อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

สัญญาเลขที่ AG-AR-023/2552

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 20 พ.ค. 2554
เลขทะเบียน 1.3458729
เลขเรียกหนังสือ SB 299 .E9 ก2115 2553

การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำโดยการใช้สารโคลชิซิน: การแปรผันทางพันธุกรรมของลักษณะเมล็ดและปริมาณน้ำมันของสบู่ดำโคลชิพลอยด์

(Colchicine Breeding of *Jatropha curcas* Linn: Genetic variability studies in seed traits and oil content of colchiploid *Jatropha curcas* Linn)

ผู้วิจัย

ผศ. ดร. ดวงพร เปรมจิต

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2552 สัญญาเลขที่ AG-AR-023/2552

ขอบคุณผู้ร่วมวิจัย รศ.ดร. ศิริพงษ์ เปรมจิต จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ช่วยแนะนำและระดมความเห็นในการแก้ปัญหาระหว่างการวิจัยตลอดจนผู้ช่วยวิจัย จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ น.ส.พรรนิดา สิงห์ทอง และนิสิตช่วยวิจัย ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม น.ส.ธัญญา ชูสงฆ์

ขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ที่ให้พื้นที่แปลงวิจัย

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีความพยายามชักนำออโตเทตราพลอยด์สบู่ดำด้วยโคลชิซีน อัลฟา-โบรโมแนปธาลีน คลอโรฟอร์มและเมทานอล วิธีการที่ใช้ชักนำคือทำการหยดสารลงบนตายอดของต้นกล้าที่มีเซลล์เจริญ อายุ 9 วันทุกวันเว้นวันเป็นเวลา 1 เดือน ใช้เครื่องวิเคราะห์ระดับพลอยดี Flow cytometry ตรวจการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดี สารยับยั้งไมโทติกโคลชิซีนความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 % ไม่สามารถชักนำการเพิ่มชุดของโครโมโซม อัลฟาโบรโมแนปาลีนที่ความเข้มข้นยิ่งยวดสามารถทำให้เกิดออโตเทตราพลอยด์โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 5 % ออโตเทตราพลอยด์มีลักษณะที่จำแนกออกจากดิพลอยด์ได้แก่มีจำนวนเซลล์ปากใบลดลง มีความยาวและความกว้างมากกว่า มีเมล็ดยาวกว่า และมีละอองเรณูขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ ในการทรีตคลอโรฟอร์มมีผลเพิ่มจำนวนดอกต่อต้นเป็น 9,280 ดอกซึ่งมีจำนวนมากกว่าต้นไม่ทรีตสาร 4.9 เท่า โดยสบู่ดำที่ศึกษามีอัตราส่วนตัวผู้ต่อตัวเมียเท่ากับ 13:1 สบู่ดำที่ทรีตคลอโรฟอร์มให้ผลผลิตเมล็ด 779 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปีซึ่งสูงกว่าต้นควบคุม 5.9 เท่า และมีปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้น 1.6 เท่า

Abstract

Induction of autotetraploid of *Jatropha curcas* L. by colchicines, alpha-bromonapthalene, chloroform and methanol were attempted. Procedure applied in this study was treatment of each compound to the 9 days old seedling with the chemicals every alternative day for a month. Change in ploidy was detected by flow cytometry. Mitotic inhibitor, colchicines at concentration 0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 % was unable to doubling chromosome numbers. Saturated solution of Alpha-bromonapthalene has provided tetraploid plant at 5% of survival rate. Tetraploid could be determined by reference characteristics; less number of stomata cell and higher in width and length, longer seed length and pollen grain is bigger than that of the diploid plant. Number of flowers increased when treated with chloroform and methanol. Chlorophyll a, b and total content decreased in treated methanol plants. Chloroform has effected on enhancing number of flowers 9,280 flowers/tree/year which was 4.9 times to that of the untreated trees. Male to feamale flower ratio was 13: 1. The results revealed that seed production of *J. curcas* trated with chloroform provided the maximum seed weight 779 kg/rai/year which was 5.9 times higher that that of the control. Oil content from 100 seed dry weight increased 1.6 times.

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		I
บทคัดย่อภาษาไทย		II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		III
สารบัญตาราง		VI
สารบัญภาพ		VII
บทที่ 1	บทนำ	
	1.1 ความสำคัญ	1
	1.2 ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	3
	1.3 วัตถุประสงค์	3
	1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
	1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	3
	1.6 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการ	4
บทที่ 2	วิธีการดำเนินการวิจัย	
การทดลองที่ 2.1	ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของสบู่ดำสายพันธุ์ อินเดีย นครราชสีมา สตูล และพิษณุโลก	6
การทดลองที่ 2.2	การชักนำออโตเทตราลอยด์โดยสาร 4 ชนิดคือ โคลชิซีน (colchicines) คลอโรฟอร์ม (chloroform) เมทานอล (methanol) และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีน ทรีตเมนต์	7
การทดลองที่ 2.3	การศึกษาลักษณะความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นรุ่น M1	8
การทดลองที่ 2.4	การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นรุ่น M1	8
การทดลองที่ 2.5	การวัดขนาดปากใบของต้นรุ่น M1	8
การทดลองที่ 2.6	การเก็บข้อมูลจำนวนดอกในช่อ จำนวนดอกตัวผู้ จำนวนดอกตัวเมีย จำนวนผล และน้ำหนักเมล็ด	8
การทดลองที่ 2.7	ปริมาณน้ำมันในเมล็ดสบู่ดำรุ่น M1	9

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 ผลการทดลอง

3.1 ผลของโคลชิซีน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีน ต่อการแปรผันของชุดของโครโมโซมของเซลล์เจริญปลายยอดสบู่ดำรุ่น M1 10

3.2 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และอัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อการแปรผันของปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นรุ่น M1 13

3.3 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อการแปรผันของจำนวนเซลล์ปากใบ และ ขนาดปากใบของต้นรุ่น M1 15

3.4 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อจำนวนดอกทั้งหมด/ต้น ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียและจำนวนผล 17

3.5 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อจำนวนเมล็ดในผลสบู่ดำรุ่น M1 19

3.6 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อความยาว ความกว้างและน้ำหนักเมล็ดและเปอร์เซ็นต์น้ำมันของสบู่ดำรุ่น M1 21

3.7 ผลผลิตเมล็ดต่อต้นต่อปีและค่าประมาณการผลผลิตเมล็ดต่อไร่ต่อปีของสบู่ดำรุ่น M1 23

3.8 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อความสมบูรณ์พันธุ์และขนาดของละอองเรณู (pollen grains) ของสบู่ดำรุ่น M1 25

บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง 29

สรุปผลการทดลอง 31

เอกสารอ้างอิง 32

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สบู่ดำรุ่น (M0) สายพันธุ์อินเดีย (I) นครราชสีมา (N) พิษณุโลก (P) และสตูล (S) 7

3.1 ผลของโคลชิซีน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และอัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อการแปรผันของชุดของโครโมโซมของเซลล์เจริญปลายยอดสบู่ดำรุ่น M1 12

3.2 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อการแปรผันของปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นรุ่น M1 14

3.3 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อการแปรผันของจำนวนเซลล์ปากใบ และ ขนาดปากใบของต้นรุ่น M1 16

3.4 จำนวนดอกทั้งหมด/ต้น ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียและจำนวนผล 18

3.5 แสดงเปอร์เซ็นต์จำนวนเมล็ดในผลสบู่ดำ รุ่น M1 20

3.6 ความยาวเมล็ด ความกว้างเมล็ด และน้ำหนักเมล็ดจำนวน 100 เมล็ดและปริมาณน้ำมันของสบู่ดำรุ่น M1 22

3.7 ผลผลิตต่อต้นต่อปี และ ค่าประมาณการผลผลิตเมล็ดต่อไร่ต่อปีของสบู่ดำรุ่น M1 24

3.8 ความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณูของสบู่ดำรุ่น M1 26

3.9 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อการแปรผันของขนาดละอองเรณูของต้นรุ่น M1 27

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
3.1	Histogram ของค่า relative nuclear DNA content ของ *J. cucas* L. แสดง peak ของ diploid nuclei ระยะ G1 ปรากฏที่ channel 200	11
3.2	Histogram ของค่า relative nuclear DNA content ของ *J. cucas* L. แสดง peak ของ autotetraploid nuclei ระยะ G1 ปรากฏที่ channel 400	11
3.4	แสดงลักษณะของละอองเรณู (pollen grains) เมล็ด และ ปากใบ ของสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลกที่เป็นต้นดิพลอยด์ และออโตเทตราพลอยด์	28

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของสบู่ดำ

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นไม้พุ่มจัดอยู่ในวงศ์ Euphobiaceae พบการกระจายตัวในเขตร้อนและเขต subtropics เพื่อฟื้นฟูพื้นที่เสื่อมโทรม ผลผลิตจากสบู่ดำใช้ประโยชน์เป็นอาหารสัตว์ สบู่ เทียนไข สารกำจัดศัตรูพืช ยารักษามะเร็ง สบู่ดำเป็นพืชที่จัดว่ามีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งดีเซลทดแทน เนื่องจากมีคุณสมบัติคือ ทนแล้ง เจริญเติบโตรวดเร็ว ขยายพันธุ์ง่าย เมล็ดพันธุ์มีราคาถูก มีปริมาณน้ำมันสูง การพัฒนาของเอมบริโอไปเป็นต้นสมบูรณ์ใช้ระยะเวลาสั้น ปลูกได้ในสภาพแวดล้อมหลากหลาย

น้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำสามารถใช้เป็นแหล่งของน้ำมันดีเซลอีกแหล่งหนึ่งเพื่อทดแทนดีเซลที่เตรียมจากปิโตรเลียม ปัญหาการขาดแคลนพลังงานทั้งในปัจจุบันและอนาคตทำให้สบู่ดำกลับมาเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นไบโอดีเซลที่มำกำลังผลิตมากเพียงพอในระดับอุตสาหกรรม นอกจากแก้ปัญหาการขาดแคลนพลังงานได้แล้วสบู่ดำยังเป็นพืชที่สามารถใช้เพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร และช่วยลดการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนสู่บรรยากาศ

ผลผลิตที่ได้ในสบู่ดำจากพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเมล็ดสูงมีค่าอยู่ที่ 5 ตัน/ เฮกเตอร์/ ปี ทั้งยังมีบางสายพันธุ์ที่มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบภายในเมล็ดถึง 66.4 % ในปี 2006 ข้อมูลเหล่านี้กระตุ้นให้นักวิจัยหันกลับมาเร่งงานวิจัยและพัฒนาสบู่ดำให้เป็นแหล่งทดแทนน้ำมันดีเซล

1.1.1 แนวทางการปรับปรุงลักษณะทางพันธุกรรมและการพัฒนาสายพันธุ์สบู่ดำ

หลายประเทศทั่วโลกดำเนินการนำเข้าพันธุ์สบู่ดำ แต่ยังมีข้อจำกัดคือพันธุ์สบู่ดำนั้นให้ผลผลิตไม่สม่ำเสมอ และผลผลิตมักต่ำไม่สามารถทำมูลค่าทางเศรษฐกิจได้ ธนาคารเชื้อพันธุ์สบู่ดำ (germplasm) ยังขาดข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรม พันธุ์ที่เก็บรักษานั้นก็ยังคงมีผลผลิตต่ำ นอกจากนั้นพันธุ์เหล่านี้ขาดความหลากหลายทางพันธุกรรม และยังไม่ต้านทานต่อโรคและแมลง คุณภาพและปริมาณของผลผลิตสบู่ดำนั้นขึ้นกับอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ด้วยข้อด้อยที่กล่าวมาการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำจึงเป็นงานที่จำเป็นเร่งด่วนในการศึกษา การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำนั้นควรพุ่งเป้าไปที่ปรับปรุงลักษณะใหม่ๆ ดังต่อไปนี้ 1) ให้ผลผลิตเมล็ดสูง 2) เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง 3) เจริญเติบโตเร็ว 4) ต้นเตี้ย 5) ต้านทานโรคและแมลง 6) ทนแล้งและสภาพแวดล้อมที่กดดันอื่นๆ 7) พันธุ์ที่ช่อดอกมีอัตราส่วนของดอกตัวเมียมากกว่าดอกตัวผู้ 8) คุณภาพน้ำมัน

เทคนิคทางพันธุศาสตร์ที่สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำได้แก่

1) การผสมพันธุ์แบบดั้งเดิม
2) การชักนำมิวเทชันเพื่อสร้างความแปรปรวนของลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3) ถ่ายยีนจากแหล่งยีนภายนอก (alien gene transfer through interspecific hybridization)

4) transformation

แหล่งกำเนิดของพันธุ์สบู่ดำคาดว่าอยู่ในประเทศเม็กซิโก และประเทศแถบอเมริกากลาง อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการตรวจและพิสูจน์ด้วยการใช้เทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อยืนยันจุดกำเนิดที่แท้จริง

ศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมและแหล่งเชื้อพันธุ์ของสบู่ดำตั้งอยู่ใน 3 ประเทศ ได้แก่ ประเทศ Costa Rica (เมือง CATIE) Burkina Faso (12 จังหวัดใน CNSF) และประเทศอินเดีย (เมือง Cape Verde) แต่เชื้อพันธุ์ทั้งหมดไม่มีความแตกต่างทางลักษณะทางพันธุกรรม

สบู่ดำพันธุ์ป่ากระจายตัวอยู่ในธรรมชาติในทวีปอเมริกาแถบร้อน แอฟริกา และเอเชียใต้ซึ่งเป็นแหล่งที่สามารถทำการเก็บรวบรวมความหลากหลายลักษณะของพันธุกรรมที่ไม่มีในพันธุ์ที่ใช้งานในปัจจุบัน การปรับปรุงพันธุ์ให้สำเร็จการดำเนินงานในขั้นแรกต้องทำการสำรวจศึกษาความแปรผันลักษณะทางพันธุกรรมทั้ง intra และ inter accessional ของเมล็ดเชื้อพันธุ์ต่างๆ จากนั้นแยกเชื้อพันธุ์ให้บริสุทธิ์และขยายพันธุ์เหล่านี้ให้มีปริมาณมากขึ้น

พันธุ์ที่ใช้งานปัจจุบันเกิดขึ้นในธรรมชาติและถูกนำมาปลูก พบว่าพันธุ์ที่มีกำเนิดจากเมือง Cape Verde ของอินเดียแพร่กระจายไปสู่ประเทศอื่นๆ ทั่วโลก สายพันธุ์ของนิการากัวติดผลจำนวนน้อยกว่าพันธุ์ของอินเดียแต่ขนาดผลใหญ่กว่า จึงทำให้ดูเหมือนว่ามีผลผลิตเท่าๆกับพันธุ์อื่นๆ นอกจากนั้นพันธุ์ที่น่าสนใจมากคือสบู่ดำพันธุ์ที่ไม่มีพิษ (non-toxic variety) ซึ่งพบในแมกซิโก ผู้คนที่นั่นใช้ประโยชน์ในแง่อาหารคือกินเมล็ดหลังจากผ่านการคั่วให้สุก หรือใช้ เป็นน้ำมันปรุงอาหาร พันธุ์ไม่มีพิษเนื่องจากไม่มีการสะสมสาร phorbol ester ที่คนสามารถใช้รับประทานมากกว่าใช้ในแง่อื่นๆ และส่วนเปลือกก็ยังเป็นแหล่งอาหารสัตว์ที่ดี พันธุ์สบู่ดำที่ได้จากกระบวนการคัดเลือกพันธุ์ สามารถคัดสายพันธุ์ SDAJ I (Chatrapati) เป็นสายพันธุ์ทางเศรษฐกิจสำหรับปลูกในพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนต่อปีน้อยและที่แห้งแล้งในบริเวณ Gujarat และ Rajasthan ในประเทศอินเดีย

การปรับปรุงพันธุ์ของสบู่ดำควรยึดแนวทางการปรับปรุงพันธุ์ของละหุ่งซึ่งในอดีตนั้นละหุ่งก็เป็นพันธุ์ป่ามีลำต้นสูง ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในช่อเดียวกัน ลักษณะของละหุ่งได้รับการพัฒนามาเรื่อยๆ จนกระทั่งได้ลักษณะลำต้นที่มีข้อสั้นและติดผลดก เนื่องจากพันธุ์ที่ปรับปรุงนั้นมีหลากหลายตั้งแต่พันธุ์ที่มีอัตรส่วนระหว่างดอกตัวผู้และดอกตัวเมียต่างๆ เช่น พันธุ์ที่มีเฉพาะดอกตัวเมียหมดทั้งช่อจนกระทั่งถึงพันธุ์ที่มีดอกตัวผู้เกือบทั้งหมด การชักนำมิวเทชันเป็นเทคนิคที่ช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์ของละหุ่งประสบความสำเร็จดังกล่าว รวมทั้งการรวบรวมเชื้อพันธุ์และการคัดกรองพันธุ์ที่มีโดยมุ่งคัดเลือกเอาเฉพาะที่ช่อดอกมีดอกตัวเมียในอัตราส่วนมากกว่าดอกตัวผู้อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างละหุ่งกับสบู่ดำ ละหุ่งจัดเป็นพืชในจีนัส *Castor* เป็นสมาชิกเดี่ยวๆ ในจัสนี้ แต่สบู่ดำจัดอยู่ในจีนัส *Jatropha* ซึ่งมีพืชที่เป็นสมาชิกทั้งไม้พุ่ม ไม้ยืนต้น พืชหัว และนอกจากนั้นพบว่าพืชแต่ละสปีชีส์มีรูปแบบของการต้านทานเชื้อที่

แตกต่างกัน และมี ปริมาณและชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบต่างกัน รวมไปถึงลักษณะดอก ผล ก็ยังหลากหลาย ดังนั้นจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการนำลักษณะดีๆ ที่ต้องการจากจีนัส *Jatropha* ถ่ายทอดให้สบู่ดำเพื่อนำสู่การพัฒนาพันธ์ที่เหมาะสมทางการค้าในอนาคต

1.2 ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำแบบดั้งเดิมมีข้อจำกัดเพราะพันธุ์สบู่ดำมีน้อยและยังคาดว่ามาจากแหล่งกำเนิดเดียวกันดังนั้นพืชชนิดนี้จึงมีฐานพันธุกรรมไม่กว้าง เทคนิคที่เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจคือการใช้สารโคลชิซีนมาชักนำออโตโพลิพลอยด์ (autopolyploid) ที่เรียกว่าโคลชิพลอยด์ (colchiploid) สามารถนำมาปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำตามสมมุติฐานว่าออโตเทตราพลอยด์ให้ลักษณะเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ขึ้น การชักนำมิวเทชันเป็นเทคนิคช่วยลดข้อจำกัดเรื่องฐานพันธุกรรมลงไป พันธุ์สบู่ดำที่ให้ผลผลิตน้ำมันสูงพอที่จะปลูกเชิงพาณิชย์นั้นยังมีความต้องการสูงทั้งในปัจจุบันและอนาคตเพื่อใช้เป็นไบโอดีเซลในประเทศไทยงานปรับปรุงพันธุ์จึงยังคงมีความสำคัญเมื่อคำนึงถึงปริมาณดีเซลที่ลดลงและจำเป็นต้องนำไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชมาทดแทนอย่างแน่นอนและการสร้างสบู่ดำสายพันธุ์ใหม่โดยวิธีที่นำเสนอมานี้จะเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาผลผลิตน้ำมันสบู่ดำต่ำได้

1.3 วัตถุประสงค์

สร้างความแปรปรวนพันธุกรรมสบู่ดำด้วยสารเคมี นำต้นรุ่น M1 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ด และ ปริมาณน้ำมัน

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ปลูกและศึกษาลักษณะทาง Morphology ของต้นรุ่น M1 จากต้นที่ผ่านการชักมิวเทชัน วัดปริมาณดีเอนเอด้วย Flow cytometry เพื่อทราบถึงการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีและคัดต้นที่เป็น autotetraploid พร้อมทั้งศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของลักษณะเมล็ดและปริมาณน้ำมันของต้นผ่านการทรีตเมนต์

1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ในการชักนำออโตโพลีพลอยด์ (Autopolyploid) ด้วยสารโคลชิซีนในพืชหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จคือ

มีรายงานการผลิตขิง (*Zingiber offinale*) ที่เป็นออโตเทตราพลอยด์โดยใช้เนื้อเยื่อปลายยอดแช่ในสารโคลชิซีนหรือ dimethylsulfoxide และได้ผลสำเร็จเป็นอย่างดี ลักษณะของขิงออโตเทตราพลอยด์จะมี ยอด ความยาวใบ ความกว้างใบ ขนาดของ rhizome ใหญ่กว่าดิพลอยด์ และบางต้นให้ผลผลิตรวมสูงกว่าแต่ rhizome มีขนาดเล็กกว่า มีการทดสอบพันธุ์หลายรอบการเพาะปลูกจนมีผลิตคงที่ ผลการทดลอง

ครั้งนี้ให้ออโตเทตราพลอยด์หลายสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีต่างกัน 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 ปกติมีระดับพลอยดีเป็นดิพลอยด์แต่กลับเป็นหมันผสมตัวเองไม่ติดเพิ่มความสมบูรณ์สายพันธุ์ออโตเทตราพลอยด์โดยชักนำด้วยโคลชิซีนได้ต้นออโตเทตราพลอยไม่เป็นหมัน (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* สามารถนำต้นที่เกิดออโตเทตราพลอยไปเลี้ยงในแปลงและในกรีนเฮาส์มีเปอร์เซ็นต์การรอด 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)

1.6 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) การเพิ่มขึ้นของโครโมโมโซมมีผลต่อพืชทั้งทางสัณฐานวิทยา (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 ของโครโมโมโซมใน microsporocyte พบว่ามี 7 ringII ± 4 rodII (Ruangpaka S and Thaya J, 2003) ดังนั้นการเพิ่มโครโมโซมทั้งชุดโดยโคลชิซีนจะให้ออโตเททราพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n=4x=44 และคาดว่าต้นสบู่ดำออโตโพลิพลอยด์มีลักษณะเมล็ดที่ใหญ่ขึ้น พันธุ์ที่จะสามารถผลิตเป็นการค้าและคุ้มทุนนั้นจะต้องมีผลผลิตถึง 1,500-2,000 กิโลกรัมต่อไร่ วิธีการที่นำเสนอมาจึงเป็นวิธีที่น่าสนใจวิธีหนึ่งเพื่อสร้าง

สายพันธุ์ที่มีผลผลิตสูงในเวลาสั้นคือและเป็นวิธีที่สามารถดำเนินการได้อย่างไม่ซับซ้อนยุ่งยากคือการชักนำโคลชิพลอยด์ ซึ่งใช้สารละลายโคลชิซีนและสารเคมีอื่นๆ มาชักนำให้เกิด autotetraploid นั้นเป็นความหวังว่าจะได้ต้นสบู่ดำที่มีเมล็ดขนาดใหญ่ขึ้นตลอดจนมีปริมาณน้ำมันสูงขึ้น โดยการวิจัยนี้ดำเนินการศึกษาความแปรปรวนของลักษณะเมล็ดและปริมาณน้ำมันของสบู่ดำที่ผ่านการทรีตสารเคมีในรุ่น M1 รวมทั้งการใช้เทคนิคทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำต้นออโตเทตราพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ

บทที่ 2
วิธีการดำเนินการทดลอง

การศึกษานี้ได้รับความอนุเคราะห์พันธุ์สบู่ดำจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์อินเดีย นครราชสีมา สตูล และพิษณุโลก จากศูนย์วิจัยพันธุ์พืชงิ้วงาม จังหวัดพิษณุโลก

ข้อกำหนดเกี่ยวกับคำศัพท์

โคลชิพลอยด์ (cochiploid) หมายถึง ออโตเทตราพลอยด์ที่ชักนำจากโคลชิซีน

ออโตเทตราพลอยด์ (autotetraploid) คือต้นที่มีการชักนำให้มีการเพิ่มชุดของโครโมโซม เป็นสองเท่า 2n = 4x และจีโนมเหมือนกันทั้ง 4 ชุด

ประวัติพันธุ์สบู่ดำที่นำมาศึกษา

ประวัติพันธุ์สบู่ดำที่นำมาศึกษาทุกสายพันธุ์เป็นพันธุ์ที่มีผลผลิตดีเนื่องจากผ่านการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือก ในช่วงระหว่างปี 2527 (อภิชาติ และคณะ 2549) โดยมีรายละเอียดดังนี้

พันธุ์สตูล พัฒนามาจากพันธุ์สบู่ดำทางภาคใต้และมาเลย์เซีย ให้ผลผลิต 102 กิโลกรัมต่อไร่

พันธุ์นครราชสีมา พัฒนามาจากการคัดเลือก clones ที่ให้ผลผลิตดีโดยการคัดเลือกแบบ bulk seed ในปี 2547-2548 มีการทดลองปลูกในหลายที่ ในนครราชสีมา ขอนแก่น พันธุ์นครราชสีมาให้ผลผลิต 106 กิโลกรัมต่อไร่

พันธุ์อินเดีย เป็นสายพันธุ์นำเข้ามีผลผลิตน้ำมันสูง แต่ไม่ทนแล้ง

วางแผนการทดลองชักนำมิวเทชันโดยการทรีตสาร 4 ชนิดคือ โคลชิซีน (colchicine) คลอโรฟอร์ม (chloroform) เมทานอล (methanol) และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีน (alpha-bromonaphthalene) โดยมีขั้นตอนการดำเนินการศึกษาดังนี้

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของสบู่ดำสายพันธุ์อินเดียนครราชสีมา สตูล และพิษณุโลก

ทำการวัดค่าความยาวเมล็ด (Seed length) ความกว้างของเมล็ด (Seed breadth) และน้ำหนักเมล็ดจำนวน 100 เมล็ด (Seed weight) โดยใช้ดิจิทอลเวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ ZIM-ZEEM®

การทดลองที่ 2.2 การชักนำออโตเทตราลอยด์โดยสาร 4 ชนิดคือ โคลชิซีน (colchicines) คลอโรฟอร์ม (chloroform) เมทานอล (methanol) และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีน ทรีตเมนต์ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สบู่ดำรุ่น (M0) สายพันธุ์อินเดีย (I) นครราชสีมา (N) พิษณุโลก (P) และสตูล (S)

ชื่อย่อสายพันธุ์	ชื่อเต็มสายพันธุ์	ชื่อย่อสารที่ใช้ทรีต	ชื่อสารในทรีตเมนต์
I	อินเดีย	C	Control
N	นครราชสีมา	alphaB	alpha-Bromonaphthalene
P	พิษณุโลก	Chlo	Chloroform
S	สตูล	Meth	Methanol

วิธีการทดลอง

1. นำเมล็ดสบู่ดำทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกเอาเฉพาะเมล็ดสมบูรณ์ลงเพาะในถุงดำเป็นเวลา 9 วัน ได้ต้นกล้าที่มีใบเลี้ยง (cotyledon) สองใบและมีตายอด (shoot bud) เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอก 100 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกต้นที่มีความสมบูรณ์สม่ำเสมอกันมาใช้ทดลองสายพันธุ์ละ 20 ต้น

2.การเตรียมสาร สารโคลชิซีนเตรียมความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ คลอโรฟอร์มความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์ และอัลฟา-โบรโมแนปธาลีน ใช้ในรูปสารละลายอิ่มตัว (Saturated solution) การทดลองทำ 5 ซ้ำ

3.หยดสารแต่ละชนิดลงบนลำลีชิ้นเล็กๆที่วางไว้ติดกับตายอด (terminal shoot buds) ทั้งสองข้างโดยทำการหยดสารเป็นระยะเวลาวันเว้นวันเป็นระยะเวลา 30 วัน เมื่ออายุต้นกล้าครบ 60 วันย้ายลงปลูกในแปลงทดลอง คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรียกต้นในรุ่นนี้ว่าต้น M1

การทดลองที่ 2.3 การศึกษาลักษณะความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นรุ่น M1

2.3.1. การวิเคราะห์ระดับพลอยดี (Ploidy level) ด้วยเครื่อง Flow Cytometry (Partec®)

เก็บตัวอย่างใบอ่อนจากต้นสบู่ดำทุกทรีตเมนต์โดยเลือกเอาใบชั้นที่ 1-3 จากต้นอายุ 1 ปี เก็บใบตัวอย่างในกล่องที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์นำใบมาตัดด้วยมีดโกนคมจนได้เป็นชิ้นเล็กๆ ในสารละลาย Lysis buffer จากนั้นกรองนิวคลีไอ (nuclei) ผ่านนีลอน mesh ขนาด 30 ไมโครเมตร บรรจุส่วนที่กรองในหลอด appendrof ® เซนตริฟิวจ์ที่ 100 x g เป็นเวลา 5 นาที เติม lysis buffer 100 ไมโครลิตร ลงในส่วน pellet ทำการย้อมนิวคลีไอด้วย propidium iodide (PI) ความเข้มข้น 75 ไมโครโมล จากนั้นกรองนิวคลีไออีกครั้ง เก็บสารละลายที่ได้ในที่มืด นำไปวิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่อง Flow Cytometry (Partec®)

การทดลองที่ 2.4 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นรุ่น M1

ใบสบู่ดำที่เก็บตัวอย่างจากใบชั้นที่ 3 จำนวน 1 กรัม นำมาบดในโกร่งให้ละเอียด ค่อยๆ เติมสารละลาย acetone ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ค่อยๆ เติมจนกระทั่งครบ 20 มิลลิลิตร กรองกากใบออก นำสารละลายไปวัดค่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 645 และ 663 นาโนเมตร ตามวิธีของ Arnon, 1949.

การทดลองที่ 2.5 การวัดขนาดปากใบของต้นรุ่น M1

นำใบขนาด 1x1 เซ็นติเมตร แช่ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ใช้ใบมีดโกนขูดเนื้อเยื่อบนชิ้นตัวอย่างออกเบาๆ เพื่อกำจัดชั้นมีโซฟิลล์ออกไป จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อไปแช่น้ำเพื่อล้าง NaOH จากนั้นนำลงแช่ใน Tween 80 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ นำชิ้นเนื้อเยื่องวางบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิด นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ Olympus CH30 โดยติดตั้งโปรแกรม Motic Images Plus 2

การทดลองที่ 2.6 การเก็บข้อมูลจำนวนดอกในช่อ จำนวนดอกตัวผู้ จำนวนดอกตัวเมีย จำนวนผล และน้ำหนักเมล็ด

เก็บผลการศึกษาเมื่อต้นอายุรุ่น M1 มีอายุ 1 ปี 6 เดือน โดยทำการนับตั้งแต่เดือนเมษายน - กันยายน 2552

การทดลองที่ 2.7 ปริมาณน้ำมันในเมล็ดสบู่ดำรุ่น M1

วิธีการทำ

2.7.1. นำเมล็ดสบู่ดำรุ่น M1 อบให้แห้งที่ตู้อบ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำมากะเทาะส่วนเปลือกสีดำออกไปให้เหลือเฉพาะเนื้อเมล็ดสีขาว จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก 10 กรัม

2.7.2. บดเมล็ดแห้งโดยใช้โกร่งบด แล้วนำเนื้อสบู่ดำที่บดแล้วใส่ลงใน Thimble ที่เตรียมไว้ในเครื่อง Soxhlet extractor

2.7.3. เทสารละลาย Normal Hexane 300 ml ในขวดก้นกลมของเครื่อง Soxhlet extractor

2.7.4. สกัดน้ำมัน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

2.7.5. นำไปแยกเอาตัวทำละลาย Normal Hexane ออกจากน้ำมันโดยใช้ Vaccuum Rotary evaporator

2.7.6. เก็บน้ำมัน ไว้ในหลอดทดลอง จากนั้นใช้ไปเปตวัดปริมาตรของน้ำมันที่สกัดได้

วางแผนการทดลองโดยเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Paired-Samples T test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 3
ผลการศึกษา

การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำโดยการใช้สารโคลชิซินและศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของลักษณะเมล็ดและปริมาณน้ำมันของสบู่ดำโคลชิพลอยด์ เป็นการชักนำมิวเทชันโดยสารเคมี ได้แก่ โคลชิซินและสารเคมีอื่นๆในการศึกษานี้เลือกใช้อัลฟาโบรโมแนปธาลีน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล การชักนำมิวเทชันคาดหวังให้มีการเพิ่มความแปรผันในลักษณะต่างๆ(Traits) ของสบู่ดำโดยท้ายที่สุดสามารถทำการสร้างพันธุ์สบู่ดำออโตเทตราพลอยด์ได้ รวมทั้งผลสบู่ดำมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีปริมาณน้ำมันสูงขึ้น

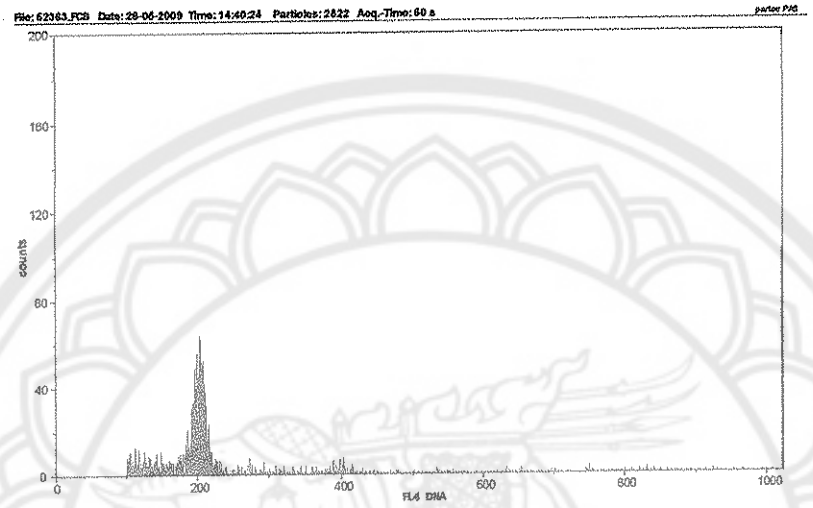
การชักนำมิวเทชันด้วยสารทั้ง 4 ชนิดโดยเทคนิคการหยดสารลงบนตายอดของต้นกล้าอายุ 9 วัน ส่งผลต่อสบู่ดำทั้งในแง่ผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยา (plant physiology) และลักษณะทางพันธุกรรม (genetic characteristics) ทั้งนี้สามารถตรวจผลของสารเคมีจากค่าการอยู่รอดของต้นสบู่ดำ (survival rate) การเจริญเติบโต (growth rate) ศึกษาชุดของโครโมโซมหรือระดับพลอยดี (Ploidy level) นอกจากนั้นยังพบว่าฟีโนไทป์ (phenotype) เปลี่ยนแปลง เช่นมีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะใบ ลำต้น ดอก ผล เมล็ด การเจริญพันธุ์และปริมาณน้ำมันในเมล็ด

การชักนำออโตเทตราพลอยด์โดยโคลชิซีน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และอัลฟา-โบรโมแนปธาลีน

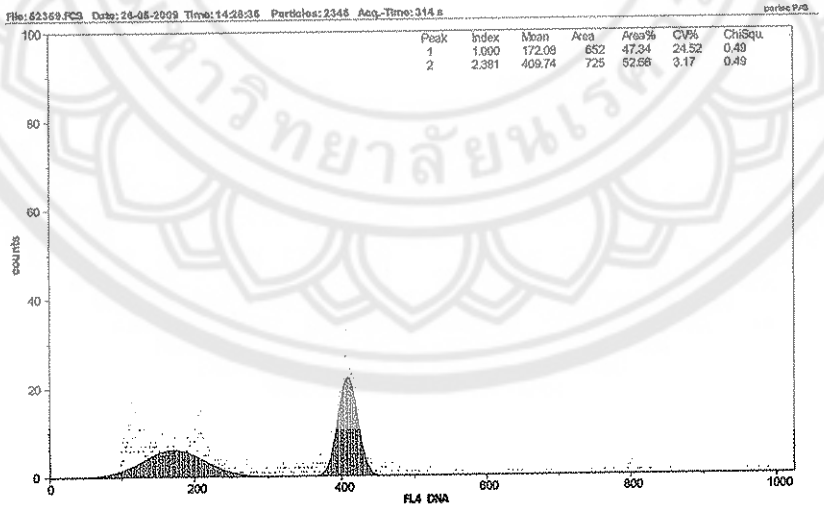
3.1 ผลของโคลชิซีน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีน ต่อการแปรผันของชุดของโครโมโซมของเซลล์เจริญปลายยอดสบู่ดำรุ่น M1

ทำการวิเคราะห์ระดับพลอยดีโดยวัดปริมาณ DNA (DNA content) ด้วย Flow cytometry อาศัยหลักการวัดค่า relative nuclear DNA content จากค่าการเรืองแสงฟลูโอเรสเซนต์ของนิวคลีไอที่ถูกย้อม โดยปกติปริมาณ DNA ถูกกำหนดการใช้งานในหน่วยของ C-unit โดย 1 C คือค่าปริมาณ DNA ของ haploid set ของโครโมโซม (n) ผลการวิเคราะห์ระดับพลอยดี แสดงเป็นค่า histogram แสดง peak ของนิวเคลียสที่อยู่ในระยะ G1 ของ cell cycle ซึ่งออโตเทตราพลอยด์จะถูกวัดเปรียบเทียบกับดิพลอยด์ที่เป็นต้นควบคุม (ภาพที่ 3.1, 3.2) ผลการทดลองในตารางที่ 3.1 พบว่าสบู่ดำทั้งสี่สายพันธุ์ที่เป็นสายพันธุ์ควบคุมมีระดับพลอยดีเป็นดิพลอยด์ทุกสายพันธุ์ โดยตรวจผลจาก peak ปรากฏที่ channel 200 นอกจากนั้นสังเกตพบว่าโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, และ 5 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีของสบู่ดำได้ ส่วนคลอโรฟอร์ม และเมทานอลก็ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีเช่นกัน จากทรีตเมนต์ทั้งหมด 20 ทรีตเมนต์พบว่ามีเพียงทรีตเมนต์เดียวคือสายพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วยอัลฟาโบร

โมแนปธาลีน (P-alphaB) พบการเปลี่ยนแปลงพลอยดีเป็นออโตเทตราพลอยด์ (2n =4x) peak ปรากฏที่ channel 400



ภาพที่ 3.1 Histogram ของค่า relative nuclear DNA content ของ *J. cucas* L. แสดง peak ของ diploid nuclei ระยะ G1 ปรากฏที่ channel 200



ภาพที่ 3.2 Histogram ของค่า relative nuclear DNA content ของ *J. cucas* L. แสดง peak ของ autotetraploid nuclei ระยะ G1 ปรากฏที่ channel 400

ตารางที่ 3.1 ผลของโคลชิซีน คลอโรฟอร์ม เมทานอลและ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อการแปรผันของชุดของโครโมโซมของเซลล์เจริญปลายยอดสบู่ดำรุ่น M1

Sample no.	Treatment (varieties/treated compounds)	Ploidy level
1.	I-control	2n
2.	I-alphaB	2n
3.	I-chlo	2n
4.	I-meth	2n
5.	N-control	2n
6.	N-alphaB	2n
7.	N-chlo	2n
8.	N-meth	2n
9.	P-control	2n
10.	*P-alphaB*	*2n=2x, 4x*
11.	P-chlo	2n
12.	P-meth	2n
13.	S-control	2n
14.	S- alphaB	2n
15.	S-chlo	2n
16.	S-meth	2n
17.	P-Colchicine 0.5 %	2n
18.	P- Colchicine 1.0 %	2n
19.	P- Colchicine 2.0 %	2n
20.	P- Colchicine 5.0 %	2n

3.2 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และอัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อการแปรผันของปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นรุ่น M1

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ a, b และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของสบู่ดำที่ทรีตสารทั้งสี่ชนิดใช้วิการตาม Arnon, 1949 ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 3.2 พบว่าปริมาณของคลอโรฟิลล์ในใบของสบู่ดำทั้งสายพันธุ์ควบคุมและต้นที่ผ่านการทรีตสารนั้น มีค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ a ในช่วง 0.36 - 0.47 ทั้งนี้ผลปรากฏว่าสายพันธุ์พิษณุโลกทรีตด้วยเมทานอลมีปริมาณคลอโรฟิลล์ a ต่ำสุด สายพันธุ์พิษณุโลกทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีนมีปริมาณคลอโรฟิลล์ a 0.40 ซึ่งทั้งสองทรีตเมนต์มีค่าคลอโรฟิลล์ a น้อยกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ

ปริมาณคลอโรฟิลล์ b ของทุกทรีตเมนต์มีค่าระหว่าง 0.12 - 0.49 พบว่าสายพันธุ์พิษณุโลกทรีตด้วยเมทานอลมีปริมาณคลอโรฟิลล์ b ต่ำสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ในกรณีของค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดแสดงค่าระหว่าง 0.49 - 0.95 สายพันธุ์พิษณุโลกทรีตด้วยเมทานอลมีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์ทั้งหมด ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าในการทรีตเมทานอลให้แก่สบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลกมีผลทำให้การสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ทั้ง a และ b ลดลง

ตารางที่ 3.2 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อการแปรผันของปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นรุ่น M1

Sample No.	Treatment (varieties/treated compounds)	Content of Chlorophyll a	Content of Chlorophyll b	Total chlorophyll content
1.	I-control	0.45 ± 0.00	0.27 ± 0.00	0.73 ± 0.06
2.	I-alphaB	0.47 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.75 ± 0.06
3.	I-chlo	0.46 ± 0.03	0.31 ± 0.05	0.78 ± 0.07
4.	I-meth	0.45 ± 0.00	0.24 ± 0.06	0.69 ± 0.08
5.	N-control	0.45 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.77 ± 0.02
6.	N-alphaB	0.45 ± 0.03	0.31 ± 0.07	0.77 ± 0.04
7.	N-chlo	0.46 ± 0.01	0.24 ± 0.03	0.70 ± 0.03
8.	N-meth	0.45 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.77 ± 0.02
9.	P-control	0.47 ± 0.02	0.43 ± 0.06	0.90 ± 0.04
10.	P-alphaB	0.40 ± 0.03*	0.26 ± 0.02	0.66 ± 0.02
11.	P-chlo	0.46 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.95 ± 0.02
12.	P-meth	0.36 ± 0.01*	0.12 ± 0.04*	0.49 ± 0.05*
13.	S-control	0.47 ± 0.02	0.31 ± 0.07	0.77 ± 0.08
14.	S- alphaB	0.46 ± 0.02	0.28 ± 0.07	0.74 ± 0.09
15.	S-chlo	0.46 ± 0.02	0.44 ± 0.08	0.90 ± 0.07
16.	S-meth	0.44 ± 0.03	0.31 ± 0.01	0.75 ± 0.09

* Significant at 5% level

3.3 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อการแปรผันของจำนวนเซลล์ปากใบ และ ขนาดปากใบของต้นรุ่น M1

เก็บข้อมูลจำนวนเซลล์ปากใบ ความกว้างปากใบ และความยาวปากใบ โดยเตรียมเนื้อเยื่อใบขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร จำนวนเซลล์ปากใบของสายพันธุ์อินเดีย นครราชสีมาพันธุ์พิษณุโลก และสายพันธุ์สตูลมีจำนวนเซลล์ปากใบใกล้เคียงกันคือมีจำนวน 65.7-75.3 เซลล์ ในกลุ่มนี้สายพันธุ์พิษณุโลกมีจำนวนน้อยที่สุด สายพันธุ์อินเดียทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีนมีจำนวนเซลล์ปากใบ (66.3) น้อยกว่าสายพันธุ์ควบคุม (72.7) อย่างมีนัยสำคัญ สายพันธุ์นครราชสีมาทรีตด้วยเมทานอลมีจำนวนเซลล์ปากใบ (68) น้อยกว่าสายพันธุ์ควบคุม (74.3) ผลในทิศทางเดียวกันสายพันธุ์พิษณุโลกทรีตด้วยเมทานอลมีเซลล์ปากใบ (44) น้อยกว่าสายพันธุ์ควบคุม (65.7) และน้อยที่สุดในกลุ่ม สายพันธุ์สตูลทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีน และคลอโรฟอร์มมีจำนวนปากใบน้อยกว่าสายพันธุ์ควบคุม

ลักษณะความกว้างปากใบของสายพันธุ์ควบคุมสายพันธุ์สตูล นครราชสีมา พิษณุโลก และอินเดียมีค่าที่ 208.67, 262.34, 270.78, 295.46 ไมโครเมตร ตามลำดับ ในกลุ่มของทรีตเมนต์สายพันธุ์อินเดีย ทั้งคลอโรฟอร์มและเมทานอลมีผลทำให้ขนาดความกว้างปากใบลดลง กลุ่มทรีตเมนต์สายพันธุ์นครราชสีมาสายพันธุ์ทรีตสารมีความกว้างปากใบน้อยกว่าตัวควบคุมทุกทรีตเมนต์ โดยเฉพาะทรีตเมนต์ที่ทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีนมีขนาดความกว้างปากใบ 190.24 ไมโครเมตร ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนทรีตเมนต์ของสายพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีนมีความกว้างปากใบมากที่สุด (322.26) และมีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ควบคุม (270.78) ประมาณ 1.2 เท่า เช่นเดียวกับพันธุ์สตูลที่ทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีนก็มีขนาดความกว้างปากใบใหญ่กว่าสายพันธุ์ควบคุมและทรีตเมนต์อื่นๆทุกทรีตเมนต์

ความยาวปากใบของสายพันธุ์สตูล นครราชสีมา พิษณุโลก และอินเดียมีค่าที่ 332.15, 377.24, 423.43 และ 431.77 ไมโครเมตรตามลำดับ ทรีตเมนต์สายพันธุ์อินเดียด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอลมีความยาวปากใบลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ทรีตเมนต์สายพันธุ์นครราชสีมาคลอโรฟอร์มให้ผลขนาดความยาวปากใบน้อยที่สุด ทรีตเมนต์สายพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตอัลฟาโบรโมแนปธาลีนมีความยาวปากใบ (431.63) มากกว่าสายพันธุ์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3.3, ภาพที่ 3.3 E,F) ทรีตเมนต์สายพันธุ์สตูล ทั้งอัลฟาโบรโมแนปธาลีน คลอโรฟอร์ม และ เมทานอล มีผลทำให้มีความยาวของเซลล์ปากใบมากกว่าสายพันธุ์ควบคุม

ตารางที่ 3.3 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อการแปรผันของจำนวนเซลล์ปากใบ และ ขนาดปากใบของต้นรุ่น M1

Sample No.	Treatment (varieties/treated compounds)	Stomata per unit area	Width of stomata (μm)	Length of stomata (μm)
1.	I-control	72.7 ± 5.2	295.46 ± 5.86	431.77 ± 14.87
2.	I-alphaB	66.3 ± 3.7*	273.48 ± 14.49	390.83 ± 13.38
3.	I-chlo	72.0 ± 4.0	253.36 ± 14.49*	351.05 ± 18.56*
4.	I-meth	61.0 ± 8.1	192.85 ± 10.29*	368.36 ± 8.28*
5.	N-control	74.3 ± 3.7	262.34 ± 10.30	377.24 ± 9.46
6.	N-alphaB	75.3 ± 7.2	190.24 ± 8.07*	310.35 ± 9.94*
7.	N-chlo	73.6 ± 5.3	184.00 ± 41.7	309.58 ± 14.37*
8.	N-meth	68.0 ± 4.6*	240.33 ± 17.24	385.23 ± 11.73
9.	P-control	65.7± 3.5	270.78 ± 7.29	423.43 ± 5.75
10.	P-alphaB	70.4 ± 4.9	322.26 ± 6.96*	431.63 ± 8.79
11.	P-chlo	56.0 ± 6.6	265.18 ± 15.08	401.3 ± 7.67*
12.	P-meth	44± 5.5*	229.8 ± 5.66*	411.55 ± 7.70*
13.	S-control	75.3 ± 3.7	208.67 ± 7.8	332.15 ± 11.05
14.	S- alphaB	53.6± 3.5*	285.62 ± 1.43*	382.17± 11.82*
15.	S-chlo	55.3 ± 3.2*	255.08 ± 9.98*	395.46 ± 16.55*
16.	S-meth	70.3 ± 4.6*	255.74 ± 11.53*	405.42 ± 7.90*

*Significant at 5% level

3.4 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อจำนวนดอกทั้งหมด/ต้น ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียและจำนวนผล

การเก็บผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 3.4 ดำเนินการระหว่างปี 2552 ตลอดปีโดยต้นที่ศึกษามีอายุในระหว่างปีที่สองของการให้ผลผลิต ยกเว้นต้นพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีนเป็นการเก็บผลในปีแรกเนื่องจากการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าต้นควบคุมทุกด้านทั้งความสูง และการติดช่อดอก (ดวงพร และคณะ 2551, 2552) สบู่ดำทุกสายพันธุ์เริ่มออกช่อดอกในช่วงเดือนเมษายน และให้ผลผลิตไปจนกระทั่งเดือนพฤศจิกายน หลังจากนั้นเมื่ออากาศเย็นลงใบจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล และไม่ค่อยมีการติดดอก ผล

สายพันธุ์ควบคุมได้แก่สายพันธุ์สตูล สายพันธุ์พิษณุโลก สายพันธุ์อินเดีย และสายพันธุ์นครราชสีมามีจำนวนดอกต่อต้นต่อปีตามลำดับดังนี้ 1,876, 1,085, 1,070, 1,056 โดยมีจำนวนดอกตัวผู้ 93 เปอร์เซ็นต์ และดอกตัวเมีย 7 เปอร์เซ็นต์ ทุกสายพันธุ์ทั้งควบคุมและทรีตเมนต์มีอัตราส่วนดอกตัวเมียต่อดอกตัวผู้เท่ากับ 1:13 เปอร์เซ็นต์การติดผลของสายพันธุ์ควบคุมมีค่า 80.56, 85.14, 87.67, 89.84 ซึ่งสายพันธุ์สตูลมีเปอร์เซ็นต์การติดผลสูงสุด และให้จำนวนผล 115 ผลต่อต้นต่อปี

สายพันธุ์ทั้งสี่สายพันธุ์ที่ทรีตด้วยคลอโรฟอร์มมีจำนวนดอกมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์ของสารอื่นๆ โดยมีจำนวนดอกดังนี้ 5,087, 4,896, 3,269, 9,280 สายพันธุ์พันธุ์สตูลมีจำนวนดอกมากที่สุดมีจำนวนดอกมากกว่าสายพันธุ์ควบคุม 5 เท่า รองลงมาคืออินเดีย มีจำนวนดอกมากกว่าตัวควบคุม 4.8 เท่า นครราชสีมามีจำนวนดอกมากกว่า 4.6 เท่า และสายพันธุ์พิษณุโลกมีจำนวนดอกเพิ่มขึ้น 3.2 เท่า เปอร์เซ็นต์ของดอกตัวผู้และตัวเมียเป็น 93 และ 7 เปอร์เซ็นต์ในทุกสายพันธุ์ สายพันธุ์สตูลทรีตด้วยคลอโรฟอร์มให้ผลจำนวน 601 ผลต่อปีซึ่งมีการติดผลมากกว่าสายพันธุ์ควบคุม 5.2 เท่า ดังนั้นสรุปจากผลการทดลองได้ว่าคลอโรฟอร์มมีผลต่อการเพิ่มจำนวนดอกของสบู่ดำทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา

เมทานอลที่ทรีตให้แก่สบู่ดำทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษามีผลเป็นไปในแนวโน้มเดียวกับของคลอโรฟอร์มคือไปช่วยให้มีจำนวนดอกเพิ่มขึ้นเช่นกันแต่คลอโรฟอร์มให้ผลที่ดีเหนือกว่า จำนวนดอกของสายพันธุ์ทรีตด้วยเมทานอลมีจำนวนดอก 1,826, 2,302, 1217, 1569 โดยสายพันธุ์นครราชสีมามีจำนวนดอกสูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ควบคุมกับสายพันธุ์ทรีตเมทานอลสายพันธุ์อินเดีย สายพันธุ์นครราชสีมา สายพันธุ์พิษณุโลก และสายพันธุ์สตูล มีจำนวนดอกมากกว่า 1.7 เท่า 1.9 เท่า 1.1 เท่า 0.8 เท่า ตามลำดับ และมีจำนวนผล 119, 132, 80, 91 ตามลำดับ และสายพันธุ์สตูลทรีตเมทานอลมีการติดผลเป็น 2.3 เท่า

อัลฟาโบรโมแนปธาลีนมีผลต่างจากกับคลอโรฟอร์มและเมทานอลคือมีผลทำให้จำนวนดอกลดลงหรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยขึ้นกับสายพันธุ์ที่นำมาทำทรีตเมนต์ สายพันธุ์นครราชสีมาและสตูล

มีผลทำให้มีจำนวนดอกเพิ่มขึ้น 2.6 เท่า และ 1.5 เท่า แต่สายพันธุ์อินเดียและพิษณุโลกมีจำนวนดอกลดลง 1.8 เท่า ส่วนการติดผลสายพันธุ์นครราชสีมาและสตูลมีการติดผลมากกว่าตัวควบคุม โดยมีจำนวน 152 และ 193 ผลต่อต้นต่อปี ส่วนสายพันธุ์อินเดียและพิษณุโลกจำนวนผล 31, 32 ผลต่อต้นต่อปี

ตารางที่ 3.4 จำนวนดอกทั้งหมด/ต้น ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียและจำนวนผล

Sample No.	Treatment (varieties/treated compounds)	Flowers/ tree	No. of Male flowers	No. of Female flowers	No. of fruits /(%)
1.	I-control	1,070	997	73	64 /87.67
2.	I-alphaB	586	546	40	31 /77.5
3.	I-chlo	5,087	4,740	347	322 /92.79
4.	I-meth	1,826	1,735	127	119 /93.7
5.	N-control	1,056	984	72	58 /80.56
6.	N-alphaB	2,771	2,582	189	152 /80.42
7.	N-chlo	4,896	4,562	334	315/ 94.31
8.	N-meth	2,302	2,145	157	132/ 84.08
9.	P-control	1,085	1,011	74	63/ 85.14
10.	P-alphaB	586	546	40	32/80
11.	P-chlo	3,269	3,046	223	188/84.33
12.	P-meth	1,217	1,134	83	80/ 96.86
13.	S-control	1,876	1,748	128	115/ 89.84
14.	S- alphaB	2,829	2,636	193	167/ 86.53
15.	S-chlo	9,280	8,647	633	601/ 94.94
16.	S-meth	1,569	1,462	107	91/ 85.05

3.5 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อจำนวนเมล็ดในผลสบู่ดำรุ่น M1

เปอร์เซ็นต์จำนวนเมล็ดในผลสบู่ดำรุ่น M1 ที่แสดงในตารางที่ 3.5 เก็บผลเป็นระยะเวลา 2 ปี แต่ต้นพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีนเก็บผลได้เพียงปีเดียวเนื่องจากติดดอกช้ากว่าต้นอื่นๆหนึ่งปี

เปอร์เซ็นต์ของผลสบู่ดำที่มีจำนวน 1 เมล็ดต่อผล ทั้ง 16 ตัวอย่าง มีเปอร์เซ็นต์อยู่ในช่วง 1.86 - 6.59 % โดยสายพันธุ์อินเดียที่ทรีตด้วยคลอโรฟอร์มมีเปอร์เซ็นต์ที่มีจำนวน 1 เมล็ดต่อผลต่ำสุด (1.86%) และสบู่ดำสายพันธุ์สตูลที่ทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีน มีเปอร์เซ็นต์ที่มีจำนวน 1 เมล็ดต่อผล สูงที่สุด (6.59 %)

ผลของสบู่ดำที่มีเปอร์เซ็นต์จำนวนเมล็ด 2 เมล็ดต่อผล ในสายพันธุ์อินเดียที่ทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีนมีจำนวนน้อยที่สุด (9.68%) แต่สายพันธุ์นครราชสีมามีเปอร์เซ็นต์ที่มีจำนวน 2 เมล็ดต่อผล สูงที่สุด (31.03%) ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ มีปริมาณใกล้เคียงกันคือ อยู่ในช่วง 15.65 -28.74 %

ผลสบู่ดำทุกทรีตเม้นจะมี 3 เมล็ดต่อผล ซึ่งมีปริมาณ 64.67-87.09% ของปริมาณผลทั้งหมด สายพันธุ์อินเดียที่ทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีนมีปริมาณมากที่สุด (87.09%) ส่วนสายพันธุ์สตูลที่ทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีน มีเปอร์เซ็นต์ที่มีจำนวน 3 เมล็ดต่อผล ต่ำที่สุด (64.67%) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าส่วนใหญ่ในผลสบู่ดำหนึ่งผลจะมีเมล็ดอยู่ 3 เมล็ด แต่มีสบู่ดำสายพันธุ์อินเดียที่เป็นต้นควบคุม (1.56%) และที่ทรีตด้วยเมทานอล (0.84%) เท่านั้นที่มีเมล็ด 4 เมล็ดต่อผล

ตารางที่ 3.5 แสดงเปอร์เซ็นต์จำนวนเมล็ดในผลสบู่ดำ รุ่น M1

Sample No.	Treatment (varieties/treated compounds)	1 seed (%)	2 seeds (%)	3 seeds (%)	4 seeds (%)
1.	I-control	3.13	26.56	68.75	1.56
2.	I-alphaB	3.23	9.68	87.09	0.00
3.	I-chlo	1.86	23.29	74.85	0.00
4.	I-meth	3.36	21.01	74.79	0.84
5.	N-control	3.45	31.03	65.52	0.00
6.	N-alphaB	6.58	28.29	65.13	0.00
7.	N-chlo	3.13	17.09	79.78	0.00
8.	N-meth	6.06	24.24	69.70	0.00
9.	P-control	4.76	23.81	71.43	0.00
10.	P-alphaB	6.25	15.65	78.12	0.00
11.	P-chlo	2.30	21.07	76.63	0.00
12.	P-meth	5.71	24.28	70.00	0.00
13.	S-control	5.22	23.48	71.30	0.00
14.	S- alphaB	6.59	28.74	64.67	0.00
15.	S-chlo	3.00	25.79	71.21	0.00
16.	S-meth	2.20	21.98	75.82	0.00

3.6 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อความยาว ความกว้างและน้ำหนักเมล็ดและเปอร์เซ็นต์น้ำมันของสบู่ดำรุ่น M1

ตารางที่ 3.6 แสดงผลลักษณะเมล็ดสบู่ดำของสายพันธุ์ควบคุมและทรีตเมนต์ สายพันธุ์อินเดีย นครราชสีมา พิษณุโลก และสตูล มีความยาวเมล็ดไม่แตกต่างกันโดยมีค่า 16.95, 17.24, 17.38, 17.91 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบในสายพันธุ์เดียวกันมีเพียงสายพันธุ์สตูลที่ทรีตด้วยอัลฟาโบรโมแนปธาลีนมีความยาวเมล็ดน้อยกว่าสายพันธุ์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อพิจารณาลักษณะความกว้างของเมล็ดสายพันธุ์อินเดียทรีตเมนต์ทุกสารมีค่าความกว้างเมล็ดมากกว่าสายพันธุ์ควบคุมของคลอโรฟอร์มให้ความกว้างมากที่สุดคือ 11.26 มิลลิเมตร ส่วนทรีตเมนต์แอลฟาโบรโมแนปธาลีนและเมทานอลให้ค่าความกว้างเป็น 11.13 และ 11.17 มิลลิเมตรตามลำดับ ในสายพันธุ์นครราชสีมามีเพียงทรีตเมนต์คลอโรฟอร์มที่มีความกว้างเมล็ดมากกว่าสายพันธุ์ควบคุม สายพันธุ์พิษณุโลกทั้งทรีตเมนต์คลอโรฟอร์มและเมทานอลมีความยาวเมล็ดมากกว่าสายพันธุ์ควบคุม ในสายพันธุ์สตูลทรีตเมนต์อัลฟาโบรโมแนปธาลีนมีความกว้างน้อยกว่าสายพันธุ์ควบคุม แต่ทรีตเมนต์เมทานอลมีความกว้างเมล็ดมากกว่า

โดยสรุปลักษณะความยาวเมล็ดไม่เกิดความแปรผันจากทรีตเมนต์คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ยกเว้นอัลฟาโบรโมแนปธาลีนที่มีผลทำเมล็ดสั้นลง ส่วนความกว้างเมล็ดสายพันธุ์สตูลทรีตเมนต์คลอโรฟอร์มของทุกสายพันธุ์มีความกว้างเมล็ดมากขึ้น อัลฟาโบรโมแนปธาลีน ทรีตเมนต์พันธุ์สตูลทั้งขนาดความยาวและความกว้างเมล็ดลดลงหมายถึงมีเมล็ดเล็กกว่าสายพันธุ์ควบคุม

น้ำหนักแห้งของเมล็ดจำนวน 100 เมล็ดได้จากการนำเมล็ดไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-7 วัน มีค่าความชื้นประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์อินเดีย นครราชสีมา พิษณุโลก และสตูล มีน้ำหนักแห้ง 51.7, 50.5, 52.2, 48.3 กรัมตามลำดับ ทรีตเมนต์คลอโรฟอร์มของทุกสายพันธุ์ให้ค่าน้ำหนักแห้งเมล็ดมากกว่าตัวควบคุม โดยสายพันธุ์อินเดีย นครราชสีมา พิษณุโลก และสตูล มีค่าตามลำดับสายพันธุ์ดังนี้ 58.5, 51.7, 57.6, 54 กรัม ทรีตเมนต์เมทานอลมีผลทั้งในทางเพิ่มน้ำหนักเมล็ดแห้งหรือลดหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับสายพันธุ์ดังนี้ ทรีตเมนต์ที่เพิ่มน้ำหนักพบในสายพันธุ์อินเดีย สายพันธุ์พิษณุโลกมีค่าน้ำหนักเมล็ดแห้งน้อยกว่าตัวควบคุม และสายพันธุ์สตูลและนครราชสีมาไม่มีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเมล็ด

อัลฟาโบรโมแนปธาลีนที่ทรีตในทุกสายพันธุ์ให้ค่าน้ำหนักแห้งน้อยกว่าพันธุ์ควบคุม สายพันธุ์อินเดีย นครราชสีมา พิษณุโลก และสตูล มีค่าตามลำดับสายพันธุ์ดังนี้ 48.6, 38.4, 44.5, 47.5 กรัม มีค่าน้อยกว่าพันธุ์ควบคุม 1.06, 1.3, 1.17, 1.01 เท่า ตามลำดับ

ตารางที่ 3.6 ความยาวเมล็ด ความกว้างเมล็ด และน้ำหนักเมล็ดจำนวน 100 เมล็ดและปริมาณน้ำมันของสบู่ดำรุ่น M1

Sample No.	Treatment (varieties/ treated compounds)	Seed length (mm.) $\overline{X}$ ± SE	Seed breadth (mm.) $\overline{X}$ ± SE	100 Seeds weight (dry) (g)	100 Seeds Oil content (ml)
1.	I-control	16.95 ± 0.22	10.76 ± 0.15	51.70	11.50
2.	I-alphaB	16.88 ± 0.22	11.13 ± 0.08*	48.60	14.10
3.	I-chlo	17.45 ± 0.24	11.26 ± 0.10*	58.50	15.70
4.	I-meth	16.90 ± 0.16	11.17 ± 0.13*	54.40	11.25
5.	N-control	17.24 ± 0.24	10.86 ± 0.13	50.50	08.70
6.	N-alphaB	16.64 ± 0.15	10.95 ± 0.10	38.40	10.50
7.	N-chlo	17.69 ± 0.13	11.27 ± 0.07*	51.70	10.80
8.	N-meth	17.09 ± 0.22	11.22 ± 0.15	50.40	14.30
9.	P-control	17.38 ± 0.14	10.97 ± 0.12	52.20	11.30
10.	P-alphaB	17.20 ± 0.17	11.12 ± 0.10	44.50	11.90
11.	P-chlo	17.82 ± 0.24	11.40 ± 0.15*	57.60	11.70
12.	P-meth	17.34 ± 0.22	11.38 ± 0.12*	50.50	06.90
13.	S-control	17.91± 0.20	11.36 ± 0.09	48.30	11.90
14.	S- alphaB	16.78 ± 0.27*	10.75 ± 0.13*	47.50	09.80
15.	S-chlo	18.20 ± 0.13	11.67 ± 0.12	54.00	12.80
16.	S-meth	18.25 ± 0.15	11.71 ± 0.07*	48.90	07.80

*Significant at 5% level

ปริมาณน้ำมันจาก 100 เมล็ด สายพันธุ์ควบคุมอินเดีย นครราชสีมา พิษณุโลก และสตูล มีค่า 11.5, 8.7, 11.3, 11.9 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทรีตเมนต์คลอโรฟอร์มของทุกสายพันธุ์มีปริมาณน้ำมันสูงกว่าตัวควบคุม โดยมีปริมาณน้ำมัน 15.7, 10.8, 11.7, 12.8 มิลลิลิตรค่าตัวเลขแสดงตามลำดับสายพันธุ์ควบคุม ทรีตเมนต์เมทานอลให้ผลผลิตน้ำมันน้อยลงในสายพันธุ์อินเดีย พิษณุโลก และสตูล มีเพียงสายพันธุ์นครราชสีมาที่มีปริมาณน้ำมันสูงขึ้น (14.3 มิลลิลิตร) ทรีตเมนต์อัลฟาโบรโมแนปธาลีน มีผลทำให้เพิ่มปริมาณน้ำมันในสายพันธุ์อินเดีย นครราชสีมา พิษณุโลกมีค่า 14.1, 10.5, 11.9, มิลลิลิตร แต่ลดลงในสายพันธุ์สตูล มีปริมาณเพียง 9.8 มิลลิลิตร

3.7 ผลผลิตเมล็ดต่อต้นต่อปีและค่าประมาณการผลผลิตเมล็ดต่อไร่ต่อปีของสบู่ดำรุ่น M1

จากผลผลิตต่อต้นต่อปีสามารถนำมาคำนวณค่าประมาณการผลผลิตรวมต่อไร่ต่อปีโดยคิดจากการปลูก 800 ต้นต่อไร่ สายพันธุ์ควบคุมที่มีผลผลิตดีที่สุดในสภาพแวดล้อมแปลงปลูกของคณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวรคือสายพันธุ์พิษณุโลกโดยให้ผลผลิต 990 กรัมน้ำหนักแห้งต่อปี สายพันธุ์อินเดีย สายพันธุ์นครราชสีมา สายพันธุ์สตูล มีผลผลิต 99, 88, 167 กรัมต่อต้นต่อปี เห็นได้ว่าทั้งสามสายพันธุ์ให้ผลผลิตต่ำกว่าสายพันธุ์พิษณุโลก 5-11.25 เท่า ในทรีตเมนต์คลอโรฟอร์มจะให้ผลผลิตสูงขึ้น ส่วนสายพันธุ์อินเดีย นครราชสีมา และสตูล ทรีตเมนต์เมทานอลให้ผลผลิตสูงขึ้นแต่น้อยกว่าคลอโรฟอร์ม ยกเว้นสายพันธุ์สตูลที่ทรีตเมทานอลผลผลิตลดลง ทรีตเมนต์อัลฟาโบรโมแนปธาลีนมีผลผลิตสูงขึ้นในสายพันธุ์นครราชสีมาและสตูลส่วนสายพันธุ์อินเดียและพิษณุโลกให้ผลผลิตลดลง โดยสรุปทรีตเมนต์คลอโรฟอร์มของสายพันธุ์สตูลให้ผลผลิตต่อไร่สูงสุด คือ 779 กิโลกรัมต่อไร่ ผลผลิตสูงขึ้น 5.85 เท่า ดังผลที่แสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 ผลผลิตต่อต้นต่อปี และ ค่าประมาณการผลผลิตเมล็ดต่อไร่ต่อปีของสบู่ดำ รุ่น M1

Sample No.	Treatment (varieties/ treated compounds)	Yield/tree/year (g)	Estimated Yield/rai/year (kg)
1.	I-control	99	79.4
2.	I-alphaB	45	36.2
3.	I-chlo	565	452.1
4.	I-meth	194	155.4
5.	N-control	88	70.3
6.	N-alphaB	175	140
7.	N-chlo	489	391
8.	N-meth	200	160
9.	P-control	990	792
10.	P-alphaB	428	34.3
11.	P-chlo	325	260
12.	P-meth	122	97.36
13.	S-control	167	133
14.	S- alphaB	238	190.4
15.	S-chlo	974	779
16.	S-meth	134	107

ว.
SB
299
.E9
ด2แร
2553
10 พ.ค. 2554
i.5458729
สำนักหอสมุด

3.8 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อความสมบูรณ์พันธุ์และขนาดของละอองเรณู (pollen grains) ของสบู่ดำรุ่น M1

ความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณูดังแสดงในตารางที่ 3.8 สบู่ดำสายพันธุ์ควบคุมได้แก่ อินเดีย นครราชสีมา พิษณุโลก และสตูล มีความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณูดังนี้ 94.40, 92.04, 91.88 และ 93.02 เปอร์เซ็นต์ โดยมีขนาดความกว้างละอองเรณูเป็น 14.43±0.18, 13.28±0.23, 14.23±0.31 และ 12.45±0.55 μm ตามลำดับ และมีขนาดความยาวคือ 15.13±0.29, 13.70±0.27, 14.70±0.19 และ 13.43±0.34 μm ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.9

เมื่อทรีตด้วยอัลฟา-โบรโมแนปธาลีนทุกสายพันธุ์จะมีความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณูลดลงเป็น 93.33, 87.09, 76.04 และ 88.74 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยมีขนาดความกว้างละอองเรณู 13.68±0.23, 14.55±0.37, 18.20±0.48 และ 15.53±0.66 μm ตามลำดับ และขนาดความยาวละอองเรณูเป็น 14.93±0.43, 14.90±0.14, 20.03±0.93 และ 16.28±0.41 μm ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วยอัลฟา-โบรโมแนปธาลีน มีความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณูต่ำสุดแต่มีขนาดความกว้างและความยาวของ ละอองเรณูใหญ่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทุก ทรีตเมนต์

สายพันธุ์อินเดียและนครราชสีมาที่ทรีตด้วยคลอโรฟอร์ม จะมีความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณูมากกว่าต้นคุมคือ 94.80 และ 92.91เปอร์เซ็นต์ แต่ สายพันธุ์พิษณุโลกและสตูลที่ทรีตด้วยคลอโรฟอร์ม จะมีความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณู 89.63 และ 90.27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าต้นคุม ขนาดของละอองเรณูของทั้งสี่สายพันธุ์ที่ทรีตด้วยคลอโรฟอร์ม มีขนาดความกว้าง 13.30±0.43, 14.13±0.21, 13.73±0.22 และ 12.45±0.42 μm ตามลำดับ และมีความยาวเท่ากับ 13.65±0.26, 14.45±0.07, 14.93±0.12 และ 13.00±0.32 μm ตามลำดับ

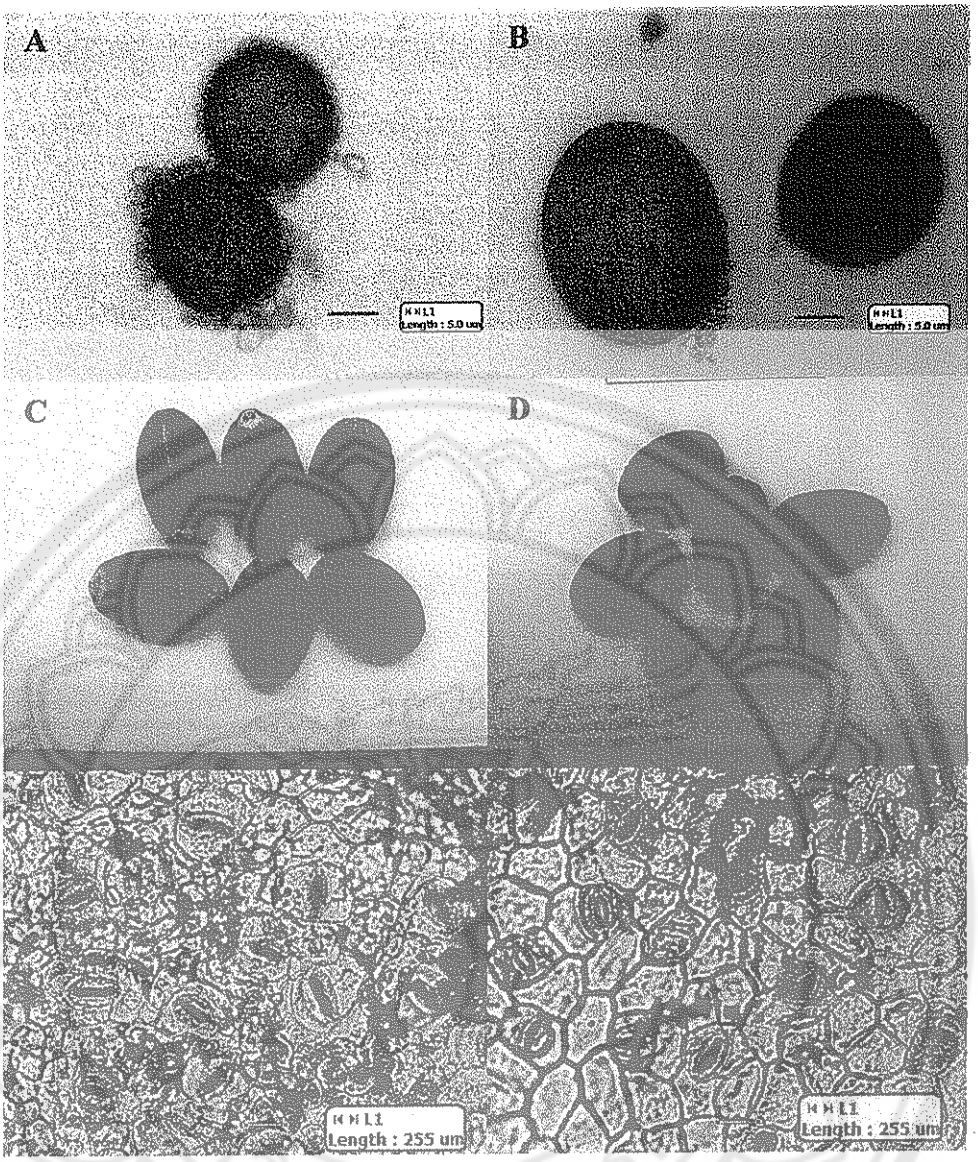
สบู่ดำสายพันธุ์อินเดียและนครราชสีมาที่ทรีตด้วยเมทานอล จะมีความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณูมากกว่าต้นคุมคือ 94.41 และ 93.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์พิษณุโลกและสตูลที่ทรีตด้วยเมทานอล จะมีความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณูต่ำกว่าต้นคุมคือ 83.54 และ 89.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยขนาดของละอองเรณู มีความกว้าง 13.38±0.52, 15.65±0.72, 13.83±0.59 และ 14.48±0.69 μm ตามลำดับ และมีความยาวเท่ากับ 14.35±0.53, 16.23±0.49, 14.48±0.42 และ 15.45±0.52 μm ตามลำดับ

ตารางที่ 3.8 ความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณูของสบู่ดำรุ่น M1

Treatment (varieties/treated compounds)	Pollen fertility (%)	
	fertilize	sterile
I-control	94.40	5.60
I-alphaB	93.33	6.67
I-chlo	94.80	5.20
I-meth	94.41	5.59
N-control	92.04	7.96
N-alphaB	87.09	12.91
N-chlo	92.91	7.09
N-meth	93.00	7.00
P-control	91.88	8.12
P-alphaB	76.04	23.96
P-chlo	89.63	10.37
P-meth	83.54	16.46
S-control	93.02	6.98
S- alphaB	88.74	11.26
S-chlo	90.27	9.73
S-meth	89.75	10.25

ตารางที่ 3.9 ผลของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนต่อการแปรผันของขนาดละอองเรณูของต้นรุ่น M1

Treatment (varieties/treated compounds)	ขนาดของละอองเรณู (μm)	
	ความกว้าง	ความยาว
I-control	14.43±0.18	15.13±0.29
I-alphaB	13.68±0.23*	14.93±0.43*
I-chlo	13.30±0.43	13.65±0.26
I-meth	13.38±0.52	14.35±0.53
N-control	13.28±0.23	13.70±0.27
N-alphaB	14.55±0.37	14.90±0.14*
N-chlo	14.13±0.21	14.45±0.07
N-meth	15.65±0.72	16.23±0.49
P-control	14.23±0.31	14.70±0.19
P-alphaB	18.20±0.48*	20.03±0.93*
P-chlo	13.73±0.22*	14.93±0.12
P-meth	13.83±0.59	14.48±0.42
S-control	12.45±0.55	13.43±0.34
S- alphaB	15.53±0.66	16.28±0.41*
S-chlo	12.45±0.42	13.00±0.32
S-meth	14.48±0.69	15.45±0.52*



ภาพที่ 3.4 แสดงลักษณะของละอองเรณู (pollen grains) เมล็ด และ ปากใบ ของสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลกที่เป็นต้นดิพลอยด์ และออโตเทตราพลอยด์

A = ละอองเรณูของต้นดิพลอยด์ ขนาดกว้าง 14.40 μm ยาว 14.70 μm

B = ละอองเรณูของต้นออโตเทตราพลอยด์ ขนาดกว้าง 19.60 μm ยาว 23.60 μm

C = เมล็ดของต้นดิพลอยด์

D = เมล็ดของต้นออโตเทตราพลอยด์

E = ปากใบของต้นดิพลอยด์

F = ปากใบของต้นออโตเทตราพลอยด์

บทที่ 4
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้มีความพยายามชักนำออโตเทตราพลอยด์โดยการทรีตสารโคลชิซีน อัลฟา-โบรโมแนปธาลีน เมทานอล และคลอโรฟอร์ม โดยสรุปสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ (Mitotic inhibition) 2 ชนิด ได้แก่โคลชิซีนและ อัลฟา-โบรโมแนปธาลีนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโมโซมของสบู่ดำ ในผลงานวิจัยก่อนหน้านี้โดยโคลชิซีนที่ความเข้มข้น 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์สามารถชักนำมิกโซพลอยด์ (mixoploid) ระหว่าง 2x, 4x ในเนื้อเยื่อแคลลัส ที่แช่ในสารละลายโคลชิซีนเป็นระยะเวลา 3 วัน แต่ในการทรีตตายอดยังไม่พบความเข้มข้นที่สามารถชักนำการเปลี่ยนแปลงพลอยดีได้ (ดวงพร 2551) และการวิจัยนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องพบว่าอัลฟา-โบรโมแนปธาลีนสามารถชักนำออโตเทตราพลอยด์สบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลก ซึ่งมีค่าความอยู่รอดของต้นที่ทรีต 20 ต้นมีเพียงต้นเดียวที่อยู่รอด ซึ่งมีอัตราการอยู่รอด 5 เปอร์เซ็นต์ การเปลี่ยนแปลงจำนวนของโครโมโซมเกิดขึ้นเนื่องจากทั้งโคลชิซีนและอัลฟา-โบรโมแนปธาลีนยับยั้งไมโครทูบูลิน (tubulin polymerization inhibitors) ทำให้ไม่สามารถเกิดการรวมตัวของทูบูลินเป็นโครงสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ (Hamel et al. 1996) สำหรับโคชิซีนมีการนำมาชักนำพอลิพลอยด์ในพืชอย่างแพร่หลาย เช่น *Morus alba* var. s54, *Chaenomeles japonica*, *Largerstroemia indica* L., *Ranunculus*, *Spathiphyllum wallisii* , (Sarince et al. 1995; Stanys et al. 2006; Zhang et al. 2010; Emmy et al. 2009; Ives et al. 2010) แต่อัลฟาโบรโมแนปธาลีนยังไม่พบรายงานมาก่อนเลย อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการชักนำออโตเทตราพลอยด์โดยการทรีตอัลฟาโบรโมแนปธาลีนอาจเนื่องมาจากเลือกเทคนิคทรีตสารให้กับอวัยวะของสบู่ดำคือตายอดเนื่องจากกลุ่มเซลล์ระยะนี้มีความบางมากกว่าเปลือกเมล็ดจึงประสบผลชักนำการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีสำเร็จ

สารอีกสองชนิดคือตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่เมทานอล และคลอโรฟอร์ม ผลการทรีตสารทั้งสองชนิดให้แก่ตายอดสบู่ดำพบว่าระดับพลอยดีนั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่มีผลต่อจำนวนดอกโดยมีการออกดอกมากขึ้นและทำให้จำนวนดอกตัวเมียต่อต้นนั้นเพิ่มสูงขึ้นและในที่สุดทำให้มีการติดผลต่อต้นจำนวนมากกว่าสายพันธุ์ที่ไม่มีการทรีตสาร สายพันธุ์ที่ตอบสนองดีคือสายพันธุ์สตูล โดยสายพันธุ์สตูลทรีตคลอโรฟอร์มให้จำนวนผลมากที่สุดคือ 601 ผล ในขณะที่ต้นควบคุมให้ผลเพียง 115 ผล ตัวทำละลายอินทรีย์ หลายชนิดเช่นเมทานอล คลอโรฟอร์ม มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสรีระวิทยาของพืช พบรายงาน เช่น เมทานอลมีผลต่อการเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย (Theodoridou et al. 2002) และพืชชั้นสูงเช่น ข้าวสาลี *Lemna gibba* (David et al. 2003) โดยส่งผลในแง่เพิ่มปริมาณชีวมวล (Nonomura and Benson 1992; Ei Jay 1996)

โดยเฉพาะการทรีตด้วย เมทานอลที่ความเข้มข้น 10-15 % นอกจากนั้น Zheng และคณะ 2008 ได้รายงานการศึกษาผลของเมทานอล 5 % พบว่าส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงของข้าวสาลีในระยะใบธงเพิ่มขึ้นเป็น 2.4 เท่าของต้นที่ทรีตด้วยน้ำกลั่น (Nonomura and Benson 1992; Li and Yi 2004) ทั้งนี้นักวิจัยทางด้านสรีรวิทยาพืชได้เสนอว่าเมทานอลเข้าไปสู่เมแทบอลิซึมปฐมภูมิ (primary metabolism) โดยใช้กลไกเดียวกับ formaldehyde และ serine (Cossins 1964; Nonomura and Benson 1992; David 2003) George และคณะ 1951 รายงานว่าในการทรีตคลอโรฟอร์มให้แก่ใบของ *Pelagonium* มีผลทำให้ปากใบปิดรวมทั้งลดอัตราการสังเคราะห์แสง ซึ่งอาจจะเกิดจากคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นอิสระอยู่ในอากาศบริเวณที่มีไอระเหยของคลอโรฟอร์มนั้นลดลงอย่างรวดเร็ว

เมื่อทราบผลของระดับพลอยดีของทุกทรีตเมนต์ ทำการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ a, b และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ในทรีตเมนต์เมทานอลของทุกสายพันธุ์มีคลอโรฟิลล์ทั้งหมดน้อยลง โดยเป็นผลมาจากค่าของปริมาณคลอโรฟิลล์ a, b ต่ำ จากนั้นผลการศึกษาจำนวนเซลล์และขนาดความกว้าง ยาวของปากใบพบว่าจำนวนเซลล์ปากใบลดลงในสบู่ดำที่ทำการทรีตสารอื่นๆ ยกเว้นกลุ่มที่ทรีตอัลฟ่าโบรโมแนปธาลีนโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ทรีตสารอัลฟ่าโบรโมแนปธาลีน (ออโตเทตราพลอยด์) มีขนาดความกว้างและความยาวปากใบมากที่สุด (322.26, 270.78 ไมโครมีเตอร์) มีขนาดเป็น 1.2 เท่าของสายพันธุ์ควบคุม

ผลการศึกษาจำนวนดอกของสบู่ดำ สายพันธุ์สบู่ดำที่ไม่ผ่านการทรีตสารมีการติดดอกจำนวน 1,217-2,302 ดอกต่อต้นต่อปี และมีอัตราส่วนดอกตัวผู้ต่อดอกตัวเมียในอัตรา 93 ต่อ 7 เปอร์เซ็นต์ จากผลของสารต่อจำนวนดอกของสบู่ดำพบว่าสายพันธุ์ทั้งหมดมีแนวโน้มออกดอกจำนวนมากขึ้นเมื่อทรีตคลอโรฟอร์ม หรือเมทานอล โดยเฉพาะสายพันธุ์สตูลทรีตคลอโรฟอร์มให้จำนวนดอกทั้งหมดสูงขึ้นกว่าต้นควบคุมมีจำนวน 9,280 ดอกซึ่งเป็น 5.2 เท่า ทั้งนี้สารที่ทรีตไม่มีผลต่ออัตราส่วนระหว่างดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย ในทางกลับกันทรีตเมนต์อัลฟ่าโบรโมแนปธาลีนต่อสายพันธุ์พิษณุโลกที่เป็นออโตเทตราพลอยด์มีจำนวนดอกน้อยกว่าต้นควบคุม 1.8 เท่า เปอร์เซ็นต์การติดผล

สรุปผลการทดลอง

สบู่ดำสายพันธุ์อินเดียที่ทรีตคลอโรฟอร์มให้ปริมาณน้ำมันสูงที่สุด ซึ่งสูงกว่าต้นควบคุม 1.37 เท่า และลักษณะที่สามารถใช้บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงของพลอยดีจากต้นดิพลอยด์เป็นต้น autotetraploid ได้คือ ปริมาณคลอโรฟิลล์ a, b และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดจะมีปริมาณลดลง ขนาดละอองเรณูมีขนาดความกว้าง 18.20±0.48 ไมโครมีเตอร์ ความยาว 20.03±0.93 ไมโครมีเตอร์ รวมทั้งขนาดความกว้างปากใบ 322.26 ไมโครมีเตอร์ และความยาวของปากใบ 431.63 ไมโครมีเตอร์ จะมีขนาดใหญ่กว่าต้นที่เป็นดิพลอยด์

เอกสารอ้างอิง

กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล Zephyranthes, ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดวงพร เปรมจิต. 2551. รายงานการวิจัยเรื่อง การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำโดยการใช้สารโคลชิซิน

ดวงพร เปรมจิต, กฤษณะ ทองบ่อ, รวิศสกุล โพธิรุกขา และ ศิริพงษ์ เปรมจิต. 2551. การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำโดยวิธีมิวเทชันด้วยสารเคมี : ผลของสารอัลฟาโบรโมแนปทาลีน ต่อลักษณะทางสัณฐานของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลก. โปสเตอร์ การประชุมวิชาการ งานเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2551

ดวงพร เปรมจิต, พรรนิดา สิงห์ทอง และ ศิริพงษ์ เปรมจิต. 2552. การชักนำออโตเทตราพลอยด์ในสบู่ดำ. โปสเตอร์ การประชุมวิชาการ งานเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2552

อภิชาติ ศุภพิชญ์นาม, อัญชลี มโนนุกุล, วิทูรัช กู๊ดวิน, บุษยวรรณ อาริยธรรม และ วิวัฒน์ ตันวงษ์วาน. 2549. สบู่ดำพืชพลังงาน ความหวังหรือความฝัน. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี, 24 หน้า

Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 24: 1–15.

Cossins EA. 1964. The utilization of carbon-1 compounds by plant. I. The metabolism of methanol-C14 and its role in amino acid biosynthesis. Can J Biochem, 42 : 1793-1802.

David Dewez, Claire Dautremepuits, Philippe Jeandet, Guy Vernet and Radovan Popovic. 2003. Effects of Methanol on Photosynthetic Processes and Growth of Lemna gibba. Photochemistry and Photobiology, 78(4): 420–424.

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

El Jay A. 1996. Effects of organic solvents and solvent–atrazine interactions on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum apricornutum*. Arch Environ Contam Toxicol, 31: 84–90.

Emmy Dhooghe, Sylvie Denis, Tom Eeckhaut, Dirk Reheul and Marie-Christine Van Labeke. 2009. In vitro induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. Euphytica, 168: 33–40.

George W, Scarth and Michael Shaw. 1951. Stomatal Movement and Photosynthesis in Pelargonium. II. Effects of Water Deficit and of Chloroform: Photosynthesis in Guard cells. Plant Physiology, 26(3) : 581-597.

Hamel, E. 1996. Antimitotic natural products and their interactions with tubulin. Med. Res. Rev., 6 : 207-231.

Ives Vanstechelman, Tom Eeckhaut, Johan Van Huylenbroeck and Marie-Christine Van Labeke. 2010. Histogenic analysis of chemically induced mixoploids in *Spathiphyllum wallisii*. Euphytica, 174 : 61-72.

Jin-Hu Wu and Pauline M., 2002. Autopolyploid tangor plant regeneration from in vitro Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicines. Plant Cell, issue and Organ Culture, 70(1) : 99-104.

Li ZR and Yi XF. 2004. Effect of methanol with different concentration on photosynthesis and yield of leaf-used lettuce. Journal of Inner Mongolia Normal University, 33 : 71–73.

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.

Nonomura A. and Benson A.. 1992. The path of carbon in photosynthesis: improved crop yields with methanol, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 9794–9798.

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.

Sarinee Chaicharoen, Ariya Satrabhandhu and Maleeya Kruatrachue. 1995. In vitro Induction of Polyploid in White Mulberry (Morus alba var. S54) by Colchicine Treatment. Science Asia, 21: 229-242.

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.

Stanys V, Weckman A, Staniene G, and Duchovskis P. 2006. In vitro induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 84 : 263-268.

Stebbins G.L. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Addison-Wesley Publ. Reading. Massachusetts.

Theodoridou A, Dornemann D and Kotzabasis K. 2002. Light-dependent induction of strongly increased mocroalgal growth by methanol. Biochimica et Biophysica Acta, 1573 : 189–198.

Zhang QY, Luo FX, Liu L and Guo FC. 2010. In vitro induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult, 101 : 41–47.

Zheng Y, Yang Y, Liang S, Yi X. 2008. Effect of Methanol on Photosynthesis and Chlorophyll Fluorescence of Flag Leaves of Winter Wheat. Agricultural Sciences in China, 7(4) : 432-437.s