บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. พืชทดลอง

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) สายพันธุ์พิษณุโลก ได้จากศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดพิษณุโลก (พันธุ์พืชเพาะเลี้ยง) บ้านบางทราย ต.งิ้วงาม อ.เมือง จ.พิษณุโลก

2. สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
absolute ethyl alcohol (C_2H_5OH)	Merck
acetone (C_3H_6O)	Lab-Scan
alpha-Bromonaphthalene ($C_{10}H_7Br$)	Lab-Scan
ammonium nitrate ($NH_4 NO_3$)	Fluka
boric acid (H_3BO_3)	Riedel-de Haen
calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)	Riedel-de Haen
carmine ($C_{22}H_{20}O_{13}$)	Fluka
chloroform ($CHCl_3$)	Lab-Scan
cobalt (II) chloride hexahydrate ($CoCl_2.6H_2O$)	Fluka
colchicine ($C_{22}H_{25}NO_6$)	Sigma
copper (II) sulfate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$)	Merck
ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt ($Na_2EDTA.2H_2O$)	Ajax
ferric chloride ($FeCl_3$)	APS
ferrous sulphate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$)	Riedel-de Haen
glacial acetic acid ($C_2H_4O_2$)	Lab-Scan
glycine	BDH
hexane (C_6H_{14})	Merck
Indole-3-butyric acid (IBA)	ACROS

lysis buffer	
magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)	Carlo erba
manganese sulfate monohydrate ($MnSO_4.H_2O$)	Riedel-de Haen
methanol (CH_3OH)	Fisher chemicals
myo-inositol	Sigma
N^6-benzyladenine (BA)	ACROS
naphthaleneacetic acid (NAA)	ACROS
nicotinic acid	BDH
potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Riedel-de Haen
potassium iodide (KI)	Ajax
potassium nitrate (KNO_3)	Ajax
propidium iodide (PI)	
pyridoxine-HCl	Fluga
sodium hydroxide (NaOH)	Merck
sodium molybdate dihydrate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	Riedel-de Haen
sucrose	Fisher
thiamine-HCl	Fluka
thidiazuron (TDZ)	Fluka
zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$)	Fluka
ผงวุ้น	ตรานางเงือก
ไฮเตอร์ (6% sodium hypochlorite)	คาโอ อินดัสเตรียล

3. อุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์ (Compound Light Microscope) (Olympus)

กล้องถ่ายภาพ moticam 2500 motic images plus 2.0 ML

Flow Cytometry (Partec®)

Gas Chromatography รุ่น 6890 N (Agilent Technology)

เครื่องกลั่นระเหยแห้ง (Evaporator) (Resona)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV/VIS spectrophotometer) รุ่น Specord 40 (Analytikjena)

ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อพืช (lamina air flow) รุ่น ABS 1800

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 713 (Metrohm)

เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Sartorius)

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) (Hirayama)

เครื่องอบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (Hot air oven) (Heraeus)

ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) รุ่น Innova 4340 (New Brunswick scientific)

เครื่องเซ็นทริฟิวจ์ (Centrifuge) รุ่น Sorvall RC 5C (Dupont)

Soxhlet extractor

Vernier Calipers

กระดาษกรอง เบอร์ 1

กระบอกตวง

กล้องถ่ายรูป

ขวดแก้วรูปชมพู่ขนาดต่าง ๆ

ขวดขนาด 4 ออนซ์ และขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ พร้อมฝาปิด

ขวดแช่เครื่องมือ

จานเพาะเชื้อ (plate)

ช้อนตักสารเคมี

ตลับเมตร

ตะเกียงแอลกอฮอล์

ตู้อบไมโครเวฟ (microwave)

เตาไฟฟ้า (hot plate)

ถุงปลูกขนาด 4*6 นิ้ว

แท่งแก้ว

บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ

ปากคีบ

ปิเปต (pipette)

มีดผ่าตัด

ไม้บรรทัด

แผ่นสไลด์ และกระจกปิดสไลด์

วิธีดำเนินงานวิจัย

การทดลองที่ 1 การชักนำพอลิพลอยด์จากต้นอ่อนสบู่ดำ (seedling) โดยการทรีตสารเคมี แอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซีน

นำเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลก ที่ผ่านการคัดเลือกเฉพาะเมล็ดที่สมบูรณ์ลงเพาะในถุงดำ เป็นเวลา 9 วัน จะได้ต้นที่มีใบเลี้ยง (cotyledon) สองใบ และมีตายอด (shoot bud) ทำการคัดเลือกต้นที่มีความสมบูรณ์สม่ำเสมอกันมาใช้ทดลอง โดยใช้การทดลองละ 5 ต้น หลังจากนั้นใช้สำลีวางแนบกับเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดระหว่างใบเลี้ยง เพื่อช่วยไม่ให้สารละลายแห้งเร็วเกินไป แล้วชักนำพอลิพลอยด์โดยสารเคมี ได้แก่ แอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน ในรูปสารละลายอิ่มตัว (Saturated solution), คลอโรฟอร์ม เข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล เข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์ และโคลชิซีน ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยหยดลงบนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีสำลีแนบอยู่ จำนวน 2 หยด วันเว้นวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน จากนั้นเมื่อต้นกล้าอายุ 60 วัน นำลงปลูกในแปลงทดลองของคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นสบู่ดำที่ถูกชักนำพอลิพลอยด์โดยสารเคมีชนิดต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test (DMRT)

การทดลองที่ 2 การชักนำพอลิพลอยด์จากจากแคลลัสสบู่ดำ ด้วยโคลชิซีน

ในการทดลองนี้จะทำการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนคู่ที่ 2 ของสบู่ดำพันธุ์พิษณุโลกบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ นำแคลลัสที่ได้มาตัดให้มีขนาด 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำมาแช่ในสารละลายโคลชิซีน ที่ความเข้มข้น 0 0.025 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใช้แคลลัสจำนวน 8 ชิ้นต่อฟลาสก์ นำไปเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ที่ 25±2 °C เป็นระยะเวลา 3 5 และ 7 วัน หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสที่ถูกชักนำด้วยโคลชิซีน โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

การทดลองที่ 3 ระดับพลอยดีของสบู่ดำที่ผ่านการทรีตสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซีน

1. วิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่อง Flow Cytometry (Partec®)

เก็บตัวอย่างใบอ่อนสบู่ดำใบที่ 1-3 จากต้นที่ทรีตด้วยอัลฟา-โบรโมแนปธาลีน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซีน และแคลลัสบู่ดำที่ทรีตด้วยโคลชิซีน ลงในกล่องที่มีอุณหภูมิ 4 ^{0}C เพื่อนำไปเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ ขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่าง คือนำใบ และแคลลัสหนักประมาณ 20 มิลลิกรัม มาตัดด้วยมีดโกนให้ละเอียดในสารละลาย Lysis buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองนิวคลีไอผ่านนีลอนขนาด Mesh 30 ไมโครเมตร บรรจุส่วนที่กรองลงใน appendorf แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 100 x g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออกแล้วเติม Lysis buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วทำการย้อมนิวคลีไอด้วย propidium iodide (PI) 75 ไมโครโมล จากนั้นกรองนิวคลีไออีกครั้ง เก็บสารละลายที่ได้ในที่มืด วิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่อง Flow Cytometry (Partec ®)

2. ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากดอกของต้นที่ทรีตด้วยสารเคมี โดยเทคนิค Smear method

เก็บตัวอย่างดอกสบู่ดำตัวผู้ โดยเลือกเก็บดอกอ่อนที่ช่อดอกยังไม่มีดอกบาน ในช่วงเวลา 8.00-16.00 น. มาฟิกซ์ในน้ำยา Carnoy (glacial acetic acid : chloroform : absolute ethyl alcohol ในอัตราส่วน 1:3:6) ที่ใส่ ferric chloride เข้มข้น 2-3 หยด จนน้ำยามีสีเหลืองเพื่อช่วยให้โครโมโซมติดสีดีขึ้น เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างออกให้สะอาดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที เก็บตัวอย่างดอกในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาสภาพเซลล์ให้คงอยู่ได้ซึ่งเก็บไว้ได้ประมาณ 12 เดือน ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ศึกษาโครโมโซมจากดอกอ่อน โดยนำดอกอ่อนที่เก็บไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ มาแยกเอาอับเรณู 2-3 อัน วางลงบนแผ่นสไลด์หยดสี aceto carmine เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 หยด แล้วใช้เข็มเขี่ยแบ่งอับเรณูแต่ละอันเป็น 2 ส่วน กดอับเรณูให้ไมโครสปอร์โรไซต์หลุดออกมา แล้วคีบผนังอับเรณูทิ้ง นำสไลด์อุ่นไฟพอร้อนเป็นการช่วยให้โครโมโซมติดสีดีขึ้น และทำให้เซลล์พองตัว วางแผ่นกระจกปิดสไลด์ปิดระวังไม่ให้มีฟองอากาศ นำสไลด์ที่ได้ไปตรวจนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

การทดลองที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสบู่ดำที่ผ่านการทรีตสาร แอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซีน

1. วัดความสูงของลำต้น อายุ 5 เดือน 1 ปี และ 2 ปี โดยใช้ตลับเมตร

2. วัดความกว้างและความยาวใบคู่ที่ 4 จำนวน 5 ใบต่อต้น โดยวัดจากส่วนที่กว้างและส่วนที่ยาวที่สุดของใบโดยใช้ไม้บรรทัด

3. ขนาด และความหนาแน่นของปากใบ

ทำการศึกษาโดยตัดใบให้มีขนาด 1 ตารางเซนติเมตร มาแช่ในสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นใช้ใบมีดโกนขูดเนื้อเยื่อบนชิ้นตัวอย่างออกเบาๆ ให้เหลือแต่เนื้อเยื่อชั้นผิวด้านที่ต้องการ แล้วล้างโซเดียมไฮดรอกไซด์ออกให้หมดด้วยน้ำ นำมาวางลงบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ศึกษาขนาด และความหนาแน่นของปากใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า จำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร โดยนับ 3 ตำแหน่งต่อหนึ่งแผ่นใบ หาค่าเฉลี่ยของจำนวนปากใบ

4. วัดปริมาณคลอโรฟิลล์จากใบ

ทำการศึกษาโดยนำใบสบู่ดำคู่ที่ 3 ปริมาณ 1 กรัม มาบดให้ละเอียด แล้วเติมสารละลาย acetone 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นกรองกากใบออก แล้วนำสารละลายคลอโรฟิลล์ที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร (Arnon, 1949) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ จากสูตร

ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ = $(12.7D_{663}-2.69D_{645})X\{V / (1000 X W)\}$

ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี = $(22.9D_{645}-4.68D_{663})X\{V / (1000 X W)\}$

ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด = $(20.2D_{645}-8.02D_{663})X\{V / (1000 X W)\}$

โดย D_{663} = O.D. ที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร

D_{645} = O.D. ที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร

V = ปริมาตรอะซิโตนที่ใช้ (20 มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักใบที่ใช้ (1 กรัม)

มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด

5. ศึกษาจำนวนดอกต่อต้น โดยนับจำนวนดอกที่ออกทั้งหมดที่ใน 1 ปี

6. ความมีชีวิต (Pollen viability) และขนาดของละอองเรณู

ทำการศึกษาโดยเก็บดอกตัวผู้ของสบู่ดำที่อยู่ในแปลงทดลอง แล้วใช้เข็มเขี่ย เขี่ยอับเรณูของดอกสบู่ดำจำนวน 1 อับ ลงบนแผ่นสไลด์ แล้วหยดสี aceto carmine เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 1-2 หยด ลงบนแผ่นสไลด์ ใช้ปากคีบขยี้อับเรณูให้แตก แล้วคีบเอาผนังอับเรณูทิ้ง นำ

สไลด์ไปอุ่นไฟพอร้อนเป็นการช่วยให้ติดสีดีขึ้น ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ปิดระวังไม่ให้มีฟองอากาศ นำสไลด์ที่เตรียมได้มาศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ และขนาดของละอองเรณู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า และ 400 เท่า โดยละอองเรณูที่มีความสมบูรณ์จะติดสีแดงเข้ม รูปร่างไม่บิดเบี้ยว ส่วนละอองเรณูที่ไม่สมบูรณ์จะไม่ติดสี

7. วัดขนาดความกว้างและความยาวเมล็ดด้วยเวอร์เนีย
8. ชั่งน้ำหนักเมล็ด 100 เมล็ด
9. ศึกษาปริมาณผลผลิตต่อต้น โดยการชั่งน้ำหนักเมล็ด

การทดลองที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณ และองค์ประกอบของกรดไขมันของน้ำมัน

1. ศึกษาปริมาณน้ำมันของสบู่ดำ

ศึกษาโดยนำเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์ออโตเทตราพลอยด์ และสายพันธุ์ดิพลอยด์ ที่เก็บจากแปลงทดลองมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C นำมากะเทาะเอาเปลือกออกให้เหลือเฉพาะเนื้อในเมล็ดสบู่ดำปริมาณ 10 กรัม แล้วนำมาสกัดน้ำมันด้วย n-hexane 300 มิลลิลิตร โดยใช้ Soxhlet extractor เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้นำมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ 40 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาณน้ำมันที่สกัดได้โดยใช้ปิเปต (pipette)

2. วิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันสบู่ดำด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC)

ศึกษาโดยนำน้ำมันที่สกัดได้ มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วยเครื่อง GC (AOAC, 2005) โดยสภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1 เครื่อง GC : Agilent Technology รุ่น 6890 N

2.2 Column : SP^{TM} – 2560 Fused silica capillary column, 100 m x 0.25 mm i.d., 0.20 µm film thickness

2.3 Injection Temperature 250°C

2.4 Detector : Flame ionization detector (FID), Temperature 250°C

2.5 Oven Temperature program: Initial temperature 140°C; hold 5 min.
Increase 3 °C/min to 250 °C ; hold 17 min.

2.6 Carrier gas : He, flow rate 1.1 mL/min
H_2 flow 40 mL/min
Air flow 450 mL/min
Make-up flow 45 mL/min

Split ratio 100:1

2.7 injection volume : 1 µl