บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสบู่ดำ

สบู่ดำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. ชื่อสามัญว่า Physic nut เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae พืชที่จัดอยู่ในวงศ์นี้ได้แก่ ยางพารา มันสำปะหลัง มะยม มะขามป้อม ผักหวานบ้าน หนุมานนั่งแท่น มะละกอฝรั่ง ปัตตาเวีย สบู่แดง และโป๊ยเซียน เป็นต้น สบู่ดำมีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ชาวโปรตุเกสเป็นผู้นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเมื่อสมัยกรุงศรีอยุธยาเป็นราชธานี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำมาหีบน้ำมันใช้ทำสบู่ สบู่ดำที่นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยในระยะแรกเชื่อว่าอาจเป็นพันธุ์เดียวกันหรืออยู่ในกลุ่มพันธุ์เดียวกันที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมไม่มากนัก และเมื่อเวลาผ่านไป อาจเกิดการกลายพันธุ์และ/หรือมีการผสมข้ามพันธุ์กันบ้างตามธรรมชาติ ทำให้สบู่ดำมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากขึ้น พันธุ์ของสบู่ดำที่พบในประเทศไทย มี 3 พันธุ์ คือ (1) พันธุ์ที่มีผลทรงกลม ขนาดปานกลาง เปลือกหนาปานกลาง ซึ่งปลูกกันทั่วไปที่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ (2) พันธุ์ที่มีผลทรงกลม ยาวกว่าพันธุ์แรกเล็กน้อย แต่มีเปลือกหนากว่า ปลูกมากที่ภาคเหนือ และ (3) พันธุ์ที่มีผลทรงกลมแต่มีขนาดเล็กกว่า 2 พันธุ์แรก ปลูกที่ภาคเหนือ และภาคใต้ โดยชื่อพันธุ์เรียกตามแหล่งปลูก (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

สบู่ดำเป็นไม้พุ่ม มีความสูง 2-7 เมตร จากการบันทึกของนักพฤกษศาสตร์รายงานว่ามีอายุยืนยาวถึง 20 ปี ผิวลำต้นเกลี้ยง เป็นไม้อวบน้ำ เนื้อไม้ไม่มีแกนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 4-6 เซนติเมตร ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) รูปหัวใจ (cordate) ขอบใบหยัก (lobed) ใบมีความกว้างและยาวประมาณ 6-15 เซนติเมตร ฐานใบเป็นรูปหัวใจ (cordate) ปลายใบเป็นแบบติ่งหนาม (mucronate) ยกเว้นปลายใบตำแหน่งหยักตรงกลางเป็นแบบปลายแหลม (acute) การจัดเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบร่างแหแบบฝ่ามือ (palmately netted venation) มีส่วนของก้านใบเชื่อมกับลำต้น ยาวประมาณ 2.5-7.5 เซนติเมตร สบู่ดำจะออกดอกเป็นช่อ (inflorescence) แบบช่อกระจุกซ้อนเชิงประกอบ (compound dichasium) เป็นดอกไม่สมบูรณ์เพศ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่แยกกัน (monoecious) แต่อยู่ภายในช่อดอกเดียวกัน ออกดอกบริเวณซอกใบส่วนปลายของยอด ช่อดอกยาวประมาณ 6-10 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงมีจำนวน 5 กลีบ มีสีเขียวอ่อนอมเหลือง

ส่วนกลีบดอกมีจำนวน 5 กลีบ มีสีเหลืองอมขาว มีต่อมน้ำหวานติดอยู่ที่โคนด้านในของกลีบดอก ดอกตัวผู้มีจำนวนเกสรตัวผู้ 10 อัน ดอกตัวเมียประกอบด้วยยอดเกสรตัวเมียเป็นรูปสามเหลี่ยม และรังไข่แบ่งออกเป็น 3 พู (carpel) อัตราส่วนของดอกตัวผู้ต่อดอกตัวเมียคือ 7 ต่อ 1 สบู่ดำเป็นพืชผสมข้าม ดอกตัวผู้ในช่อดอกเดียวกันจะบานก่อนที่ดอกตัวเมียจะพร้อมที่จะรับการผสม ปริมาณดอกย่อยใน 1 ช่อ จะมีประมาณ 70-120 ดอก แต่จะติดผลเพียง 6-15 ผล ผลอ่อนมีสีเขียวอ่อนผิวเรียบ เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน และจะเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อผลแห้ง ในหนึ่งผลจะมี 2-4 เมล็ด เมล็ดจะมีสีดำขนาดเล็กกว่าเมล็ดละหุ่งมีลายสีขาวดำเล็กน้อย ตรงปลายเมล็ดจะมีสีขาวเล็กๆ ติดอยู่ เมื่อเก็บไว้นานๆ สีขาวนี้ก็จะหดตัวเหี่ยวแห้งลง เมล็ดของสบู่ดำจะยาวประมาณ 1.7-1.9 เซนติเมตร และกว้าง 0.8-1.0 เซนติเมตร น้ำหนักสดเมล็ด 100 เมล็ด ประมาณ 69.8 กรัม เมื่อแกะเปลือกสีดำของเมล็ดออกจะเห็นเนื้อในเมล็ดสีขาว ดังแสดงในภาพ 1 (กรมวิชาการเกษตร, 2549 อ้างอิงใน อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ, 2551) มีน้ำมันประมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์ (Augustus, Java Beans and Seiler, 2002) ประกอบไปด้วย กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงถึง 78-84 เปอร์เซ็นต์ (oleic acid 41.5–48.8 เปอร์เซ็นต์ และ linoleic acid 34.6–44.4 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่กรดไขมันอิ่มตัวที่พบในน้ำมันสบู่ดำมี 16-22 เปอร์เซ็นต์ (palmitic acid 10.5–13.0เปอร์เซ็นต์ และ stearic acid 2.3–2.8 เปอร์เซ็นต์) (Salimon and Abdullah, 2008; Martinez-Herrera, et al., 2006)

ภาพ 1 แสดงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลก

หมายเหตุ: ก = ลำต้น ข = ใบ ค = ช่อดอก ฆ = ดอกตัวเมีย
ง = ดอกตัวผู้ จ = ผล ฉ = เมล็ด

การชักนำพอลิพลอยด์ในพืชบางชนิด

การชักนำพืชให้เกิดพอลิพลอยด์เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมมากขึ้น ในสภาพปกติจะพบสิ่งมีชีวิตที่เป็นดิพลอยด์ (diploid) จำนวนโครโมโซมเป็น 2n และมีองค์ประกอบของโครโมโซมเป็นจีโนมชุดเดียวกัน 2 ชุด ส่วนพอลิพลอยด์ (polyploid) เป็นสิ่งมีชีวิตที่เซลล์ร่างกายมีจีโนมมากกว่า 2 ชุด ขึ้นไป เช่น 3 จีโนม (triploid, 3x) 4 จีโนม (tetraploid, 4x) 5 จีโนม (pentaploid, 5x) เป็นต้น พอลิพลอยด์อาจเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติโดยมีสาเหตุจากการที่เซลล์มีการจำลองโครโมโซมแต่กลับไม่มีการแบ่งเซลล์ จึงทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของเซลล์ (อมรา คัมภิรานนท์, 2540) วิธีการที่สามารถชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในพืช ได้แก่

1. การใช้รังสี

รังสีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมคือ มีการขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นมาของโครโมโซมบางแห่งมีผลทำให้เกิด aneuploid ขึ้น ดังตัวอย่างรายงานการทดลองของ

ไซนีย๊ะ ละมะ (2549) ได้ทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) โดยการนำเมล็ดมาฉายรังสีแกมมา ปริมาณ 0 2 4 6 8 และ 10 กิโลแรด แล้วนำไปชักนำให้เกิดยอดและรากในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ต้นควบคุมและต้นที่ได้รับการฉายรังสีปริมาณ 2 กิโลแรด มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n=16 ส่วนปริมาณรังสี 4 กิโลแรด มีจำนวนโครโมโซมแปรผัน คือ 2n=16 และ 2n=18

บังอร สุทธิพงศ์เกียรติ์ (2544) ได้ชักนำการกลายพันธุ์ของถั่วเหลือง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์สุโขทัย 1 สุโขทัย 2 นครสวรรค์ 1 และสายพันธุ์ 81-1-145 โดยฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 20 กิโลแรด และโซเดียมอาไซด์ 0.001 โมลาร์ พบว่า ลักษณะของใบย่อยมีขนาดเล็ก หนา หยาบ เป็นคลื่นหรือย่น ขอบใบม้วน เส้นใบผิดปกติ และในชั่วที่ 3 ได้ใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ จำนวนใบย่อย การเปลี่ยนแปลงของสีดอก อายุการเก็บเกี่ยวสั้น และน้ำหนัก 100 เมล็ดสูง เป็นเกณฑ์คัดเลือก ทำให้ได้สายพันธุ์กลายจากพันธุ์สุโขทัย 1 จำนวน 20 สายพันธุ์ สุโขทัย 2 จำนวน 25 สายพันธุ์ นครสวรรค์ 1 จำนวน 26 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ 81-1-145 จำนวน 13 สายพันธุ์

2. การใช้สารเคมี

ในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในพืชนั้น สารเคมีแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการชักนำความผันแปรทางพันธุกรรมได้ต่างกัน คือ สารเคมีบางชนิดทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของชุดโครโมโซม เช่น สารอัลฟา-โบรโมแนฟธาลีน มีคุณสมบัติในการยับยั้งเส้นใยสปินเดิ้ล (Sharma and Sharma, 1980) และสารโคลชิซีนสามารถชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในพืชได้ ดังรายงานของ

Chulalaksananukul and Chimnoi (1999) ได้ชักนำพอลิพลอยด์ต้นบัวบกโดยใช้โคลชิซีน โดยทำการชักนำ 2 วิธี คือ ใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซีน 1-2 เปอร์เซ็นต์ วางลงบนต้นอ่อน (seedling) และผสมโคลชิซีน 1-2 เปอร์เซ็นต์ กับวุ้นแล้ววางลงบนปลายยอดของต้นอ่อน (seedling shoot tip) พบว่าทุกทรีตเมนต์สามารถชักนำให้ต้นบัวบกเกิดพอลิพลอยด์ได้ โดยการใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซีน 2 เปอร์เซ็นต์ วางบนต้นอ่อน สามารถชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ดีที่สุด (60 เปอร์เซ็นต์) ต้นพอลิพลอยด์ที่เกิดขึ้นแสดงลักษณะแตกต่างจากต้นดิพลอยด์ คือ จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม (guard cell) ความกว้างและความยาวของปากใบ ความกว้างและความยาวใบ จำนวนใบ และเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นของต้นพอลิพลอยด์สูงกว่าต้นดิพลอยด์

Smith, et al. (2004) ผลิตขิง (*Zingiber officinale*) ที่เป็นออโตเทตราพลอยด์โดยใช้เนื้อเยื่อปลายยอดแช่ในสารโคลชิซีน เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ หรือ dimethyl sulfoxide 2.0 เปอร์เซ็นต์ และได้ผลสำเร็จเป็นอย่างดี ลักษณะของขิงออโตเทตราพลอยด์จะมี ยอด ความยาวใบ ความกว้างใบ ขนาดของเหง้า (rhizome) ใหญ่กว่าดิพลอยด์ และบางต้นให้ผลผลิตรวมสูงกว่าแต่เหง้าจะมีขนาดเล็กกว่า มีการทดสอบพันธุ์หลายรอบการเพาะปลูกจนมีผลผลิตคงที่ ผลการทดลองครั้งนี้ให้ออโตเทตราพลอยด์หลายสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีแตกต่างกัน ออโตเทตราพลอยด์พันธุ์ Buderim Gold ได้คัดเลือกไปเป็นพันธุ์ทางการค้า ใช้ป้อนโรงงานอุตสาหกรรม ส่วนพันธุ์ Queensland มีกลิ่น รส และเส้นใย เหมาะสำหรับขายในรูปหัวสด

ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา รังษี เจริญสถาพร และ อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ (2549) ได้นำฝ้ายพันธุ์พื้นเมือง (ฝ้ายน้อย) *G. arboretum* มาชักนำพอลิพลอยด์ โดยแช่เมล็ดฝ้ายในน้ำ แล้วนำมาแช่ในสารโคลชิซีนเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ฝ้ายพอลิพลอยด์จะมีลักษณะของใบใหญ่ขึ้นและมีสีเขียวเพิ่มขึ้น ขนาดของปากใบมีขนาดใหญ่กว่าฝ้ายพื้นเมือง 1.84 เท่า และขนาดของละอองเกสรใหญ่กว่าพันธุ์พื้นเมือง 1.18 เท่า เมื่อทำการตัดแต่งกิ่งครั้งที่ 2 3 และ 4 (MV2, MV3 และ MV4) ให้ฝ้ายแตกแขนงใหม่ พบว่ามีการติดสมอดีขึ้นตามลำดับ และเมื่อตัดแต่งจนถึงครั้งที่ 6 (MV6) สามารถคัดเลือกฝ้ายที่มีลักษณะ พอลิพลอยด์ ได้จำนวน 20 ต้น

พรพิรุณ เปลี่ยนคง ผดุงศักดิ์ สุขสอาด และ สุรวิช วรรณไกรโรจน์ (2553) ได้เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมพริกขี้หนูสวนด้วยสารโคลชิซีนโดยแช่เมล็ดพริกในสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0 100 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในที่มืด ก่อนนำเมล็ดไปเพาะ พบว่าสารโคลชิซีนทุกความเข้มข้นสามารถชักนำพอลิพลอยด์ได้ และความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดต้นพริกพอลิพลอยด์ได้ร้อยละ 70 นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดเซลล์คุมปากใบของต้นพริกพอลิพลอยด์ใหญ่กว่าต้นควบคุม

การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำ

การปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสี และการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ วิธีการเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำได้ เช่น

Dwimahyani and Ishak (2004) ได้ทดลองฉายรังสีแกมมา (gamma) ปริมาณ 10 15 20 และ 25 เกรย์ แก่กิ่งของสบู่ดำ พบว่า การฉายรังสีที่ปริมาณ 10 เกรย์ ทำให้เกิดการผันแปรทางพันธุกรรม โดยทำให้น้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น 30 เปอร์เซ็นต์

Dhakshanamoorthy, Selvaraj and Chidambaram (2010) ได้ศึกษาการชักนำการกลายพันธุ์ที่เกิดในสบู่ดำ โดยใช้รังสีแกมมา ที่ความเข้ม 5 10 15 20 และ 25 กิโลแรด และ ethyl methanesulphonate (EMS) เข้มข้น 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ แก่เมล็ด พบว่าการฉายรังสีแกมมาที่ 5 กิโลแรด ทำให้มีจำนวนผลมากสุด คือ 17 ผลต่อช่อ ขณะที่ต้นควบคุมมี 11 ผลต่อช่อ นอกจากนี้การ ทรีตด้วยสาร EMS ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จะมีจำนวนผล 14 ผลต่อช่อ แต่เมื่อปริมาณการฉายรังสีแกมมา และ EMS เพิ่มมากขึ้น จะทำให้ปริมาณผลผลิตลดลง

Dhakshanamoorthy, Selvaraj and Chidambaram (2011) ชักนำการกลายพันธุ์ในสบู่ดำโดยการฉายรังสีแกมมาให้เมล็ด ที่ปริมาณ 5 10 15 20 และ 25 กิโลแรด พบว่า ปริมาณรังสีที่ 5 กิโลแรด มีอิทธิพลต่อลักษณะที่ดี เช่น จำนวนผลต่อกิ่ง น้ำหนักเมล็ด เพิ่มขึ้น ยกเว้นเปอร์เซ็นต์งอกของเมล็ด แต่ปริมาณรังสี 10 กิโลแรด จะมีเปอร์เซ็นต์การงอก (80.65 เปอร์เซ็นต์) สูงที่สุด ในขณะที่รังสีที่ 15 20 และ 25 กิโลแรด ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอก จำนวนดอกต่อช่อ และน้ำหนักเมล็ดลดลง และจากศึกษาความแตกต่างของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD พบแถบ DNA ทั้งหมด 90 แถบ แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน (polymorphic DNA) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.3 ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ Jaccard coefficients มีค่าความใกล้ชิดระหว่างพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.233 ถึง 0.632 และสร้าง dendrogram โดยใช้ Unweighted pair group method with arithenetic arerages (UPGMA) พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ต้นควบคุม ต้นที่ได้รับการฉายรังสี 10 15 และ 20 กิโลแรด กลุ่มที่ 2 คือ ต้นที่ได้รับการฉายรังสี 25 กิโลแรด และ กลุ่มที่ 3 คือ ต้นที่ได้รับการฉายรังสี 5 กิโลแรด

มยุรี แก้วภู่ (2553) ได้เพิ่มชุดโครโมโซมของสบู่ดำโดยการเพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดในอาหารที่มีสารโคลชิซีน เข้มข้น 0.01 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ หรือออไรซาลิน (oryzalin) 0.005 0.01 0.025 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาต่างๆ พบว่าสารโคลชิซีนทำให้ใบมีลักษณะหนา สีเข้ม และมีขนาดใหญ่ ส่วนออไรซาลิน ทำให้ขนาดเซลล์ปากใบใหญ่กว่าต้นควบคุม แต่พืชที่ทรีตด้วยสารโคลชิซีนและออไรซาลิน ไม่สามารถชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ได้

ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำพอลิพลอยด์โดยการใช้สารเคมี

1. ชิ้นส่วนพืช

การชักนำพืชให้เกิดพอลิพลอยด์นั้น จำเป็นต้องเลือกชิ้นส่วนพืชให้เหมาะสม ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมด้วยสารเคมี มักเป็นชิ้นส่วนที่มีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญ เช่น

Shao, Chen and Deng (2003) ได้ชักนำเทตราพลอยด์ในทับทิม โดยเพาะเลี้ยงยอด (shoots) ของทับทิมในอาหารแข็ง MS ที่มีสารโคลชิซีน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน หรือเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสารโคลชิซีน 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 96-114 ชั่วโมง พบว่า การเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของทับทิมในอาหารเหลวที่มีโคลชิซีน 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง สามารถชักนำเทตราพลอยในทับทิมได้

Rauf, et al. (2006) ชักนำเทตราพลอยด์ในฝ้าย โดยใช้สารโคลชิซีน เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ทรีตเมล็ด ปลายยอด และ ต้นอ่อน ของฝ้าย พบว่า การทรีตโคลชิซีนในปลายยอด และต้นอ่อน สามารถชักนำเทตราพลอยด์ในฝ้ายได้

Alishah and Bagherieh-Najjar (2008) ได้ชักนำพอลิพลอยด์ฝ้าย 2 สปีชีส์ (*Gossypium herbaceum* และ *G. arboreum*) โดยแช่เมล็ดในสารโคลชิซีน ที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 4 8 12 และ 36 ชั่วโมง พบว่า *G. herbaceum* ที่แช่ในสารโคลชิซีน เข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง และ *G. arboretum* ที่แช่ในสารโคลชิซีน เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง สามารถชักนำเทตราพลอยด์ได้

2. ความเข้มข้นของสาร และระยะเวลา

ความเข้มข้น และระยะเวลาในการทรีตสารเคมีก็แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด และชิ้นส่วนพืชที่ใช้ โดยทั่วไปสารเคมีความเข้มข้นสูง ใช้ระยะเวลาสั้น ความเข้มข้นต่ำใช้เวลานาน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการทนทานของชิ้นส่วนพืชที่นำมาศึกษา เช่น

Ghaffari (2006) ได้ทรีตปลายยอดของข้าวฟ่างด้วยสารโคลชิซีน เข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการหยดสารวันละ 3 เวลา จำนวน 2 และ 3 วัน แล้วศึกษาจำนวนโครโมโซมในดอก พบ แฮพลอยด์ (haploid) 73.91 เปอร์เซ็นต์ ดิพลอยด์(diploid) 10.43 เปอร์เซ็นต์ ทริพพลอยด์ (triploid) 7.82 เปอร์เซ็นต์ เทตราพลอยด์ (tetraploid) 4.34 เปอร์เซ็นต์ และ เพนตะพลอยด์ (pentaploid) 3.47 เปอร์เซ็นต์

Nimura, et al. (2006) หยดสารโคลชิซีน เข้มข้น 500 1000 และ 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร บนปลายยอดลูกผสม *Dianthus caryophyllus* L. และ *D. japonicus* Thunb. จำนวน 1 วัน และ 5 วัน พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ได้

Wei, et al. (2007) สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของ *Lespedeza formosa* โดยการแช่เมล็ดในสารโคลชิซีน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

การตรวจสอบระดับพลอยดีของพืช

ความสำเร็จในการชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมจะต้องมีการตรวจสอบซึ่งวิธีการตรวจสอบพืชพอลิพลอยด์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นข้อมูลแรกที่สามารถสังเกตได้ง่าย และเห็นได้ชัดเจน โดยลักษณะเหล่านี้ถูกถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านยีนบนโครโมโซม ภายหลังการชักนำการกลายพันธุ์ ลักษณะที่ปรากฏเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงข้อมูลที่เป็นองค์ประกอบทางจีโนไทป์และสิ่งแวดล้อม ที่ส่งผลให้แสดงลักษณะนั้นๆ ออกมา เช่น

Wu and Mooney (2002) ชักนำออโตเทตราพลอยด์ (Autotetraploid) ในส้ม ด้วยสารโคลชิซีน และ ออไรซาลิน พบว่าใบส้มเทตราพลอยด์ จะมีสีเขียวเข้ม กว้าง และหนากว่าส้มดิพลอยด์

Morgan, Hofmann and Grant (2003) ได้ชักนำเทตราพลอยด์ *Gentiana triflora* โดยใช้ออไรซาลิน 15.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พืชที่ได้ใบจะมีลักษณะหนากว่าต้นปกติ

Nimura, et al. (2006) ชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมของลูกผสม *Dianthus caryophyllus* L. และ *D. japonicus* Thunb โดยสารละลายโคลชิซีน พบว่าดอกมีขนาดใหญ่ และเวลาที่ออกดอกช้ากว่าต้นที่ไม่ได้ทรีตสาร

Liu, Li and Bao (2007) ได้ชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมของ *Platanus acerifolia* และผลกระทบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช พบว่าต้นที่เป็นเทตราพลอยด์ จะมีกิ่งและ ก้านใบสั้น แต่ใบหนาและเขียวกว่าต้นดิพลอยด์

Seneviratne and Wijesundara (2007) ชักนำการกลายพันธุ์ต้นแอฟริกันไวโอเลต โดยการใช้สารโคลชิซีนร่วมกับรังสีแกมมา เพื่อให้ได้ลักษณะการกลายพันธุ์ที่ถาวร ซึ่งจากการทดลองพบว่า การใช้สารโคลชิซีนที่ความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 22.5 ชั่วโมง ร่วมกับการฉายรังสี ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ก้านใบ และช่อดอกสั้น ใบและดอกมีขนาดเล็ก และจำนวนดอกต่อช่อดอกมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับต้นควบคุม แต่จำนวนช่อดอกต่อต้นมีมากกว่า

Wei, et al. (2007) ชักนำพอลิพลอยด์ ใน เมล็ด hypocotyl และ apices ของ *Lespedeza formosa* โดยใช้สารโคลชิซีน เข้มข้น 0.4 0.2 0.1 0.05 0.025 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 36 และ 48 ชั่วโมง ในเมล็ด hypocotyl และ ปลายยอด พบว่า ต้นพอลิพลอยด์ที่ได้มีลักษณะ ต้นเตี้ย อ้วน ใบกว้างและหนา

Zhang, et al. (2008) ได้ชักนำเทตราพลอยด์ของต้น *Phlox subulata* L. โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดบนอาหารที่มีโคลชิซีน 0.005 0.01 0.02 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 10 20 และ 30 วัน พบว่าทุกการทดลองสามารถชักนำเทตราพลอยด์ได้ และจากการทดลองจะเห็นได้ว่า ดอกของต้นเทตราพลอยด์จะมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์อย่างเห็นได้ชัด

2. การเปรียบเทียบขนาดและจำนวนปากใบ และปริมาณคลอโรพลาสต์

การเปรียบเทียบขนาดและจำนวนปากใบ และปริมาณคลอโรพลาสต์ มีรายงานในพืชหลายชนิดที่พบว่า พอลิพลอยด์มีขนาดของปากใบใหญ่กว่าดิพลอยด์ค่อนข้างชัดเจนแต่มีความหนาแน่นต่อหน่วยพื้นที่น้อยกว่า เช่น

สมปอง เตชะโช และราตรี สุจารีย์ (2542) ได้เพาะเลี้ยงตายอดมังคุดร่วมกับสารโคลชิซีน 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มระยะเวลาและความเข้มข้นของโคลชิซีน จะส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น และเมื่อเพาะเลี้ยงตายอดร่วมกับโคลชิซีน 750 และ1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน เซลล์ปากใบบางเซลล์มีขนาดใหญ่และมีสีเข้มกว่าปกติ

Chulalaksananukul and Chimnoi (1999) ได้ใช้สำลีชุบสารโคลชิซีน เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ วางลงบนต้นอ่อนบัวบก ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในต้นบัวบกได้ ต้นพอลิพลอยด์ที่ได้จะมีจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมสูงกว่าต้นปกติ

มยุรี แก้วภู่ (2547) ได้ชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 โดยใช้สารโคลชิซีนความเข้มข้น 0.25 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาต่างๆ พบว่า ทุกความเข้มข้นในทุกระยะเวลา สามารถชักนำพอลีพลอยด์ได้ และทำให้เซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่

มณทินี ธีรารักษ์ และ สมภพ ฐิตะวสันต์ (2551) ได้ทำการศึกษาผลของโคลชิซีนต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะการเติบโตและพัฒนาการทางด้านลำต้นของคะน้า โดยการแช่เมล็ดคะน้าในสารละลายโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำลงปลูก พบว่า สารโคลชิซีนมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด และอัตราส่วนคลอโรฟิลล์เอ ต่อคลอโรฟิลล์บี ในใบคะน้าเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น พื้นที่ใบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

3. ความสมบูรณ์เพศและขนาดของละอองเกสร

การศึกษาความสมบูรณ์เพศและขนาดของละอองเรณูของพืช เนื่องจากพืชส่วนใหญ่ที่เป็นพอลิพลอยด์มักมีละอองเรณูที่เป็นหมัน ที่เกิดจากการจับคู่ของโครโมโซมผิดปกติ และมีขนาดของละอองเรณูใหญ่กว่าปกติ เช่น ละอองเรณูของฝ้ายพอลิพลอยด์ มีความเป็นหมันมากกว่าต้น

ดิพลอยด์ (Mehetre, et al., 2003) และ ขนาดของละอองเรณูของฝ้ายที่เป็นออโตเทตราพลอยด์จะมีขนาดใหญ่กว่าดิพลอยด์ (Rauf, et al., 2006)

4. การนับจำนวนโครโมโซม

การนับจำนวนโครโมโซมนับว่าเป็นวิธีการโดยตรงที่แม่นยำและน่าเชื่อถือมาก ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม เช่น Zhang, et al. (2010) ตรวจสอบจำนวนโครโมโซมจากส่วนยอดของ Crape myrtle โดยวิธี Feulgen squash method

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมของสบู่ดำที่ผ่านมา พบว่า มีจำนวนโครโมโซมใน Complement เท่ากับ 22 (2n=22) และมี basic number (X) = 11 จึงมีระดับพลอยดีเป็นดิพลอยด์ (2n = 2X = 22) เมื่อศึกษา meiotic configuration ของโครโมโซมใน microsporocyte พบว่ามี 7 ringII + 4 rodII (Soontornchainakseang and Jenjitikul, 2003; Sasikala and Paramathma, 2010)

5. การใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรี (Flow Cytometry)

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) ที่เป็นองค์ประกอบภายในนิวเคลียสด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี (Flow Cytometry) จะให้ผลได้รวดเร็ว เทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอพืชได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีประชากรพืชที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณมาก เป็นวิธีที่สามารถศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ วิธีนี้มีหลักการคือย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์ด้วย สีเรืองแสง (fluorescence) แล้วใช้เครื่อง Flow cytometer วิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอที่ย้อมติด สี ขณะที่เซลล์เคลื่อนที่ผ่านลำแสง (ยูวี หรือ เลเซอร์) เป็นเซลล์เดี่ยว แล้ว Detector จะวัดค่าการหักเหของแสง โปรแกรมภายในเครื่องจะแปลงสัญญาณเหล่านั้นเป็นกราฟระหว่างความเข้มของแสงที่เปล่งออกมากับจำนวนของเซลล์ที่เรืองแสงในขณะนั้น และนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลปริมาณดีเอ็นเอของพืชที่มีชุดโครโมโซมปกติ ซึ่งวิธีการตรวจวัดนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งคุณลักษณะภายนอกและภายในเซลล์โดยรายละเอียดประกอบด้วย ระบบของเหลว ระบบของแสง และระบบอิเล็กทรอนิกส์ ปัจจุบันนี้มีการพัฒนาของเทคนิคโฟลไซโทเมทรีมากขึ้นจึงมีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย และงานทางห้องปฏิบัติการมากขึ้น ดังจะเห็นได้ในงานวิจัยต่างๆ ที่ได้มีการนำโฟลไซโทมิเตอร์เข้ามาช่วยวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอและระดับชุดโครโมโซม ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันมากในปัจจุบัน (Dolezel and Bartos, 2005) การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอสามารถใช้ตรวจสอบระดับพลอยดีในพืช ดังการทดลองของ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 18 มี.ค. 2555
เลขทะเบียน 250002
เลขเรียกหนังสือ

Yokoya, et al. (2000) ได้วัดปริมาณดีเอ็นเอ ในนิวเคลียสของกุหลาบ โดยทำการสกัด นิวคลีไอ (Nuclei) จากใบอ่อน แล้วย้อมด้วย propidium iodide (PI) แล้ววิเคราะห์ด้วยโฟลไซโทเมทรี

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอจากใบอ่อน และย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI ใน *Acacia dealbata* Link. จำนวน 7 ชนิด และ *A. mangium* Willd. จำนวน 2 ชนิด (Blakesley, et al., 2002) พบว่า การย้อมด้วยสี DAPI สามารถตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอได้