บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลก โดยการทรีตสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน ในรูปของสารละลายอิ่มตัว คลอโรฟอร์ม เข้มข้น 99.5 % เมทานอล เข้มข้น 99.9 % และโคลชิซีน ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 และ 5.0 % ลงบนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด พบว่า การทรีตสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน และโคลชิซีน เข้มข้น 0.5 1.0 และ 5.0 % สามารถชักนำให้เกิดมิกโซพลอยด์ได้ โดยสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน จะมีเปอร์เซ็นต์ของการเกิด 4n สูงที่สุด (52.66 %) และการชักนำแคลลัสให้เกิดพอลิพลอด์โดยแช่ในสารโคลชิซีน ที่ความเข้มข้น 0 0.025 0.05 0.1 และ 0.2 % พบว่า แคลลัสที่แช่ในสารโคลชิซีนเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2 % เป็นระยะเวลา 3 5 และ 7 วัน สามารชักนำพอลิพลอยด์ได้ โดยการแช่ในสารโคลชิซีน ที่ความเข้มข้น 0.2 % เป็นระยะเวลา 3 วัน จะมีเปอร์เซ็นต์ของการเกิด 4n สูงที่สุด (51.46 %)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นสบู่ดำที่ทรีตด้วยสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน มีผลทำให้ความสูงของต้น จำนวนปากใบ ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ, บี และทั้งหมด จำนวนดอก ความสมบูรณ์พันธุ์ น้ำหนักเมล็ด และปริมาณผลผลิตลดลง ส่วนความยาวของก้านใบยาว ขนาดปากใบ และขนาดละอองเรณูจะเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม สารคลอโรฟอร์ม มีผลทำให้ความยาวของใบ จำนวนปากใบ และจำนวนดอกลดลง ส่วนขนาดปากใบ ขนาดละอองเรณู และน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น สารเมทานอล มีผลทำให้จำนวนปากใบ ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์ทั้งหมด จำนวนดอก และปริมาณผลผลิตลดลง ส่วนความกว้างใบ ขนาดปากใบ และขนาดละอองเรณูเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม และสารโคลชิซีน มีผลทำให้จำนวนปากใบ จำนวนดอก และปริมาณผลผลิตลดลง ส่วนขนาดปากใบ และขนาดละอองเรณูใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

ปริมาณน้ำมันในเมล็ดสบู่ดำที่ทรีตด้วยสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน มีปริมาณน้ำมันสูงที่สุด (5.55±0.75 มิลลิลิตรต่อ 10 กรัมน้ำหนักแห้ง) ซึ่งสูงกว่าต้นควบคุม 44.16 % ส่วนองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันของต้นที่ทรีตด้วยสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน และคลอโรฟอร์ม มีปริมาณกรดโอเลอิก และกรดสเตียริก เพิ่มสูงขึ้น ส่วนกรดลีโนเลอิก และ

กรดปาล์มิติก มีปริมาณลดลง และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated) สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

อภิปรายผล

1. การชักนำพอลิพลอยด์จากต้นอ่อนสบู่ดำ (seedling) สายพันธุ์พิษณุโลก ด้วยสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซีน

สารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ (Mitotic inhibition) ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของสบู่ดำ จากการทดลองพบว่าสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน สามารถชักนำมิกโซพลอยด์ในสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลกได้ การเปลี่ยนแปลงจำนวนของโครโมโซมเกิดขึ้นเนื่องจากสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน ไปยับยั้งเส้นใยสปินเดิล (spindle inhibition) (Sharma and Sharma, 1980) ในการทดลองการชักนำพอลิพลอย์ โดยการทรีตสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน ยังไม่พบรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จในการชักนำพอลิพลอยด์โดยการทรีตสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน อาจเนื่องมาจากเลือกเทคนิคทรีตสารแก่ตายอด เนื่องจากกลุ่มเซลล์ระยะนี้มีความบอบบางมากกว่าเมล็ด จึงประสบผลสำเร็จในการชักนำการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดี สบู่ดำที่ได้รับการทรีตด้วยสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน ในช่วงแรกยอดของสบู่ดำจะเหี่ยว และหลุดหายไป หลังจากนำไปปลูกในแปลงทดลอง พบว่าต้นสบู่ดำสามารถแตกใบอ่อน และยอดใหม่ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการซ่อมแซมเซลล์ที่เสียหาย ส่วนความสูงของต้นจะเตี้ยกว่าต้นควบคุม ขนาดปากใบ และละอองเรณูใหญ่กว่าต้นควบคุม จำนวนดอกของต้น และปริมาณผลผลิตลดลง เช่นเดียวกับ สบู่ดำที่ทรีตด้วยสาร EMS พบว่าที่ความเข้มข้นสูงขึ้น จะมีผลทำให้ความสูงของต้น ปริมาณผลผลิต และจำนวนดอกลดลง (Dhakshanamoorthy, et al., 2010) และ *Miscanthus giganteus* และ *Miscanthus sinensis* ที่เป็นเทตราพลอยด์ มีขนาดของละอองเรณู ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ (Glowacka, et al., 2010)

สารคลอโรฟอร์ม และเมทานอล เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ผลการทรีตสารทั้งสองชนิดแก่สบู่ดำ พบว่า คลอโรฟอร์ม ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด และน้ำหนักแห้งของเมล็ดเพิ่มขึ้น และสารเมทานอล ทำให้ความกว้างของใบ และความกว้างของปากใบเพิ่มขึ้น ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาของพืช เช่น เมทานอลมีผลต่อการเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย (Theodoridou, et al., 2002) และพืชชั้นสูง เช่น ข้าวสาลี *Lemna gibba* (David, et al., 2003) โดยทำให้ชีวมวลเพิ่มขึ้น (Nonomura and Benson, 1992; Ei Jay, 1996) โดยเฉพาะการทรีตด้วยเมทานอล เข้มข้น 10-15 % นอกจากนี้ Zheng, et al. (2008) ได้ศึกษาผลของเมทานอลเข้มข้น 5 % พบว่า ส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงของข้าวสาลี

ในระยะใบธงเพิ่มขึ้นเป็น 2.4 เท่า จากต้นที่ทรีตด้วยน้ำกลั่น (Nonomura and Benson, 1992; Li and Yi, 2004)

สารโคลชิซีน เป็นสารแอลคาลอยด์มีสูตรเคมีคือ $C_{22}H_{25}O_6$ ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล จึงมีผลทำให้โครโมโซมของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวไม่สามารถแยกออกจากกันได้และหยุดไว้ที่ระยะเมทาเฟส ในการปรับปรุงพันธุ์พืชส่วนใหญ่นิยมใช้เทคนิคการชักนำการเพิ่มชุดของโครโมโซม (chromosome doubling) ในพืชเพื่อสร้างพืชพอลิพลอยด์ (Stebbins, 1971) ซึ่งการชักนำพอลิพลอยด์สบู่ดำโดยสารโคลชิซีน พบว่า โคลชิซีน เข้มข้น 0.5 1.0 และ 5.0 % สามารถชักนำให้ต้นสบู่ดำสายพันธุ์พิษณุโลกเกิดมิกโซพลอยด์ได้ โดยในช่วงแรกของการทรีตสารลักษณะใบที่พบนั้นมีรูปร่างผิดปกติ แต่ลักษณะความผิดปกตินี้จะค่อยๆ หายไปเมื่อต้นสบู่ดำอายุมากขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการซ่อมแซมเซลล์ที่เสียหาย จึงทำให้ใบที่เกิดขึ้นมาใหม่มีลักษณะที่เป็นปกติ นอกจากนี้ยังพบว่า ความหนาแน่นของปากใบมีจำนวนลดลง ขนาดของปากใบเพิ่มขึ้น และจำนวนดอกต่อต้นลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ สิทธิพงษ์ พรมมา (2553) ที่ชักนำพอลิพลอยด์ในปาล์มน้ำมันโดยใช้สารโคลชิซีน พบว่าลักษณะใบแรกที่พบมีรูปร่างของใบที่ผิดปกติเกิดขึ้น ขนาดของปากใบจะใหญ่กว่าต้นปกติ Yang, et al. (2006) พบว่า องุ่นที่เป็นเทตราพลอยด์จะมีขนาดความกว้าง และความยาวของปากใบ ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ แต่ความหนาแน่นของปากใบ ต่ำกว่าต้นดิพลอยด์ De Carvalho, et al. (2005) พบว่า คำแสด ที่เป็นเทตราพลอยด์จะมีขนาดความกว้าง และความยาวของปากใบใหญ่กว่า ดิพลอยด์ ส่วนความหนาแน่นของปากใบจะน้อยกว่าดิพลอยด์ Glowacka, et al. (2010) พบว่า *Miscanthus giganteus* และ *Miscanthus sinensis* ที่เป็นเทตราพลอยด์ มีขนาดความกว้าง และความยาวของปากใบ ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ Zhang, et al. (2010) พบว่า ยี่เข่ง (*Lagerstroemia indica* L.) ที่เป็นมิกโซพลอยด์ จะมีขนาดความกว้าง และความยาวของปากใบ ไม่แตกต่างจากต้นดิพลอยด์ แต่ต้นที่เป็นเทตราพลอยด์จะมีขนาดความกว้าง และความยาวของปากใบ ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ ส่วนความหนาแน่นของปากใบ จะพบว่า ต้นเทตราพลอยด์จะมีความหนาแน่นของปากใบน้อยที่สุด ลองลงมาคือ ต้นมิกโซพลอยด์ และ Dhakshanamoorthy, et al. (2010) พบว่า สบู่ดำที่ได้รับการทรีตสาร EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะมีจำนวนดอกลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น

2. การชักนำพอลิพลอยด์จากแคลลัสสบู่ดำโดยสารโคลชิซีน

ในการชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในหลอดทดลองโดยใช้สารเคมีนั้น ประสิทธิภาพในการชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และระยะเวลาในการให้สารเคมี รวมทั้งพืชด้วยเช่นกัน ซึ่งความแตกต่างในการตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้น

ของสารเคมีขึ้นอยู่กับ ชนิด หรือพันธุ์พืช อายุ และแหล่งของชิ้นส่วนพืช โดยทั่วไปสารเคมีที่ใช้ในการชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในพืชส่วนใหญ่จะใช้สารโคลชิซีน ซึ่งเป็นสารแอลคาลอยด์มีสูตรเคมีคือ $C_{22}H_{25}O_6$ ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล จึงมีผลทำให้โครโมโซมของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวไม่สามารถแยกออกจากกันได้และหยุดไว้ที่ระยะเมทาเฟส ในการปรับปรุงพันธุ์พืชส่วนใหญ่นิยมใช้เทคนิคการชักนำการเพิ่มชุดของโครโมโซม (chromosome doubling) ในพืชเพื่อสร้างพืชพอลิพลอยด์ (Stebbins, 1971) มีรายงานการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการใช้สารโคลชิซีนเป็นจำนวนมากไม่ว่าจะเป็นในไม้ดอกไม้ประดับ ไม้ผล พืชผัก ซึ่งพืชส่วนใหญ่ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จะมีระดับพลอยดีเพิ่มขึ้นจากเดิมเป็นสองเท่า จากการทดลองแช่แคลลัสสบู่ดำในสารละลายโคลชิซีน ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ พบว่า อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของแคลลัสน้อยมากที่ระยะเวลา 3 วัน แต่หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนที่ได้รับสารมีการปรับตัวให้ทนต่อโคลชิซีนความเข้มข้นสูงขึ้นได้ในระยะเวลาการทรีตที่ยาวนานขึ้น ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Pinheiro, et al. (2000) ได้ทำการทดลองในหญ้า *Brachiaria brizantha* แล้วพบว่าโคลชิซีนที่ความเข้มข้น 0.1 % มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการที่ได้รับโคลชิซีน 0.05 % นอกจากนี้แคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากการทรีตด้วยโคลชิซีน จะมีสีเหลือง สีเขียวอ่อน และสีน้ำตาล และมีการพัฒนาเป็นยอดช้ากว่าแคลลัสที่ไม่ผ่านการทรีต ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพืชมีจำนวนโครโมโซมเกินระดับปกติ ทำให้เซลล์เสียสมดุลและเกิดการตาย (สมปอง เตชะโต และ ราตรี สุจารีย์, 2542)

3. การวิเคราะห์ปริมาณ และองค์ประกอบของกรดไขมันของน้ำมัน

จากการสกัดน้ำมันจากเนื้อในเมล็ดสบู่ดำด้วย n-hexane โดยใช้ Soxhlet extractor เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า เมล็ดที่ได้จากต้นที่ทรีตด้วยสารแอลฟา-โบรโมแนฟธาลีน จะมีปริมาณน้ำมันในเนื้อในเมล็ดสูงขึ้น 5.55 มิลลิลิตร ต่อ 10 กรัมน้ำหนักแห้ง คิดเป็น 55.5 % ซึ่งสูงกว่าต้นควบคุม 44.16 % เช่นเดียวกับ แคลลัสคำฝอยที่กลายพันธุ์ด้วยสาร EMS เข้มข้น 0.8 % แคลลัสที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อที่มีความเสียหายระดับ 2 ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ มีปริมาณน้ำมันสูงกว่าแคลลัสควบคุม (ปวีณา นวมเจริญ, 2541) โดยทั่วไปเนื้อในเมล็ดสบู่ดำประกอบไปด้วยน้ำมัน 40-60 % (Augustus, et al., 2002) ซึ่งจะมีปริมาณสูงกว่าเมล็ดของต้นแฟลกซ์ ถั่วเหลือง ปาล์ม และน้ำมันปาเกีย (*Parkia biglobbossa*) ซึ่งพบ 33.33 % 18.35 % 44.6 % และ 26.525 % ตามลำดับ (Gunstone, 1994; Akintayo, 2004)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมัน ของสบู่ดำที่ทรีตด้วยสารแอลฟา-โบรโมแนฟธาลีน และคลอโรฟอร์ม พบว่า สารทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรด

ไขมัน แต่จะมีผลต่อปริมาณของกรดไขมันในน้ำมัน กล่าวคือ เมื่อทรีตด้วยสารแอลฟา-โบรโมแนฟธาลีน และคลอโรฟอร์ม จะมีผลทำให้ปริมาณกรดโอเลอิก (49.39 และ 51.14 % ตามลำดับ) และกรดสเตียริก (7.36 และ 7.95 % ตามลำดับ) เพิ่มสูงขึ้น ส่วนกรดลีโนเลอิก (28.48 และ 25.41 % ตามลำดับ) และกรดปาล์มิติก (13.42 และ 13.87 %ตามลำดับ) มีปริมาณลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม เช่นเดียวกับ การชักนำการกลายพันธุ์ในเอ็มบริโอของทานตะวัน ซึ่งพบว่าทำให้ปริมาณกรดโอเลอิก เพิ่มขึ้นจาก 29 % เป็น 84 % และในถั่วเหลืองที่กลายพันธุ์ก็มีปริมาณกรดสเตียริก เพิ่มขึ้นจาก 4 % เป็น 30 % แต่ปริมาณกรดปาล์มิติก จะลดลงจาก 11 % เป็น 4 % (Liu; et al., 2002) ในทางตรงกันข้าม ทานตะวันที่ได้รับการทรีตด้วยสาร ethylmethane sulfonate (EMS) โดยการนำเมล็ดมาแช่เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นั้น จะมีผลทำให้ทานตะวันสายพันธุ์ CAS-5 มีปริมาณกรดปาล์มิติกสูงขึ้น (Velasco, et al., 2008) ซึ่งโดยทั่วไปน้ำมันสบู่ดำประกอบไปด้วย กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงถึง 78-84 % (oleic acid 41.5–48.8 % และ linoleic acid 34.6–44.4 %) ในขณะที่กรดไขมันอิ่มตัวที่พบในน้ำมันสบู่ดำมี 16-22 % (palmitic acid 10.5–13.0 % และ stearic acid 2.3–2.8 %) (Salimon and Abdullah, 2008; Martinez-Herrera, et al., 2006)