อิทธิพลของ colchicine และ oryzalin ต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของสบู่ดำ

ธีระพงษ์ บุญปรก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

THE EFFECTS OF COLCHICHINE AND ORYZALIN ON CHROMOSOME DOUBLING OF PHYSIC NUT (*Jatropha curcas* L.)

TEERAPONG BOONPOK

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

MAJOR IN AGRICULTURE FACULTY OF AGRICULTURE

UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

YEAR 2012

COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์

เรื่อง อิทธิพลของ colchicine และ oryzalin ต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของสบู่ดำ

ผู้วิจัย นายธีระพงษ์ บุญปรก

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

.... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์)

.... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูศักดิ์ จอมพุก)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ถาวร สุภาพรม)

.... กรรมการ
(ดร.ทินน์ พรหมโชติ)

.... คณบดี
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรพงษ์ วัฒนกูล)

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รับรองแล้ว

....
(รองศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประสิทธิ์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ
ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2555

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ ซึ่งเป็นทั้งอาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความรู้ทางวิชาการ วิธีการดำเนินการวิจัย ให้คำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ ถ่ายทอดประสบการณ์การทำงานวิจัยและการใช้ชีวิตในการเรียน ตลอดทั้งเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ถาวร สุภาพรม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ประจำศูนย์วิเคราะห์โครโมโซม ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความรู้และชี้แนะในการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณพี่ ๆ บุคลากรคณะเกษตรศาสตร์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือวิทยาศาสตร์ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยด้วยดีเสมอมา ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และพี่น้อง ๆ ที่คอยเป็นกำลังใจในการทำงานด้วยดีตลอดมา และขอขอบพระคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทดลอง

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยเลี้ยงดูและสนับสนุนเป็นอย่างดี ขอขอบคุณญาติพี่น้อง และสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่คอยให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีมาตลอด

(นายธีระพงษ์ บุญปรก)
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : อิทธิพลของ colchicine และ oryzalin ต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของสบู่ดำ
โดย : ธีระพงษ์ บุญปรก
ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา : เกษตรศาสตร์
ประธานกรรมการที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์

ศัพท์สำคัญ : โคลชิซิน ออไรซาลิน โพลีพลอยด์ สบู่ดำ โฟลไซโทเมทรี

สบู่ดำเป็นพืชพลังงานชนิดหนึ่งที่ให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ เนื่องจากมีฐานพันธุกรรมแคบ การกลายพันธุ์โดยการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ ซึ่งสารเคมีที่นิยมใช้ คือ สาร colchicine แต่สารชนิดนี้เป็นพิษต่อมนุษย์ แต่มีสาร oryzalin ที่เป็นสารทางเลือก ซึ่งมีความเป็นพิษต่อมนุษย์น้อย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของสาร colchicine และ oryzalin ในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (polyploidy) ของสบู่ดำ โดยการหยดสาร colchicine และ oryzalin บนยอดอ่อนของต้นกล้าสบู่ดำ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ และระดับความเข้มข้น 0, 0.0005, 0.0010, 0.0015 และ 0.0020 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นาน 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า ต้นสบู่ดำที่ได้รับสาร colchinie และ oryzalin มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่แตกต่างกับต้นปกติ การหยดสารละลาย colchicine ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และการหยดสาร oryzalin ที่ระดับความเข้มข้น 0.0015 เปอร์เซ็นต์ จะพบจำนวนต้นเททระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์สูงสุด และทำการทดลองโดยแช่เมล็ดสบู่ดำในสาร colchicine ที่มีระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง พบว่า ต้นสบู่ดำที่ได้รับสาร colchicine โดยวิธีการแช่เมล็ดที่ระดับความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 41.25 เปอร์เซ็นต์ ต้นสบู่ดำที่รอดชีวิตจะมีการเจริญเติบโตช้า ขนาดของปากใบของต้นสบู่ดำที่เป็นโพลีพลอยด์ และต้นดิพลอยด์มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้การใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในการตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์ในเบื้องต้นสามารถกระทำได้ และใช้เทคนิค flow cytometry ตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์ควบคู่เพื่อความแม่นยำ

ABSTRACT

TITLE : THE EFFECTS OF COLCHICINE AND ORYZALIN ON CHROMOSOME DOUBLING OF PHYSIC NUT (*Jatropha cuscas* L.)

BY : TEERAPONG BOONPROK

DEGREE : MASTER OF SCIENCE (AGRICULTURE)

MAJOR : AGRICULTURE

CHAIR : ASSIST.PROF. ARIYAPORN PONGRAT, Ph.D.

KEYWORDS : *Jatropha cuscas* L. / COLCHICINE / ORYZALIN / POLYPLOIDY / FLOW CYTROMETRY

Physic nut (*Jatropha curcas* L.) was narrow genetic based of energy plant, resulting low productivity. Chromosome doubling was a mutation technique, that could enhance genetic variation. The chemicals used for chromosome doubling was colchicine, toxicity for life and oryzalin, less toxicity for life. In this study, the shoot tip of physic nut seedlings were treated with 0, 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20 % of colchicine and 0, 0.0005, 0.0010, 0.0015 and 0.0020 % of oryzalin for 24 and 48 hr. to induce polyploidy. The results showed that the survival of treated and non-treated physic nut seedlings were non different significantly. The number of tetraploid and mixoploid were increased mostly by 0.0015 % of oryzalin and 0.2 % of colchicine. Whereas, the physic nut seedlings were soaked with 0, 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20 % of colchicine for 48 hr. to induce polyploidy. The results showed that the survival of soaked with 0.05 % of colchicine seedlings was 41.25 %. The stomata size of diploid and induced by colchicine and oryzalin polyploidy were different significantly. Therefore, the stomata size can be used to detect polyploidy. In addition, the flow cytometry is one of efficient method to detect polyploidy level.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**ก**
บทคัดย่อภาษาไทย	**ข**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**ค**
สารบัญ	**ง**
สารบัญตาราง	**ช**
สารบัญภาพ	**ซ**
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญในการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย	2
1.4 ขอบเขตการศึกษา	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 การตรวจเอกสาร	
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำ	4
2.2 การใช้ประโยชน์จากสบู่ดำ	6
2.3 การขยายพันธุ์ของสบู่ดำ	7
2.4 พันธุกรรมของสบู่ดำ	8
2.5 การกลายพันธุ์	9
2.6 โพลีพลอยด์	10
2.7 ผลของโพลีพลอยด์	12
2.8 ประโยชน์ของลักษณะโพลีพลอยด์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช	12
2.9 สาร colchicine และ oryzalin	12
2.10 การใช้สาร colchicine และ oryzalin เพิ่มจำนวนโครโมโซมพืช	14
3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 อุปกรณ์	17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย 17

3.2.1 การเลือกเมล็ดและการเพาะต้นกล้าสบู่ดำในการทดลอง 17

3.2.2 การให้สาร colchicine และ oryzalin กับต้นกล้าสบู่ดำ 17

3.2.2.1 การให้สาร colchicine และ oryzalin หยดบนยอดอ่อนของต้นกล้าสบู่ดำ 17

3.2.2.2 การให้สาร colchicine แช่เมล็ดสบู่ดำ 18

3.2.3 การตรวจสอบลักษณะโพลีพลอยด์ 18

3.2.3.1 การวัดขนาดของปากใบ 18

3.2.3.2 การวัดขนาดละอองเกสรเพศผู้ 18

3.2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค flow cytometry 18

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 19

4 ผลการทดลอง

4.1 ผลของ colchicine และ oryzalin ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำด้วยวิธีการหยดบนยอดอ่อน 20

4.2 ผลของ colchicine ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำด้วยวิธีแช่เมล็ด 21

4.3 ผลของความเข้มข้นสาร colchicine และ oryzalin ต่อขนาดเซลล์คุมปากใบ 22

4.4 ผลของ colchicine และ oryzalin ต่อจำนวนชุดโครโมโซมของสบู่ดำ 24

4.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสบู่ดำโพลีพลอยด์ 25

5 อภิปรายผลการทดลอง

5.1 ผล ของสาร colchichine และ oryzalin ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำ 30

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นสาร colchicine ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำ ด้วยวิธีการแช่เมล็ด	30
5.3 ผลของความเข้มข้นสาร colchicine และ oryzalin ต่อขนาดเซลล์คุมปากใบของสบู่ดำ	31
5.4 ผลของ colchicine และ oryzalin ต่อจำนวนโครโมโซมของสบู่ดำ	32
5.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสบู่ดำโพลีพลอยด์	33
6 สรุป	**34**
เอกสารอ้างอิง	**35**
ภาคผนวก	
ก การเตรียมสาร colchicine และ oryzalin	42
ข หลักการของ flow cytometry	44
ประวัติผู้วิจัย	**49**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำที่แช่สาร colchicine ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อต้นกล้าอายุ 5 วัน	21
2	เปอร์เซ็นต์จำนวนกิ่ง และขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบของสบู่ดำที่ได้รับ colchicine และ oryzalin ที่ระดับความเข้มต่าง ๆ	23
3	ผลของสาร colchicine ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อระดับโพลีพลอยด์ของสบู่ดำ	24
4	ผลของสาร oryzalin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อระดับโพลีพลอยด์ของสบู่ดำ	25
5	ความยาว และความกว้างของดอกเพศผู้ และละอองเกสรเพศผู้สบู่ดำที่ได้รับและไม่ได้รับสาร colchicine	28

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเปรียบเทียบของ ภาพการเกิดวิวัฒนาการของยีนต่อมาจากการเกิดโพลีพลอยด์ แบบดั้งเดิม (a) กับ ภาพใหม่ที่ปรับปรุงแก้ไข เป็นภาพที่แสดงให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์ของยีนพ่อแม่ในโครโมโซมผสม (allopolyploid) ทำให้เข้าใจถึงการสร้างจีโนมใหม่ ตามลูกศรที่ชี้บอกถึงการเปลี่ยนย้ายยีนระหว่างโครโมโซมภายในชุดโครโมโซมผสม (b)	10
2	ความสัมพันธ์และที่มาของ autopolyplods และ allpolyploids	11
3	โครงสร้างทางเคมีของสาร colchicine	13
4	โครงสร้างทางเคมีของสาร oryzalin	13
5	ต้นกล้าสบู่ดำหลังจากให้สาร colchicine อายุ 45 วัน ต้นดิพลอยด์ (ซ้าย) และต้นที่ได้รับสาร (ขวา) เพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมที่มีลักษณะป่องออกของเนื้อเยื่อ (ลูกศรชี้)	20
6	ต้นกล้าสบู่ดำอายุ 5 วัน หลังจากแช่สาร colchicine ระดับความเข้มข้น 0, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง	22
7	เซลล์คุมปากใบสบู่ดำดิพลอยด์ (ก) และโพลีพลอยด์ (ข)	23
8	แสดงผลการวัดปริมาณสารพันธุกรรมของสบู่ดำดิพลอยด์ (2x) (ก) มิกโซพลอยด์ (2x + 4x) (ข) เททระพลอยด์ (4x) (ค) และมิกโซพลอยด์ (2x + 4x+ 8x) (ง)	25
9	ต้นสบู่ดำดิพลอยด์ (ก) ต้นสบู่ดำที่ได้รับสารเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (ข) ช่อดอกของต้นสบู่ดำดิพลอยด์ (ค) และโพลีพลอยด์ (ง)	26
10	ดอกเพศผู้ของต้นสบู่ดำโพลีพลอยด์และต้นสบู่ดำดิพลอยด์	27
11	ละอองเกสรเพศผู้ดิพลอยด์ (ก) และโพลีพลอยด์ (ข)	27
12	ผลสบู่ดำของต้นโพลีพลอยด์และต้นดิพลอยด์	28
13	เมล็ดสบู่ดำของต้นโพลีพลอยด์และต้นดิพลอยด์	29

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญในการวิจัย

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกันกับ ยางพารา มันสำปะหลัง และละหุ่ง มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกากลาง และนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยโดยชาวโปรตุเกสเพื่อนำเมล็ดมาสกัดน้ำมันสำหรับทำสบู่ สบู่ดำมีการกระจายพันธุ์ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งในอดีตนิยมปลูกตามพื้นที่ว่าง หรือปลูกเป็นแนวรั้วป้องกันสัตว์เข้ามาทำความเสียหายในไร่นา (จเร สดากร, 2527 ; พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2549) น้ำมันสบู่ดำที่ผ่านการกรองโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทำไบโอดีเซล (biodiesel) สามารถนำมาใช้กับเครื่องจักรกลทางการเกษตรที่มีความเร็วรอบต่ำ น้ำมันสบู่ดำมีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันดีเซล (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2549) แต่ปัจจุบันสบู่ดำมีผลผลิตต่อไร่ค่อนข้างต่ำ โดยให้ผลผลิตประมาณ 300 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อมีอายุ 3 ปี ซึ่งไม่คุ้มค่าในการลงทุนทางการค้า การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำโดยวิธีการปกติสามารถเพิ่มผลผลิตของสบู่ดำได้ไม่สูงนัก เนื่องจากสบู่ดำในประเทศไทยมีฐานพันธุกรรม (genetic potential) แคบ (วิมลรัตน์ ศุกรินทร์ และคณะ, 2534) ดังนั้นการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสบู่ดำให้กว้างขึ้น ซึ่งการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติ หรือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นได้โดยการใช้สารเคมี (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2551)

การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม เป็นวิธีการที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชหลายชนิด เช่น การสร้างหอมสายพันธุ์แท้จากหอมที่เป็นแฮพลอยด์ (haploid) (Alan et al., 2007) การสร้างฐานพันธุกรรมปาล์มน้ำมันให้กว้างขึ้น ในการปรับปรุงสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเพื่อเพิ่มผลผลิต (Madon et al., 2005) การผลิตสายพันธุ์ Royal Blue (*Gentiana triflora* var. japonica) ชนิดเททระพลอยด์ (tetraploid) เพื่อให้มีลักษณะดอกใหญ่ และใบหนา (Morgan et al., 2003) และการเหนี่ยวนำให้เกิดลักษณะเททระพลอยด์ ในใบบัวบกเพื่อเพิ่มสารสกัดตัวยาสมุนไพร (วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และวิสา ฉิมน้อย, 2542) เป็นต้น ซึ่งสารเคมีที่นิยมนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมคือ สาร colchicine และ oryzalin โดยสารทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ (antimitotic agents) โดยสารดังกล่าวนี้จะเข้าไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนทูบูลิน (tubulin) ที่เป็นส่วนประกอบไมโครทูบูล (microtubules) ในเส้นใยสปินเดิล (spindle fibers) ขณะที่

เซลล์มีการแบ่งตัว (Petersen et al., 2003) และเป็นผลทำให้จำนวนชุดโครโมโซมในพืชเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาอิทธิพลของสาร colchicine และ oryzalin ต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของสบู่ดำ

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของสาร colchicine และ oryzalin กับระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของสบู่ดำ

1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร colchicine และ oryzalin ในการเหนี่ยวนำเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของสบู่ดำ

1.2.3 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นสบู่ดำที่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซมกับต้นดิพลอยด์

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 ระดับความเข้มข้นของสาร colchicine กับ oryzalin ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของสบู่ดำมีความแตกต่างกัน

1.3.2 ระดับความเข้มข้นของสาร colchicine และ oryzalin กับระยะเวลาในการเหนี่ยวนำเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของสบู่ดำมีความสัมพันธ์ต่อกัน

1.3.3 ประสิทธิภาพของสาร colchicine และ oryzalin ในการเหนี่ยวนำเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของสบู่ดำมีความแตกต่างกัน

1.3.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นสบู่ดำที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นกับต้นปกติมีความแตกต่างกัน

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษากับสบู่ดำสายพันธุ์ส่งเสริมของสถานีทดลองวิจัยพืชสวน ตำบลท่าพระ อำเภอเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น โดยทำการวิจัย ณ สำนักงานไร่ฝึกทดลองและห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการสร้างความแปรปรวนให้กับประชากรและนำไปใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำเพื่อเพิ่มผลผลิต

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Euphorbiaceae ซึ่งเป็นพืชในกลุ่มเดียวกับ ยางพารา ละหุ่ง โป๊ยเซียน มันสำปะหลัง มะยม น้ำนมราชสีห์ และมะไฟ และอยู่ในสกุล (Genus) *Jatropha* ซึ่งพืชในสกุลนี้มีมากกว่า 470 ชนิด (species) สำหรับสบู่ดำมีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ทวีปอเมริกากลาง ประเทศเม็กซิโก และนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยโดยชาวโปรตุเกสในสมัยกรุงศรีอยุธยา (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2549) ในประเทศไทยพืชสกุลนี้มีอยู่ 5 ชนิด ได้แก่ สบู่แดง (*J. gossypifolia*) หนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica*) ปัตตาเวีย (*J. integerrima*) ฝิ่น (*J. multifida*) และ สบู่ดำ (*J. curcas*) สายพันธุ์สบู่ดำที่พบในประเทศไทยมีอยู่ 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ผลยาว พันธุ์ผลกลมสั้นขนาดปานกลาง และพันธุ์ผลเล็ก (ทวีศักดิ์ อุ่นจิตติกุล, 2548)

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำ

สบู่ดำเป็นพืชไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง อายุไม่น้อยกว่า 20 ปี ทรงพุ่มมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เมตร สำหรับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำ มีรายละเอียดดังนี้

2.1.1 ราก

รากของสบู่ดำที่เพาะจากเมล็ดจะเป็นรากแก้ว และมีรากแขนง แตกออกมาเป็นจำนวนมาก กระจายอยู่บริเวณใกล้ผิวดินรอบทรงพุ่ม สำหรับรากที่เกิดจากการตอนกิ่งหรือกิ่งชำ สบู่ดำจะไม่มีรากแก้ว มีเฉพาะรากแขนงและรากฝอยเท่านั้น

2.1.2 ลำต้น

ลำต้นเป็นไม้เนื้ออ่อน อวบน้ำ สีเขียวเข้มถึงน้ำตาล เรียงตามความอ่อนไปแก่ แตกกิ่งจำนวนมาก ลำต้นสูง 3 - 7 เมตร ลำต้นและกิ่งหากเกิดแผลจะมียาง (latex) ไหลออก ยางมีลักษณะใส

2.1.3 ใบ

สบู่ดำเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ เมื่อเมล็ดงอกมีใบเลี้ยงรูปกลมรี 2 ใบ ขอบใบเรียบ ใบจริงเป็นใบเดี่ยวแบบฝ่ามือ (palmate) ลักษณะคล้ายรูปหัวใจ โคนใบเว้าลึก คล้ายกับใบพุดตาล ฝ้าย และใบละหุ่ง แต่มีความหนามากกว่า เพราะมีสารไข (cutin) มาก ขอบใบหยัก มี 5 - 7 แฉก การเรียงตัว

ของเส้นใบเป็นแบบร่างแห (palmately netted venation) โดยมีเส้นใบเริ่มจากปลายก้านใบส่วนที่เว้าเข้ามา สีของโคนใบเขียวเข้ม เส้นใบหลักที่เกิดจากตำแหน่งก้านใบมีอยู่ 7 เส้น ใบมีขนาดความกว้างประมาณ 6.0 - 10.0 เซนติเมตร ยอดและใบอ่อนมีสีม่วงแกมเขียว

2.1.4 ดอก

สบู่ดำออกดอกบริเวณซอกใบใกล้ปลายกิ่ง มีลักษณะเป็นช่อคล้ายช่อเชิงหลั่น ยาวประมาณ 12 เซนติเมตร และมีก้านช่อยาวประมาณ 6 เซนติเมตร ช่อดอกส่วนแรกเป็นแบบแขนง (racemose) มักออกเป็นคู่ๆ ช่อดอกย่อยเป็นแบบช่อกระจุก (cymose) ที่ส่วนปลาย แตกแขนงออกด้านข้างสลับกัน ดอกมีขนาดเล็กสีเหลืองมีกลิ่นหอมอ่อนๆ โดยดอกจะเริ่มบานจากล่างขึ้นบน หรือจากโคนช่อดอกไปหาปลายช่อดอก ดอกสบู่ดำภายในต้นเดียวกันจะมีทั้งดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่ในช่อดอกเดียวกัน โดยในช่อดอกย่อยมีดอกเพศเมีย 1 ดอก อยู่ตรงกลางกิ่งแขนง มีอัตราดอกเพศผู้ต่อดอกเพศเมียเท่ากับ 10 - 15 : 1 ดอกเพศผู้มีก้านเกสร 10 ก้าน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 5 ก้าน ดอกเพศเมียมีกลีบดอก 5 กลีบ มีก้านเกสร 3 ก้าน ดอกเพศเมียมี 3 - 4 รังไข่ การบานหรือความพร้อมในการผสมเกสร ดอกเพศเมียจะพร้อมก่อนดอกเพศผู้

2.1.5 ผล

ผลมีรูปร่างค่อนข้างป้อมหรือรูปกระสวย กว้าง 2.0 - 3.0 เซนติเมตร ยาว 2.5 - 3.5 เซนติเมตร มีลักษณะผลเป็นแบบเปลือกแข็ง (capsule) เป็นพู (lobes) เกลี้ยงเกลา ผลอ่อนมีสีเขียวอ่อน ส่วนมากมี 3 พู ผลสุกแก่จะมีสีเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีดำ ผลสดมีน้ำหนักประมาณ 15.0 กรัม ผลแห้งมีน้ำหนัก 2.6 กรัม ต่อผล ในแต่ละผลมีจำนวนเมล็ด 2 - 3 เมล็ด ผลจะสุกแก่ประมาณ 60 - 90 วัน หลังดอกบาน

2.1.6 เมล็ด

เมล็ดจากผลแก่มีสีดำ ผิวเรียบเป็นมัน และเมื่อเมล็ดแห้งผิวจะหยาบ ไม่เรียบ เมล็ดมีรูปร่างป้อมยาว (oblong) รูปกระสวยแกมขอบขนานแบบข้าง กว้างประมาณ 1.0 เซนติเมตร และยาวประมาณ 2.0 เซนติเมตร เปลือกหนาสีดำแข็ง เนื้อในมีสีขาว (kernel) ซึ่งเป็นส่วนที่มีน้ำมันอยู่ประมาณ 33.0 - 60.0 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักเมล็ด 1,000 เมล็ด เมื่อแห้งจะหนักประมาณ 1.0 กิโลกรัม (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2549)

2.2 การใช้ประโยชน์จากสบู่ดำ

ประโยชน์ของสบู่ดำมีหลายประการ คือ

2.2.1 เป็นแหล่งพลังงานทดแทน

เมล็ดสามารถนำมาสกัดเป็นน้ำมันเพื่อใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลในเครื่องยนต์ความเร็วรอบต่ำ เช่น เครื่องยนต์ทางการเกษตร ซึ่งน้ำมันสบู่ดำมีอัตราความสิ้นเปลืองของน้ำมันใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล หากผสมน้ำมันสบู่ดำต่อน้ำมันดีเซลในสัดส่วน 60 : 40 โดยปริมาตร จะทำให้เครื่องยนต์ทำงานได้ปกติ (Baitiang et al., 2008) หรือหากผ่านกระบวนการไบโอดีเซลสามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลความเร็วรอบสูง เช่น รถบรรทุก (ระพีพันธุ์ ภาสบุตร และ สุขสันต์ สุทธิผลไพบูลย์, 2544) และสามารถใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นส่วนผสมกับเชื้อเพลิงเครื่องยนต์เจท (Jet A fuel) ในอัตราส่วน 50 : 50 โดยปริมาณ ทำให้สามารถลดต้นทุนเรื่องเชื้อเพลิงและลดการทำลายสิ่งแวดล้อมได้ (Air New Zealand, 2010)

2.2.2 ประโยชน์จากการปลูกสบู่ดำ

2.2.2.1 เป็นแนวรั้วล้อมรอบพื้นที่ปลูกพืชเศรษฐกิจหลัก เพื่อป้องกันสัตว์เลี้ยงมาทำความเสียหายกับแปลงปลูก เนื่องจากต้นสบู่ดำมีกรดไฮโดรไซยานิค (hydrocyanic) ที่มีกลิ่นเหม็นเขียว และยังเป็นแนวป้องกันลมได้ดี

2.2.2.2 ช่วยป้องกันการกัดเซาะหน้าดินจากน้ำและลม โดยระบบรากของสบู่ดำจะช่วยยึดเกาะผิวดินได้ดี

2.2.3 การใช้เป็นอาหารของมนุษย์

ใบอ่อนหรือยอดอ่อนของสบู่ดำสามารถนำมาลวกหรือนึ่งสำหรับรับประทานและเป็นอาหารที่ปลอดภัย ไม่มีสารพิษ เนื่องจากกรดไฮโดรไซยานิคในใบและยอดอ่อนจะถูกทำลายด้วยความร้อน และเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์ที่ไม่มีพิษสามารถจะนำมาคั่วรับประทานเหมือนเมล็ดถั่วลิสงได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์

2.2.4 การใช้เป็นอาหารสัตว์

กากสบู่ดำ (press cake) ที่เหลือจากการสกัดน้ำมันมีคุณค่าทางอาหารสูง แต่มีสารพิษอยู่ในเนื้อในเมล็ดสูง ได้แก่ สารเคอร์ซิน (curcin) ไฟโบลิค เอสเตอร์ (phorbolic ester) แซฟโพนิน (saponin) โปทิเอส (protease) และไฟเทท (phytase) แต่สารพิษเหล่านี้จะถูกทำลายด้วยความร้อน

2.2.5 การใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรค

ชิ้นส่วนของสบู่ดำมีคุณสมบัติทางยาที่ภูมิปัญญาชาวบ้านนำมาใช้ดังนี้

2.2.5.1 ต้น ใช้เป็นยาถ่าย

2.2.5.2 ลำต้น ใช้เป็นยารักษาโรคซางหรือตาลขโมย

2.2.5.3 เปลือก ใช้เป็นยาถ่าย ขับพยาธิ แก้ปวดท้อง

2.2.5.4 กิ่งก้าน ใช้ห้ามเลือด รักษาโรคฟัน โรคผิวหนัง

2.2.5.5 ใบ ใช้เป็นยารักษาอาการไอ และมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ แก้พิษตานซาง แก้ปากและลิ้นพุพอง แก้ลิ้นเป็นฝ้าละออง ถอนพิษไข้

2.2.5.6 เมล็ด ใช้เป็นยาระบาย ยาถ่ายชนิดรุนแรง แก้ปวดตามข้อ แก้โรคผิวหนัง

2.2.5.7 น้ำมัน ใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนัง บรรเทาอาการเจ็บปวดจากโรคไขข้อหรือโรคปวดกล้ามเนื้อ และใช้เป็นยาถ่าย

2.2.5.8 น้ำยาง ใช้เป็นยารักษาอาการของโรคปากนกกระจอก ห้ามเลือด ต้านการติดเชื้อ แก้ปวดฟัน แก้ปากเปื่อย พุพอง

2.2.6 การใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์

นอกจากนี้ส่วนต่างๆ ของสบู่ดำจากต้นสดๆ สามารถนำมาทำเป็นปุ๋ยอินทรีย์ที่มีธาตุอาหารสูง เนื่องจากมีไนโตรเจน 4.44 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส 2.09 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียม 1.68 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบธาตุไนโตรเจนของกากสบู่ดำจะมีสูงกว่าปุ๋ยคอก มูลไก่ มูลเป็ด ปุ๋ยหมักจากฟางข้าว และผักตบชวา

2.2.7 ประโยชน์ด้านอื่น ๆ

นอกจากนี้สบู่ดำยังนำมาใช้ประโยชน์อื่นได้อีก เช่น ใช้น้ำมันสบู่ดำทำหมึกพิมพ์โรเนียว ทำกาวบนเทปกระดาษหรือกาวบนเทปผ้า เป็นวัตถุดิบการทำสีทาบ้าน และเป็นส่วนผสมของสบู่ กากเมล็ดสบู่ดำสามารถนำไปทำก้อนถ่านอัดแท่งได้ ส่วนลำต้นกิ่งสบู่ดำใช้ผลิตกระดาษที่มีคุณภาพดี (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2549 ; ชำนาญ ฉัตรแก้ว และคณะ, 2549)

2.3 การขยายพันธุ์ของสบู่ดำ

สบู่ดำสามารถขยายพันธุ์ได้ 3 วิธี คือ

2.3.1 ขยายพันธุ์เมล็ด เมล็ดสบู่ดำที่เก็บเกี่ยวจากผลแก่ (ผลมีสีเหลืองถึงสีน้ำตาลดำ) สามารถนำมาเพาะได้ทันที และให้ความมีชีวิตของเมล็ดสูง เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่เก็บไว้นาน เพราะเมล็ดสบู่ดำไม่มีระยะพักตัว และความมีชีวิตของเมล็ดจะลดลงเมื่อเก็บไว้นาน เพราะเมล็ดสบู่ดำมีน้ำมันเป็นส่วนประกอบ การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดจะเริ่มจากการนำเมล็ดที่สมบรูณ์ มาเพาะในถุงเพาะ หรือเพาะในกระบะทราย และย้ายปลูกเมื่อต้นกล้ามีอายุประมาณ 45 - 60 วัน สำหรับการปลูกด้วยเมล็ดในสภาพแปลงปลูกโดยตรง ควรปลูกในช่วงที่มีฝนตกสม่ำเสมอเพื่อความอยู่รอดของต้นกล้า (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2549 ; ชำนาญ ฉัตรแก้ว และคณะ, 2549)

2.3.2 ขยายพันธุ์ด้วยการปักชำ โดยนำกิ่งท่อนพันธุ์ที่มีสีน้ำตาลปนเขียว ซึ่งเป็นกิ่งที่ไม่อ่อนหรือแก่เกินไป ตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 15 - 20 เซนติเมตร นำมาชำในถุงเพาะกล้า นานประมาณ 2 เดือน แล้วนำไปปลูกในแปลง หรือตัดท่อนพันธุ์ยาวประมาณ 30 - 60 เซนติเมตร ปักชำในแปลงปลูกโดยตรง โดยก่อนปักชำควรมีการแช่ หรือชุบสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2549 ; ชำนาญ ฉัตรแก้ว และคณะ, 2549)

2.3.3 ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยนำส่วนต่างๆของสบู่ดำที่มีเนื้อเยื่อเจริญ เช่น ใบ ก้าน ข้อ และยอดอ่อน เป็นต้น มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารสังเคราะห์ ภายใต้สภาวะควบคุมและปลอดเชื้อ จนเป็นพืชที่สมบรูณ์ แล้วนำออกปลูกในเรือนเพาะชำและในแปลงปลูกตามลำดับ (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2549)

2.4 พันธุกรรมของสบู่ดำ

แหล่งพันธุกรรมของสบู่ดำที่พบในประเทศไทยมี 2 แหล่ง คือสายพันธุ์ที่นำมาจากต่างประเทศ และภายในประเทศ ดังนั้นจึงมีการศึกษาพันธุกรรมของสบู่ดำ ทั้งสองแหล่ง ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.4.1 สายพันธุ์สบู่ดำที่นำมาจากต่างประเทศ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์สบู่ดำที่ให้เมล็ดมีพิษและไม่มีพิษจำนวน 42 ตัวอย่าง จากประเทศอินเดีย และเม็กซิโก โดยใช้เทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ inter-simple sequence repeat (ISSR) เพื่อแยกความแตกต่างทางพันธุกรรม (percent of polymorphism) พบว่ามีความแตกต่างกันในฐานพันธุกรรมของสายพันธุ์สบู่ดำภายในประเทศอินเดีย 42 เปอร์เซ็นต์ และ 64 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างสายพันธุ์ประเทศอินเดียกับประเทศเม็กซิโก และควรปรับฐานพันธุกรรมของสบู่ดำให้กว้างขึ้นเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ (Basha, 2007) และสายพันธุ์สบู่ดำที่ปลูกในประเทศจีนจำนวน 38 แหล่งประชากร ถูกศึกษาพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม amplified fragment length polymorphism (AFLP) พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมเพียง 26.99 เปอร์เซ็นต์ นั่นก็คือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ (Shen et al., 2010)

2.4.2 สายพันธุ์สบู่ดำของประเทศไทย

จากการศึกษาลักษณะของผลสบู่ดำจากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย สามารถจำแนกตามรูปร่างผลได้ 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ผลยาว พันธุ์ผลกลมสั้นขนาดปานกลาง และพันธุ์ผลเล็ก (ทวีศักดิ์ อุ่นจิตติกุล, 2548)

การรวบรวมตัวอย่างเมล็ดและกิ่งพันธุ์ของสบู่ดำที่ปลูกในประเทศไทย จำนวน 14 แห่ง คือ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วิทยาเขตลพบุรี วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร สถานีวิจัยลพบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่จังหวัดนครราชสีมา สำนักวิจัยและพัฒนาเกษตร เขตที่ 3 พืชไร่ และพืชสวนขอนแก่น ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตสกลนคร มหาวิทยาลัยขอนแก่น มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีอีสานจังหวัดสุรินทร์ ตำบลวังเหนือ อำเภอวังเหนือ จังหวัดลำปาง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดน่าน และ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย จังหวัดนครศรีธรรมราช มาศึกษาความสัมพันธ์ระดับ DNA ของสบู่ดำ โดยใช้เทคนิค AFLP สามารถแบ่งกลุ่มสบู่ดำได้ 4 - 5 กลุ่ม โดยทั้งหมดจะให้ผลผลิตอยู่ในช่วง 500 - 1,000 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี (ชำนาญ ฉัตรแก้ว และคณะ, 2549)

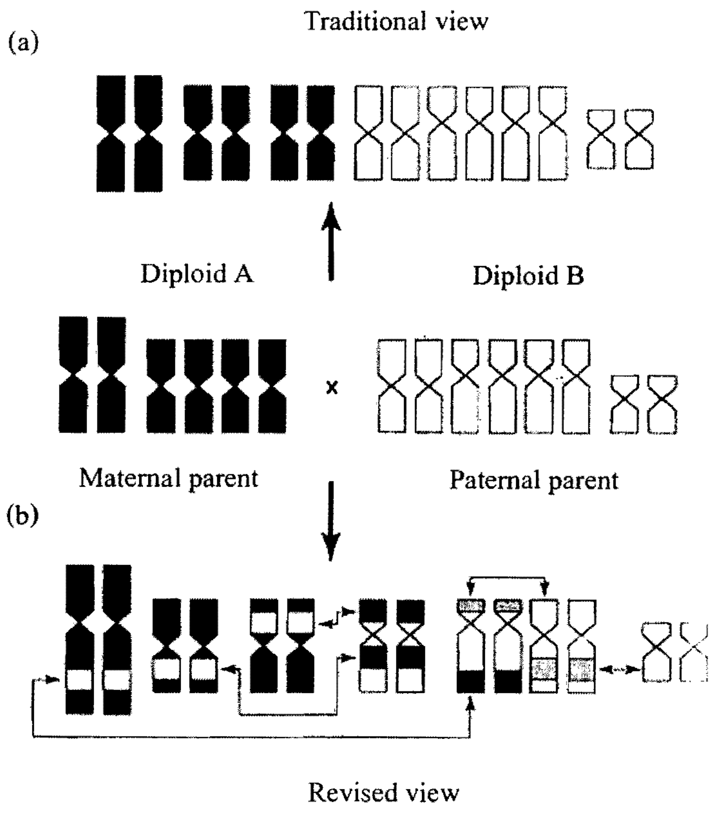
จากผลการศึกษาพันธุกรรมของสบู่ดำสายพันธุ์ของประเทศและต่างประเทศ แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์สบู่ดำมีฐานพันธุกรรมแคบ ซึ่งจะปรับปรุงสายพันธุ์สบู่ดำเพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีการผสมข้ามสายพันธุ์ปกติทำได้ยาก และ กฤษฎา สัมพันธารักษ์ (2551) ได้กล่าวว่าการกลายพันธุ์เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มความแตกต่างทางพันธุกรรมพืชทั่วไปและเพิ่มฐานพันธุกรรมและสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อเพิ่มผลผลิตได้

2.5 การกลายพันธุ์ (mutation)

สิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปจะคงอยู่และรักษาเผ่าพันธุ์ของตนได้ ต้องปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ซึ่งการปรับตัวของพืชดังกล่าวทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ที่พร้อมจะปรับเปลี่ยนตัวเองเมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง สาเหตุหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวของพืชคือกลายพันธุ์ ซึ่งการกลายพันธ์สามารถเกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบ คือ การผสมข้าม และการเหนี่ยวนำพันธุกรรม (genetic induction) ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (spontaneous) หรือถูกทำให้เกิดขึ้น (artificial) การกลายพันธุ์สามารถแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม คือ การเปลี่ยนแปลงลำดับหน่วยพันธุกรรม (nucleotide) หรือเรียกว่าการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรม การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม (chromosome mutation) และการเปลี่ยนแปลงจำนวนของโครโมโซม (ploidy mutation) (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2551)

2.6 โพลีพลอยด์ (polypliod)

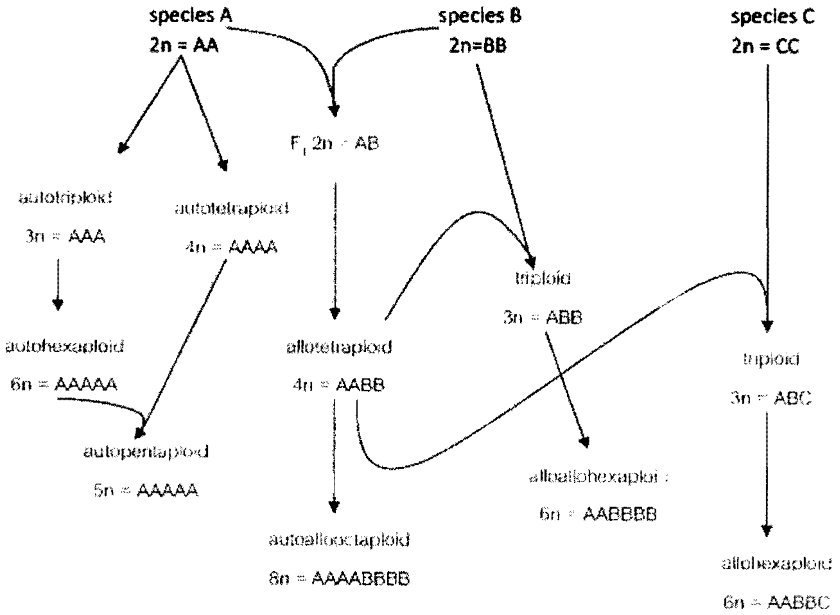
โพลีพลอยด์ เป็นกลไกการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมขึ้นมากกว่าสองชุดโครโมโซมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งโพลีพลอยด์เป็นกลไกหนึ่งที่ผลักดันให้เกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ โดยเฉพาะพบในกลุ่มของพืชดอกเกือบ 70 เปอร์เซ็นต์ และในพืชตระกูลเฟิร์น 95 เปอร์เซ็นต์ การเกิดโพลีพลอยด์ทำให้วิวัฒนาการพืชเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว เพราะหลังจากการเกิดโพลีพลอยด์ทำให้เกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้างพันธุกรรม (genome restructuring) ใหม่ เกิดการเข้าคู่ของโครโมโซมคล้ายกันและเกิด crossing over ขึ้นระหว่างคู่โครโมโซม (ภาพที่ 1) (Soltis and Soltis, 1999) ซึ่งการเกิดโพลีพลอยด์ ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากร สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้



ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบของ ภาพการเกิดวิวัฒนาการของยีนต่อมาจากการเกิดโพลีพลอยด์ แบบดั้งเดิม (a) กับ ภาพใหม่ที่ปรับปรุงแก้ไข เป็นภาพที่แสดงให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์ของยีนพ่อแม่ในโครโมโซมผสม (allopolyploid) ทำให้เข้าใจถึงการสร้างจีโนมใหม่ ตามลูกศรที่ชี้บอกถึงการเปลี่ยนย้ายยีนระหว่างโครโมโซมภายในชุดโครโมโซมผสม (b) (Soltis and Soltis, 1999)

พืชโพลีพลอยด์ สามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติหรือมนุษย์ชักนำให้เกิดขึ้น ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการแบ่งเซลล์ในระยะไมโทซิสผิดปกติ โดยอาจเกิดจากเซลล์ร่างกายหรือเกิดในช่วงของการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์และทำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า หรือเกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสผิดปกติ ทำให้ได้เซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งในระยะไมโอซิส I (unreduced gamete) ทำให้ได้เซลล์สืบพันธุ์ที่เป็น 2n หรือเกิดจากการผสมที่ไข่ถูกผสมโดยสเปิร์มมากกว่า 1 ตัว (polyspermy) หรือเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ผิดปกติในเกสรเพศผู้ (เบญจมาศ ศิลาย้อย, 2553)

สำหรับระดับโพลีพลอยด์มีชื่อเรียกตามจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงจากพันธุ์ซึ่งถ้าเพิ่มหรือลดจำนวนชุดโครโมโซมเป็นชุดเรียกว่า euploidy ซึ่งมีชื่อเรียกตามจำนวนที่เพิ่มขึ้นที่ต่างกัน เช่น โครโมโซมหนึ่งชุด (2n = 1x) เรียกว่า monoploid โครโมโซมสองชุด (2n = 2x) เรียกว่า ดิพลอยด์ โครโมโซมสามชุด (2n = 3x) เรียกว่า triploid และ (2n = 4x) เรียกว่า เททระพลอยด์ เป็นต้น หรือพืชที่มีการเพิ่มลดโครโมโซมบางแท่งหรือบางส่วนเรียกว่า aneuploidy เช่น 2n-1(monosomic), 2n-2 (nullissomic), 2n+1 (trisomic), 2n + 2 (tetrasomic) เป็นต้น (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2551; อรุณี วงศ์ปิยะสถิต, 2550) และถ้าที่มีจำนวนชุดโครโมโซมชุดเดียวกันเพิ่มขึ้นมากกว่า 2 ชุด เรียกว่า autopolyploid หรือที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นแบบผสมเรียกว่า allopolyploid หรือ amphidiploid (ภาพที่ 2) (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2551)



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์และที่มาของ autopolyplods และ allpolyploids (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2551)

2.7 ผลของโพลีพลอยด์

การเกิดโพลีพลอยด์ในธรรมชาติมักเกิดร่วมกับการเกิดการผสมพันธุ์ระหว่างชนิด สายพันธุ์ หรืออาจจะต่างสกุล ดังนั้นลักษณะจึงขึ้นอยู่กับ genotype ของบรรพบุรุษ ผลกระทบจากการเกิดโพลีพลอยด์อาจมีทั้งผลที่ดีและไม่ดี ขึ้นกับความต้องการที่จะนำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งผลกระทบที่เกิดจากโพลีพลอยด์กับการแสดงออกของพืชทั่วไปนี้ คือ เซลล์เนื้อเยื่อเจริญมีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้อวัยวะหรือส่วนต่างๆ ของพืชมีขนาดใหญ่ขึ้น เช่น ขนาดของใบ โดยเห็นได้ชัดเจนจากขนาดของ guard cell ของปากใบ (stomata) และขนาดของ pollen เป็นต้น หรือมีอัตราการเจริญเติบโต ช้ากว่าต้นปกติ (ดิพลอยด์) มีการออกดอกช้า การแตกกิ่งก้านน้อยลง มีขนาดผลเล็กลง หรือมีรูปร่างของส่วนต่างๆ ของพืชเปลี่ยนแปลง อาจทำให้พืชมีความแข็งแรงหรืออ่อนแอ เช่น กล้วยหอมเป็นโพลีพลอยด์จะมีความแข็งแรงกว่ากล้วยไข่และกล้วยเล็บมือนางที่เป็นดิพลอยด์ แต่ใบกล้วยหอมมีโอกาสฉีกขาดมากกว่ากล้วยไข่ หรือมีจำนวน pollen น้อยลง เกิดความเป็นหมันมากขึ้น เช่น พบแตงโมและกล้วยที่เป็นโพลีพลอยด์ (เบญจมาศ ศิลาย้อย, 2553)

2.8 ประโยชน์ของลักษณะโพลีพลอยด์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

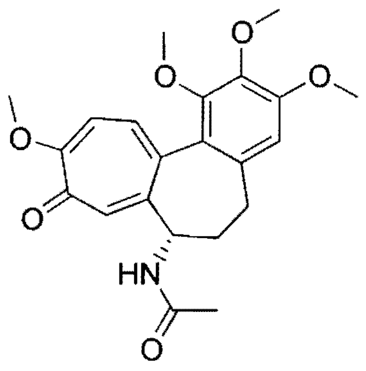
การใช้ลักษณะโพลีพลอยด์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชมีวัตถุประสงค์หลากหลาย เช่น เพื่อการต้านทานโรค ทนเค็ม หรือเพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือม่วงลูกผสม ซึ่งสามารถทำให้มีการติดเมล็ดเพิ่มขึ้น 70 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดเมล็ดใหญ่ขึ้น (Ali et al., 1992) หรือใช้ในการศึกษาความผิดปกติของพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Soltis and et al., 2003)

2.9 สาร colchicine และ oryzalin

จากที่กล่าวมาข้างต้นว่าการเกิดโพลีพลอยด์ สามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติ และชักนำโดยมนุษย์ ซึ่งในการเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์ นิยมใช้สารยับยั้งการแบ่งเซลล์ ที่มีชื่อว่า สาร colchicine แต่สารชนิดนี้เป็นพิษต่อมนุษย์ และสารอีกชนิดที่เริ่มนำมาใช้เป็นสารทางเลือกคือสาร oryzalin ซึ่งสารชนิดนี้เป็นพิษน้อยต่อมนุษย์

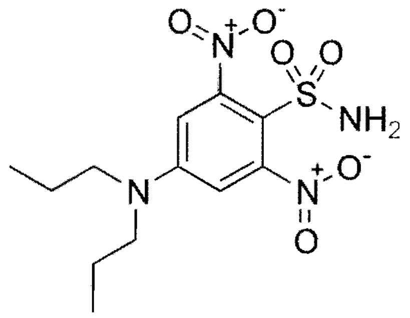
สาร colchicine เป็นสารที่สกัดมาจาก *Colchicum autumnae* โดยมีโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 3 มีชื่อทางเคมีว่า (S)-N-(5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo(a)heptalen-7-yl)acetamide ($C_{22}H_{25}NO_6$, M.W. 399.43) colchicine บริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง มีคุณสมบัติเป็นสารอัลคาลอยด์ละลายได้ในน้ำ และแอลกอฮอล์ (Muzaffar and Brossi, 1991) ในอดีต ช่วง

1,500 ปีก่อนคริสตศักราช สารนี้ถูกใช้ในการรักษาโรคไขข้อ และการอักเสบในยุคอียิปต์โบราณ (Graham and Roberts, 1952) และใช้รักษาโรคเกาต์ในช่วงปีคริสต์ศักราชที่ 550 (Edward, 1945) จนถึงปัจจุบัน



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสาร colchicine (Wikipedia, 2012)

สาร oryzalin เป็นสารป้องกัน กำจัดวัชพืชใบกว้างประเภทก่อนงอก (pre-emergence herbicide) มีชื่อทางเคมีคือ 3,5-dinitro-N,N-di(n-propyl)benzenesul-fanilamide (ภาพที่ 4) สาร oryzalin ที่บริสุทธิ์มีลักษณะเป็นเกร็ดหรือผงสีส้ม ละลายในแอลกอฮอล์ และอะซิโตน (aceton) นิยมใช้ในสวนผลไม้โดยมีชื่อการค้าว่า surflan AS, oryzalin AS และ dirimal (Dvorakova et al., 1997; Oregon state university and Intertox, Inc., 2012) เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำ ถ้าหากกิน หรือสัมผัสสารโดยตรง อาจทำให้เกิดการระคายเคืองที่ผิวหนังได้ หรือหากได้รับสาร surflan as ความเข้มข้นต่ำ หรือปานกลางเป็นเวลานาน 2 - 3 ปีต่อเนื่อง อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเม็ดเลือด และอวัยวะบางส่วนได้ (Oregon state university and Intertox, Inc., 2012)



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของสาร oryzalin (Wikipedia, 2009)

สาร colchicine และ oryzalin มีผลยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล โดยเข้าจับกับโปรตีนทูบูลลินในขณะที่เซลล์กำลังแบ่งตัวอยู่ในช่วงปลายระยะโพรเฟส ซึ่งเป็นช่วงที่มีการสร้างเส้นใยสปินเดิลและเชื่อมต่อทูบูลลินเข้าด้วยกัน การที่สาร colchicine และ oryzalin ไปยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิลจะมีผลทำให้โครโมโซมไม่แยกออกจากกันไปสู่ขั้วเซลล์ และไม่มีการสร้างเซลล์เพลท (cell plate) เซลล์จึงมีโครโมโซมที่เหมือนกันเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อเซลล์ดังกล่าวมีการแบ่งตัวอีกครั้งก็จะได้เซลล์ลูกเป็นเซลล์เททระพลอยด์ (Ranney, 2004)

2.10 การใช้สาร colchicine และ oryzalin เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมพืช

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และวิสา ฉิมน้อย (2542) ได้ชักนำใบบัวบกต้นดิพลอยด์ ให้เป็นต้นโพลีพลอยด์ โดยการใช้สำลีชุบสารลาย colchicine ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ วางบนต้นอ่อน และใช้วิธีผสมสาร colchicine ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ กับวุ้นวางบนปลายยอดของต้นอ่อน พบว่าการใช้สำลีชุบสารละลาย colchicine ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดต้นโพลีพลอยด์ดีที่สุด ในขณะที่การใช้วุ้นผสม colchicine ทั้ง 2 ระดับ จะเกิดต้นโพลีพลอยด์ไม่แตกต่างกัน

Morgan et al. (2003) ได้ทำการทดสอบวิธีการสร้างต้น *Gentina triflora* var. japonica ต้นดิพลอยด์ให้เกิดต้นเททระพลอยด์ โดยใช้ oryzalin 15.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นาน 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นเมื่อต้นแข็งแรง จึงย้ายปลูกในโรงเรือน แล้วตรวจสอบระดับความเป็นเททระพลอยด์ โดยพิจารณาจากความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา เช่น ความหนาของใบ และวัดขนาดปากใบ เป็นต้น จากนั้นจึงยืนยันการเกิดเททระพลอยด์ ด้วย เทคนิค flow cytometry กับการนับจำนวนชุดโครโมโซม พบว่าต้นที่เป็นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ จะมีปริมาณ DNA เท่ากับ 9.26 พิโคกรัม (pg.) และ 17.77 พิโคกรัม ตามลำดับ การนับจำนวนชุดโครโมโซมเป็น 2n เท่ากับ 26 และ 2n เท่ากับ 52 ตามลำดับ

Thao et al. (2003) ได้ทำการเหนี่ยวนำให้ *Alocasia* (Gree velvet) ดิพลอยด์ปกติ (2n=28) เป็นเททระพลอยด์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด ในอาหารสูตร MS ที่มีส่วนประกอบของ colchicine ระดับความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และสาร oryzalin ระดับความเข้มข้น 0, 0.005, 0.01 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสาร DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์ด้วยเทคนิค flow cytometry ได้ต้นเททระพลอยด์ 22 ต้น และมิกโซพลอยด์ 22 ต้น จากจำนวน 396 ต้น

Smith et al. (2004) ได้ศึกษาผลกระทบของเททระพลอยด์ของขิง โดยนำปลายยอดขิงมาแช่สาร colchicine ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสาร dimethyl sulfoxide ความเข้มข้น

2 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์ด้วยเทคนิค flow cytometry พบว่า จากการเหนี่ยวนำปลายยอดขิงทั้งหมด 500 ยอด มี 6 ยอดที่เป็นเททระพลอยด์

Madon et al. (2005) ได้ศึกษาการการสร้างปาล์มลูกผสมให้ติดเมล็ดและขยายพันธุ์ได้ โดยชักนำปาล์มลูกผสมเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม ด้วยสาร colchicine และสาร oryzalin ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยพิจารณาความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา เช่น ความหนาของใบ และวัดขนาดปากใบ เป็นต้น แล้วตรวจสอบด้วยการใช้เทคนิค flow cytometry และนับจำนวนชุดโครโมโซม พบว่าสารโคลชิซินจะให้ต้นปาล์มที่เป็นเททระพลอยด์มากกว่า สาร oryzalin ซึ่งให้ต้นที่เป็นมิกโซพลอยด์มากกว่าเททระพลอยด์

Leire et al. (2006) ได้ชักนำมันฝรั่งลูกผสม จำนวน 6 สายพันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงส่วนปลายยอด ในอาหารสูตร MS ประยุกต์ที่มีส่วนประกอบของสาร oryzalin ระดับความเข้มข้น 0, 0.001 และ 0.002 เปอร์เซ็นต์ และสาร colchicine ระดับความเข้มข้น 0, 0.005 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสาร DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์ด้วยเทคนิค flow cytometry พบว่าสาร oryzalin ระดับความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ให้ต้นเททระพลอยด์มากที่สุดถึง 43 เปอร์เซ็นต์

Nassar et al. (2008) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของโพลีพลอยด์ต่อโครงสร้างทางกายวิภาคของมันสำปะหลัง ที่มีผลต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้ง โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์ กับตาข้างของต้นมันสำปะหลัง ด้วยสาร colchicine ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 12 ชั่วโมง เมื่อได้ต้นที่เป็นโพลีพลอยด์แล้วนำมาตัดขวางลำต้นอ่อน ย้อมสีแล้วตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลำต้นของมันสำปะหลังที่เป็นเททระพลอยด์ จะมีลักษณะของชั้น pericycle ที่หนาขึ้นและมี secondary xylem กว้างกว่าต้นมันสำปะหลังปกติ

Glendon et al. (2008) ได้ชักนำให้ *Watsonia lepida* N.E. Brown โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารสูตร MS จนต้นกล้าอายุ 3 สัปดาห์ หรือมีความสูงประมาณ 4 เซนติเมตร และนำมาเลี้ยงในอาหาร MS ที่ผสมสาร oryzalin ระดับความเข้มข้น 0, 0.001, 0.002, 0.003 และ 0.004 เปอร์เซ็นต์ และสาร colchicine ระดับความเข้มข้น 0, 0.001, 0.002, 0.0025 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์ด้วยเทคนิค flow cytometry พบว่าสารทั้งสองชนิดให้เปอร์เซ็นต์ต้นมิกโซพลอยด์มากกว่าเททระพลอยด์ และสาร oryzalin ที่ระดับความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้ *Watsonia lepida* N.E. Brown เกิดต้นเททระพลอยด์ที่สุด คือ มีการรอดตายสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ และให้ต้นเททระพลอยด์ มากที่สุดถึง 33 เปอร์เซ็นต์

Sainiya and Te-chato (2012) ศึกษาการเหนี่ยวนำปาล์มน้ำมัน โดยนำ secondary somatic embryos (SSEs) มาเพาะในอาหารเหลวสูตร MS ที่ผสมสาร colchicine ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์ด้วยเทคนิค flow cytometry พบว่าสาร colchicine ที่ระดับความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นาน 24 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดเททระพลอยด์สูงสุด

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 เมล็ดพันธุ์สบู่ดำ

3.1.2 วัสดุเพาะกล้า

3.1.3 ถุงเพาะกล้า

3.1.4 ผ้าพลาสติก

3.1.5 กระติกน้ำร้อน

3.1.6 ขวดสีชา

3.1.7 dropper

3.1.8 กระจกสไลด์

3.1.9 ไมโครมิเตอร์

3.1.10 น้ำยาเคลือบเล็บชนิดใส

3.1.11 เทปกาวใส

3.1.12 กล้องจุลทรรศน์

3.1.13 flow cytometer

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเลือกเมล็ดและวิธีการเพาะต้นกล้าสบู่ดำในการทดลอง

การเพาะต้นกล้าสบู่ดำเพื่อใช้ในการทดลองมีวิธีการดังนี้ คือ เริ่มจากคัดเลือกเมล็ดสบู่ดำที่สมบูรณ์เพาะบนกระดาษเพาะ รักษาความชื้นให้คงที่ด้วยการคลุมพลาสติก เมื่อเมล็ดเริ่มงอกรากประมาณ 3 - 4 วัน จึงนำไปเพาะในถุงเพาะ เมื่อต้นกล้าอายุ 7 วัน จึงให้สาร colchicine และ oryzalin

3.2.2 การให้สาร colchicine และ oryzalin กับต้นสบู่ดำ

3.2.2.1 การให้สาร colchicine และ oryzalin หยดบนยอดอ่อนต้นกล้าสบู่ดำ

เมื่อต้นกล้าสบู่ดำเริ่มคลี่ใบเลี้ยงคล้ายรูปตัววี (V) ก็เริ่มให้สาร colchicine และ oryzalin ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ และระดับความเข้มข้น

0, 0.0005, 0.0010, 0.0015 และ 0.0020 เปอร์เซ็นต์ ผสมวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 และ 48 ชั่งโมง ควบคุมความชื้นให้คงที่และพรางแสงในระหว่างให้สารทั้ง 2 ชนิด ตามวิธีการของ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และวิสา ฉิมน้อย (2542)

3.2.2.2 การให้สาร colchicine แช่เมล็ดสบู่ดำ

คัดเลือกเมล็ดสบู่ดำที่มีความสมบูรณ์ นำมาเพาะบนกระดาษเพาะ แล้วคลุมด้วยพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น จนเมล็ดงอกรากจึงนำมาแช่สาร colchicine ระดับความเข้มข้นเป็น 0, 0.2, 0.15, 0.10 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นล้าง colchicine ออก แล้วผึ่งลมพอหมาด ๆ จึงนำไปเพาะในถุงเพาะ ตามวิธีการของ Madon et al. (2005)

3.2.3 การตรวจสอบลักษณะโพลีพลอยด์

3.2.3.1 การวัดขนาดของปากใบ

เก็บตัวอย่างใบแก่ของต้นสบู่ดำ มาตัดแผ่นใบที่บริเวณกลางใบให้มีขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำมาวางบนกระจกทาด้วยน้ำยาทาเล็บ พอน้ำยาทาเล็บเริ่มแห้งจึงลอกน้ำยาทาเล็บออกจากแผ่นใบสบู่ดำ ด้วยเทปกาวใสแล้วนำมาติดบนกระจกส่องสไลด์ ตัดเทปกาวใสรอบแผ่นน้ำยาทาเล็บออกประมาณ 0.2 เซนติเมตร วัดขนาดความยาวปากใบ โดยจำนวน 20 เซลล์ต่อต้น ด้วยไมโครมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ตามวิธีการของ Madon et al. (2005)

3.2.3.2 การวัดขนาดละอองเกสรเพศผู้

เก็บตัวอย่างดอกที่บานในตอนเช้าจำนวน 1 - 2 ดอกต่อต้น ใช้ปลายเข็มเขี่ยละอองเกสรเพศผู้บนกระจกส่องสไลด์และย้อมสีด้วยสาร acetocarmine แล้ววัดขนาดของละอองเกสรตัวผู้จำนวน 20 เซลล์ต่อต้น ด้วยไมโครมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ตามวิธีการของ Katsiotis and Forsberg (1995)

3.2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค flow cytometry

นำใบอ่อนของสบู่ดำ จำนวน 50 ไมโครกรัม ใส่ลงใน plastic petridish แล้วเติมสารละลาย buffer (Cystain UV ploidy) ซึ่งเป็นสารที่ผสมระหว่างสารสกัดและสารย้อมนิวเคลียส จำนวน 400 ไมโครลิตร และสาร PVP (polyvinylpyrelidon) จำนวน 0.1 กรัม สับตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมากรองผ่านตะแกรงไนลอนขนาด 30 ไมครอน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำตัวอย่างใส่ลงในเครื่อง flow cytometry เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ตามวิธีการของ Sarathum et al. (2010), Jaskani et al. (2005) และ Kaewpoo and Te-chato (2010)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

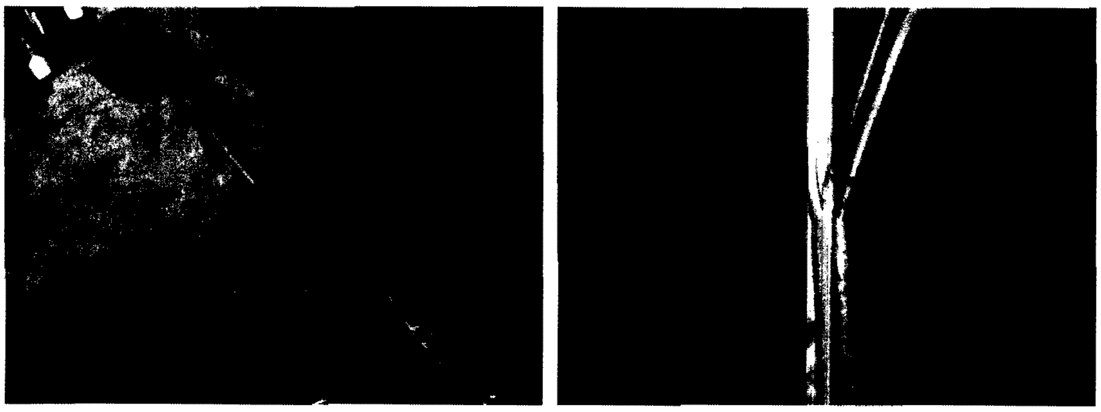
วิเคราะห์ข้อมูลที่บันทึกด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูปเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากการเหนี่ยวนำให้สบู่ดำเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม ด้วยสาร colchicine และ oryzalin ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ มีผลการทดลองดังนี้

4.1 ผลของ colchicine และ oryzalin ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำด้วยวิธีการหยดบนยอดอ่อน

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำสบู่ดำเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยสาร colchicine และ oryzalin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ และ 0, 0.0005, 0.0010, 0.0015 และ 0.0020 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นาน 24 และ 48 ชั่วโมง กับต้นสบู่ดำอายุ 7 วัน โดยการหยดบนยอดอ่อน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่แตกต่างกับต้นดิพลอยด์ แต่การเจริญเติบโตของยอดอ่อนจะช้ากว่าต้นดิพลอยด์ และพบว่าส่วนของยอดอ่อนบริเวณที่ได้รับสารจะมีการขยายตัวและป่องออกในช่วงแรกหลังที่ได้รับสาร colchicine และ oryzalin แต่เมื่อนำต้นกล้าอายุ 45 วัน ลงปลูกในแปลงเพื่อรอการตรวจสอบระดับความเป็นโพลีพลอยด์ พบว่า ต้นสบู่ดำมีการเจริญเติบโตปกติ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ต้นกล้าสบู่ดำหลังจากให้สาร colchicine อายุ 45 วัน ต้นดิพลอยด์ (ซ้าย) และต้นที่ได้รับสาร (ขวา) เพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมที่มีลักษณะป่องออกของเนื้อเยื่อ (ลูกศรชี้)

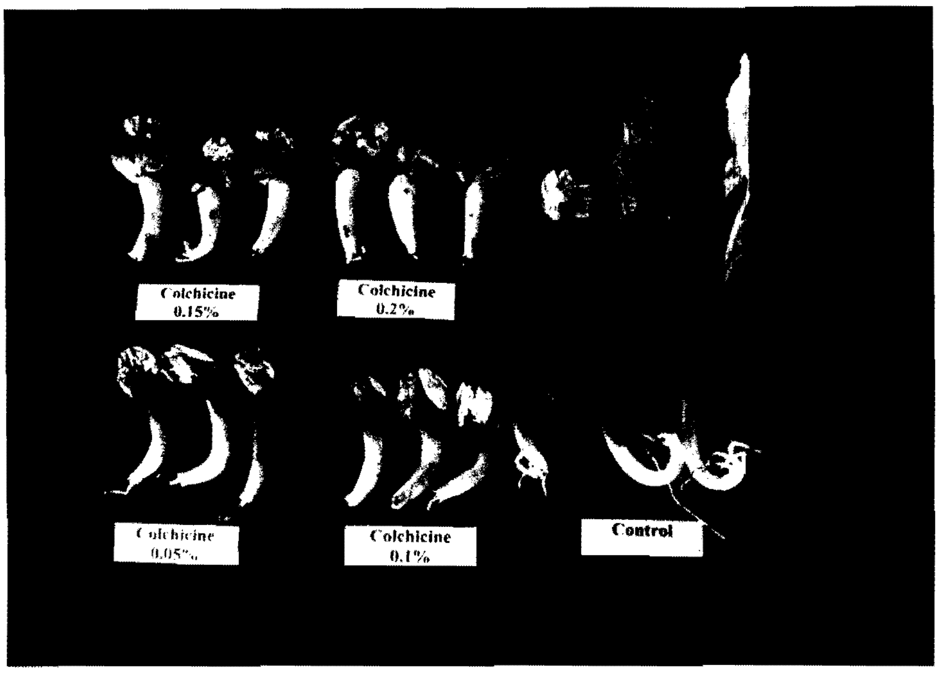
4.2 ผลของสาร colchicine ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำด้วยวิธีการแช่เมล็ด

จากผลการศึกษาในหัวข้อ 4.1 พบว่าต้นสบู่ดำที่ได้รับสาร colchicine นาน 48 ชั่วโมง สามารถเจริญเติบโตได้ปกติจึงทำการศึกษาการเหนี่ยวนำสบู่ดำเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมโดยการแช่เมล็ดสบู่ดำที่งอกปุ่มรากในสาร colchicine ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง และพบว่า สาร colchicine มีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นสบู่ดำ โดยหลังจากเมล็ดสบู่ดำได้รับสาร colchicine ต้นกล้าจะมีขนาดลำต้นอวบบวม ขนาดใบเลี้ยงใหญ่และหนา รากมีขนาดใหญ่และไม่ยืดยาว เมื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์ (ภาพที่ 6) และต้นสบู่ดำที่ได้รับสาร colchicine ระดับความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 41.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อต้นกล้าอายุ 1 เดือน ในถุงเพาะ และ 38.75 เปอร์เซ็นต์ หลังจากปลูกในแปลง ต้นสบู่ดำที่รอดชีวิตจะมีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า ส่วนต้นกล้าสบู่ดำที่รับ colchicine ระดับความเข้มข้น 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ แสดงลักษณะเน่าเมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 5 วัน และตายในที่สุด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำที่แช่สาร colchicine ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อต้นกล้าอายุ 5 วัน

ความเข้มข้นของ colchicine (%)	จำนวนต้นที่รอดชีวิตหลังเพาะ (%)	จำนวนต้นที่รอดชีวิตในแปลงปลูก (%)
0 (control)	96.25 a	95.00 a
0.05	41.25 b	38.75 b
0.1	0.00 c	0.00 c
0.15	0.00 c	0.00 c
0.2	0.00 c	0.00 c
F-test	**	**
C.V. (%)	21.3	21.91

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 6 ต้นกล้าสบู่ดำอายุ 5 วัน หลังจากแช่สาร colchicine ระดับความเข้มข้น 0, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง

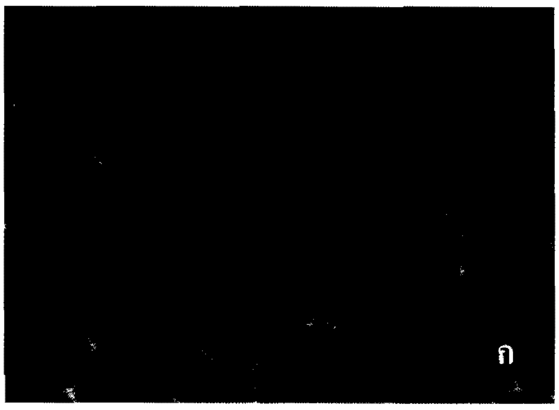
4.3 ผลของระดับความเข้มข้นสาร colchicine และ oryzalin ต่อขนาดเซลล์คุมปากใบของสบู่ดำ

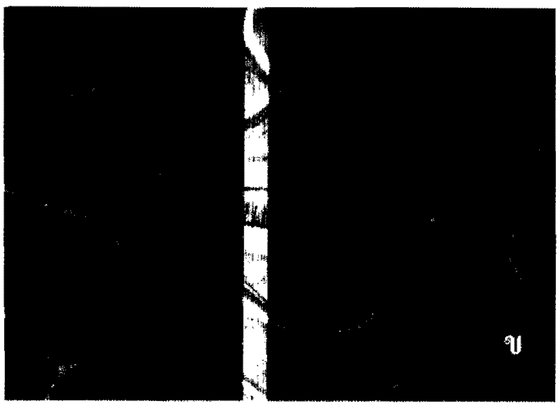
ภายหลังจากการเหนี่ยวนำสบู่ดำเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมด้วยวิธีการหยดบนยอดอ่อน และการแช่เมล็ดด้วยสาร colchicine และ oryzalin พบปลายสบู่ดำแตกกิ่ง 2 - 3 กิ่งต่อต้น ที่แสดงลักษณะขนาดและความหนาของใบแตกต่างกันจึงทำการศึกษาผลของสารของ colchicine และ oryzalin ต่อขนาดเซลล์คุมปากใบสบู่ดำ โดยศึกษาจากกิ่งสบู่ดำที่วัดความยาวเซลล์คุมปากใบทั้งหมดจำนวน 2,606 กิ่ง พบว่า สบู่ดำต้นดิพลอยด์ มีความยาวของเซลล์คุมปากใบอยู่ระหว่างช่วง 35 - 50 ไมครอน ต้นสบู่ดำที่ได้รับสาร colchicine และ oryzalin มีความยาวของเซลล์คุมปากใบตั้งแต่น้อยกว่า 35 ไมครอน จนถึง มากกว่า 55 ไมครอน (ภาพที่ 7) และมีความแตกต่างกับความยาวเซลล์คุมปากใบดิพลอยด์ โดยสาร colchicine ระดับความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ และ oryzalin ระดับความเข้มข้น 0.0020 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์ของจำนวนกิ่งที่มีขนาดเซลล์คุมปากใบมากกว่า 55 ไมครอน สูงสุด คือ 2.35 และ 1.91 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งจะคัดเลือกกิ่งที่มีขนาดเซลล์คุมปากใบยาวกว่า 50 ไมครอน ไปตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรมในเซลล์ ด้วยเทคนิค flow cytometry ต่อไป

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์จำนวนกิ่ง และขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบของสบู่ดำที่ได้รับ colchicine และ oryzalin ที่ระดับความเข้มต่าง ๆ

ระดับความเข้มข้น (%)	จำนวนกิ่งสบู่ดำที่วัดความยาวเซลล์คุมปากใบ (%)					
	น้อยกว่า 35 (ไมครอน)	35-40 (ไมครอน)	40-45 (ไมครอน)	45-50 (ไมครอน)	50-55 (ไมครอน)	มากกว่า 55 (ไมครอน)
0 (control)	3.03	57.58	36.36	3.03	0.00	0.00
col. 0.05	19.25	66.20	14.32	0.23	0.00	0.00
col. 0.10	12.25	67.55	16.00	1.50	2.00	0.75
col. 0.15	13.37	67.07	10.08	2.47	6.17	0.83
col. 0.20	14.79	65.02	9.62	3.29	4.93	2.35
ory. 0.0005	6.25	75.00	13.64	1.14	3.40	0.57
ory. 0.0010	11.60	56.35	30.94	0.00	1.10	0.00
ory. 0.0015	21.29	62.58	10.32	0.65	5.16	0.00
ory. 0.0020	17.22	61.24	13.87	2.39	3.35	1.91

หมายเหตุ col. หมายถึง colchicine และ ory. หมายถึง oryzalin





ภาพที่ 7 เซลล์คุมปากใบสบู่ดำดิพลอยด์ (ก) และโพลีพลอยด์ (ข)

4.4 ผลของ colchicine และ oryzalin ต่อจำนวนชุดโครโมโซมของสบู่ดำ

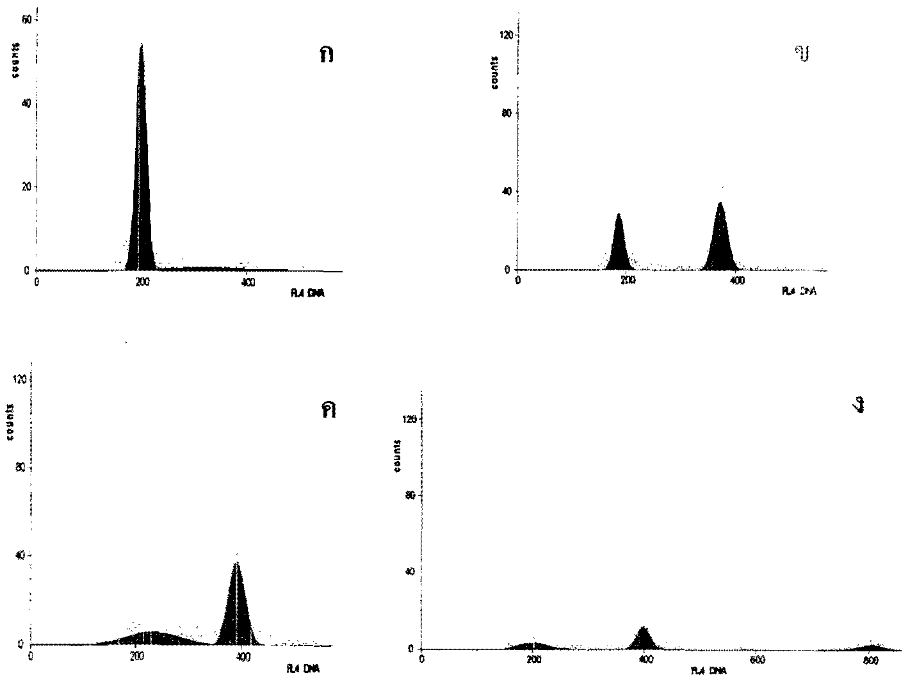
จากผลการตรวจวัดหาปริมาณสารพันธุกรรมของสบู่ดำที่ได้รับสาร colchicine และ oryzalin ที่มีจำนวนเซลล์คุมปากใบมากกว่า 50 ไมครอน จำนวน 114 ตัวอย่างโดยเทคนิค flow cytometry พบว่า มีจำนวนต้นสบู่ดำที่มีต้นเททระพลอยด์ (4x) จำนวน 11 ตัวอย่าง นอกนั้นจะเป็นมิกโซพลอยด์ (2x + 4x) และต้นดิพลอยด์ (2x) เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แต่ละความเข้มข้นของสาร colchicine และ oryzalin พบว่า ต้นสบู่ดำที่ได้รับสาร colchicine 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการหยดปลายยอด ได้เปอร์เซ็นต์ของต้นเททระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์สูงสุด รองลงมา คือ ระดับความเข้มข้น 0.15 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) พบว่า สาร oryzalin ระดับความเข้มข้น 0.0015 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับที่พบต้นสบู่ดำเททระพลอยด์และมิกโซพลอยด์สูงสุด (ตารางที่ 4) การใช้ flow cytometry แยกความแตกต่างของโพลีพลอยด์ สามารถแยกความแตกต่างที่เป็นดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์ได้ มีความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 3 ผลของสาร colchicine ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อระดับโพลีพลอยด์ของสบู่ดำ

สิ่งทดลอง **ระดับความเข้มข้นสาร colchicine (%)**	**จำนวนต้นสบู่ดำที่ขนาดเซลล์คุมปากใบเปลี่ยนแปลง (%)**	**ระดับของโพลีพลอยด์ (%)**		
		2n= 2x	**2n= 4x**	**2n=2x+4x**
0 (control)	0.0	100.0	0.0	0.0
0.05	0.0	99.7	0.0	0.4
0.10	9.1	97.9	0.3	1.8
0.15	18.1	97.9	0.3	1.8
0.20	16.7	96.2	1.0	2.9

ตารางที่ 4 ผลของสาร oryzalin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อระดับโพลีพลอยด์ของสบู่ดำ

สิ่งทดลอง ความเข้มข้นสาร oryzalin (%)	จำนวนต้นสบู่ดำที่ขนาดเซลล์คุมปากใบเปลี่ยนแปลง (%)	ระดับของโพลีพลอยด์		
		2n=2x	2n=4x	2n=2x+4x
0 (control)	0	100	0	0
0.0005	4.4	96.3	0	3.7
0.001	0.6	98.9	0	1.1
0.0015	10.9	93.1	2	5
0.002	9	95.1	0.5	4.4

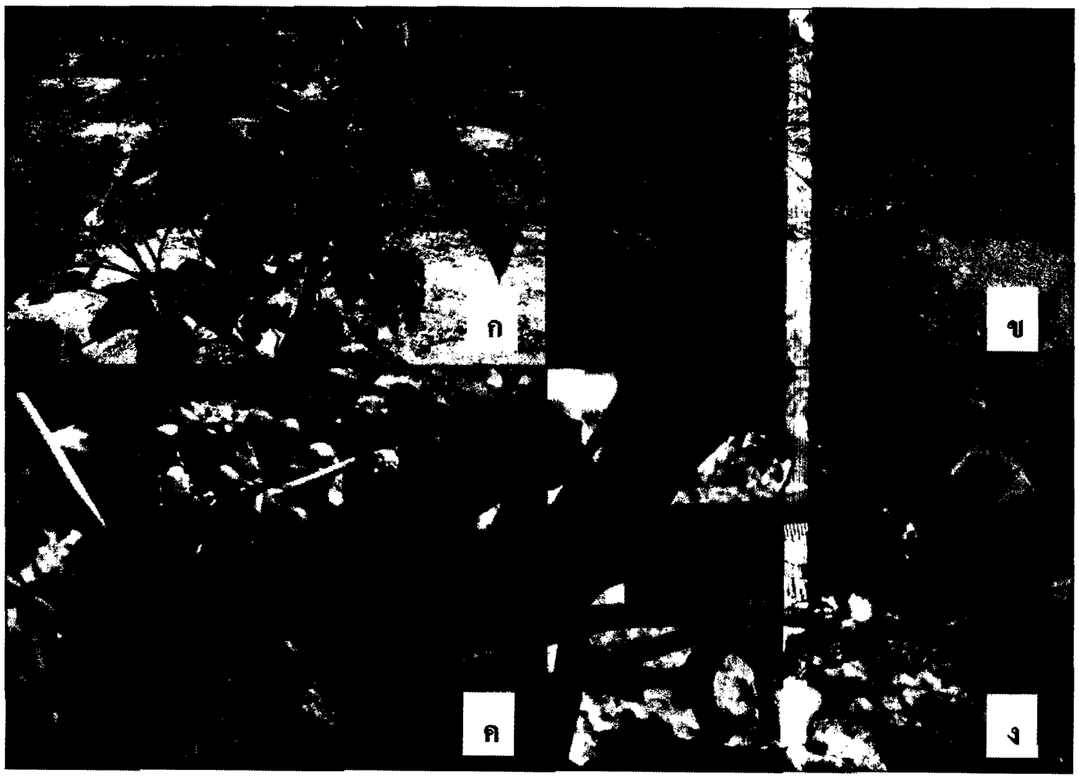


ภาพที่ 8 แสดงผลการวัดปริมาณสารพันธุกรรมของสบู่ดำดิพลอยด์ (2x) (ก) มิกโซพลอยด์ (2x + 4x) (ข) เททระพลอยด์ (4x) (ค) และมิกโซพลอยด์ (2x + 4x + 8x) (ง)

4.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสบู่ดำโพลีพลอยด์

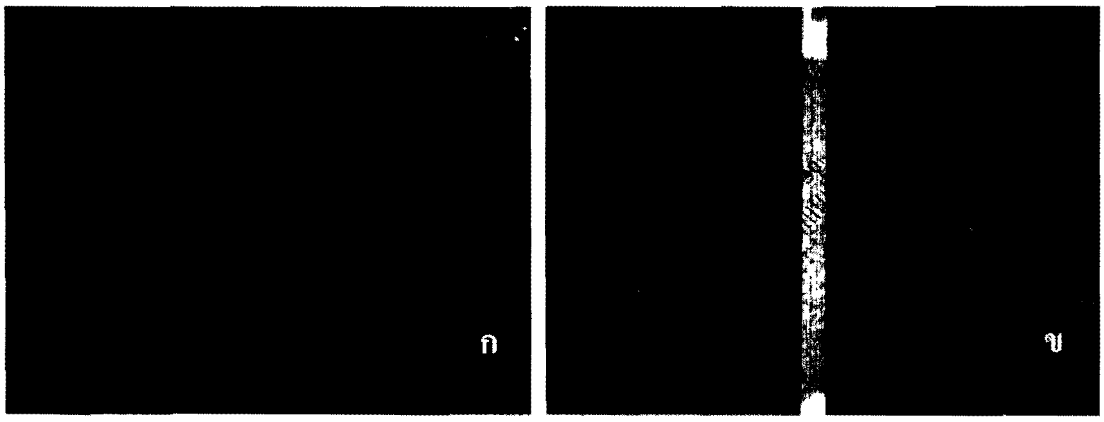
จากผลการศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นสบู่ดำปกติ และต้นสบู่ดำหลังได้รับสาร colchicine และ oryzalin พบว่า ต้นที่ได้รับสาร colchicine และ oryzalin มีลักษณะ

ของสัณฐานวิทยาแตกต่างจากต้นดิพลอยด์ คือ มีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ และแตกกิ่งก้านน้อย ลำต้น กิ่ง ก้านใบ และใบมีขนาดใหญ่และหนามากขึ้น และผิวแผ่นใบมีลักษณะขรุขระ หากสัมผัสรู้สึกสากมือ ก้านช่อดอกสั้นและใหญ่ ดอกเรียงตัวกันแน่นเป็นกระจุก (ภาพที่ 9) ดอกเพศผู้ และดอกเพศเมียมีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 10) ขนาดเซลล์คุมปากใบและละอองเกสรเพศผู้ใหญ่กว่าปกติ (ภาพที่ 11) โดยมีขนาดของละอองเกสรเพศผู้ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสบู่ดำดิพลอยด์ (ตารางที่ 5) ลักษณะผลสบู่ดำ สามารถสังเกตเห็นได้ในช่วงแรกของการติดผล โดยผลสบู่ดำโพลีพลอยด์มีเหลี่ยมชัดเจนจนถึงระยะสุกแก่ เมื่อเปรียบเทียบกับสบู่ดำดิพลอยด์ (รูปที่ 12) ลักษณะผลใหญ่ มีเปลือกหุ้มเมล็ดหนา แต่ไม่ติดเมล็ด และร่วงก่อนถึงระยะสุกแก่ (รูปที่ 13) ดังนั้นการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในการคัดเลือกต้นที่คาดว่าจะเป็นโพลีพลอยด์สามารถกระทำได้ในเบื้องต้น เพื่อลดงาน และลดต้นทุนการคัดเลือก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมจะส่งผลให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปกติ



ภาพที่ 9 ต้นสบู่ดำดิพลอยด์ (ก) ต้นสบู่ดำที่ได้รับสารเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (ข) ช่อดอกของต้นสบู่ดำดิพลอยด์ (ค) และโพลีพลอยด์ (ง)

ภาพที่ 10 ดอกเพศผู้ของต้นสบู่ดำโพลีพลอยด์และต้นสบู่ดำดิพลอยด์

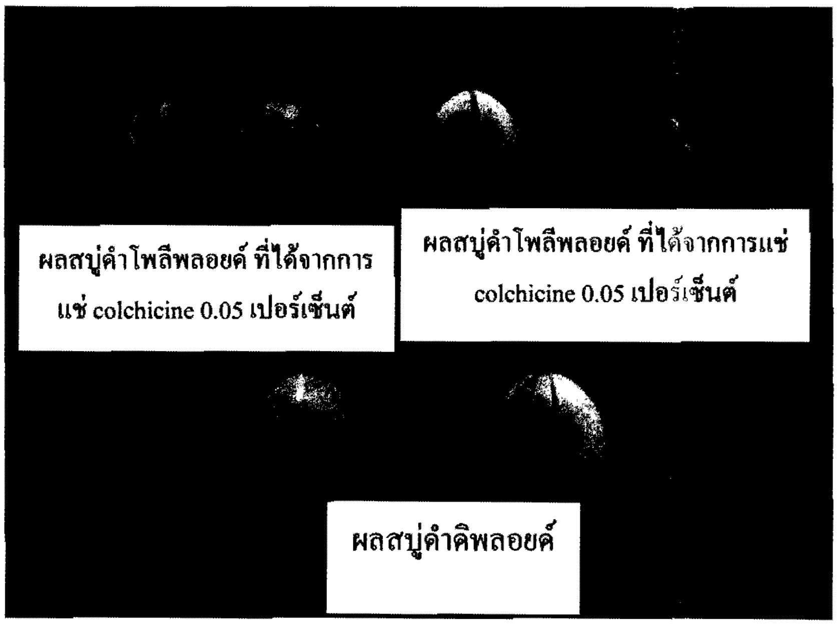


ภาพที่ 11 ละอองเกสรเพศผู้ดิพลอยด์ (ก) และโพลีพลอยด์ (ข)

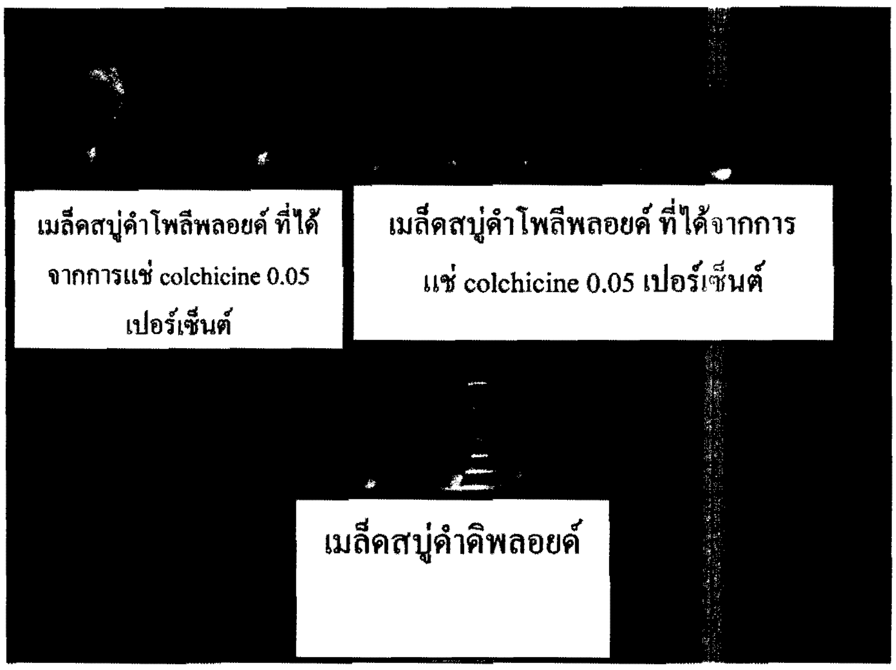
ตารางที่ 5 ความยาว และความกว้างของดอกเพศผู้ และขนาดละอองเกสรเพศผู้สบู่ดำที่ได้รับและไม่ได้สาร colchicine

	ขนาดดอกเพศผู้		
สิ่งทดลอง	**ความยาว (ซม.)**	**ความกว้าง (ซม.)**	**ละอองเกสรเพศผู้ (ไมครอน)**
control	0.597 b	0.633 b	89.06 b
colchicine	0.741 a	0.764 a	115.5 a
F-test	**	**	**

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 12 ผลสบู่ดำของต้นโพลีพลอยด์และต้นดิพลอยด์



ภาพที่ 13 เมล็ดสบู่ดำของต้นโพลีพลอยด์และต้นดิพลอยด์

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

5.1 ผล ของสาร colchichine และ oryzalin ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำ

ระดับความเข้มข้นของสาร colchicine (0.05 - 0.2 เปอร์เซ็นต์) กับ oryzalin (0.0005 - 0.002 เปอร์เซ็นต์) วิธีการหยดยอดสบู่ดำ ในช่วง 1 สัปดาห์หลังจากให้สาร colchicine และ oryzalin มีผลให้ต้นกล้าเจริญเติบโตช้ากว่าต้นปกติ เนื่องจากเซลล์บริเวณที่ได้รับสารดังกล่าวมีความผิดปกติและปรับสมดุลภายในเซลล์และเนื้อเยื่อใหม่ อย่างไรก็ตามสาร oryzalin จะมีพิษต่อต้นกล้าสบู่ดำน้อยกว่า colchicine ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Madon et al. (2005) ที่พบว่า ปาล์มน้ำมันลูกผสมที่ได้รับสาร oryzalin มีการเจริญเติบโตดีกว่าปาล์มน้ำมันลูกผสมที่ได้รับสาร colchicine

ผลการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และวิสา ฉิมน้อย (2542) ที่ได้เหนี่ยวนำใบบัวบกต้นดิพลอยด์ ให้เป็นต้นโพลีพลอยด์ โดยการใช้สำลีชุบสารลาย colchicine ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ วางบนต้นอ่อน และใช้วิธีผสมสาร colchicine ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ กับวุ้นวางบนปลายยอดของต้นอ่อน นาน 6 วัน พบว่าวิธีการทั้ง 2 มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 60 - 80 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Sarathum et al. (2010) ได้ศึกษาการเหนี่ยวนำกล้วยไม้ให้เกิดโพลีพลอยด์กับเนื้อเยื่อ protocorm like bodies (PLBs) พบว่า PLBs ที่ได้รับ colchicine ความเข้มข้น 0.025 - 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 14 วัน มีอัตราการรอดชีวิต 33.5 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด คือ 36.8 เปอร์เซ็นต์

จากผลการศึกษาและการค้นเอกสาร พบว่า สาร colchicine มีความเป็นพิษเซลล์และเนื้อพืชอย่างมากเมื่อได้รับในระดับความเข้มข้นที่สูงและระยะเวลานาน ซึ่งการรอดชีวิตของพืชแต่ละชนิดจะไม่เหมือนกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมและชิ้นส่วนที่นำมาเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์ของพืชนั้น

5.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นสาร colchicine ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำ ด้วยวิธีการแช่เมล็ด

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำให้สบู่ดำเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมโดยการแช่เมล็ดสบู่ดำที่กำลังงอกราก ในสาร colchicine ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง พบว่า สาร colchicine ระดับความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์จะมีอัตราการรอดชีวิต

41.25 เปอร์เซ็นต์ ในระยะต้นกล้าที่เพาะในถุงเพาะ และ 38.75 เปอร์เซ็นต์หลังจากปลูกลงแปลง และทำให้ต้นสบู่ดำเจริญเติบโตช้า ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการใช้สาร colchicine ของ ดวงจันทร์ เกษบุตร (2549) ได้ศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดและการเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมของปทุมมาลูกผสม โดยใช้สาร colchicine 0.08 - 0.12 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 วัน ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของปทุมมาลูกผสม 20 - 40 เปอร์เซ็นต์ โดยจะแสดงอาการที่ใบเริ่มเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด เช่นเดียวกับรายงานของ Gao et al. (1996) ที่พบว่าจำนวนกลุ่มยอดอ่อนของ *Salva miltiorrhiza* Bge. จะลดลงเมื่อได้รับสาร colchicine ความเข้มข้นสูงขึ้น ใน Inca lily ลูกผสม (Lu and Bridgen, 1997)

จากผลการทดลองและการตรวจเอกสาร ทำให้ทราบว่าความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้สาร colchicine กับพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน ซึ่งมีหลายปัจจัยที่ส่งผลดังกล่าว เช่น สารพันธุกรรมในพืช ชนิดเนื้อเยื่อที่นำมาเหนี่ยวนำ วิธีการ ระยะเวลาเหนี่ยวนำ และระดับความเข้มข้นของสาร colchicine ซึ่งมากหรือน้อยจำเป็นต้องพิจารณาควบคู่กับปัจจัยที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด

5.3 ผลของความเข้มข้นสาร colchicine และ oryzalin ต่อขนาดเซลล์คุมปากใบของสบู่ดำ

จากผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของสาร colchicine (0.05 - 0.20 เปอร์เซ็นต์) กับ oryzalin (0.0005 - 0.0020 เปอร์เซ็นต์) ต่อเซลล์คุมปากใบนั้น หลังจากตรวจวัดความยาวและความกว้างของเซลล์คุมปากใบสบู่ดำจำนวน 1,800 กิ่ง จาก 20 สิ่งทดลอง พบว่าความยาวของปากใบเพิ่มขึ้นแตกต่างกัน ซึ่งมีความยาวปากใบอยู่ระหว่างช่วง 35 - 55 ไมครอน ขึ้นไป

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับโพลีพลอยด์กับขนาดของเซลล์ผิว (epidermal cell) ของ *Arabidopsis* โดย Melaragno et al. (1993) พบว่าเซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นตามระดับโพลีพลอยด์ที่เพิ่มขึ้น โดยเซลล์ดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์ จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ 96, 199 และ 372 หน่วย ตามลำดับ และ Morgan et al. (2003) ได้ทำการทดสอบวิธีการสร้างต้น *Gentina triflora* Var. japonica ต้นดิพลอยด์ให้เกิดต้นเททระพลอยด์ ได้กล่าวว่าการตรวจสอบระดับความเป็นเททระพลอยด์ ควรใช้ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา เช่น ความหนาของใบ และขนาดเซลล์คุมปากใบ เป็นต้น ในการคัดเลือกเบื้องต้น ซึ่งก็มีรายงานที่สอดคล้องกับหลายงานทดลอง เช่น calla lily (Cohen and Yao, 1996) กล้วย (Van Duren et al. 1996) Inca lily (Lu and Bridgen, 1997) กล้วยไข่ (Saradhulhat and Silayoi, 2001) และขิง (Smith et al., 2004) เป็นต้น

วิธีการศึกษาผลของสาร colchicine และ oryzalin หรือการคัดเลือกเบื้องต้นนั้นการใช้ขนาดเซลล์คุมปากใบ ซึ่งเป็น epidermal cell ที่ขนาดเซลล์นี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อพืชมีโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากเดิม และสามารถทำได้ง่าย สะดวก ลดต้นทุนและเวลาได้ จึงเห็นว่าในการ ศึกษาผลของสาร

colchicine และ oryzalin กับพืช สามารถใช้ขนาดเซลล์คุมปากใบเป็นเกณฑ์ในการศึกษาหรือคัดเลือกเบื้องต้น

5.4 ผลของ colchicine และ oryzalin ต่อจำนวนโครโมโซมของสบู่ดำ

จากผลการตรวจวัดหาปริมาณสารพันธุกรรมของสบู่ดำ โดยเทคนิค flow cytometry พบว่า ระดับความเข้มข้นของสาร colchicine (0.05 - 0.2 เปอร์เซ็นต์) กับ oryzalin (0.0005-0.002 เปอร์เซ็นต์) วิธีการหยดบนยอดอ่อน ความเข้มข้นที่ให้ต้นที่เป็นเททระพลอยด์สูงสุดคือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ระดับความเข้มข้น 0.15 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสาร oryzalin ความเข้มข้น 0.0015 และ 0.002 เปอร์เซ็นต์ ที่ให้ต้นสบู่ดำเททระพลอยด์สูงสุด คือ 2.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะให้เปอร์เซ็นต์ต้นเททระพลอยด์ต่ำกว่า การทดลองของ Leire et al. (2006) ในการเหนี่ยวนำมันฝรั่งลูกผสม โดยเพาะเลี้ยงส่วนปลายยอด ในอาหารสูตร MS ประยุกต์ที่มีส่วนประกอบของ สาร oryzalin ระดับความเข้มข้น 0, 0.001 และ 0.002 เปอร์เซ็นต์ และสาร colchicine ระดับความเข้มข้น 0, 0.005 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสาร DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า สาร oryzalin ระดับความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ให้ต้นเททระพลอยด์มากที่สุดถึง 43 เปอร์เซ็นต์

ผลที่แตกต่างกันขึ้นกับวิธีการและการควบคุมสภาพแวดล้อมในระหว่างการให้สาร colchicine และ oryzalin แต่ความเข้มข้นของสารทั้งสองก็ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน อีกปัจจัยคือชนิดพืชที่แตกต่างกัน ดังนั้นความเข้มข้นสารทั้งสองจึงให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน เช่น ในการทดลองของ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และวิสา ฉิมน้อย (2542) ได้เหนี่ยวนำใบบัวบกต้นดิพลอยด์ให้เป็นต้นโพลีพลอยด์ พบว่า การใช้สำลีชุบสารละลาย colchicine ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดต้นโพลีพลอยด์ดีที่สุด ในขณะที่การใช้วุ้นผสม colchicine ทั้ง 2 ระดับ จะเกิดต้นโพลีพลอยด์ไม่แตกต่างกัน และ Glendon et al. (2008) ได้เหนี่ยวนำให้ *Watsonia lepida* N.E. Brown ยอดอ่อน อายุ 3 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ผสมสาร oryzalin ระดับความเข้มข้น 0-0.004 เปอร์เซ็นต์ และสาร colchicine ระดับความเข้มข้น 0 - 0.01 เปอร์เซ็นต์ นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าสารทั้งสองชนิดให้เปอร์เซ็นต์ต้นมิกโซพลอยด์มากกว่าเททระพลอยด์ และสาร oryzalin ที่ระดับความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้ *Watsonia lepida* N.E. Brown เกิดต้นเททระพลอยด์ที่สุด คือ มีการรอดตายสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ และให้ต้นเททระพลอยด์มากที่สุดถึง 33 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบการเหนี่ยวนำของสาร colchicine และ oryzalin สบู่ดำแล้ว พบว่าสาร colchicine มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดสบู่ดำเททระพลอยด์มากกว่า สาร oryzalin ซึ่งให้

ต้นสบู่ดำมิกโซพลอยด์มากกว่าเททระพลอยด์ ซึ่งสอดคล้ายกับการสร้างปาล์มลูกผสมให้ติดเมล็ด และขยายพันธุ์ได้ โดยเหนี่ยวนำปาล์มลูกผสมเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม ด้วยสาร colchicine และสาร oryzalin (Madon et al., 2005; Sainiya and Sompong, 2012)

5.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสบู่ดำโพลีพลอยด์

จากผลการศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นสบู่ดำปกติ และต้นสบู่ดำหลังได้รับสาร colchicine และ oryzalin พบว่ามีลักษณะของสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกับต้นปกติอย่างชัดเจน คือ ต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมจะเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ กิ่ง และก้านใบใหญ่ ใบหนา ขนาดดอกเพศผู้และดอกเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าปกติ ซึ่งก็ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองในพืชหลายชนิด เช่น การทดลองของ Morgan et al. (2003) ได้ทำการทดสอบวิธีการสร้างต้น *Gentina triflora* var. japonica ต้นดิพลอยด์ให้เกิดต้นเททระพลอยด์ รายงานว่าสัณฐานวิทยาของต้น *Gentina triflora* var. japonica มีความแตกต่างกัน เช่น ความหนาของใบ และขนาดเซลล์คุมปากใบของต้นเททระพลอยด์จะใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ Nassar et al. (2008) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของโพลีพลอยด์ต่อโครงสร้างทางกายวิภาคของมันสำปะหลัง พบว่าลำต้นของมันสำปะหลังที่เป็นเททระพลอยด์จะมีลักษณะของชั้น pericycle ที่หนาขึ้นและมี secondary xylem กว้างกว่าต้นมันสำปะหลังปกติ ส่วนในปาล์มน้ำมันโพลีพลอยด์ จะแสดงลักษณะต้นเตี้ย และใบเขียวเข้มกว่าต้นดิพลอยด์ (Madon et al., 2005)

การเพิ่มจำนวนโครโมโซมหรือสารพันธุกรรมในพืช มีผลต่อการแสดงออกทางลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชนั้น ๆ ซึ่งอาจจะแตกต่างกันในบางลักษณะ แต่ลักษณะที่เหมือนกันและสามารถเป็นลักษณะที่สังเกตได้คือ ลำต้นเตี้ย ใบหนา ขนาดดอกใหญ่ และสีสันอาจจะเข้มมากขึ้น และอีกลักษณะที่เกิดขึ้นกับสบู่ดำโพลีพลอยด์ คือ การร่วงของผลที่อยู่ในช่วงพัฒนาผล ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับความเป็นหมันของพืชที่เป็นโพลีพลอยด์ (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2551)

บทที่ 6
สรุป

6.1 ผลของ colchicine และ oryzalin ต่อจำนวนโครโมโซมของสบู่ดำ

สาร colchicine ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้เปอร์เซ็นต์ของต้นเททระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์สูงสุด รองลงมาคือ ระดับความเข้มข้น 0.15 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สาร oryzalin ระดับความเข้มข้น 0.0015 เปอร์เซ็นต์ พบต้นสบู่ดำเททระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์สูงสุด

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร colchicine และ oryzalin พบว่าสาร oryzalin ใช้ระดับความเข้มข้นน้อยกว่าสาร colchicine และให้เปอร์เซ็นต์ต้นสบู่ดำเททระพลอยด์ มากกว่าสาร colchicine

6.2 ผลของ colchicine และ oryzalin ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำ

การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำที่ได้รับสาร colchicine และ oryzalin ด้วยวิธีการหยดบนยอดอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่แตกต่างกับต้นปกติ แต่การเจริญเติบโตของยอดอ่อนจะช้ากว่าต้นดิพลอยด์ การรอดชีวิตของต้นกล้าสบู่ดำที่ได้รับสาร colchicine ด้วยการแช่เมล็ดสบู่ดำ พบว่าระดับความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิต 41.25 เปอร์เซ็นต์

6.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสบู่ดำโพลีพลอยด์

ลักษณะสัณฐานวิทยาสบู่ดำโพลีพลอยด์มีลักษณะของสัณฐานวิทยาแตกต่างจากต้นปกติ คือ มีการเจริญเติบโต้ช้ากว่าปกติ และแตกกิ่งก้านน้อย ลำต้น กิ่ง ก้านใบ และใบมีขนาดใหญ่และหนามากขึ้น ก้านช่อดอกสั้นและใหญ่ ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียมีขนาดใหญ่ขึ้น ขนาดเซลล์คุมปากใบและละอองเกสรเพศผู้ใหญ่กว่าปกติ ผลสบู่ดำโพลีพลอยด์มีเหลี่ยมชัดเจน ลักษณะผลใหญ่มีเปลือกหุ้มเมล็ดหนาแต่ไม่ติดเมล็ด

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธรักษ์. 2551. ปรับปรุงพันธุ์พืช : พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โกวิทย์ พัฒนาปัญญาสัตย์. 2539. โฟลไซโทเมทรี. กรุงเทพฯ : วงตะวัน.

จเร สดากร. 2527. "สบู่ดำพืชศักยภาพสูงเพื่อพลังงานทดแทนของประเทศไทย", วารสารวิชาการเกษตร. 2 : 67-72.

ชญานิษฐ์ ศิริแสงเลิศ. "เทคนิคการนับแยกเซลล์ด้วยวิธีการ Flow cytometry", องค์การเภสัชกรรม. cytrometryhttp://www.gpo.or.th/rdi/html/Flow-cytometry.html. มีนาคม, 2555.

ชำนาญ ฉัตรแก้ว และคณะ. 2549. สบู่ดำพืชพลังงาน. กรุงเทพฯ : ห้างหุ้นส่วน จำกัด ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง.

ดวงจันทร์ เกษบุตร. 2549. การเพิ่มจำนวนยอดและการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมในปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) โดยโคลชิซินในสภาพหลอดแก้ว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

ทวีศักดิ์ อุ่นจิตติกุล. 2548. สบู่ดำพืชพลังงานสารพัดประโยชน์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ บริษัท วศิระ จำกัด.

เบญจมาศ ศิลาย้อย. "โพลีพลอยดี", สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.). http://www.ipst.ac.th/biology/bio-Articles/ mag- content 36.html. ธันวาคม, 2553.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. สบู่ดำเพื่อไบโอดีเซล. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มติชน.

ระพีพันธุ์ ภาสบุตร และสุขสันต์ สุทธิผลไพบูลย์. 2548. "น้ำมันสบู่ดำพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซลและเบนซิน", เกษตรกรรมธรรมชาติ. 8 : 21-27.

————. 2548. "สรรพคุณสบู่ดำ", เทคโนโลยีชาวบ้าน. 362(17) : 109-110; กรกฎาคม.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และวิสา ฉิมน้อย. 2542. "การชักนำ ให้เกิดพอลีพลอยด์ในต้นบัวบกโดยใช้สารโคลชิซีน", วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2 : 55-65.

วิมลรัตน์ ศุกรินทร์ และคณะ. 2534. "การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำเพื่อผลผลิตสูงโดยใช้รังสีแกมมา", ใน รายงานผลการวิจัยประจำปี 2532. น.140-159. ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่ : กรมวิชาการเกษตร.

สุรพล เกาะเรียนอุดม. 2548. การตรวจหาระดับเม็ดเลือดขาวชนิด CD4. การตรวจวินิจฉัยเอชไอวี/เอดส์ทางห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนา.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Air New Zealand. "The good oil", http://static.airnewzealand.com/assets /Resources-AirNZ/Environment/environment-booklet-november08.pdf. June, 2011.

Alan, A. R. and et al. 2007. "Complementary strategies for ploidy manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.)", Plant Science. 173: 25-31.

Ali, M., H., Okubo and K., Fujieda. 1992. "Production and characterization of *Solanum* amphidiploids and their resistance to bacterial wilt", Scientia Horticulturae. 49: 181-196.

Baitian, T. and et al. 2008. "Effects of biodiesel and *Jatropha* oil on performance black smoke and durability of single-cylinder diesel engine", Journal of Metals, Materials and Minerals. 18(2): 181-185.

Cohen, D. and J., Yao. 1996. "*In vitro* chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 47: 43-49.

Dvorakova, K. and et al. 1997. "Pharmacokinetic studies of the herbicide and antitumor compound oryzalin in mice", Journal of chromatography. 696(2): 275-281.

Edward, F. H. 1954. "History of the use colchicine and related medicaments in gout", Ann rheum dis. 13: 190-200.

Gao, S. L., B. J., Chen and D. N., Zhu. 2002. "*In vitro* production and identification of autotetraploids of *Scutellaria baicalensis*", Plant Cell. 70: 289-293.

Glendon, D. A., J. V., Staden and J. E., Erwin. 2008. "Effectiveness of colchicine and oryzalin at inducing polyploidy in *Watsonia lepida* N.E. Brown", Hort science. 43: 2248-2251.

Graham, W., and J. B., Roberts. 1952. "In travennous colchicines in the treatment of gouty arthritis", Ann rheum dis. 12: 16-19.

Jaskani, M. J., S.W., Kwon and D. H., Kin. 2005. "Flow cytometry of DNA contents of colchicine treated watermelon as a ploidy screening method at M1 stage", Pakistan Journal of Botany. 37(3): 685-696.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Kaewpoo, M. and S., Te-chato. 2010. "Study on ploidy level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry", Journal of Agricultural Technology. 6(2): 391-400.

Katsiotis, A. and R.A., Forsberg. 1995. "Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Arena*", Euphytica. 83: 103-108.

Kenneth, D. B., and et al. 1993. Clinical flow cytometry: principles and application. Baltimore: Williams&Wilkins.

Leire, B. and et al. 2006. "Oryzalin treatment of potato diploids yields tetraploid and chimeric plants from which euploids could be derived by callus induction", Potato research. 49: 143-154.

Lu, C. and M.P., Bridgen. 1997. "Chromosome doubling and fertility study of *Alstroemeria aurea* x *A. caryophyllaea*", Euphytica. 94: 75-81.

Madon, M., and et al. 2005. "Polyploidy induction of oil palm through colchicines and oryzalin treatments", Journal of palm research. 17: 110-123.

Melaragno, J. E., B., Mehrotra and A. W., Coleman. 1993. "Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*", The Plant Cell. 5: 1661-1668.

Morgan, E. R., B. L., Hofmann and J. E., Grant. 2003. "Production of tetraploid *Gentiana triflora* var. Japonica Royal Blue plants", New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 31(1): 65-68.

Muzaffar, A. and A., Borossi. 1991. "Chemistry of colchicine", Pharmacology and therapeutics. 49(1-2): 105-109.

Nassar, N. M. A. and et al. 2008. "Anatomical alterations due to polyploidy in cassava, *Manihot esculenta* Crantz", Genetics and molecular research. 7(2): 276-283.

Oregon state university and Intertox, Inc. "Washington state deparment of transportation oryzalin", roadside vegetation management herbicide fact sheet. www.wsdot.wa.gor/oryzalin. July, 2012.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Petersen, K. K., P., Hagberg and K., Kristiansen. 2003. "Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*", Plant Cell Tissue and Organ Culture. 73(2): 137-146.

Ranney, T. G. "Polyploid: From evolution to landscape plant improvemet", North CarolinaCooperativeExtension. http://www.ces.ncsu.edu/Fletcher/programs/nurseey/metria/metria11/ranney/polyploidy.htm. September, 2010.

Sainiya, S. and S., Te-chato. 2012. "Ploidy induction through secondary somatic embryo (SSE) of oil palm by colchicine treatment", Journal of Agricultural Technology. 8(1): 337-352.

Saradhuhat, P. and B., Silayoi. 2001. "Some chemical treatment on Kluai Khai through tissue culture for mutation breeding", Kasetsart Journal (Nutural Science). 35(3): 231-241.

Sarathum, S., and et al. 2010. "Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L.", European Journal of Horticultural Science. 75(3): 123-127.

Shen, J. and et al. 2010. "AFLP analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* grown in Hainan, China", Tree. J. 24(3):455-462.

Smith, M. K.and and et al. 2004. "Ginger (*Zingiber officinale*) autotetraploids with improved processing quality produced by an *in vitro* colchicine treatment", AustralianJournal of Experimental Agriculture. 44(10): 1065-1072.

Soltis, D. E. and. S. P., Soltis. 1999. "Polyploidy: recurrent formation and genome evolution", Tree. J. 14(9): 348-352.

Soltis, D. E., S. P., Soltis. and J. A., Tare. 2003. "Advances in the study of polyploidy since plant speciation", New Phytologist. 161: 173-191.

Thao, N. T. P. and et al. 2003. "Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments", Plant Cell. 72: 19-25.

Van Duren, M. and et al. 1996. "Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminate*) by *in vitro* techniques", Euphytica. 88: 25-34.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Wikipedia. "Colchicine structure", http://en.wikipedia.org/wiki/File: Colchicin structure. png. March, 2012.

________. "Oryzalin", http://en.wikipedia.org/wiki/File:Oryzalin.png. January, 2009.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี colchicine และ oryzalin

1. การเตรียมสาร colchicine และ oryzalin

1.1 การเตรียมสาร colchicine

นำสาร colchicine บริสุทธิ์ จำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สาร colchicine ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเตรียมสารละลาย colchicine เข้มข้น 0.2, 0.15, 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สูตรการคำนวณปริมาตรและความเข้มข้นสาร $C_1V_1 = C_2V_2$

1.2 การเตรียมสาร oryzalin

นำสาร oryzalin บริสุทธิ์ จำนวน 100 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายสารอะซิโตน (acetone) เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ละลายจนสาร oryzalin หมด แล้วเติมน้ำกลั่น และเปิดฝาขวดให้สารอะซิโตนระเหยออกจนหมด ปรับปริมาตรสารโดยเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร100 มิลลิลิตร จะได้สาร oryzalin ที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเตรียมสารละลาย oryzalin เข้มข้นเป็น 0.002, 0.0015, 0.001 และ 0.0005 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้สูตรการคำนวณปริมาตรและความเข้มข้นสาร $C_1V_1 = C_2V$

ภาคผนวก ข

หลักการของ flow cytometry

หลักการของ flow cytometry

การทำงานของ flow cytometer อาศัยการวัดเซลล์ที่กำลังไหลอยู่ ซึ่งจะวัดปริมาณของสารเรืองแสงที่เปล่งบนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์ขณะที่ไหล ผ่านทางพรวย (nozzle) ของเครื่องเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ในอัตราเร็ว 500-1,000 เซลล์ต่อวินาที เมื่อเซลล์ไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ แสงที่กระทบเซลล์จะเกิดการหักเหเป็น 2 ทิศทาง ในตัวเครื่องจะมีตัวมารับการหักเหของแสงเรียกว่า "detector" ซึ่งจะวัดค่าการหักเหของแสงเป็นมุมแคบทางด้านหน้าทำให้สามารถหาขนาดของเซลล์ ได้ และวัดค่าการหักเหของแสงที่ออกจากเซลล์จะทำให้สามารถวัดส่วนประกอบภายในเซลล์ได้ จากนั้นเครื่องก็จะเปลี่ยนสัญญาณแสงให้กลายเป็นสัญญาณไฟฟ้า และส่งข้อมูลไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผลออกมาเป็นค่าทางดิจิตอล เป็นขนาด และรูปร่างของเซลล์หรือโมเลกุลนั้น ๆ (Kenneth, 1993)

องค์ประกอบภายในเครื่อง flow cytometer

อุปกรณ์ภายใน flow cytometer มีส่วนประกอบหลัก ๆ คือ

1. แหล่งกำเนิดแสงหรือแหล่งกระตุ้นพลังงานเป็นเลเซอร์ที่ปล่อยแสงที่ความยาวคลื่นจำเพาะออกมา

2. ส่วนควบคุมการไหล ส่วนนี้จะควบคุมการไหลของเซลล์แขวนลอยในของเหลวให้ผ่านเลเซอร์

3. detector จะวัดการเปล่งแสงจากเซลล์ที่ไหลผ่านลำแสงเลเซอร์

การทำงานของ flow cytometer

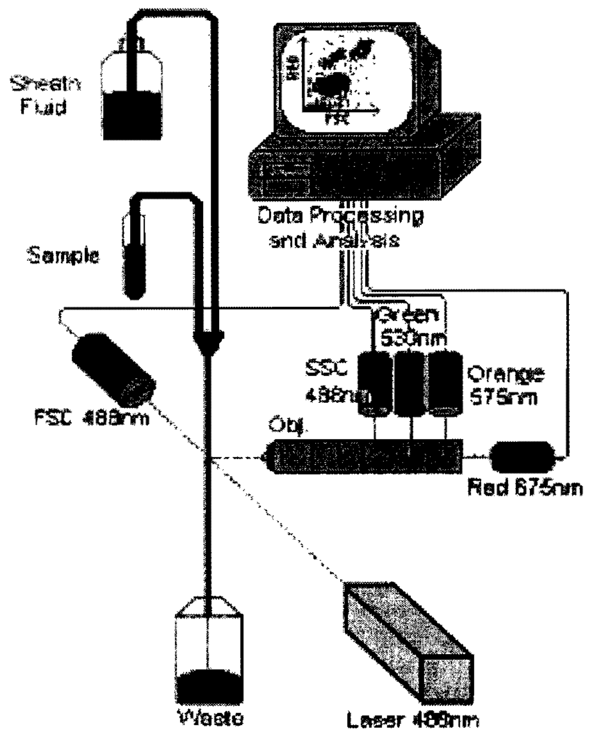
ขั้นแรกส่วนควบคุมการไหลจะดูดสารละลายเซลล์ขึ้นมาผสมรวมกับบัฟเฟอร์ที่เรียกว่า "sheath fluid" เพื่อเข้าสู่หัวฉีดที่จะบังคับให้เซลล์แขวนลอยเหล่านี้จะวิ่งเป็นสายของเซลล์เดี่ยว ๆ ผ่านลำแสงเลเซอร์

ลำแสงเลเซอร์ monochromatic ที่กระทบกับเซลล์จะทำให้อิเล็คตรอนของสีย้อมเรืองแสงเข้าสู่สภาวะกระตุ้นซึ่งเกิดพลังงานในระดับที่สูง และหลังจากผ่านลำแสงเลเซอร์แล้วอิเล็คตรอนก็จะสูญเสียพลังงานในรูปแบบของโฟตอน และเปล่งแสงในความยาวคลื่นที่ยาวจำเพาะซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วย detector

เซลล์ที่มีแอนติบอดีกับ marker จับกันจะเรืองแสงขึ้น ผลรวมของโฟตอนที่เรืองแสงออกมาจะมีความสัมพันธ์กับผลรวมของแอนติบอดีที่จับอยู่ต่อเซลล์ การวัดความแตกต่างของสีย้อมเรืองแสงอย่างต่อเนื่องนี้เกิดขึ้นได้เพราะความแตกต่างกันของการเปล่งแสงสเปคตรา

การวัดการเรืองแสงจะขึ้นอยู่กับการดูดซับ และการเปล่งแสงของเซลล์ในความยาวคลื่นต่างๆ โดย flow cytometer จะใช้ฟิลเตอร์กรองแสงจากแหล่งกำเนิดแสงที่เดินทางผ่านเซลล์ลงสู่ detector การวัดแสงที่กระจายออกจะวัดอยู่ 2 ที่คือ แสงส่วนที่กระจายผ่านเซลล์ (forward scatter signal: FSC) จะบอกถึงความสัมพันธ์ของขนาดเซลล์ และสัญญาณแสงที่กระจายออกด้านข้าง (side scatter signal: SSC) จะบอกถึงข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะ granule ของเซลล์ การตรวจวัดในส่วนนี้จะวัดการเปล่งแสงของเซลล์ซึ่งยอมให้แสงเบี่ยงเบนที่ รบกวนสัญญาณจากพื้นหลังลงสู่ detector น้อยมากๆ ลำแสงทั้งสองทางนี้จะผ่านเลนส์ และฟิลเตอร์ซึ่งทำหน้าที่หักเหแสง และกรองสัญญาณแสงไปยัง photomultiplier tube ซึ่งเป็น detector เพื่อตรวจวัดแสงในความยาวคลื่นตามชนิดของสีย้อมที่เราใช้ เพราะสีย้อมต่างชนิดกันจะเปล่งแสงให้ความยาวคลื่นที่ต่างกันออกไป โดยเครื่อง flow cytometer แต่ละรุ่นจะมี photomultiplier tube ต่างกันไปตามความสามารถในการใช้งาน รูปแบบการกระเจิงแสงเหล่านี้จะมีความสัมพันธ์ในการวัดคุณสมบัติต่างๆ ของเซลล์ที่ไหลผ่านลำแสงซึ่งขึ้นอยู่กับรูปทรง และขนาดของเซลล์

หลังจาก detector วัดคุณสมบัติของเซลล์ไปแล้ว เซลล์หรือโมเลกุลที่เรืองแสงจะรับประจุลบมากน้อยตามการเรืองแสงที่เกิดขึ้น แต่ละหยดที่ไหลผ่านจะถูกแยกด้วยสนามไฟฟ้าโดยตรงจาก deflection plates ในแนวตั้งซึ่งสามารถปรับได้ตามความเหมาะสมเพื่อคัดแยกเซลล์ที่เราสนใจออก เป็นหยดตามประจุบวกหรือประจุลบ โดยเซลล์หรือโมเลกุลที่เรืองแสงมากคือ มีแอนติบอดีติดสีที่ย้อมเรืองแสงจับอยู่มาก ส่วนเซลล์หรือโมเลกุลที่เรืองแสงน้อยคือ มีฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดีจับอยู่น้อย และเซลล์ที่ไม่มีฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดีจับอยู่เลย หยดที่มีประจุที่เราต้องการจะถูกเก็บในหลอดพิเศษแยกเก็บไว้ ส่วนหยดที่ไม่มีประจุจะถูกแยกทิ้งไป (ภาพที่ 1) (โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์, 2539)



ภาพที่ 1 องค์ประกอบภายในเครื่อง flow cytometer (โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์, 2539)

ความสามารถของ flow cytermetry

1. วิเคราะห์คุณสมบัติของอนุภาคหรือเซลล์โดยไม่ทำลาย ให้รายละเอียดเกี่ยวกับเซลล์หรืออนุภาคได้พร้อมๆกันในเวลาที่รวดเร็วโดยที่เซลล์ไม่เกิดความเสียหาย สามารถใช้ในการศึกษาฟังก์ชั่น และความสามารถต่าง ๆ ของเซลล์พร้อมทั้งบันทึก และประมวลผลเพื่อนำไปใช้ประเมินผลการทดลองในการวิจัยหรือเป็นข้อมูลสำหรับพิจารณาใน โครงการระดับที่สูงขึ้น

2. คัดแยกเซลล์ในสภาวะปลอดเชื้อ เช่น คัดแยกเซลล์ที่มีชีวิตออกจากเซลล์ที่ตายแล้ว คัดแยกเซลล์ที่ติดฉลากรังสีตามวิธีตรวจสอบทางภูมิคุ้มกัน cell sorting แยกเซลล์ตามคุณสมบัติ DNA content แยกเซลล์ที่มี คุณสมบัติทางกายภาพต่างกันเช่น รูปร่าง ขนาด สี หรือหลายๆพารามิเตอร์ร่วมกัน โดยสามารถคัดแยกเซลล์เหล่านี้ลงในอุปกรณ์เก็บเซลล์ต่าง ๆ ได้สะดวก อีกทั้งช่วยลดเวลาในการทำงาน และช่วยลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนของเซลล์ได้อย่างมาก

3. สามารถนับเซลล์ และบันทึกข้อมูลทางสถิติได้ โดยสามารถนับเซลล์ปริมาณมาก ๆ พร้อมกับคัดแยกได้ในความเร็วสูง (5,000-30,000 เซลล์ต่อวินาที หรือมากกว่านั้น)

การประยุกต์ใช้ flow cytometry

ปัจจุบัน ได้มีการนำ flow cytometry มาใช้ในการวิจัยหลายๆ ด้านเช่น การตรวจหาความผิดปกติในโครโมโซม การตรวจหาเซลล์มะเร็งเพื่อติดตามผลการรักษา การตรวจหา autoantibodies บนผิวเซลล์ในโรค Autoimmune ต่างๆ การทดสอบประสิทธิภาพของยาที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย การวิเคราะห์ membrane potential การวิเคราะห์ enzyme activity การคัดแยกเซลล์ในสภาวะปลอดเชื้อในกลุ่มประชากรย่อยของเซลล์จากเซลล์แขวนลอย ในหลอดทดลองหรือ microtiter plates หรือบนสไลด์โดยตรง จะเห็นได้ว่างานวิจัยที่กล่าวมามี ความสำคัญทางการแพทย์อย่างมาก หากแต่ยังเป็นงานวิจัยขั้นพื้นฐานเท่านั้น ทั้งนี้เพราะเครื่อง flow cytometer ยังมีราคาแพง ต้องอาศัยเทคโนโลยีขั้นสูง ซึ่งการพัฒนาเครื่องมือชนิดนี้จะยังคงมีอย่างต่อเนื่อง และในอนาคตน่าจะมีราคาถูกลงทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์อย่างจริงจังต่อไป (Kenneth,1993; ชญานิษฐ์ ศิริแสงเลิศ, 2555)

การใช้ flow cytometer สำหรับศึกษาระบบภูมิคุ้มกันนั้น ได้ทำมาเป็นเวลาประมาณ 20 ปี การตรวจ หาจำนวนแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว และนับแยกชนิดย่อยของเซลล์สามารถบอกถึงความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน บอกระยะการดำเนินของโรค การพยากรณ์โรคและติดตามผลการรักษาได้

ปัจจุบัน flow cytometry เป็นเทคโนโลยีที่นำมาใช้ในการติดตามการรักษาด้วยยาต้านไวรัส การศึกษาและวิจัยการติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์ การติดเชื้อ HIV ได้ก่อให้เกิดพยาธิสภาพในเซลล์เป้าหมายที่สำคัญคือ เซลล์ CD4+T-lymphocyte เป็นเซลล์ที่เชื้อจะเข้าไปเจริญเติบโต และแบ่งตัวทำลายเซลล์ ดังนั้นเซลล์ CD4 จึงมี ความสำคัญต่อการพยากรณ์โรค และเป็นดัชนีชี้วัดผลการรักษาของคนไข้ที่ติดเชื้อ HIV ที่รับการรักษาด้วย ยาต้าน ไวรัส (สุรพล เกาะเรียนอุดม, 2548)

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นายธีระพงษ์ บุญปรก
ประวัติการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พ.ศ. 2550
ประวัติการทำงาน	ผู้ช่วยโครงการวิจัยโครงการพัฒนาสายพันธุ์สบู่ดำเพื่อเพิ่มผลผลิตโดยการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พ.ศ. 2551– 2555 ศึกษาต่อ หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ผลงานทางวิชาการ	1. อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ และธีระพงษ์ บุญปรก. 2554. "การคัดเลือกพันธุ์สบู่ดำเพื่อเพิ่มผลผลิตโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้วยวิธี Ethyl Methane Sulfonte," ใน <u>แก่นเกษตร</u> 39: 156-162. 2. ธีระพงษ์ บุญปรก, อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์, อรวรรณ รักสงฆ์ และธีรพันธ์ บัญญัติรัชต. 2556. "ผลของสาร oryzalin สบู่ดำ", <u>แก่นเกษตร</u>. 41: 624-628.