

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



250002

การขึ้นนำพอลิพลอยด์สบูเค้า (*Jatropha curcas* Linn.) โดยสารเคมี

พรทิศา สิงห์ทอง

วิทยานิพนธ์เสนอเพื่อขึ้นนำพอลิพลอยด์สบูเค้า มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของงานศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2555

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

600254659

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



250002

การชักนำพอลิฟลอยด์สปูดำ (*Jatropha curcas* Linn.) โดยสารเคมี



พรรนิตา สิงห์ทอง

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2555
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ เรื่อง “การชักนำพอลิพลอยด์สนับดำ
(*Jatropha curcas* L.) โดยสารเคมี” ของ พรรณิดา สิงห์ทอง เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของ
มหาวิทยาลัยนเรศวร

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุพันธ์ กองบังเกิด)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร เปรมจิต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพงษ์ เปรมจิต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ ถนอมแก้ว)

อนุมัติ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คณินิจ ภูพัฒน์วิบูลย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

10 พฤษภาคม 2555

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร เปรมจิต ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพงษ์ เปรมจิต กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้อุดหนุนช่วยเหลือเวลาอันมีค่ามาเป็นทั้งที่ปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุพันธ์ กงบังเกิด ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ ถนนแก้ว กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

ขอขอบพระคุณ ทูสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2551 และ 2552 ขอขอบพระคุณศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดพิษณุโลก (พันธุ์พืชเพาะเลี้ยง) บ้านบางทราย ต.จี่วังาม อ.เมือง จ.พิษณุโลก ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดสับปะรด ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จุลภาค คั่นวงศ์ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้บริการเครื่อง Flow Cytometer ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เชื้อเพื่อสถานที่และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์คณะวิทยาศาสตร์ ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชา และให้คำแนะนำในระหว่างการดำเนินการวิจัยจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จ ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณกฤษณะ ทองบ่อ คุณบุญทริก ภูมิรา คุณนุชจรี ทัดเศษ คุณวิศกุล โพธิ์รักษา คุณจิรัฐติกาฬ ศรีปราบหล่ม คุณธีรวิทย์ บุตรดี ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในระหว่างดำเนินการวิจัยตลอดมา

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องผู้อุปการะคุณทุกท่านของผู้วิจัยที่ให้อำนาจใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

พรนิดา สิงห์ทอง

ชื่อเรื่อง	การชักนำพอลิพลอยด์สนับดำ (<i>Jatropha curcas</i> Linn.) โดยสารเคมี
ผู้วิจัย	พรรนิตา สิงห์ทอง
สถานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร เปรมจิต
กรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพงษ์ เปรมจิต
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2554
คำสำคัญ	สนับดำ พอลิพลอยด์ ไบโอดีเซล โคลชิซิน แอลฟา-โบรโมแนฟธาไลน์ ตัวทำละลายอินทรีย์

บทคัดย่อ

250002

สนับดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นพืชที่มีศักยภาพในการผลิตเป็นไบโอดีเซล เป็นพลังงานทางเลือกในประเทศไทย ปัญหาที่พบของพันธุ์สนับดำก็คือไม่มีความผันแปรทางพันธุกรรม เพื่อแก้ไขปัญหาที่ตรงนั้นจึงควรมีการชักนำให้สนับดำเกิดเป็นพอลิพลอยด์ ด้วยสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเส้นใยสปินเดิล ซึ่งก็คือ สารโคลชิซิน และแอลฟา-โบรโมแนฟธาไลน์ และตัวทำละลายอินทรีย์ คือ สารคลอโรฟอร์ม และเมทานอล ทำการชักนำความแปรปรวนในตายอด และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการแช่เซลล์ที่ชักนำจากใบ เพื่อเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะที่มีความสำคัญ

ต้นอ่อนของสนับดำ ที่มีอายุ 9 วัน จะถูกทรีตด้วยการหยดสารเคมีลงบนตายอด วันเว้นวัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วทำการคัดเลือกหาพอลิพลอยด์ ด้วยเครื่อง flow cytometry และศึกษาจำนวนโครโมโซม การทรีตด้วยสารแอลฟา-โบรโมแนฟธาไลน์ สามารถชักนำให้เกิดต้นมิกโซพลอยด์ ($2n$, $4n$) ได้ ส่วนโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 และ 5.0% มีผลต่อการพัฒนาของใบแรกที่เกิดขึ้น ความแตกต่างระหว่างต้นดิพลอยด์ และมิกโซพลอยด์ ที่ทำการเก็บข้อมูลคือ อัตราการเจริญเติบโต ระยะเวลาการออกดอก ความยาวของก้านใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ น้ำหนักเมล็ด ปริมาณน้ำมัน และองค์ประกอบของกรดไขมัน พบว่า ต้นมิกโซพลอยด์ จะมีอัตราการเจริญเติบโตช้า ระยะการออกดอกช้า ต้นเตี้ย ใบเล็ก ก้านใบยาว น้ำหนักเมล็ดต่ำ มีปริมาณน้ำมันสูง และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated) สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์ นอกจากนี้ต้นมิกโซพลอยด์จะมีขนาดปากใบ และละอองเรณู ที่ใหญ่

การชักนำการกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง ทำการศึกษาโดยแช่แคลลัสในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0 0.025 0.05 0.1 และ 0.2% เป็นระยะเวลา 3 5 และ 7 วัน แล้วทำการศึกษาอัตราการรอดชีวิต (%) และระดับพลอยดี (%) พบว่า โคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.2% เป็นระยะเวลา 3 วัน สามารถชักนำให้เกิดเตตราพลอยดีได้ (51.46%) ส่วนแคลลัสที่เป็นมิโครพลอยด์ที่รอดชีวิต จะถูกเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน benzyladenine (BA) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Indole-3-butyric acid (IBA) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 เดือน

Title	INDUCTION OF POLYPLOIDY IN <u>JATROPHA CURCAS</u> LINN. BY CHEMICAL AGENTS
Author	Pannida Singthong
Advisor	Assistant Professor Duangporn Premjet, Ph.D.
Co- Advisor	Associate Professor Siripong Premjet, Ph.D.
Academic Paper	Thesis M.S. in Biotechnology, Naresuan University, 2011
Keywords	<i>Jatropha curcas</i> L., Polyploidy, biodiesel, Colchicine, alpha-Bromonaphthalene, organic solvent

ABSTRACT

250002

Jatropha curcas L. is a potential species for producing biodiesel as an alternative fuel in Thailand. The problem with this species that it lacks of genetic variability in the population. To cope with this problem, induction of polyploidy of *J. curcas* was attempted. The mitotic inhibitor agents, colchicine and alpha-Bromonaphthalene, and organic solvents, chloroform and methanol, were used for treatment of *J. curcas* for induction of polyploidy. Treatment of shoot buds and *in vitro* induction by soaking leaf-derived calli to the solutions were conducted to raise genetic variability of some important characteristics.

The 9-days old shoot buds were treated with a drop of each solution every alternative day for a month. Screening of polyploidy was performed by flow cytometry and chromosome counting in buds. Mixoploid (2n, 4n) was obtained from the alpha-Bromonaphthalene used to treat shoot buds. Colchicine at concentration 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0% had an effect on malformation of the first leaf development. Significant differences were found between diploid and mixoploid in terms of growth rate, flowering period, stem length, leaf length, leaf stalk length, seed weight, oil content and fatty acids profile. The mixoploid line had significantly slower growth rate, longer flowering period, shorter stem, smaller leaves, longer leaf stalk, lower seed weight, higher oil content, and

higher monounsaturated fatty acid compared to diploid. The stomata and pollen grain sizes were larger in mixoploid.

The induced mutation *in vitro* was investigated by soaking calli in colchicine 0, 0.025, 0.05, 0.1 and 0.2% for 3, 5 and 7 days. Data were recorded for survival rate (%) and ploidy level (%). Colchicine at a concentration of 0.2% had effect on induction of tetraploid (51.46%) with a soaking period of 3 days. The surviving mixoploid calli were cultured on MS supplemented 0.5 mg/L BA and 0.1 mg/L IBA for 8 months.

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการศึกษา.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	2
สมมุติฐานของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสบูดำ.....	4
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	4
การชักนำพอลิพลอยดีในพืชบางชนิด.....	6
การปรับปรุงพันธุ์สบูดำ.....	8
ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำพอลิพลอยดีโดยใช้สารเคมี.....	9
การตรวจสอบระดับพลอยดีของพืช.....	11
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
อุปกรณ์และสารเคมี.....	15
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	18

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	ผลการวิจัย.....	23
	ผลการชักนำพอลิพลอยด์จากต้นอ่อนสับดำ (seedling) สายพันธุ์พิษณุโลก ด้วยสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซีน.....	23
	ผลการชักนำพอลิพลอยด์จากแคลลัสสับดำโดยสารโคลชิซีน.....	25
	ระดับพลอยดีของสับดำสายพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วย แอลฟา-โบรโมแนฟทาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซีน.....	27
	ลักษณะสัณฐานวิทยาของสับดำที่ผ่านการทรีตสารแอลฟา-โบรโมแนฟทาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซีน.....	33
	ผลของแอลฟา-โบรโมแนฟทาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซีน ต่อปริมาณ และองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันสับดำสายพันธุ์ พิษณุโลก.....	48
5	บทสรุป.....	51
	สรุปผลการวิจัย.....	51
	อภิปรายผลการวิจัย.....	52
	บรรณานุกรม.....	56
	ภาคผนวก.....	64
	ประวัติผู้วิจัย.....	70

สารบัญตาราง

ตาราง

หน้า

1	แสดงอัตราการรอดชีวิตของแคล์สสบูดำ อายุ 4 สัปดาห์ หลังจากการแช่ใน สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ.....	25
2	แสดงความแปรผันของชุดโครโมโซมของสบูดำสายพันธุ์พิษณุโลก ที่ทรีตด้วยสาร แอลฟา-โบรมิแนฟธาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซิน.....	27
3	แสดงความแปรผันของชุดโครโมโซมของแคล์สสบูดำที่ผ่านการทรีตโคลชิซินที่ระดับ ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 3 5 และ 7 วัน.....	30
4	แสดงความสูงของต้นสบูดำสายพันธุ์พิษณุโลก ที่ทรีตด้วยแอลฟา-โบรมิแนฟธาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซิน.....	33
5	แสดงขนาดใบ และความยาวของก้านใบ ของสบูดำสายพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วย สารแอลฟา-โบรมิแนฟธาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซิน.....	35
6	แสดงขนาด และความหนาแน่นของปากใบสบูดำสายพันธุ์พิษณุโลก ที่ทรีตด้วย สารแอลฟา-โบรมิแนฟธาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซิน.....	37
7	แสดงปริมาณคลอโรฟิลล์ ของสบูดำสายพันธุ์พิษณุโลก ที่ทรีตด้วย สารแอลฟา-โบรมิแนฟธาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซิน.....	40
8	แสดงจำนวนดอก ของสบูดำสายพันธุ์พิษณุโลก ที่ทรีตด้วย สารแอลฟา-โบรมิแนฟธาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซิน.....	41
9	แสดงควมมีชีวิต และขนาดของละอองเรณู ของสบูดำสายพันธุ์พิษณุโลก ที่ทรีต ด้วยสารแอลฟา-โบรมิแนฟธาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซิน.....	43
10	แสดงขนาดเมล็ด ของสบูดำสายพันธุ์พิษณุโลก ที่ทรีตด้วย สารแอลฟา-โบรมิแนฟธาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซิน.....	46
11	แสดงน้ำหนักแห้งเมล็ด และปริมาณผลผลิตต่อต้นต่อปี ของสบูดำสายพันธุ์ พิษณุโลก ที่ทรีตด้วยสารแอลฟา-โบรมิแนฟธาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และ โคลชิซิน.....	48
12	แสดงปริมาณน้ำมัน ของสบูดำสายพันธุ์พิษณุโลก ที่ทรีตด้วย สารแอลฟา-โบรมิแนฟธาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซิน.....	49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
13 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันสบู่ดำต้นควบคุมสายพันธุ์พิษณุโลก และที่สกัดด้วย แอลฟา-โบรโมเนฟทาไลน์ และคลอโรฟอร์ม.....	50
14 แสดงสูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS (Murashige and Skoog).....	65

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 แสดงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสนุ่นดำสายพันธุ์พิษณุโลก.....	6
2 แสดงลักษณะของต้นสนุ่นดำสายพันธุ์พิษณุโลกที่ทรีตด้วย แอลฟา-โบรโมเนฟธาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซิน ที่ความ เข้มข้นต่างๆ.....	24
3 แสดงแคลลัสของสนุ่นดำปกติและสนุ่นดำที่ผ่านการทรีตสารโคลชิซิน.....	26
4 แสดง Histogram ของ relative nuclear DNA content ของสนุ่นดำสายพันธุ์ พิษณุโลก (<i>J. curcas</i> L.) ดิพลอยด์ (2n) และ มิกโซพลอยด์ (2n, 4n).....	28
5 แสดง Histogram ของ relative nuclear DNA content ของสนุ่นดำ (<i>J. curcas</i> L.) ดิพลอยด์ (2n) และ มิกโซพลอยด์ (2n, 4n).....	31
6 แสดงไมโครสโคปไรโซต์ ระยะเมทาเฟส I ของสนุ่นดำ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า บาร์ = 10 μ m.....	32
7 แสดงขนาด และความหนาแน่นของเซลล์ปากใบของสนุ่นดำสายพันธุ์พิษณุโลก ที่กำลังขยาย 400 เท่า บาร์ = 20 μ m.....	38
8 แสดงลักษณะ และขนาดของละอองเรณู ของสนุ่นดำสายพันธุ์พิษณุโลก ที่ทรีต ด้วยแอลฟา-โบรโมเนฟธาไลน์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และโคลชิซิน ที่กำลังขยาย 100 เท่า บาร์ = 100 μ m.....	44
9 แสดง Histogram ของ Relative nuclear DNA content ของแคลลัสสนุ่นดำ (<i>Jatropha curcas</i> L.) ที่ทรีตด้วยสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	68