |
| 0.2 | 5 | 24 | 79.17 |
| 0.2 | 7 | 24 | 20.83 |

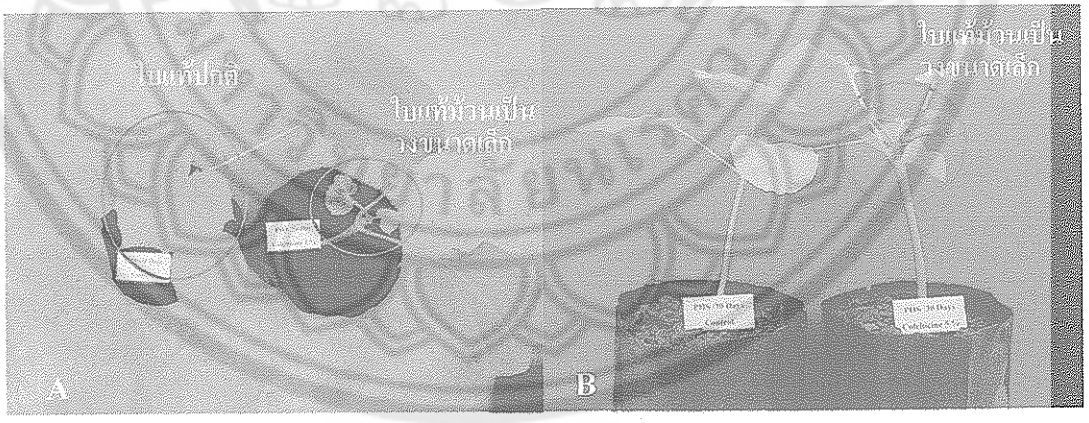
ตารางที่ 3.2 แสดงความแปรผันของชุดโครโมโซมของแคลลัสสบู่ดำที่ผ่านการทรีตโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน

| Colchicines concentration (%) | Soaked period (days) | Ploidy level |
|---|---|---|
| 0.025 | 3 | 2x |
| 0.025 | 5 | 2x |
| 0.025 | 7 | 2x |
| 0.05 | 3 | 2x |
| 0.05 | 5 | 2x |
| 0.05 | 7 | 2x |
| 0.1 | 3 | mixoploid |
| 0.1 | 5 | 2x |
| 0.1 | 7 | 2x |
| 0.2 | 3 | mixoploid |
| 0.2 | 5 | 2x |
| 0.2 | 7 | 2x |

**3.2 ชักนำออโตเทตราพลอยด์จากตายอด**

**3.2.1 ผลของโคลชิซีนต่อการกลายของเนื้อเยื่อตายอดสบู่ดำ**

เตรียมโคลชิซินในรูปของสารละลายที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 5 % จากนั้นนำไปหยดลงบนตายอดของสบู่ดำอายุ 9 วัน เพื่อทำการชักนำให้เซลล์เจริญปลายยอด (apical meristem) เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซม จากนั้นสังเกตผลของสารโคลชิซีนต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นสบู่ดำในระยะอายุ 30 วัน สารโคลชิซินทุกความเข้มข้นไม่ก่อให้เกิดการตายจึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (Survival rate) เป็น 100 % ต้นสบู่ดำที่ไม่ทรีตสารใดๆ ใบมีลักษณะเป็นแผ่นมีรูปร่างคล้ายหัวใจ โคลชิซีนที่ความเข้มข้น 2 และ 5 % มีผลทำให้ใบสบู่ดำเจริญเพียงซีกเดียวและม้วนเป็นวงและขนาดแผ่นใบเล็กกว่าใบต้นต้นปกติ (ภาพที่ 3.4) สบู่ดำอายุ 1 ปีในแปลงปลูกทั้งต้นควบคุมและต้นที่ถูกชักนำมิวเทชันมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่าง

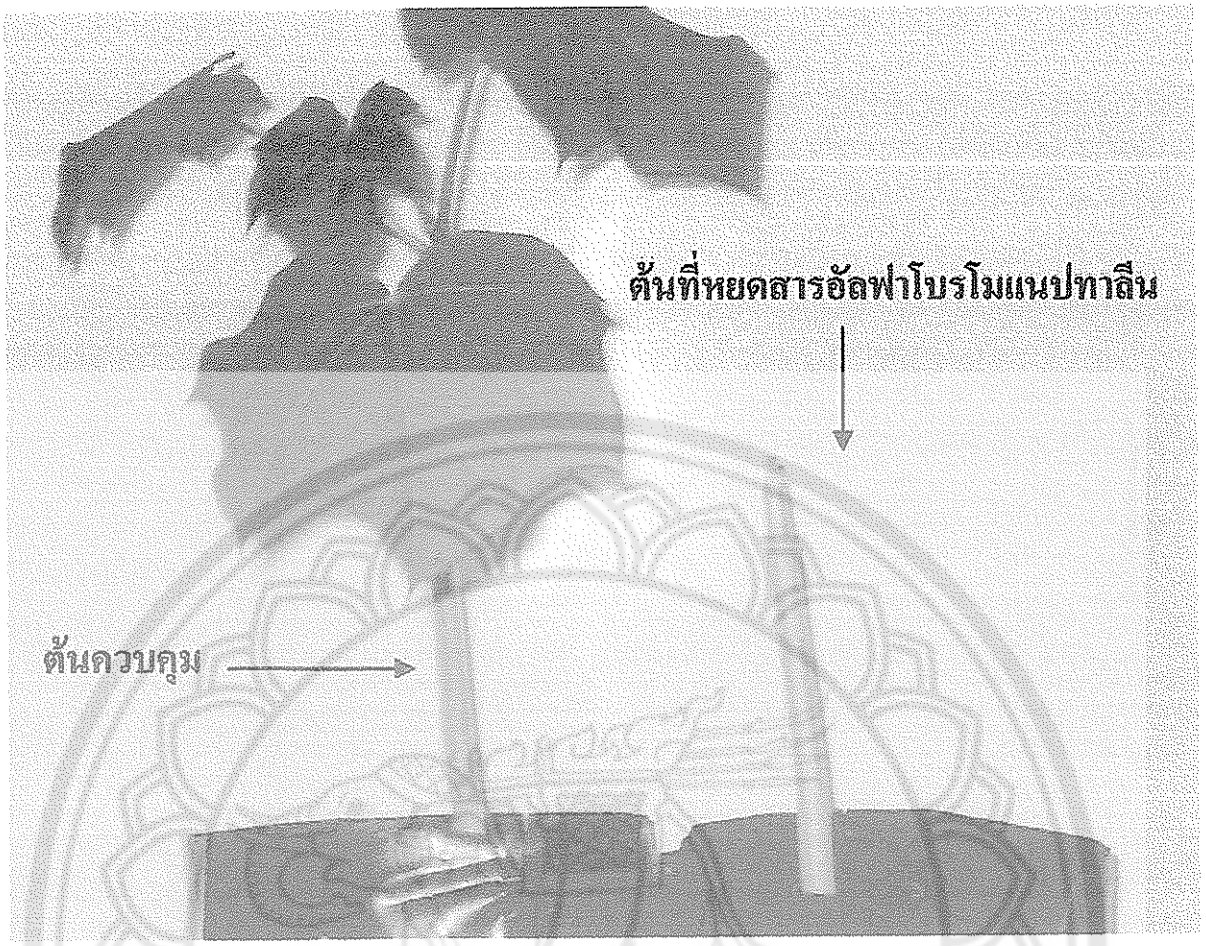



**ภาพที่ 3.4** แสดงลักษณะใบแท้ของสบู่ดำปกติและใบม้วนเป็นวงเมื่อทรีตด้วยสารโคลชิซีน 2% และ 5% A หมายถึง สบู่ดำปกติและสบู่ดำที่ทรีตด้วยสารโคลชิซีน 2%, B หมายถึง สบู่ดำปกติและสบู่ดำที่ทรีตด้วยสารโคลชิซีน 5%

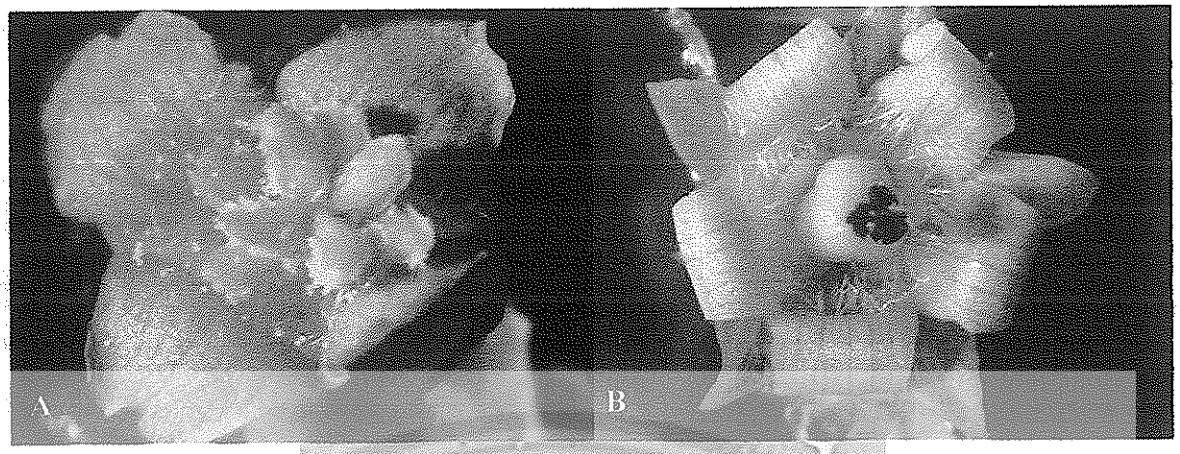
### 3.2.2 ผลของα-bromonapthalene ต่อการกลายของเนื้อเยื่อตายอดสบู่ดำ

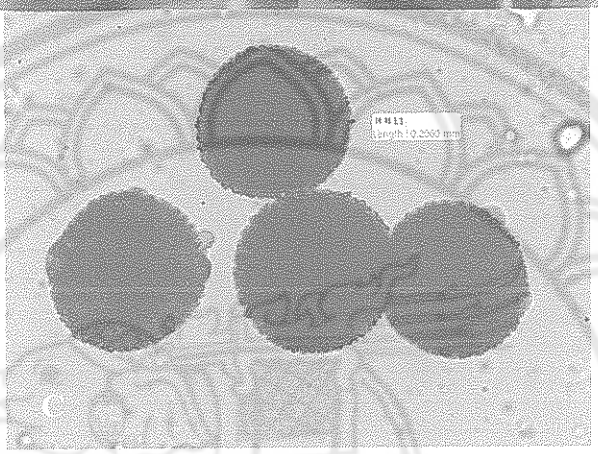
สารเคมีที่นำมาทรีตทั้งหมดมีผลต่อรูปร่างใบแท้คู่ที่ 1, 2, 3 ของสบู่ดำอย่างเห็นได้ชัด พบว่ามีใบครึ่งซีกจากใบปกติ ใบม้วนงอและไม่สมดุล ต้นที่รับสารที่มีความเข้มข้นสูงทำให้ความสูงของต้นน้อย ผลของสาร α-bromonapthalene เปอร์เซ็นการอยู่รอดของต้นที่หยดสารเท่ากับ 5 % จากต้นที่ทรีตสารทั้งหมด 20 ต้นมีต้นรอดเพียงต้นเดียวและเซลล์ปลายยอดถูกทำลาย ทำให้ลำต้นทิ้งใบทั้งหมดเป็นระยะเวลา 6 เดือน จากนั้นผลิใบใหม่เมื่ออายุ 8 เดือน (ภาพที่ 3.5)

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้แก่ ลำต้น ใบ ดอก pollen grain (ภาพที่ 3.6) จำนวนดอก จำนวนผลต่อต้นในปีที่ 1 พบว่าต้นกลายจาก α-bromonapthalene มีความสูงของลำต้นน้อยกว่าต้นปกติ (ตารางที่ 3.3) แต่มีการแตกกอดีกว่าต้นปกติ ลักษณะที่ต่างจากพันธ์เดิมคือแผ่พุ่มใบออกในแนวกว้าง ลักษณะทางสรีระวิทยาที่เด่นชัดคือมีการเจริญเติบโตช้าออกดอกช้ากว่าต้นปกติ สบู่ดำพันธุ์พิษณุโลกที่เป็นต้นควบคุมออกดอกเมื่อปลูกเป็นระยะเวลา 7 เดือน และทยอยออกดอกติดผล ส่วนต้นออโตเทตราพลอยด์นั้นออกดอกเมื่ออายุ 18 เดือน สบู่ดำต้นปกติให้ผลผลิตเมล็ดในปีที่ 1 จำนวน 13.88 กรัมต่อต้น ต้นเทตราพลอยด์ยังไม่มีผลผลิต




ภาพที่ 3.5 แสดงผลของ α-bromonapthalene ต่อเนื้อเยื่อตายอดสบู่ดำ อายุ 60 วัน




ภาพที่ 3.6 แสดงลักษณะ ดอกตัวผู้ ดอกตัวเมีย pollen grain ของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลก

A หมายถึง ดอกตัวผู้, B หมายถึง ดอกตัวเมีย, C หมายถึง pollen grain

**ตารางที่ 3.3 แสดงความสูงของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลก และ พันธุ์กลายด้วย α-bromonapthalene เมื่ออายุ 153 วัน**

| ลักษณะ | พันธุ์พิษณุโลก | พันธุ์กลายด้วย α-bromonapthalene |
|---|---|---|
| ความสูง (ซ.ม.) | 77.7 ± 10.1 | 22 |
| **รอบโคนต้น (ซ.ม.)** | **12.5 ± 1.8** | **5.5** |
| **รอบยอด (ซ.ม.)** | **4.3± 0.6** | **3.1** |

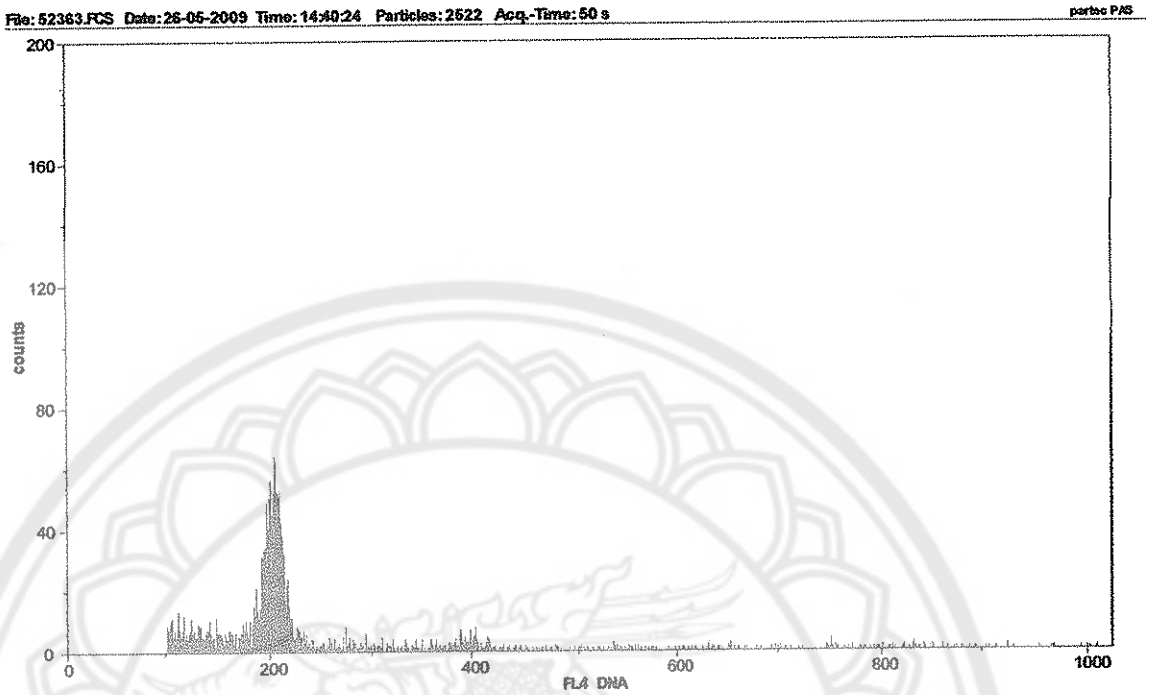
### 3.3. การตรวจระดับพลอยดีของต้นสบู่ดำที่ตายอดผ่านการทรีตสารโคลชิซีนหรือ α-bromonapthalene

#### 3.3.1 ผลการวิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่อง Flow Cytometry (Partec ®)

วิธีวัดปริมาณ DNA (DNA content) ด้วย Flow Cytometry อาศัยหลักการวัดค่า relative nuclear DNA content จากค่าการเรืองแสงฟลูโอเรสเซนต์ของนิวคลีไอที่ถูกย้อม โดยปกติปริมาณ DNA ถูกกำหนดใช้ในหน่วยของ C-unit โดย 1 C คือค่าปริมาณ DNA ของ haploid set ของโครโมโซม (n) ผลการวิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่อง Flow Cytometry จะปรากฏเป็นค่า histogram แสดง peak ของนิวเคลียสในระยะ G1 ของ cell cycle ซึ่งออโตเทตราพลอยด์จะถูกวัดเปรียบเทียบกับดิพลอยด์ จากผลการวิเคราะห์ระดับพลอยดีของสบู่ดำดิพลอยด์ที่เป็นต้นควบคุม พบว่าตำแหน่งของ peak แสดงอยู่ที่ channel 200 (ภาพที่ 3.7) ส่วนต้นที่ถูกทรีตด้วยสารโคลชิซินเตรียมในรูปของสารละลายที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 5 % ก็แสดง peak ใน channel 200 เช่นกัน (ตารางที่ 4, ภาพที่ 3.8) แสดงว่าไม่สามารถชักนำออโตเทรตราพลอยด์ของสบู่ดำได้ ส่วนต้นที่ทรีตด้วย α-bromonapthalene พบ peak ที่ channel 400 (ตารางที่ 5,ภาพที่ 3.9) ซึ่งแสดงว่าเป็นต้นออโตเทรตราพลอยด์

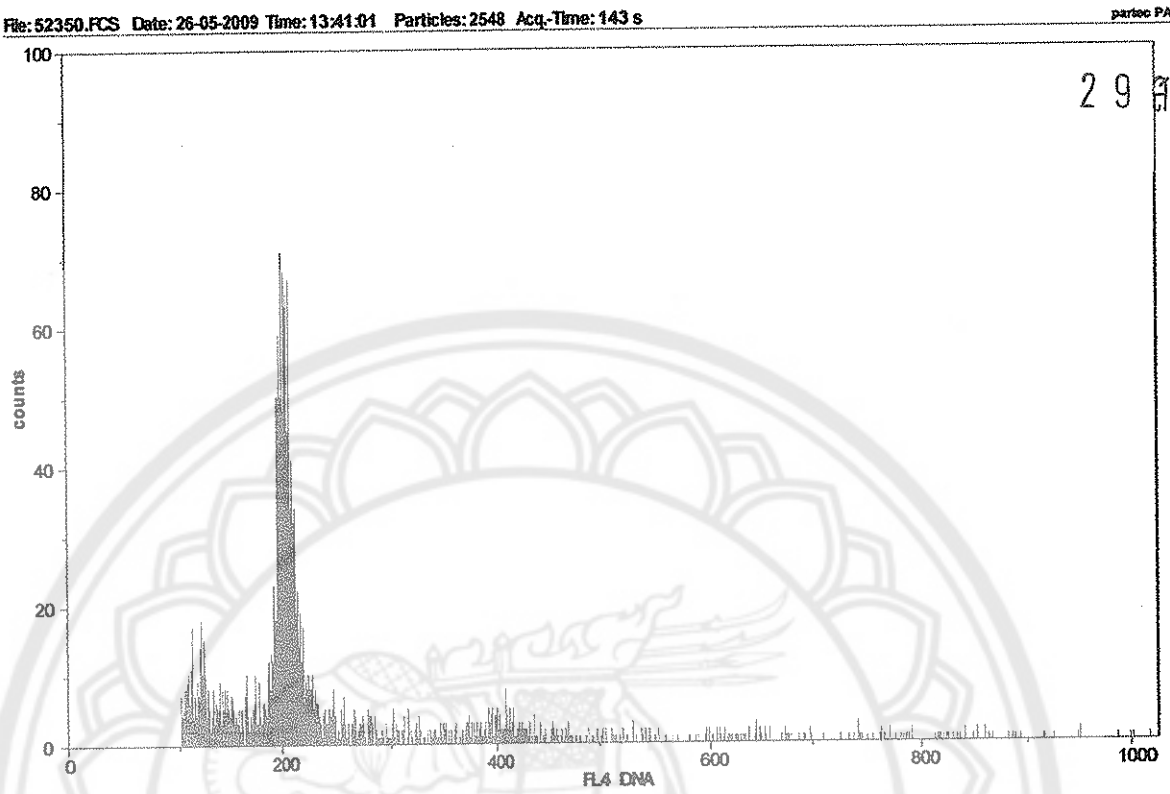
ตารางที่ 3. 4 แสดงระดับพลอยดีของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วยโคลชิซีนความเข้มข้นต่างๆ

| Colchicines concentrations (%) | Ploidy level |
|---|---|
| 0 | 2x |
| 0.5% | 2x |
| 1 % | 2x |
| 2 % | 2x |
| 5 % | 2x |




ภาพที่ 3.7 แสดง Histogram ของ relative nuclear DNA content ของ *J. curcas* L. ดิพลอยด์นิวคลีไอระยะ G1 ปรากฏ peak ที่ channel 200

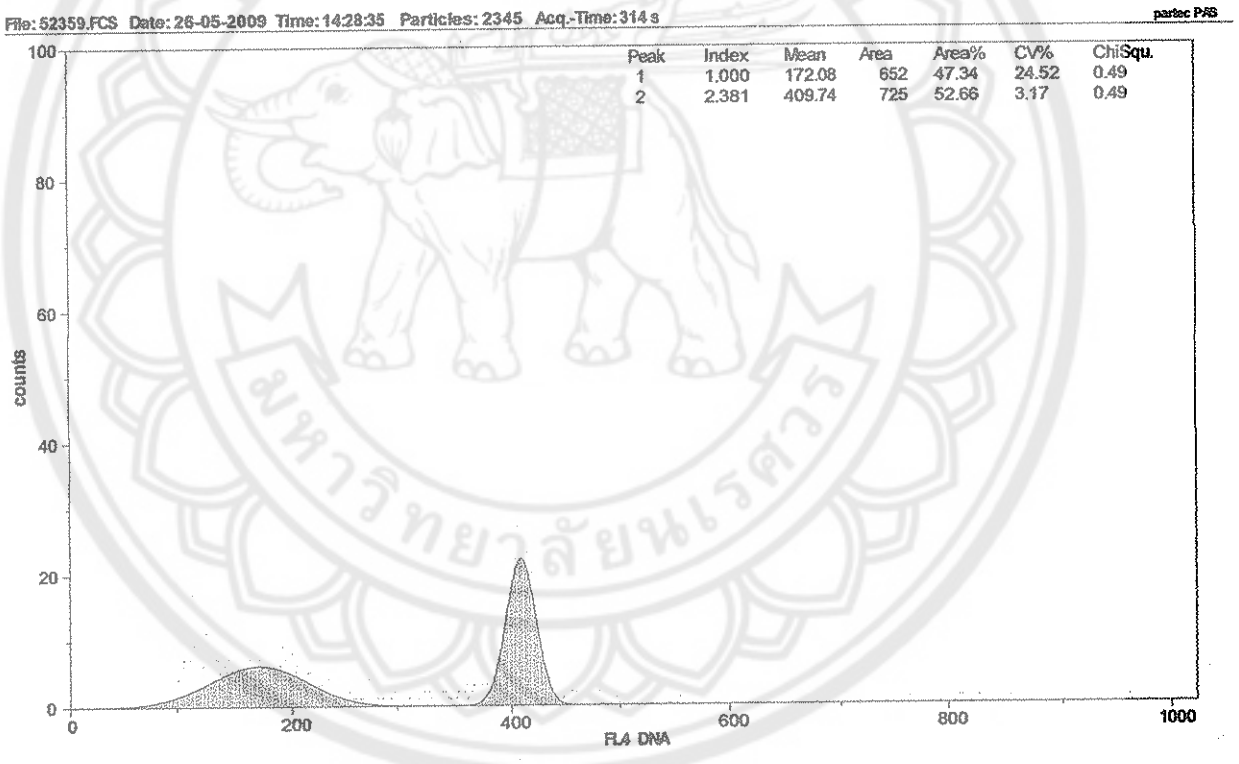
15611350 e3
สำนักหอสมุด
29 ส.ค. 2554
QB
299
.E5
ด2117
2552




ภาพที่ 3.8 แสดง Histogram ของ relative nuclear DNA content ของ *J. curcas* L. ต้นที่ทรีตด้วยสารละลายโคลชิซีนทุกความเข้มข้น นิวคลีไอระยะ G1 ปรากฏ peak ที่ channel 200

ตารางที่ 3. 5 แสดงระดับพลอยดีของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วย α-bromonapthalene

| α-bromonapthalene concentrations | Ploidy level |
|---|---|
| 0 | 2x |
| Saturated | 4x |




ภาพที่ 3.9 แสดง Histogram ของ relative nuclear DNA content ของ *J. curcas* L. ต้นออโตเทตราพลอยด์ที่เกิดจากการทรีตด้วย α-bromonapthalene นิวคลีไอระยะ G1 ปรากฏ peak ที่ channel 400

### 3.4 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

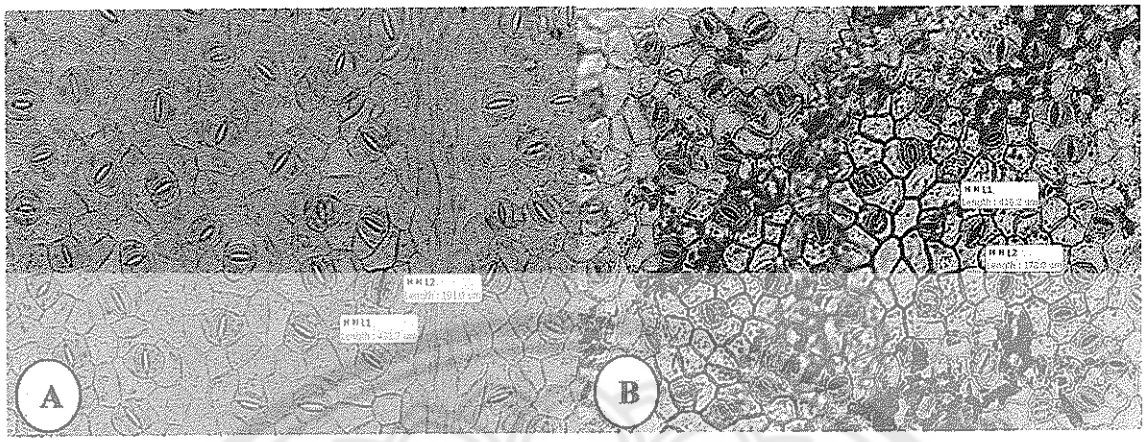
จากการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บีและปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด พบว่าสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลกมีปริมาณคลอโรฟิลล์ 0.47, 0.43, 0.9 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ในขณะที่สบู่ดำพันธุ์พิษณุโลก ที่ทรีตด้วย α-bromonapthalene มีค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ต่างๆ ดังนี้ 0.45, 0.26 และ 0.95 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด สังเกตุเห็นว่าปริมาณคลอโรฟิลล์บีของต้นออโตเทรตพลอยด์มีค่าเพียงครึ่งหนึ่งของต้นควบคุม

ตารางที่ 3.6 แสดงปริมาณคลอโรฟิลล์ ในสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลกและต้นออโตเทตราพลอยด์

| สายพันธุ์ | คลอโรฟิลล์ (มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด) | | |
|---|---|---|---|
| | คลอโรฟิลล์ A | คลอโรฟิลล์ B | คลอโรฟิลล์ทั้งหมด |
| พิษณุโลก | 0.47 ± 0.028 | 0.43 ± 0.06 | 0.9 ± 0.052 |
| ออโตเทตราพลอยด์ | 0.45 ± 0.017 | *0.26 ± 0.115* | 0.95 ± 0.015 |

### 3.5 การศึกษาขนาดปากใบ

การศึกษาขนาดปากใบ (ภาพที่ 3.10) พบว่าสบู่ดำออโตเทรตาพลอยด์มีขนาดความกว้างโดยฉลี่ยเท่ากับ 322.25 ± 27.84 ไมโครมีเตอร์ และความยาวของปากใบ 431.63 ± 35.16 ไมโครมีเตอร์โดยที่ต้นควบคุมมี ขนาดความกว้างโดยฉลี่ยเท่ากับ 270.78 ± 53.13 ไมโครมีเตอร์ และความยาวของปากใบ 423.43 ± 41.9 ไมโครมีเตอร์ จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าความกว้างของปากใบของสบู่ดำออโตเทรตาพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าต้นควบคุม 1.2 เท่า (ตารางที่ 3.7)




**ภาพที่ 3.10 ภาพแสดงขนาดปากใบของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลกและต้นออโตเทรตราพลอยด์**

A หมายถึง ปากใบพันธุ์พิษณุโลก, B หมายถึง ปากใบพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วย α-bromonapthalene

**ตารางที่ 3.7 แสดงขนาดความกว้าง และความยาวของปากใบ**

| สายพันธุ์ | ขนาดปากใบ | |
|---|---|---|
| | กว้าง (µm) | ยาว (µm) |
| พิษณุโลก | 270.78 ± 53.13 | 423.43 ± 41.9 |
| พิษณุโลก อัลฟา-โบรโมแนพทาลีน | *322.25 ± 27.84* | 431.63 ± 35.16 |

# บทที่ 4

# อภิปรายผลการทดลอง

## 4.1 การชักนำออโตเทตราพลอยด์จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของสบู่ดำโดยการทรีตสารโคลชิซีน

โคลชิซีนเป็นสารแอลคาลอยด์มีสูตรเคมีคือ $C_{22}H_{25}O_6$ ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ (Ostergren, 1950) จึงมีผลทำให้โครโมโซมของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวไม่สามารถแยกออกจากกันได้และหยุดไว้ที่ระยะเมทาเฟส ต่อมานิยมใช้ในเทคนิคการชักนำการเพิ่มชุดของโครโมโซม (chromosome doubling) ของพืชเพื่อสร้างพืชพอลิพลอยด์ (Stebin, 1971, Forbes, 1961) ในการศึกษานี้มีความประสงค์ทดสอบการใช้โคลชิซีนชักนำออโตเทตราพลอยด์ในสภาพ *in vitro* ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ใช้คือแคลลัสที่ชักนำมาจากเนื้อเยื่อใบในชั้นที่ 3ของสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลกบนอาหาร MS ที่เติม BA และ IBA ตามวิธีการที่กล่าวมาเบื้องต้นพบว่าโคลชิซีนความเข้มข้น 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน แคลลัสที่ทรีตโคลชิซีนเข้มข้น 0.1% และ 0.2% เป็นระยะเวลา 3 วัน สามารถชักนำให้เกิด mixoploid ซึ่งความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นที่ $LD_{50}$ ขณะนี้กำลังเพาะเลี้ยงแคลลัสไลน์นี้เพื่อค้นหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำไปเป็นต้นสมบูรณ์

## 4.2 การชักนำออโตเทตราพลอยด์จากตายอดของสบู่ดำโดยการทรีตสารโคลชิซีนและ α-bromonapthalene

การชักนำการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมพืชสามารถเลือกใช้ชิ้นเนื้อเยื่อพืชตามความเหมาะสมและความสำเร็จของการชักนำก็ขึ้นกับการเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดในกรณี

ของสบู่ดำเมล็ดนั้นมีเปลือกหุ้มหนาการซึมผ่านของสารเคมีต่างๆจึงยาก ผู้วิจัยจึงเลือกที่จะทดลองใช้ต้นกล้าในระยะที่ยังคงมีใบเลี้ยงทั้งสองใบและตายอดของใบแท้กำลังเจริญมาเป็นตัวอย่างในการทรีตสารแทนการใช้เมล็ดโดยตรง สารโคลชิซีนความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 5 % ไม่สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพลอยดีของสบู่ดำได้ อย่างไรก็ตามควรมีการทดลองใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้นจนพบความเข้มข้น $LD_{50}$ นอกจากโคลชิซีนแล้วยังทดลองใช้ α-bromonapthalene ซึ่งสารนี้เป็นสารที่ใช้ในการ Pretreatment โครโมโซมพืชให้หยุดอยู่ในระยะเมทาเฟส ออกฤทธิ์เช่นเดียวกับโคลชิซีนแต่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงใช้ในสภาพ saturated solution พบว่าให้ผลในการชักนำออโตเทตราพลอยด์ในเนื้อเยื่อตายอดสบู่ดำได้เป็นอย่างดี

**สรุปผลการทดลอง**

แคลลัสที่ทรีตด้วยโคลชิซีน เข้มข้น 0.1% และ 0.2% เป็นเวลา 3 วัน สามารถชักนำให้เกิด mixoploid เมื่อทรีตสารโคลชิซินเตรียมในรูปของสารละลายที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 5 % ลงบนตายอดของต้นกล้าอายุ 9 วัน ไม่สามารถชักนำให้เกิดการผันแปรทางพันธุกรรมได้ และเมื่อชักนำการแปรผันทางพันธุกรรมของตายอดสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลกด้วย α-bromonapthalene สามารถชักนำให้ต้นสบู่ดำเกิดเป็นออโตเทตราพลอยด์ ซึ่งมีลักษณะต้นเตี้ย แตกกอมากกว่าต้นปกติ แผ่พุ่มใบออกในแนวกว้าง ออกดอกช้า

# เอกสารอ้างอิง


กันยารัตน์ ไชยสุต 2532. **เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล** Zephyranthes, ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Arnon DI. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1–15.

Carvalho et. al. (2008)Genome size, base composition and karyotype of Jatropha curcas L., an important biofuel plant. Plant Science 174 : 613–617.

Doggett H and Majisu B.N. 1972. Fertility improvement in autopolyploid sorghum.3.Yields of cultivated tetraploid. Euphytica 21(1):86-89.

Forbes, I., Jr., and G.W. Burton. 1961. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecies hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flugge. Crop Sci. 1:402–406.

http://www.kasetcity.com/Thaibioenergy. "สบู่ดำและไบโอดีเซลพลังงานทดแทนเพื่อเกษตรกร"นิตยสารเทคโนโลยีชาวบ้านในเครือมติชน

Jin-Hu Wu and Pauline M., 2002. Autopolyploid tangor plant regeneration from in vitro Citrus Somatic embryogenic callus treated with colchicines. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70(1)

Kitajima, A., M. Befu, Y. Hidaka, T. Hotta and K. Hasegawa. (2001) A chromosome preparation method using young leaves of *Citrus*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 70: 191–194.

Mathur A, Mathur A.K, Ahuja P.S, and Tyagi B.R, 1987. Establishment and multiplication of colchicines autotetraploids of Rauvolfia serpentia L. Benth. Ex Kurz. Through tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10 (2): 129-134.

Puangpaka Soontornchainakseang and Thaya Jenjitikul. 2003. Karyology of Jatropha (Euphobiaceae) in Thailand. Thai FOR BULL (BOT) 31:105-112.

Quarin C.L, Espinoza F, Eric J. M, Silvina C.P, Osca A. B., 2001. A rise of ploidy level induces the expression of apomixes in Paspalum notatum. Sexual Plant Reroduction 13(5): 243-249.

Reidar V. 1960. The Effect of induced autopolyploid on resistance to clover rot (*Sclerotinia trifoliorum*) Euphytica 9(1) : 35-38.

Sartnee et. al. (1995) In vitro induction of polyploidy in white mulberry (Morus alba var. s54) by colchicines treatmet. ScienceAsia 21: 229-242.

Shang-Shyng Yang, Tsai-Yi Wu, Chia-Bei Wei (2008) Bioethanol Production Progress in Taiwan. World Renewable Energy Congress (WRECX) Editor A. Sayigh © 2008 WREC. All rights reserved.: 26-30.

Smith M.K. 2004. Ginger (*Zingiber offinale* ) autotetraploids with improved processing quality produced by an in vitro colchicines treatment. Australian J. of Experimental Agriculture 44(10): 1065-1072.

Stebbins GL. 1971. Chromosomal evolution in higher plants [M]. Edward Arnold Ltd,London

Sujatha, M. and Mukta, N. (1996) "Morphologenesis and plant regeneration from tissue culture of *Jatropha curcas.*" Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 135-141.