รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิจัยและพัฒนาพืชในจีนัส *Jatropha* sp. เพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

Research and Development of *Jatropha* sp. For Industrial Uses

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร เปรมจิต และคณะ

8 กรกฎาคม 2558

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สัญญาเลขที่ R2557B053

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิจัยและพัฒนาพืชในจีนัส *Jatropha* sp. เพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

Research and Development of *Jatropha* sp. For Industrial uses

คณะผู้วิจัย สังกัด

รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร เปรมจิต		สังกัด คณะเกษตรศาสตร์ฯ
รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพงษ์ เปรมจิต		สังกัด คณะวิทยาศาสตร์
ดร.ปราณี	นางงาม	สังกัด คณะวิทยาศาสตร์
ดร.พัทธมน	แสงอินทร์	สังกัด คณะวิทยาศาสตร์

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ.2557 มหาวิทยาลัยนเรศวร

Abstract

Survey of Jatropha in Thailand

Fruits and seeds production are importance because it can increase quality and quantity of fruits. The ratio of male and female flower, pollinator and other factors are affected to fruiting. The objectives of study was to study phenology, fruit set efficiency and reproductive success of *Jatropha* in Thailand. Fruiting of five species of *Jatropha* was observed at Faculty of Science, Naresuan University in natural habitat. Plants are flowering in 8-12 months old. The result of this study showed that most plants are compound cyme inflorescence. All species are consisting of male flowers more than female flowers in each inflorescence. The reprocuctive success of *Jatropha curcas* L. (สบู่ดำ) and *J. gossypiifolia* L. (สบู่แดง) are height average of 83% (RS=0.83) and 75% (RS=0.75), *J. multifida* L. (มะละกอฝรั่ง) and *J. podagrica* Hook. f. (หนุมานนั่งแท่น) are middle average of 50 % (RS=0.5 และ 0.44). The last species of *J. integerrima* Jacq. (ปัตตาเวีย) is lower of average of 33 % (RS=0.33). In contrast, the pollinators were only found in this species. Results can be used as basic information for seed management to increase seed production in the future.

Keywords: physic nut, bellyache bush, spicy *jatropha*, coral plant and *Jatropha* L.

Molecular phylogenetic relationship of *Jatropha*

Plant Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase) is a very important enzyme that regulates fatty acid synthesis in both leaf and seed. In this study, Phylogenectic relationships among 5 species (*Jatropha* curcas, *J. gossypifolia*, *J. multifida*, *J. podagrica* and *J. integerrima*) within genus *Jatropha* in Thailand were examined using three intron regions of ACCase. A maximum likelihood analysis was performed on separated data and combined data set to generated phylogenetic tree. The combined data results showed that five species of *Jatropha* were separated into 2 groups. *J. multifida* and *J. podagrica* were placed in the same group with high bootstrap support and *J. curcas* was grouped with *J. integerrima* and *J. gossypifolia*. However, *J. curcas* was monophyletic group. In addition, the 3' end of ACCase gene was cloned and sequenced from *J. multifida* and *J. gossypifolia*. DNA sequences were found to be 99% homology of *J. curcas*.

Keywords: *Jatropha* , Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase), phylogenetic tree

Research on physical properties and chemical constituents of seeds of *Jatropha podagrica Hook* for using as biodiesel

Jatropha Podgorica, were cultivated for a year during 2013-2015 to obtain seeds. Proximate analysis showed that seed kernel contained 3.51 % moisture content, 7.74% ash, 28.74 % crude protein, 29.14 % carbohydrate and 30.87 % oil. Free fatty acid, saponification value, and iodine number were, 0.91 g/100g, 186.70 mgKOH/g, and 134.11 g/100g, respectively. The seeds oil was analyzed for fatty acids (FAMEs) composition. *J. podagrica* oil had 85.38% unsaturated fatty acids with 70.15% linoleic acid predominating. Apart from linoleic acid, other prominent fatty acids were palmitic acid (8.51%), stearic acid (5.57%), lauric acid (0.02%), myristic acid (0.13%), pentadecanoic acid (0.01%), heptadeconoic acid (0.09%), arachidic acid (0.18%), behenic acid (0.04%), Tricosanoic acid (0.02) and lignoceric acid (0.05%), oleic acid (14.71%), and eicosenoic acid (0.09%). Results showed that the oil is highly unsaturated because of the high percentage of linoleic acid.

Keywords: *Jatropha podagrica*, proximate analysis, physical properties, chemical composition

Production of Intergeneric Hybrid between *Jatropha curcas L.* and *Ricinus communis*: Protoplast Isolation and Fusion

Jatropha curcas L. and *Ricinus communis L.* belong to Euphorbiaceous and considered as important alternative biofuel. Somatic hybridization between *J.curcas L.* and *R.communis L.* was proposed to solve low genetic variability of *J. curcas L.* The intergeneric hybrid will provide a novel variety which perform as an annual crop and bear fruits to ease harvesting for commercial production. Protoplast fusion between *J.curcas L.* and *R. communis L.* to create intergeneric hybrid was attempted via PEG-mediated method. Mesophyll protoplasts of *J. curcas L.* and call protoplasts of *R. communis L.* were used in this study. Concentration and molecular weight of PEG, fusion period, micro fusion and macro fusion method were optimized. The highest (66%) viability of heterokary on was obtained from using 30% PEG (MW6000) assisted with macro fusion method for 10 Minutes.

Keyword: *Jatropha curcas L.*, *Ricinus communis* Protoplast fusion, PEG-mediated method.

บทคัดย่อ

การสำรวจพืชสกุล Jatropha L. ที่พบในประเทศไทย

การศึกษากลไกการติดผลของพืชแต่ละชนิดมีความสำคัญเพราะจะช่วยเพิ่มคุณภาพและปริมาณที่มากขึ้นของผล ซึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องได้แก่ สัดส่วนของดอกเพศผู้และเพศเมีย พาหะผสมเกสร และปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยต่อการติดผลในสภาพธรรมชาติและพาหะที่ช่วยในการติดผลของพืชทั้ง 5 ชนิดของสกุล *Jatropha* ที่มีรยงานในประเทศไทย จึงได้ทำการปลูกต้นพืชที่ต้องการศึกษไว้ในบริเวณสวนพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อายุได้ 8-12 เดือน จึงได้เริ่มทำการสังเกตการติดผลและพาหะที่ช่วยในการผมเกสร พบว่า ทุกชนิดมีช่อดอกคล้ายกันคือ แบบ compound cyme มีสัดส่วนดอกเพศผู้กับดอกเพศเมียแตกต่างกัน ค่าความสำเร็จการสืบพันธุ์แตกต่างกันดังนี้ สบู่ดำและสบู่แดง มีค่าความสำเร็จในการสืบพันธุ์ ใกล้เคียงกับกัน และเกือบ 100 % คือ 83 % (RS= 0.833) และ 75 % (RS=0.75) ตามลำดับ ส่วนมะละกอฝรั่งและหนุมานนั่งแท่น มีค่าความสำเร็จในการสืบพันธุ์น้อยกว่า 50 % (RS=0.5 และ 0.44) และปัตตาเวียมีค่าความสำเร็จน้อยที่สุด คือ 33 % (RS=0.33) จะเห็นว่าปัตตาเวียมีค่าการสืบพันธุ์ต่ำที่สุด แต่กลับพบแมลงผสมเกสรถึง 3 ชนิด แสดงให้เห็นว่าชนิดที่ไม่พบพาหะผสมเกสรนั้น พืชมีความสามารถในการผสมในตัวเองสูง อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อนำข้อมูลมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเมล็ดได้

คำสำคัญ: สบู่ดำ สบู่แดง ปัตตาเวีย มะละกอฝรั่ง หนุมานนั่งแท่น *Jatropha* L.

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของพืชในสกุล Jatropha

เอนไซม์ Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในพืช ซึ่งควบคุมกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันที่ใบและเมล็ดของพืช ในการศึกษาครั้งนี้ได้หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Jatropha* 5 ชนิดในประเทศไทย (สบู่ดำ สบู่แดง มะละกอฝรั่ง หนุมานนั่งแท่น และปัตตาเวีย) โดยใช้ส่วนของ intron 3 บริเวณของยีน ACCase. โดยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) จาก intron แต่ละบริเวณและการรวมข้อมูลของ intron ผลการทดลองจากการรวมข้อมูล intron แสดงให้เห็นว่าพืชในสกุล *Jatropha* 5 ชนิดนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยมะละกอฝรั่งและหนุมานนั่งแท่นจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันด้วยค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) ที่สูงและสบู่ดำมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปัตตาเวียและสบู่แดง อย่างไรก็ตามสบู่ดำจัดเป็นกลุ่มวงศ์วานเดี่ยว (monophyletic group) นอกจากนี้ยังหาลำดับดีเอ็นเอทางด้านปลาย 3´ ของยีน ACCase ของมะละกอฝรั่งและสบู่แดง ซึ่งลำดับดีเอ็นเอนี้มีความเหมือนกับสบู่ดำ 99%

คำสำคัญ: เอนไซม์เอซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลต, ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

การวิจัยคุณสมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบเคมีของเมล็ดหนุมานนั่งแท่น

(Jatropha podagrica Hook) เพื่อใช้เป็นแหล่งไบโอดีเซล

ดำเนินการปลูกต้นหนุมานนั่งแท่นจากเมล็ดระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557 เพื่อนำเมล็ดมาสกัดน้ำมันและวิเคราะห์ proximate พบว่ามีปริมาณความชื้น 3.51 % เถ้า 7.74 % โปรตีน 28.74 % คาร์โบไฮเดรต 29.14 % ปริมาณน้ำมัน 30.87 % มีค่า Saponification value, ค่า Free Fatty Acid และ Iodine number เท่ากับ 186.70 mgKOH/g, 0.91 g/100g และ 134.11 g/100g ตามลำดับ องค์ประกอบชนิดกรดไขมัน (FAMEs; fatty acids methyl esters) พบว่า น้ำมันหนุมานนั่งแท่น ประกอบด้วย กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) ถึง 85.35 % โดยมีlinoleic เป็นองค์ประกอบหลัก 70.15 % กรดไขมันชนิดอื่นๆ ได้แก่ palmitic (8.51%) stearic (5.57%) lauric acid (0.02%) myristic acid (0.13%), pentadecanoic acid (0.01%), heptadeconoic acid (0.09%), arachidic acid (0.18%), behenic acid (0.04%), Tricosanoic acid (0.02) and lignoceric acid (0.05%), oleic acid (14.71%) และ eicosenoic acid (0.09%)

คำสำคัญ : หนุมานนั่งแท่น, proximate analysis, physical property, chemical composition

การสร้างสายพันธุ์ลูกผสมข้ามชนิดของสบู่ดำและละหุ่ง : การแยกและหลอมรวมโปรโตพลาสต์

สบู่ดำและละหุ่งเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceous เป็นพืชที่ได้รับความสนใจในแง่การใช้เป็นพลังงานทดแทนการศึกษานี้ดำเนินการผสมข้ามสกุลระหว่างพืชทั้งสองชิดนี้เพื่อปรับปรุงลักษณะของสบู่ดำให้เป็นพืชที่มีนิสัยเป็นพืชปลูกฤดูเดียวและมีผลดกซึ่งจะง่ายต่อการปลูกเป็นการค้า การรวมเอาลักษณะของละหุ่งเข้าสู่สบู่ดำทำโดยการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ของใบและแคลลัสของสบู่ดำและละหุ่งโดยใช้ PEG ทำการวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ได้แก่ ความเข้มข้น PEG ระยะเวลาการหลอมรวม วิธีการหลอมรวมแบบ Micro method และ Macro method ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สามารถทำให้โปรโตพลาสต์ของสบู่ดำและละหุ่งหลอมรวมกันและยังคงมีชีวิตถึง 66 % เมื่อใช้ PEG (MW 6000) 30 % โดยวิธีการ Macro Fusion เป็นเวลา 10 นาที

คำสำคัญ: *Jatropha curcas L.* , *Ricinus communis L.*, การหลอมรวมโปรโตพลาสต์, PEG

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
การสำรวจพืชสกุล *Jatropha* L. ที่พบในประเทศไทย	
บทที่ 1	
- ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
- ขอบเขตของโครงการวิจัย	1
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
บทที่ 2	
- เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 3	
- วิธีการดำเนินการวิจัย	3
บทที่ 4	
- ผลการวิจัย	4 - 14
บทที่ 5	
- สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ	15
- เอกสารอ้างอิง	16
ความสัมพันธุ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของพืชในสกุล *Jatropha*	
บทที่ 1	
- ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	17
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	17
บทที่ 2	
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18 - 20
บทที่ 3	
- วิธีการดำเนินการวิจัย	21 - 26
บทที่ 4	
- ผลการวิจัย	27 - 39
บทที่ 5	
- ข้อสรุปการศึกษา	40
- เอกสารอ้างอิง	41 – 42
- ภาคผนวก	43

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**

การวิจัยคุณสมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบเคมีของเมล็ดหนุมานนั่งแท่น (Jatropha podagrica Hook) เพื่อใช้เป็นแหล่งไบโอดีเซล

บทที่ 1

- ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 44
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 44
- ขอบเขตของโครงการวิจัย 45
- ประโยชน์ 45

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

- ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ 46
- การใช้ประโยชน์ 46
- ความเป็นพิษ 46
- ข้อมูลทางสารพฤกษเคมี 47
- ข้อมูลการวิจัยและพัฒนาน้ำมันสบู่ดำไปเป็นไบโอดีเซล 47 - 49

บทที่ 3

- วิธีการดำเนินการวิจัย 50 - 53

บทที่ 4

- ผลการวิจัย 54 - 61

บทที่ 5

- อภิปรายและสรุปผลการทดลอง 62
- เอกสารอ้างอิง 63 - 64

การสร้างสายพันธุ์ลูกผสมข้ามชนิดของสบู่ดำและละหุ่ง

บทที่ 1

- บทนำ 65
- วัตถุประสงค์ 65

บทที่ 2

- วิธีการดำเนินการวิจัย 66 - 71

บทที่ 3

- ผลการวิจัย 72 - 84

บทที่ 4

- อภิปรายและสรุปผลการทดลอง 85
- เอกสารอ้างอิง 86 - 87

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

พืชสกุล *Jatropha* L. อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae สกุลนี้ มีจำนวน 175 ชนิดโดยประมาณ สำรวจพบในประไทย 5 ชนิด ซึ่งทุกชนิดเป็นพืชต่างถิ่นที่นำมาเป็นพืชปลูก (introduced and cultivated) พบมีการปลูกกระจายอยู่ทุกภาคในประเทศไทย ชนิดที่มีรายงานพบในประเทศไทยได้แก่ *Jatropha curcas* L. (สบู่ดำ), *J. Gossypiifolia* L. (สบู่แดง), *J. integerrima* Jacq. (ปัตตาเวีย), *J. Multifida* L. (มะละกอฝรั่ง) และ *J. podagrica* Hook. f. (หนุมานนั่งแท่น) บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ทั่วไปคล้ายวัชพืช เช่น สบู่แดง ยังไม่มีรายงานการนำมาใช้ประโยชน์ สบู่ดำใช้เป็นพืชพลังงานทดแทน ปลูกเป็นพืชไร่เพื่ออุตสาหกรรมน้ำมันไบโอดีเซล ปัตตาเวีย มะละกอฝรั่งและหนุมานนั่งแท่น ปลูกเป็นพืชประดับให้และประโยชน์ทางสมุนไพร เช่นหนุมานนั่งแท่น กินเหง้าเป็นยาบำรุงกำลัง ฟอกโลหิต น้ำยางใช้ทารักษาแผลสด ห้ามเลือด และรักษาฝี สารสกัดจากเมล็ดมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา มะละกอฝรั่งก็มีสรรพคุณทางยา เช่น เปลือก แก้ลม คุมธาตุ แก้อาเจียน น้ำยางจากเมล็ดเป็นยาที่ทำให้แท้งบุตรได้ และเป็นยาเบื่อที่รุนแรงถึงตายได้ น้ำยางสดมีคุณสมบัติสมานแผล แก้ปากเปื่อย และแผลอักเสบเรื้อรัง และใบเป็นยาฆ่าเหา หิด และพยาธิผิวหนังได้ (ก่องกานดา ชยามฤต, 2548 และ พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2546)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสกุล *Jatropha* หรือลักษณะของพืช 5 ชนิดที่มีความเหมือนกันคือ เป็นไม้พุ่มขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ไม่ผลัดใบ ดอกออกเป็นช่อ เป็นฤดูกาล ไม่ได้ออกดอกตลอดทั้งปี ดอกแยกเพศ (unisexual flower) อยู่บนช่อเดียวกัน ทั้งดอกเพศผู้และดอกเพศเมียมีกลีบเลี้ยง 5 กลีบอิสระจากกัน กลีบดอก 5 กลีบ อิสระจากกัน ดอกเพศเมียมีรังไข่อยู่เหนือส่วนประกอบอื่นของดอก มี 3-5 ห้อง ไข่ (ovule) ติดที่แกนกลาง (axile placentation) ดอกเพศผู้ จากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พืชทั้ง 5 ชนิดน่าจะมีการผลิตผลที่ดีเพราะมีทั้งเพศผู้และเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน น่าจะมีประสิทธิภาพการผสมเกสรที่ดีและติดผลได้อย่างสม่ำเสมอ แต่ในความเป็นจริง จะเห็นว่าบางชนิดไม่มีการผลิตผล หรือผลิตจำนวนน้อยมาก ซึ่งไม่สัมพันธ์กันกับปริมาณดอกที่พบ เช่น ปัตตาเวีย และมะละกอฝรั่ง จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีต่อการผลิตผลของพืชสกุล *Jatropha* L. ที่พบอยู่ในประเทศไทย

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ ต้องการศึกษาพาหะผสมเกสร (pollinator) ของพืชสกุล *Jatropha* L. ที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

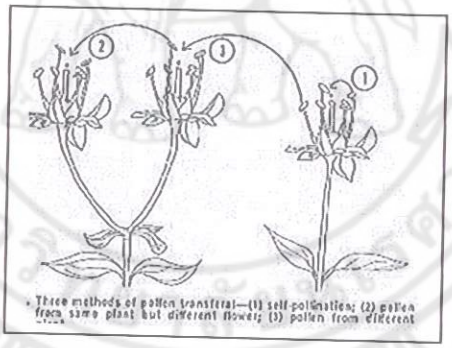
1. ได้ข้อมูลสำหรับการจัดการพืชสกุล *Jatropha* L. เป็นทางเลือกหรือเพิ่มโอกาสที่จะนำทรัพยากรทางชีวภาพมาใช้ประโยชน์ นอกเหนือจาก สบู่ดำ ที่มีประโยชน์เชิงเศรษฐกิจอยู่แล้ว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกียว

การศึกษาปัจจัยและพาหะผสมเกสรที่มีผลต่อการติดผลของพืชดอก (angiosperm) นั้น มีความสำคัญมาก เพราะนอกจากจะให้ทราบหรือควบคุมการผลิตผลของพืชได้แล้วยังช่วยให้พืชเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม และอนุรักษ์พาหะที่ช่วยผสมเกสร ซึ่งพาหะที่เป็นสัตว์ หรือแมลง เป็นชีวะพาหะ (biotic pollination) ซึ่งดอกไม้เองจะต้องมีส่วนที่เป็นแรงดึงดูดพาหะเข้ามา มากกว่าพืชที่มีพาหะเป็นสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic pollination) ทั้งพืชและสัตว์หรือพาหะที่ไม่มีชีวิต 2 สิ่งนี้จะมีความสัมพันธ์กัน โดยเฉพาะสัตว์จะมีผลต่อการผสมเกสรของพืชดอกมากกว่า 90% (Willmer, 2011)

รูปแบบการผสมเกสรของพืชดอก หรือการถ่ายละอองเรณูเกิดขึ้นได้ใน 2 ลักษณะ คือ 1) ละอองเรณูจากเกสรเพศผู้ไปสู่ยอดเกสรเพศเมียที่อยู่ในดอกเดียวกัน (self-pollination) หรือคนละดอกที่อยู่บนต้นเดียวกัน และ 2) เป็นการถ่ายละอองเรณูจากเกสรเพศผู้ไปสู่ยอดเกสรเพศเมีย ที่อยู่คนละดอก ที่ดอกอยู่คนละต้น (cross-pollination) ถ้าการถ่ายละอองเรณูเกิดแบบ self-pollination จะได้ genotype ที่เหมือนกัน เป็น homozygous เพียงแต่ถ้าผสมในดอกเดียวกัน เรียกว่า autogamy ถ้าผสมข้ามดอกหรือต่างดอกกัน แต่อยู่ในต้นเดียวกัน เรียกว่า geitonogamy ซึ่งก็อาจเป็นไปได้ เพราะพาหะอาจจะย้ายไปหลายๆ ดอกในต้นหนึ่งในเวลาเดียวกัน ส่วนการเกิด cross-pollination หมายถึงการที่ละอองเรณูของพืชดอกหนึ่ง ไปตกบนยอดเกสรเพศเมียของอีกดอกหนึ่งที่อยู่คนละต้นกัน genotype ที่ได้จะเป็น herterozygous สาเหตุที่ทำให้พืชต้องมีการผสมข้ามเนื่องมาจากการแก่ไม่พร้อมกันของเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย ซึ่งลักษณะแบบนี้เกิดจากการควบคุมของยีนส์ ในธรรมชาติพืชมีการผสมข้ามมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีโอกาสทำให้เกิดลักษณะที่ผิดแปลกไปจากต้นพ่อหรือแม่ หรือที่เรียกว่าการผ่าเหล่า (mutant) ซึ่งจะมีทั้งลักษณะที่ดีและไม่ดี ลักษณะที่ดีก็ยังคงอยู่ต่อไป ส่วนลักษณะที่ด้อย ก็จะสูญหายไป ทำให้เกิดวิวัฒนาการและความหลากหลายของพืชเกิดขึ้นในปัจจุบัน (Willmer, 2011)



รูปแบบการถ่ายละอองเรณูของพืชดอก

ที่มา: http://agritech.tnau.ac.in/crop_improvement/crop_imprv_pollmode.html

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ปัจจัยที่ดึงดูดพาหะผสมเกสร ได้แก่ การมีน้ำหวาน ที่พบบริเวณที่เรียกว่า disc หรือ spur แมลงหรือสัตว์ก็จะมาเก็บน้ำหวานจากดอกไม้มาเป็นอาหาร น้ำหวานที่พืชขับออกมาส่วนมากจะเป็นสารละลายน้ำตาล glucose, fructose และ sucrose ซึ่งเป็นสิ่งที่จะดึงดูดพาหะ (ลาวัลย์ รักสัตย์, 2534)

ในส่วนของพืชสกุล *Jatropha* L. อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae สกุลนี้ สำรวจพบในประไทย 5 ชนิด ดอกแยกเพศ (unisexual flower) ที่อยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious plant) ดอกออกเป็นช่อที่มีทั้งดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่ในช่อเดียวกัน ดังนั้น การถ่ายละอองเรณูจึงมีโอกาสเกิดขึ้นทั้งแบบ self-pollination และแบบ cross-pollination โดยจะมีพาหะผสมเกสรเป็นอย่างไร และพาหะมีความจำเป็นต่อการติดผลหรือไม่จึงเป็นที่มาของการศึกษาเรื่อง การติดผลของ *Jatropha* L. ในสภาพธรรมชาติและสภาพควบคุม ในครั้งนี้ เพื่อเป็นประโยชน์ในการผลิตผล ที่จะนำเมล็ดไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมต้นไม้สกุล *Jatropha* ทั้ง 5 ชนิด

ปลูกต้นไม้ที่ต้องการศึกษาที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก โดยได้ซื้อต้นไม้และปลูกลงในกระถาง รอการเจริญเติบโต ออกดอก ผล เพื่อสังเกตต่อไป

2. ศึกษาโครงสร้างของช่อดอก และดอก

ศึกษาโครงสร้างของช่อดอกและดอก โดยทำการวาดการเรียงตัวของดอก นับจำนวนดอกเพศผู้และเพศเมียในแต่ละช่อและบันทึกผลการศึกษา

3. ติดตามชีพลักษณ์ของการออกดอกและติดผล

ติดตามช่วงเวลาการติดดอกและผลของแต่ละชนิด และติดตามช่วงเวลาการพัฒนาของดอกตั้งแต่เริ่มออกเป็นช่อดอก และสังเกตพัฒนากรของดอกในแต่ละช่อ จนถึงติดผล และติดตามผลที่ติดนั้นตั้งแต่ผลอ่อนจนถึงผลแก่ แห้งเองในธรรมชาติ เก็บผลแก่ที่แห้งมาศึกษารูปร่าง วัดขนาด และชั่งน้ำหนัก

4. ประเมินค่าความสำเร็จของการสืบพันธุ์

หาค่าความสำเร็จของการสืบพันธุ์เพื่อระบุถึงศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นผลและเมล็ด

โดยใช้สูตร $RS = (Fr/Fi) \times O/S$

โดยที

- RS = ค่าความสำเร็จของการสืบพันธุ์
- Fr = จำนวนผลแก่ต่อช่อผล
- Fi = จำนวนดอกเพศเมียต่อช่อดอก
- O = จำนวนไข่อ่อนต่อดอก
- S = จำนวนเมล็ดที่สุกแก่ต่อผล

* ค่า RS = 0 หมายถึงทุกดอกภายในช่อดอกนั้นๆ พัฒนาไปเป็นผล 100 % และไข่ (ovule) พัฒนาไปเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์

บทที่ 4

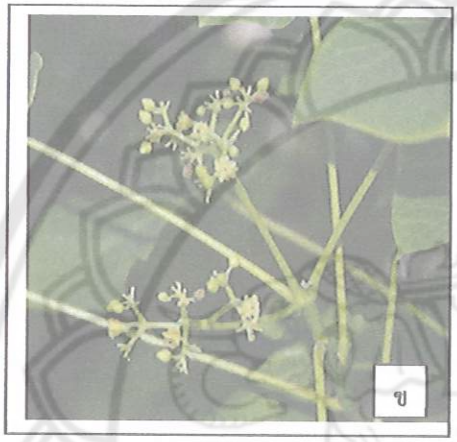
ผลการดำเนินการวิจัย

1. ได้ปลูก *Jatropha* ทั้ง 5 ชนิด ในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ดัง ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนต้นของสกุล *Jatropha* ที่นำมาปลูกเพื่อศึกษาการผสมเกสร

ชนิด	สายพันธุ์/แหล่งที่มา	จำนวน (ต้น)	วิธีการปลูก	การเจริญเติบโต
1. สบู่ดำ	พิษณุโลก	3	ธรรมชาติ	รอด
	เลย	1	กระถาง	ตาย
2. สบู่แดง	พิจิตร	20/5	กระถาง	รอด
	เพชรบุรี	1	กระถาง	รอด
	นครสวรรค์	1	กระถาง	รอด
3. ปัตตาเวีย	พิษณุโลก	10	กระถาง	รอด 3/ตาย 7
		4	ธรรมชาติ	รอด
4. มะละกอฝรั่ง	เลย	1	กระถาง	ตาย
	พิจิตร	1	กระถาง	ตาย
	พิษณุโลก	3	กระถาง	รอด
	นครราชสีมา	20	กระถาง	รอด 8/ตาย 12
5. หนุมานนั่งแท่น	พิษณุโลก	2/1	กระถาง/ธรรมชาติ	รอด/รอด
	นครราสีมา	10	กระถาง	

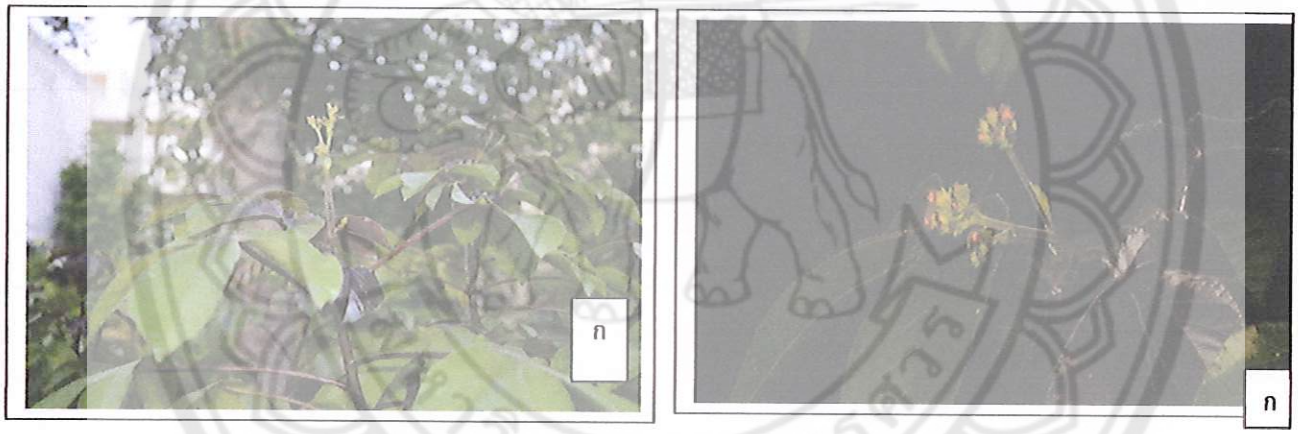
การติดผลและพาหะผสมเกสรสบู่ดำ ได้สังเกตจากต้นสบู่ดำอายุมากกว่า 5 ปี (ภาพที่ 1ก) **พบว่า** มีการติดผลในแต่ละช่อเป็นปกติ และไม่พบการเหี่ยวแห้งของดอกและช่อดอก เพราะเป็นต้น**ที่อายุ** มากกว่า 5 ปี การติดผลของสบู่ดำใน 1 ช่อติดผลมากกว่าร้อยละ 80 ของดอกเพศเมียต่อ 1 ช่อ (ภา**พที่ 1** ค) มีส่วนน้อยที่ดอกเพศเมียเหี่ยว ไม่ประสบผลสำเร็จในการผสมเกสร (ภาพที่ 1ข) แต่มีบางช่อที่พบ**ว่ามี** **การติดผลน้อยกว่าร้อยละ 50 ของดอกเพศเมีย 1 ช่อ ด้วยเช่นกัน พาหะผสมเกสรไม่สามารถสังเกตได้**



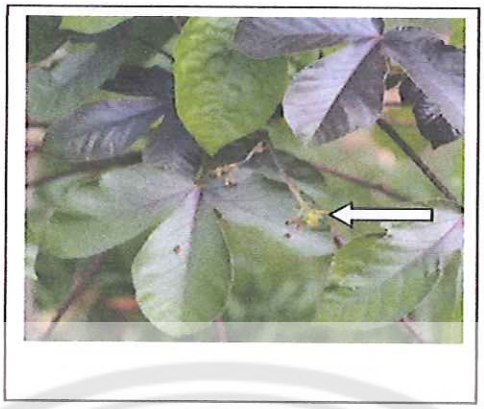
ภาพที่ 1 ต้นสบู่ดำที่ใช้ในการศึกษา ปลูกโดยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร 1ก) ช่อดอกสบู่ดำ อายุ 2 สัปดาห์ จะเห็นว่ามีดอกเพศเมียบางสวนที่ไม่เจริญเป็นผลได้ (1ข) และผลสบู่ดำที่แก่เต็มที่ (1ก)

การติดผลของสบู่แดง หลังจากที่ได้นำต้นสบู่แดงที่อายุ ประมาณ 1 เดือน มาปลูกเพื่อใช้ในการศึกษา พบว่าการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า ไม่ออกดอกและผลตามที่ได้คาดการณ์ไว้ และมีบางต้นที่ไม่เจริญและตายไปในที่สุด เมื่อต้นอายุ 8 เดือน (ภาพที่ 2ก) เริ่มมีดอกและผล จึงทำการศึกษาพาหะผสมเกสรและการติดผล พบว่า ช่อดอกออกมาได้เพียง 1 สัปดาห์ ได้แห้ง ไม่มีการผสมเกสรเกิดขึ้น เพราะสังเกตไม่พบการติดผล และไม่พบพาหะผสมเกสร (ภาพที่ 3ก และ 3ข)

ภาพที่ 2 สบู่แดง อายุ 8 เดือน พบว่าการเจริญเติบโตช้า ไม่ออกดอกและผลตามที่ได้คาดการณ์ไว้ และมีบางต้นที่ไม่เจริญและตายไปในที่สุด



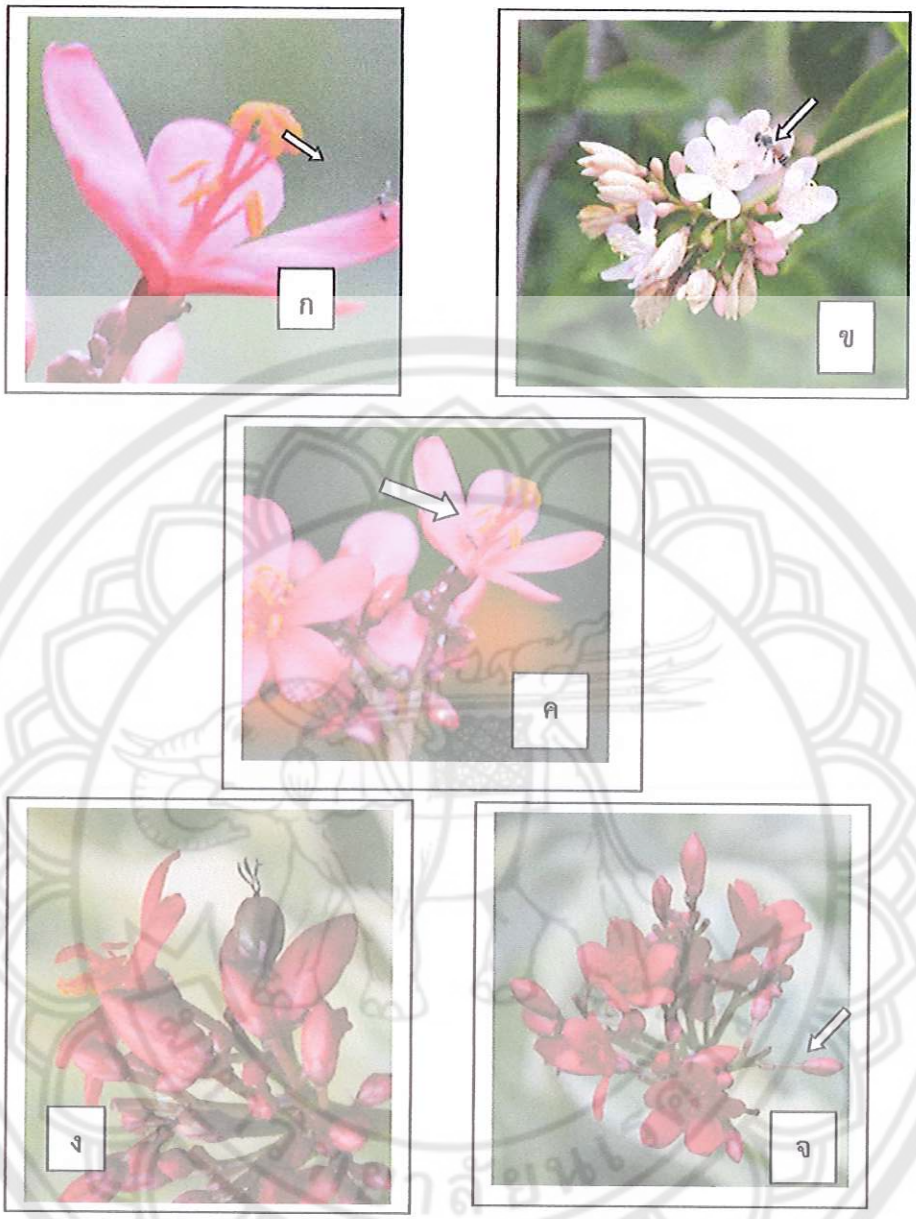
ภาพที่ 3 ช่อดอกสบู่แดง ใช้ในการศึกษาการติดผลและแมลงผสมเกสร จากต้นอายุ 8 เดือน



ภาพที่ 4 ช่อดอกสบู่แดง เหี่ยวแห้งก่อนที่จะติดผล และไม่พบมีพาหะผสมเกสร

ปัตตาเวีย ได้ศึกษาการติดผลและพาหะผสมเกสรจากต้นที่ได้มีการปลูกไว้เป็นเวลามากกว่า 3 ปี ในสวนของสถานีบริการน้ำมันเอสโซ่ ข้างมหาวิทยาลัยนเรศวร พบพาหะผสมเกสร แต่พบการติดผลน้อยเพียงช่อละ 1 ผล และไม่ติดผลเป็นส่วนใหญ่ คิดเป็นร้อยละของการติดผล เป็นช่อละ 1 % สาเหตุน่าจะเกิดจากผลของการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อใช้เป็นไม้ประดับหรือถูกทำให้เป็นหมันเพื่อคงไว้ซึ่งลักษณะที่ต้องการ

ภาพที่ 5 ปัตตาเวีย ใช้ต้นที่ได้มีการปลูกไว้เป็นเวลามากกว่า 3 ปี ในสวนสถานีบริการน้ำมันเอสโซ่ ข้างมหาวิทยาลัยนเรศวร พบพาหะผสมเกสร

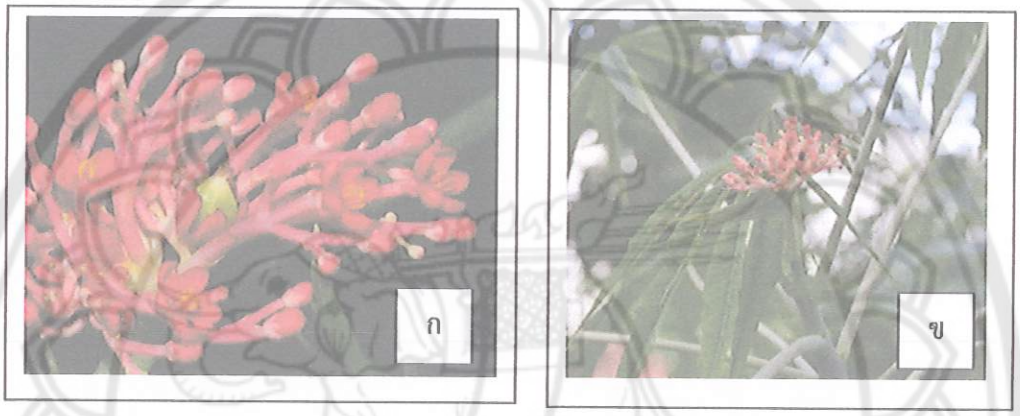


ภาพที่ 6 พาหะผสมเกสรปัตตาเวีย แตน (6ก) ผึ้งโพรง (6ข) และมด (6ค) การติดผลจะพบเพียง 1 ผล **ต่อ** 1 ช่อ (6ง) หรือพบการติดผลแต่หลุดร่วงก่อนผลแก่ (6จ)

การรติดผลของมะละกอฝรั่ง พบว่าการเจริญเติบโตช้า ไม่ออกดอกและผลตามที่ได้คาดการณ์ไว้ และมีบางต้นที่ไม่เจริญและตายไปในที่สุด จึงสังเกตผลและเก็บข้อมูลได้เพียง 1 ต้น จากการสังเกตพบว่า ใน 1 ต้น มีช่อดอก **จำนวนน้อย ในแต่ละช่อนั้น จะมีดอกเพศผู้จำนวนมากและดอกเพศเมียจำนวนน้อย ในสัดส่วนที่ไม่สมดุล และพบว่าการติดผลส่วนมากพบ 1 ลูกต่อ 1 ช่อดอก หรือมากที่สุด 3 ลูก ต่อ 1 ช่อดอก ตามภาพที่ 8ก - 8ข และ ภาพที่ 9**

ภาพที่ 7 มะละกอฝรั่งอายุประมาณ 24 เดือน ที่ใช้ในการศึกษา

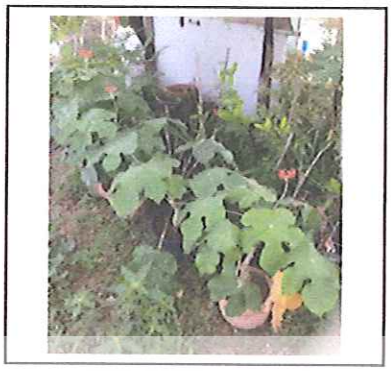
a



ภาพที่ 8 ช่อดอกมะละกอฝรั่ง (7ก) ช่อดอกที่ดอกเพศเมียแห้งโดยที่ยังไม่เจริญเป็นผล

ภาพที่ 9 มะละกอฝรั่ง ติดผล 1-3 ผล ต่อ 1 ช่อ

หนุมานนั่งแท่น ได้นำปลูกใหม่จากกระถาง เพื่อการสังเกตผล พบว่าเป็นชนิดที่ปลูกง่ายและมีอัตราการรอดมากที่สุด แต่ไม่สามารถสังเกตพาหะผสมเกสรได้

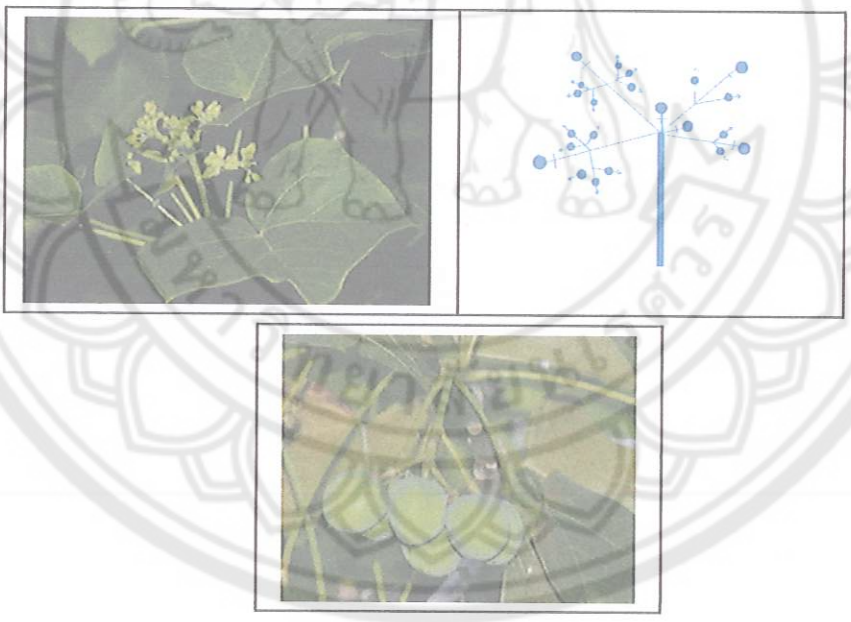


ภาพที่ 10 ต้นหนุมานนั่งแท่นที่ใช้ในการศึกษา

2. ศึกษาโครงสร้างของช่อดอก และดอก

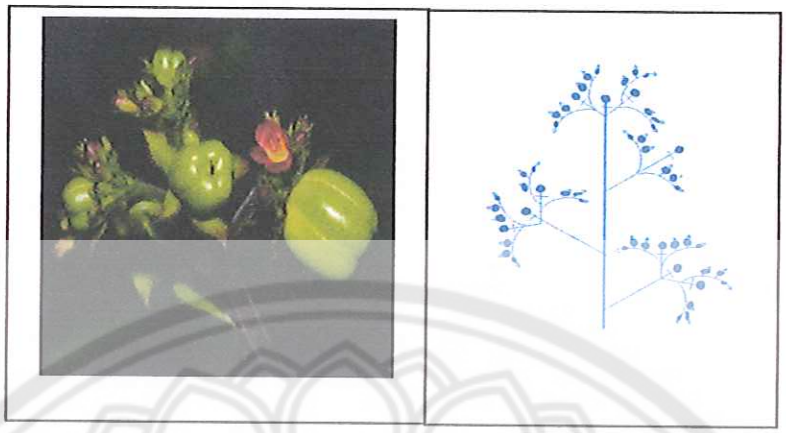
ผลการศึกษาโครงสร้างของช่อดอกและดอก โดยทำการวาดการเรียงตัวของดอก นับจำนวนดอกเพศผู้และดอกเพศเมียในแต่ละช่อของแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน แต่ทุกชนิดมีรูปแบบของดอกเป็นแบบ compound cymes ทั้งหมด เพียงแต่มีจำนวนของดอกในแต่ละช่อและขนาดของดอกและผลที่แตกต่างกัน สามารถจำแนกชนิดได้อย่างง่าย

สบู่ดำ ช่อดอกออกที่ซอกใบ ปลายกิ่ง ใน 1 กิ่งมักมีหลายช่อ ช่อดอกเป็นแบบ compound cymes สัดส่วนของดอกเพศผู้ : ดอกเพศเมียประมาณ 4 : 1 เมื่อติดผลประมาณ 4-6 ผลต่อ 1 ช่อ



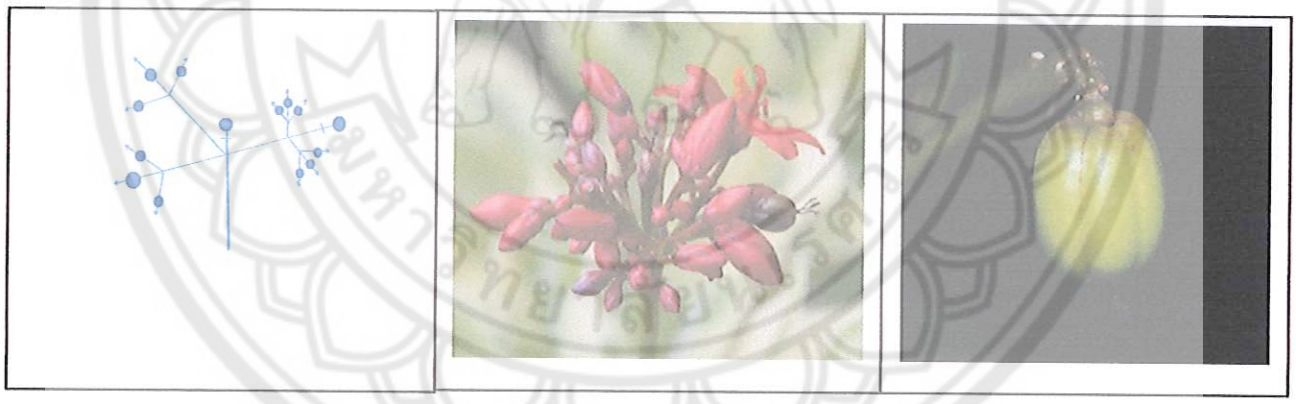
ภาพที่ 11 แสดงช่อดอกและช่อผลของสบู่ดำ

สบู่แดง ช่อดอกมักออกที่ปลายยอดของแต่ละกิ่ง เป็นช่อดอกแบบ compound cymes เช่นเดียวกับสบู่ดำ ที่มีช่อดอกย่อยจำนวนมาก สัดส่วนของจำนวนดอกเพศผู้ : ดอกเพศเมีย ประมาณ 8 : 1 การติดผลสังเกตพบว่าใน 1 ช่อ นั้นจะให้ผลผลิต 2 รุ่น ในแต่ละรุ่นประมาณ 4-8 ผลต่อช่อ พบแมลงผสมเกสรจำนวนมาก



ภาพที่ 12 แสดงช่อดอกและผล สบู่แดง

ปัตตาเวีย เป็นชนิดที่สังเกตพบว่าติดผลจำนวนน้อยมาก น่าจะเกิดจากพืชชนิดนี้ได้รับการปรับปรุงพันธุ์เพื่อไม่ให้เกิดการผสมเกสรได้ต่อไป เพื่อความคงที่ของลักษณะที่สวยงาม เพราะพบปลูกเป็นไม้ประดับ มีคุณค่าเชิงเศรษฐกิจในตัวเอง แต่จะพบการออกดอกจำนวนมาก ในแต่ละช่อจะมีจำนวนดอกมากเช่นกัน ช่อดอกออกที่ปลายยอด ของแต่ละกิ่ง ช่อดอกแบบ compound cymes สัดส่วนของดอกเพศผู้ : ดอกเพศเมีย ประมาณ 6 : 1 ทั้งช่อมีดอกเพศเมียประมาณ 2-3 ดอก แต่ติดผลเพียง 1 ผลเท่านั้น ดอกเพศผู้มีจำนวนมากกว่า 3 เท่าของดอกเพศเมีย มีเกสรเพศผู้ที่เด่นและสวยงาม พบแมลงผสมเกสรบ้าง ภาพที่ 6ก-6ค

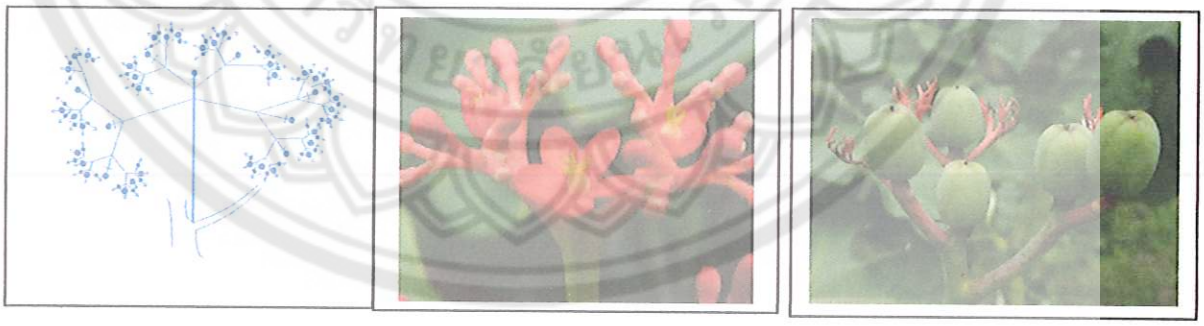


ภาพที่ 13 ช่อดอก ผล

มะละกอฝรั่ง ช่อดอกออกที่ปลายยอดและซอกใบของกิ่งย่อย ช่อดอกชั้นแรกคล้าย umbel ส่วนช่อดอกย่อยแบบ compound cymes **ที่มีดอกเพศผู้จำนวนมาก สัดส่วนต่อดอกเพศผู้ต่อดอกเพศเมีย คือ 20 : 1 และติดผลน้อย 1-3 ผล ต่อช่อ เท่านั้น**

ภาพที่ 14 แสดงช่อดอก และช่อผล มะละกอฝรั่ง

หนุมานนั่งแท่น ช่อดอกจะออกที่บริเวณซอกใบ ของแต่ละกิ่ง ในแต่ละกิ่งอาจพบ 1-3 ช่อต่อกิ่ง ช่อดอกแบบ compound cymes สัดส่วนของจำนวนดอกเพศผู้ : จำนวนดอกเพศเมีย ประมาณ 2 : 1 แต่ละช่อจะติดผลประมาณ 1-6 ผล



ภาพที่ 11 ช่อดอก และผล หนุมานนั่งแท่น

3. ติดตามชีพลักษณ์ของการออกดอกและติดผล

การติดตามการออกดอกและผล สำหรับทุกชนิดนั้น ไม่เป็นไปตามที่วางแผนไว้ เก็บข้อมูลประเมินค่าความสำเร็จของการสืบพันธุ์ได้เพียง 1 ชนิดคือ สบู่ดำ สำหรับสบู่แดง ปัตตาเวีย หนุมานนั่งแท่น และมะละกอฝรั่ง เนื่องจากอากาศร้อนมาก เมื่อพืชเริ่มมีช่อดอก แต่ไม่เจริญไปเป็นดอกได้ ช่อดอกได้แห้งก่อนที่ดอหจะบาน ทำให้ไม่สามารถสังเกตผลการศึกษาได้

4. ประเมินค่าความสำเร็จของการสืบพันธุ์

หาค่าความสำเร็จของการสืบพันธุ์เพื่อระบุถึงศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นผลและเมล็ด

โดยใช้สูตร RS = (Fr/Fi) x O/S

โดยที RS = ค่าความสำเร็จของการสืบพันธุ์

Fr = จำนวนผลแก่ต่อช่อผล

Fi = จำนวนดอกเพศเมียต่อช่อดอก

O = จำนวนไข่อ่อนต่อดอก

S = จำนวนเมล็ดที่สุกแก่ต่อผล

* ค่า RS = 1 หมายถึงทุกดอกภายในช่อดอกนั้นๆ พัฒนาไปเป็นผล 100 % และไข่ (ovule) พัฒนาไปเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์

จากการสังเกตการติดผลของทั้ง 5 ชนิด ตามตารางที่ 1 พบว่า สบู่ดำและสบู่แดง มีค่าความสำเร็จในการสืบพันธุ์ ใกล้เคียงกับกัน และเกือบ 100 % คือ 83 % (RS=0.833) และ 75 % (RS=0.75) ตามลำดับ ส่วนมะละกอฝรั่งและหนุมานนั่งแท่น มีค่าความสำเร็จในการสืบพันธุ์น้อยกว่า 50 % (RS=0.5 และ 0.44) และปัตตาเวียมีค่าความสำเร็จน้อยที่สุด คือ 33 % (RS=0.33)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการติดผลของทั้ง 5 ชนิด ในสภาพธรรมชาติ

ชนิด	จำนวนดอกเพศผู้ต่อ 1 ช่อ	จำนวนดอกเพศเมียต่อ 1 ช่อ (Fi)	จำนวนผลแก่เฉลี่ยต่อ 1 ช่อ (Fr)	จำนวนไข่อ่อนต่อดอก (O)	จำนวนเมล็ดที่สุกแก่ต่อผล (S)	ค่าความสำเร็จของการสืบพันธุ์ (RS)	ขนาดเมล็ด (มม.)
สบู่ดำ	16-27	6	5	3	3	0.833	18 x 11 x 8
สบู่แดง	48	8	6	3	3	0.75	8 x 5 x 3
ปัตตาเวีย	12-15	3	1	3	3	0.33	10 x 4.5 x 4.5
มะละกอฝรั่ง	>20	5	1.5	3	3	0.5	13 x 10 x 9
หนุมานั่งแท่น	48 (16+32)	8	3.5	3	3	0.44	10 x 6 x 5

หมายเหตุ เมล็ดที่ใช้ศึกษาเป็นเมล็ดที่ทำให้แห้งในอากาศเป็นเวลา 1 สัปดาห์

บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินงาน

ผลการดำเนินงานไม่เป็นไปตามที่วางแผนไว้เพราะมีอุปสรรคเรื่องการเจริญของต้นพืช และสภาพอากาศที่แห้งแล้ง จนพืชไม่ออกดอก จึงได้ทำการศึกษาได้เพียงบางชนิดตามที่รายงานไว้ ในบทที่ 4 ทำให้ไม่เป็นไปตามตัวชี้วัดที่ตั้งไว้

ความเห็นและข้อเสนอแนะ การศึกาครั้งนี้ ไม่สามารถควบคุมตัวแปรต้นคือ ความสมบูรณ์ของต้นพืชได้ ดังนั้น จึงต้องมั่นใจว่ามีต้นพืชเพื่อการศึกษาพร้อมก่อนจึงจะตั้งโทจย์วิจัยเกี่ยวกับการสืบพันธุ์ได้ และมีโอกาสที่จะประสบความสำเร็จสูงกว่าเริ่มต้นจากการปลูกใหม่ เพราะเป็นพืชอายุมากกว่า 1 ปี เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่ จึงมีช่วงเวลาเป็นไม้หนุ่ม (sapling) ที่ยาวนานประมาณ 1 ปี จึงเสนอแนะว่าต้องเตรียมต้นพันธุ์ให้พร้อมก่อนการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

แก้วนภา กิตติบรรพชา และ จำนรรจ์ เพียรอนุรักษ์. 2550. **ชีพลักษณ์ ลักษณะดอกและผล และความสำเร็จในการสืบพันธุ์ของผักหวานป่า.** เอกสารประกอบการสัมมนาทางวนวัฒนวิทยา ครั้งที่ 8 "เทคโนโลยีวนวัฒน์เพื่อขจัดความยากจน" สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้ กรุงเทพฯ

ก่องกานดา ชยามฤต. 2548. **พืชมีประโยชน์วงศ์เปล้า.** บริษัทประชาชน, กรุงเทพฯ

พงษ์ศักดิ์ พลเสนา. 2546. **พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน: ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ.** ห้างหุ้นส่วนกำกัด เจตนารมภัณฑ์, จังหวัดปราจีนบุรี

ลาวัลย์ รักสัตย์. 2539. **ละอองเรณู (Pollen grains).** โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร

สุวิมล อุทัยรัศมี และ ดำรง พิพัฒนวัฒนากุล. 2555. ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของไม้เทพทาโร. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50 สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. ณ วันที่ 31 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2555

Willmer, P. 2011. Pollination and floral ecology. Princeton University Press. USA.

โครงการย่อยที่ 2

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของพืชในสกุล *Jatropha*

Molecular phylogenetic relationship of *Jatropha*

บทที่1

บทนำ

การศึกษาความหลากหลายและการจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการนำน้ำมันสบู่ดำไปใช้เพื่อทดแทนน้ำมัน ซึ่งสอดคล้องกับแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 ให้ความสำคัญกับการเพิ่มปริมาณการผลิตพลังงานทดแทนจากพืชแทนการใช้พลังงานจากน้ำมัน (คณะกรรมการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ, 2555) พืชในสกุล *Jatropha* ที่พบในประเทศไทยมีทั้งสิ้น 5 ชนิดคือ *Jatropha gossypifolia* (สบู่แดง) *J. podagrica* (หนุมานนั่งแท่น) *J. integerrima* (ปัตตาเวีย) *J. multifida* (มะละกอฝรั่ง, ฝิ่นต้น) และ *J. curcas* (สบู่ดำ) (Chayamarit *et al.*, 2001) ปัญหาส่วนใหญ่ของสบู่ดำคือให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ แต่มีบางสายพันธุ์ของสบู่ดำที่ให้ผลผลิตสูง ดังนั้นการศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ ที่นำไปสู่การหาความสัมพันธ์เชิงวัฒนาการ อาจเป็นแนวทางหนึ่งสำหรับการใช้ประโยชน์เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานโรค ลำต้นไม่สูง และอาจให้ผลผลิตได้ตลอดทั้งปี ดังนั้นสบู่ดำจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำไปใช้เพื่อผลิตพลังงานชีวภาพที่สำคัญของประเทศไทยในอนาคต

การศึกษาความสัมพันธ์ของพืชโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลได้เข้ามามีส่วนช่วยในการจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ของกลุ่มพืชให้มีความชัดเจนมากขึ้น การใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆเช่น Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) มาใช้ในการแก้ปัญหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับของดีเอ็นเอ ส่วนวิธีการหาลำดับดีเอ็นเอถึงแม้ว่าเป็นวิธีที่ยากและจำเป็นต้องรู้ข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอ ใช้เวลานาน และมีค่าใช่จ่ายสูง แต่วิธีการหาลำดับดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการใช้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่มีสายพันธุ์ใกล้ชิดกัน (Pamidimarri *et al.*, 2009) ในพืชสกุล *Jatropha* ได้มีรายงานลำดับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของ *J. curcas* ขนาดดีเอ็นเอนั้นใกล้เคียงกับพืชชนิดอื่น และการจัดเรียงตัวของยีนในคลอโรพลาสต์มีความคล้ายกับพืชดอก (Asif *et al.*, 2010) เนื่องจากคลอโรพลาสต์นั้นมีข้อได้เปรียบ คือมีจีโนมขนาดเล็ก ยีนทั้งหมดในจีโนมของคลอโรพลาสต์เป็น single copy gene คือส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสจำเพาะพบเพียง 1 ครั้งต่อ 1 จีโนมแตกต่างจากยีนที่พบในนิวเคลียส นอกจากนี้คลอโรพลาสต์ยังมีส่วน non-coding region มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน นอกจากส่วนดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ยังมีส่วนดีเอ็นเอในนิวเคลียสซึ่งสามารถนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชได้เช่นกัน ส่วนของยีนในนิวเคลียสที่นิยมนำมาศึกษาคือส่วนของ intron ซึ่งก็เป็นส่วนของ non-coding region เช่นกัน (Bailey and Doyle, 1999) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจากบริเวณ intron ของยีน Acetyl-CoA carboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันที่สะสมอยู่ที่เมล็ดและใบ สำหรับจำแนกและหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชสกุล *Jatropha* ในประเทศไทย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Jatropha* ในประเทศไทยโดยใช้ส่วน intron ของยีน Acetyl-CoA carboxylase (ACCase)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชในสกุล *Jatropha*

พืชในสกุล *Jatropha* พบประมาณ 172 ชนิด จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอเมริกากลาง (Latin America) และมีการกระจายทั่วไปในแอฟริกาและเอเชีย (Fairless, 2007) ปัจจุบันนี้พืชในสกุลนี้จัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น *Jatropha curcas* เป็นพืชที่ผลิตน้ำมันสามารถใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ในหลายประเทศทั่วโลก (Agarwal and Agarwal, 2007) พืชในสกุลนี้สามารถเจริญเติบโตได้ในที่แห้งแล้งและทนทานต่อโรคพืช จึงสามารถกระจายพันธุ์ได้ดีในหลายภูมิภาคทั้งในเขตร้อน เขตกึ่งร้อน เขตอบอุ่นและเขตที่มีปริมาณฝนต่ำ (Kumar and Sharma, 2008) ในประเทศไทยพบพืชสกุลนี้เพียง 5 ชนิดคือ *J.* gossypifolia (สบู่แดง), *J.* podagrica (หนุมานนั่งแท่น) *J.* integerrima (ปัตตาเวีย), *J. multifida* (มะละกอฝรั่ง, ฝิ่นต้น) และ *J.* curcas (สบู่ดำ) (Chayamarit *et al.*, 2001)

ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 ประเทศไทยเกิดการขาดแคลนน้ำมันก๊าซสำหรับใช้จุดตะเกียง เกษตรกรทางภาคอีสานได้นำเมล็ดสบู่ดำมาตำให้ละเอียด หรือนำเอากากของเมล็ดที่สกัดน้ำมันออกแล้วมาใส่ในกระบอกไม้ไผ่ หรือกะเทาะเปลือกเมล็ดออกเหลือแต่เนื้อในที่มีสีขาว แล้วใช้ไม้ไผ่ที่เหลาเล็กๆเสียบให้ติดกัน ยาวประมาณ 1 คืบ ใช้จุดให้แสงสว่างแทนเทียนไข (นาค, 2548; อนุวัฒน์และคณะ, 2550) และในอดีตชาวบ้านในชนบทจะปลูกสบู่ดำเป็นรั้วธรรมชาติเพื่อป้องกันสัตว์เลี้ยงตามบ้านเรือนและแปลงปลูกพืช ไม่ให้เข้ามาทำลายพืชผลในแปลง เนื่องจากสบู่ดำมีการเจริญเติบโตรวดเร็ว ปลูกง่าย และทนต่อความแห้งแล้ง ทำให้สามารถปลูกสบู่ดำได้เกือบทุกสภาพพื้นที่ของประเทศไทย สบู่ดำจึงมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่นของแต่ละภาค ภาคกลางเรียก สบู่ดำ ภาคเหนือเรียก มะหุ่งฮั้ว ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียก มะเยา หรือ หมากเยา ชาวโคราชเรียก สีหลอด ภาคใต้เรียก หงเทศ (อนุวัฒน์และคณะ, 2550)

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษาความหลากหลายของสบู่ดำ

จเร (2527) ได้รวบรวมพันธุ์จากภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวม 41 พันธุ์ แยกความแตกต่างของพันธุ์จากลักษณะผลได้เป็น 3 กลุ่ม คือ 1.กลุ่มที่มีผลทรงกลม 2.กลุ่มที่มีผลทรงกลมหรือยาวกว่ากลุ่มแรกเล็กน้อยแต่มีเปลือกหนากว่า 3.กลุ่มที่มีผลทรงกลมแต่มีขนาดเล็กกว่า 2 กลุ่มแรก จากผลการวิจัยพบความแตกต่างทางพันธุกรรมในลักษณะทางการเกษตรและการให้ผลผลิตของสบู่ดำ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาศึกษาความแตกต่างของสบู่ดำในระดับดีเอ็นเอ 18 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมจากภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มสบู่ดำทางพันธุกรรมได้ 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่มีความแตกต่างไปจากกลุ่มอื่นมาก คือ สบู่ดำที่รวบรวมจาก จ.เชียงใหม่ (สนธิชัยม 2548) เช่นเดียวกันกับการใช้วิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) จำนวน 37 ไพรเมอร์ พบว่ามี 8 ไพรเมอร์ที่เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในตัวอย่างสบู่ดำ 34 ตัวอย่างจาก 4 ประเทศ คือ จีน อินเดีย เวียดนามและไทย ทั้งจากต้นที่ปลูกจากเมล็ดและท่อนพันธุ์ โดยจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบความแตกต่างมีจำนวน 1-4 อัลลีล/ไพรเมอร์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ 1.75 และเมื่อแบ่งกลุ่มพันธุ์โดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient 0.45 สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มไทยกับอินเดีย และกลุ่มจีนกับเวียดนาม ผลจากการจัดกลุ่มดังกล่าวได้ค่า cophenetic correlation (r) 0.92 แสดงว่าจัดกลุ่มได้ในเกณฑ์ดี ผลจากการศึกษาครั้งนี้ สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการวางแผนคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุง พันธุ์สบู่ดำในอนาคต (พัชรินทร์, 2551)

มลิวรรณ (2552) ได้ใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบความหลากหลายของสบู่ดำในประเทศไทย จำนวน 46 สายพันธุ์ โดยรวบรวมจากศูนย์วิจัยพืชไร่นครราชสีมา พบว่ามี 12 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน 20% จำนวน 64 แถบ มีขนาด 250-2,500 คู่เบส มีดัชนีความเหมือน (similarity index) อยู่ระหว่าง 0.5706-0.9881 โดยเมื่อแสดงผลในรูปของ dendrogram พบว่าสามารถแบ่งสบู่ดำออกเป็น 3 กลุ่ม และเมื่อวิเคราะห์ผลโดนใช้โปรแกรม PAUP* version 4.0b10 แสดงผลในรูป phylogram พบว่าในบางตัวอย่างมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน แต่โดยรวมแล้วยังไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสบู่ทุกตัวอย่างได้ นอกจากนี้การยังมีรายงานการศึกษาความหลากหลายของสบู่ดำจำนวน 224 สายพันธุ์ ซึ่งมาจากจีน 219 พันธ์ และมาจากพม่า 5 พันธ์ โดยใช้เทคนิค Inter-simple sequence repeat (ISSR markers) จาก 15 ไพรเมอร์ให้ดีเอ็นเอ 169 แถบ แต่มี 127 แถบ (75.15%) ที่มี polymorphic ดังนั้นสบู่ดำในประเทศจีนจึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยมีค่า Nei's gene diversity (*He*) อยู่ที่ 0.19 และ Shanmon Information Index (*I*) อยู่ที่ 0.292 ทั้งนี้ dendrogram จากค่า Nei's gene diversity ทำให้สามารถแยกสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สายพันธ์ที่อยู่บนแผ่นดินใหญ่ออก กับ สายพันธ์อยู่บนเกาะ Hainan และจังหวัดที่อยู่ติดกับจังหวัด Guangdong การศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถแยกสายพันธ์ได้ 46 สายพันธ์ ซึ่งคิดเป็น 20.54% จาก 224 สายพันธ์ (Cai, 2010)

การใช้เทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) เพื่อศึกษาความหลากหลายของสบู่ดำจำนวน 63 สายพันธ์ จาก 10 ประเทศในเอเชีย แอฟริกาและแมกซิโกที่นำมาปลูกในประเทศจีนและเวียดนาม โดยใช้ 4 ไพรเมอร์ และได้ดีเอ็นเอ 89 แถบโดยสามารถแบ่งสบู่ดำออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มสบู่ดำจากประเทศอินเดีย , กลุ่มสบู่ดำจากประเทศจีน , กลุ่มสบู่ดำจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแอฟริกา และกลุ่มสบู่ดำจากแมกซิกัน ซึ่งกลุ่มสุดท้ายนี้แยกออกจากกลุ่มอื่นๆอย่างชัดเจน ซึ่งบ่งบอกว่าสบู่ดำในเอเชียอาจไม่ได้มาจากแถบแมกซิโก (Shen, 2012) ในขณะที Mulpuri (2013) ได้ทำการศึกษาความหลายหลากของสบู่ดำจำนวน 48 สายพันธุ์ที่มาจากประเทศต่างๆโดยใช้เทคนิค start codon targeted (ScoT) จำนวน 36 ไพรเมอร์ เทคนิคนี้ทำให้เห็นถึง polymorphism ที่สูง โดยไพรเมอร์ถึง 74% สามารถแยกความแตกต่างได้ ทั้งนี้การศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถแยกกลุ่ม toxic และ non-toxic ออกเป็น 2 กลุ่ม และกลุ่มที่ 3 คือสบู่ดำที่มาจาก Mexico

<u>ยีน Acetyl-CoA carboxylase (ACCase)</u>

Acetyl-CoA carboxylase เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันในเมล็ดและใบของพืช ในพืชจะพบเอนไซม์นี้อยู่สองรูปแบบ คือ homodimeric พบที่ไซโตพลาสซึมส่วนแบบ heterodimeric พบที่พลาสติด (Konishi and Sasaki, 1994) การศึกษาการแสดงออกของยีน ACCase ใน Arabidosis พบว่ายีนนี้จะมีการแสดงออกในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีการสังเคราะห์กรดไขมันซึ่งจำเป็นต่อการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์หรือสำหรับการเก็บสะสมน้ำมันเพื่อการพัฒนาเอ็มบริโอ (Ke *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีนชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับการเก็บสะสมน้ำมันในพืชที่มีเมล็ดผลิตน้ำมัน (Turnham *et al.*, 1983)

ยีน ACCase ยังใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในพืชหลายชนิด ส่วนใหญ่แล้วมักจะใช้ศึกษาในพืชพวก polyploidy เช่น พืชในสกุล *Hordeum* 22 ชนิดซึ่งมีทั้งที่เป็น diploid และ polyploidy จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับดีเอ็นที่เป็นส่วน intron และ exon ของยีน ACCase โดยใช้วิธี Maximum parsimony Maximum likelihood และ Bayesian interference พบว่าสามารถแยกกลุ่ม diploid ออกจาก polyploid และพบว่าชนิดที่เป็น diploid 8 ชนิดจากอเมริกามีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่แตกต่างไปจากการศึกษาที่ผ่านมา (Naghavi *et al.*, 2013) เช่นเดียวกันกับในพืชในสกุล Hystrix และ leymus เป็นพวก polyploid ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากส่วนของ exon intron intron รวมกับ synonymous sites และ T-rich element (TGRT) พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของพืชที่อยู่ในสกุลทั้งสองออกจากกันได้ (Fan *et al.*, 2007) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของพืชในกลุ่ม Pooideae 50 ชนิด โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์ คือยีน matK และ intron ของยีน matk ส่วนของนิวเคลียสดีเอ็นเอใช้ยีน Topoisomerase 6(Topo6) Acetyl-CoA carboxylase (ACCase) และ phytochrome B (Phy B) และสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum parsimony Maximum likelihood และ Bayesian interference ผลของ phylogenetic tree จากทุกข้อมูลแสดงให้เห็นว่า Brachyelytrum และ Nardeae มีวิวัฒนาการที่เก่าแก่ที่สุด Hordeeae Aveneae และ Poeae จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ในขณะที่ Brachypodieae จัดเป็นกลุ่มวงศ์วานเดี่ยว (monophyletic group) เช่นเดียวกันกับ Meliceae และ Stipeae จัดเป็นกลุ่มวงศ์วานเดี่ยวเช่นกัน ส่วน Diarrheneae และ Duthieeae ไม่จัดเป็นกลุ่มวงศ์วานเดี่ยวในเครื่องหมายดีเอ็นเอบางชนิดที่ใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Hochbach *et al.*, 2015)

นอกจากนี้ยีน ACCase ได้นำมาในการศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ระดับประชากรของ *Panicum virgatum* 6 สายพันธุ์พบ 4 ตำแหน่งที่มีลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่างกันบริเวณ exon และบริเวณ intron พบ 18 ตำแหน่งที่มีลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่างและ 4 indel (insertion หรือ deletion) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า *Panicum virgatum* ทีเป็น tetraploid มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับ octaploid และการเกิด polyploidy ของพืชกลุ่มนี้เกิดขึ้นมาไม่น้อยกว่า 2 ล้านปีมาแล้ว (Huang *et al.*, 2003) ซึงลำดับดีเอ็นเอของยีน ACCase ยังนำมาศึกษาความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) ในพืชกลุ่ม Triticeae และหาความสัมพันธ์ของพืชยืนต้นและพืชล้มลุกในพืชกลุ่มนี้ พบว่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์สูงสุดพบในกลุ่ม Ns จีโนม ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ของ D และ Ns จีโนมของ polyploidy มีค่าสูงกว่า diploid ในขณะที่ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ของ St จีโนมของ polyploidy มีค่าที่ต่ำกว่า diploid ค่าเฉลี่ยความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ของพืชยืนต้นสูงกว่าพืชล้มลุกมากกว่าสองเท่า นอกจากนี้ค่าเฉลี่ยความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ของชนิดที่ผสมข้ามสูงกว่าสองเท่าเมื่อเทียบกับชนิดที่ผสมกันเอง ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าวิวัฒนาการและรูปแบบของการผสมพันธุ์อาจจะมีความสำคัญในการกำหนดความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละจีโนม (Wu *et al.*, 2014)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1 พืชตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บใบอ่อนของสบู่ดำสายพันธุ์ต่างๆจากศูนย์วิจันพืชไร่นครราชสีมา อำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งเป็นแหล่งรวบรวมสายพันธุ์สบู่ดำจากทั่วประเทศไทย จำนวน 8 สายพันธุ์ และตัวอย่างที่เป็น non-toxic เก็บจากแปลงเกษตร มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก ส่วนตัวอย่างที่เป็นชนิดอื่นๆ ในสกุล *Jatropha* ได้รวบรวมจากจังหวัดต่างๆดังตารางที่ 1

2 การสกัดดีเอ็นเอ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงมาจาก Doyle และ Doyle (1990)

ชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัมบดให้ละเอียดเป็นผงโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ย้ายตัวอย่างที่บดละเอียดลงใน extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris HCl pH8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl) 0.5 มิลลิลิตรที่เติม β-mercaptoethanol 2 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ย้ายหลอดทดลองมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วเติม chloroform : isoamylaalcohol (24 : 1) 0.5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวียงที 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม absolute ethanol 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปเก็บที่ -20องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย ethanol 70% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 5 นาที ที่ ดูดส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนให้แห้งประมาณ 15 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม RNase A 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วเติม sodium acetate 3 M ปริมาตร 10 µl และ absolute ethanol จำนวน 100 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย ethanol 70% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนให้แห้งประมาณ 15 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟรโตมิเตอร์

3. การออกแบบไพรเมอร์บริเวณ Intron ของยีน A

สืบค้นข้อมูลลำดับเอ็มอาร์ของยีน acetyl-CoA carboxylase (ACCase) จากพืชในสกุล *Jatropha* และลำดับดีเอ็นเอของยีน acetyl-CoA carboxylase (ACCase) ในฐานข้อมูล หลังจากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอมาเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม ClustalX เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ และสังเคราะห์ไพรเมอร์

ตารางที่ 1 รายชื่อตัวอย่างพืชในสกุล *Jatropha* ที่ใช้ในการศึกษา

No.	Specimens	Source	ชื่อเรียก หรือ สายพันธุ์
1.	*Jatropha curcas* L. (1)*	บ้านธิ, ลำพูน	สบู่ดำ
2.	*Jatropha curcas* L. (2)*	ดอยสะเก็ด, เชียงใหม่	สบู่ดำ
3.	*Jatropha curcas* L. (3)*	ลำปาง	สบู่ดำ
4.	*Jatropha curcas* L. (4)*	เลย	สบู่ดำ
5.	*Jatropha curcas* L. (5)*	ดอยหล่อ, ลำพูน	สบู่ดำ
6.	*Jatropha curcas* L. (6)*	ตากฟ้า, นครสรรค์	สบู่ดำ
7.	*Jatropha curcas* L. (7)*	มุกดาหาร	สบู่ดำ
8.	*Jatropha curcas* L. (non toxic 6)	เม็กซิโก	สบู่ดำ
9.	*Jatropha curcas* L. (non toxic 5)	เม็กซิโก	สบู่ดำ
10.	*Jatropha gossypifolia* L. (1)	พิจิตร	สบู่แดง
11.	*Jatropha gossypifolia* L. (2)	เพชรบุรี	สบู่แดง
12.	*Jatropha multifida* L. (1)	เลย	มะละกอฝรั่ง
13.	*Jatropha multifida* L. (2)	เลย	มะละกอฝรั่ง
14.	*Jatropha podagrica* Hook.	ประจวบคีรีขันธ์	หนุมานนั่งแท่น
15.	*Jatropha integerrima* Jacq.(1)	ประจวบคีรีขันธ์	ปัตตาเวีย
16	*Jatropha integerrima* Jacq.(2)	เชียงใหม่	ปัตตาเวีย

4 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ intron

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนบริเวณ intron ในส่วนผสมสำหรับ PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร primer forward 1 ไมโครลิตร และ primer reverse 1 ไมโครลิตร dNTP 1 ไมโครลิตร Expand High Fidelity enzyme 0.75 ไมโครลิตร Expand High Fidelity buffer 5 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 36.25 ไมโครลิตร ขั้นตอนในการทำ PCR กำหนดโปรแกรมดังต่อไปนี้ ขั้นตอนที่ 1 predenature ที 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 denature ที 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 3 annealing ที 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 4 extension ที 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย final extension ที 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบสอบขนาดด้วย gel electrophoresis หลังจากที่ได้ขนาดของ PCR product ตามที่ต้องการแล้ว ทำให้ดีเอ็นเอที่ต้องการบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสำเร็จรูปของ Thermo scientific ซึ่งขั้นตอนนี้ สามารถทำได้ 2 วิธีที่แตกต่างกันเล็กน้อย คือ ในกรณีที่ PCR product มีแถบที่ต้องการเพียงแถบเดียวก็ไม่ต้องทำการตัดเจล แต่หาก PCR product ที่ได้มีชิ้นส่วนดีเอ็นเออื่นๆปนมาด้วย ก็จะต้องทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตัดเจล

5 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

การหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) โดยเครื่องอัตโนมัติของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มารวมกัน (sequence assembly) โดยโปรแกรม DNA baser หลังจากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้แต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบกัน (Alignment) โดยใช้โปรแกรม clustalW และนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากการ alignment มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยสร้างเป็น phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Mega 6 โดยใช้วิธี Maximum likelihood และวิเคราะห์ทั้งหมด 1,000 รอบ

6 การสกัดอาร์เอ็นเอ

โดยใช้ชุดสกัด RNeasy Plant mini kit บริษัท Qiagen

1. ชั่งเมล็ด ตัวอย่างละ 100 มิลลิกรัม บดให้ละเอียดด้วย ไนโตรเจนเหลว ย้ายตัวอย่างใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ แล้วเติมบัฟเฟอร์ Plant RNA Lysis ปริมาตร 500 ไมโครลิตรที่เติม β-mercaptoethanol 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาทีและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ เติม absolute ethanol 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. ดูดสารละลายที่ได้ลงในคอลัมน์ที่มี collection tube และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งสารละลายที่ได้
4. เติมบัฟเฟอร์ WB1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ได้
5. เติมบัฟเฟอร์ WB2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ได้ นำคอลัมน์มาใส่ในหลอดใหม่และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
7. นำคอลัมน์มาใส่ในหลอดใหม่เติมน้ำกลั่นที่ปราศจาก Rnase ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลาย RNA ที่ได้ในตู้ -20 องศาเซลเซียส

8. ตรวจสอบความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟรโตมิเตอร์ และ gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1% และย้อมด้วย ethidium bromide

7 การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอคู่สม (cDNA)

การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) จากอาร์เอ็นเอโดยใช้ ReverTra Ace -α- ® โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ผสมสารละลายต่างๆดังตารางที่ 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส 5 นาที และเก็บ cDNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่อไป

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA

สารละลาย	ปริมาตร
อาร์เอ็นเอแม่แบบ	5 ไมโครลิตร
5X RT buffer	4 ไมโครลิตร
10 mM dNTP mixture	2 ไมโครลิตร
RNase inhibitor (10 U/μl)	1 ไมโครลิตร
Primer	1 ไมโครลิตร
H_2O (RNase free)	6 ไมโครลิตร
ReverTra Ace®	1 ไมโครลิตร

2. การตรวจสอบผลการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ eEF1A (Eukaryote Elongation factor 1-alpha) ตรวจสอบผลการสังเคราะห์ cDNA ถ้าสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนนี้ได้ แสดงว่าการสังเคราะห์ cDNA ประสบความสำเร็จ ในส่วนผสมสำหรับ PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆดังนี้ 1X PCR buffer $MgCl_2$ 2.5 mM dNTP 0.2 mM primer 0.4 μM *Taq* DNA polymerase 1 Unit และ cDNA template กำหนดโปรแกรมดังต่อไปนี้ ขั้นตอนที่ 1 predenature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 denature ที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 3 annealing ที่ Tm-5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 4 extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบขนาด ดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 1% ย้อมเจลด้วย ethidium bromide

8 การสังเคราะห์ยีนทางด้านปลาย 3'

การสังเคราะห์ยีนทางด้านปลาย 3' ด้วยเทคนิค PCR ในส่วนผสมสำหรับ PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆดังนี้ 1X PCR buffer $MgCl_2$ 2.5 mM dNTP 0.2 mM primer 0.4 μM (AG Fและ p18C1) *Taq* DNA polymerase 1 Unit และ cDNA template กำหนดโปรแกรมดังต่อไปนี้ ขั้นตอนที่ 1 predenature ที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที ขั้นตอนที่ 2 denature ที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่ 3 annealing ที่ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้นตอนที่ 4

extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 1% ย้อมเจลด้วย ethidium bromide

9 การหาลำดับดีเอ็นเอของยีน ACCase

การเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีน ACCase ทางด้านปลาย 3'

นำดีเอ็นที่ทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T vector (promega) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้ สารละลายดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร 2X ligation buffer 5 ไมโครลิตร pGEM-T vector 1 ไมโครลิตร T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน

การเตรียมเซลล์คอมพลีเทนต์ (Completent cell)

ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook *et al.* (1989) โดยนำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โคโลนีเดียวจากการเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LB (ภาคผนวกที่ 1) ลงในอาหารเหลวสูตร LB (ภาคผนวกที่ 2) 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ข้ามคืน หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ 1 ml มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง ย้ายสารละลายที่ได้มาใส่ในหลอด 50 มิลลิลิตร นำไปแช่ในถังน้ำแข็งนาน 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วเติม 0.1 M $CaCl_2$ ที่แช่เย็นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆจนไม่มีตะกอนของเซลล์เหลืออยู่ที่ก้นหลอด แล้วแช่น้ำแข็งนาน 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้งแล้วเติม 0.1 M $CaCl_2$ ที่แช่เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ขย่าเบาๆจนไม่มีตะกอนของเซลล์เหลือ แบ่งสารละลายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์คอมพลีเทนต์ (transformation)

เติมดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับเวคเตอร์จากข้อ 6.1 ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีคอมพลีเทนต์ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและแช่ลงในถังน้ำแข็งทันทีนาน 30 นาที หลังจากย้ายลงไปจุ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที ลงในถังน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที แล้วจึงเติมอาหาร SOC (ภาคผนวกที่ 3) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อ่างน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายแบคทีเรียมาเกลี่ยให้ทั่วในอาหารแข็งสูตร LB ที่มี amplicilin 50 µg/ml X-gal 40 µg/ml และ IPTG 4 µg/ml นำไปบ่มไว้ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้นส่วนของยีนแทรกอยู่ในพลาสมิด

การสกัดพลาสมิด

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่ได้รับการ transformation ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เติม amplicilin 50 µg/ml นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาสกัดพลาสมิด โดยดูดสารละลายแบคทีเรียใส่ลงในหลอด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส ทิ้งสารละลายส่วนบน ละลายตะกอนด้วย solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) ที่เย็นจัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้ตะกอนละลายหมด แล้วเติม solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมจนลารละลายที่ได้ใส แล้วเติม solution III ที่เย็นจัดปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในถังน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ แล้วเติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) 1 เท่าของปริมาตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ เติม ethanol 100% ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ในตู้ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ตากตะกอนให้แห้ง และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบสอบขนาดด้วย gel electrophoresis และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัด Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (promega) โดยดูดสารละลายแบคทีเรียใส่ลงในหลอด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งสารละลายส่วนบน เติมสารละลาย Cell Resuspension ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตผสมให้เข้ากันจนเซลล์ละลาย เติม Cell Lysis Solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด เติม Alkaline Protease Solution ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และเติม Neutralization Solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายที่ได้มาใส่ในหลอด spin column ที่ใส่ในหลอด collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายในหลอด collection tube ทิ้ง เติม Wash solution ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายในหลอด collection tube ทิ้ง เติม Wash solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายในหลอด collection tube ทิ้ง นำ spin column ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที แล้วย้าย spin column มาใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์อันใหม่ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที เก็บสารละลายพลาสมิดที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

10 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

การหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) โดยเครื่องอัตโนมัติของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มารวมกัน (sequence assembly) โดยโปรแกรม DNA baser หลังจากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้แต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบกัน (Alignment) โดยใช้โปรแกรม clustalW

ผลการทดลอง

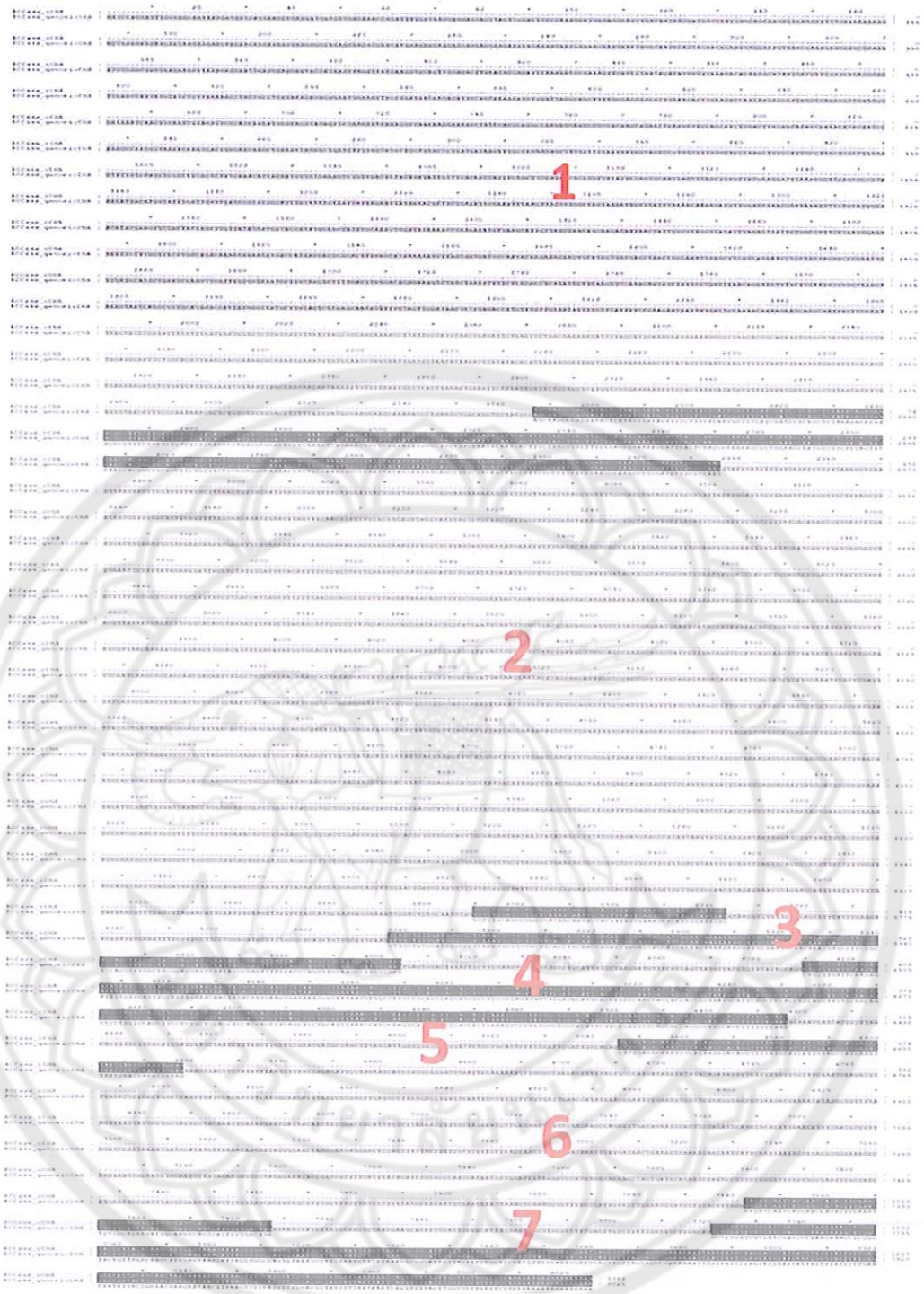
การออกแบบไพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณบริเวณ Intron ของยีน ACCase

ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ intron ของยีน ACCase ออกแบบโดยการเปรียบเทียบยีน ACCase จาก genomic DNA และ cDNA (รูปที่ 1) พบบริเวณ intron 7 บริเวณ และออกแบบไพรเมอร์ 3 ชนิดคือ ไพรเมอร์ BCCP1F และ BCCP1R อยู่บริเวณ intron ที่ 2 (รูปที่ 2) ไพรเมอร์ In2F และ In2R อยู่ระหว่างบริเวณที่ 3-5 (รูปที่ 3) ส่วนไพรเมอร์ InF1 และ BCCPF1R บริเวณที่ 6 (รูปที่ 4) ลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 1

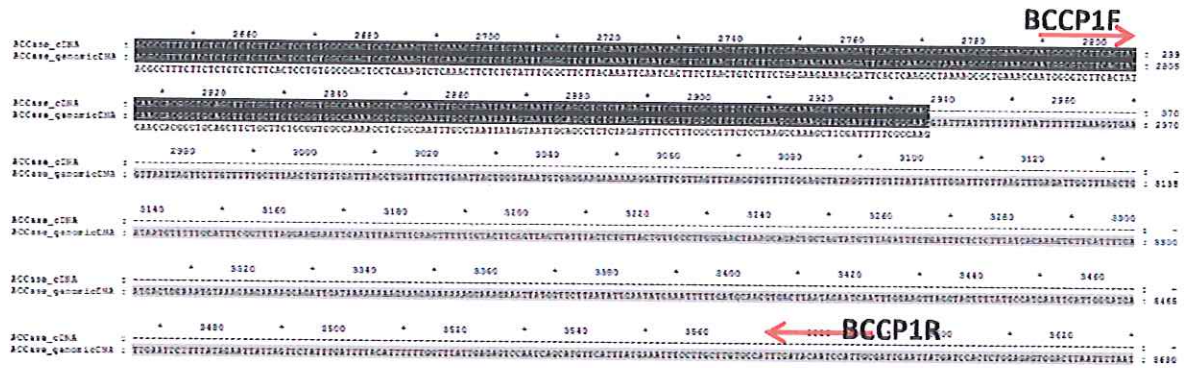
ตารางที่ 1 แสดงลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ intron ของยีน ACCase

Name	Sequence
BCCP1F	ATG GCG TCT TCA CTA TCA ACC
BCCP1R	GCT CGA TCA CGA ACA GAG G
In2F	TAA CAA TTC CAC TTT AGT GAA AGC
In2R	GTC CCT TCT GCA CTT TGT CT
In1F	ATG CAT CAT TGA AGC CAT GAA ATT
BCCPF1R	TCG CAA TGG ATT GTA TCA AAT GG

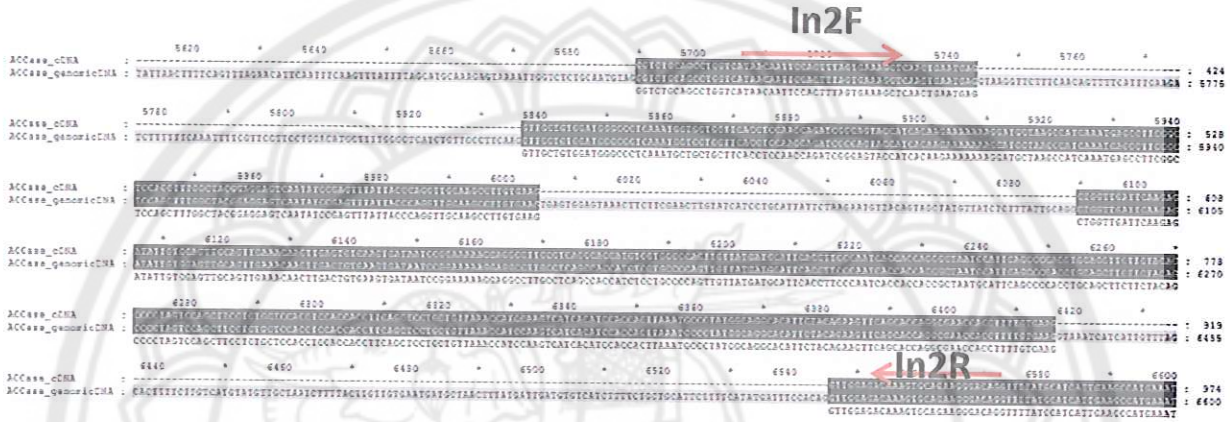
นำไพรเมอร์ทั้งสามคู่นี้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ intron ของพืชในสกุล *Jatropha* 5 ชนิด คือ *Jatropha curcas* 9 สายพันธุ์ *Jatropha gossypifolia* 2 สายพันธุ์ *Jatropha multifida* 2 สายพันธุ์ *Jatropha integerrima* 2 สายพันธุ์ และ *Jatropha podagrica* 1 สายพันธุ์ ไพรเมอร์คู่ที่ 1 คือ BCCP1F และ BCCP1R นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณมาหาลำดับดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 689-800 คู่เบส ดีเอ็นเอของปัตตาเวียจะมีขนาดสั้นที่สุด ส่วนดีเอ็นเอของมะละกอฝรั่งมีขนาดยาวที่สุด พบว่า intron ในบริเวณนี้มีความแปรปรวนสูงมากระหว่างชนิดของพืชในสกุล *Jatropha* ส่วนไพรเมอร์คู่ที่ 2 คือ In2F และ In2R ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 802-808 คู่เบสและจากการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของพืช 16 ตัวอย่าง พบว่าลำดับดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันน้อยกว่าไพรเมอร์ชนิดอื่น เนื่องมาจากลำดับดีเอ็นเอบริเวณนี้จะอยู่ระหว่างส่วนของ exon ทำให้มีความเหมือนกันมากกว่าบริเวณอื่น ไพรเมอร์คู่ที่ 3 คือ In1F และ BCCPF1R ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 987-1117 คู่เบส ดีเอ็นเอของสบู่แดงจะมีขนาดยาวที่สุด และดีเอ็นเอของสบู่ดำมีขนาดสั้นที่สุด ซึ่งไพรเมอร์คู่ที่สามนี้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นได้ในทุกตัวอย่างของพืชในสกุล *Jatropha* เนื่องจากไพรเมอร์ออกแบบในบริเวณ exon ซึ่งเป็นส่วนของยีน ACCase จากสบู่ดำ อาจจะทำให้ไพรเมอร์นี้จับกับพืชชนิดอื่นในสกุลนี้ได้ไม่ดี ทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่ได้ และเมื่อนำดีเอ็นเอของพืชชนิดอื่นที่ไม่ใช่สบู่ดำไปหาลำดับดีเอ็นเอได้ผลไม่ดี แสดงให้เห็นว่าบริเวณที่ไพรเมอร์นี้จับเป็นบริเวณที่มีลำดับดีเอ็นเออนุรักษ์เฉพาะในสบู่ดำ (conserve region)



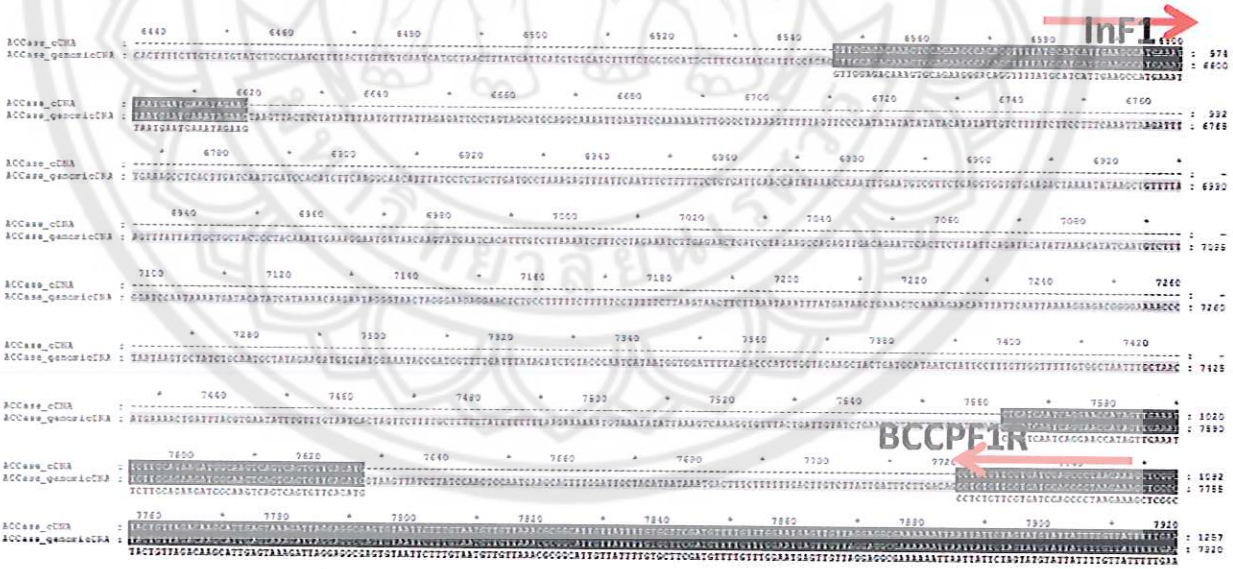
<u>รูปที่ 1</u> การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอระหว่างยีน ACCase จาก genomic DNA และ cDNA หมายเลข 1-7 แสดงตำแหน่งของ intron



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ BCCP1F และ BCCP1



รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ In2F และ In1R



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ In1F และ BCCPF1R

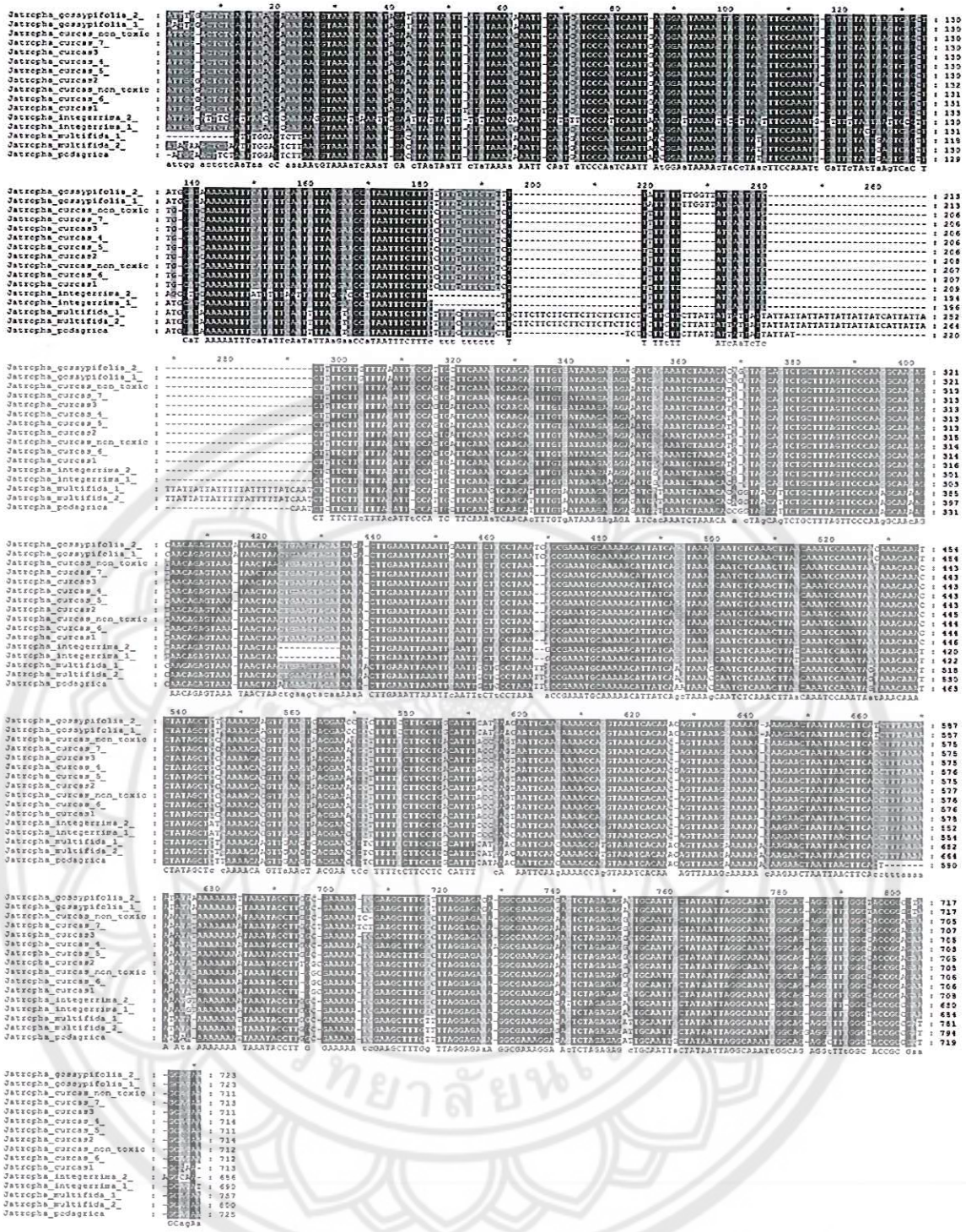
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

หลังจากส่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปหาลำดับดีเอ็นเอ โดยบริษัท Macrogen Inc. ของประเทศเกาหลีใต้แล้ว นำชิ้นส่วนของ DNA ในส่วน Forward และ Reverse มาทำการ assembly ด้วยโปรแกรม DNA baser ซึ่งจะได้ลำดับ consensus DNA จากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ มาทำการเปรียบเทียบ โดยใช้โปรแกรม Crustal X (Thompson *et al.*, 1997) แล้วตัดแต่งลำดับดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม Gendoc (Nicholas *et al.*, 1997) โดยตัดส่วนต้น และส่วนปลายของลำดับดีเอ็นออก เนื่องจากเป็นบริเวณที่อาจเกิดความผิดพลาดในการหาลำดับดีเอ็นเอ และอาจเป็นชิ้นส่วนของยีนบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

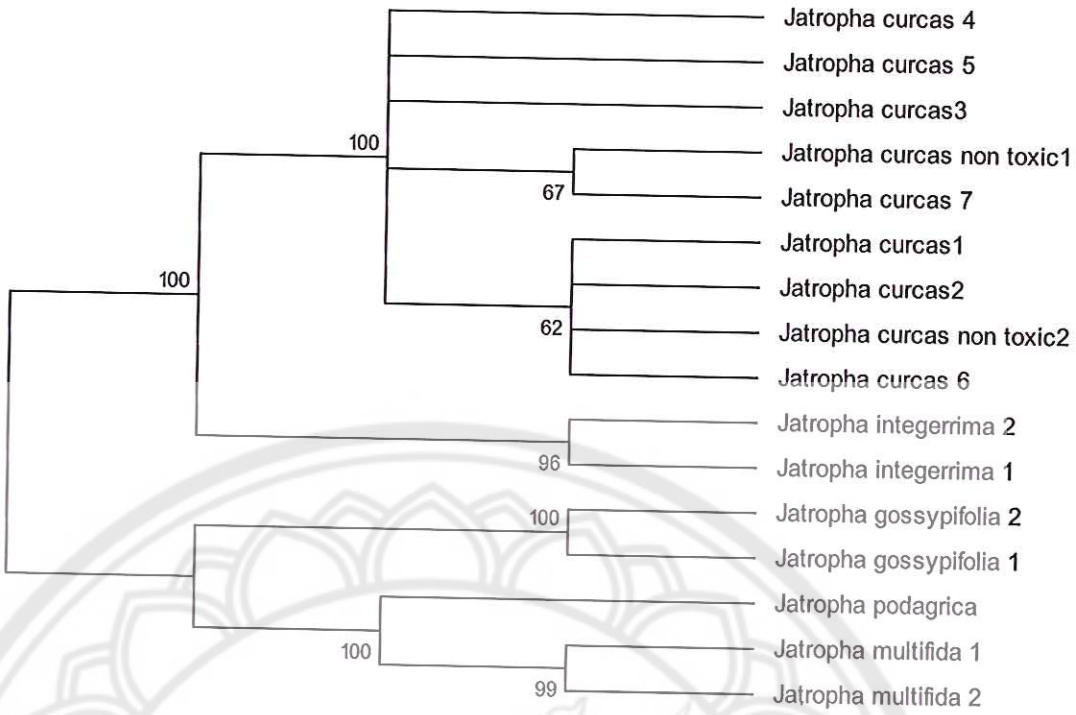
บริเวณระหว่างไพรเมอร์ BCCP1F และ BCCP1R

ความยาวของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณระหว่างไพรเมอร์ BCCP1F และ BCCP1R ขนาด 689-800 คู่เบส เมื่อนำมาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับดีเอ็นเอ (alignment) มีขนาด 811 คู่เบส (รูปที่ 5) โดยตำแหน่งดีเอ็นเอที่มีการอนุรักษ์ (conserve site) เท่ากับ 638 คู่เบส คิดเป็น 78.68% ส่วนบริเวณที่มีความแปรปรวน (variable site) มีทั้งสิ้น 165 คู่เบส คิดเป็น 20.34% ในขณะที่ลำดับดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ หรือ phylogenetically informative site มีขนาดเท่ากับ 111 คู่เบส คิดเป็น 13.68% บริเวณจะมีความแปรปรวนสูงระหว่างชนิดของพืชในสกุล*Jatropha* และลำดับดีเอ็นเอที่พบเฉพาะตัวอย่าง (singleton) เท่ากับ 56 คู่เบส ซึ่งคิดเป็น 6.90% ยังพบว่าลำดับดีเอ็นเอของมะละกอฝรั่งจะมีการเพิ่มของเบส (insertion) 2 บริเวณมีขนาด 22 คู่เบสและ 33 คู่เบสซึ่งมีความแตกต่างจากพืชชนิดอื่นในสกุล *Jatropha*

จากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละบริเวณของตัวอย่างต่างๆ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA 6 โดยการสร้าง phylogenetic tree เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum likelihood ดังรูปที่ 6 ทำการตรวจสอบค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 ซ้ำ จาก phylogenetic tree สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย สบู่ดำและปัตตาเวีย กลุ่มที่สองคือมะละกอฝรั่ง สบู่แดงและหนุมานนั่งแท่น ในกลุ่มแรกสบู่ดำสามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกสบู่ดำหมายเลข 1, 2, 6 และ non-toxic 2 ที่ค่าความเชื่อมั่น 62% ส่วนกลุ่มที่สอง สบู่ดำหมายเลข 7 และ non-toxic 1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันด้วยค่าความเชื่อมั่น 67 เช่นเดียวกันกับ มะละกอฝรั่งและหนุมานนั่งแท่นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากด้วยค่าความเชื่อมั่น 100%



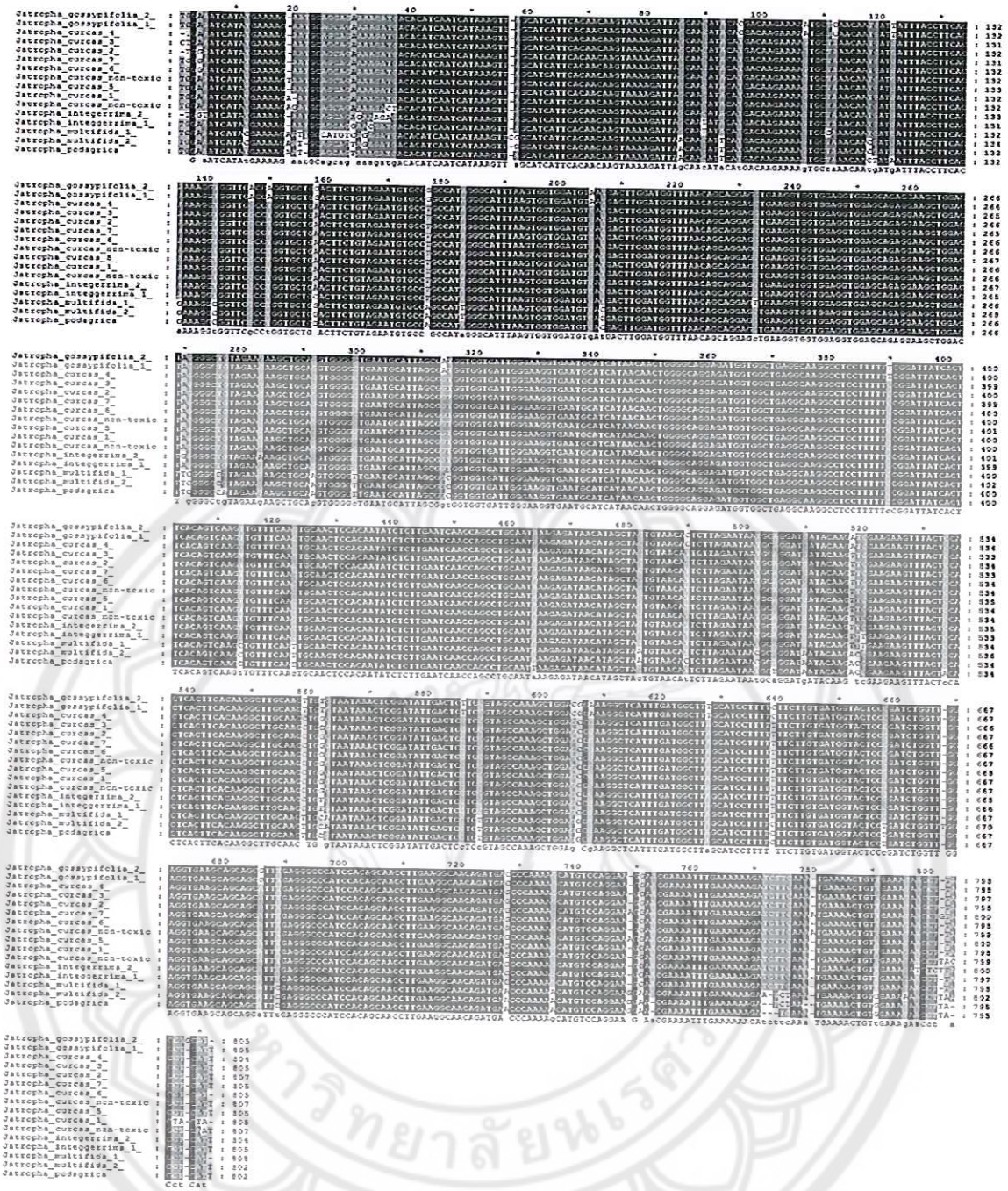
<u>รูปที่ 5</u> แสดงการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอบริเวณระหว่างไพรเมอร์ BCCP1F และ BCCP1R



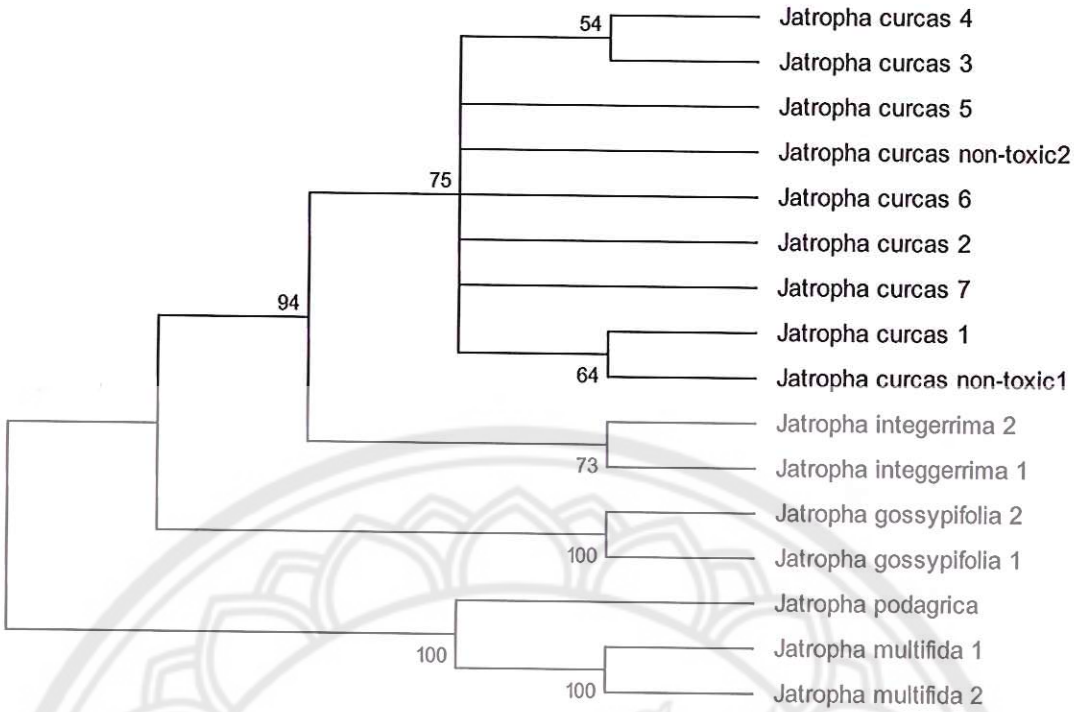
<u>รูปที่ 6</u> Maximum likelihood tree ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอระหว่างไพรเมอร์ BCCP1F และ BCCP1R ของพืชสกุล Jatropha ค่า bootstrap ที่ 1000 ซ้ำ

<u>บริเวณระหว่างไพรเมอร์ In2F และ In2R</u>

ความยาวของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณระหว่างไพรเมอร์ In2F และ In2R มีขนาด 802-808 คู่เบส เมื่อนำมาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับดีเอ็นเอ (alignment) มีขนาด 812 คู่เบส (รูปที่ 7) โดยตำแหน่งดีเอ็นเอที่มีการอนุรักษ์ (conserve site) เท่ากับ 716 คู่เบส คิดเป็น 88.17% ส่วนบริเวณที่มีความแปรปรวน (variable site) มีทั้งสิ้น 94 คู่เบส คิดเป็น 11.57% ในขณะที่ลำดับดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ หรือ phylogenetically informative site มีขนาดเท่ากับ 61 คู่เบส คิดเป็น 7.51% และลำดับดีเอ็นเอที่พบเฉพาะตัวอย่าง (singleton) เท่ากับ 33 คู่เบส ซึ่งคิดเป็น 4.06% จากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละบริเวณของตัวอย่างต่างๆ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA 6 โดยการสร้าง phylogenetic tree เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum likelihood ดังรูปที่ 8 ทำการตรวจสอบค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 ซ้ำ จาก phylogenetic tree สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย สบู่ดำ สบู่แดงและปัตตาเวีย กลุ่มที่สองคือมะละกอฝรั่งและหนุมานนั่งแท่น ในกลุ่มแรกสบู่ดำหมายเลข 4 และสบู่ดำหมายเลข 3 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันโดยมีค่า bootstrap 54% เช่นเดียวกันกับสบู่ดำหมายเลข 1 และสบู่ดำ non-toxic 1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันโดยมีค่า bootstrap 64% ส่วนในกลุ่มที่สองมะละกอฝรั่งและหนุมานนั่งแท่น จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยมีค่า bootstrap ที่สูง (100%)



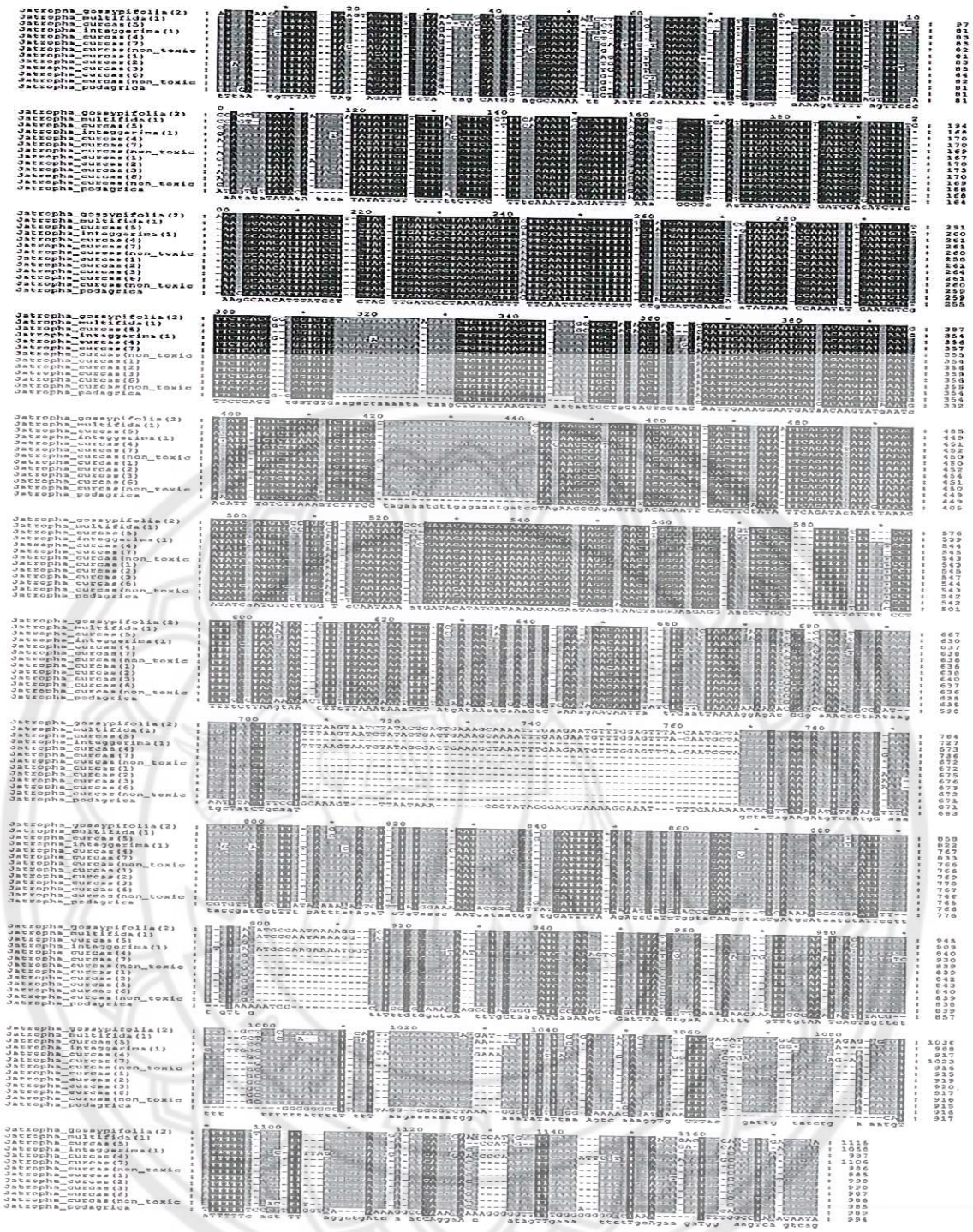
รูปที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอบริเวณระหว่างไพรเมอร์ In2F และ In2R



รูปที่ 8 Maximum likelihood tree ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอระหว่างไพรเมอร์ In2F และ In2R ของพืชสกุล Jatropha ค่า bootstrap ที่ 1000 ซ้ำ

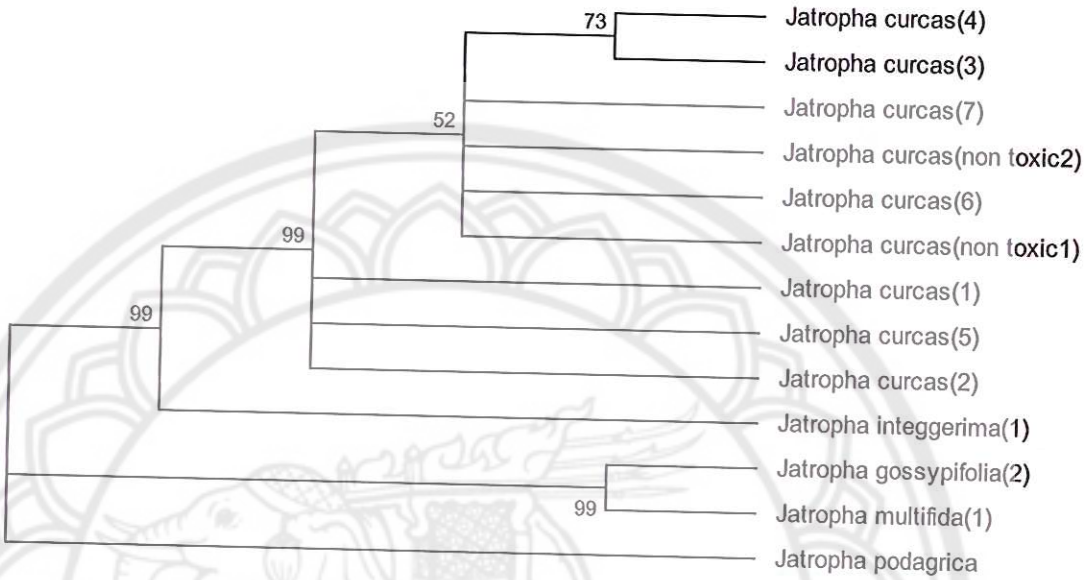
บริเวณระหว่างไพรเมอร์ In1F และ BCCPF1R

ความยาวของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณระหว่างไพรเมอร์ In1F และ BCCPF1R มีขนาด 985-1115 คู่เบส เมื่อนำมาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับดีเอ็นเอ (alignment) มีขนาด 1180 คู่เบส (รูปที่ 9) โดยตำแหน่งดีเอ็นเอที่มีการอนุรักษ์ (conserve site) เท่ากับ 698 คู่เบส คิดเป็น 59.15% ส่วนบริเวณที่มีความแปรปรวน (variable site) มีทั้งสิ้น 416 คู่เบส คิดเป็น 35.25% ในขณะที่ลำดับดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ หรือ phylogenetically informative site มีขนาดเท่ากับ 73 คู่เบส คิดเป็น 6.18% และลำดับดีเอ็นเอที่พบเฉพาะตัวอย่าง (singleton) เท่ากับ 331 คู่เบส ซึ่งคิดเป็น 28.05% จากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละบริเวณของตัวอย่างต่างๆ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA 6 โดยการสร้าง phylogenetic tree เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum likelihood ดังรูปที่ 10



รูปที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอบริเวณระหว่างไพรเมอร์ In1F และ BCCPF1R

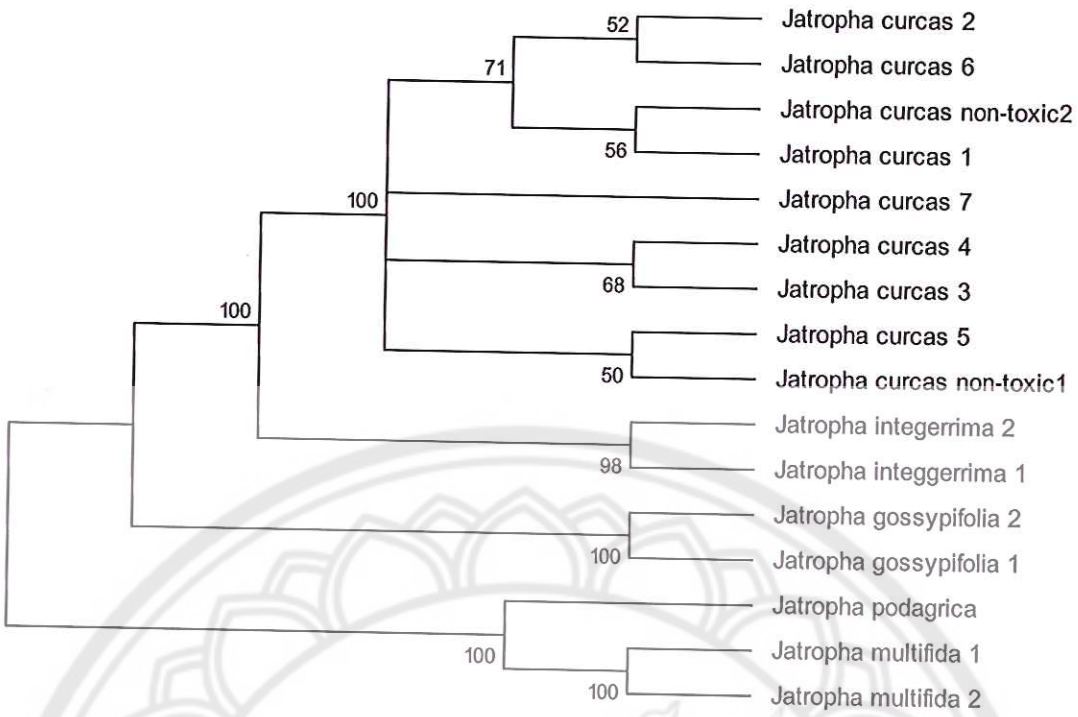
จาก phylogenetic tree สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย สบู่ดำและปัตตาเวีย กลุ่มที่สองคือมะละกอฝรั่งและสบู่แดง ส่วนหนุมานนั่งแท่นถูกแยกออกจากทั้งสองกลุ่ม ในกลุ่มแรก สบู่ดำหมายเลข 3 4 7 6 non-toxic 1 และ non-toxic 2 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยมีค่า bootstrap 52% ส่วนกลุ่มที่สองมะละกอฝรั่งและสบู่แดงมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากโดยมีค่า bootstrap 99% ซึ่งสอดคล้องกับลำดับดีเอ็นเอที่คล้ายกัน ผลของความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในรูปของ phylogenetic tree นี้มีความคล้ายคลึงกับผลของไพรเมอร์ BCCP1F และ BCCP1R (รูปที่ 6)



รูปที่ 10 Maximum likelihood tree ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอระหว่างไพรเมอร์ In1F และ BCCPF1R ของพืชสกุล Jatropha ค่า bootstrap ที่ 1000 ซ้ำ

บริเวณระหว่างไพรเมอร์ BCCP1F-BCCP1R และ In2F-In2R

นำลำดับดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองบริเวณนี้มารวมกันเพื่อสร้างเป็น phylogenetic tree ทำให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือ ส่วนลำดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณระหว่างไพรเมอร์ In1F และ BCCPF1R ไม่สามารถนำมารวมได้เพราะมีตัวอย่างบางชนิดไม่สามารถหาลำดับดีเอ็นเอได้ จาก phylogenetic tree (รูปที่ 11) สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย สบู่ดำ สบู่แดงและปัตตาเวีย สอดคล้องกับ phylogenetic tree ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้งสามชนิดแสดงให้เห็นว่าพืชทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกัน ซึ่งข้อมูลในงานวิจัยนี้ยังสอดคล้องกับการใช้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณ ITS (internal transcribed spacer) ระหว่างยีน rRNA พบว่าสบู่ดำและปัตตาเวียมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากกว่าพืชในสกุลอื่น (Pamidimarri et al., 2009) กลุ่มที่สองคือมะละกอฝรั่งและหนุมานนั่งแท่น ในกลุ่มแรก สบู่ดำสามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม กลุ่มย่อยกลุ่มแรกคือสบู่ดำหมายเลข 1 6 2 และสบู่ดำ non-toxic 2 ส่วนกลุ่มย่อย 2 ประกอบด้วยสบู่ดำหมายเลข 3 และ 4 มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันโดยมีค่า bootstrap 68% เช่นเดียวกันกับสบู่ดำหมายเลข 5 และ สบู่ดำ non-toxic 1 ซึ่งในกลุ่มนี้สบู่ดำสามารถจัดกลุ่มได้มากกว่า phylogenetic tree อื่นแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ข้อมูลคือลำดับดีเอ็นเอจากสองบริเวณรวมกันสามารถจัดกลุ่มของสบู่ดำได้ดีกว่า ส่วนกลุ่มที่สองมะละกอฝรั่งและหนุมานนั่งแท่นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันโดยมีค่า bootstrap สูง 100%



รูปที่ 11 Maximum likelihood tree ที่สร้างจากการรวมลำดับดีเอ็นเอบริเวณระหว่างไพรเมอร์ BCCP1F-BCCP1R และ In2F-In2R ของพืชสกุล *Jatropha* ค่า bootstrap ที่ 1000 ซ้ำ

การหาลำดับดีเอ็นเอทางด้านปลาย 3´ ของยีน ACCase

การสกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดของพืชในสกุล *Jatropha* 4 ชนิดคือ สบู่แดง ปัตตาเวีย มะละกอฝรั่ง และหนุมานนั่งแท่น พืชทั้งสีชนิดสามารถสกัดอาร์เอ็นเอได้แต่ได้ในปริมาณน้อยอาจเนื่องมาจากตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดเป็นเมล็ดซึ่งทำให้การบดไม่ละเอียดทำให้ปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้น้อย และเปลี่ยนอาร์เอ็นเอที่ได้เป็น cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ GACTGCTGACGAGACAGCATTTTTTTTTTTTTTTTT ไพรเมอร์นี้ออกแบบให้มีส่วนของลำดับดีเอ็นที่เพิ่มจากบริเวณปลาย 5´ เพื่อที่จะใช้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณนี้เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณนี้ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนปลาย 3´ ของยีน ACCase ด้วยไพรเมอร์ TCCAACCAGATCGGGAGTAC และ GACTGCTGACGAGACAGC พืชทั้งสี่ชนิดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ชนิดนี้ได้ และนำไปโคลนเพื่อหาลำดับดีเอ็นเอ พบว่าลำดับดีเอ็นเอของพืชทั้งสี่ชนิดมีแค่สองชนิดคือ มะละกอฝรั่งและสบู่แดง (รูปที่ 12) ความยาวของลำดับดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 752 คู่เบส และเมื่อนำลำดับดีเอ็นเอของสองชนิดนี้มาเปรียบเทียบกันพบว่ามีความเหมือน 100% (รูปที่ 13) และเมื่อนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับดีเอ็นเอในฐานข้อมูลพบว่ามีความเหมือนกับลำดับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของสบู่ดำในฐานข้อมูล (รูปที่ 14) ในขณะที่ปัตตาเวียและหนุมานนั่งแท่นลำดับดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีความเหมือนกับลำดับดีเอ็นเอของพืชใดเลยในฐานข้อมูล

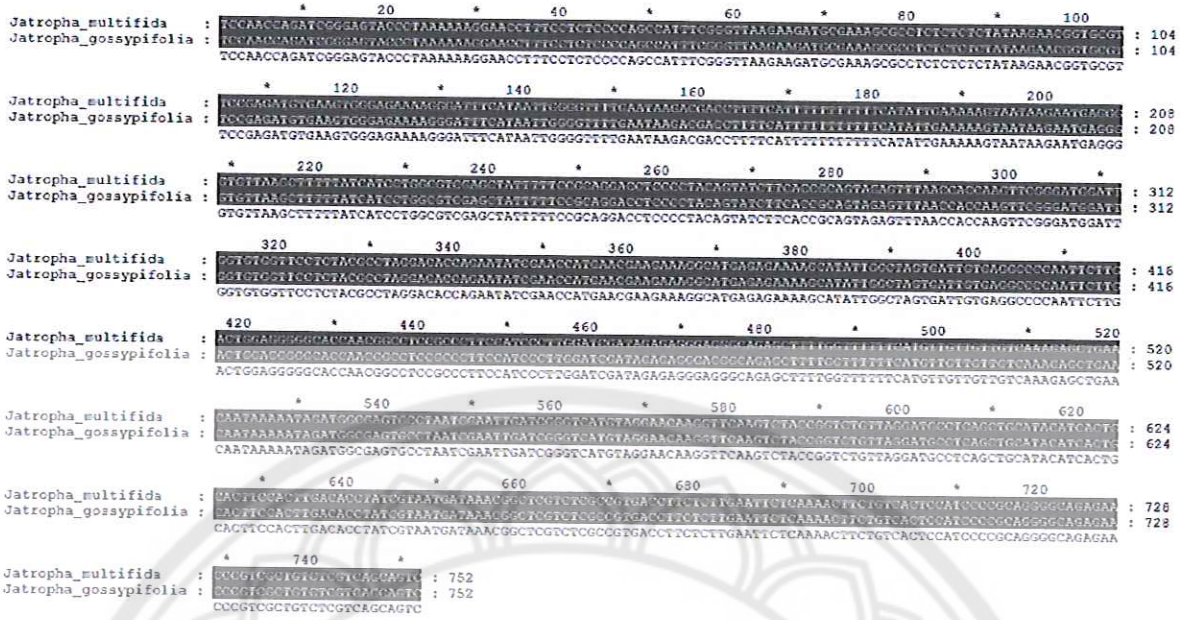
>Jatropha multifida

TCCAACCAGATCGGGAGTACCCTAAAAAAGGAACCTTTCCTCTCCCCAGCCATTTCGGGTTAAG
AAGATGCGAAAGCGCCTCTCTCTCTATAAGAACGGTGCGTTCCGAGATGTGAAGTGGGAGAAAA
GGGATTTCATAATTGGGGTTTTGAATAAGACGACCTTTTCATTTTTTTTTTTCATATTGAAAAAG
TAATAAGAATGAGGGGTGTTAAGCTTTTTATCATCCTGGCGTCGAGCTATTTTTCCGCAGGACC
TCCCCTACAGTATCTTCACCGCAGTAGAGTTTAACCACCAAGTTCGGGATGGATTGGTGTGGTT
CCTCTACGCCTAGGACACCAGAATATCGAACCATGAACGAAGAAAGGCATGAGAGAAAAGCATA
TTGGCTAGTGATTGTGAGGCCCCAATTCTTGACTGGAGGGGGCACCAACGGCCTCCGCCCTTCC
ATCCCTTGGATCGATAGAGAGGGAGGGCAGAGCTTTTGGTTTTTTCATGTTGTTGTTGTCAAAG
AGCTGAACAATAAAAATAGATGGCGAGTGCCTAATCGAATTGATCGGGTCATGTAGGAACAAGG
TTCAAGTCTACCGGTCTGTTAGGATGCCTCAGCTGCATACATCACTGCACTTCCACTTGACACC
TATCGTAATGATAAACGGCTCGTCTCGCCGTGACCTTCTCTTGAATTCTCAAAACTTCTGTCACT
CCATCCCCGCAGGGGCAGAGAACCCGTCGCTGTCTCGTCAGCAGTC

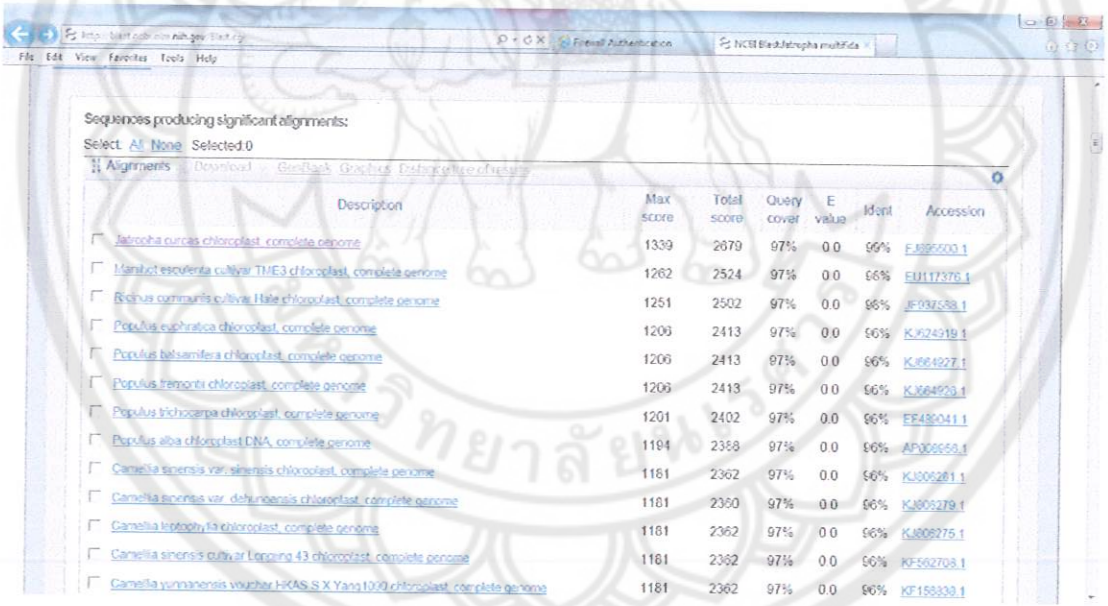
>Jatropha gossypifolia

TCCAACCAGATCGGGAGTACCCTAAAAAAGGAACCTTTCCTCTCCCCAGCCATTTCGGGTTAAG
AAGATGCGAAAGCGCCTCTCTCTCTATAAGAACGGTGCGTTCCGAGATGTGAAGTGGGAGAAAA
GGGATTTCATAATTGGGGTTTTGAATAAGACGACCTTTTCATTTTTTTTTTTCATATTGAAAAAG
TAATAAGAATGAGGGGTGTTAAGCTTTTTATCATCCTGGCGTCGAGCTATTTTTCCGCAGGACC
TCCCCTACAGTATCTTCACCGCAGTAGAGTTTAACCACCAAGTTCGGGATGGATTGGTGTGGTT
CCTCTACGCCTAGGACACCAGAATATCGAACCATGAACGAAGAAAGGCATGAGAGAAAAGCATA
TTGGCTAGTGATTGTGAGGCCCCAATTCTTGACTGGAGGGGGCACCAACGGCCTCCGCCCTTCC
ATCCCTTGGATCGATAGAGAGGGAGGGCAGAGCTTTTGGTTTTTTCATGTTGTTGTTGTCAAAG
AGCTGAACAATAAAAATAGATGGCGAGTGCCTAATCGAATTGATCGGGTCATGTAGGAACAAGG
TTCAAGTCTACCGGTCTGTTAGGATGCCTCAGCTGCATACATCACTGCACTTCCACTTGACACC
TATCGTAATGATAAACGGCTCGTCTCGCCGTGACCTTCTCTTGAATTCTCAAAACTTCTGTCACT
CCATCCCCGCAGGGGCAGAGAACCCGTCGCTGTCTCGTCAGCAGTC

<u>รูปที่ 12</u> ลำดับดีเอ็นเอทางส่วนปลาย 3´ของยีน ACCase ของมะละกอฝรั่ง (*Jatropha multifida*) และสบู่แดง (*Jatropha gossypifolia*)



<u>รูปที่ 13</u> การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอด้านปลาย 3' ของยีน Accase ของ มะละกอฝรั่งและสบู่แดง



<u>รูปที่ 14</u> ผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นด้านปลาย 3´ ของยีน ACCase ของมะละกอฝรั่งกับดีเอ็นในฐานข้อมูล Genbank

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาของพืชในสกุล *Jatropha* ในประเทศไทย 5 ชนิดคือ สบู่แดง หนุมานนั่งแท่น ปัตตาเวีย มะละกอฝรั่ง และสบู่ดำ ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง โดยใช้ส่วนของ intron ของยีน ACCase 3 บริเวณ ไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะต่อพืชในสกุล *Jatropha* เป็นอย่างมาก จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในพืชสายพันธุ์อื่นได้ ทำให้ไม่มีกลุ่มพืชที่เป็น outgroup ไพรเมอร์ที่ใช้แบ่งออกเป็น 3 บริเวณ คือ บริเวณระหว่างไพรเมอร์ BCCP1F-BCCP1R In2F-In1R และ In1F-BCCPF1R เมื่อนำไพรเมอร์ทั้งสามคู่ไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพืชในสกุล *Jatropha* 16 ตัวอย่างพบว่า ไพรเมอร์ BCCP1F-BCCP1R และ In2F-In1R สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง ในขณะที่ไพรเมอร์ In1F-BCCPF1R ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ใน 3 ตัวอย่างคือ *Jatropha gossypifolia* (1) *Jatropha multifida* (2) และ *Jatropha integerrima* (2) จาก phylogenetic tree ทั้ง 3 ไพรเมอร์ให้ผลที่สอดคล้องกันคือสบู่ดำมีความใกล้ชิดกับปัตตาเวียมากที่สุด แต่ในกลุ่มของสบู่ดำเองไม่สามารถจัดกลุ่มได้ เมื่อนำลำดับดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ BCCP1F-BCCP1R และ In2F-In2R นำมาสร้างเป็น phylogenetic tree ทำให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือ พบว่าสามารถจำแนกกลุ่มของสบู่ดำเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม กลุ่มย่อยกลุ่มแรกคือสบู่ดำจากจังหวัดลำพูน เชียงใหม่ นตรสรรค์ และสบู่ดำ non-toxic 2 ส่วนกลุ่มย่อย 2 ประกอบด้วยสบู่ดำ ลำปาง และ เลย มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันโดยมีค่า bootstrap 68% เช่นเดียวกันกับสบู่ดำจากดอยหล่อ จังหวัดลำพูน และ สบู่ดำ non-toxic 1 การจัดกลุ่มของสบู่ดำไม่ได้มีความสัมพันธ์กับถิ่นกำเนิด อาจจะเนื่องมาจากบริเวณ intron ของยีน ACCase ไม่สามารถใช้ในการจำแนกสบู่ดำตามแหล่งกำเนิดได้

การหาลำดับดีเอ็นเอบริเวณปลาย 3´ ของยีน ACCase จากพืชในสกุล *Jatropha* 4 ชนิด สบู่แดง ปัตตาเวีย มะละกอฝรั่งและหนุมานนั่งแท่น ส่วนสบู่ดำนั้นมีข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของยีน ACCase ในฐานข้อมูลแล้ว ไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับดีเอ็นเอด้านปลาย 3´ ของยีน ACCase ออกแบบมาจากสบู่ดำ ไพรเมอร์นี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในตัวอย่างพืชทั้ง 4 ชนิดแต่เมื่อนำไปโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอและนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ไปเปรียบเทียบในฐานข้อมูลพบว่ามีลำดับดีเอ็นเอด้านปลาย 3´ ของยีน ACCase ของมะละกอฝรั่งและสบู่แดงที่มีความเหมือนกับลำดับดีเอ็นเอของสบู่ดำ และเมื่อนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากพืชทั้งสองมาเปรียบเทียบกันพบว่ามีความเหมือนกัน 100% ส่วนลำดับดีเอ็นเอของ หนุมานนั่งแท่นและปัตตาเวียไม่มีความเหมือนกันดีเอ็นเอใดๆในฐานข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

คณะกรรมการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. 2555. **แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับ ที่ 11 (พ.ศ.2555–2559).** กรุงเทพมหานคร: สานักนายกรัฐมนตรี, 169 หน้า

จเร สดากร. 2527. สบู่ดำพืชศักยภาพสูงเพื่อพลังงานทดแทนของประเทศไทย. วารสารวิชาการเกษตร 2(1) : 67-72.

นาค โพธิแท่น. 2548. สบู่ดำ. หนังสือพิมพ์กสิกร 78(3): 67 – 68.

มลิวรรณ นาคขุนทด.2552. การตรวจสอบความ หลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศไทย ด้วยวิธี อาร์เอพีดี. NU Science Journal. 6(1):55-65.

สนธิชัย จันทร์เปรม. 2548. สรุปผลการศึกษาความสัมพันธ์ระดับดีเอ็นเอของสบู่ดำโดยใช้เทคนิค AFLP. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม. 3 หน้า.

อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ อุดมวิทย์ ไวทยการ เถลิงศักดิ์ วีระวุฒิ และวรยิต ผาภูมิ. 2550. สบู่ดำ:พืชพลังงานทดแทน. เอกสารเผยแพร่งานมหกรรมเกษตรกรรมรวมใจเทิดไท้มหาราชา. 28 พฤศจิกายน 2550-2 ธันวาคม 2550 ณ พิพิทธภัณฑ์การเกษตรเฉลิมพระเกียรติ พระยาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี.(แผ่นพับ)

Agarwal, D., Agarwal, A.K. 2007. Performance and emissions characteristics of Jatropha oil (preheated and blends) in a direct injection compression ignition engine. Appl. Therm. Eng. 27:2314-2323.

Asif, M. H., Mantri, S. S., Sharma, A., Srivastava, A., Trivedi, I., Gupta, P., Mohanty, C., Sawant, V. S. and Tuli R. 2010. Complete sequence and organisation of the Jatropha curcas (Euphorbiaceae) chloroplast genome. **Tree Genetics & Genomes.** 6:941–952.

Bailey, C. D. and Doyle, J. J. 1999. Potential phylogenetic utility of the low-copy nuclear gene *pistillata* in dicotyledonous plants: comparison to nrDNA ITS and *trnL* intron in *Sphaerocardamum* and other Brassicaceae. Molecular Phylogenetics and Evolution. 13:20–30.

Cai, Y., Sun, D., Wu, G. and Peng, J. 2010. ISSR-based genetic diversity of Jatropha curcas germplasm in China. Biomass and bioenergy 34:1739-1750.

Chayamarit, C., Santisuk, T., Larsen, K., Welzen, P. van., Esser, H. J., Nanakorn, W., Chantaranothai, P., Boonthavikoon, T., Pooma, R., Phuphathanaphong, L., Chantharaprasong, C. & Larsen, S. 2001. Systematic study of the family Euphorbiaceae in Thailand. In: Baimai, V. & Kumhom, R. (eds), BRT Research Report 2001, pp. 78–88. Biodiversity Research and Training Program, Bangkok Thailand.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 12-15.

Fairless, D. 2007. Biofuel: the little shrub that could-maybe. Nature. 449:652-655.

Fan, X., Zhang, H. Q., Sha, L. N., Zhang, L., Yang, R. W., Ding, C. B. and Zhou, Y. H. Phylogenetic analysis among Hystrix, Leymus and its affinitive genera (Poaceae: Triticeae) based on the sequences of a gene encoding plastid acetyl-CoA carboxylase. Plant Science. 172:701–707.

Hochbach, A., Schneider, J. and Roser, M. 2015. A multi-locus analysis of phylogenetic relationships within grass subfamily Pooideae (Poaceae) inferred from sequences of nuclear single copy gene regions compared with plastid DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution. 87:14–27

Huang, S., Su, X., Haselkorn, R. and Gornicki, P. 2003. Evolution of switchgrass (Panicum virgatum L.) based on sequences of the nuclear gene encoding plastid acetyl-CoA carboxylase. Plant Science. 164: 43-49.

Ke, J., Wen, T.N. Nikolau, B.J. and Wurtele, E.S. 2000. Coordinate regulation of the nuclear and plastidic genes coding for the subunits of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase. Plant Physiology. 122:1057–1071.

Konishi, T. and Sasaki, Y. 1994. Compartmentalization of two forms of acetyl-CoA carboxylas in plants and the origin of their tolerance toward herbicides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91:3598–3601.

Mulpuri, S., Muddanuru, T. and Francis, G. 2013. Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-toxic accessions of Jatropha curcas L. and development of a codominant SCAR marker. Plant Science. 207:117– 127.

Naghavi, M. R., Rad, M. B., Riahi, M. and Taleie, A. 2013. Phylogenetic analysis in some Hordeum species (Triticeae;Poaceae) based on two single-copy nuclear genes encoding acetyl-CoA carboxylase. Biochemical Systematics and Ecology. 47:148–155.

Pamidimarri, D.V.N.S., Chattopadhyay, B., Reddy, M. P. 2009. Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence. Molecular Biology Reports. 3:1929-1935.

Sambrook, J., Fritsoh, E.F. and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A laboratory Manual,** 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.

Shen, J., Pinyopusarerk, K., Bush, D. and Chen, D. AFLP-based molecular characterization of 63 populations of *Jatropha curcas* L. grown in provenance trials in China and Vietnam. Biomass and bioenergy. 37:266-274.

Turnham, E. and Northcote, D. H. 1983. Changes in the activity of acetyl-CoA carboxylase during rape-seed formation. Journal of Biochemistry. 212:223–229.

Wu, D., Sun, G., Yang, L. and Hu, Q. 2014. Comparison of Acetyl-CoA carboxylase 1 (Acc-1) gene diversity among different Triticeae genomes. Gene. 546:11–15

LB plate ประกอบด้วย

Tryptone 1 กรัม

Yeast extracts 0.5 กรัม

NaCl 1 กรัม

Agar 2 กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บไว้ที 4 องศาเซลเซียส

LB broth ประกอบด้วย

Tryptone 1 กรัม

Yeast extracts 0.5 กรัม

NaCl 1 กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

SOC ประกอบด้วย

Tryptone 1.2 กรัม

Yeast extracts 0.3 กรัม

NaCl 0.0351 กรัม

KCl 0.0111 กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 60 มิลลลิตร ปิดด้วยจุกสำลีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้เติม

1M $MgSO_4$. $7H_2O$ 600 ไมโครลิตร

1M MgCl2.6H2O 600 ไมโครลิตร

2M Glucose 600 ไมโครลิตร

โครงการย่อยที่ 3

การวิจัยคุณสมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบเคมีของเมล็ดหนุมานนั่งแท่น

(*Jatropha podagrica* Hook) เพื่อใช้เป็นแหล่งไบโอดีเซล

Research on physical properties and chemical constituents of seeds of *Jatropha podagrica* Hook for using as biodiesel

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากสภาวการณ์การขาดแคลนพลังงานปิโตรเลียมที่ทุกประเทศทั่วโลกตื่นตัวกับการตั้งรับกับข้อจำกัดของพลังงานที่กำลังหมดไป ไบโอดีเซลทดแทนจากพืชที่ไม่เป็นอาหารมนุษย์และราคาถูกจึงเป็นแหล่งใหม่ที่น่าสนใจอย่างยิ่งเนื่องจากเป็นพลังงานที่อยู่ในรูปของการหมุนเวียน (Renewable resources) สบู่ดำ (*Jatropha curcas Linn*) เป็นพืชที่มีศักยภาพในการใช้เป็นพลังงานทดแทนเนื่องจากแม้จะมีพิษแต่สามารถนำน้ำมันมาพัฒนาใช้เป็นไบโอดีเซลได้ ในระยะเวลา 6 ปีที่ผ่านมาช่วงระหว่าง พ.ศ. 2548-2554 พบรายงานการวิจัย ในหลายๆ ด้านเช่นการคัดเลือกพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการปลูกในพื้นที่ต่างๆ (ชำนาญ ฉัตรแก้ว 2549) การปรับปรุงพันธุ์โดยการสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยสารเคมี (ดวงพร เปรมจิต และ คณะ 2551, 2552; Premjet et al., 2011) การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันจากเมล็ดรวมทั้งคุณสมบัติทางกายภาพเช่น เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันอิสระ (% FFA), iodine value, peroxide value, ปริมาณกรดไขมัน (fatty acid) และ ไตรกลีเซอร์ไรด์ (TAGs) พบว่า กรดโอเลอิก (44.7 %) และกรดไลโนเลอิก (32.8 %) เป็นกรดไขมันส่วนใหญ่ของน้ำมันสบู่ดำรวมทั้งพบกรดไขมันแบบไม่อิ่มตัวได้แก่กรดปาล์มมิติก และ กรดสเตียริก (Akbar E et al., 2009) อย่างไรก็ตามยังพบว่าการนำสบู่ดำมาใช้ประโยชน์ในแง่การผลิตระดับอุตสาหกรรมยังมีปัญหาในเรื่องผลผลิตต่ำและยังคงต้องใช้ความพยายามของนักวิจัยในสาขาเกษตรศาสตร์และอื่นๆที่เกี่ยวข้องอีกระยะหนึ่งอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งควรมีการนำพืชในจีนัส *Jatropha sp.* อื่นๆ ที่ยังเป็นพืชที่ไม่มีการพัฒนาไปใช้ประโยชน์มาทำการศึกษาวิจัยในการศึกษานี้มีความสนใจ หนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica*) เนื่องจาก อยู่ในจีนัสเดียวกับสบู่ดำ มีการขยายพันธ์ง่ายและมีเมล็ดสีดำลักษณะคล้ายสบู่ดำ แต่ไม่พบรายงานการศึกษาข้อมูลคุณสมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีเพื่อนำมาพัฒนาเป็นแหล่งไบโอดีเซล การศึกษานี้ต้องการให้ข้อมูลทางด้านคุณสมบัติน้ำมันจากเมล็ดหนุมานนั่งแท่น เพื่อขยายฐานความรู้ก่อนการพัฒนาสายพันธุ์พืชในจีนัสสบู่ดำอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ให้ก่อเกิดประโยชน์ทางด้านพลังงานทดแทนที่ช่วยให้ประเทศสามารถพึ่งพาตนเองได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโตของให้ *J. Podagrica* ได้เมล็ดในปริมาณมากพอสำหรับการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเมเล็ด เก็บข้อมูลน้ำหนักเมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ด เนื้อในเมล็ด และการออกดอกติดผลในรอบปี

1.2.2 เพื่อทราบค่า free fatty acids (as oleic acid) ของน้ำมันเมล็ด *J. Podagrica*

1.2.3 เพื่อวิเคราะห์ Iodine number ของน้ำมันเมล็ด *J. Podagrica*

1.2.4 เพื่อวิเคราะห์ Saponification value ของน้ำมันเมล็ด *J. Podagrica*

1.3 <u>ขอบเขตของโครงการวิจัย ในปี พ.ศ. 2557</u>

ศึกษาการออกดอกผลของ *J. Podagrica* ที่ปลูกจำนวน 100 ต้น เพื่อเก็บเมล็ดสำหรับศึกษาข้อมูลทางกายภาพในปีที่ 2 นำเมล็ดมาสกัดด้วย n-hexane แล้วแยกน้ำมันที่ได้ออกมาทำการวิเคราะห์ free fatty acids, Iodine number และ Saponification value

1.4 <u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

ได้ข้อมูลองค์ประกอบของน้ำมันจากเมล็ดหนุมานนั่งแท่น เพื่อใช้ในการศึกษาเป็นน้ำมันไบโอดีเซลทดแทน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1.ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

หนุมานนั่งแท่น มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Jatropha podagrica* Hook จัดอยู่ในวงศ์ Euphobiaceae มีชื่อพื้นเมืองอื่นๆ เช่น ว่านเลือด (ภาคกลาง) หัวละมานนั่งแท่น (ประจวบคีรีขันธ์) มีชื่อ common name ได้แก่ coral nut, Guatemala rhubarb ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้พุ่ม มีความสูงได้ถึง 2.5 เมตร ผิวลำต้นเกลี้ยง ลำต้นพองที่โคน หูใบแตกแขนงยาว 5 มิลลิเมตร ใบมีรูปไข่กว้าง ก้านใบยาว 10-20 เซนติเมตร แผ่นใบแบบก้นปิด ขอบใบเว้า 3-5 แฉก ดอกแยกเพศ ออกเป็นช่อถึงเชิงหลั่นยาว 26 เซนติเมตร แกนช่อดอกยาว 20 เซนติเมตร มีใบประดับรูปสามเหลี่ยมยาว 2 มิลลิเมตร ดอกเพศผู้มีกลีบเลี้ยงรูปไข่กว้าง 0.6 มิลลิเมตร กลีบดอกรูปไข่กว้าง 2 มิลลิเมตร ยาว 5-6 มิลลิเมตร เกสรยาว 6-8.5 มิลลิเมตร ก้านชูเกสรเชื่อมกันที่โคน ดอกเพศเมียกลีบเลี้ยงรูปรียาว 2 มิลลิเมตร กลีบดอกยาว 6-7 มิลลิเมตร ผลรูปรี มี 3 พู เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร กว้าง 6 มิลลิเมตร ยาว 1.2 มิลลิเมตร เมล็ดมีสีดำ มี 3 เมล็ดต่อผล เนื้อเมล็ดมีสีขาวชุ่มน้ำมัน มีถิ่นกำเนิดแถบอเมริกากลาง และฮาวาย เป็นพืชปลูกพบตั้งแต่ระดับน้ำทะเลถึงระดับ 800 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (ศูนย์ข้อมูลพืช สำนักวิชาการ-วิจัย องค์การสวนพฤกษศาสตร์ 2554)

2.2. การใช้ประโยชน์

J. podagrica เป็นไม้ประดับในเขตร้อน ราก ลำต้น ใบ ผล และเมล็ด มีประวัติการนำไปใช้ในยาแผนโบราณแถบแอฟริกาตะวันตก เมล็ดใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ รักษาโรคผิวหนัง เกาต์ หนองใน เปลือกใช้เบื่อปลา เมล็ดเคี้ยวเป็นยาถ่าย

2.3. ความเป็นพิษ

J. podagrica จัดเป็นพืชมีพิษเช่นเดียวกับสบู่ดำ ทุกส่วนมีพิษโดยเฉพาะเมล็ดมีพิษมากที่สุด พิษก่อให้เกิดสภาวะขาดน้ำ และทางเดินหายใจล้มเหลว เนื่องจากมีเลือดออกในกระเพาะอาหารและกดระบบประสาทส่วนกลาง อาการเหล่านี้ปรากฏเมื่อกินเมล็ดผ่านไปเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง สารพิษในเมล็ดคือ curcin น้ำมันมีฤทธิ์เป็นยาถ่าย เรียกว่า hell oil ในน้ำมันมีสาร curcanoleic acid ก่อความระคายเคือง มีโครงสร้างคล้ายกับ ricinoleic acid และ crotonoleia acid ที่พบในละหุ่งและเปล้า (Joubert et al., 1984)

2.4. **ข้อมูลทางสารพฤกษเคมี**

Aiyelaagbe O, et. al., 2000 ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดรากของ *J. podagrica* โดยแบ่งเป็นสารสกัดเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล จากเนื้อในรากและเปลือกราก โดยทดสอบกับจุลินทรีย์ 18 ชนิด สารสกัดทุกชนิดแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด (broad spectrum antibacterial activity) ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่า สารสกัดคลอโรฟอร์ม และเมทานอล สารสกัดเฮกเซนจากส่วนรากที่มีสีเหลืองออกฤทธิ์ได้ดีพอกับ gentamycin แต่ดีกว่าในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *B. cereus* สารสกัดเฮกเซนของเปลือกราก และสารสกัดเนื้อรากโดยเฮกเซนและเมทานอล ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดีโดยเฉพาะยีสต์ *Candida albicans*

Aiyelaagbe O, et. al., 2007 สามารถแยก diterpenoids จากรากของ *J. podagrica* ได้แก่ Japodagrin, Japodagone, lathyrane, jatrophane โดยวิเคราะห์โครงสร้างจาก NMR และ HRMS และเปรียบเทียบสเปคตรัม สารที่แยกได้แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก

Aiyelaagbe O and James B.G., 2008 ทำการแยก Japodic acid และ fraxidin จากรากของ *J. podagrica* โดยใช้ 1D, 2D NMR และแยกสารตัวอื่นที่เคยมีรายงานคือ erythrinasinate ฤทธิ์ทางชีวภาพ Japodic acid แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแมลง *Helicoverpa zea* สาร erythrinasinate และ fraxidin ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* แต่ Japodic acid ไม่ยับยั้งแบคทีเรีย

Rumzhum et al., 2012 ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากเปลือกที่ลอกจากลำต้นของ *J. podagrica* จากนั้นทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสารสกัดมีสารประกอบ 6 ชนิด ได้แก่ faxin, fraxetin, scoparone, 3-acetylaleurifolic acid, ß-sitosterol และ sitosterone

2.5. ข้อมูลการวิจัยและพัฒนาน้ำมันสบู่ดำไปเป็นไบโอดีเซล

เนื่องจาก *J. Podagrica* เป็นพืชในจีนัสเดียวกับสบู่ดำ การรวบรวมเอกสารจึงเห็นสมควรนำกรณีศึกษาของสบู่ดำมาเป็นตัวอย่างดังรายละเอียดที่จะกล่าวต่อไปนี้ ช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมาประเทศต่างๆ ได้หันมาศึกษาพัฒนาการใช้ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นพลังงานทดลักแทนน้ำมันปิโตรเลียมที่ได้จากฟอสซิล เนื่องจากเป็นพลังงานที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและสามารถนำมาใช้หมุนเวียน ไม่มีพิษ แหล่งหลักของพลังงานไบโอดีเซลคือน้ำมันจากพืช และ ไขมันสัตว์

Prarawira W., 2010 เขียนรายงานการผลิตไบโอดีเซลจากเมล็ดสบู่ดำ ไว้ว่า สบู่ดำเป็นพืชที่เมล็ดมีน้ำมันในปริมาณสูงเพียงพอที่จะนำมาผลิตไบโอดีเซล และคาดว่ามีค่าใช้จ่ายในการผลิตต่ำกว่าพืชอื่นๆ ทั้งยังเป็นแหล่งพลังงานสะอาด และยั่งยืน เนื่องจากสามารถใช้หมุนเวียน และลดการปลดปล่อยก๊าซที่ก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจก ไบโอดีเซลมีค่าการเผาไหม้เทียบได้กับ ปิโตร-ดีเซล (Petro-diesel)

ไบโอดีเซล โดยคำนิยามทางเคมีหมายถึง รูป methyl หรือ ethyl ester ของ fatty acid ที่ได้จากน้ำมันพืช ทั้งชนิดกินได้และกินไม่ได้ หรือ หมายถึง เชื้อเพลิงทดแทนประเภทดีเซลจากธรรมชาติโดยการนำเอาน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์ ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทไตรกลีเซอร์ไรด์มาผ่านกระบวนการ Transesterification โดยทำปฏิกริยากับแอลกอฮอล์ และมีด่างเป็นตัวเร่งปฏิกริยาเช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์

(NaOH) ได้ผลผลิตเป็น ester ตามชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ทำปฏิกริยา ผลพลอยได้จากปฏิกริยาคือกลีเซอรอล (Glycerol)

ปี ค.ศ.1900 Rudolph Diesel ใช้น้ำมันถั่วลิสงกับเครื่องยนต์เป็นครั้งแรก (Shay, 1993) อย่างไรก็ตามในเวลานั้นน้ำมันปิโตรเลียมราคาถูกมากจนไม่มีใครสนใจไบโอดีเซล พืชน้ำมันที่อเมริกาและยุโรปใช้เป็นไบโอดีเซล ได้แก่ ถั่วเหลือง ทานตะวัน เรพสีด

ในส่วนประเทศกำลังพัฒนาในทวีปแอฟริกาและเอเชีย การนำพืชอาหารมาใช้เป็นพลังงานทดแทนนั้นไม่เหมาะสมเนื่องจากมีผลกระทบ ดังนั้นพืชที่กินไม่ได้จึงเป็นแหล่งที่เหมาะสมกว่า ทั้งนี้ความสำเร็จจะอยู่ที่การมีพืชชนิดที่มีผลผลิตน้ำมันสูง มีเทคโนโลยีเฉพาะของตนเอง จึงจะสามารถนำประเทศไปสู่การส่งออกพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพ ซึ่งธุรกิจพลังงานทดแทนนั้นจะสร้างความเข้มแข็งทางเศรษฐกิจและความมั่นคงให้แก่ประเทศ แอฟริกาใต้เป็นพื้นที่นำร่องของการปลูกและการใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นไบโอดีเซล นักลงทุนจากบริษัทต่างๆ จากกลุ่มสแกนดิเนเวีย จีน ยุโรป และอินเดีย ต่างวิ่งกันไปลงทุนในแอฟริกา รวมทั้งทุนจากกลุ่ม Ericsson, GSMA และ MTN (Openshaw, 2000)

วิธีการสกัดน้ำมันแบบง่ายๆคือการนำเมล็ด หรือ ไขมันสัตว์มาบีบอัดจนได้เป็น crude oil ในน้ำมันนี้จะมีสารประกอบเช่น free fatty acids, phospholipids, sterol น้ำ สารให้กลิ่น และ สารเจือปนอื่นๆ คุณสมบัติของ crude oil จะมี high viscosity, low volatility, polyunsaturated คุณสมบัติเหล่านี้ทำให้น้ำมันพืชไม่สามารถนำมาใช้เป็นไบโอดีเซลโดยตรงในเครื่องยนต์บีบอัด น้ำมันสบู่ดำมีองค์ประกอบเป็น unsaturated fatty acids ในปริมาณ 72% มี oleic acid เป็น predominant และตามมาด้วย linoleic acid ที่อุณหภูมิ 30°C ค่า viscosity เท่ากับ 17-39 cSt ขึ้นกับสายพันธุ์ ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำจึงสำคัญอย่างยิ่ง ปัจจุบันมีการเตรียมไบโอดีเซลจากสบู่ดำดังนี้ คือ ใช้น้ำมันโดยตรง (direct use) นำไปผสม (blending) ทำปฏิกริยา pyrolysis เตรียมแบบ microemulsification เทคนิคที่ใช้มากที่สุดคือ trans-esterification

การนำน้ำมันมาใช้โดยตรงมีปัญหาเรื่องเครื่องยนต์อุดตันด้วย gum ที่เกิดจากปฏิกริยาออกซิเดชันของ fatty acid (Meher et al., 2006) การลด viscosity ของน้ำมันพืชสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค เตรียมแบบ micro-emulsion ด้วย methanol, ethanol และ 1-butanol (Agawal, 2007) แต่ยังมีปัญหาในการใช้งานเนื่องจากมีการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์

Pyrolysis หมายถึง การเปลี่ยนสารหนึ่งเป็นเป็นสารอื่นโดยใช้ความร้อนในสภาวะที่ไร้อากาศ (O_2) หรือมีตัวคะตะลิสต์ ที่สามารถตัดพันธะในโมเลกุลสารต่างๆ การนำน้ำมันพืชมาผ่านกระบวนการนี้พบว่ามีสารอินทรีย์ alkanes, alkenes, alkadienes และ aromatics และ carboxylic acid ปนมากับไบโอดีเซลในปริมาณต่างๆ กัน เครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ใน Pyrolysis มีราคาแพง ทั้งยังต้องมีการแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น จึงทำให้ราคาค่าการผลิตทั้งระบบแพงขึ้น ทั้งผลผลิตมีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบคล้ายกับ gasoline ซึ่งเป็นสารที่ไม่ ecofriendly (Ranganathan et al., 2007)

Trans-esterification (alcohol lysis) นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชมากที่สุด แอลกอฮอล์ที่ใช้ได้แก่ methanol, ethanol, propanol, butanol, amyl alcohol แต่ที่ใช้กันแพร่หลายคือ methanol และ ethanol ในปฏิกริยามีตัวเร่งเป็น กรด (acid catalyst) หรือ ด่าง (alkali catalyst) แต่ ด่างสามารถเร่งปฏิกริยาได้เร็วกว่า เมื่อน้ำมันพืชผ่านกระบวนการนี้จะลดค่า viscosity ลง เนื่องจากมีการกำจัด glycerol ออกไป ทำให้ค่า viscosity มีค่าลดลงมาเท่าๆกับ น้ำมัน fossil อย่างไรก็ตาม ผลผลิต ไบโอดีเซลขึ้นกับค่าความชื้น เปอร์เซ็นต์ free fatty acid (FFA) เวลาปฏิกริยาและอุณหภูมิ ตัวเร่งปฏิกริยาและ จำนวนสัดส่วนโมลาร์ของแอลกอฮอล์และน้ำมัน

Lipase catalyst (enzymatic trans-esterification) เทคโนโลยีนี้ให้ผลผลิตไบโอดีเซลที่มีความบริสุทธิ์สูง ช่วยในการแยก glycerol และสารเจือปนอื่นๆ ออกจากระบบ เอนไซม์ผลิตจาก *Mucor meihei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida Antarctica*, *Pseudomonas flurescens*, *Pseudomonas cepacia* ปัจจุบันมีการนำเซลล์มาแพคในสารตัวกลาง (immobilized cells) เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ในการเร่งปฏิกริยา trans-esterification

น้ำมันสบู่ดำเมื่อผ่านกระบวนการนี้ยังคงมี free fatty acid ถึง 14 % ซึ่งสูงกว่าค่าเหมาะสมซึ่งสามารถให้มีเหลือได้เพียง 1 % การพัฒนาเทคโนโลยีเอนไซม์กำลังดำเนินการศึกษามากที่สุดในปัจจุบัน

จากการค้นคว้าเอกสารที่มีในฐานข้อมูลปัจจุบันของ *J. Podagrica* พบเพียงการสกัด การแยกสารและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ของกลุ่มวิจัยแคบๆ การศึกษากรณีสบู่ดำยืนยันว่าพืชในจีนัส Jatropha อื่นๆ นั้นยังมีความสำคัญ ดังนั้นการศึกษานี้จะเป็นการเพิ่มความรู้ของ *J. podagrica* ในด้านคุณสมบัติของน้ำมันเมล็ดเพื่อเป็นแหล่งพลังงานไบโอดีเซล

บทที 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1.อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (Shoxlet apparatus) ประกอบด้วย ขวดก้นกลม(สำหรับใส่สารตัวทำละลาย) ซอกห์เล็ก(Shoxlet) อุปกรณ์ควบแน่น (condensor) และเตาให้ความร้อน (Heating mantle)
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (Cellulose extraction thimbles ขนาด 33 mm X 94mm ยี่ห้อ Whatman)
3. ตัวทำละลาย (เฮกเซน), petroleum ether (Merck)
4. สำลี
5. ตู้อบไฟฟ้า
6. Boiling chips
7. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Satorious)
8. โกร่งบด
9. Gas Chromatography (Zhimadzu)

3.2. วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างเมล็ด จาก *J. podagrica*

   ตัวอย่างเมล็ดได้จากการขยายพันธุ์เมล็ดที่แปลงปลูก จังหวัดอุตรดิตถ์

2. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเมล็ด *J. podagrica*

   นำเมล็ดตัวอย่างมากระเทาะส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดออก จากนั้นแยกเนื้อเมล็ดและเปลือกออกจากกันนำแต่ละส่วนไป ชั่งน้ำหนัก เพื่อเก็บข้อมูลน้ำหนักสด และแห้ง

3. วิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

   นำเนื้อเมล็ดมาบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปสกัดน้ำมันด้วย Soxhlet Extraction วิเคราะห์กรดไขมันโดยวิธีมาตรฐานวิเคราะห์ Fatty acid methyl esters (FAME) ตามวิธีการของ AOAC, 1990 และ Schlechtriem et al., 2004 โดย GC และเปรียบเทียบชนิด Fatty acid methyl esters แต่ละตัวด้วยสารมาตรฐาน

3.3. การทดลองที่1 การเก็บตัวอย่างเมล็ดและการขยายพันธุ์ *J. podagrica*

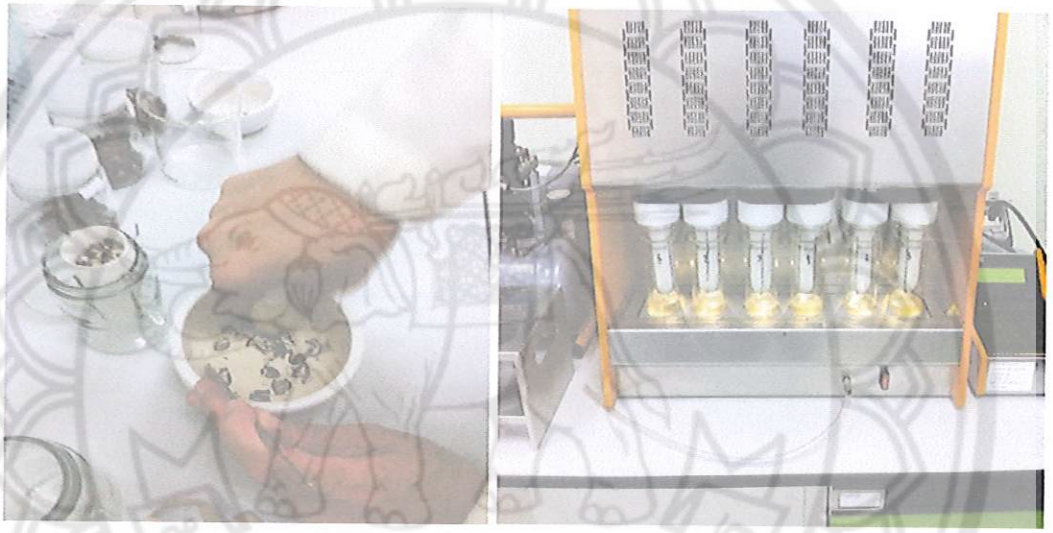
ตัวอย่างเมล็ดที่นำมาศึกษานำมาจากต้นไม้ประดับที่จำหน่ายขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดระยะปลูก 1x1 เมตร จำนวน 100 ต้น ระยะเวลาปลูก 1 เมษายน 2556 – เมษายน 2557 ที่แปลงทดลองจังหวัดอุตรดิตถ์

3.4. การทดลองที่ 2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเมล็ดมาเพาะในวัสดุปลูกเป็นเวลา 7 วัน ได้ต้นอ่อนระยะใบเลี้ยง 2 ใบ และนำลงแปลงปลูกเมื่อมีอายุ 1 เดือน เริ่มเก็บผลตั้งแต่อายุ 6 เดือน

3.5. การทดลองที่ 3 การสกัดน้ำมันจากเมล็ด

นำเมล็ด 500 กรัม มาบดด้วยโกร่งบด และนำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ใน Thimbles ละ 15 g จากนั้นนำมาสกัดด้วย n-hexane (200 ml) ในเครื่อง shoxlet ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลาย n-hexane ออกโดย Rotary Evaporator ที่ 45 °C เก็บตัวอย่างน้ำมันที่สกัดได้ใส่ในหลอดทดลองทิ้งไว้ในเดสซิเคเตอร์จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่นำมาวัดปริมาตร (ml)



ภาพที่1 การสกัดน้ำมันจากเมล็ด *J. Podagrica*

3.6. การทดลองที่ 4 การวิเคราะห์หาความชื้น

นำเมล็ดมาบดและนำไปผ่านตะแกรง 1-2 มิลลิเมตร เตรียมถ้วยสำหรับวัดความชื้นที่ผ่านการอบที่ 95-100 °C นาน 1 ชั่วโมง และพักให้เย็นลง แล้วชั่งน้ำหนักถ้วย นำตัวอย่างเนื้อเมล็ดที่บดแล้ว 2-5 กรัมใส่ลงไปในถ้วย เข้าตู้อบที่ 100-105 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำถ้วยออกมาชั่งน้ำหนักที่เหลือ

3.7. การทดลองที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

นำตัวอย่างเนื้อเมล็ดที่บดแล้ว 2-5 กรัม ใส่ถ้วยเผา แล้วนำไปเผาที่ 550-600 °C เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งตัวอย่างเผาไหม้หมด ทิ้งถ้วยตัวอย่างหลังเผาแล้วในตู้เผาอย่างน้อย 2 ชั่วโมงให้ตัวอย่างเย็นลง จึงนำออกจากเตามาพักไว้ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่งจนได้น้ำหนักคงที่

3.8 การทดลองที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์โปรตีนใช้วิธี Kjeldahl nitrogen analysis วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

3.9 การทดลองที่ 7 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต คือ ส่วนต่างที่เกิดขึ้นจากสมการ

คาร์โบไฮเดรต (%) = 100 – (ความชื้น+เถ้า+น้ำมัน+โปรตีน) %

ค่าที่แสดงผล คือ ค่าเฉลี่ย (mean)

3.10 การทดลองที่ 8

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน (Fatty acids)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน ในน้ำมันใช้วิธีมาตรฐานของ AOAC 996.06 นำน้ำมันที่สกัดได้ 0.2 กรัม มาเติม Pyrogallic acid เพื่อลดการทำลายกรดไขมันโดยปฏิกิริยา Oxidation และใช้ Triundecanoin (C11:O) เป็น internal standard ไขมันถูกสกัดด้วยอีเทอร์และทำการเติมหมู่เมทิล ให้ได้ fatty acid methyl esters FAMEs) โดยใช้ BF_3 ในเมทานอล การวิเคราะห์ใช้ Gas Chromatography โดยติดอุปกรณ์ดังนี้ คอลัมน์ capillary FFAP,25m-0.25mm.id..,0-22 mm film thickness ใช้ Helium เป็น Carrier gas และมี inlet pressure 1.2 kg ตั้งอุณหภูมิที่ตำแหน่ง injection port และ detector (FID) ที่ 200-240 °C และอุณหภูมิในคอลัมน์ 170 °C (4 min) จากนั้นปรับไปที่ 180 °C โดยปรับให้ขึ้นครั้งละ 3 °C/นาที จากนั้นปรับให้ได้ 190 °C (ปรับ 1 องศา/นาที)เป็นเวลา 25 นาที พีกของ FAMEs จำแนกโดยใช้ค่า retention time และเปรียบเทียบกับค่า retention time ของสารมาตรฐาน (authentic standard) ของ FAMEs แต่ละชนิด

3.11 การทดลองที่ 9

การวิเคราะห์ปริมาณ Free Fatty Acids (FFA)

ใช้วิธีการไตเตรทด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) และฟีนอปธาลีน (phenolpthalene) เป็น indicator โดยดำเนินการดังนี้ ชั่งน้ำมัน 2 กรัม ใส่ในฟาสก์ขนาด 250 ml ที่มีสารละลายที่เป็นเป็นกลาง (neutral solution) 50 ml จากนั้นเติมฟีนอปธาลีน 3-4 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมล คนสารละลายสม่ำเสมอระหว่างไตเตรทจนได้สารละลายสีชมพูและเห็นสีคงตัวประมาณ 15 วินาที

3.12 การทดลองที่ 10

การวิเคราะห์ค่าไอโอดีน (Iodine value)

ชั่งน้ำมัน 0.5 กรัมใส่ในขวดที่มีฝาปิดขนาด 250 ml เติมคลอโรฟอร์ม 15 ml ลงไปละลายน้ำมันจากนั้นเติม wijis iodine ปริมาตร 25 ml แล้วนำขวดไปวางในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เติมโปแตสเซียมไอโอดีน (KI) ความเข้มข้น15 % ลงไป 20 ml ปิดฝาขวดแล้วนำไปเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายที่ได้ไปไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.1 โมล จนกระทั่งเห็นสารละลายเป็นสีเหลือง จึงเติมสารละลายแป้ง

1 % เป็น indicator และไตเตรทต่อไปจนสารละลายไม่มีสี ปิดปากขวดและเขย่าให้ไอโอดีนที่อยู่ในชั้น organic solvent ถูกส่งผ่านไปที่ชั้นของน้ำ บันทึกค่า titer values

3.13 <u>การทดลองที่ 11</u>

<u>การวิเคราะห์ค่า Sponification value</u>

นำน้ำมันมากรองเอาส่วนผสมอื่นๆที่เจือปนเช่นฝุ่นและองแข็งอื่นๆออกไป ชั่งน้ำมันที่กรองแล้ว 5 กรัม เทลงในฟาสก์และให้ทำปฏิกิริยากับ

KOH ปริมาตร 5 ml ที่ปล่อยมาจากบิวเรต จากนั้นนำฟาสก์ไปต่อเข้ากับ reflux condenser ทิ้งไว้ 1 ชัวโมง เมื่อสังเกตว่า condenser เย็นลงให้นำน้ำกลั่นไป rinse แล้วถอด condenser ออก เติม indicator (1ml) แล้วไตเตรทด้วยกรด HCl (0.5 m) จนกระทั่งสารละลายที่เป็นสีชมพูหายไป

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การปลูกต้นขยายพันธุ์

หนุมานนั่งแท่นเป็นไม้ประดับ การเก็บรวบรวมเมล็ดเพื่อให้มีปริมาณที่มากเพียงพอต่อการนำมาสกัดน้ำมันและศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพนั้นทำได้ยาก การทดลองจึงเริ่มต้นที่การขยายพันธุ์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้ได้เมล็ดตามความต้องการ การศึกษานี้ใช้เมล็ดในการขยายพันธุ์ซึ่งเหมาะสมกว่าวิธีอื่น เนื่องจากลำต้นและใบมียางเหนียว แต่เมล็ดมีการเจริญรวดเร็วตอนอ่อนจะมีสีเขียวและเป็นสีเทาดำเมื่อเมล็ดแก่ จากนั้นนำเมล็ดแก่ 100 เมล็ด เพาะในพีทมอส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดงอกเป็นต้นอ่อนที่มีใบเลี้ยง 2 ใบโดยมีความสูงเฉลี่ย 8-5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางใบเลี้ยง 3 เซนติเมตร ความยาวใบ 7 เซนติเมตร ใบแท้ใบแรกปรากฏในระยะเวลาหลังจากการเพาะเมล็ด 15 วัน ใบแท้มีลักษณะกลมมน เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร เมื่อมีอายุ 1 เดือนสามารถนำไปปลูกลงแปลง ระยะห่างระหว่างต้น 1x1 เมตร เมื่อมีอายุ 6 เดือนออกผล ลำต้นมีความสูง 1 ฟุต รอบลำต้น 9 เซนติเมตร ใบขนาดใหญ่มีหยัก ก้านใบยาว 15 เซนติเมตร ผลมีลักษณะกลมมีสามพูแต่ละพูมี 1 เมล็ด

ภาพที่ 2 ต้น ใบ ดอก ผลและศัตรู (เพลี้ยแป้ง) ของ *J. Podagrica*

4.2 . ลักษณะของเมล็ด *J. Podagrica*

ศึกษาความยาว ความกว้าง มิลลิเมตร และน้ำหนัก 100 เมล็ด ผลดังแสดงในตารางที่ 1,2 เมล็ดมีความยาวเฉลี่ย12.11±0.71 มิลลิเมตร มีความกว้าง6.03±0.41 มิลลิเมตร และมีค่าน้ำหนัก 100 เมล็ดเฉลี่ย 15.52±0.19 กรัม ซึ่งค่าน้ำหนักเมล็ดต่ำกว่าของสบู่ดำ 3.8 เท่า

ภาพที่ 3 ผลแก่เปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นดำและแตกออกเป็นสามพู
เมล็ดที่กะเทาะออกจากผลที่สุก ของ *J. Podagrica* เมล็ดสีน้ำตาลเข้มถึงดำ เนื้อในสีขาว

ตารางที่ 1 ข้อมูลการออกดอกและผลของ *J. Podagrica* ในรอบปี 2557

มค-มีค	เมย-มิย	กค-กย	ตค-ธค
ไม่มีดอก/ผล	ไม่มีดอก/ผล	ติดดอก/ผล (จำนวนผลมาก)	ติดดอก/ผล (จำนวนผลน้อย)

4.3. Proximate analysis

เมื่อนำเนื้อในเมล็ดมาทำการวิเคราะห์ พบว่าเนื้อเมล็ดของ *J. Podagrica* มีค่าความชื้น (moisture content) 3.51 % เถ้า (Ash content) 7.74 % โปรตีน (protein) 28.74% คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) 29.14 % ปริมาณไขมัน (oil) 30.87%

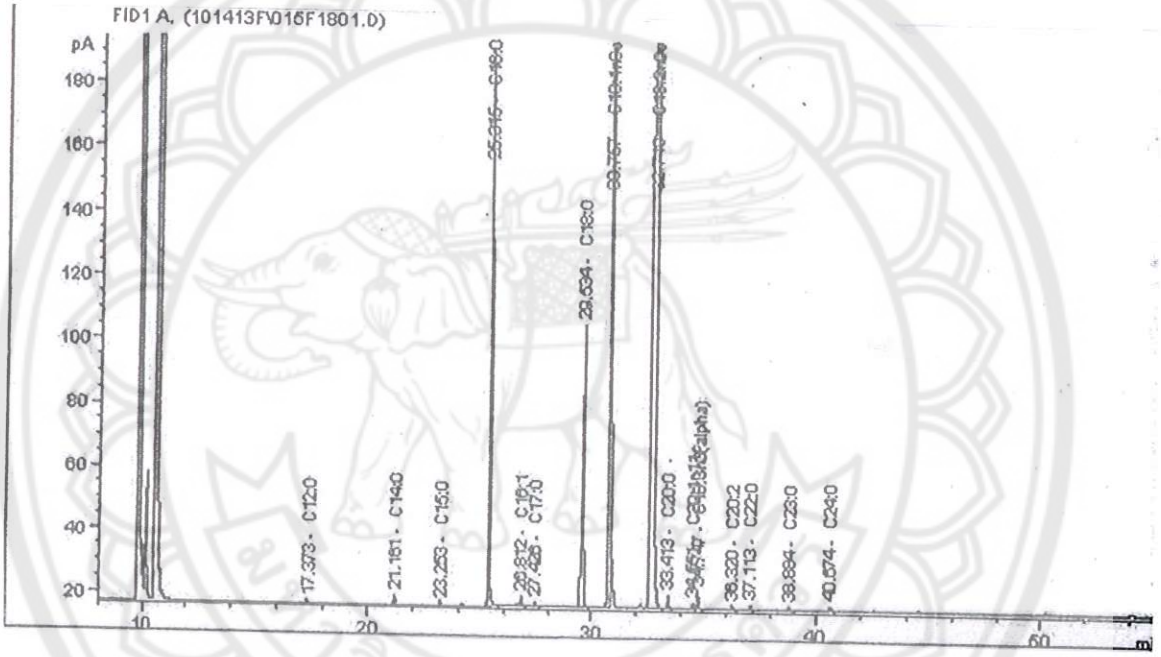
ส่วนเนื้อในเมล็ดที่สกัดน้ำมันออกไปแล้วนั้นพบว่ามีไขมัน 8.97% โปรตีน (protein) 28.74% คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) 51.05 % (แสดงในตารางที่ 1)

4.4. ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ด

เมล็ด *J. podagrica* มีปริมาณน้ำมัน 30-38 % น้ำมันมีสีเหลือง ถึงน้ำตาลอ่อน ถ้าต้องการน้ำมัน 1 ลิตร จะต้องมีเมล็ดจำนวน 2.64 กิโลกรัม สำหรับต้นที่มีอายุ 1 ปี ผลผลิตเมล็ดเฉลี่ยได้ 20 กรัม/ ต้น ผลผลิตปีที่ 2 มีการติดผลต้นละ 73 ผล 219 เมล็ด น้ำหนักเมล็ดแห้ง 34.01 กรัม/ ต้น จาก 100 ต้นทั้งปีให้ผลผลิตรวม 3401.36 กรัม และปริมาตรน้ำมัน 1.050 ลิตร

4.5. <u>การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมัน</u>

ตารางที่ 3 แสดงชนิดและปริมาณของกรดไขมัน ผลการวิเคราะห์พบว่ามีองค์ประกอบเป็น saturated fat 14.62% โดยในกลุ่มนี้มี fatty acid เป็น Palmitic acid (8.51%), stearic acid (5.57%) และมีชนิดที่พบในปริมาณน้อยได้แก่ Lauric acid (0.02%), Myristic acid (0.13%), Pentadecanoic acid (0.01%), Heptadeconoic acid (0.09%), Arachidic acid (0.18%), Behenic acid 0.04% Tricosanoic acid 0.02 และ lignoceric acid (0.05%) ส่วน Monounsaturated fatty acid มี 14.97% ได้แก่ Oleic acid (14.71%) และ Eicosenoic acid (0.09%) และ Polyunsaturated fatty acid ทั้งหมด 70.15% มีองค์ประกอบของ linoleic acid สูงถึง 70.15% มี Alpha-linoleic acid 0.24 % และ Eicosenoic acid 0.02% มี Polyunsaturated fatty รวม 85.38% ผลการวิเคราะห์แสดงเป็นโครมาโตแกรม



<u>ภาพที่ 4</u> โครมาโตแกรมแสดงรูปแบบ Fatty acids ในน้ำมันจากเมล็ด *J. Podagrica*

ตารางที่ 2 ค่าความกว้าง ความยาว ของเมล็ด *J. Podagrica*

เมล็ดที่	ความยาว (mm)	ความกว้าง (mm)
1	13.25	6.4
2	12.1	6.3
3	13.45	6.24
4	11.87	6.45
5	12.29	6.53
6	13.69	6.81
7	12.64	6.17
8	12.12	6.37
9	11.2	5.59
10	11.87	5.87
11	11.79	5.59
12	11.63	5.27
13	11.99	5.67
14	12	6.19
15	11.26	5.49
16	11.7	6.17
17	11.33	5.85
18	12.64	6.07
19	11.44	5.48
20	11.89	6.06
$\bar{x}$	12.11±0.71	6.03±0.41

ตารางที่ 3 ค่าน้ำหนักเมล็ดจำนวน 100 เมล็ด

จำนวนเมล็ด	น้ำหนัก(กรัม)
100	15.8
100	15.6
100	15.4
100	15.5
100	15.3
500	77.6
	$\bar{x}$ =15.52±0.19

ตารางที่ 4 Proximate analysis แสดงเปอร์เซ็นต์ ความชื้น เถ้าไขมัน โปรตีน และ คาร์โบไฮเดรต ของเนื้อเมล็ด *J. Podagrica*

(%)	เนื้อในเมล็ด (Seed kernel)	เนื้อในเมล็ดที่สกัดน้ำมันแล้ว (De-oiled seed kernel)	*J. curcas**
ความชื้น	3.51	3.51	5.54
เถ้า	7.74	7.74	4.5
ไขมัน	30.87	8.97	47.25
โปรตีน	28.74	28.74	24.6
คาร์โบไฮเดรต	29.14	51.05	7.99

* Akintayo ET., 2004

ตารางที่ 5 ชนิดกรดไขมันในน้ำมันของ *Jatropha podgrica.*

Fatty acids	%
Lauric acid (C12:0)	0.02
Myristic acid (C14:0)	0.13
Pentadecanoic acid (C15:0)	0.01
Palmitic acid (C16:0)	8.51
Heptadecanoic acid (C17:0)	0.09
Stearic acid (C18:0)	5.57
Arachidic acid (C20:0)	0.18
Behenic acid (C22:0)	0.04
Tricosanoic acid (C23:0)	0.02
Lignoceric acid (C24:0)	0.05
Saturated Fat	14.62
Palmitoleic acid (C16:1)	0.16
Oleic acid	14.71
Eicosenoic acid (C20:1)	0.09
Monounstaturated fatty acid	14.97
Linoleic acid (C18:2)	70.15
Alpha-Linolenic acid (C18:3)	0.24
Eicosadienoic acid (C20:2)	0.02
Polyunsaturated fatty acid	70.41
Unsaturated fat	85.38

ตารางที่ 6 ตารางเปรียบเทียบองค์ประกอบ fatty acid ของ

J. podagrica และ *J. curcas*

Fatty acids	*J. podagrica*	*J. curcas*
Palmitic	8.51	14.19
Stearic	5.57	6.76
Oleic	14.71	46.09
Linoleic	70.15	31.54
Linolenic	0.24	-
Saturated	14.62	21.38
Unsaturated	85.38	78.61

4.6 องค์ประกอบ fatty acid ของ *J. Podagrica* และ *J. curcas*

J. podagrica มีกรด linoleic เป็น predominant และเป็นองค์ประกอบสูงที่สุด 70.15% สบู่ดำมีเพียง 31.54 % แต่สบู่ดำมีกรด Oleic 46.09% มีค่าเป็น 3 เท่าของ *J. podagrica* เมื่อเปรียบเทียบค่า Unsaturated พบว่า *J. podagrica* มีค่า 85.38% ซึ่งสูงกว่า สบู่ดำ มี ค่า 78.61 %

ตารางที่ 7 Chemical Properties of *J. Podagrica* seed oil

Item	Value	Analysis method
Iodine number	134.11 g/100g	AOCS Cd 1d-92 (1997)
Saponification value	186.70 mgKOH/g	AOCS Cd 3-25 (2003)
Free fatty acids	0.91 g/100g	AOCS Ca 5a-40(1997)

4.7 คุณสมบัติทางเคมีบางประการของน้ำมันจากเมล็ด *J. podagrica*

การวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ค่า Free fatty acids (FFA), Iodine numberและ Saponification value

ค่า FFAคือค่าไขมันอิสระในน้ำมันซึ่งเป็นดัชนีบ่งบอกคุณภาพของน้ำมันพืชถ้ามีค่าสูงจะทำให้เกิดการยับยั้งการเปลี่ยนของ triglycerides ไปเป็น ไบโอดีเซล เผาไหม้ยากไม่เหมาะที่จะนำมาใช้งานที่อุณหภูมิต่ำกว่า 11 oC เพราะจะทให้น้ำมันแข็งตัวในเครื่องยนต์ได้ ดังนั้น FFA จึงเป็นตัวแปรสำคัญในการผลิตไบโอดีเซล ผลการวิเคราะห์พบว่าน้ำมันเมล็ดของ *J. Podagrica* มีค่า FFA เพียง 0.91 g/100g

Iodine number เป็นค่าบอกถึงความมีเสถียรภาพทางเคมีของน้ำมัน ถ้ามีค่าสูงก็มีแนวโน้มว่าน้ำมันชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพง่ายค่า Iodine ตามมาตรฐาน EN1411 ระบุไว้ไม่เกิน 120 กรัม Iodine ต่อ 100 กรัมน้ำมัน พบว่าน้ำมันเมล็ดของ *J. podagrica* มีค่า Iodine number 134.11 g/100g

Saponification value คือจำนวนมิลลิกรัมของด่าง เช่น โพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ KOH ที่ใช้ทำปฏิกริยากับไตรกลีเซอร์ไรด์ในน้ำมัน1 กรัมอย่างสมบูรณ์ได้เป็นสบู่ซึ่งเป็นเกลือของกรดไขมัน พบว่าน้ำมันเมล็ดของ *J. podagrica* มีค่า Saponification value เท่ากับ186.70 mgKOH/g

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบค่า Iodine number, Saponification value และ Free Fatty Acid ระหว่าง *J.podagrica* และ *J.curcas*

Item	*J.podagrica*	*J.curcas*
Iodine number	134.11	90.8-112.25
Saponification value	186.70	188-198
Free Fatty Acid	0.91	6.85-14

4.8 เปรียบเทียบค่า Iodine number, Saponification value และ Free Fatty Acid ระหว่าง *J.podagrica* และ *J.curcas*

จากตารางที่ 80 จะเห็นได้ว่า *J.podagrica* มีค่า Saponification value ใกล้เคียงกับสบู่ดำ (*J. curcas*) แต่ค่า Iodine number สูงกว่า 1.12 เท่า และค่า Free Fatty Acid ต่ำกว่า 15.34 เท่า

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

J. padagrica เป็นพืชที่มีความคล้ายคลึงกับสบู่ดำ ลักษณะต้นและเมล็ด ที่ผล 1 ผล มีเมล็ด 3 เมล็ด และเมล็ดเมื่อนำมาเพาะปลูกจะมีการเจริญเติบโต้เป็นต้นได้ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ *J. podagrica*ให้ผลเร็วกว่า *J. curcas* สามารถเก็บผลได้ในเวลา 6 เดือน ขณะที่สบู่ดำได้ใช้เวลา 8 เดือน ผลออกตลอดปี อย่างไรก็ตามยังมีผลผลิตในปีแรกต่ำ (20 กรัม/ต้น) ต่อมาเมื่อเก็บข้อมูลผลผลิตปีที่สอง มีผลผลิตต่อต้นเพิ่มสูงขึ้น (34.01 กรัม/ ต้น) ดังนั้นควรเก็บข้อมูลผลผลิตมีความสัมพันธ์กับอายุต้น เช่นสบู่ดำผลผลิตจะคงที่เมื่ออายุต้น 7 ปี

เมื่อเปรียบเทียบสบู่ดำ ข้อมูลค่าความชื้นต่ำกว่า มีเถ้ามากกว่า 1.75 เท่า ปริมาณโปรตีน มากกว่า 1.16 เท่า คาร์โบไฮเดรตมากกว่า 3.6 เท่า

J. podagrica มีผลผลิตน้ำมัน 380 ml/kg ซึ่งมากกว่าสบู่ดำ 1.52 เท่า ซึ่งมีผลผลิตเพียง 250 ml/kg

รูปแบบองค์ประกอบของกรดไขมัน ของ *J. Podagrica* มี linoleic เป็น predominant ซึ่งมีองค์ประกอบคล้ายน้ำมันทานตะวันสายพันธุ์ linoleic สูง ในขณะที่สบู่ดำมี oleic ในปริมาณที่สูง น้ำมันของทั้ง *J. podagrica* และ *J. curcas* จัดอยู่ใน Oleic-linoleic group เป็นกรดไขมันที่สำคัญคือช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ (Boelhouwer 1983) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า ลำต้น ใบ ล้วนเมล็ดมีพิษ ท๊อกซิน (Toxin) ชนิดหลักที่พบคือ Curcin ซึ่งคล้ายคลึงกับ ricin ในละหุ่ง

น้ำมันจากเมล็ด *J.podagrica* มีค่า Saponification value, ค่า Free Fatty Acid และ Iodine number เท่ากับ 186.70 mgKOH/g, 0.91 g/100g และ 134.11 g/100g ตามลำดับ จากข้อมูลที่วิเคราะห์ได้ในการศึกษานี้ ค่า FFA ที่ต่ำเป็นปัจจัยที่คาดว่าน้ำมันเมล็ด *J.podagrica* มีคุณสมบัติเหมาะต่อการเตรียมไบโอดีเซล แต่อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบสมบัติการเป็นไบโอดีเซลก่อน

เอกสารอ้างอิง

ชำนาญ ฉัตรแก้ว., (2549), สบู่ดำ พืชพลังงาน: เอกสารวิชาการ. ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง :กรุงเทพฯ.

ดวงพร เปรมจิต กฤษณะ ทองบ่อ รวิศกุล โพธิรุกขา และ ศิริพงษ์ เปรมจิต(2551). การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำโดยวิธีมิวเทชันด้วยสารเคมี: ผลของสารอัลฟาโบรโมแนปทาลีนต่อลักษณะทางสัณฐานของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลก. การประชุมวิชาการ งานเกษตรแห่งชาติ 8-10 กันยายน คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

ดวงพร เปรมจิต พรรนิดา สิงห์ทอง และศิริพงษ์ เปรมจิต. (2552). การชักนำออโตเทตราพลอยด์ในสบู่ดำ. การประชุมวิชาการ งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 7 วันที่ 29-30 กรกฎาคม 2552 คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

ศูนย์ข้อมูลพืช สำนักวิชาการ-วิจัย องค์การสวนพฤกษศาสตร์. (2554) หนุมานนั่งแท่น. สืบค้นเมื่อ 27 กันยายน 2554. จาก : http://www.qsbg.org

Akbar E., Yaakob Z., Kamarudin KS., Isamil M and Salimon J., (2009), Charateristic and Composition of *Jatrpha curcas* Oil Seed from Malaysia and its Potential as Biodiesel Feedstock. European Journal of Scientific Research, 29 (3): 396-403.

Akintayo, ET. 2004. Characteristics and composition of Parkia biglobbossa and JatrophaCurcas oils and cakes. Bioresource. Technol., 92: 307-310.

Aiyelaagbe OO., Adesogan EK, Ekundayo O and Adeniyi BA., (2000), The antimicrobial activity of roots of *Jatropha podagrica* (Hook) Phytotherapy Research.;14(1):60–62.

Aiyelaagbe OO., Adeniyi BA., Fatunsin OF. and Arimah BD., (2007), *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Jatropha curcas* roots. International Journal of Pharmacology.;3(1):106–110.

Aiyelaagbe OO. and Gloer JB., (2008), Japodic Acid, A Novel Aliphatic Acid from Jatropha podagrica Hook. Rec. Nat. Prod. 2:4; 100-106.

AOAC, 1990. Official Methods of Analysis of the AOAC. 15th Edn., Association of Official Analytical Chemists, Arlington VA.

Devappa RK., Makkar HPS. and Becker K., (2010), *Jatropha* toxicity: a review. J Toxicol Environ Health 13:476–507.

Joubert PH., Brown, JMM., Hay., IT, Sebata, PDB., (1984). Acute poisoining with *Jatropha curcas* (purging nut tree) in children. South African Medical Journal, 65: 729-730.

Makkar, H. P. S., Francis, G., & Becker, K. (2007). Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. Animal, 1(9), 1371–1391.

Ojewole J A O, O O Odebiyi. (1980) Neuromuscular and Cardiovascular Actions of Tetramethylpyrazine from the Stem of Jatroha Podagrica.

PlantaMedica:38:332-338.

Premjet D., Singthong P. and Premjet S., (2011). *Jatropha curcas* Linn. Improvement through Mutagenesis; Induction of Autotetraploidy by Colchicine and Alpha-bromonapthalene Treatment. The 5th Korea-Thailand-Indonesia Join Symposium on Biomass and Renewable Energy. May 31, 2011. Korea University.

Rumzhum, NN, Hossain S, Mohammad, AA, Mohammad SR., Choudhury, MH., and Mohamad AR.,(2012). Seconday Metabolites from *Jatropha podagrica* Hook. Journal of Physical Science, 23(1), 29-37

Schlechtriem, C., Ricci, M., Focken, U., & Becker, K. (2004). The suitability of the free living nematode *Panagrellus redivivus* as live food for first-feeding fish larvae. Journal of Applied Ichthyology, 20(3), 161–168.

Shah, S., Sharma, A. and Gupta, M. N., (2004), Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by enzyme assisted three phase partitioning. Industrial Crops and Products 20, 275–279

Ojewole J A O, O O Odebiyi. (1980) Neuromuscular and Cardiovascular Actions of Tetramethylpyrazine from the Stem of Jatroha Podagrica. PlantaMedica:38:332-338

โครงการย่อยที่ 4

การสร้างสายพันธุ์ลูกผสมข้ามชนิดของสบู่ดำและละหุ่ง : การแยกและหลอมรวมโปรโตพลาสต์

Production of Intergeneric Hybrid between *Jatropha curcas* L. and *Ricinus communis* : Protoplast Isolation and Fusion

บทที่ 1

บทนำ

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) จัดอยู่ในวงศ์ Euphobiaceae เป็นพืชพลังงานที่ไม่ใช่พืชอาหาร รวมถึงน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล ทำให้สบู่ดำกลายเป็นพืชพลังงานที่มีศักยภาพในการผลิตเป็นพลังงานทดแทนได้ (Openshaw, 2000) อีกทั้งสบู่ดำยังเป็นพืชที่ทนทานต่อความแห้งแล้ง แต่สบู่ดำยังไม่สามารถผลิตเป็นการค้าได้ เนื่องจากให้ผลผลิตไม่สม่ำเสมอ เก็บเกี่ยวได้ไม่พร้อมกันทำให้เสียเวลาในการเก็บเกี่ยว และมีสารพิษในเมล็ด แต่เนื่องด้วยความนิยมของสบู่ดำทีเพิ่มขึ้น การพัฒนาสายพันธุ์จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการปรับปรุงพันธุกรรมของสบู่ดำ ซึ่งหลายประเทศได้พัฒนาสบู่ดำสำหรับนำเมล็ดผลิตน้ำมัน ซึ่งความสำเร็จของการพัฒนาสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Zhang et al, 2011) ดังนั้นการสร้างสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ โดยการผสมเซลล์ (somatic hybridization) จึงเป็นการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ด้วยวิธีรวมสารพันธุกรรมของพืชทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกัน เพื่อสร้างพืชข้ามสายพันธุ์/สกุล ซึ่งเหมาะสำหรับพืชที่ไม่สามารถผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ โดยมีการย่อยผนังเซลล์ (cell wall) ของเซลล์พืชด้วยเอนไซม์จนได้เซลล์เดี่ยวๆ ของพืชที่มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrance) ห่อหุ้มองค์ประกอบของเซลล์ไว้เรียกว่า โปรโตพลาสต์ ซึ่งง่ายต่อการนำเอาเซลล์ที่ไร้ผนังเซลล์ทั้ง 2 เซลล์มารวมกัน ซึ่งเทคนิคการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์และการสร้างพืชพันธุ์ใหม่จากพืชต่างสกุล ซึ่งภายหลังจากการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนของสบู่ดำน่าจะมีความสามารถชักนำพืชต้นใหม่เช่นกัน ดังนั้นการชักนำให้โปรโตพลาสต์มีความสามารถในการเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์จึงมีความแปรผันตามแหล่งที่นำมาแยก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบอ่อนของสบู่ดำ ได้แก่ สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และวิธีการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต การสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ และการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งโดยสารโพลีเอทิลีนไกลคอน (PEG)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสูตรอาหารที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต การสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนสบู่ดำ
2. เพื่อศึกษาเทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมในการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งโดยวิธีการใช้สารเคมี PEG (polyethylene glycol)

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

การเตรียมโปรโตพลาสต์สำหรับการเพาะเลี้ยง

1. นำโปรโตพลาสต์มาทำให้สะอาดด้วยสารละลายซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ โดยดูดสารละลายซูโครส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วใช้พลาสเจอปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ซึ่งแขวนลอยอยู่ในสารละลาย washing solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ค่อยๆ ปล่อยโปรโตพลาสต์ลงบนผิวหน้าของซูโครส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โปรโตพลาสต์ที่บริสุทธิ์ จะเห็นแถบด้านบนของสารละลายซูโครส ดูดโปรโตพลาสต์ที่บริสุทธิ์ออกมาใส่ในหลอดเซนตริฟิวใหม่

2. หลังจากล้างโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลาย washing solution นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 750 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง เพื่อล้างสารละลายซูโครสออกให้หมด ปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ตามต้องการในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อไป

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตรต่างๆ

ศึกษาสูตรอาหารที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต การสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนสบู่ดำทำการทดลองเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ กัน จำนวน 5 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 ½MS, pH 5.6

สูตรที่ 2 MS (Murashige and Skoog, 1962) , pH 5.6

สูตรที่ 3 MS+0.2% (w/v) casamino acid + 1.0g MES + 9% (w/v) mannitol, pH 5.6

สูตรที่ 4 MS+1060 mg/l $CaCl_2.2H_2O$ + 1.0g MES + 9% (w/v) mannitol, pH 5.6

สูตรที่ 5 CPW (Frearson et al, 1973), pH 5.6

สูตรที่ 6 washing solution, pH 5.6

การทดลองสูตรละ 4 ซ้ำ ในจานแก้ว เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ ได้แก่ ตรวจสอบอัตราการรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์โดยใช้สีย้อม Congo red และตรวจสอบการแบ่งเซลล์ (dividing efficiency) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5, 7 และ 14 วัน

วิธีตรวจสอบความมีชีวิต (Darvishi et al, 2006)

1. เตรียมสารละลาย Trypan blue ให้มีความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (โดยชั่งสี trypan blue 0.02 กรัม และฟีนอล 10 กรัม ละลายในกลีเซอรีน 10 มิลลิลิตรและกรดแลคติค 10 มิลลิลิตร) (Freshney, 1987)

2. จากนั้นหยดสารละลาย Trypan blue จำนวน 90 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ที่มีตัวอย่างโปรโตพลาสต์ 10 ไมโครลิตร ปิดด้วยกระจกปิดไสลด์

3. หลังจากนั้นทิ้งไว้ ประมาณ 1-2 นาที นับจำนวนโปรโตพลาสต์ด้วยไสลด์นับเซลล์ (hemocytometer) โปรโตพลาสต์ที่ไม่มีชีวิตจะย้อมติดสีน้ำเงิน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า สุ่มนับจำนวนโพรโตพลาสต์ที่มีชีวิต (ไม่ติดสีน้ำเงิน) โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต ดังนี้

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด - จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ติดสีน้ำเงิน}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

วิธีตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์

1. เตรียมสารละลาย Congo Red (Sigma, USA) ให้มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยชั่งสี Congo Red 0.01 กรัม น้ำ 10 มิลลิลิตร

2. จากนั้นหยดสารละลาย Congo Red จำนวน 90 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ที่มีตัวอย่างโปรโตพลาสต์ 10 ไมโครลิตร ปิดด้วยกระจกปิดไสลด์

3. หลังจากนั้นทิ้งไว้ ประมาณ 1-2 นาที นับจำนวนโปรโตพลาสต์ด้วยไสลด์นับเซลล์ (hemocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า สุ่มนับจำนวนโพรโตพลาสต์ที่สร้างผนังเซลล์จะย้อมติดสีแดงเป็นวงรอบนอกเยื่อหุ้มเซลล์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$\text{cell wall formation (\%)} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ติดสีแดง}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

วิธีตรวจสอบการแบ่งเซลล์

สุ่มนับโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์โดยแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 เรียกว่า first cell division เป็นระยะที่โปรโตพลาสต์แยกออกเป็นสองเซลล์ (mitotic division) หรือเรียกว่า ระยะ Initial Plating Efficiency (IPE) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นเวลา 7-14 วัน (Marchant et al, 1997)

ระยะที่ 2 เรียกว่า Intermediate plating efficieny (MPE) โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็น microcolonied จำนวน 2-10 เซลล์ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นเวลาอีก 1 สัปดาห์ (Rezazadeh et al, 2011)

ระยะที่ 3 Final Plating Efficiency (FPE) โปรโตพลาสต์เจริญเป็น microcalluses (1–2 mm diam.) ซึ่งสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร เป็นเวลา 42 วัน (Marchant et al, 1997)

$$\text{อัตราการแบ่งเซลล์ (first cell division, \%)} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดที่ตรวจสอบ}} \times 100$$

การเตรียมโปรโตพลาสต์สำหรับการหลอมรวมโปรโตพลาสต์

ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนของสบู่ดำและแคลลัสจากละหุ่ง เพื่อใช้ในการติดตามและคัดเลือกลูกผสมที่มาจากแหล่งที่มีความแตกต่างกัน

การแยกโปรโตพลาสต์จากสบู่ดำโดยการใช้ใบอ่อนจำนวน 0.5 กรัม ย่อยในสารละลายเอนไซม์ cellulase onozuka R10 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับ pectolyase Y23 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายในสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้น 0.7 โมลลาร์ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และบัฟเฟอร์ MES ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 5.6) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ในที่มืด เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของละหุ่งโดยการใช้แคลลัสจำนวน 0.5 กรัม ย่อยในสารละลายเอนไซม์ cellulase onozuka R10 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับ macerozyme R10 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายในสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้น 0.7 โมลลาร์ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และบัฟเฟอร์ MES ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 5.6) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ในที่มืด เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

การหลอมรวมโปรโตพลาสต์

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของน้ำหนักมวลโมเลกุลของสารละลาย PEG ต่อการหลอมรวม โปรโตพลาสต์และความมีชีวิตระหว่างสบู่ดำและละหุ่ง ดัดแปลงจากการทดลองของ Durieu and Ochatt (2000)

ศึกษาอิทธิพลของของน้ำหนักมวลโมเลกุลของสารละลาย PEG จำนวน 2 ระดับ คือ 6000 และ 8000 โดยการนำโปรโตพลาสต์ของสบู่ดำและละหุ่งปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ให้ได้ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมารวมกันในอัตราส่วน 1:1 ใส่ในหลอดเซนตริฟิว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลาย washing solution ส่วนบนทิ้งไปเหลือไว้เพียง 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายหลอมรวม โปรโต พลาสต์ ประกอบด้วย PEG MW 6000 และ 8000 ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับซูโคส ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโลลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวใช้ระยะเวลาในการชักนำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ เป็นระยะเวลา 25 นาที จากนั้นเติมสารละลาย washing medium ซึ่งประกอบด้วย high Ca^{++}:0.8 M mannitol และ 0.1 M $CaCl_2.2H_2O$/high pH: 0.1 M Glycine, pH 10.5 ในอัตราส่วน 2:1 ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อดูดเอาสารละลายหลอมรวมโปรโตพลาสต์ออก ล้างด้วยสารละลาย CPW13M (pH 5.8) โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง หรือจนกระทั่ง pH เท่ากับ 5.8 นำโปรโตพลาสต์ที่ได้ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การหลอมรวมและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างสบู่ดำและละหุ่ง

การบันทึกผลการทดลอง

1. เปอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion โดยการนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดการรวมกันของ 2 โปรโตพลาสต์ และนับจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด ด้วย hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CH30) ที่กำลังขยาย 400x ทำการสุ่มนับ 6 fields แล้วหาค่าเฉลี่ย

$$\text{เปอร์เซ็นต์ binary fusion} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิด binary fusion}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

2. เปอร์เซ็นต์การเกิด multi fusion โดยการนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดการรวมกันของโปรโตพลาสต์จำนวน 3 โปรโตพลาสต์ขึ้นไป และนับจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด ด้วย hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CH30) ที่กำลังขยาย 400x ทำการสุ่มนับ 6 fields แล้วหาค่าเฉลี่ย

$$\text{เปอร์เซ็นต์ multi fusion} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิด muti fusion}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

การทดลองที่ 2 การศึกษาองค์ประกอบของสารละลายหลอมรวมโปรโตพลาสต์ที่มีผลต่อการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่ง

ศึกษาอิทธิพลของการศึกษาองค์ประกอบของสารละลายหลอมรวมโปรโตพลาสต์ จำนวน 5 สูตร (ตารางที่ 1) โดยการนำโปรโตพลาสต์ของสบู่ดำและละหุ่งปรับความหนาแน่นของโปรโต พลาสต์ให้ได้ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมารวมกันในอัตราส่วน 1:1 ใส่ในหลอด เซนตริฟิว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลาย washing solution ส่วนบนทิ้งไปเหลือไว้เพียง 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายหลอมรวมโปรโต พลาสต์ ตารางที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวใช้ระยะเวลาในการชักนำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ เป็นระยะเวลา 25 นาที จากนั้นเติมสารละลาย washing medium ซึ่งประกอบด้วย high Ca^{++}:0.8 M mannitol และ 0.1 M $CaCl_2.2H_2O$/high pH: 0.1 M Glycine, pH 10.5 ในอัตราส่วน 2:1 ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อดูดเอาสารละลายหลอมรวมโปรโต พลาสต์ออก ล้างด้วยสารละลาย CPW13M (pH 5.8) โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง หรือจนกระทั่ง pH เท่ากับ 5.8 นำโปรโตพลาสต์ที่ได้ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การหลอมรวมและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างสบู่ดำและละหุ่ง

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของสารละลายการหลอมรวมโปรโตพลาสต์โดยวิธีการใช้สารเคมี PEG

ส่วนประกอบ	สารละลายหลอมรวมโปรโตพลาสต์				
	1	2	3	4	5
PEG MW 6000 (% w/v)		15	30	40	50
Sucrose (% w/v)			4		
$CaCl_2.2H_2O$ (mM)	5	60	10	10.5	0.5
$KH_2PO_4.H_2O$ (mM)				0.7	
Mannitol (mM)	500	90			500
Glycine (mM)	3.753	25			
Reference	Durieu and Ochatt, 2000	Hu et al. 2002	Durieu and Ochatt, 2000	Prange et al. 2012	Assani et al. 2005

การทดลองที่ 3 การศึกษาเทคนิคที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์และระยะเวลาการชักนำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งโดยวิธีการใช้สารเคมี PEG

วิธีที่ 1 วิธี Macromethod

นำโปรโตพลาสต์ของสบู่ดำและละหุ่งปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ให้ได้ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมารวมกันในอัตราส่วน 1:1 ใส่ในหลอดเซนตริฟิว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลาย washing solution ส่วนบนทิ้งไปเหลือไว้เพียง 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายหลอมรวมโปรโตพลาสต์ ประกอบด้วย PEG MW 6000 ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับซูโคส ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโลลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ทำการทดสอบระยะเวลาการชักนำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ดังนี้ 10 15 20 25 และ 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย washing medium ซึ่งประกอบด้วย high Ca^{++}:0.8 M mannitol และ 0.1 M $CaCl_2.2H_2O$/high pH: 0.1 M Glycine, pH 10.5 ในอัตราส่วน 2:1 ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อดูดเอาสารละลายหลอมรวมโปรโตพลาสต์ออก ล้างด้วยสารละลาย CPW13M (pH 5.8) โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง หรือจนกระทั้ง pH เท่ากับ 5.8 นำโปรโตพลาสต์ที่ได้ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การหลอมรวมและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างสบู่ดำและละหุ่ง

วิธีที่ 2 วิธี Micromethod

นำโปรโตพลาสต์ของสบู่ดำและละหุ่งปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ให้ได้ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมารวมกันในอัตราส่วน 1:1 .ใส่ในหลอดเซนตริฟิว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลาย washing solution ส่วนบนทิ้งไปดหลือไว้เพียง 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายหลอมรวมโปรโตพลาสต์ ประกอบด้วย PEG MW 6000 ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับซูโคส ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น10 มิลลิโลลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิว ทำการทดสอบระยะเวลาการชักนำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ดังนี้ 10 15 20 25 และ 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย washing medium ซึ่งประกอบด้วย high Ca^{++}:0.8 M mannitol และ 0.1 M $CaCl_2.2H_2O$/high pH: 0.1 M Glycine, pH 10.5 ในอัตราส่วน 2:1 ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อดูดเอาสารละลายหลอมรวมโปรโตพลาสต์ออก ล้างด้วยสารละลาย CPW13M (pH 5.8) โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง หรือจนกระทัง pH เท่ากับ 5.8 นำโปรโตพลาสต์ที่ได้ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การหลอมรวมและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างสบู่ดำและละหุ่ง

บทที่ 3

ผลการทดลองการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ผลของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว 6 สูตร เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบอ่อนของสบู่ดำ (non-toxic No.5) ในอาหารทั้ง 6 สูตรพบอัตราการรอดชีวิต 83.31-96.82 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ (cell wall formation) 87.64-98.22 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) ซึงการสร้างผนังเซลล์ใหม่เกิดขึ้นภายใน 4 ชั่วโมง การตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์สามารถตรวจสอบได้โดยการย้อมโปรโตพลาสต์ด้วยสี Congo red โปรโตพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์จะเห็นสีแดงของผนังเซลล์เป็นวงรอบนอกเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 1C) โดยสี Congo red จะเข้าไปจับกับ amyloid fibrils ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลลูโลส เมื่อโปรโตพลาสต์มีการสังเคราะห์ผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ส่งผลให้โปรโตพลาสต์ติดสีแดง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นระยะเวลา 5 วัน โปรโตพลาสต์ยังไม่มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนของสบู่ดำในอาหารเหลวสูตรสูตรต่างๆ พบว่า อาหารสูตรที่ 4 ซึ่งประกอบด้วย อาหารสูตร MS ร่วมกับ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 1060 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ MES ปริมาตร 1.0 กรัม และ mannitol ความเข้มข้น 9% (w/v) ที่ pH 5.6 ส่งผลให้โปรโตพลาสต์มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 96.82 เปอร์เซ็นต์ และมีการสร้างผนังเซลล์ 98.22 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา 5 วัน ทั้งนี้เนื่องจากสารละลาย $CaCl_2.2H_2O$ ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ส่งผลให้ความเข้มข้นของสารละลาย $CaCl_2.2H_2O$ เพิ่มขึ้นเป็น 3.41 เท่าจากปริมาณสารละลาย $CaCl_2.2H_2O$ ปกติ Sasamoto et al (2003) กล่าวว่า Ca^{2+} ions ช่วยส่งเสริมการสร้างเส้นใยของผนังเซลล์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมเป็น 2-4 เท่าจากปริมาณปกติ ซึ่งปริมาณแคลเซียมที่เพิ่มขึ้นอาจมีส่วนสำคัญทำให้เนื้อเยื่อนั้นคงที่ กล่าวคือโปรโตพลาสต์สามารถมีกระบวนการเมทาบอลิซึมได้ปกติ (Chawla ,2002) ทั้งนี Chawla (2002) ยังได้รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในอาหารเหลวหรืออาหารแข็ง แต่บางครั้งโปรโตพลาสต์สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวก่อนย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

สำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เป็นะระยะเวลา 7 วัน พบว่า การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบอ่อนของสบู่ดำ (non-toxic No.5) ในอาหารสูตรที่ 6 ซึ่งประกอบด้วย ด้วยแมนนิทอล ที่ความเข้มข้น 0.7 M ร่วมกับ $CaCl_2.2H_2O$ ที่ความเข้มข้น 2.5 mM และ MES ที่ความเข้มข้น 5 mM pH 5.6 โปรโตพลาสต์มีขนาดใหญ่ขึ้น 1.86 เท่าของโปรโตพลาสต์ปกติ ออร์แกเนลล์ต่างๆ เกาะกลุ่มกันอยู่บริเวณผนังเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง และไม่พบการสร้างผนังเซลล์ (ภาพที่ 2A) และมีอัตราการแบ่งเซลล์เฉลี่ย (first cell division) 2.00 เปอร์เซ็นต์

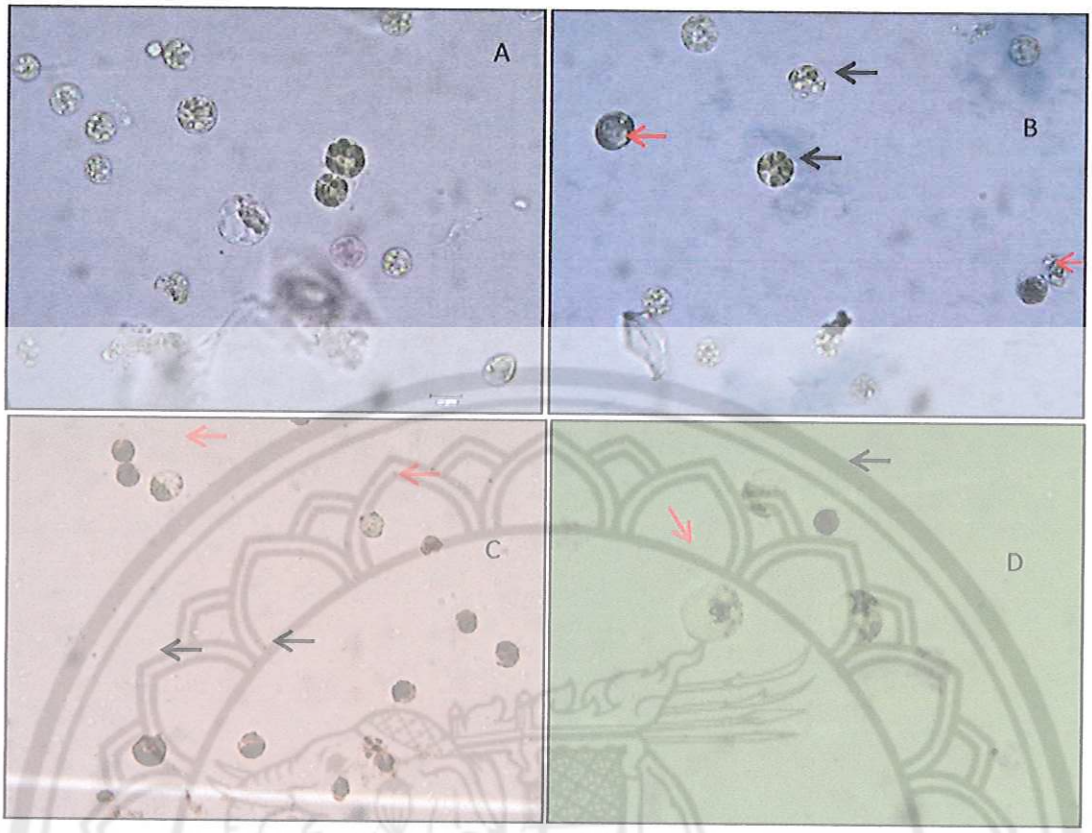
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไปเป็นระยะเวลา 14 วันในอาหารสูตรเดิม พบว่า อัตราการรอดชีวิตของโปรโตพลาสต์เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1 2 3 และ 4 ลดลง รวมถึงโปรโตพลาสต์ยังไม่มีการแบ่งเซลล์ และโปรโตพลาสต์ทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ในขณะที่การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 6 พบอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น 32.08 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1 ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 ผลของสูตรอาหารที่มีต่ออัตราการรอดชีวิต (viability) เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ (cell wall formation) และอัตราการแบ่งเซลล์ (first cell division) ของโปรโตพลาสต์สบู่ดำ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 7 และ 14 วัน

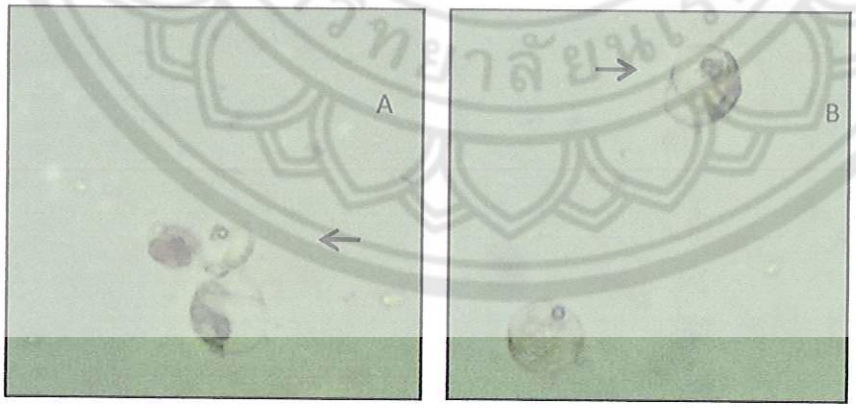
สูตรอาหาร	อัตราการรอดชีวิต (%)			เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ (%)			อัตราการแบ่งเซลล์ (% first cell division)		
	5	7	14	5	7	14	5	7	14
1	89.56±3.85^{b}	75.28±3.10^{b}	59.80±8.50^{c}	98.73±0.51^{ab}	97.98±1.84^{c}	96.15±1.11^{ab}	0	0	0
2	95.29±1.78^{a}	99.46±1.09^{a}	57.51±6.41^{c}	98.23±0.98^{ab}	99.75±0.50^{a}	57.50±6.41^{d}	0	0	0
3	94.52±0.77^{a}	100^{a}	71.10±2.49^{b}	96.94±1.50^{b}	93.65±8.15^{a}	71.10±2.49^{c}	0	0	0
4	96.69±1.53^{a}	100^{a}	0^{d}	98.22±0.66^{ab}	97.73±1.59^{a}	100^{a}	0	0	0
5	94.52±2.40^{a}	100^{a}	100^{a}	99.11±0.77^{a}	98.78±2.44^{a}	100^{a}	0	0	0
6	83.32±4.22^{c}	100^{a}	100^{a}	87.64±2.18^{c}	75.54±8.82^{b}	93.47±6.35^{b}	0	2.00$^{a/}$	32.08$^{b/}$
F-test	*	*	*	*	*	*			
% C.V.	2.95	1.40	6.93	1.28	5.43	4.46			

$^{a/}$ Cell division was measured after 7 days of culture and the data were expressed

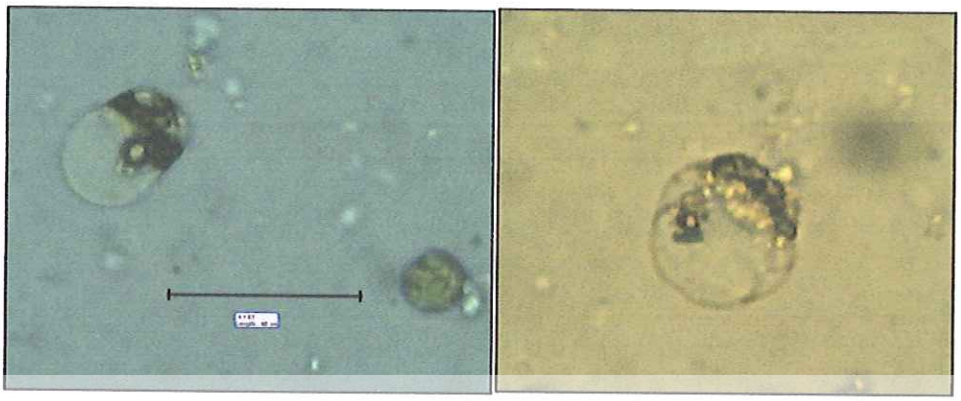
$^{b/}$ The Initial Plating Efficiency (IPE) was defined as the percentage of the originally plated protoplasts that had regenerated a cell wall and undergone at least one mitotic division after 14 days (Marchant et al, 1997)



ภาพที่ 1 โปรโตพลาสต์ของสบู่ดำในสารละลาย washing solution A) โปรโตพลาสต์ของใบอ่อนสบู่ดำ B) โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วยสี Tryphan Blue C) การสร้างผนังเซลล์เมื่อย้อมด้วยสี Congo red ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน (red arrow= non cell wall , black arrow=cell wall) ตรวจสอบด้วยกำลังขยายภาพ 400x D) การเพิ่มขนาดของโปรโตพลาสต์ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน



ภาพที่ 2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนของสบู่ดำในสารละลาย washing solution เป็นระยะเวลา 7 วัน A) First cell division B) Initial Plating Efficiency (IPE)



ภาพที่ 3 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนของสบู่ดำในสารละลาย washing solution ในระยะ Initial Plating Efficiency (IPE) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน (bar= 60 um)

สรุปผลการทดลอง

อาหารสูตร MS ร่วมกับ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 1060 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ MES ปริมาตร 1.0 กรัม และ mannitol ความเข้มข้น 9% (w/v) ที่ pH 5.6 มีประสิทธิภาพสูงสุดต่ออัตราการรอดชีวิต และการสร้างผนังเซลล์ ในขณะที่ สารละลาย washing solution ต่อการแบ่งเซลล์ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์สบู่ดำสามารถย้ายเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตรใหม่ที่มีสารควบคุมการเจริญการเติบโตเพื่อเพิ่มความสามารถในการแบ่งเซลล์ได้ ภายใน 5-7 วัน

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองของ Resustle and Natter (1997) ได้เติมสารละลาย PVP-40 ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ขององุ่นสูตร CPW-13 medium และ MS medium ก่อนทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 0 วัน (Day 0) พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นระยะเวลา 14 วัน พบ % plating efficiency 5.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อไม่มีการเติม PVP-40 ลงในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบ% plating efficiency 2.8 เปอร์เซ็นต์

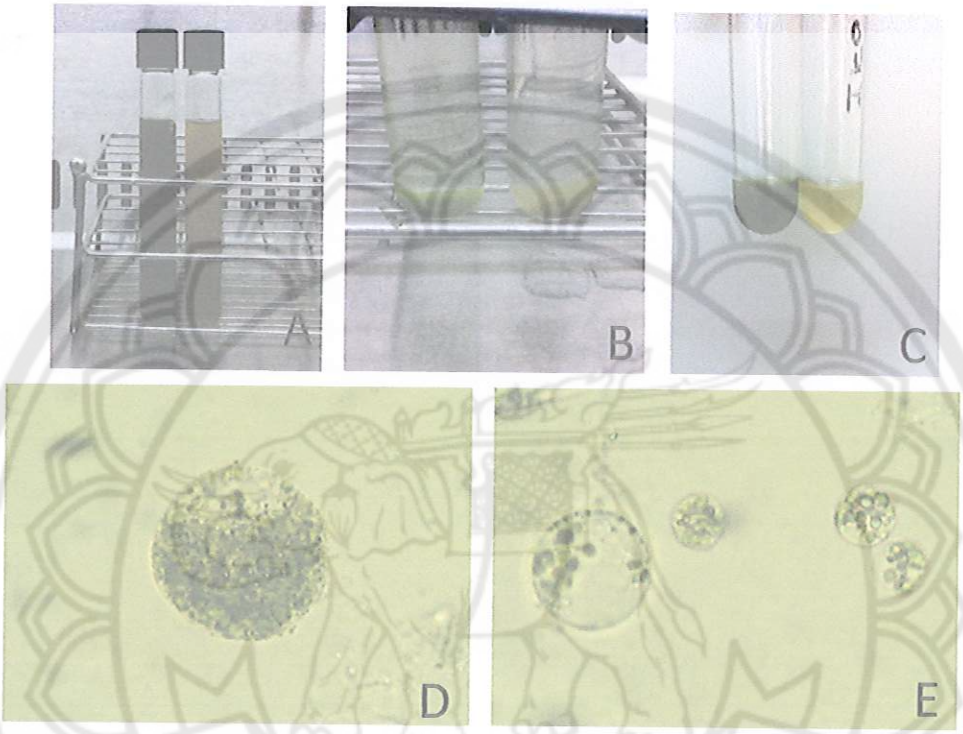
2. จากการทดลองของรงรอง วิเศษสุวรรณ ได้ทดสอบโดยการเติมผงถ่าน (Activity charcoal) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์สามารถลดการเกิดสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากเซลล์สร้างสาร phenolic compound ในระหว่างการเพาะเลี้ยง

3. อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ควรปรับลดสาร osmoticum ลงอย่างช้าๆ เพื่อไม่ให้โปรโตพลาสต์เกิดการ plasmolysis อีกครั้ง

4. ทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 6 (washing solution) โดยทดสอบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ของสบู่ดำ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลองของการหลอมรวมโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนของสบู่ดำด้วยสารละลายเอนไซม์ cellulase onozuka R10 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับ pectolyase Y23 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายในสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้น 0.7 โมลลาร์ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และบัฟเฟอร์ MES 5 มิลลิโมลาร์ (pH 5.6) และแคลลัสของละหุ่งด้วยสารละลายเอนไซม์ ได้โปรโตพลาสต์จำนวนเฉลี่ย $9.45\pm44.74 \times 10^6$ และ $1.33\pm2.31 \times 10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 4 การแยกโปรโตพลาสต์จากใบออ่นของสบู่ดำและแคลลัสของละหุ่ง

A-C) ขั้นตอนการเตรียมโปรโตพลาสต์

D) โปรโตพลาสต์จากที่แยกได้จากใบอ่อนของสบู่ดำ

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของน้ำหนักมวลโมเลกุลของสารละลาย PEG ต่อเปอร์เซ็นต์การหลอมรวมโปรโตพลาสต์และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตระหว่างสบู่ดำและละหุ่ง ดัดแปลงจากการทดลองของ Durieu and Ochatt (2000)

ผลการทดลองการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งโดยใช้สารละลาย PEG ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลที่แตกต่างกัน คือ PEG (MW 6000) และ PEG (MW 8000) โดยใช้สารละลาย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับซูโคส ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ระยะเวลาการหลอมรวมนาน 25 นาที พบว่าน้ำหนักมวลโมเลกุลของสารละลาย PEG มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยการใช้

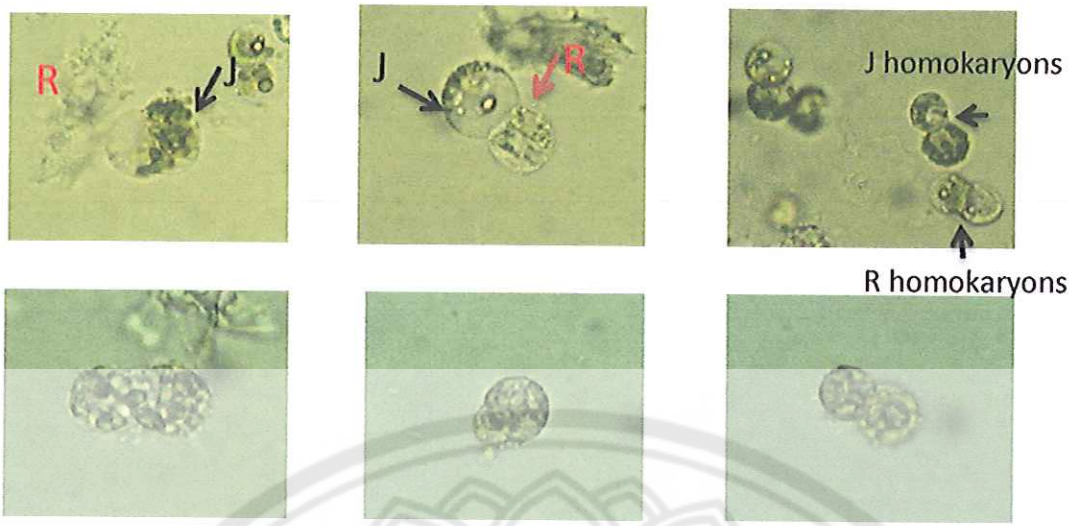
สารละลาย PEG ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 6000 (MW 6000) มีผลให้เกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การหลอมรวมโปรโตพลาสต์เฉลี่ย 6.88 เปอร์เซ็นต์ และพบการเกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์มาก กว่า 2 โปรโตพลาสต์ เฉลี่ย 0.29 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้สารละลาย PEG ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 8000 (MW 8000) มีเปอร์เซ็นต์การหลอมรวมโปรโตพลาสต์เฉลี่ยเพียง 2.98 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

สำหรับการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งโดยใช้สารละลาย PEG มีผลให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งพบว่า โปรโตพลาสต์ของใบอ่อนของสบู่ดำและแคลลัสของละหุ่งมีจำนวนความมีชีวิตก่อนการหลอมรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลาย PEG เฉลี่ย 77.83 ± 3.09 และ 75.00 ± 8.33 ตามลำดับ (ภาพที่ 1)ภายหลังจากการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่ง พบว่ามีจำนวนความมีชีวิตลดลงกว่าก่อนการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ ซึ่งในการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งด้วยสารละลาย PEG ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 6000 (MW 6000) มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่าการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งด้วยลายละลาย PEG ทีมีน้ำหนักมวลโมเลกุล 8000 (MW 8000) เฉลีย 58.33 และ 58.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การหลอมรวมโปรโตพลาสต์และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ได้จากการหลอมรวมโปรโตพลาสต์สต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งโดยใช้สารละลาย PEG พบว่าน้ำหนักมวลโมเลกุลของสารละลาย PEG 6000 เหมาะสมสำหรับการหลอมรวมโปรโตพลาสต์สต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่ง ซึ่งเป็นน้ำหนักมวลโมเลกุลที่สามารถกระตุ้นการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ได้และโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการหลอมรวมโปรโตพลาสต์มีอัตราความมีชีวิตสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลาย PEG ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 8000 นอกจากนี้ลูกผสมที่ได้สามารถเกิดได้ทั้งการรวมกันของ 2 โปรโตพลาต์ และเกิดการรวมกันของโปรโตพลาสต์มากกว่า 2 โปรโตพลาสต์ (ภาพที่ 5) ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลาย PEG น้ำหนักมวลโมเลกุล 6000 ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การหลอมรวมโปรโตพลาสต์และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งโดยใช้สารละลาย PEG ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลที่แตกต่างกัน

น้ำหนักมวลโมเลกุลของสารละลาย PEG	การหลอมรวมโปรโตพลาสต์ (%)		เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (%)
	Binary fusion	Multi fusion	
6000	6.88	0.29	58.33
8000	2.98	0.00	58.12



ภาพที่ 5 ลักษณะการหลอมรวมโปรโตพลาสต์แบบ "Binary fusion" ระหว่างสปู่ดำและละหุ่งด้วยสารละลาย Polyethelene glycol (MW 6000) A-C) ลักษณะการเกิด Binary fusion แบบ homokaryons และ D-F) ลักษณะการเกิด Binary fusion แบบ heterokaryons

การทดลองที่ 2 การศึกษาองค์ประกอบของสารละลายหลอมรวมโปรโตพลาสต์ที่มีผลต่อการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสปู่ดำและละหุ่ง

ผลการทดลองการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสปู่ดำและละหุ่งที่มีองค์ประกอบของสารละลายหลอมรวมโปรโตพลาสต์ (fusion solution) ที่แตกต่างกันจำนวน 5 สูตร ทำการชักนำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์เป็นระยะเวลา 25 นาที พบว่าองค์ประกอบของสารหลอมรวมโปรโต พลาสต์มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสปู่ดำและละหุ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยการใช้สารละลาย fusion solution 3 ที่ประกอบด้วย PEG (MW 6000) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับซูโคส ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีผลให้เกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์สูงที่สุด รองลงมาคือ การใช้สารละลาย สารละลาย fusion solution 4 ที่ประกอบด้วย PEG (MW 6000) ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 10.5 มิลลิโมลาร์ และ $KH_2PO_4.H_2O$ ความเข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างสปู่ดำและละหุ่งที่ผ่านการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลาย fusion solution 2 ที่ประกอบด้วย PGE (MW 6000) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ แมนนิทอล ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ และ Glycine ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 3)

เมื่อพิจารณาส่วนประกอบในสารละลายหลอมรวมโปรโตพลาสต์พบว่า การสร้างสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างสปู่ดำและละหุ่งด้วยสารเคมี PEG นอกจากการพิจารณาจากน้ำหนักมวลโมเลกุลแล้ว ยังต้องคำนึงถึงส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้เนื่องจากมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การหลอมรวม โปรโตพลาสต์และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลูกผสม จากผลการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์การหลอมรวมโปรโตพลาสต์นั้นขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของ PEG กล่าวคือ สารละลาย fusion solution ที่ไม่ได้เติม PEG พบเปอร์เซ็นต์การหลอมรวมโปรโตพลาสต์ต่ำที่สุด เมื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของสารละลาย PEG สูงขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การหลอมรวมโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้นแต่กลับพบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลง ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของสายพันธุ์

ลูกผสมนั้นขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของ $CaCl_2.2H_2O$ เนื่องจากเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ $CaCl_2.2H_2O$ สูงขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลูกผสมเพิ่มสูงขึ้น Chawla (2002) ได้กล่าวการแตกของผนังเซลล์ระหว่างการแยกโปรโตพลาสต์ส่งผลทำให้เกิดการรวมกันของโปรโตพลาสต์เกิดขึ้นได้เอง เนื่องจากในระหว่างการย่อยผนังเซลล์ทำให้บริเวณ plasmodesmata นั้นเกิดการขยายตัวส่งผลให้โปรโตพลาสต์เกิดการหลอมรวมกันได้ สำหรับสายโมเลกุลของ PEG มีขนาดใหญ่ที่สามารถเชื่อมโปรโตพลาสต์ให้มาเข้าใกล้กัน เช่นเดียวกับการเติมสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างและมีปริมาณแคลเซียมสูง (high pH-high Ca++ ions) ส่งผลให้บริเวณรอบๆ เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีประจุลบมีสถานะเป็นกลาง ทำให้ประจุเป็นปกติ โปรโตพลาสต์จึงเข้ามาเชื่อมติดกันได้ สำหรับระดับความเข้มข้นของ PEG และระยะเวลาในการหลอมรวมโปรโตพลาสต์นั้นจะส่งผลต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์และการแบ่งเซลล์

Assani et al (2005) ได้ศึกษาวิธีการการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ด้วยสารเคมี PEG และใช้กระแสไฟฟ้า จากผลการทดลองพบว่าการหลอมรวม โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากกล้วยด้วยวิธีการใช้สารเคมีให้เปอร์เซ็นต์การหลอมรวมมากกว่าการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ด้วยกระแสไฟฟ้า รวมถึงอัตราการแบ่งเซลล์ลูกผสมภายหลังจากการรวม โปรโตพลาสต์ด้วยสารเคมีเกิดขึ้นได้ดีกว่า

ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลาย fusion solution 3 ที่ประกอบด้วย PEG (MW 6000) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับซูโคส ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การหลอมรวมโปรโตพลาสต์และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของลูกผสมระหว่างสบู่ดำและละหุ่งเมื่อใช้องค์ประกอบของสารละลายหลอมรวมโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

Fusion solution	Binary fusion rate (%)	Multi fusion rate (%)	Viability (%)
1	1.81	0.00	27.78
2	3.63	0.89	64.46
3	6.88	0.29	58.33
4	4.38	0.00	45.00
5	2.59	0.60	40.00

การทดลองที่ 3 การศึกษาเทคนิคที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์และระยะเวลาการชักนำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งโดยวิธีการใช้สารเคมี PEG

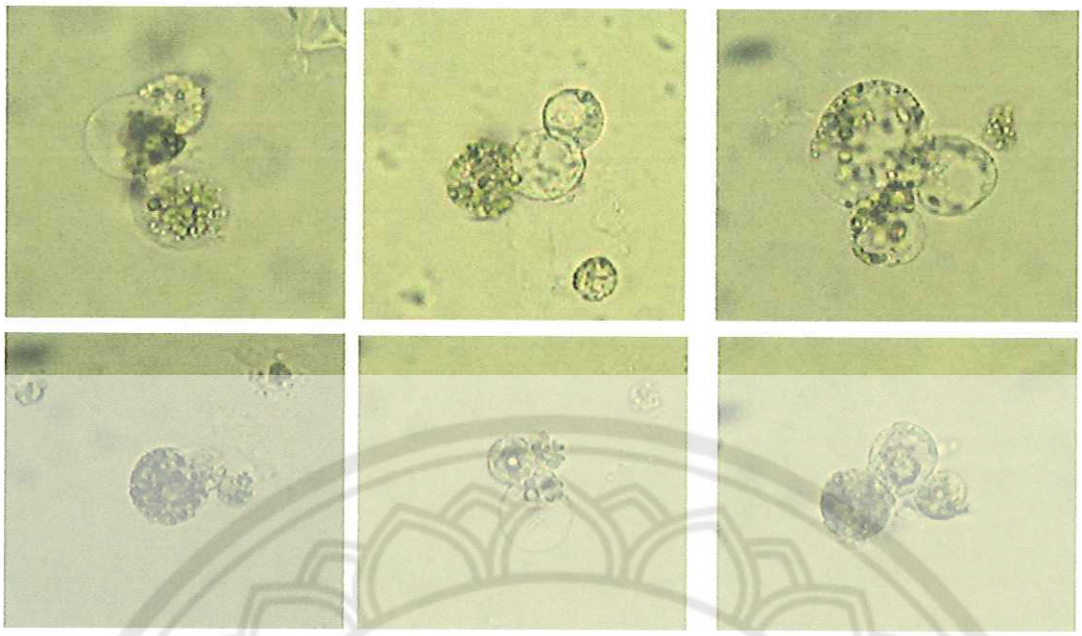
การพัฒนาเทคนิคการชักนำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งโดยวิธีการใช้สารเคมี PEG โดยการศึกษา 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 วิธีการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน 2 วิธี คือ macro method และ micro method และปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการชักนำให้เกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ เพื่อพัฒนาวิธีการในการชักนำให้เกิดการหลอมรวมที่มีประสิทธิภาพและสามารถส่งผลให้เกิดเปอร์เซ็นต์การหลอมรวมสูงสุด ได้ผลการทดลองดังนี้

วิธีการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ด้วยวิธี macro method และ micro method มีผลต่อเปเปอร์เซ็นต์การเกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งแบบ binary fusion และ multi fusion แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 3) โดยวิธีการหลอมรวม โปรโตพลาสต์ด้วยวิธี macro method พบเปอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion และ multi fusion เท่ากับ 7.62 และ 0.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่วิธีการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ด้วยวิธี micro method พบเปอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion เพียงอย่างเดียว 1.48 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4)

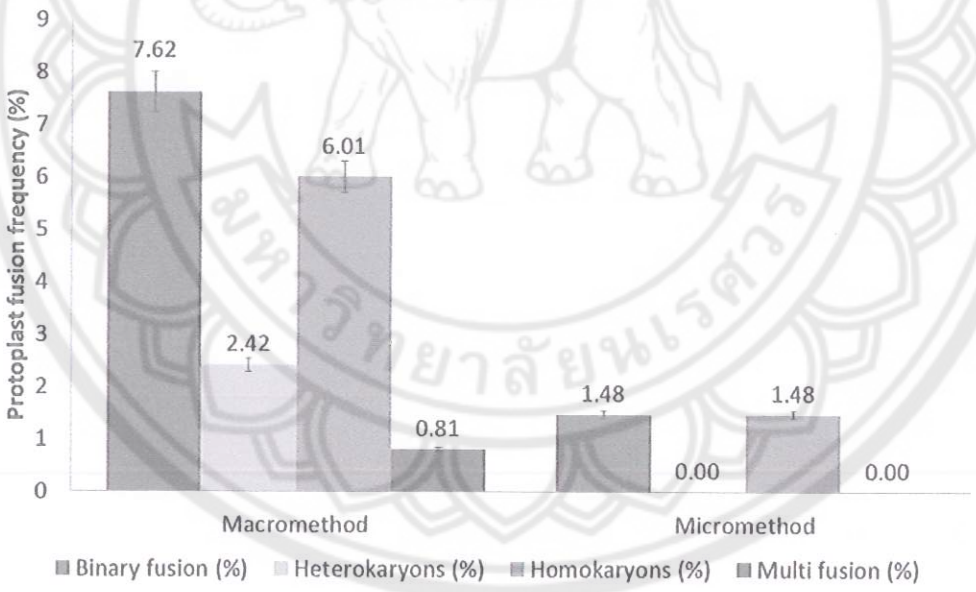
สำหรับเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของสายพันธุ์ลูกผสมของทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งพบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเท่ากับ 66.89-77.87 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5)

ระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การหลอมรวมโปรโตพลาสต์และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของสายพันธุ์ลูกผสมลดลง เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ด้วยวิธี macro method ที่นานขึ้นส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการฉีกขาดโปรโตพลาสต์จีกแตกได้ง่าย อีกทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ที่นานขึ้นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตนั้นลดลงเช่นกัน (ภาพที่ 6-7) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Beránek et al (2007) ได้รายงานว่าการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *Brassica carinata* และ *B. Rapa* โดยใช้สารเคมี PEG พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการหลอมรวม โปรโตพลาสต์ที่นานขึ้นส่งผลให้ความมีชีวิต การพัฒนาของผนังเซลล์ การแบ่งเซลล์และการพัฒนาของ microcolonies นั้นเกิดขึ้นลดลง เช่นเดียวกับการทดลองของ Guan et al (2010) ได้ใช้สารเคมี PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ในการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างพืชวงศ์ขิงเป็นระยะเวลา 30 นาที ส่งผลต่อให้โปรโตพลาสต์ตาย

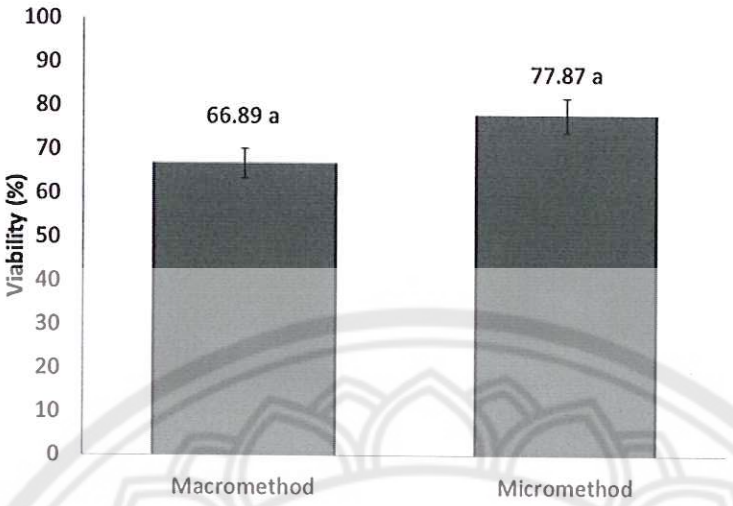
อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตภายหลังจากการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งด้วยสารเคมี PEG โดยวิธี macro method ที่ระยะเวลาในการชักนำการหลอมรวม โปรโตพลาสต์ 15 นาที พบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 71.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



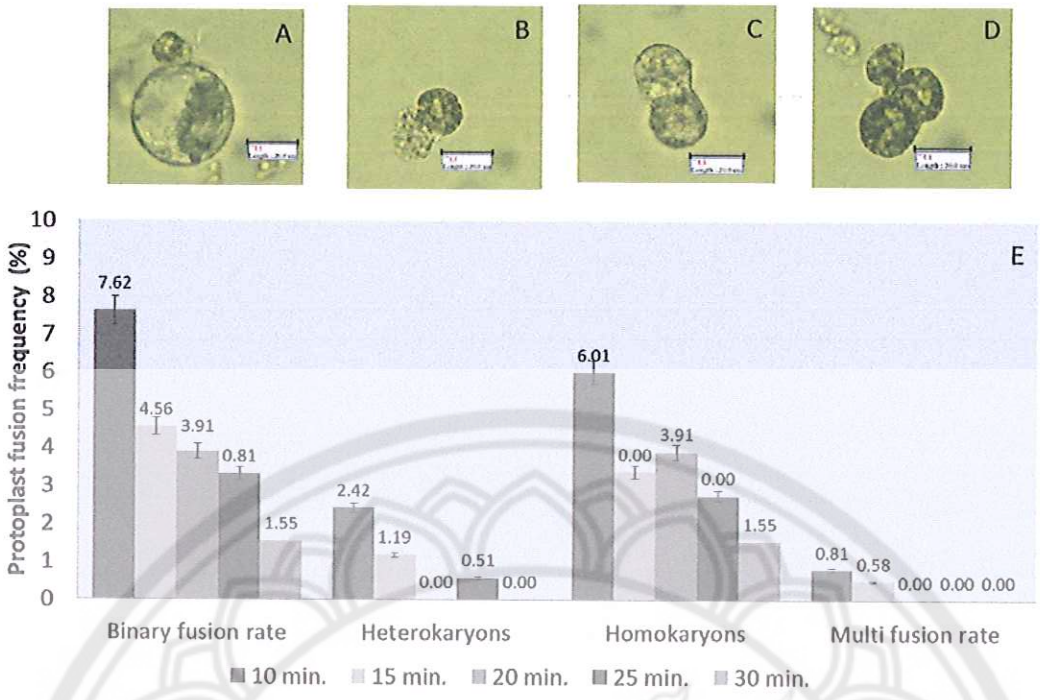
ภาพที่ 6 ลักษณะการหลอมรวมโปรโตพลาสต์แบบ "Multi fusion" ระหว่างสปูดำและละหุ่งด้วยสารละลาย Polyethylene glycol (MW 6000)



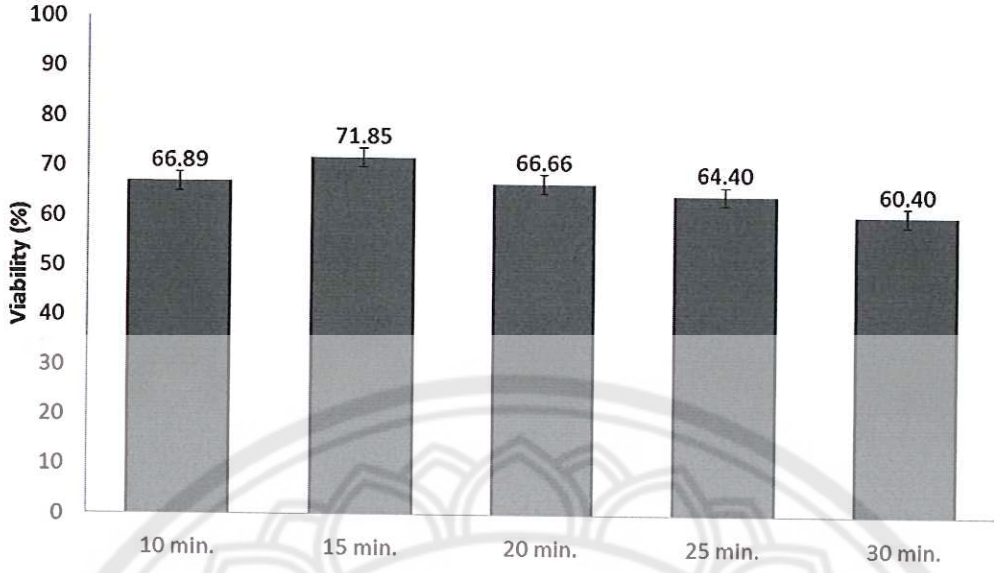
ภาพที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสปูดำและละหุ่งแบบ binary fusion และ multi fusion



ภาพที่ 8 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่ง เมื่อใช้การหลอมรวมโปรโตพลาสต์โดยวิธี macromethod และ Micromethod ในสารละลาย fusion solution 3



ภาพที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์แบบ binary fusion heterokaryons Homokaryons และ multi fusion ระหว่างสปู่ดำและละหุ่งเมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำให้เกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งโดยใช้ระยะเวลาในการหลอมรวมที่แตกต่างกัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การสร้างการสร้างสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างสบู่ดำและละหุ่งโดยวิธี macromethod ในสารละลาย fusion solution ที่ประกอบด้วย PEG (MW 6000) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับซูโคส ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และ $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 10 mM ระยะเวลาในการชักนำให้เกิดการหลอมรวม เป็นเวลา 10 นาที ส่งผลให้การเกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสบู่ดำและละหุ่งแบบ binary fusion (heterokaryons and homokaryons) และ multi fusion สูงสุด 7.62 เปอร์เซ็นต์ และพบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 66.89 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำกรับนำไปใช้ในการรวมโปรดตพลาสต์เพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมให้ได้จำนวนมากเพื่อการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Assani A, Chabane D, Cour RH, Bakry F, Wenzel G and Foughi-Wehr B. 2005. Protoplast fusion in banana (*Musa* spp.): comparison of chemical (PEG: Polyethylene glycol) and electrical procedure. Plant Cell Tiss. Org. Cult. Culture. 83: 145–151.

Beránek M, Bechyaé M, and Klíma M. 2007. Protoplast isolation and fusion between *Brassica carinata* braun and *B. rapa* L. Agriculturea Yropica et Subtropica. 40:1-6.

Bourgin, J.P and Missonier, C. 1978. Culture of haploid mesophyll protoplasts from Nicotiana alata. Z. Pflanzenphysiol. Bd., 87, pp. 55-64.

Chawla, H. S. (2000). *Introduction to plant biotechnology*. Enfield, N.H.: Science Publishers.

Chawla, H.S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology. 2nd. Science Publishers, Inc. UK. 88-109.

David, H., E. Jarlet, and A. David. 1974. Effect of nitrogen source, calcium concentration and osmotic stress on protoplasts and protoplast-derived cell culture of *Pinus pinaster* cotyledons. Physiol. Plant, 61 pp. 477-482.

Darvishi, E, R. Zarghami, C.A. Mishani, M. Omidi and A. Sarkhosn. 2006. Investigation of the best time of enzyme treatment in order to isolate the protoplast from embryogenic callus of saffron (*Crocus sativus* L.). Biotechnology 5 (3): 284-286.

Durieu P, and Ochatt SJ. 2000. Efficient intergeneric fusion of pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protoplast. J. Exp. Bot. 5 (348): 1237-1242.

Freshney, R. (1987) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, p.117, Alan R. Liss, Inc., New York.

Frearson, E.M. Power, J. B., Cocking, E.C. (1973) The isolation, culture and regeneration of petunia leaf protoplast, Develop. Biol. 33: 130-137.

Guan Q, Guo Y, Wei Y, Meng F, and Zhang Z. 2010. Regeneration of somatic hybrids of ginger via chemical protoplast fusion. . Plant Cell Tiss. Org. Cult. Culture. 102: 279-284.

Hu Q, Andersen SB, Dixelius C and Hansen LN. 2002. Production of fertile intergeneric somatic hybrids between Brassica napus and Sinapis arvensis for The enrichment of the rapeseed gene pool. Plant Cell Rep. 21:147–152.

Prange ANS, Bartsch M, Meiners J, Serek M and Winkelmann T. 2012. Interspecific somatic hybrids between *Cyclamen persicum* and *C. coum*, two sexually incompatible species. Plant Cell Rep 31:723–735.

Sasamoto, H., Ogita, S., Hayashi, N., Wakia, Y. Yokota, S. and Yoshizawa, N. 2003. Development of novel elongated fiber-structure in protoplast cultures of *Betula platyphylla* and *Larix leptolepis*. In Vitro. Cell. Dev. Biol. Plant, 39: 223-228.

Zhang, Z., X. Guo, B. Liu, L. Tang and F. Chen. 2011. Genetic diversity and genetic relationship of *Jatropha curcas* between China and Southeast Asian revealed by amplified fragment length polymorphisms . African Journal of Biotechnology Vol. 10(15), pp. 2825-2832.

กองกลาง สำนักงานอธิการบดี
เลขรับ 08515
วันที่ - 3 ส.ค. 2558
เวลา 10.44น. บันทึกข้อความ

R2557B053

กองบริหารการวิจัย
รับที่ 03458
วันที่ 16 ก.ค. 2558
เวลา 09.43น.

1013317

ส่วนราชการ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ภาควิชา วิทยาศาสตร์การเกษตร โทร.2736
ที่ ศธ 0527.07.03/1399 วันที่ 13 กรกฎาคม 2558
เรื่อง ขอปิดโครงการวิจัยและส่งผลงานตามตัวชี้วัด

คณะเกษตรศาสตร์ฯ มน.นเรศวร
รับที่ 3319 วันที่ 16 ก.ค. 2558
เวลา 14.06 น.ส่งคืน

(1) เรียน อธิการบดี

ตามที่ มหาวิทยาลัยอนุมัติให้ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 สัญญาเลขที่ R2557B053 เรื่อง การวิจัยและพัฒนาพืชในจีนัส Jatropha sp. เพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ในวงเงิน 889,700.00 บาท (แปดแสนแปดหมื่นเก้าพันเจ็ดร้อยบาทถ้วน) โดยมี รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร เปรมจิต สังกัดคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ภาควิชา วิทยาศาสตร์การเกษตรเป็นหัวหน้าโครงการ นั้น

ขณะนี้ได้ดำเนินการมาเป็นระยะเวลา 1 ปี 8 เดือน และมีผลงานวิจัยตามตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการวิจัย (รายละเอียดดังเอกสารที่แนบมาพร้อมนี้) และเพื่อให้ผลงานทางวิชาการของข้าพเจ้าเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและสาธารณชน ข้าพเจ้าอนุญาตให้กองบริหารการวิจัยและสำนักหอสมุดเผยแพร่ผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์และบทคัดย่อ ในระบบสารสนเทศ ดังนี้

☐ ระบบผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ (http://dra-is.research.nu.ac.th/dra-elibrary/)
☑ ฐานข้อมูล NU Digital Repository (http://obj.lib.nu.ac.th/media)
☐ ไม่ยินยอม เนื่องจาก.....

ดังนั้นผู้วิจัยจึงขอปิดโครงการวิจัยดังกล่าว และหากมีผลงานวิจัยเกิดขึ้นภายหลังจักนำแจ้งให้มหาวิทยาลัยทราบทันที

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติ

งานธุรการ (หน่วยสัญญา)
☑ ตรวจสอบและคุมยอด 29 ก.ค. 2558
☑ ระบบบริหารโครงการวิจัย - 5 ส.ค. 2558
☐ ระบบ NRPM.....
เรียน อธิการบดี

.....
รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร เปรมจิต
หัวหน้าโครงการวิจัย

(2) เห็นควรอนุมัติ และให้ดำเนินการบันทึกข้อมูล

ลงชื่อ .....
(น.ส.สุกรีลา แสงหมาย)
ผู้ประสานงานวิจัยคณะ
(วันที่ 14/07/58)

(3) เรียน อธิการบดี
เห็นควรอนุมัติ

ลงชื่อ .....
(รศ.ดร.ชนินทร์ อัจฉริยสกุล)
รองคณบดีฝ่ายวิจัย/คณบดีคณะ.....
(วันที่ 14/07/58)

(4) เรียน อธิการบดี
( ) เห็นควรอนุมัติ ( ) เห็นควรไม่อนุมัติ

ลงชื่อ .....
(นางสาวสิริกร ชูแก้ว)
ผอ.กองบริหารการวิจัย
(วันที่ 29/07/58)

(5) เรียน อธิการบดี
( ) อนุมัติ ( ) ไม่อนุมัติ

ลงชื่อ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภูพงษ์ พงษ์เจริญ)
รองอธิการบดีฝ่ายวิจัย
(วันที่ 3/8/58)

29 ก.ค 2558