การขยายพันธุ์สบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซมโดยใช้สารคอลชิซีนและออรีซาลิน

Micropropagation of *Jatropha curcas* Linn. and Chromosome Duplication by Colchicine and Oryzalin Treatment

มยุรี แก้วภู่

Mayuree Kaewpoo

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Doctor of Philosophy in Plant Science

Prince of Songkla University

2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์สบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซมโดยใช้สารคอลชิซีนและออรีซาลิน

ผู้เขียน นางสาวมยุรี แก้วภู่

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…………………………………….

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

…………………………...ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)

……………………………………..กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

…………………………………....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ขวัญจิตร สันติประชา)

…………………………………....กรรมการ

(ดร.ศิริวรรณ บุรีคำ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……………………………….………..

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์สบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซมโดยใช้สารคอลชิซีนและออรีซาลิน

ผู้เขียน นางสาวมยุรี แก้วภู่

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

เพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS เติม BA อย่างเดียว เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าคือ ใบเลี้ยง ก้านใบ ลำต้น และตาข้าง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ชิ้นส่วนก้านใบ และใบเลี้ยง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และชิ้นส่วนลำต้นอ่อน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ สำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างให้ยอดรวมสูงสุด 5.3 ยอด บนอาหารเติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.25 มก./ล. ลำต้นเหนือใบเลี้ยงให้ยอดรวมสูงสุด 15 ยอด บนอาหารเติม KN 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 0.25 มก./ล. และชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงให้ยอดรวมสูงสุด 22.76 ยอด บนอาหารเติม KN 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.25 มก./ล. หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ยอดดังกล่าวสร้างรากได้บนอาหารเติม IBA 0.5 มก./ล. หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เมื่อนำชิ้นส่วนใบ ลำต้น และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยโฟลไซโทเมทรีไม่พบการเปลี่ยนแปลง ปริมาณดีเอ็นเอจากทั้งสามแหล่งที่ตรวจสอบเป็น 2C หรือดิพลอยด์

จากการทรีตชิ้นส่วนปลายยอดด้วยสารคอลชิซีนเข้มข้น 0.01 0.05 0.1 และ 0.2% หรือออรีซาลินเข้มข้น 0.005 0.01 0.025 0.05 0.1 และ 0.2% เป็นเวลาต่าง ๆ ส่งผลให้อัตรารอดชีวิตลดลง เมื่อวิเคราะห์ค่า LD_{50} (ความเข้มข้นและเวลาที่ให้อัตรารอดชีวิตลดลง 50%) ของสารคอลชิซีน พบว่า ความเข้มข้น 0.016% นาน 24 ชม. 0.065% นาน 48 ชม. หรือ 0.02% นาน 72 ชม. ให้อัตรารอดชีวิตลดลง 50% ส่วนสารออรีซาลิน เข้มข้น 0.031% นาน 24 ชม. 0.003% นาน 48 ชม. หรือ 0.01% 72 ชม. ให้อัตรารอดชีวิตลดลง 50% เมื่อตรวจสอบผลทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ได้รับสารดังกล่าว พบว่า ใบมีลักษณะหนา สีเข้ม มีขนาดใหญ่ สารออรีซาลินมีขนาดเซลล์ปากใบใหญ่ที่สุด 17.2 และ 26.2 ไมโครเมตร (ความกว้าง×ความยาว) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำต้นดังกล่าวไปตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอและตรวจนับจำนวนโครโมโซม ไม่พบการเปลี่ยนแปลง ดังนั้น จึงไม่สามารถชักนำให้เกิดพืชพอลิพลอยด์ได้

Thesis Title Micropropagation of *Jatropha curcas* Linn. and Chromosome Duplication by Colchicine and Oryzalin Treatment

Author Miss Mayuree Kaewpoo

Major Program Plant Science

Academic 2009

Abstract

In vitro zygotic embryo culturing of *Jatropha curcas* L. was carried out on MS medium supplemented with BA alone. Cotyledon, petiole, stem and axillary bud explants were excised from seedling grown in BA containing the medium and cultured on the same medium supplemented with various combinations of BA (N_6-benzyladenine) and IBA (Indole-3-yl-butyric acid). The results showed that petioles and cotyledons could be initiated callus. Young stem explants yielded callus subsequent to plantlet regeneration. Axillary bud explants resulted in the highest number of shoots at 5.3 shoots on medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.25 mg/l IBA. Epicotyls gave the highest average number of shoot at 15 shoots on the medium supplemented with 0.5 mg/l KN (Kinetin) and 0.25 mg/l TDZ (Thidiazuron) and hypocotyls gave the highest number of shoots at 22.76 shoots on the medium supplemented with 0.5 mg/l KN and 0.25 mg/l IBA after culture for 30 days. Each source of shoot could be rooted on the medium supplemented with 0.5 mg/l IBA after 30 days of culture. Regenerated plants from three sources were diploid (2C) as revealed by flow cytometric analysis.

Shoot tips were treated with colchicine at concentrations of 0.01, 0.05, 0.1 and 0.2% or oryzalin at concentrations of 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 and 0.2% for various time periods. Survival rate of shoots was decreased. Analysis of LD_{50} (the time and concentration caused the death of 50% of the shoots.) revealed that treating with colchicine at 0.016% 24 h, 0.065% 48h and 0.02% 72 h or oryzalin at 0.031% 24h, 0.003% 48h and 0.01% 72 h caused the death of 50% of the shoots. Morphological characteristics of treated plants were altered. Leaves were thick, dark in color and larger than those of control. Oryzalin had a larger size of stomata at 17.2 and 26.2 μM (width×length). However, flow cytometry analysis showed no change in DNA content and cytological analysis showed no change in chromosome number either. These findings confirmed that the treated plants were diploid.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำสั่งสอน ทั้งด้านการเรียน การวิจัย คุณธรรม จริยธรรม และการเขียนวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ขวัญจิตร สันติประชา และ ดร. ศิริวรรณ บุรีคำ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่าน ที่เคยให้การอบรมสั่งสอน และช่วยเหลือจนสำเร็จการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ สำนักงานเขตพื้นที่การศึกษากระบี่ ที่กรุณาให้การสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่และน้อง และบุคลากรโรงเรียนบ้านนางรอง อ.คลองท่อม จ.กระบี่ ทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ น้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยจนสำเร็จ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

มยุรี แก้วภู่

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(9)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	21
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	22
วัสดุ และอุปกรณ์	22
วิธีการ	24
3 ผล	31
4 วิจารณ์	77
5 สรุป	86
เอกสารอ้างอิง	88
ภาคผนวก	96
ประวัติผู้เขียน	100

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลวิเคราะห์ทางเคมีของน้ำมันสบู่ดำ	5
2	ข้อมูลเปรียบเทียบทางเคมีของน้ำมันสบู่ดำกับน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว	6
3	น้ำหนักแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 1 เดือน	34
4	น้ำหนักแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 15 วัน	37
5	การชักนำการเกิดยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงลำต้น ตาข้าง และปลายยอด บนอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 1.5 เดือน	40
6	ผลการชักนำการเกิดยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 2 เดือน	48
7	ผลการชักนำการเกิดยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 2 เดือน	51
8	ผลของสารละลายคอลชิซีนหรือออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการรอดชีวิตหลังจากย้ายเลี้ยงนาน 30 วัน	59
9	อัตราการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ IBA หลังจากได้รับสารคอลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 30 วัน	65
10	อัตราการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ IBA หลังจากได้รับสารออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 30 วัน	66
11	จำนวนใบจากชิ้นส่วนยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดที่ได้รับสารละลายคอลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 30 วัน	68

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	จำนวนใบจากชิ้นส่วนยอดรวม จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดที่ได้รับสารละลายออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 30 วัน	70
13	ขนาดความกว้างและความยาวของเซลล์ปากใบ จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารชุดควบคุม ชุดที่ได้รับสารคอลชิซีน หรือออรีซาลิน หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 30 วัน	73
14	จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายยอด และปลายรากที่ไม่ได้รับและได้สารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน	74

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำ	3
2	โครงสร้างทางเคมีของคอลชิซีน	6
3	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของ *Colchicum autumnale* L.	7
4	โครงสร้างทางเคมีของออรีซาลิน	7
5	คัพภะที่ตัดแยกและเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ไม่เติมหรือเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) และต้นกล้าที่งอก (ข) (บาร์ = 1.5 ซม.)	31
6	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อพัฒนาของคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS นาน 1 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)	33
7	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยง (ก) และ ก้านใบ (ข) (บาร์ = 1.5 ซม.)	35
8	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อลักษณะของแคลลัสที่พัฒนาในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 15 วัน (บาร์ = 1.5 ซม.)	38
9	ต้นอ่อนสบู่ดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะ และนำไปเพิ่มจำนวน (บาร์ = 1.5 ซม.)	39
10	จำนวนยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้น ตาข้าง และปลายยอด บนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 1.5 เดือน	1
11	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำการเกิดยอดรวม จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้น นาน 1.5 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)	43
12	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำการเกิดยอดรวม จากการเพาะเลี้ยงตาข้าง นาน 1.5 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)	44
13	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำการเกิดยอดรวม จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด นาน 1.5 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)	45
14	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำการเกิดยอดรวม จากแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยง นาน 1.5 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)	46

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ลักษณะการเกิดยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 2 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)	49
16	การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.25 มก./ล. นาน 10 วัน (บาร์ = 1.5 ซม.)	50
17	ลักษณะแคลลัสและตาข้างจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 2 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)	52
18	การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.25 มก./ล. นาน 10 วัน (บาร์ = 1.5 ซม.)	53
19	ผลของ BA ต่อการชักนำการเกิดยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารเหลว นาน 1 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)	53
20	การชักนำรากจากการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 0.5 มก./ล. นาน 1 เดือน (บาร์ = 1.0 ซม.)	54
21	การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 1 เดือน แคลลัสได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ (บาร์ = 1.5 ซม.)	55
22	การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 1 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)	56
23	ปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบ (ก) ลำต้น (ข) และ แคลลัส(ค) จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ	57
24	อัตราการรอดชีวิตจากการได้รับสารละลายคอลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มก./ล. นาน 30 วัน	60

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	อัตราการรอดชีวิตจากการได้รับสารละลายออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มก./ล. นาน 30 วัน	61
26	ลักษณะชิ้นส่วนยอดที่ได้รับสารละลายคอลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ (บาร์ = 1.0 ซม.)	62
27	ชิ้นส่วนยอดที่ได้รับสารละลายออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ (บาร์ = 1.5 ซม.)	63
28	ลักษณะใบ (ก) และยอด (ข) สบู่ดำที่ได้รับสารคอลชิซีนเมื่อย้ายเลี้ยง นาน 30 วัน (บาร์ = 1.5 ซม.)	67
29	ลักษณะใบ (ก) และยอด (ข) สบู่ดำที่ได้รับสารออรีซาลินเมื่อย้ายเลี้ยง นาน 30 วัน (บาร์ = 1.5 ซม.)	69
30	ลักษณะรากที่ได้รับสารคอลชิซีน (ก) หรือออรีซาลิน (ข) (บาร์ = 1.5 ซม.)	71
31	ลักษณะเซลล์ปากใบชุดควบคุม ชุดที่ได้รับสารคอลชิซีน และออรีซาลิน	72
32	จำนวนโครโมโซม ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x	75
33	ฮีสโตแกรมแสดงปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบในชุดการทดลองต่าง ๆ	76

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

BA	=	N_6-benzyladenine
TDZ	=	Thidiazuron
KN	=	Kinetin
2iP	=	2-isopentenyl adenine
2, 4-D	=	2, 4-dichlorophenoxyacetic acid
IBA	=	Indole-3-yl-butyric acid
NAA	=	$\propto$-Naphthalene acetic acid
IAA	=	1-indoleacetic acid
GA_3	=	Gibberellic acid
MS	=	Murashige and Skoog medium
DAPI	=	4′, 6-diamino-2-phenylindole
PI	=	Propidium iodide
CRD	=	Completely Randomized Design
DMRT	=	Duncan's multiple range test
*p*DB	=	*p*-Dichlorobenzene
RNase	=	Ribonuclease

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในสภาวะที่ประเทศไทยกำลังเผชิญกับปัญหาหลายอย่าง ปัญหาหนึ่งที่สำคัญมากที่สุดก็คือ "พลังงานขาดแคลน" แต่ละปีมีการนำเข้าพลังงานในรูปของน้ำมันปิโตรเลียมคิดเป็นมูลค่าหลายแสนล้านบาท น้ำมันที่นำเข้ามาจะถูกนำมาใช้ในการประกอบกิจการต่าง ๆ ทั้งในภาคอุตสาหกรรม เกษตรกรรม การคมนาคม และอื่น ๆ อีกมากมาย ปัจจุบันราคาของน้ำมันปิโตรเลียมที่นำเข้าได้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องอย่างไม่มีทีท่าว่าจะหยุด ราคาน้ำมันที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ นี้ได้ส่งผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจของชาติเป็นอย่างมาก ส่งผลให้ค่าครองชีพสูงขึ้น เหตุนี้เองทำให้คนไทยทั้งชาติต้องหันมาช่วยกันคิดแก้ไขปัญหาพลังงานขาดแคลนอย่างจริงจัง

ปัญหาราคาน้ำมัน ก๊าซธรรมชาติ ที่มีแนวโน้มสูงขึ้น จากสถานการณ์นี้ได้มีการนำเอาพลังงานอื่นมาทดแทนการใช้ก๊าซธรรมชาติ และน้ำมันเชื้อเพลิงเพื่อลดการพึ่งพาพลังงานนำเข้า ที่ผ่านมาประเทศไทยนำเข้าพลังงานจากต่างประเทศประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของพลังงานที่ใช้ทั้งหมด โดยเฉพาะน้ำมันเชื้อเพลิง มีสัดส่วนนำเข้าสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่พลังงานทดแทนในประเทศมีสัดส่วนนำมาใช้เพียง 0.5 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ในบรรดาพลังงานทดแทนทั้งหมด "ไบโอดีเซลจากสบู่ดำ" เป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจ เมื่อเทียบกับการปลูกปาล์มน้ำมัน พบว่า การปลูกสบู่ดำสามารถปลูกได้ทุกพื้นที่ทั่วประเทศ แต่ปาล์มน้ำมันปลูกได้เฉพาะพื้นที่ซึ่งมีปริมาณน้ำฝนเพียงพอ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตต่อไร่ของสบู่ดำกับปาล์มน้ำมันซึ่งได้รับการส่งเสริมมานานพบว่า ขณะนี้ "สบู่ดำ" ยังสู้ปาล์มน้ำมันไม่ได้ เพราะปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่ให้ผลผลิตต่อไร่ละมากกว่า 1 ตันขึ้นไป และพันธุ์สบู่ดำที่มีอยู่ในเวลานี้ยังไม่มีการพัฒนาเพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีคุณภาพ (ไทยรัฐ, 2551)

ดังนั้น ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการชักนำการกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง เพื่อส่งเสริมความแปรปรวนและการผลิตให้ได้ลักษณะที่ต้องการ ก็จะช่วยให้สามารถปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำได้สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น นับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำสบู่ดำมาเป็นพลังงานทดแทน

การตรวจเอกสาร

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสบู่ดำ

สบู่ดำ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* Linn. ชื่อสามัญว่า physic nut เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกับยางพารา สบู่แดง ปัตตาเวีย ฝิ่นต้นหรือมะละกอฝรั่ง หนุมานนั่งแท่น โป๊ยเซียน มันสำปะหลัง มะยม มะขามป้อม ผักหวานบ้าน ซึ่งมีความหลากหลายกันค่อนข้างมากในลักษณะต้น ใบ ช่อดอก ผลและเมล็ด สบู่ดำเป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกาใต้ ชาวโปรตุเกสนำเข้ามาในช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยา เพื่อรับซื้อเมล็ดไปคัดบีบเอาน้ำมันสำหรับทำสบู่ (เทคโนโลยีการเกษตร, 2550)

เมล็ดสบู่ดำมีสารพิษที่เรียกว่า เคอซิน (curcin) หากบริโภคแล้วทำให้เกิดอาการท้องเดินเหมือนสลอด กากสบู่ดำยังมีธาตุอาหารใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ได้ ในชนบทยังใช้สบู่ดำเป็นยาสมุนไพรกลางบ้าน โดยใช้ยางจากก้านใบป้ายรักษาโรคปากนกกระจอก ห้ามเลือดและแก้ปวดฟัน รวมทั้งผสมน้ำนมมารดากวาดป้ายลิ้นเด็กที่มีฝ้าขาวหรือคอเป็นตุ่ม และใช้ส่วนของลำต้นมาตัดเป็นท่อนๆ ต้มให้เด็กกินแก้โรคซางหรือตานขโมย (พงศ์เทพ, 2551)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

สบู่ดำเป็นไม้พุ่ม สูงประมาณ 2-7 เมตร ลำต้นตั้งตรง ผิวลำต้นเรียบ มีความสูง 2-5 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว การเรียงตัวของใบบนกิ่ง ของสบู่ดำเป็นแบบสลับ ใบเรียบมี 5 แฉก คล้ายใบละหุ่ง แต่มีหยักตื้นกว่า ใบที่เจริญเติบโตเต็มที่มีขนาดเท่าฝ่ามือ ลำต้น ใบ ผลและเมล็ดมีสาร hydrocyanide สังเกตได้เมื่อหักลำต้น ส่วนยอดหรือส่วนก้านใบจะมียางสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนมไหลออกมา มีกลิ่นเหม็นเขียว สบู่ดำออกดอกเป็นช่อแบบ cyme ที่ข้อส่วนปลายของยอด ขนาดดอกเล็กสีเหลืองมีกลิ่นหอมอ่อนๆ มีดอกตัวผู้จำนวนมากและดอกตัวเมียจำนวนน้อยอยู่บนต้นเดียวกัน ผลเติบโตเต็มที่มีความยาวประมาณ 1-1.5 นิ้ว ในขณะที่ยังอ่อนมีสีเขียว แล้วค่อยเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อสุก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ผลมี 3 พู แต่ละพูมีเมล็ดจำนวน 1 เมล็ด เมล็ดสีดำขนาดเล็กกว่าเมล็ดละหุ่งลายขาวดำเล็กน้อย สีตรงปลายเมล็ดมีจุดสีขาวเล็ก ๆ ติดอยู่ เมื่อเก็บไว้นานจุดนี้จะหดตัวเหี่ยวแห้งลง เมล็ดมีความยาวเฉลี่ย 1.7-1.9 เซนติเมตร หนา 0.8-0.9 เซนติเมตร น้ำหนัก 100 เมล็ดประมาณ 69.8 กรัม เมื่อแกะเปลือกนอกสีดำออกจะเห็นเนื้อในสีขาว ลักษณะพฤกษศาสตร์ที่กล่าวข้างต้นแสดงในภาพที่ 1

ก ข ค

ง จ ฉ

ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำ

(ก) ลำต้นเป็นพุ่ม ตั้งตรง

(ข) ใบเป็นใบเดี่ยว

(ค) ดอกเป็นช่อแบบ cyme

(ง) ผลสดสีเขียวอ่อน

(จ) ผลแห้งสีน้ำตาล

(ฉ) เมล็ดสีดำ

ที่มา: อนุวัฒน์ (2551)

การขยายพันธุ์สบู่ดำโดยทั่วไปใช้เมล็ด ควรเก็บฝักที่มีสีเหลืองแก่แกมน้ำตาล แกะเมล็ดนำมาเพาะในถุงเพาะหรือกระบะทราย ประมาณ 2 เดือน จึงนำไปปลูก ต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดให้ผลผลิต 8-10 เดือนหลังปลูก นอกจากนี้ การขยายพันธุ์โดยวิธีการปักชำ ควรใช้ท่อนพันธุ์ที่มีสีเขียวปนน้ำตาลเล็กน้อย ซึ่งเป็นกิ่งที่ไม่แก่หรืออ่อนเกินไป สามารถชักนำรากได้ง่าย สำหรับความยาวของกิ่งชำที่เหมาะสม คือ ประมาณ 45-50 เซนติเมตร โดยปักลงในถุงเพาะหรือกระบะทราย และใช้เวลาปักชำประมาณ 2 เดือน จึงสามารถนำไปปลูก และให้ผลผลิตหลังปลูกประมาณ

6-8 เดือน การเจริญเติบโตลำต้นจะสูง ไม่ค่อยแตกกิ่งก้านจึงควรตัดแต่งกิ่งบ่อยๆ เพื่อให้ต้นแตกกิ่งก้าน ระยะปลูก 2 × 2.5 เมตร ฤดูปลูกที่เหมาะสมเป็นช่วงเดือน เมษายน-พฤษภาคม พื้นที่ปลูกควรเป็นที่ดอน น้ำไม่ท่วมขัง อยู่กลางแจ้งแสงแดดจัด เช่น คันนา ริมรั้วบ้าน

การสกัดน้ำมันสบู่ดำ ทำโดยนำผลสบู่ดำแห้ง (ผลสีเหลืองถึงสีดำ) ที่แก่จากต้นมากะเทาะเปลือกออกให้เหลือเฉพาะเมล็ด ล้างน้ำทำความสะอาด ผึ่งลมให้เมล็ดแห้ง ทุบหรือบดให้แตก นำเมล็ดที่ทุบแล้วออกตากแดดเพื่อรับความร้อนประมาณ 30 นาที แล้วนำเมล็ดสบู่ดำเข้าเครื่องสกัด (ใช้แรงงานคน) กรองน้ำมันที่ได้เพื่อแยกเศษผงออก เมล็ดสบู่ดำ 4 กิโลกรัม สกัดน้ำมันได้ 1 ลิตร น้ำมันที่ได้จากการสกัดเมล็ดสบู่ดำสามารถใช้แทนน้ำมันดีเซลได้ โดยไม่ต้องใช้ส่วนผสมและไม่ทำให้เครื่องยนต์เสียหาย กากเมล็ดสบู่ดำที่เหลือจากการสกัดน้ำมันมีปริมาณไนโตรเจนสูงซึ่งเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการจึงสามารถนำไปเป็นปุ๋ยอินทรีย์ของพืชได้ โดยกากที่เหลือจากการหีบน้ำมัน มีธาตุอาหารหลักมากกว่าปุ๋ยหมักและมูลสัตว์หลายชนิด (ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดชัยนาท, 2550)

การทดสอบการใช้งาน จากการนำน้ำมันสบู่ดำที่ได้ไปทดลองเดินเครื่องยนต์คูโบต้าดีเซล 1 สูบ แบบลูกสูบนอกระบบ 4 จังหวะ ระบายความร้อนด้วยน้ำ ปริมาตรกระบอกสูบ 400 ซีซี 7 แรงม้า/2200 รอบ/นาที ผลจากการทดสอบกับเครื่องยนต์เมื่อเดินเครื่องยนต์ด้วยน้ำมันสบู่ดำครบ 1,000 ชั่วโมง ถอดชิ้นส่วนของเครื่องยนต์ออกมาตรวจสอบ เสื้อสูบ ลูกสูบ แหวนลิ้น หัวฉีด และ อื่น ๆ ไม่พบยางเหนียวจับ ทุกชิ้นยังคงสภาพดีเหมือนเดิม ต้นสบู่ดำหนึ่งต้นอายุ 8 เดือน ให้ผลผลิตเมล็ดสบู่ดำประมาณ 1 กิโลกรัม หรือคิดเป็นผลผลิตต่อไร่ก็คือ 800 กิโลกรัม (เมล็ด) ต่อไร่ (กรณีปลูกแบบเชิงพาณิชย์ 800 ต้นต่อไร่) การสกัดน้ำมันให้ได้ 1 ลิตร จะต้องใช้เมล็ดสบู่ดำ(ตากแห้ง) ประมาณ 4 กิโลกรัม สามารถนำมาใช้กับเครื่องยนต์หมุนช้า ได้แก่ เครื่องสูบน้ำ รถไถเดินตามเครื่องรถ อีแต๋น เครื่องยนต์การเกษตรต่าง ๆ แต่หากใช้กับเครื่องยนต์หมุนเร็ว จะทำให้เครื่องยนต์หนืด อาจทำให้เครื่องรวนได้ น้ำมันสบู่ดำมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล แต่จะมีความหนืดมากกว่า (36.9 เซนติพอยส์ เทียบกับน้ำมันดีเซลที่มีความหนืด 3.8 เซนติพอยส์) ในปี 2525 มีการทดลองนำน้ำมันสบู่ดำมาเดินเครื่องยนต์ดีเซล พบว่า เครื่องเดินปกติสม่ำเสมอ และสิ้นเปลืองน้ำมันน้อยกว่าดีเซลหมุนเร็วเล็กน้อย ส่วนการทดสอบไอเสียเปรียบเทียบระหว่างน้ำมันสบู่ดำกับน้ำมันดีเซลพบว่า ทั้งค่าควันดำและปริมาณคาร์บอนมอนนอกไซด์ไม่แตกต่างกัน และต่ำกว่าค่ามาตรฐานรวมทั้งไม่พบซัลเฟอร์ไดออกไซด์ จากปลายท่อไอเสียของเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันสบู่ดำ ในปี 2548 กรมส่งเสริมการเกษตรได้ทดลองใช้น้ำมันสบู่ดำทดแทนน้ำมันดีเซล โดยทดลองผสมกับน้ำมันเบนซินแล้วใช้ในเครื่องยนต์แบบต่างๆ เช่น รถจักรยานยนต์ เครื่องปั่นไฟ รถยนต์ดีเซล พบว่า ถ้าผสมในอัตราส่วนที่เหมาะสม เครื่องยนต์สามารถเดินเครื่องได้ตามปกติ (นิสากร, 2551)

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันสบู่ดำ เป็นไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเป็นสารประกอบทางเคมีที่ประกอบเป็นกรดไขมันและกลีเซอรีน (ตารางที่ 1 และ 2) เมื่อไตรกลีเซอไรด์รวมตัวกับสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นด่าง เช่น โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์โดยมีแอลกอฮอล์ปริมาณมากเกินพอ จะทำให้เกิดการรวมพันธะของกรดไขมันและแอลกอฮอล์เกิดเป็นไบโอดีเซล โดยได้กลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งเป็นสารเคมีที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง ปฏิกิริยานี้เรียกว่า tranesterification

น้ำมันสบู่ดำเมื่อนำมาผ่านกระบวนการ tranesterification จะได้ เมทธิล เอสเทอร์ (methyl ester) อีทิล เอสเทอร์ (ethyl ester) หรือบิลทิล เอสเทอร์ (butyl ester) ขึ้นอยู่กับชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงแทนน้ำมันดีเซล โดยไม่เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมสามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ

ตารางที่ 1 ผลวิเคราะห์ทางเคมีของน้ำมันสบู่ดำ

ข้อมูลทางเคมี	ผลการวิเคราะห์
ค่ากรด	38.2
ค่าสปอนนิพฟิเคชั่น	195.0
ค่าไอโอดีน	101.7
ค่าความหนืด(31G)	40.4cp
กรดไขมันอิสระ	
กรดพาลิมิก	14.2
กรดสเตียริค	6.9
กรดโอลิอิค	43.1
กรดลิโนเลอิค	34.3
อื่นๆ	1.4

ที่มา: จรูญ และโยซิมูนิ (2550)

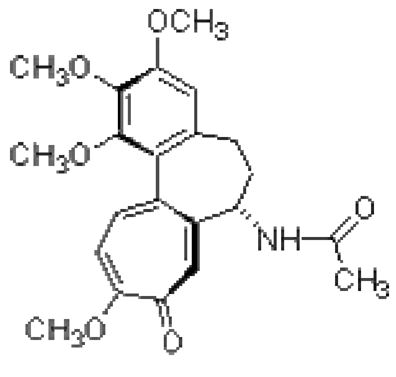
ตารางที่ 2 ข้อมูลเปรียบเทียบทางเคมีของน้ำมันสบู่ดำกับน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว

รายการวิเคราะห์	น้ำมันสบู่ดำ		น้ำมันดีเซลล์	วิธีที่ใช้วิเคราะห์
ความถ่วงจำเพาะ	d15/4	0.9185	d15/4 0.82-0.84	JIS-K-2249
จุดวาบไฟ	C	240	50cp	JIS-K-2265
คาร์บอนตกค้าง		0.64	0.15 less	JIS-K-2270
ค่าของซีเทน		51.0	50 up	JIS-K-2271
การระเหย	C	295	350 less	JIS-K-2254
ค่าความหนืด	CS	50.73	2.7 up	JIS-K-2283
ปริมาณซัลเฟอร์		0.31	1.2 less	JIS-K-2273
ค่าทองแดงตกค้าง	1A		-	JIS-K-2213
ค่าความร้อนที่ให้	Kcl/Kg	9.470	10.170	JIS-K-2271

ที่มา: จรูญ และโยซิมูนิ (2550)

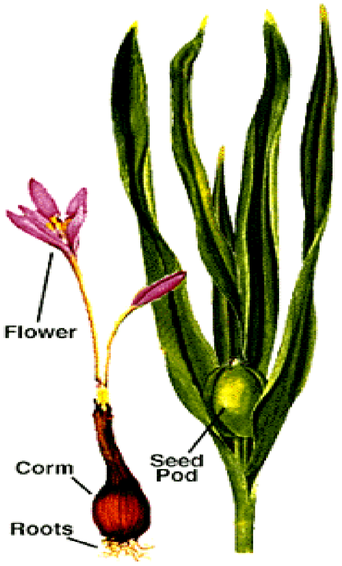
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสารคอลชิซีนและออรีซาลิน

คอลชิซีนเป็นสารประกอบอโรมาติก เรียกว่า อัลคาลอยด์ ที่พืชสกัดออกมา ประกอบด้วยไนโตรเจน อยู่ในวงของ hetero เป็นผลึกสีเหลือง น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 399.48 มีสูตรโครงสร้างคือ $C_{22}H_{25}NO_6$ (ภาพที่ 2) มีผลทางสรีรวิทยาต่อคนและสัตว์ และยังมีผลต่อพืชด้วยคอลชิซีนพบในพืช เช่น *Colchicum autumnale* L. (James, 1997) (ภาพที่ 3)



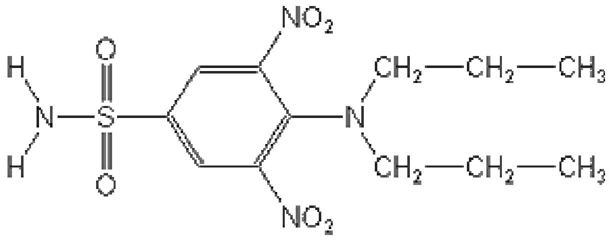
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของคอลชิซีน

ที่มา: Matthew (1998)



ภาพที่ 3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของ *Colchicum autumnale* L.
ที่มา: Matthew (1998)

ออรีซาลินลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 346.36 มีสูตรโครงสร้างคือ $C_{12}H_{18}N_4O_6S$ (ภาพที่ 4) มีผลทางสรีรวิทยาต่อคนและพืชเช่นเดียวกับสารคอลชิซีน



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของออรีซาลิน
ที่มา: http://www.alanwood.net/pesticides/oryzalin.html

สมบัติของคอลชิซีนและออรีซาลินที่มีผลต่อพืช

คอลชิซีนมีผลต่อไมโครทูบูล โดยขัดขวางการสร้างไมโครทูบูล ทำให้พืชไม่สร้างสปินเดิล ไฟเบอร์ ในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโทซีส เป็นผลให้โครโมโซมแยกออกจากกันไม่ได้ ทำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมจากดิพลอยด์เป็นพอลิพลอยด์ หากให้คอลชิซีนในระยะอะนาเฟสตอนปลายที่ยังไม่แบ่งเซลล์ จะทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ ได้เป็นเซลล์ที่มี 2 นิวเคลียส (Davidson

et al., 1966) สารออรีซาลินมีผลทางสรีรวิทยาของพืชเช่นเดียวกับสารคอลชิซีนคือ สามารถขัดขวางการสร้างไมโครทูบูล ทำให้พืชไม่สร้างสปินเดิลไฟเบอร์ ในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโทซีส เป็นผลให้โครโมโซมแยกออกจากกันไม่ได้ ทำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมจากดิพลอยด์เป็นพอลิพลอยด์ได้เช่นกัน ส่งผลให้พืชมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เช่น มีขนาดใบ ดอก ผล หรือลำต้นใหญ่ขึ้น ในปัจจุบัน มีการนำสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ในพืชหลายชนิด เพื่อให้ได้ลักษณะตรงตามความต้องการ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ

ปัจจุบันสบู่ดำเป็นพืชที่กำลังได้รับความสนใจและมีการศึกษากันมาก เนื่องจากปัญหาราคาน้ำมัน ก๊าซธรรมชาติมีแนวโน้มสูงขึ้น นอกจากการขยายพันธุ์สบู่ดำโดยใช้วิธีการเพาะเมล็ดและปักชำแล้ว ยังนำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ขยายพันธุ์สบู่ดำจนประสบผลสำเร็จ นอกจากนี้ ยังสามารถนำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม การใช้สารก่อกลายพันธุ์และการใช้สารเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซม ทำให้ได้ต้นสบู่ดำที่มีคุณลักษณะตามต้องการและสม่ำเสมอทางพันธุกรรมเพื่อประโยชน์ในด้านเศรษฐกิจ การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดขึ้นจาก 2 กระบวนการ คือ ออร์กาโนเจนีซิส เป็นกระบวนการสร้างอวัยวะต่าง ๆ เช่น รากหรือยอด และเอ็มบริโอเจนีซิส เป็นกระบวนการพัฒนาเป็นต้นอ่อน ส่วนใหญ่ทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มักได้มาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของเซลล์ร่างกาย ดังนั้นจึงเรียกว่า กระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนีซีส ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมักขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ หลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของน้ำตาล และสภาพแวดล้อมที่เพาะเลี้ยง ในพืชชนิดเดียวกัน เซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่ต่างกันให้ผลตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงได้จากชิ้นส่วนที่หลากหลาย เช่น ชิ้นส่วนใบ (นันท์นภัส และคณะ, 2550; ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์, 2551; Sujatha and Dhingra, 1993; Sujatha and Mukta, 1996; Sujatha *et al*., 2005; Jha *et al*., 2007 และ Deore and Johnson, 2008) เมล็ด (Sujatha and Dhingra, 1993; Sujatha *et al*. 2000 ; Qin *et al*., 2004 และ Soomro and Memon, 2007) ก้านใบ (นันท์นภัส และคณะ, 2550; ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์, 2551; Sujatha and Muktha, 1996) ก้านดอก (Sujatha and Dhingra, 1993 และ Sujatha and Mukta, 1996) และตาข้าง (นันท์นภัส และคณะ, 2549; ศิริวรรณ และ รุ่งทิพย์, 2551; Sujatha *et al*., 2005; Datta *et al*., 2007; Shrivastava and Banerjee, 2008) ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง และชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์,

2551; Sujatha and Dhingra, 1993; Sujatha *et al*., 2000; Qin *et al*., 2004; Soomro and Memon, 2007) ตาข้าง (นันท์นภัส และคณะ, 2549; ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์, 2551; Sujatha *et al*., 2005; Datta *et al*., 2007; Shrivastava and Banerjee, 2008) เป็นต้น

ชิ้นส่วนต่างกันมีการพัฒนาเป็นต้นที่ต่างกัน การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการออร์กาโนเจนีซิส เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนที่มีจุดกำเนิดของยอดหรือรากอยู่แล้ว เช่น ตาข้าง ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยง ดังรายงานของ นันท์นภัส และคณะ (2549) ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์ (2551) Qin และคณะ (2004) Sujatha และคณะ (2005) Datta และคณะ (2007) และ Shrivastava และ Banerjee (2008) ได้เพาะเลี้ยงตาข้าง ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงสบู่ดำ ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นยอด ส่วนกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสเป็กระบวนการสร้างต้นอ่อนผ่านการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ก้านใบ และก้านดอก มีพัฒนาการเป็นแคลลัสจากนั้นพัฒนาเป็นยอดจากแคลลัส (นันท์นภัส และคณะ, 2550; ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์, 2551 และ Jha *et al*., 2007)

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเพื่อพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ โดยสองกระบวนการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสบู่ดำที่ผ่านมา ส่วนใหญ่เป็นอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตหรืออัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนิน มีผลต่อกระบวนการเกิดพืชต้นใหม่ จากรายงานผลการศึกษาของ ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์ (2551) ใช้ Thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร Sujatha และคณะ (2005) ใช้ Kinetin (KN) เข้มข้น 23.3 ไมโครโมลาร์ Datta และคณะ (2007) ใช้ N_6-benzyladenine (BA) เข้มข้น 22.2 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดยอดรวมและแคลลัสได้ นอกจากนี้มีรายงานการใช้ไซโตไคนินร่วมกับออกซินเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดรวม เช่น นันท์นภัส และคณะ (2549) เพาะเลี้ยงตาข้างบนอาหารเติม BAเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Indole-3-yl-butyric acid (IBA) เข้มข้น 0.049 ไมโครโมลาร์ นันท์นภัส และคณะ (2550) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบบนอาหารเติม BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA เข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ Sujatha และ Dhingra (1993) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA เข้มข้น 4.9 ไมโครโมลาร์ Sujatha และ Mukta (1996) ใช้ BA เข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA เข้มข้น 4.9 ไมโครโมลาร์ Sujatha และคณะ (2000) ใช้ BA เข้มข้น 1 - 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Qin และคณะ (2004) ใช้ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดรวมได้

วิตามินบางชนิดและกรดอะมิโนเชิงซ้อนที่เติมลงไปในอาหารส่งเสริมการพัฒนาเป็นต้นใหม่ เช่น เคซีนไฮโดรไลเสท (casein hydrolysate; CH) เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสบู่ดำ (ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์, 2551) พบว่า เคซีนไฮโดรไลเสทมีผลต่อการชักนำยอดจากแคลลัสโดยกระบวนการออร์แกโนเจนีซีสจากชิ้นส่วนใบสบู่ดำ นอกจากนี้ ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์ (2551) ยังใช้โพรลีน (proline) เข้มข้น 300 - 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำให้เกิดยอดรวมได้อีกด้วย Datta และคณะ (2007) ใช้อะดีนีน ซัลเฟต (adenine sulphate; AS) เข้มข้น 55.6 ไมโครโมลาร์ ในการส่งเสริมการพัฒนายอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาร่วมกับ KN เข้มข้น 2.3 - 37.2 ไมโครโมลาร์ หรือ BA เข้มข้น 22.2 - 35.6 ไมโครโมลาร์ TDZ เข้มข้น 2.3 - 36.4 ไมโครโมลาร์ Isopentenyl adenine (2iP) เข้มข้น 2.5 - 39.4 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 - 6 สัปดาห์ พบว่า BA ความเข้มข้น 22.2 ไมโครโมลาร์ ให้ผลตอบสนองดีที่สุด Shrivastava และ Banerjee (2008) ใช้ BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อะดินีนซัลเฟต เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูตามีน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-อาจินีน เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดซิตริค เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้เช่นกัน

จากรายงานดังกล่าวข้างต้น เห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นเป็นวิธีการหนึ่งในการขยายพันธุ์สบู่ดำให้ได้ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว และในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้มีคุณภาพน้ำมันให้ดีขึ้นนั้น การใช้สารเคมี เช่น สารคอลชิซีน หรือออรีซาลิน ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกวิธีการหนึ่ง สามารถสร้างความแปรปรวนในพืชได้ เพื่อใช้ประโยชน์ในการสร้างพืชให้มีคุณภาพตรงตามความต้องการ

การชักนำการเกิดพอลิพลอยด์โดยใช้สารคอลชิซีนและออรีซาลิน

สำหรับการเพิ่มชุดโครโมโซมในพืช นักวิทยาศาสตร์นิยมใช้คอลชิซีนและออรีซาลิน โดยทำสำเร็จมาแล้วในพืชหลายชนิด ปัจจัยที่สำคัญควรคำนึงถึง เช่น ชิ้นส่วนพืช ความเข้มข้น ระยะเวลา และวิธีการในการทรีตสาร

ชิ้นส่วนพืช

ชิ้นส่วนของพืชที่นิยมใช้ในการชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมด้วยสารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน มักเป็นชิ้นส่วนที่มีองค์ประกอบของตายอด เพราะมีชั้นเนื้อเยื่อเจริญที่พร้อมจะรับสารทั้งสอง และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม ในกิ่งหรือต้นที่เจริญต่อมา เช่น

ชิ้นส่วนปลายยอด ตาข้างหรือข้อของพืชพันธุ์ลูกผสม (*Syringa vulgaris* × *S. pinnatifolia*) (Rose *et al*., 2000) *Solanum* spp. (Chauvin *et al*., 2003) ฝ้าย (Mehetre *et al*., 2003; Omran and Mohammad, 2008) แพร์ญี่ปุ่น (Kadota and Nimii, 2002) ทับทิม (Shao *et al*., 2003) *Miscanthus sinensis* พันธุ์ 93-245 (Petersen *et al*., 2003) ข้าวไรย์ (Stanys *et al*., 2006) *Scoparia montevidiensis* (Escandon *et al*., 2005) พุทรา (Gu *et al*., 2005) *Bacopa monnieri* (Escandon *et al*., 2006) *Chaenomeles japonica* (Stanys *et al*., 2006) *Phlox subulata* L. (Zhang *et al*., 2008) คาร์เนชั่นพันธุ์ลูกผสม (*Dianthus caryophyllus* L. และ *D. japonicus* Thumb) (Nimura *et al*., 2006) *Lespedeza formosa* (Wei *et al*., 2007) ตาดอกของข้าวฟ่าง (Ghaffari, 2006) *Gentiana trifler* var. *japonica* (Morgan and Hofmann, 2003) *Alocasia* (Thao *et al*., 2003) กุหลาบ (Kermani *et al*., 2003; Allum *et al*., 2007; Khosravi *et al*., 2008) *Miscanthus sinensis* พันธุ์ 93-245 (Petersen *et al*., 2003) ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง และข้อใบเลี้ยงของ *Bixa orellana* (Carvalho *et al*., 2005) และต้นอ่อน ryegrass (*Lolium perenne* L.) (Nair, 2004) นอกจากชิ้นส่วนที่มีองค์ประกอบเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดแล้วยังสามารถใช้ชิ้นส่วนอื่น ที่มีความสามารถพัฒนาให้พืชต้นใหม่สูง เช่น เกสรตัวผู้ของข้าว (Chen *et al*., 2001) อับเรณู และไมโครสปอร์ของข้าวสาลี (Sariano *et al*., 2007) ไมโครสปอร์ของ *Brassica napus* (Zhou *et al*., 2002) กาแฟ (Herrera *et al*., 2002) ละอองเกสรข้าวบาร์เลย์และข้าวไรย์ (Szakács and Barnabás, 2004) รังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของข้าวสาลี (Olfa and Hajer, 2007) โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้แคทลียา (Konzen *et al*., 2000) ไซโกติกเอ็มบริโอของ *Ilex paraguariensis* (Rey *et al*., 2002) ข้าวโพด (Obert and Barnabás, 2004) และ *Spathiphyllum wallisii* Regel (Eeckhaut *et al*., 2004) แคลลัสของส้ม ‘Frost’ navel (*Citrus sinensis* Osbeck) (Zeng *et al*., 2006) แคลลัสของส้มแทงเจอรีน (Wu and Mooney, 2002) เมล็ดของ *Lespedeza formosa* (Wei *et al*., 2007) *Platanus acerifolia* (Liu *et al*., 2007) ใบอัฟริกันไวโอเลตพันธุ์ลูกผสม (Seneviratne and Wijesundara, 2004) เอ็มบริโอของข้าวไรย์ (Szakács and Barnabás, 2004) และไซโกติกเอ็มบริโอของ *Spathiphyllum wallisii* Regel (Eeckhaut *et al*., 2004)

นอกจากนี้อาจใช้เซลล์เดี่ยว ๆ เช่น โพรโทพลาสต์ ซึ่งโดยทฤษฎีให้ต้นที่มีลักษณะเพิ่มชุดโครโมโซมได้สำเร็จโดยไม่ต้องคัดเลือกมาก เนื่องจากมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว เช่น โพรโทพลาสต์ของส้ม ‘Meiwa’ kumquat (*Fortunella crassifolis*) (Zeng *et al*., 2006)

ความเข้มข้น ระยะเวลา และวิธีการในการทรีตสาร

ความเข้มข้น และระยะเวลา ในการทรีตสารเคมีที่ใช้เพิ่มชุดโครโมโซม แตกต่างกันขึ้นกับชนิด และชิ้นส่วนของพืชที่ใช้ โดยทั่วไปสารเคมีความเข้มข้นสูง ใช้ระยะเวลาสั้น ความเข้มข้นต่ำก็ใช้เวลานาน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการทนทานของชิ้นส่วนพืชที่นำมาศึกษา Escandon และคณะ (2006) เพาะเลี้ยงตาข้าง *Bacopa monnieri* ร่วมกับสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.001-0.01 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพืชพอลิพลอยด์ได้ มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบ ดอก และลำต้นมีขนาดใหญ่ และมีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ Thao และคณะ (2003) เพาะเลี้ยงปลายยอด *Alocasia* ร่วมกับสารคอลชิซีน ความเข้มข้น 0.001-0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24-72 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ และเกิดยอดรวมได้ ที่ระดับความเข้มข้นสูง ระยะเวลานานขึ้น มีความเป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยง ส่งผลให้อัตรารอดชีวิตลดต่ำลง ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบมีลักษณะกว้างมากขึ้น อวบ หนา และสีเขียวเข้ม เซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ แต่อัตราความหนาแน่นลดลง Rose และคณะ (2000) ใช้สารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.002-0.01 เปอร์เซ็นต์ ทรีตตาข้างพืชลูกผสม (*Syringa vulgaris* × *S. pinnatifolia*) ระยะเวลา 24-72 ชั่วโมง พบว่า ไม่สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ได้ แต่สามารถชักนำให้เกิดพืชมิกโซพลอยด์ได้ในอัตราที่ต่ำ และมีอัตรารอดชีวิตลดน้อยลงเมื่อความเข้มข้นสูง และระยะเวลาการทรีตนานขึ้น การทรีตปลายยอดด้วยสารคอลชิซีนความเข้มข้นสูงขึ้น 0.01-0.03 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง ชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์ได้ การเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ช้ากว่าปกติ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบหนา สีเขียวเข้ม ตาข้างเล็กสั้น Petersen และคณะ (2003) ใช้สารคอลชิซีนเข้มข้น 0.004-0.02 เปอร์เซ็นต์ ทรีตชิ้นส่วนตาข้างของ *Miscanthus sinensis* ระยะเวลา 18 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ ต้นที่ได้มีใบ และดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น

พืชบางชนิดทนทานต่อสารคอลชิซีนได้ในระดับปานกลาง เช่น Stanys และคณะ (2006) เพาะเลี้ยงปลายยอด *Chaenomeles japonica* ร่วมกับสารคอลชิซีน ความเข้มข้น 0.01-1.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่า ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นสามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ได้ แต่อัตรารอดชีวิตลดต่ำลง และสามารถพัฒนาเป็นยอดรวมได้ พืชที่ได้มีลักษณะใบและเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ Gu และคณะ (2005) เพาะเลี้ยงปลายยอดพุทราร่วมกับสารคอลชิซีน ความเข้มข้น 0.01-0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24-96 ชั่วโมง พบว่า มีอัตรารอดชีวิตลดลงที่ระดับความเข้มข้นสูง และระยะเวลาการทรีตนานขึ้น สามารถชักนำให้เกิดพืชมิกโซพลอยด์และเตตระพลอยด์ได้ พืชดังกล่าวมีเซลล์ปากใบขนาดใหญ่ขึ้น จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์มากขึ้นด้วย ใบมีขนาดใหญ่ สีเขียวเข้ม และหนา ดอกมีขนาดใหญ่ และระยะเวลาการบานช้ากว่าปกติ

Kadota และ Nimii (2002) เพาะเลี้ยงปลายยอดแพร์ญี่ปุ่นร่วมกับสารคอลชิซีน ความเข้มข้น 0.01-0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24-96 ชั่วโมง พบว่า อัตรารอดชีวิตต่ำลง ที่ระยะเวลาทรีตนานขึ้น สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ได้น้อย ลักษณะเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น มีการเจริญเติบโตช้า Wei และคณะ (2007) รายงานผลการหยดสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ บนปลายยอด *Lespedeza formosa* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลอง ระยะเวลา 36 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เช่น ลำต้นอวบเตี้ย ใบหนาสีเขียวเข้ม Ghaffari (2006) ทรีตปลายยอด *Sorghum bicolor* ในอาหารร่วมกับสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพืชทริพลอยด์ และเตตระพลอยด์ได้ จำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น Liu และคณะ (2007) หยดสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ บนปลายยอดของต้นอ่อน *Platanus acerifolia* ระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นอัตรารอดชีวิตลดต่ำลง แต่สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ได้เช่นกัน มีลักษณะใบหนา อวบใหญ่ ก้านใบอวบ เซลล์ปากใบใหญ่ขึ้น แต่ความหนาแน่นลดลง

ในพืชบางชนิดทนต่อสารคอลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นสูง ในช่วงระยะเวลาสั้น เช่น Omran และ Mohammad (2008) จุ่มแช่ชิ้นส่วนปลายยอดฝ้ายในสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ และมีการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ Nimura และคณะ (2006) หยดสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ บนปลายยอดคาร์เนชั่นพันธุ์ลูกผสม ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพืชพอลิพลอยด์ได้ ลักษณะดอกใหญ่ และบานช้ากว่าปกติ Shao และคณะ (2003) ทรีตสารคอลชิซีนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ บนปลายยอดทับทิม ระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า ทุกความเข้มข้น และระยะเวลาดังกล่าว สามารถส่งผลให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบหนาสีเขียวเข้ม ดอกใหญ่ รากสั้น และลำต้นมีขนาดใหญ่ขึ้น

นอกจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด หรือตาข้างดังกล่าวร่วมกับสารคอลชิซีนชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมแล้ว ยังสามารถใช้ชิ้นส่วนอื่นได้ด้วย จากรายงานผลการศึกษาของ Zeng และคณะ (2006) เพาะเลี้ยงแคลลัสและโพรโทพลาสต์ของส้มบนอาหารร่วมกับสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.01-0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 8-24 ชั่วโมง พบว่า ที่ความเข้มข้นสูง และระยะเวลานานขึ้น ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อโพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง สำหรับชิ้นส่วนแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ Obert และ Banabás (2004) เพาะเลี้ยงเกสรตัวผู้ของข้าวโพดบนอาหารร่วมกับสารคอลชิซีนเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ Seneviratne และ

Wijesundara (2004) จุ่มแช่ชิ้นส่วนใบอัฟริกันไวโอเลตจำนวน 9 สายพันธุ์ ในสารคอลชิซีน ความเข้มข้น 0.025-0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 18-117 ชั่วโมง พบว่า ทุกความเข้มข้น และระยะเวลาในการได้รับสารมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ และยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วย เช่น ดอกมีสีเข้ม หนา ใบใหญ่ และหนากว่าปกติ Nair (2004) ทรีตต้นอ่อน ryegrass ด้วยสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น Gao และคณะ (2002) รายงานผลการใช้สารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสของ *Scutellaria baicalensis* ระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์ได้ ลักษณะใบหนา ผิวใบขรุขระ ใบและเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น Rey และคณะ (2002) เพาะเลี้ยงไซโกติกเอ็มบริโอของ *Ilex paraguariensis* บนอาหารร่วมกับสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การใช้ความเข้มข้นสูง เป็นเวลานานขึ้นทำให้อัตราการตายเพิ่มขึ้น

สำหรับการทรีตสารคอลชิซีนกับชิ้นส่วนอื่น ๆ เช่น 0.001-0.05 เปอร์เซ็นต์ 12-48 ชั่วโมง ทรีตชิ้นส่วนแคลลัสของข้าว (Chen *et al.*, 2001) ไมโครสปอร์ของเมล็ดเร็ป (Zhou *et al.*, 2002) ไมโครสปอร์ของกาแฟ (Herrera *et al.*, 2002) อับเรณูและไมโครสปอร์ของข้าวสาลี (Sariano *et al.*, 2007) พบว่า ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น ส่งผลให้อัตรารอดชีวิตลดต่ำลง การพัฒนาเป็นต้นใช้เวลานานกว่าปกติ ดอก ใบและเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น Carvalho และคณะ (2005) ใช้สารคอลชิซีนเข้มข้น 0.001 และ 0.005 เปอร์เซ็นต์ ทรีตชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง *Bixa orellana* ระยะเวลา 30 วัน พบว่า ชิ้นส่วนพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตาย Lui และคณะ (2007) ใช้สารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่เมล็ด *Platanus acerifolia* ระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ได้ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่ง พบว่า ต้นอ่อนที่ได้ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ Omran และ Mohammad (2008) จุ่มแช่เมล็ดฝ้ายในสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 16 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ได้ แต่มีอัตรารอดชีวิตลดต่ำลง Urwin และ Horsnell (2007) จุ่มแช่เมล็ด *Lavandula angustifolia* ในอาหารเหลวร่วมกับสารคอลชิซีนความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 7 วัน พบว่า ชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ มีขนาดดอก ก้านดอกใหญ่กว่าปกติ ใบหนา สีเขียวเข้ม

สำหรับรายงานการใช้สารออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ นั้น Rey และคณะ (2002) เพาะเลี้ยงไซโกติกเอ็มบริโอของ *Ilex paraguariensis* ร่วมกับสารออรีซาลินความเข้มข้น 0.0035 0.035 และ 0.07 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า อัตรารอด

ชีวิตลดต่ำลงที่ระดับความเข้มข้นของสารสูง และระยะเวลานานขึ้น และไม่สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ได้ Eeckhaut และคณะ (2004) เพาะเลี้ยงเกสรตัวผู้ของ *Spathiphyllum wallisii* บนอาหารร่วมกับสารออรีซาลินความเข้มข้น 0.035 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพืชพอลิพลอยด์ และเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป ใบและดอกมีขนาดใหญ่ หนา สีเข้ม Thao และคณะ (2003) เพาะเลี้ยงปลายยอด *Alocasia* ร่วมกับสารออรีซาลินความเข้มข้น 0.005-0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24-72 ชั่วโมง พบว่า มีความเป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืชน้อย ส่งผลให้อัตรารอดชีวิตในทุกระดับความเข้มข้น และทุกช่วงระยะเวลา และสามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ได้มากที่สุด ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบมีลักษณะกว้างมากขึ้น อวบ หนา และสีเขียวเข้ม เซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ แต่อัตราความหนาแน่นลดลง Carvalho และคณะ (2005) ใช้สารออรีซาลินความเข้มข้น 0.0175 เปอร์เซ็นต์ ทรีตชิ้นส่วนข้อใบเลี้ยง *Bixa orellana* ระยะเวลา 15 วัน พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพืชพอลิพลอยด์ได้ พืชมีลักษณะทางสัณฐานเปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบมีขนาดใหญ่ เซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น และสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ Wu และ Mooney (2002) เพาะเลี้ยงแคลลัสส้มในอาหารร่วมกับสารออรีซาลินความเข้มข้น 0.01-0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ได้ Stanys และคณะ (2006) เพาะเลี้ยงปลายยอด *Chaenomeles japonica* ในอาหารเหลวร่วมกับสารออรีซาลินความเข้มข้น 0.035-0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพืชพอลิพลอยด์ และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และมีอัตรารอดชีวิตสูงในทุกความเข้มข้น ใบและเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้นเช่นกัน Chauvin และคณะ (2003) ใช้สารออรีซาลินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่ตาข้างของ *Solanum* ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น ลักษณะของใบเปลี่ยนแปลงไป Morgan และ Hofmann (2003) เพาะเลี้ยงปลายยอด *Gentiana trifler* var. *japonica* ร่วมกับสารออรีซาลินเข้มข้น 1.55 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 4 สัปดาห์ ส่งผลให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป มีใบหนา เซลล์ปากมีขนาดใหญ่ และชักนำให้เกิดพืชพอลิพลอยด์ได้เช่นกัน

การให้สารคอลชิซีนและออรีซาลินแก่พืชต้องพยายามให้สารแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อเจริญ ต้องใช้กับเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตและสมบูรณ์ ระยะเวลาและความยาวนานของการให้สารแก่เนื้อเยื่อ นานเท่าใดขึ้นอยู่กับวัฏจักรของการแบ่งเซลล์พืช หากระยะเวลาที่ให้สารสั้นอาจไม่แสดงผล หากนานเกินไปอาจแสดงผลมาก พืชที่ได้จะมีโครโมโซมมากเกินระดับที่ต้องการจนทำให้เซลล์ตายและไม่ได้ต้นที่มีการเพิ่มชุดของโครโมโซมได้

การตรวจสอบพืชพอลิพลอยด์

เมื่อตรวจสอบโดยใช้สายตาจากลักษณะทางสัณฐาน พืชที่เป็นพอลิพลอยด์จะมีลักษณะแตกต่างจากพืชที่เป็นดิพลอยด์หลายประการดังนี้ คือ ใบหนาและโตกว่า มีปากใบกว้าง ดอกใหญ่ มีสีเข้ม ผลขนาดใหญ่ อายุการเก็บเกี่ยวช้ากว่าปกติ ละอองเกสรใหญ่กว่า มีความเป็นหมันมากกว่า การตรวจสอบระดับพลอยดีสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา นับจำนวนโครโมโซม ตรวจลักษณะทางสรีรวิทยา การเปรียบเทียบและการนับจำนวนปากใบ หาอัตราการตาย (Capella and Conger, 1967 อ้างโดย ธีระ, 2525) หรืออัตราการรอดชีวิต (วนิภา, 2525; Constantin and Love, 1967) ของต้นพืชที่ได้รับสาร เป็นต้น ซึ่งรายละเอียดในแต่ละวิธีมีดังนี้

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา เป็นข้อมูลแรกที่สามารถสังเกตได้ง่าย และเห็นได้ชัดเจน โดยลักษณะเหล่านี้ถูกถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านยีนบนโครโมโซม ภายหลังการชักนำการกลายพันธุ์ ลักษณะที่ปรากฏเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงข้อมูลที่เป็นองค์ประกอบทางจีโนไทป์และสิ่งแวดล้อม ที่ส่งผลให้แสดงลักษณะนั้น ๆ ออกมา เช่น ลักษณะของลำต้น ใบ ดอก ผล หรือเมล็ด เป็นต้น จากการทรีตสารคอลชิซีนในพืชชนิดต่าง ๆ พบว่า ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของใบ เช่น ใบมีลักษณะหนา สีเขียวเข้ม ใบอวบใหญ่ (Rose *et al*., 2000; Petersen *et al*., 2003; Gao *et al*., 2001; Wu and Mooney, 2002; Mehetre *et al*., 2003; Escandon *et al*., 2005: 2006; Liu *et al*., 2007) ผิวใบขรุขระ ใบบิดเบี้ยวเสียรูปร่าง (Seneviratne and Wijesundara, 2004; Rey *et al*., 2002) มีจำนวนก้านใบน้อยลง (Rey *et al*., 2002 และ Wei *et al*., 2007) และจากการทรีตด้วยสารออรีซาลิน พบว่า ส่งผลให้ใบมีลักษณะเปลี่ยนแปลง มีขนาดใบใหญ่ และหนาเช่นกัน (Morgan and Hofmann, 2003; Kermani *et al*., 2003; Allum *et al*., 2007)

จากรายงานลักษณะของดอกที่ได้จากการทรีตสารคอลชิซีน พบว่า ดอกมีลักษณะอวบ ใหญ่ (Morgan and Hofmann; 2003; Kermani, 2003; Seneviratne and Wijesundara, 2004; Escandon *et al*., 2005: 2006; Nimura *et al*., 2006; Zhang *et al*., 2008) สีดอกเข้มขึ้น (Seneviratne และ Wijesundara, 2004) และจากการทรีตด้วยสารออรีซาลิน พบว่า ส่งผลให้ดอกมีขนาดใหญ่ กลมมนเช่นกัน (Morgan และ Hofmann, 2003; Kermani *et al*., 2003 และ Allum *et al*., 2007) ส่วนลำต้นมีลักษณะอวบ อ้วน หรือเตี้ย (Escandon *et al*., 2005, 2006 และ Wei *et al*., 2007) รากเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อน (Wei *et al*., 2007) รากสั้น (Shao *et al*., 2003) สำหรับการทรีตด้วยสารคอล

ชิซีนยังส่งผลต่อลักษณะอื่น ๆ ด้วย เช่น อับเรณู (Szakács and Barnabás, 2004)) ละอองเกสร (Mehetre *et al*., 2003) และเมล็ด (Liu *et al*., 2007) พบว่า มีขนาดใหญ่กว่าปกติ และยังพบว่า จำนวนเมล็ดเกิดขึ้นน้อยกว่าปกติด้วย (Sariano *et al*., 2007) ก้านดอกอวบหนา (Liu *et al*., 2007) ระยะเวลาการบานของดอกช้ากว่าปกติ (Nimura *et al*., 2006) ระยะเวลาในการเจริญพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ช้ากว่าปกติ (Rose *et al*., 2000; Petersen *et al*., 2003; Stanys *et al*., 2004; Zeng *et al*., 2006) และออรีซาลินนั้น พบว่า ส่งผลให้มีการเจริญพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ช้ากว่าปกติเช่นกัน (Allum *et al*., 2007; Khosravi *et al*., 2008)

จากรายงานลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยส่วนใหญ่เป็นไปในทางเพิ่มขึ้น ไม่ว่าจะเป็นใบ ดอก ผล ลำต้น อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่สารเคมีดังกล่าวให้ผลในทางกลับกัน เช่น Shao และคณะ (2003) พบว่า สารคอลชิซีนส่งผลให้ใบมีขนาดเล็ก ขอบใบคอดเข้าหากันไม่เรียวยาว ดอกอวบสั้นไม่เรียวยาว และรากสั้น

2. การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยา

การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยา เช่น ขนาดและความหนาแน่นของเซลล์ปากใบ จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม เป็นตัวแปรหลักที่บ่งบอกถึงระดับพลอยดีในพืช ซึ่งหากจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มเป็น 2 เท่านั้น หมายความว่าพืชที่ได้รับสารมีการเพิ่มชุดของโครโมโซมเป็น 2 เท่าด้วย ข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาตรวจสอบผลของสารเคมีต่อการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมของพืชได้ เช่น จากรายงายผลการศึกษาการทรีตสารคอลชิซีน ในฝ้าย (Mehetre *et al*., 2003) กล้วยไม้ (Konzen *et al*., 2000) *Scutellaria baicalensis* (Gao *et al*., 2002) แพร์ญี่ปุ่น (Kadota and Niimi, 2000) พุทรา (Gu *et al*., 2005) คาร์เนชั่นพันธุ์ลูกผสม (Nimura *et al*., 2006) *Platanus acerifolia* (Liu *et al*., 2007) และการทรีตด้วยสารออรีซาลินใน *Bixa orellana* (Carvalho *et al*., 2005) *Chaenomeles japonica* (Stanys *et al*., 2006) พบว่า เซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น และความหนาแน่นของเซลล์ปากใบลดลง

3. อัตรารอดชีวิต

อัตรารอดชีวิต เป็นดัชนีบ่งชี้ผลของสารที่ก่อให้เกิดความเสียหาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ดังนั้น ระยะเวลาและความเข้มข้นที่ให้ค่า LD_{50} ซึ่งเป็นตับ่งชี้ถูกเลือกไว้ใช้ในการเพิ่มชุดโครโมโซม จากรายงานผลการทรีตสารคอลชิซีน หรือออรีซาลินในพืชต่าง ๆ พบว่า ที่ระดับความ

เข้มข้นของสารสูงขึ้น และระยะเวลาในการทรีตสารนาน เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารคอลชิซีนเข้มข้น 25 250 และ 1,250 ไมโครโมลาร์ และออรีซาลินเข้มข้น 5 และ 15 ไมโครโมลาร์ นาน 15 และ 30 วัน ส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายในที่สุด (Carvalho *et al.*, 2005) การเพาะเมล็ดร่วมกับสารคอลชิซีนเข้มข้น 250 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 7 วัน (Urwin และ Horsnell, 2007) ส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตต่ำลง จากรายงานของ Shao และคณะ (2003) พบว่า ความเข้มข้นคอลชิซีน 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และระยะเวลาในการทรีตสารนาน 96 และ 114 ชั่วโมง พบว่า มีอัตรารอดชีวิตต่ำเช่นกัน และไม่สามารถชักนำพืชพอลิพลอยด์ได้ แต่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากรายงานการทรีตสารที่ความเข้มข้นต่ำ แต่ระยะเวลาในการทรีตนาน หรือความเข้มข้นสูง แต่ระยะเวลาในการทรีตสารน้อยลง เช่น คอลชิซีนเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 และ 72 ชั่วโมง และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 และ 48 ชั่วโมง (Gu *et al.*, 2005) พบว่า ส่งผลให้อัตรารอดชีวิตสูงขึ้น และชักนำให้เกิดพืชพอลิพลอยด์ได้ (Rose *et al.*, 2000; Kozen *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2003; Kanami *et al.*, 2003; Nair, 2004; Stanys *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่า การทรีตสารคอลชิซีนที่ความเข้มข้นสูง เช่น 100 200 300 500 หรือ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้พืชมีอัตรารอดชีวิตสูงได้เช่นกัน (Chen *et al.*, 2001; Herrera *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002; Nimura *et al.*, 2006; Sariano et al., 2007)

4. จำนวนชุดโครโมโซม

การตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากเป็นวิธีการที่ให้ผลชัดเจนต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของพืชที่ศึกษา Thao และคณะ (2003) ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของ *Alocasia* โดยนำปลายรากมาจุ่มแช่ใน 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำปลายรากมาจุ่มแช่ในกรดแอซิติกร่วมกับแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95-100 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:3 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำปลายรากมาจุ่มแช่ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำปลายรากมาศึกษาโดยวิธี Feulgen squash จากวิธีการดังกล่าว สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ และพบการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของพืชจากการทรีตด้วยสารคอลชิซีน หรือออรีซาลิน Mehetre และคณะ (2003) ตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมในฝ้าย Escandon และคณะ (2005, 2006) ใน *Scoparia montevidiensis* และ *Bacopa monnieri* และ Morgan และ Hofman (2003) ใน *Gentiana trifler* ที่ทรีตด้วยสารคอลชิซีน

ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 วัน พบว่า จำนวนชุดโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์ Ghaffari (2006) ตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมของข้าวฟ่างที่ทรีตด้วยสารคอลชิซีน ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน พบว่า จำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นทริพพลอยด์ เตตระพลอยด์ และเพนตะพลอยด์ Allum (2007) ทรีตสารออรีซาลินในกุหลาบความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ นาน 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า จำนวนชุดโครโมโซมเป็นมิกโซพลอยด์ และที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ นาน 48 ชั่วโมง พบว่า เป็นเตตระพลอยด์ Khosravi และคณะ (2008) ทรีตสารออรีซาลินในกุหลาบที่ความเข้มข้น 6 ไมโครโมลาร์ นาน 24 ชั่วโมง พบว่า จำนวนชุดโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์เช่นกัน

5. การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยโฟลไซโทเมทรี

เนื่องจากการใช้เทคนิคการตรวจนับจำนวนโครโมโซมใช้เวลานาน มีขั้นตอนยุ่งยากและต้องใช้ความชำนาญของผู้ปฏิบัติการสูง ดังนั้น การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบภายในนิวเคลียสด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรีจึงให้ผลได้รวดเร็วกว่า เทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ประมาณดีเอ็นเอได้ทั้งเซลล์สัตว์ มนุษย์ และพืช (Ulrich and Ulrich, 1991) การใช้โฟลไซโทมิเตอร์รวดเร็วกว่ามาก (Doležel *et al*., 1989) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีประชากรพืชที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณมาก ดังจะเห็นได้ในงานวิจัยต่าง ๆ ได้มีการนำโฟลไซโทมิเตอร์เข้ามาช่วยวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอและระดับชุดโครโมโซมเป็นที่ยอมรับกันมากในปัจจุบัน (Doležel and Bartoš, 2005) โฟลไซโทเมทรีเป็นการวิเคราะห์เซลล์โดยใช้เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ โดยจะเป็นการตรวจวิเคราะห์ลักษณะต่างๆ ของเซลล์หลายๆ ชนิดพร้อมๆ กัน ซึ่งการวิเคราะห์จะทำขณะที่เซลล์เคลื่อนที่ผ่านลำแสงเลเซอร์เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ซึ่งวิธีการตรวจวัดนี้จะสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งคุณลักษณะภายนอกและภายในเซลล์โดยมีรายละเอียดประกอบด้วย ระบบของเหลว ระบบของแสง และระบบอิเล็กทรอนิกส์ ปัจจุบันนี้มีการพัฒนาของเทคนิคโฟลไซโทเมทรีมากขึ้นจึงมีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย และงานทางห้องปฏิบัติการมากขึ้น การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอสามารถเพื่อใช้ตรวจสอบระดับพลอยดีในพืชแต่ละชนิด สามารถทำได้จากใบอ่อน แคลลัส เซลล์ซัสเพนชั่น และปลายราก โดยนำมาแยกเซลล์ในสารละลายบัพเฟอร์ แล้วย้อมนิวเคลียสด้วย Propidium iodide (PI) หรือ 4′, 6-diamino-2-phe nylindole (DAPI) จากผลการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอและย้อมด้วยสี PI จากชิ้นส่วนใบในพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ในข้าว 10 ชนิด (Martínez *et al*., 1994; Chen *et al*., 2001) หญ้า 13 ชนิด (Arumuganathan *et al*., 1999) *Hosta* ชนิดต่าง ๆ (Zonneveld and Iren, 2000) *Helleborus* 5 สายพันธุ์ (Zonneveld, 2001) ส้ม (Wu and Mooney, 2002; Seker *et*

al., 2003) *Humulus lupulus L.* (Koutoulis *et al*., 2005) และใช้วิธีการสกัดตามที่รายงานโดย Doležel, 1994; Lysák *et al.,* 1999) กุหลาบ (Yokoya *et al*., 2000) กล้วยไม้สกุลหวาย (รัตนา และคณะ, 2552) พบว่า สามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นในพืชที่ต้องการตรวจสอบได้ Loureiro และคณะ (2007) แยกเซลล์จากชิ้นส่วนใบของพืช 37 ชนิด โดยใช้สารละลายบัพเฟอร์ 2 กลุ่ม คือ GPB (general plant buffer) และ WPB (woody plant buffer) แล้วย้อมนิวเคลียสด้วยสี PI พบว่า สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยมี 7 ชนิด แยกเซลล์ได้ผลดีในสารละลายบัฟเฟอร์ WPB อีก 30 ชนิด แยกเซลล์ได้ดีใน WPB และ GPB แต่พบว่ามีเพียง 15 ชนิดเท่านั้นที่สามารถแยกเซลล์ได้ผลดีใน GPB Rival และคณะ (1997) วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากแคลลัสของปาล์มน้ำมัน แล้วย้อมด้วยสี PI พบว่า สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอได้เช่นกัน และจากการแยกนิวเคลียสจากชิ้นส่วนใบ และแคลลัสของปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วย้อมด้วย PI พบว่า มีปริมาณดีเอ็นเอมีความแตกต่างกัน (Rival *et al*., 1997)

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอจากใบอ่อน และย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI ใน *Acacia dealbata* Link. จำนวน 7 ชนิด และ *A. mangium* Willd. จำนวน 2 ชนิด (Blakesley *et al*., 2002) *Alocasia* (Thao *et al*., 2003) กล้วยไม้ (*Bletilla striata*) (Hirano *et al*., 2005) *Lavandula angustifolia* (Urwin and Horsnell, 2007) เฟิร์น (Kawakami *et al*., 2007) กุหลาบ (Yokoya *et al*., 2000; Khosravi *et al*., 2008) พบว่า การย้อมด้วยสี DAPI สามารถตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอได้ Doležel และคณะ (1989) รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่แยกได้จากแคลลัสประเภทคอมแพคฟรายเอเบิล และเซลล์ซัสเพนชั่น ของถั่ว (*Alfalfa sativum* และ *Medicago sativa*) แล้วย้อมด้วย DAPI สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอได้ Elmaghrabi และ Ochatt (2006) แยกนิวเคลียสจากชิ้นส่วนปลายรากของ *Medicago truncatula* และ Kovárová และคณะ (2007) แยกนิวเคลียสจากปลายรากของถั่วปากอ้า แล้วย้อมด้วยสี DAPI พบว่า สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอได้เช่นกัน

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์สบู่ดำจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง
2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนต้นและการเกิดรากของสบู่ดำในสภาพปลอดเชื้อ
3. ศึกษาผลของสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานสรีรวิทยา และการเพิ่มชุดของโครโมโซม

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ และอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เมล็ดสบู่ดำพันธุ์ D1 เป็นพันธุ์นำเข้าจากประเทศอินเดีย ได้รับเมล็ดพันธุ์สบู่ดำมาจากศูนย์วิจัยพืชไร่นครราชสีมา หมู่ที่ 3 ตำบลลาดบัวขาว อำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา

1.2 สารเคมีเพิ่มชุดโครโมโซม

สารคอลชิซีน และสารออรีซาลิน

1.3 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (รายละเอียดแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1)

สารควบคุมการเจริญเติบโต ประกอบด้วย BA KN TDZ 2iP IBA NAA และ 2, 4-D

น้ำตาลซูโครส

วุ้นตรานางเงือก

1.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์พอลิพลอยด์

วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ

ประกอบด้วย Tris Na_2EDTA Spermine tetrahydrochloride KCl NaCl Triton X-100 Propidium iodide และ RNase (รายละเอียดแสดงในตารางภาคผนวกที่ 2)

ตรวจสอบจำนวนโครโมโซม

ประกอบด้วย Paradichlorobenzene (*p*DB) คาร์บอนฟูกซิน กราเซียลแอซิติก แอซิด และกรดไฮโดรคลอริก (รายละเอียดแสดงในตารางภาคผนวกที่ 3)

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์เตรียมอาหาร

เครื่องแก้วประกอบด้วย ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปากกว้าง ขนาด 2 4 และ 8 ออนซ์ จานเพาะเลี้ยง บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ กระบอกตวง ปิเปตต์ ขวดใส่สารสีชา กรวยกรอง แท่งแก้ว คนสารละลาย

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

หม้อนึ่งความดัน

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

เครื่องเขย่า

เครื่องกรองแบคทีเรีย

เครื่องกลั่นน้ำ

เตาแม่เหล็กไฟฟ้า

เตาไมโครเวฟ

2.2 อุปกรณ์ย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยง

ตู้ปลอดเชื้อ

เครื่องมือที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานเพาะเลี้ยง

ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยง ซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500-2,000 ลักซ์ ให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน

2.3 อุปกรณ์ตรวจสอบพืชพอลิพลอยด์

กล้องจุลทรรศน์คอมพาวด์พร้อมกล้องถ่ายรูปดิจิตอล

เครื่องวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโฟลไซโทมิเตอร์รุ่น Becton Dickinson FACSCalibur™

วิธีการ

1 ศึกษาผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ

1.1 การเพาะเลี้ยงคัพภะ

คัดเลือกเมล็ดสบู่ดำที่สมบูรณ์ นำมาล้างทำความสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อประมาณ 10 - 12 ชั่วโมง จากนั้นกะเทาะเปลือกสีดำออก นำเมล็ดที่กะเทาะเปลือกแล้วไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3-4 ครั้ง นำคัพภะไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติมสารควบคุมการเจริญ เติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้คือ

1) เติม BA เข้มข้น 0 0.05 0.25 0.5 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
2) เติม BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
3) เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
4) เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
5) เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
6) เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
7) เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
8) เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
9) เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

10) เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

11) เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

12) เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยแต่ละสิ่งการทดลองใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวน 20 ชิ้น บันทึกผลการทดลองทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบแยกกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s multiple range test (DMRT)

1.2 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยง และก้านใบของต้นกล้าในหลอดทดลอง

ตัดแยกชิ้นส่วนใบเลี้ยง และก้านใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ ดังนี้คือ

1) เติม BA เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

2) เติม TDZ เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

3) เติม 2iP เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

4) เติม IBA เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

5) เติม NAA เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

6) เติม 2, 4-D เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

7) เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

8) เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยแต่ละสิ่งการทดลองใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวน 20 ชิ้น บันทึกผลการทดลองทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

1.3 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนของต้นกล้าในหลอดทดลอง

ตัดแยกชิ้นส่วนลำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ ดังนี้คือ

1) เติม BA เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

2) เติม TDZ เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

3) เติม 2iP เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

4) เติม IBA เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

5) เติม NAA เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

6) เติม 2, 4-D เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยแต่ละสิ่งการทดลองใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวน 20 ชิ้น บันทึกผลการทดลองทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

1.4 การชักนำการเกิดยอดรวมจากลำต้น ปลายยอด ตาข้าง และแคลลัส

จากเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1.5 เดือน คัพภะมีการเจริญพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ ประกอบด้วยปลายยอด ตาข้าง ใบจำนวนมาก และเกิดแคลลัส จากนั้นตัดแยกชิ้นส่วนลำต้น ปลายยอด ตาข้าง และแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1) เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2) เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยแต่ละสิ่งการทดลองใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวน 20 ชิ้น บันทึกผลการทดลองทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

1.5 การชักนำการเกิดยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงและใต้ใบเลี้ยง

จากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

เป็นเวลา 10 วัน คัพภะมีการเจริญเป็นต้นอ่อน ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ลำต้นเหนือใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยง จากนั้นตัดชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงและลำต้นใต้ใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1) เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.05 0.01 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

2) เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.05 0.01 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

3) เติม KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.05 0.01 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

4) เติม KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.05 0.01 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

5) เติม KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 0.01 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยแต่ละสิ่งการทดลองใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวน 20 ชิ้น บันทึกผลการทดลองทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

1.6 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารเหลว

นำชิ้นส่วนปลายยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร บันทึกผลการทดลองทุก ๆ 10 วัน สังเกตลักษณะชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงการเจริญเติบโต

1.7 การชักนำราก

นำยอดที่ได้จากการทดลองข้างต้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IBA หรือ

NAA เข้มข้น 0 0.25 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร บันทึกผลการทดลองหลังจากการเพาะเลี้ยงทุก ๆ 10 วัน โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์ จำนวนและความยาวของรากเปรียบเทียบกัน โดยให้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

1.8 การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

นำชิ้นส่วนปลายยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1) เติม 2, 4-D เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

2) เติม TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

3) เติม KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

บันทึกผลลักษณะต่าง ๆ ของแคลลัส เช่น สี และชนิดของแคลลัส จากนั้นย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ภายใต้การให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และทำการย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์ จำนวน 2 ครั้ง บันทึกผลลักษณะเซลล์ที่เพาะเลี้ยง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2. การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอโดยโฟลไซโทเมทรี

นำชิ้นส่วนใบ ลำต้น และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาผลของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณดีเอ็นเอ (Doležel and Bartoš, 2005) วิธีการหาปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้คือ นำชิ้นส่วนพืชหนักประมาณ 30 มิลลิกรัม ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเล็ก ล้างด้วยสารละ ลาย Tris buffer 25 มิลลิลิตร ประมาณ 5 นาที สับชิ้นส่วนด้วยใบมีดโกนให้ละเอียด ใส่ LB01 lysis buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเขย่าจานเพาะเลี้ยง 1-2 นาที ใส่สารละลาย RNase 50 ไมโครลิตร ประมาณ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย PI ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าจานเพาะเลี้ยงให้สารละลายทั้งหมดเข้ากันดี กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 42 ไมโครเมตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์ภายใน 15 นาที โดยโฟลไซโทมิเตอร์

3. ศึกษาผลของสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม

3.1 ผลของสารต่ออัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนยอด

นำชิ้นส่วนปลายยอดซึ่งประกอบด้วยตาข้าง 2-3 ตา ไปวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมสารละลายคอลชิซีนเข้มข้น 0 0.01 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ หรือออรีซาลินเข้มข้น 0 0.005 0.01 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง แต่ละสิ่งการทดลองใช้ชิ้นส่วนยอดจำนวน 20 ยอด หลังจากให้สารเป็นระยะเวลาดังกล่าวแล้ว ย้ายชิ้นส่วนปลายยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงอีกเป็นเวลานาน 30 วัน ตรวจสอบอัตรารอดชีวิต หาค่า LD_{50} ของสารแต่ละชนิดในแต่ละระยะเวลาการทรีตตามวิธีการของวนิภา (2525) และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่พัฒนา เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน และระยะเวลาการให้สาร โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3.2 ผลของสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยา

หลังจากทรีตด้วยสารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน นำชิ้นส่วนปลายยอดมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดยอดรวมสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน และตัดแยกชิ้นส่วนยอดรวมไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำรากสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน ตรวจสอบผลการทดลองจำนวน 20 ต้น ในแต่ละชุดการทดลอง ดังนี้ บันทึกผลการสร้างยอดรวม นับจำนวนใบต่อชิ้นส่วนยอด ระยะเวลาในการเจริญเติบโต ลักษณะและขนาดของยอด ใบ ลำต้น กิ่ง ก้าน สีผิวใบ ลักษณะ และขนาดของราก นับจำนวนราก เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและ ความเข้มข้นของสารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน และระยะเวลาในการได้รับสาร

3.3 ผลของสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินต่อลักษณะทางสรีรวิทยา

นำใบจากต้นที่ไม่ได้รับ และได้รับสารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน จำนวน 5 ต้น ๆ ละ 5 ใบ ในแต่ละชุดการทดลอง มาลอกแล้ววางบนกระจกสไลด์ จากนั้นหยดน้ำลงบนใบ 1 -2 หยด

แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า และถ่ายรูปด้วยกล้องดิจิตอล บันทึกขนาด ความหนาแน่น และลักษณะเซลล์ปากใบ จำนวนใบละ 2 ตำแหน่ง

3.4 ผลของสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินต่อจำนวนโครโมโซม

นำราก หรือปลายยอดสบู่ดำจากชุดควบคุม และชุดที่คาดว่าเป็นพอลิพลอยด์จากต้นที่ได้รับสารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน มาตรวจสอบจำนวนโครโมโซม ชุดการทดลองละ 5 ราก หรือปลายยอด โดยนำปลายรากหรือปลายยอดมาจุ่มแช่ใน *p*-dichlorobenzene (*p*DB) อิ่มตัว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำปลายรากหรือปลายยอดมาจุ่มแช่ในกรดแอซิติกร่วมกับแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95-100 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:3 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำปลายรากหรือปลายยอดมาจุ่มแช่ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำปลายรากหรือปลายยอดมาศึกษาโดยวิธี Feulgen squash

3.5 ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอโดยโฟลไซโทเมทรีจากต้นที่ได้รับและไม่ได้รับสารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน

หลังจากเกิดต้นสบู่ดำที่สมบูรณ์แล้ว ตัดแยกใบอ่อนไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโฟลไซโทมิเตอร์ (วิธีการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 2)

บทที่ 3

ผล

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ

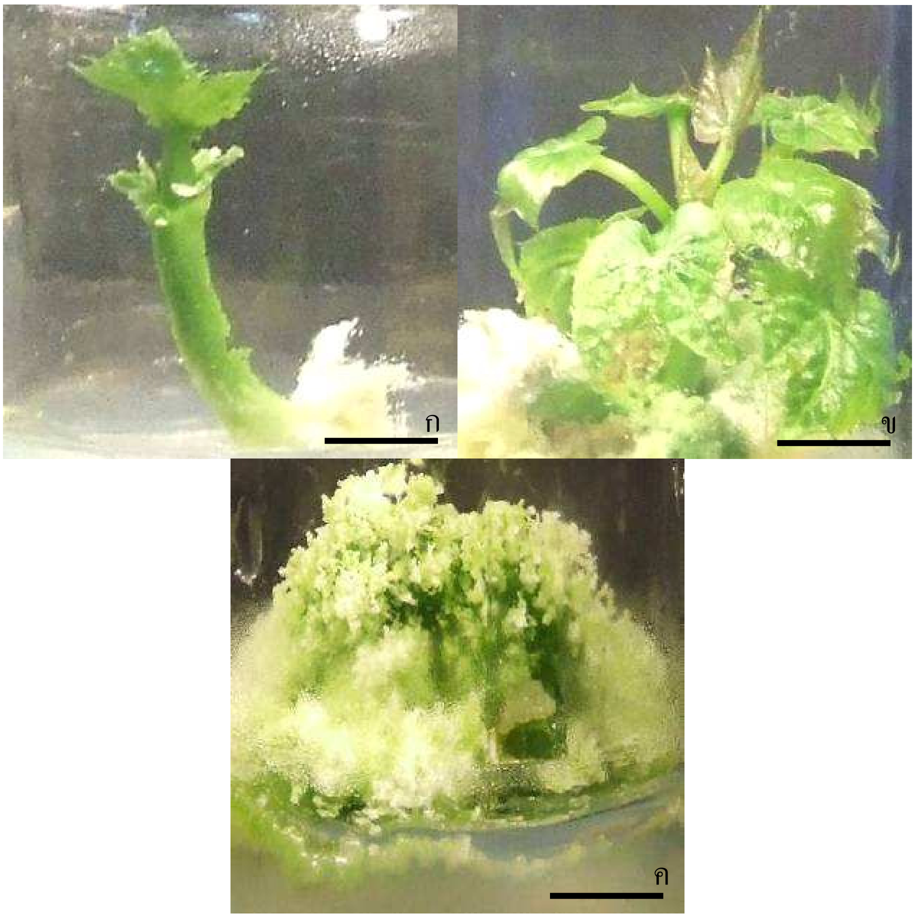
1.1 การเพาะเลี้ยงคัพภะ

จากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดสบู่ดำ และนำคัพภะไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมและเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่ 5ก) พบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ คัพภะสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้ภายในเวลา 10 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยง ลักษณะต้นอ่อนประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยง (ภาพที่ 5ข)

ภาพที่ 5 คัพภะที่ตัดแยกและเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ไม่เติมหรือเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) และต้นกล้าที่งอก (ข) (บาร์ = 1.5 ซม.)

จากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 1 เดือน พบว่า คัพภะมีการเจริญได้ 3 แบบใหญ่ ๆ คือ คัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA อย่างเดียว สามารถพัฒนาเป็นต้นกล้ามีใบเลี้ยง 2 ใบ และมีรากได้ คัพภะมีอัตราการเจริญพัฒนาเป็นต้นกล้า 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6ก) คัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 และ 0.25 มิลลิกรัม สามารถงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ มีใบและตาข้างจำนวนมาก และเกิดแคลลัสบริเวณฐานเป็นก้อนแข็งสีเขียวปนขาวเกาะตัวกันแน่น เรียกว่า คอมแพคแคลลัส (compact callus) คัพภะมีอัตราการเจริญพัฒนาเป็นต้นและแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6ข) และคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างแคลลัสได้เพียงอย่างเดียว แคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนแข็งสีเขียวปนขาวเกาะตัวกันแน่นเป็นประเภทคอมแพค และแคลลัสดังกล่าวไม่สามารถเจริญพัฒนาเป็นยอดรวมได้ คัพภะมีอัตราการเจริญพัฒนาเป็นแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน (ภาพที่ 6ค) เมื่อทำการย้ายเลี้ยงแคลลัส พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วภายใน 15 วัน หากปล่อยไว้นานจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตาย

จากการชั่งน้ำหนักแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 3.45 กรัม รองลงมาคือ อาหารเติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย 3.40 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นอื่น ๆ พบว่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 6 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อพัฒนาของคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS นาน 1 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)

(ก) BA 0 0.25 0.5 1 2 และ 3 มก./ล.

(ข) BA 0.25 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. หรือ BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 หรือ 0.25 มก./ล.

(ค) BA 1 2 และ 3 มก./ล. + IBA 0.1 0.25 และ 0.5 มก./ล.

ตารางที่ 3 น้ำหนักแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 1 เดือน

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)		การตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยง (%)	น้ำหนักแคลลัส (กรัม)
BA	IBA		
0	0	S (100)	0.00±0.00
0.05	-	S (100)	0.00±0.00
0.25	-	S (100)	0.00±0.00
0.5	-	S (100)	0.00±0.00
1	-	S (100)	0.00±0.00
2	-	S (100)	0.00±0.00
3	-	S (100)	0.00±0.00
0.25	0.1	SC (100)	1.85 ± 0.07^{e}
0.5	0.1	SC (100)	1.87 ± 0.96^{e}
0.5	0.25	SC (100)	$2.00\pm.0.93^{d}$
1	0.1	C (100)	1.69 ± 0.08^{e}
1	0.25	C (100)	2.86 ± 0.10^{cd}
1	0.5	C (100)	3.06 ± 0.11^{bc}
2	0.1	C (100)	3.05 ± 0.09^{bc}
2	0.25	C (100)	3.04 ± 0.10^{bc}
2	0.5	C (100)	3.32 ± 0.09^{ab}
3	0.1	C (100)	3.40 ± 0.10^{a}
3	0.25	C (100)	3.45 ± 0.10^{a}
3	0.5	C (100)	3.18 ± 0.08^{ab}
F-test			*
C.V. (%)			20.36

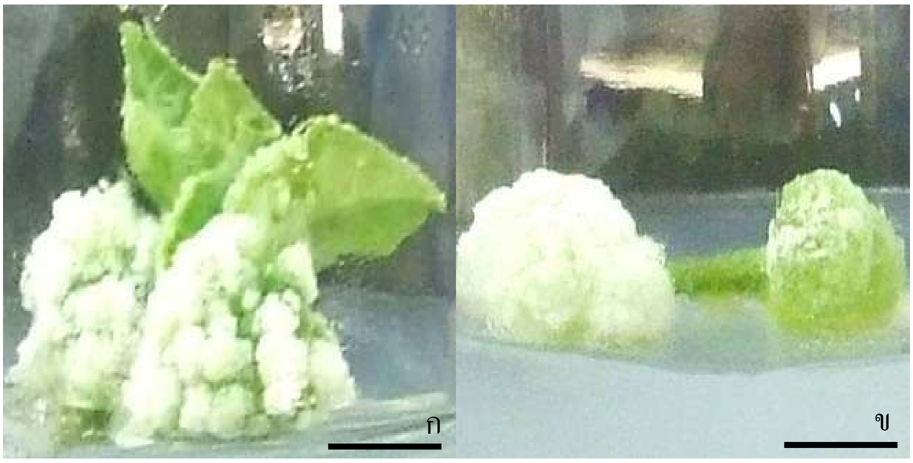
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

S = shoot SC = shoot/callus C = callus

1.2 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยง และก้านใบของต้นกล้าในหลอดทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คัพภะสามารถพัฒนาเป็นต้น มีใบเลี้ยง 2 ใบ จากนั้นตัดแยกเอาชิ้นส่วนใบเลี้ยง และก้านใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA TDZ 2iP IBA NAA และ 2,4-D เข้มข้น 0 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารเติม BA เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นาน 15 วัน พบว่า ชิ้นส่วนใบเลี้ยง และก้านใบ ให้แคลลัสได้ตรงบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืช ลักษณะเป็นก้อนแข็ง เซลล์เกาะตัวกันแน่นเป็นประเภทคอมแพค เมื่อเพาะเลี้ยงไปอีกระยะหนึ่ง พบว่า แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลไม่สามารถเจริญพัฒนาต่อไปได้ (ภาพที่ 7) ดังนั้น ชิ้นส่วนดังกล่าวไม่เหมาะต่อการใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการขยายพันธุ์สบู่ดำ



ภาพที่ 7 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยง (ก) และ ก้านใบ (ข) (บาร์ = 1.5 ซม.)

1.3 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนของต้นกล้าในหลอดทดลอง

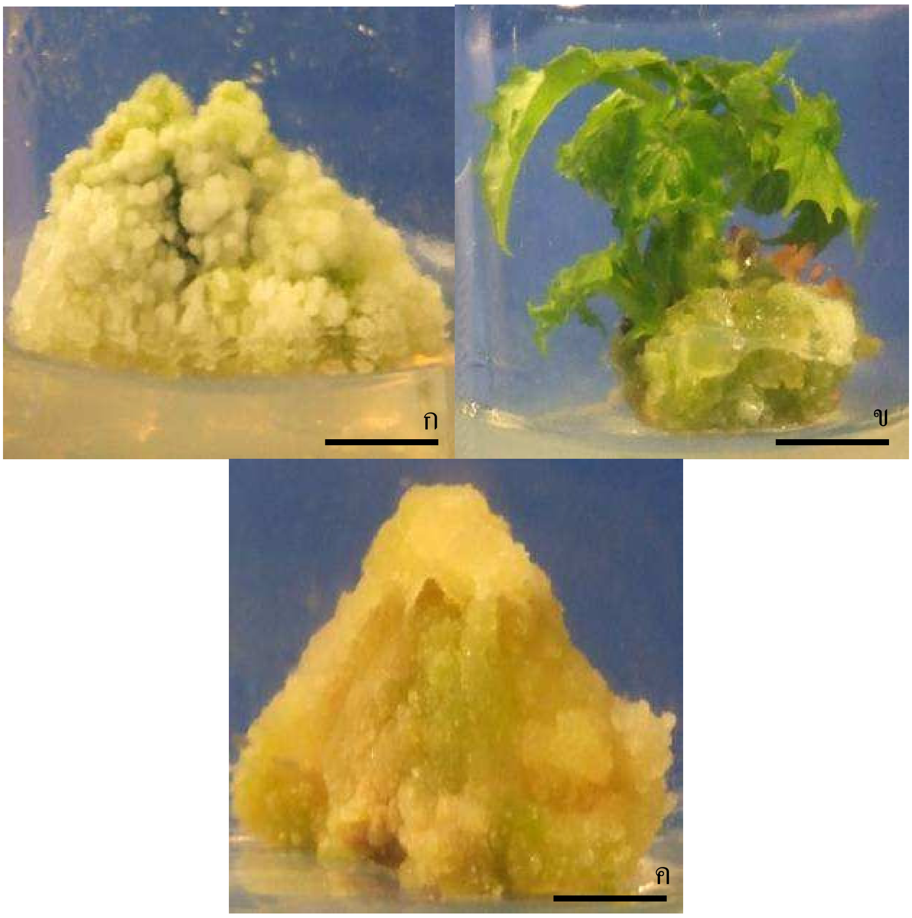
จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนใต้ใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงในที่มีแสง เป็นเวลา 15 วัน พบว่า อาหารเติม IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว ให้น้ำหนักแคลลัสมากที่สุด 3.13 กรัม รองลงมาคือ อาหารเติม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย 2.98 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดและความเข้มข้นอื่น ๆ พบว่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4) จากการศึกษาลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA TDZ IBA ทุกความเข้มข้น พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ตรงบริเวณรอบ ๆ รอยตัด แคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนแข็ง สีขาวปนเขียวอ่อน ปกคลุมชิ้นส่วนลำต้น เซลล์เกาะตัวกันแน่น เป็นประเภทคอมแพค (ภาพที่ 8ก) และไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นบนอาหารเติม BA เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากชักนำให้เกิดแคลลัสแล้ว พบว่า ต้นอ่อนยังสามารถพัฒนาเป็นต้น มีใบจำนวนมาก และยอดที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 8ข) แต่ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ยอดที่ได้มีลักษณะสั้นและใบหยิกงอไม่สามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม 2,4-D ทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ตรงบริเวณรอบ ๆ รอยตัด แคลลัสมีสีเหลืองเข้ม ก้อนแคลลัสมีขนาดใหญ่ เซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ หลุดร่วนง่าย เรียกว่า ฟรายเอเบิลแคลลัส (friable callus) เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 15 วัน แคลลัสจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล และหลุดร่วนออกจากกันได้ง่าย (ภาพที่ 8ค) สำหรับ 2iP เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และ 2iP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA ทุกความเข้มข้น พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ตารางที่ 4 น้ำหนักแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 15 วัน

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)				น้ำหนักแคลลัส (กรัม)	ลักษณะแคลลัส
ไซโตไคนิน		ออกซิน			
	0		0	0.00 ± 0.00	ไม่เกิดแคลลัส
BA	1		0	1.26 ± 0.06^{e}	คอมแพค
	2		0	2.24 ± 0.15^{cd}	คอมแพค
	3		0	2.21 ± 0.16^{cd}	คอมแพค
เฉลี่ย				1.9	
TDZ	1		0	2.52 ± 0.19^{bc}	คอมแพค
	2		0	1.94 ± 0.16^{c}	คอมแพค
	3		0	1.24 ± 0.64^{e}	คอมแพค
เฉลี่ย				1.9	
2iP	1		0	0.00 ± 0.00	ไม่เกิดแคลลัส
	2		0	0.00 ± 0.00	ไม่เกิดแคลลัส
	3		0	0.72 ± 0.03^{fg}	คอมแพค
เฉลี่ย				0.72	
	0	IBA	1	3.13 ± 0.10^{a}	คอมแพค
	0		2	2.98 ± 0.13^{a}	คอมแพค
	0		3	2.53 ± 0.21^{bc}	คอมแพค
เฉลี่ย				2.88	
	0	NAA	1	0.27 ± 0.01^{g}	คอมแพค
	0		2	0.34 ± 0.02^{fg}	คอมแพค
	0		3	0.35 ± 0.02^{fg}	คอมแพค
เฉลี่ย				0.32	
	0	2, 4-D	1	3.03 ± 0.23^{a}	ฟรายเอเบิล
	0		2	2.80 ± 0.15^{ab}	ฟรายเอเบิล
	0		3	2.79 ± 0.25^{ab}	ฟรายเอเบิล
เฉลี่ย				2.87	
F-test				*	
C.V. (%)				30.15	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 8 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อลักษณะของแคลลัสที่พัฒนาในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 15 วัน (บาร์ = 1.5 ซม.)

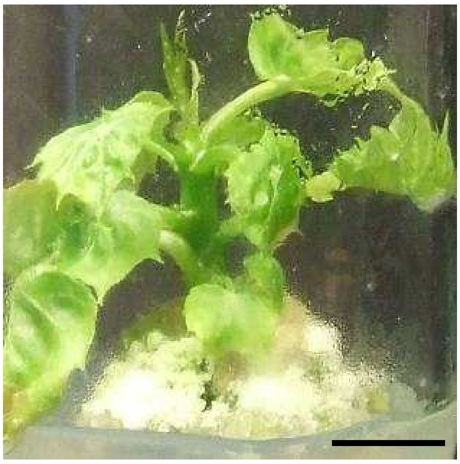
(ก) IBA TDZ 1 2 และ 3 มก./ล.

(ข) BA 1 2 และ 3 มก./ล.

(ค) 2, 4-D 1 2 และ 3 มก./ล.

1.4 ผลการชักนำการเกิดยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้น ปลายยอด ตาข้าง และแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1.5 เดือน สามารถชักนำให้เกิดการเจริญพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ประกอบด้วยปลายยอด ตาข้าง ใบจำนวนมาก ลักษณะใบ และลำต้นอวบ และเกิดแคลลัสเป็นก้อนแข็งสีขาวปนเขียวตรงบริเวณโคนต้น (ภาพที่ 9) จากนั้นตัดแยกชิ้นส่วนปลายยอด ตาข้าง ลำต้น และแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมเฉลี่ยมากที่สุด 5.3 ยอดต่อชิ้นส่วนตาข้าง เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้น และปลายยอดบนอาหารสูตรเดียวกัน พบว่าให้การสร้างยอดรวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่น ๆ พบว่า แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 5 และภาพที่ 10)



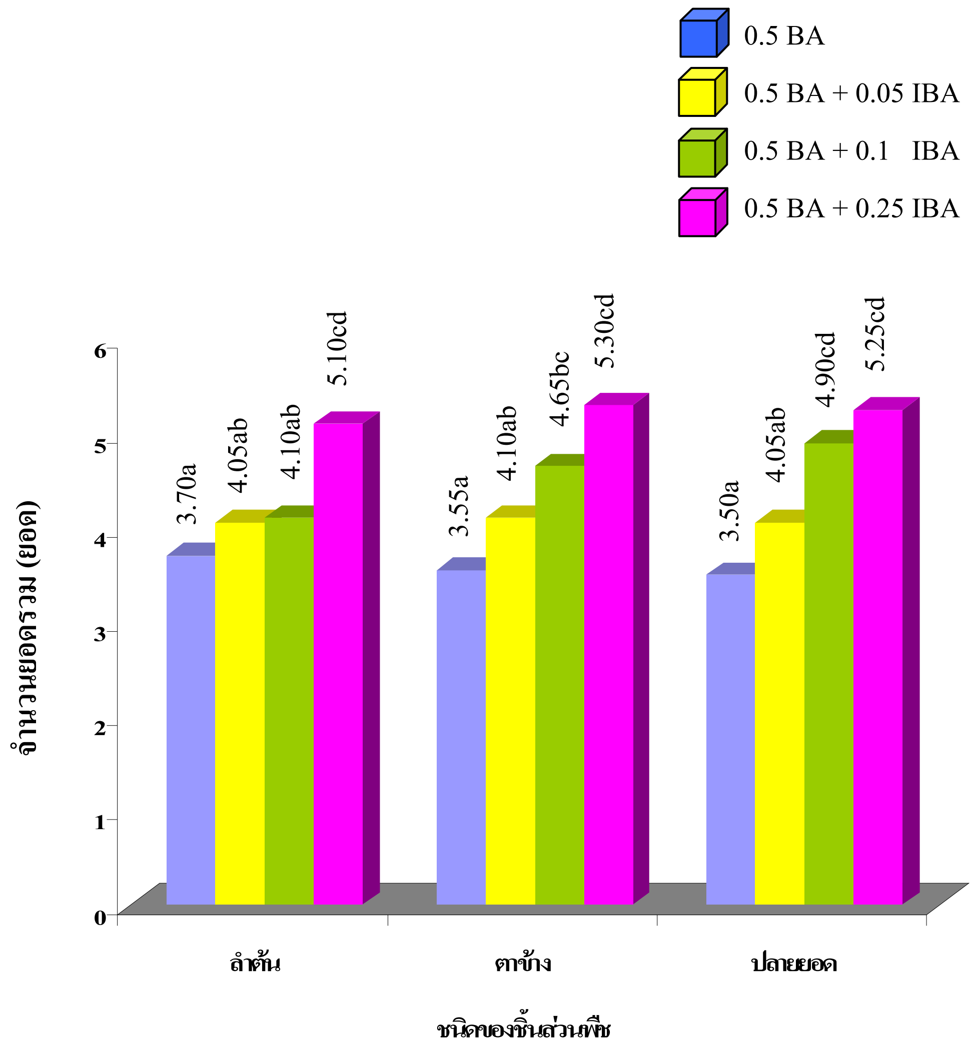
ภาพที่ 9 ต้นอ่อนสบู่ดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะ และนำไปเพิ่มจำนวน (บาร์ = 1.5 ซม.)

ตารางที่ 5 การชักนำการเกิดยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงลำต้น ตาข้าง และปลายยอด บนอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 1.5 เดือน

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)		การเกิดยอดรวม (ยอด)			เฉลี่ย
BA	IBA	ลำต้น	ตาข้าง	ปลายยอด	
0	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00
0.5	-	3.70±0.73[d]	3.55±0.75[d]	3.50±0.88[d]	3.58
0.5	0.05	4.05±0.68[cd]	4.10±0.71[cd]	4.05±0.88[cd]	4.06
0.5	0.1	4.10±0.64[cd]	4.65±1.08[cd]	4.90±0.91[ab]	4.55
0.5	0.25	5.10±1.33[ab]	5.30±1.12[ab]	5.25±0.91[ab]	5.21
เฉลี่ย		4.23	4.40	4.42	
F-test			*		
C.V. (%)			20.72		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 10 จำนวนยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้น ตาข้าง และปลายยอด บนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 1.5 เดือน

1.4.1 การชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงลำต้น

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ อาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดรวมเฉลี่ยมากที่สุด 5.1 ยอดต่อชิ้นส่วนลำต้น รองลงมาคือ อาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดรวมเฉลี่ย 4.1 ยอดต่อชิ้นส่วนลำต้น เมื่อเปรียบเทียบกันพบว่า แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 5 และภาพที่ 10) ลักษณะของยอด

รวมที่ได้มีการเจริญพัฒนาเป็นต้นใหญ่ขึ้น มีใบและตาข้างจำนวนมาก และเกิดแคลลัสตรงบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืช มีลักษณะเป็นก้อนแข็งสีขาวปนเขียว เซลล์เกาะตัวกันแน่น เป็นประเภทคอมแพค (ภาพที่ 11)

1.4.2 การชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงตาข้าง

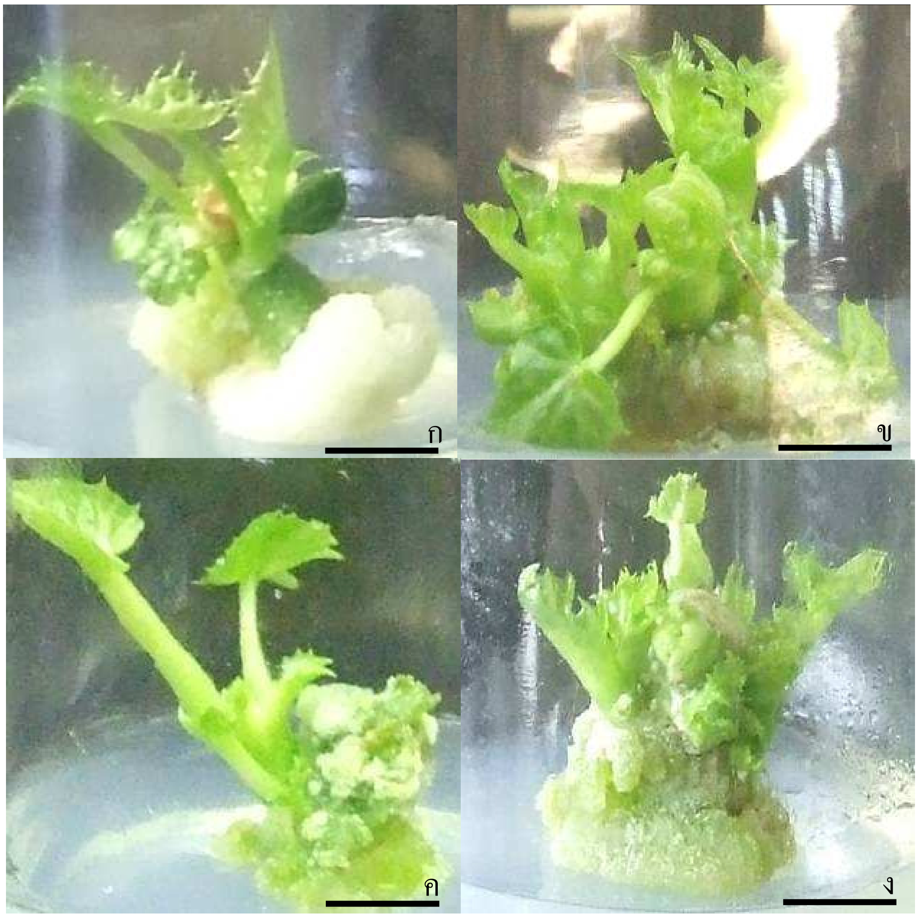
จากการตัดแยกชิ้นส่วนตาข้าง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า อาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดรวมเฉลี่ยมากที่สุด 5.3 ยอดต่อชิ้นส่วนตาข้าง รองลงมาคือ อาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดรวมเฉลี่ย 4.65 ยอดต่อชิ้นส่วนตาข้าง เมื่อเปรียบเทียบกัน พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 5 และภาพที่ 10) ลักษณะของยอดรวมที่ได้มีการเจริญพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ เกิดใบจำนวนมาก ตรงบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืช พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมขนาดเล็ก และเกิดแคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนแข็งสีขาวปนเขียว เซลล์เกาะตัวกันแน่น เป็นประเภทคอมแพค (ภาพที่ 12)

1.4.3 การชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงปลายยอด

จากการนำชิ้นส่วนปลายยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า อาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดรวมเฉลี่ยมากที่สุด 5.25 ยอดต่อชิ้นส่วนปลายยอด รองลงมาคือ อาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดรวมเฉลี่ย 4.9 ยอดต่อชิ้นส่วนปลายยอด เมื่อเปรียบเทียบกัน พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 5 และภาพที่ 10) ลักษณะชิ้นส่วนปลายยอดที่ได้ มีการเจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อน มีใบเกิดขึ้นจำนวนมาก และตรงบริเวณซอกใบเกิดตาข้างจำนวนมาก ตรงบริเวณรอยตัดเกิดแคลลัสมีสีขาวปนเขียว เป็นก้อนแข็ง สีขาวปนเขียว เกาะตัวกันแน่น เป็นประเภทคอมแพค (ภาพที่ 13)

1.4.4 การชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส

จากการตัดแยกแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ (ภาพที่ 14) แต่จำนวนแคลลัสที่สามารถชักนำให้เกิดยอดรวม พบว่า มีจำนวนน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอื่น ๆ



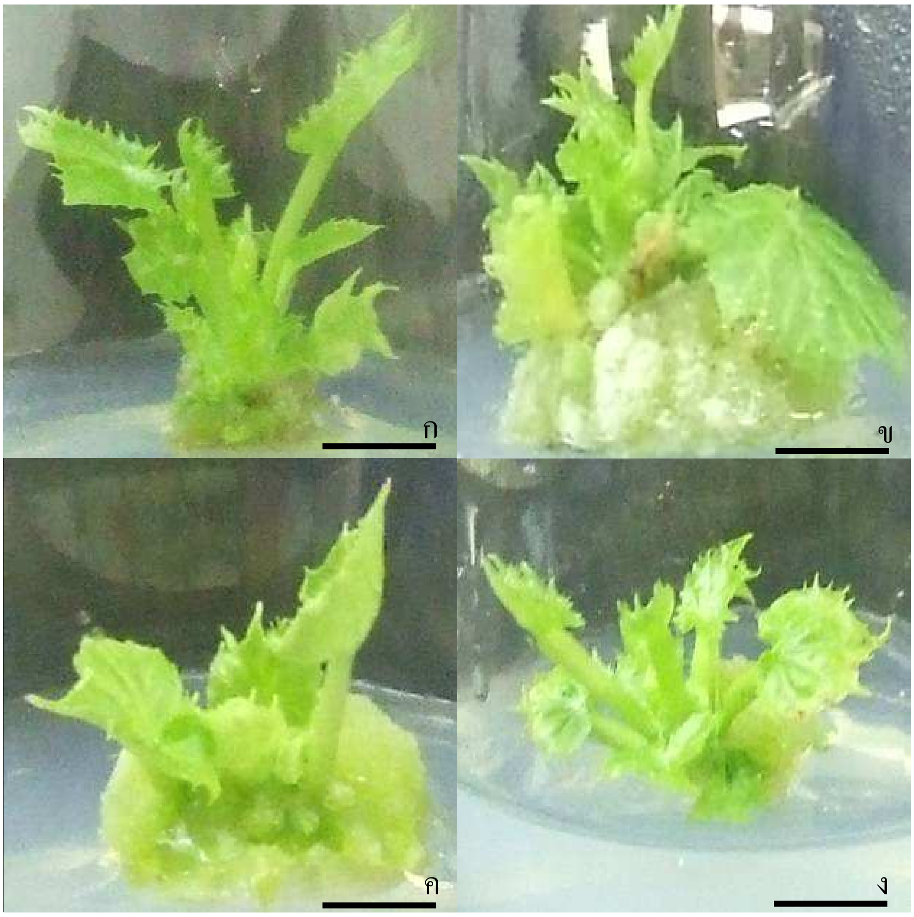
ภาพที่ 11 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำการเกิดยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้น นาน 1.5 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)

(ก) BA 0.5 มก./ล.

(ข) BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.05 มก./ล.

(ค) BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

(ง) BA 0.5 มก./ล.+ IBA 0.25 มก./ล.



ภาพที่ 12 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำการเกิดยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงตาข้าง นาน 1.5 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)

(ก) BA 0.5 มก./ล.

(ข) BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.05 มก./ล.

(ค) BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

(ง) BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.25 มก./ล.

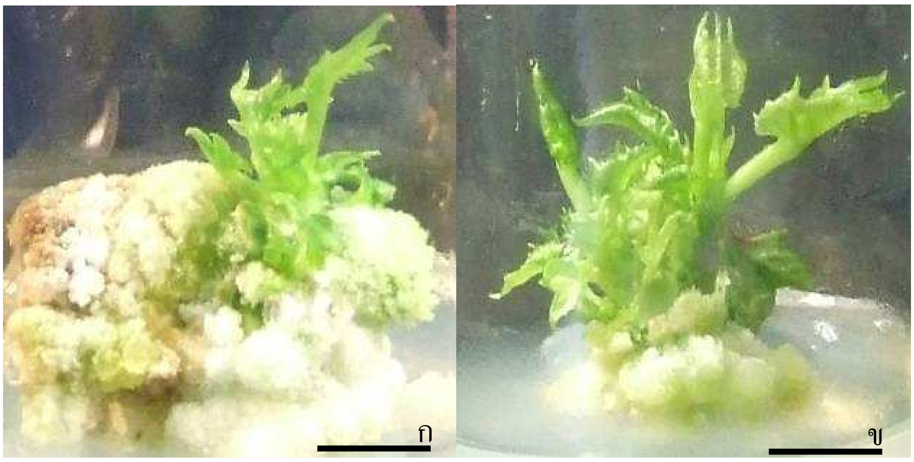
ภาพที่ 13 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำการเกิดยอดรวม จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด นาน 1.5 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)

(ก) BA 0.5 มก./ล.

(ข) BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.05 มก./ล.

(ค) BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

(ง) BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.25 มก./ล.



ภาพที่ 14 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำการเกิดยอดรวม จากแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยง นาน 1.5 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)

(ก-ข) เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.1 มก./ล.

1.5 ผลการชักนำการเกิดยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงและใต้ใบเลี้ยง

1.5.1 ผลการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

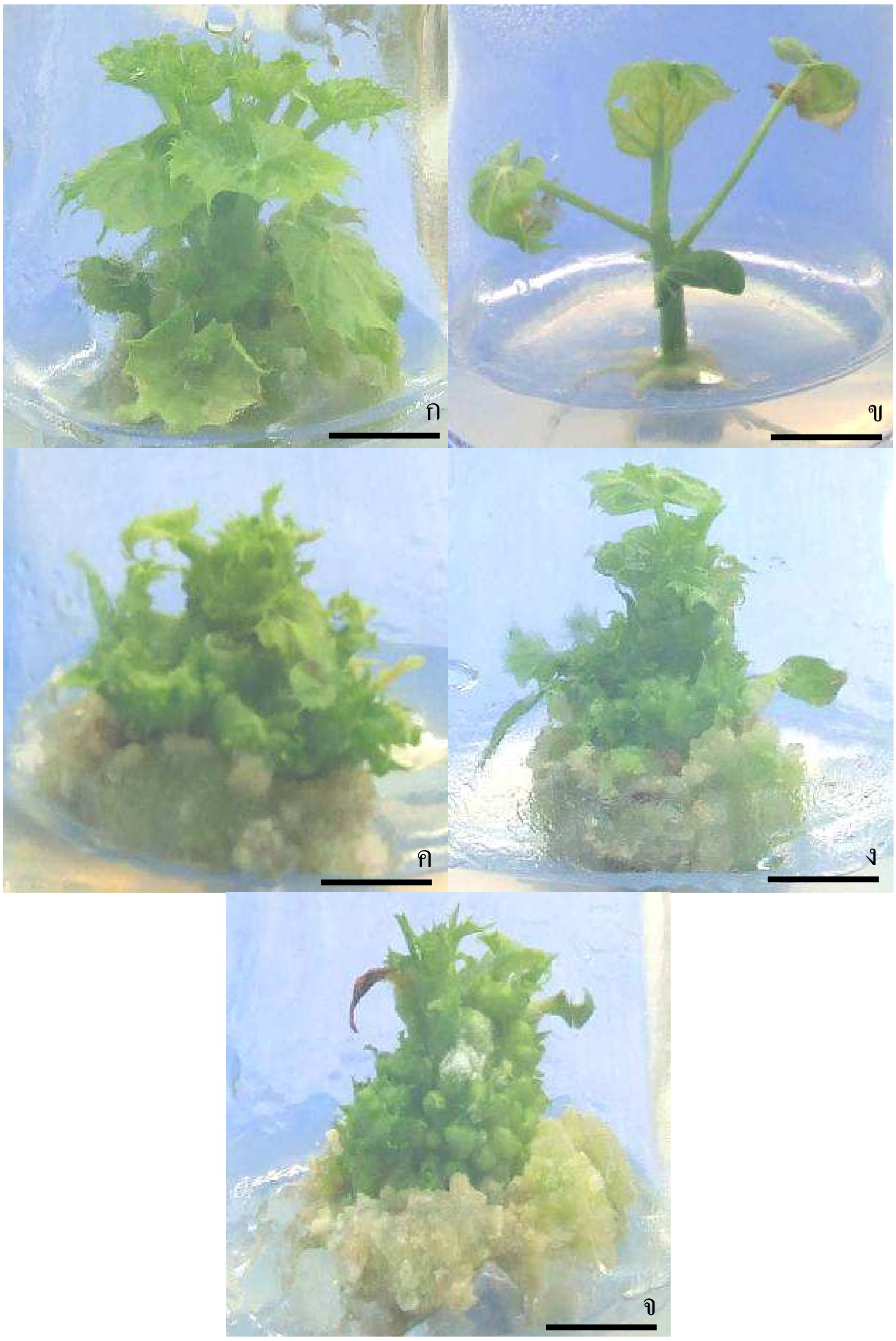
จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ยมากที่สุด 15 ยอดต่อชิ้นส่วน เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นอื่น ๆ พบว่า แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 6) จากการศึกษาลักษณะยอดรวม พบว่า อาหารเติม BA ร่วมกับ IBA ทุกความเข้มข้น ให้ยอดรวมมีขนาดใหญ่ มีใบจำนวนมาก ลำต้นอวบอ้วน มีการเจริญพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 15ก) สำหรับการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม KN ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ชักนำให้เกิดยอดรวมได้น้อยและไม่เกิดแคลลัส แต่ชักนำการเกิดรากได้ ลักษณะลำต้นยืดยาว (ภาพที่ 15ข) และจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม TDZ ร่วมกับ 2,4-D KN ร่วมกับ 2,4-D และ KN ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ ยอดมีขนาดเล็ก สั้น และเกิดแคลลัสตรงบริเวณรอยตัด มีสีขาวปนเขียว ลักษณะเป็นก้อนแข็ง เซลล์เกาะตัวกันแน่น เป็นประเภทคอมแพค (ภาพที่ 15ค-จ) เมื่อทำการย้ายเลี้ยงยอดรวมดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 10 วัน พบว่า ยอดรวมมีการเจริญพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 16) สำหรับอาหารเติม KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ทุกระดับความเข้มข้น พบว่า ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เกิดยอดรวมน้อย ลำต้นมีขนาดเล็ก เกิดรากจำนวน 2-3 ราก

ตารางที่ 6 ผลการชักนำการเกิดยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 2 เดือน

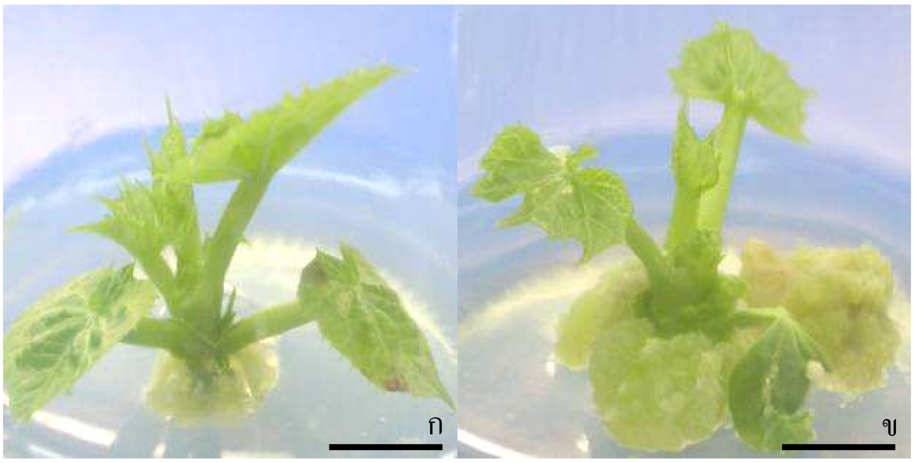
สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)				จำนวนยอดรวม (ยอด)	ลักษณะยอดรวม
กลุ่มควบคุม				1.00 ± 0.00^{e}	-
BA	0.5	IBA	0.05	3.86 ± 0.23^{de}	ยอดรวมมีลำต้นขนาดใหญ่ เจริญเป็นต้นสมบูรณ์
	0.5		0.1	4.29 ± 0.16^{de}	ยอดรวมมีลำต้นขนาดใหญ่ เจริญเป็นต้นสมบูรณ์
	0.5		0.25	5.19 ± 0.24^{de}	ยอดรวมมีลำต้นขนาดใหญ่ เจริญเป็นต้นสมบูรณ์
เฉลี่ย				4.44	
TDZ	0.5	2,4-D	0.05	3.61 ± 0.11^{cd}	ยอดรวมสั้น เกิดแคลลัสเป็นก้อนแข็งสีขาวปนเขียว
	0.5		0.1	2.80 ± 0.13^{d}	ยอดรวมสั้น เกิดแคลลัสเป็นก้อนแข็งสีขาวปนเขียว
	0.5		0.25	3.64 ± 0.15^{cd}	ยอดรวมสั้น เกิดแคลลัสเป็นก้อนแข็งสีขาวปนเขียว
เฉลี่ย				3.35	
KN	0.5	2,4-D	0.05	3.18 ± 0.21^{d}	ยอดรวมสั้น เกิดแคลลัสเป็นก้อนแข็งสีขาวปนเขียว
	0.5		0.1	2.45 ± 0.31^{de}	ยอดรวมสั้น เกิดแคลลัสเป็นก้อนแข็งสีขาวปนเขียว
	0.5		0.25	2.60 ± 0.30^{de}	ยอดรวมสั้น เกิดแคลลัสเป็นก้อนแข็งสีขาวปนเขียว
เฉลี่ย				2.74	
KN	0.5	TDZ	0.05	13.00 ± 1.14^{b}	ยอดรวมเล็ก เกิดแคลลัสเป็นก้อนแข็งสีขาวปนเขียว
	0.5		0.1	12.56 ± 1.08^{b}	ยอดรวมเล็ก เกิดแคลลัสเป็นก้อนแข็งสีขาวปนเขียว
	0.5		0.25	15.00 ± 1.40^{a}	ยอดรวมเล็ก เกิดแคลลัสเป็นก้อนแข็งสีขาวปนเขียว
เฉลี่ย				13.52	
KN	0.5	IBA	0.05	2.88 ± 0.12^{d}	เกิดยอดรวมน้อย ลำต้นเล็ก
	0.5		0.1	2.93 ± 0.18^{d}	เกิดยอดรวมน้อย ลำต้นเล็ก
	0.5		0.25	2.67 ± 0.12^{de}	เกิดยอดรวมน้อย ลำต้นเล็ก
เฉลี่ย				2.82	
F-test				*	
C.V. (%)				41.76	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 15 ลักษณะการเกิดยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 2 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.) (ก) BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.05 0.1 และ 0.25 มก./ล. (ข) KN 0.5 มก./ล. + IBA 0.05 0.1 และ 0.25 มก./ล. (ค) TDZ 0.5 มก./ล. + 2,4-D 0.05 0.1 และ 0.25 มก./ล. (ง) KN 0.5 มก./ล. + 2,4-D 0.05 0.1 และ 0.25 มก./ล. (จ) KN 0.5 มก./ล. + TDZ 0.05 0.1 และ 0.25 มก./ล.



ภาพที่ 16 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.25 มก./ล. นาน 10 วัน (บาร์ = 1.5 ซม.)
(ก) การพัฒนาของปลายยอด
(ข) การสร้างแคลลัสบริเวณรอยตัด

1.5.2 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง

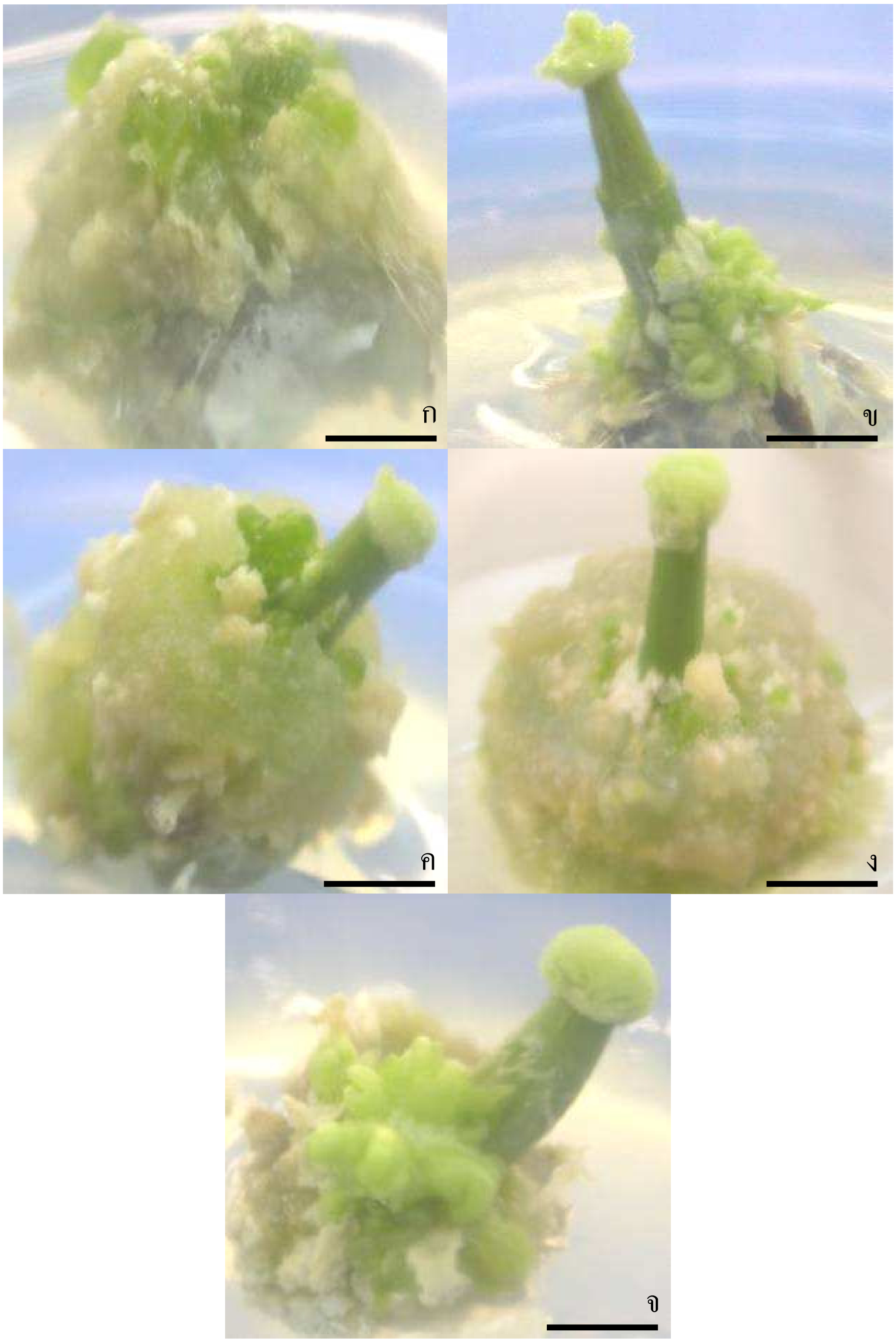
จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 2 เดือน พบว่า ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ยมากที่สุด 22.76 ยอดต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นอื่น ๆ พบว่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 7) จากการศึกษาลักษณะยอดรวม พบว่า ยอดมีขนาดเล็ก สั้น ลักษณะโค้งงอ จากการศึกษาพบว่า ทุกชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ มีลักษณะเป็นก้อนแข็ง สีขาวปนเขียว เซลล์เกาะตัวกันแน่น เป็นประเภทคอมแพค (ภาพที่ 17) เมื่อนำยอดที่ได้มาย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนยอดมีการเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ช้า ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตนาน และเกิดแคลลัสรอบ ๆ ชิ้นส่วนพืช เป็นก้อนแข็งสีขาว (ภาพที่ 18)

ตารางที่ 7 ผลการชักนำการเกิดยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 2 เดือน

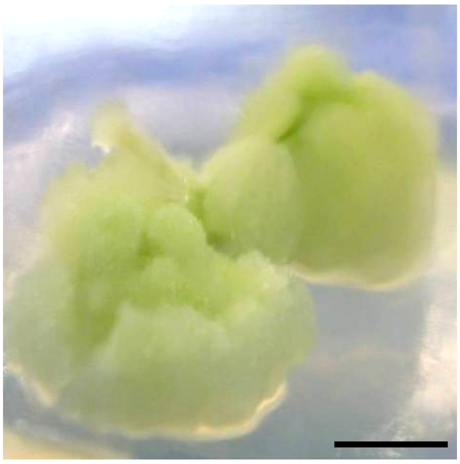
สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)				จำนวนยอดรวม (ยอด)	ลักษณะยอดรวม
กลุ่มควบคุม				1.00±0.00[g]	ไม่เกิดยอดรวม
BA	0.5	IBA	0.05	5.76±0.53[ef]	ยอดเล็กสั้น สีเขียวใส
	0.5		0.1	5.64±0.37[ef]	ยอดเล็กสั้น สีเขียวใส
	0.5		0.25	5.5±0.39[ef]	ยอดเล็กสั้น สีเขียวใส
เฉลี่ย				5.63	
KN	0.5	TDZ	0.05	7.73±0.39[d]	ยอดเล็กสั้น สีเขียวใส
	0.5		0.1	6.53±0.31[de]	ยอดเล็กสั้น สีเขียวใส
	0.5		0.25	6.42±0.40[def]	ยอดเล็กสั้น สีเขียวใส
เฉลี่ย				6.89	
KN	0.5	2,4-D	0.05	5.91±0.22[def]	ยอดเล็กสั้น สีเขียวใส
	0.5		0.1	4.6±0.28[ef]	ยอดเล็กสั้น สีเขียวใส
	0.5		0.25	4.5±0.38[f]	ยอดเล็กสั้น สีเขียวใส
เฉลี่ย				5.00	
KN	0.5	IBA	0.05	13.13±0.65[b]	ยอดเล็กสั้นโค้งงอ สีเขียวเข้ม
	0.5		0.1	8.64±0.60[c]	ยอดเล็กสั้นโค้งงอ สีเขียวเข้ม
	0.5		0.25	22.76±1.27[a]	ยอดเล็กสั้นโค้งงอ สีเขียวเข้ม
เฉลี่ย				14.84	
TDZ	0.5	2,4-D	0.05	12.33±0.65[b]	ยอดเล็กสั้นโค้งงอ สีเขียวเข้ม
	0.5		0.1	9.12±0.70[c]	ยอดเล็กสั้นโค้งงอ สีเขียวเข้ม
	0.5		0.25	21.47±1.09[a]	ยอดเล็กสั้นโค้งงอ สีเขียวเข้ม
เฉลี่ย				14.30	
F-test				*	
C.V. (%)				26.51	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



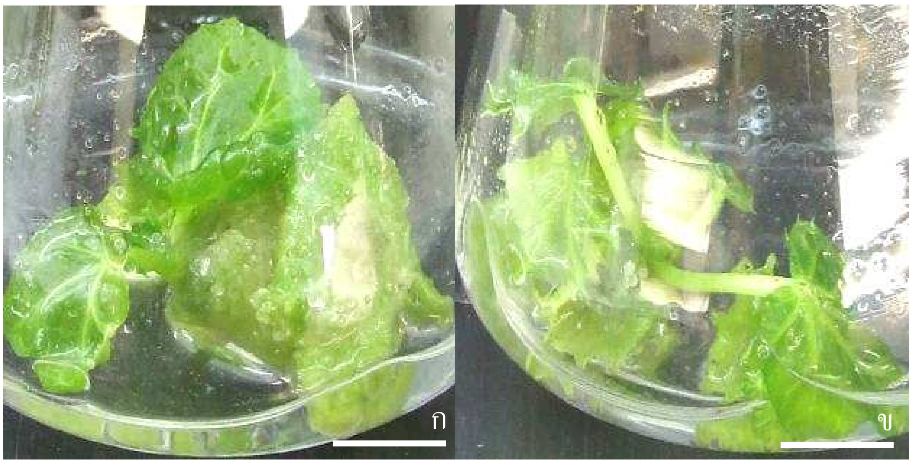
ภาพที่ 17 ลักษณะแคลลัสและตาข้างจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 2 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.) (ก) BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.05 0.1 และ 0.25 มก./ล. (ข) KN 0.5 มก./ล. + IBA 0.05 0.1 และ 0.25 มก./ล. (ค) TDZ 0.5 มก./ล. + 2,4-D 0.05 0.1 และ 0.25 มก./ล. (ง) KN 0.5 มก./ล. + 2,4-D 0.05 0.1 และ 0.25 มก./ล. (จ) KN 0.5 มก./ล. + TDZ 0.05 0.1 และ 0.25 มก./ล.



ภาพที่ 18 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.25 มก./ล. นาน 10 วัน (บาร์ = 1.5 ซม.)

1.6 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารเหลว

จากการนำปลายยอดไปวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 เดือน พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ปริมาณน้อย ลักษณะใบและก้านใบอวบมีขนาดใหญ่สีเขียวใสและเปราะหักง่าย เกิดแคลลัสเป็นก้อนแข็งเกาะตัวกันแน่นตรงบริเวณรอยตัด (ภาพที่ 19) แต่ปริมาณแคลลัสเกิดน้อยกว่าที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งและระยะเวลาการชักนำการเกิดยอดใหม่และการเจริญเป็นต้นจะใช้เวลานานกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง



ภาพที่ 19 ผลของ BA ต่อการชักนำการเกิดยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารเหลว นาน 1 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.) (ก) เข้มข้น 0.1 มก./ล. (ข) เข้มข้น 0.5 มก./ล.

1.7 การชักนำราก

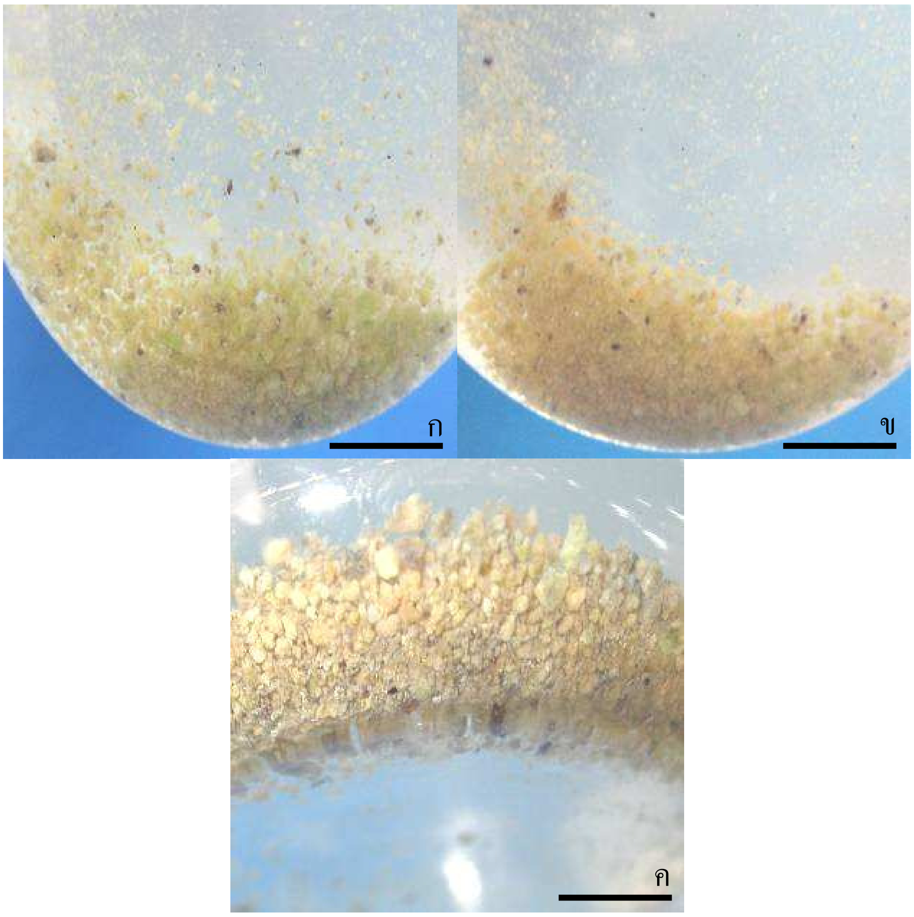
จากการนำยอดอ่อนที่ได้มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 เดือน พบว่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ลักษณะรากสีขาว มีขนาดใหญ่ และมีรากแขนงแตกออกมาจำนวนมาก (ภาพที่ 20)

ภาพที่ 20 การชักนำรากจากการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 0.5 มก./ล. นาน 1 เดือน (บาร์ = 1.0 ซม.)

1.8 การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารอาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อวางเลี้ยง นาน 1 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้บริเวณรอยตัด มีสีเหลืองอ่อน ลักษณะอ่อนนุ่มร่วน และหลุดง่าย เป็นประเภทฟรายเอเบิล เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำการย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์ ด้วยปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น 1 2 และ 3 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง บันทึกผลการทดลอง พบว่า เซลล์ปริมาตร 2 และ 3 มิลลิลิตร มีการเจริญพัฒนาเป็นก้อนแข็ง เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียวอ่อน เซลล์มีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่จะหยุดการเจริญเติบโต และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สำหรับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น 1 มิลลิลิตร มีการเจริญเติบโตช้า เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ปนเขียวอ่อน และมีการเจริญได้นานกว่าปริมาตร 2 และ 3 มิลลิลิตร (ภาพที่ 21

ก-ข) สำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.05   0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีสีเหลืองปนน้ำตาล อ่อนนุ่ม และหลุดร่วนง่าย เป็นประเภทฟรายเอเบิล เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำการย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2   สัปดาห์ จำนวน 2 ครั้ง พบว่า แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน มีการเพิ่มปริมาณ และการเจริญเติบโตช้า และไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ (ภาพที่ 21ค)



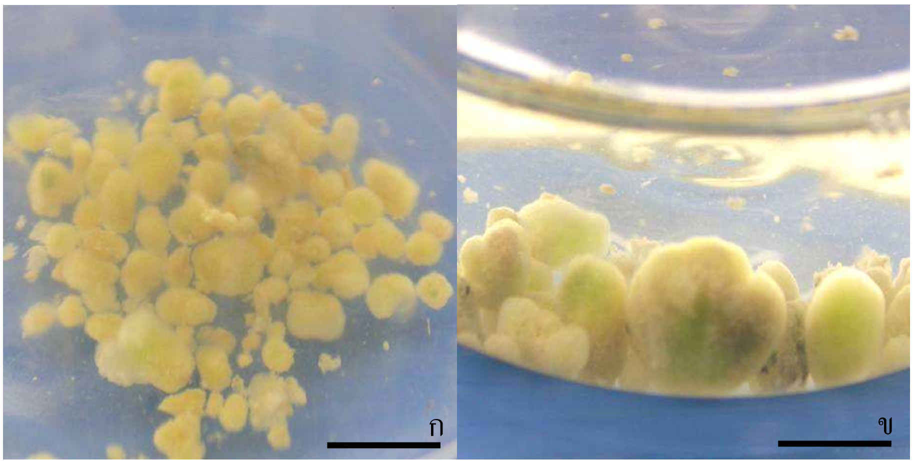
ภาพที่ 21 การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 1 เดือน แคลลัสได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ   (บาร์ = 1.5 ซม.)

(ก) TDZ 0.5 มก./ล. + 2,4-D 0.05 0.1 และ 0.2 มก./ล.

(ข) 2,4-D 1 และ 2 มก./ล.

(ค) KN 0.5 มก./ล. + 2,4-D 0.05   0.1 และ 0.25 มก./ล.

เมื่อทำการย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นที่ได้จากอาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อไปอีกในอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตจำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 2 สัปดาห์ พบว่า เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลือง ปนเขียวอ่อน และพัฒนาเป็นก้อนกลม สีเขียวมีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 22ก-ข) อย่างไรก็ตามไม่มีการพัฒนาให้พืชต้นใหม่



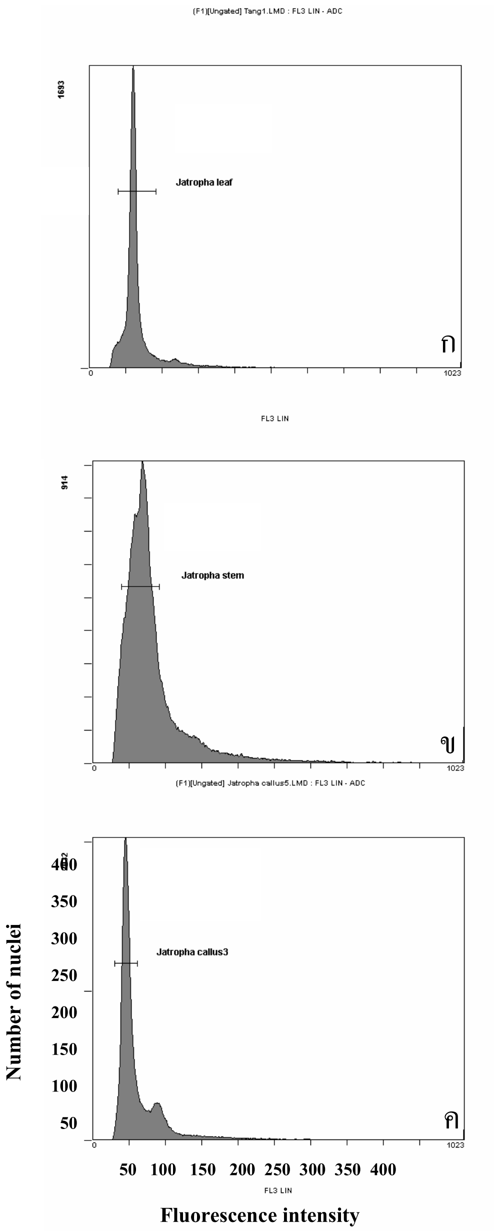
ภาพที่ 22 การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 1 เดือน (บาร์ = 1.5 ซม.)

(ก) เซลล์ซัสเพนชั่นเพาะเลี้ยง นาน 2 สัปดาห์

(ข) เซลล์ซัสเพนชั่นเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลารวม 4 สัปดาห์

2. ผลการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอโดยโฟลไซโทเมทรี

จากการนำชิ้นส่วนใบ ลำต้น และแคลลัส ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ มาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยโฟลไซโทเมทรี พบว่า พืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีปริมาณดีเอ็นเอไม่เปลี่ยนแปลง เป็น 2C หรือดิพลอยด์ (2n = 2x = 22) แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณดีเอ็นเอ ภาพที่ 23



ภาพที่ 23 ปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบ (ก) ลำต้น (ข) และ แคลลัส(ค) จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ

3. ผลของสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

3.1 ผลของสารต่ออัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนยอด

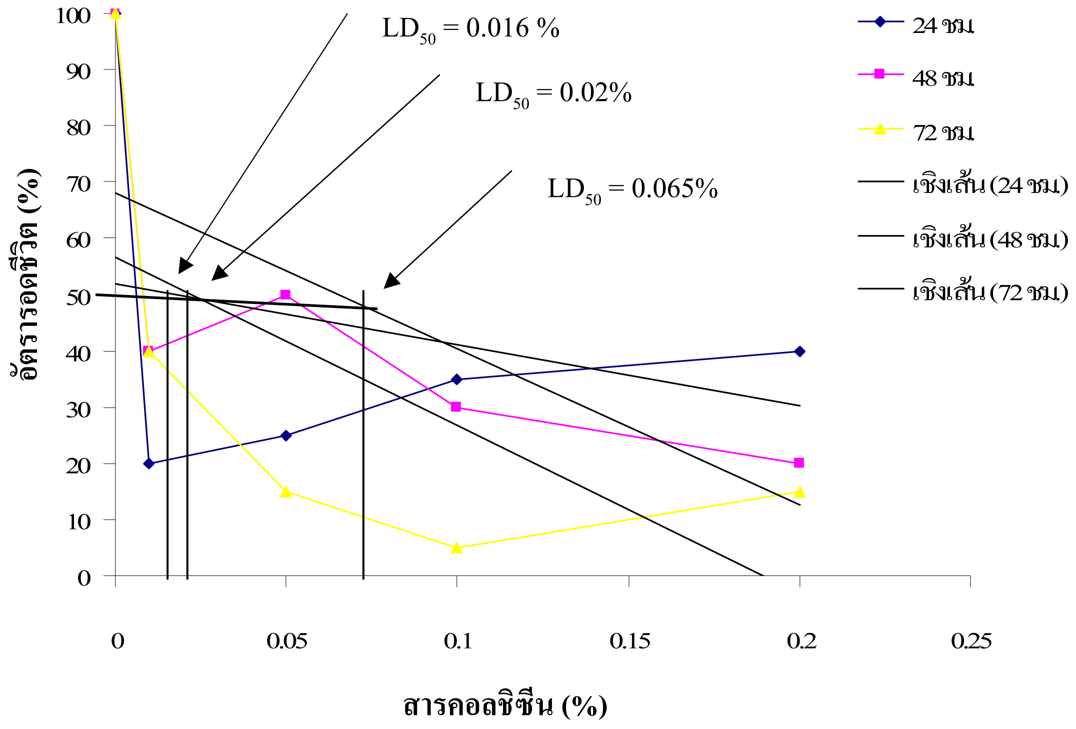
ผลของความเข้มข้นของสารละลายคอลชิซีน หรือออรีซาลิน ต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนยอดสบู่ดำในหลอดทดลอง หลังจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดสบู่ดำในอาหารเหลวร่วมกับสารคอลชิซีนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อทำการย้ายเลี้ยงไปบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มขน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 วัน พบว่า ชิ้นส่วนยอดที่ได้รับสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.01 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง มีอัตรารอดชีวิต 20 25 35 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการทรีตที่ความเข้มข้นเดียวกัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีอัตรารอดชีวิต 40 50 30 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อใช้เวลานานขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง มีอัตรารอดชีวิต 40 15 5 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 8) เมื่อวิเคราะห์ค่า LD_{50} ในแต่ละระยะเวลาและความเข้มข้น พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายคอลชิซีน 0.016 0.065 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลานาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ให้ค่าดังกล่าว (ภาพที่ 24)

สำหรับชิ้นส่วนยอดที่ได้รับสารละลายออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้น 0.005 0.01 0.025 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง มีอัตรารอดชีวิต 65 30 30 40 25 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการทรีตนาน 48 ชั่วโมง มีอัตรารอดชีวิต 55 10 35 35 15 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อใช้เวลานานขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง มีอัตรารอดชีวิต 50 15 30 50 20 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 8) เมื่อวิเคราะห์ค่า LD_{50} ในแต่ละระยะเวลาและความเข้มข้น พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายออรีซาลิน 0.031 0.003 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลานาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ให้ค่าดังกล่าว (ภาพที่ 25)

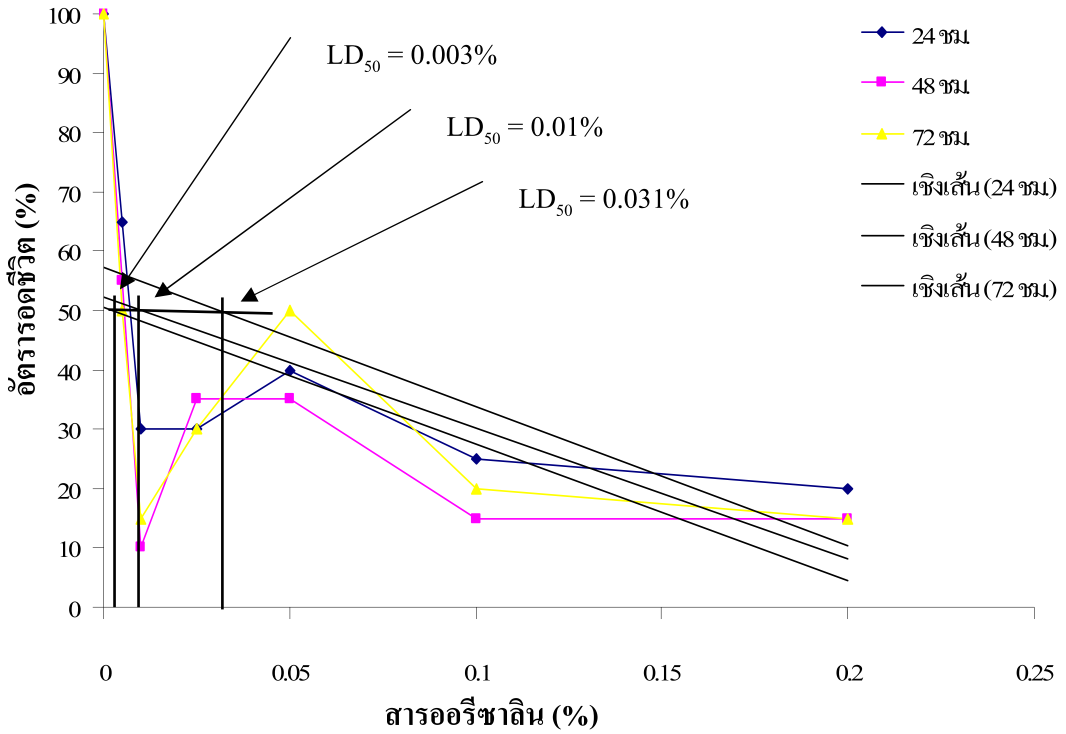
ตาราง 8 ผลของสารละลายคอลชิซีนหรือออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการรอดชีวิตหลังจากย้ายเลี้ยง นาน 30 วัน

ชิ้นส่วนพืช	กลุ่มทดลอง			จำนวนยอดที่วางเลี้ยง	อัตรารอดชีวิต วันที่ 30 (%)	จำนวนต้นที่คาดว่าเป็นพอลิพลอยด์
	สารเคมี	ระดับความเข้มข้น (%)	ระยะเวลา (ชม.)			
ยอด	คอลชิซีน	0	0	20	80	-
		0.01	24	20	20	-
			48	20	40	-
			72	20	40	2
		0.05	24	20	25	2
			48	20	50	-
			72	20	15	2
		0.1	24	20	35	1
			48	20	30	1
			72	20	5	2
		0.2	24	20	40	2
			48	20	20	-
			72	20	15	2
รวม				240	27.9±12.8	14 (5.83%)
ยอด	ออรีซาลิน	0.005	24	20	65	-
			48	20	55	-
			72	20	50	-
		0.01	24	20	30	1
			48	20	10	-
			72	20	15	-
		0.025	24	20	30	-
			48	20	35	-
			72	20	30	-
		0.05	24	20	40	-
			48	20	35	-
			72	20	50	-
		0.1	24	20	25	-
			48	20	15	-

		72	20	20	2
	0.2	24	20	20	-
		48	20	15	3
		72	20	15	3
รวม			360	30.8±15.5	11 (3.05%)



ภาพที่ 24 อัตราการรอดชีวิตจากการได้รับสารละลายคอลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มก./ล. นาน 30 วัน



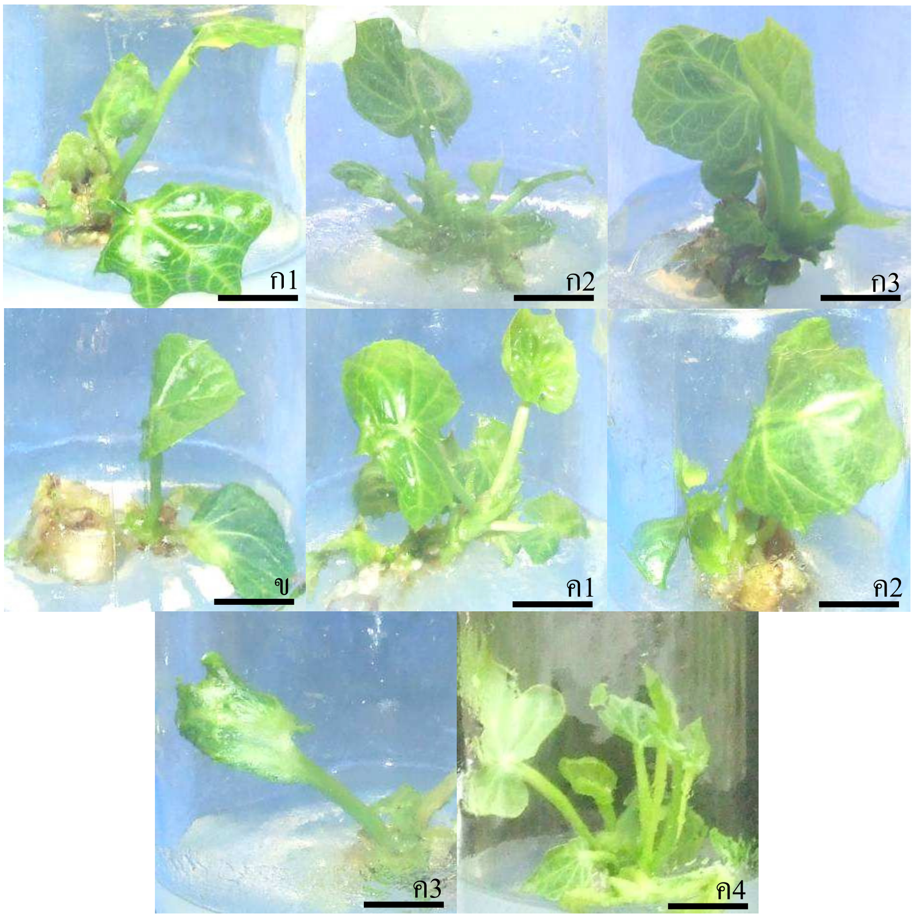
ภาพที่ 25 อัตราการรอดชีวิตจากการได้รับสารละลายออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มก./ล. นาน 30 วัน

3.2 ผลของสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ใบ

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดในอาหารเหลวเติมสารละลายคอลชิซีน หรือออรีซาลินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ จากนั้นทำการย้ายเลี้ยงมาบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วัน และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า สารคอลชิซีนที่ความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง และความเข้มข้น 0.01 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ใบมีขนาดใหญ่ หนา และหยิกงอ สีเขียวเข้ม ผิวใบขรุขระไม่เรียบ ขอบใบหยัก บิดเบี้ยวเสียรูปร่าง ก้านใบอวบอ้วน เกิดแคลลัสเป็นก้อนแข็งสีเหลือง ปนขาวตรงบริเวณรอยตัด การเจริญเติบโตเป็นต้นช้ากว่าปกติ

และเป็นลักษณะต้นที่คาดว่าเป็นพอลิพลอยด์ (ภาพที่ 26) รวมจำนวนทั้งหมด 14 ต้น คิดเป็น 5.83 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)



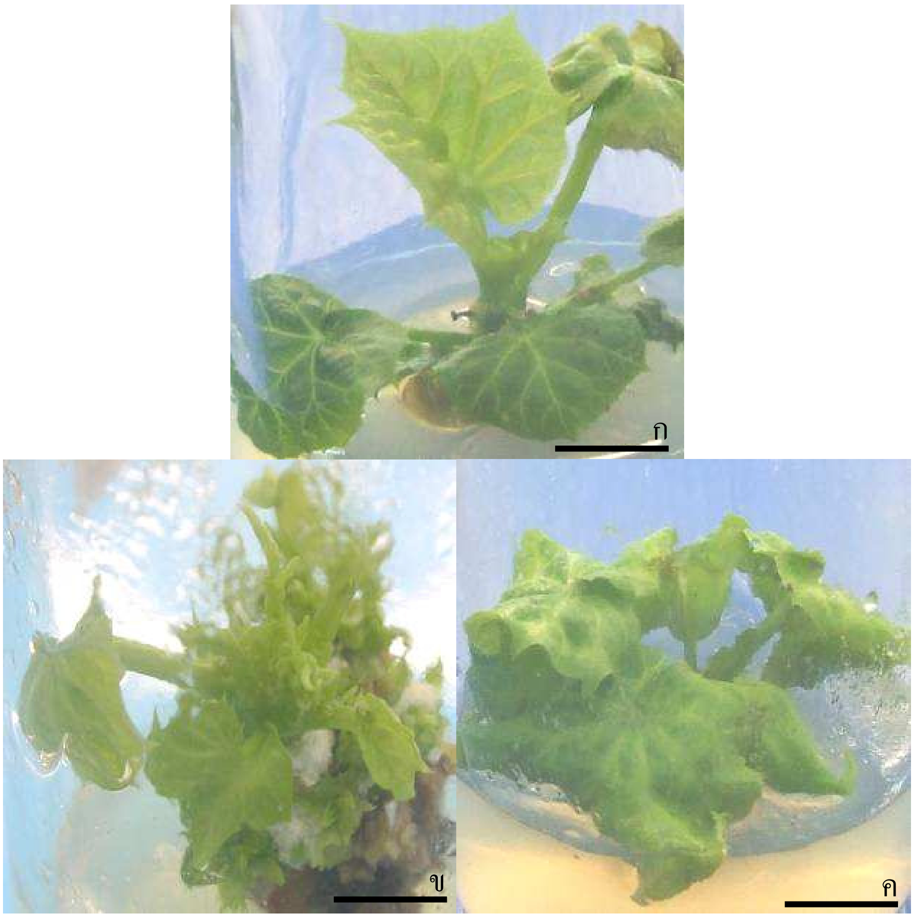
ภาพที่ 26 ลักษณะชิ้นส่วนยอดที่ได้รับสารละลายคอลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ (บาร์ = 1.0 ซม.)

(ก1-3) ความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2 % นาน 24 ชม. ตามลำดับ

(ข) ความเข้มข้น 0.01 % นาน 48 ชม.

(ค1-4) ความเข้มข้น 0.01 0.05 0.1 และ 0.2 % นาน 72 ชม. ตามลำดับ

สำหรับสารออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง พบว่ามีลักษณะใบใหญ่ หนา สีเขียวเข้ม ใบม้วนและโค้งงอ ผิวใบไม่เรียบ มีการเจริญเติบโตช้า ใบหยิกงอและมีขนาดเล็ก แต่สามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ สำหรับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เกิดยอดรวมขนาดเล็กจำนวนมาก (ภาพที่ 27) รวมจำนวนทั้งหมด 9 ต้น คิดเป็น 3.05 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9)



ภาพที่ 27 ชิ้นส่วนยอดที่ได้รับสารละลายออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ (บาร์ = 1.5 ซม.)

(ก) ความเข้มข้น 0.01 % นาน 24 ชม.

(ข-ค) ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 % นาน 72 ชม.

การเกิดยอดรวม

ผลการศึกษาอัตราการสร้างยอดรวมของชิ้นส่วนยอดที่รอดชีวิตหลังจากทรีตด้วยสารคอลชิซีน และทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 วัน พบว่า สารละลายคอลชิซีนความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมเฉลี่ยมากที่สุด 11 ยอดรวมต่อชิ้นส่วนยอด รองลงมาที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ให้ยอดรวมเฉลี่ย 10.25 ยอดรวมต่อชิ้นส่วนยอด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นและระยะเวลาอื่น ๆ สำหรับที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง พบว่า ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ ชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย (ตารางที่ 9)

สำหรับอัตราการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดที่ได้รับสารละลายออรีซาลิน และทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 วัน พบว่า ความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมเฉลี่ยมากที่สุด 9.90 ยอด รองลงมาที่ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 เปอร์เซ็นต์ ให้ยอดรวมเฉลี่ย 8 ยอด สำหรับที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง เข้มข้น 0.01 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง และเข้มข้น 0.025 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง พบว่า ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ และเน่าตายเช่นกัน (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 อัตราการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ IBA หลังจากได้รับสารคอลชิซีนที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 30 วัน

สารละลายคอลชิซีน		จำนวนยอดรวม
เวลา (ชม.)	**ความเข้มข้น (%)**	
0	ชุดควบคุม	5.15 ± 0.24^{de}
24	0.01	10.25 ± 1.70^{ab}
	0.05	11.00 ± 1.51^{a}
	0.1	9.00 ± 1.13^{abc}
	0.2	5.75 ± 0.79^{cde}
	เฉลี่ย	9.00
48	0.01	5.66 ± 0.66^{cde}
	0.05	5.75 ± 1.37^{cde}
	0.1	3.83 ± 0.40^{e}
	0.2	5.00 ± 1.68^{de}
	เฉลี่ย	5.06
72	0.01	7.77 ± 0.33^{bcd}
	0.05	5.66 ± 1.52^{cde}
	0.1	0.00 ± 0.00
	0.2	5.66 ± 2.08^{cde}
	เฉลี่ย	6.36
F-test		*
C.V. (%)		34.03

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

ตารางที่ 10 อัตราการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ IBA หลังจากได้รับสารออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 30 วัน

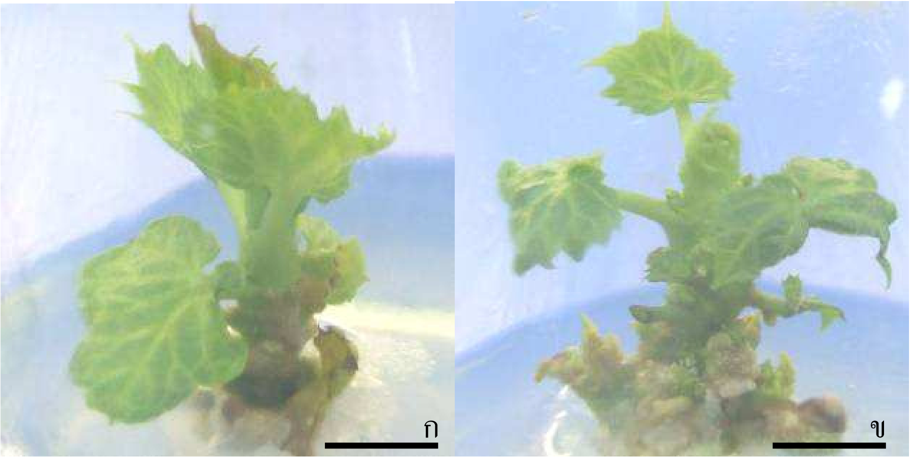
สารละลายออรีซาลิน		**จำนวนยอดรวม**
เวลา (ชม.)	**ความเข้มข้น (%)**	
0	ชุดควบคุม	5.18 ± 0.24^{d}
24	0.005	9.90 ± 1.58^{ab}
	0.01	6.20 ± 1.24^{cd}
	0.025	8.00 ± 1.36^{cd}
	0.05	7.00 ± 1.21^{cd}
	0.1	0.00 ± 0.00
	0.2	0.00 ± 0.00
	เฉลี่ย	7.77
48	0.005	5.88 ± 0.58^{d}
	0.01	0.00 ± 0.00
	0.025	6.25 ± 0.47^{cd}
	0.05	5.83 ± 1.53^{d}
	0.1	0.00 ± 0.00
	0.2	0.00 ± 0.00
	เฉลี่ย	5.98
72	0.005	5.37 ± 0.70^{d}
	0.01	6.66 ± 0.33^{cd}
	0.025	0.00 ± 0.00
	0.05	6.12 ± 0.93^{cd}
	0.1	5.85 ± 1.2^{d}
	0.2	0.00 ± 0.00
	เฉลี่ย	6.00
F-test		*
C.V. (%)		32.84

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

จำนวนใบต่อชิ้นส่วนยอดรวม

จากการนับจำนวนใบต่อชิ้นส่วนยอดรวมที่ได้รับสารละลายคอลชิซีนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง ให้จำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด 5.25 ใบต่อชิ้นส่วนยอด และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้น และระยะเวลาอื่น ๆ (ตารางที่ 11) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมมีจำนวนใบน้อยกว่า 3-4 เท่า จากการศึกษาลักษณะใบ พบว่า มีขนาดเล็ก ลักษณะหนา บิดเบี้ยวเสียรูปร่าง มีการเจริญเติบโตช้า (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 ลักษณะใบ (ก) และยอด (ข) สบู่ดำที่ได้รับสารคอลชิซีนเมื่อย้ายเลี้ยง นาน 30 วัน (บาร์ = 1.5 ซม.)

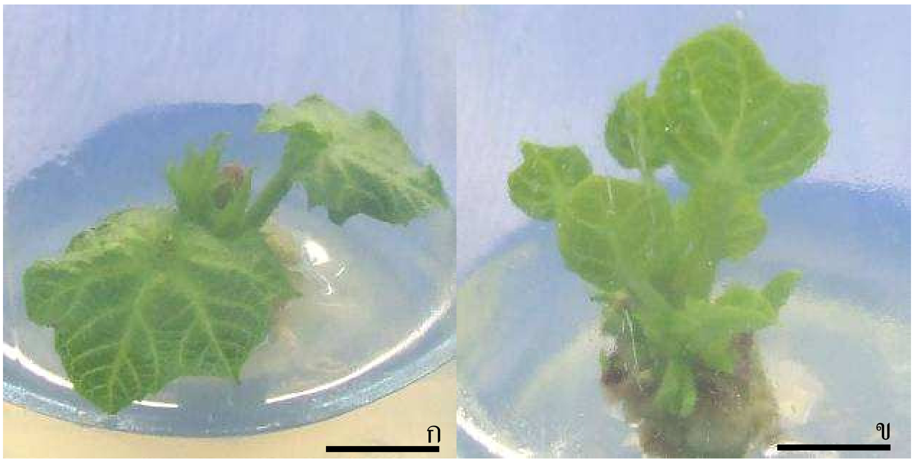
ตารางที่ 11 จำนวนใบจากชิ้นส่วนยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดที่ได้รับสารละลายคอลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 30 วัน

สารละลายคอลชิซีน		**จำนวนใบ**
เวลา (ชม.)	**ความเข้มข้น (%)**	
0	ชุดควบคุม	16.55 ± 0.55[a]
24	0.01	3.50 ± 0.64[b]
	0.05	5.00 ± 0.94[b]
	0.1	4.16 ± 0.87[b]
	0.2	4.00 ± 0.36[b]
	เฉลี่ย	4.16
48	0.01	3.66 ± 0.66[b]
	0.05	5.00 ± 2.00[b]
	0.1	4.20 ± 1.24[b]
	0.2	2.25 ± 0.25[b]
	เฉลี่ย	3.77
72	0.01	4.66 ± 1.66[b]
	0.05	5.25 ± 2.87[b]
	0.1	0.00 ± 0.00
	0.2	4.00 ± 0.57[b]
	เฉลี่ย	4.63
F-test		*
C.V. (%)		28.19

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

จากการนับจำนวนใบจากชิ้นส่วนยอดรวมที่ได้รับสารละลายออรีซาลินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง ให้จำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด 13.00 ใบต่อชิ้นส่วนยอด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้น และระยะเวลาอื่น ๆ (ตารางที่ 12) อย่างไรก็ตาม จำนวนใบเฉลี่ยน้อยกว่าชุดควบคุม 3-4 เท่า เช่นกัน จากการศึกษาลักษณะใบ พบว่า มีขนาดเล็ก ลักษณะหนา บิดเบี้ยวเสียรูปร่าง มีการเจริญเติบโตช้าเช่นกัน (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 ลักษณะใบ (ก) และยอด (ข) สบู่ดำที่ได้รับสารออรีซาลินเมื่อย้ายเลี้ยง นาน 30 วัน (บาร์ = 1.5 ซม.)

ตารางที่ 12 จำนวนใบจากชิ้นส่วนยอดรวม จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดที่ได้รับสารละลายออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 30 วัน

สารละลายออรีซาลิน		จำนวนใบ
เวลา (ชม.)	ความเข้มข้น (%)	
0	ชุดควบคุม	16.55 ± 0.55[a]
24	0.005	5.81 ± 1.00[cd]
	0.01	2.80 ± 0.37[de]
	0.025	4.00 ± 0.73[cde]
	0.05	4.57 ± 0.64[cde]
	0.1	0.00 ± 0.00
	0.2	0.00 ± 0.00
	เฉลี่ย	4.29
48	0.005	5.44 ± 0.78[cde]
	0.025	6.00 ± 1.29[c]
	0.05	3.33 ± 0.02[cde]
	0.1	0.00 ± 0.00
	0.2	0.00 ± 0.00
	เฉลี่ย	4.92
72	0.005	5.00 ± 1.26[cde]
	0.01	2.33 ± 0.33[e]
	0.05	4.25 ± 0.70[cde]
	0.1	13.00 ± 0.78[b]
	0.2	0.00 ± 0.00
	เฉลี่ย	6.14
F-test		*
C.V. (%)		31.11

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

ลักษณะราก

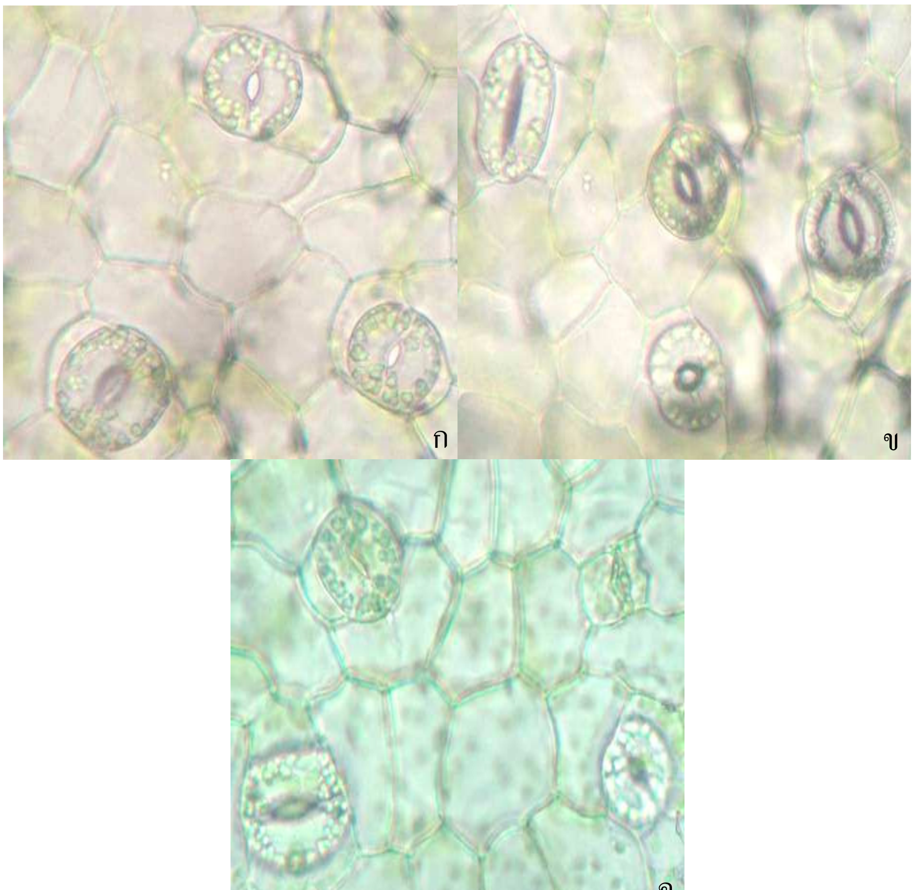
เมื่อย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนยอดเพื่อชักนำรากบนอาหารเติม IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ลักษณะรากสีขาวขุ่น มีขนาดเล็ก สั้น เกิดรากแขนงน้อย และระยะเวลาในการเกิดรากช้ากว่าปกติ (ภาพที่ 30)

ภาพที่ 30 ลักษณะรากที่ได้รับสารคอลชิซีน (ก) หรือออรีซาลิน (ข) (บาร์ = 1.5 ซม.)

3.3 ผลของสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินต่อลักษณะทางสรีรวิทยา

ลักษณะเซลล์ปากใบ

จากการศึกษาลักษณะของเซลล์ปากใบ จากใบในชุดควบคุม (ภาพที่ 31ก) ชุดที่ได้รับสารคอลชิซีนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง จำนวน 5 ใบ และสารออรีซาลินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง จำนวน 5 ใบ พบว่า เซลล์ปากใบมีลักษณะบิดเบี้ยวเสียรูปร่าง และมีขนาดไม่สม่ำเสมอกัน (ภาพที่ 31ข-ค)



ภาพที่ 31 ลักษณะเซลล์ปากใบชุดควบคุม ชุดที่ได้รับสารคอลชิซีน และออรีซาลิน

(ก) ชุดควบคุม

(ข) สารคอลชิซีนเข้มข้น 0.1 % นาน 48 ชม.

(ค) สารออรีซาลินเข้มข้น 0.1 % นาน 72 ชม.

ขนาดเซลล์ปากใบ

จากการวัดขนาดความกว้างและความยาวของเซลล์ปากใบจากชุดควบคุม ชุดที่ได้รับสารคอลชิซีนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง หรือสารออรีซาลินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง จำนวนชุดการทดลองละ 10 เซลล์ พบว่า ชุดที่ได้รับสารออรีซาลินมีความกว้างและความยาวของเซลล์ปากใบใหญ่ที่สุด เท่ากับ 17.2 และ 26.2 ไมโครเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ขนาดความกว้างและความยาวของเซลล์ปากใบ จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารชุดควบคุม ชุดที่ได้รับสารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน

ชุดทดลอง	จำนวนเซลล์ปากใบ	ความกว้าง (ไมโครเมตร)	ความยาว (ไมโครเมตร)
ชุดควบคุม	10	16.5 ± 0.37	21.6 ± 0.37
สารคอลชิซีน	10	16.9 ± 0.35	25.1 ± 0.46
สารออรีซาลิน	10	17.2 ± 0.25	26.2 ± 0.25
เฉลี่ย		16.87 ± 0.19	24.3 ± 0.42
F-test		*	
C.V. (%)		6.14	4.811

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

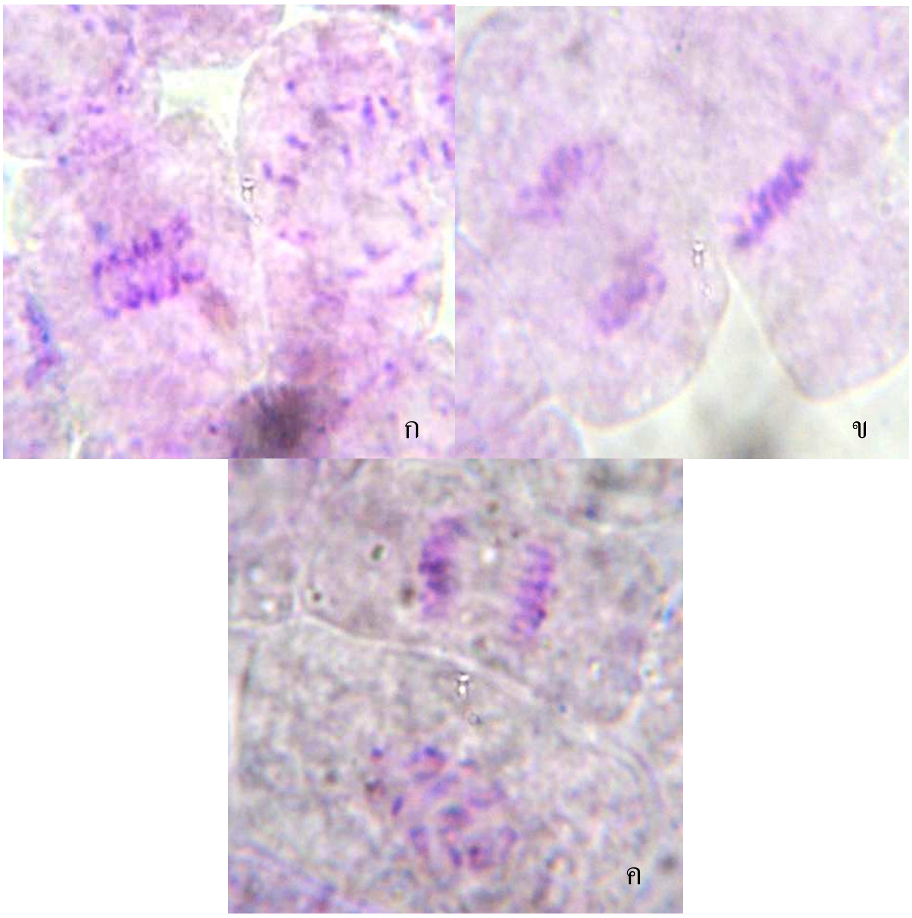
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

3.4 ผลของสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินต่อลักษณะทางเซลล์วิทยา

จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากชุดควบคุม จำนวน 2 ต้น จากเซลล์ปลายยอด และปลายรากจากต้นที่ได้รับสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง จำนวน 2 ต้น และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง จำนวน 2 ต้น และออรีซาลินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง จำนวน 2 ต้น และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง จำนวน 2 ต้น พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอด และปลายรากมีจำนวนโครโมโซมเฉลี่ย ไม่เกิน 22 คู่ แสดงว่า สารคอลชิซีนหรือออรีซาลินไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดของโครโมโซม (ภาพที่ 32) แต่ส่งผลต่อลักษณะทางสัณฐานให้เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายยอด และปลายรากที่ไม่ได้รับและได้สารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน

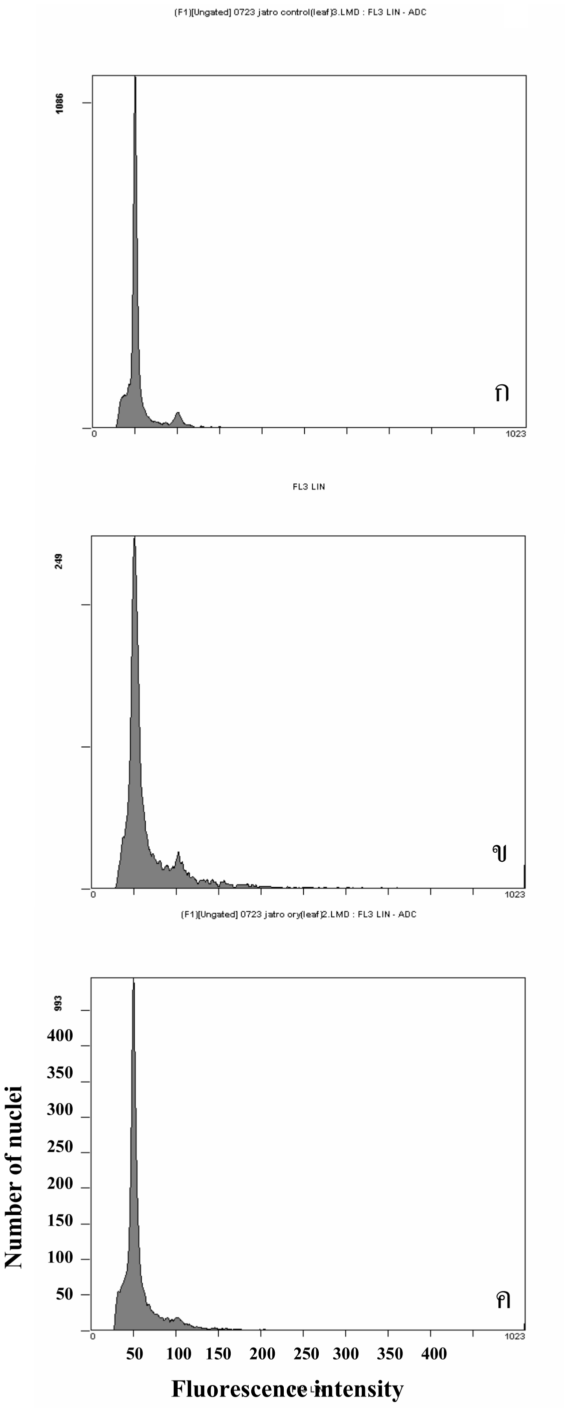
ชุดการทดลอง	เวลา (ชม.)	จำนวน (ต้น)	ดิพลอยด์ (%) (2n=2x=22)	พอลิพลอยด์ (%)
ชุดควบคุม	0	2	100	0
สารคอลชิซีน				
0.1 %	48	2	100	0
	72	2	100	0
สารออรีซาลิน				
0.1 %	72	2	100	0
0.2 %	48	2	100	0



ภาพที่ 32 จำนวนโครโมโซมจาก (ก) ชุดควบคุม (ข) สารคอลชิซีน (ค) สารออรีซาลิน ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x

3.5 ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอจากต้นที่ได้รับและไม่ได้รับสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินด้วยโฟลไซโทเมทรี

จากการนำชิ้นส่วนใบ แคลลัส และลำต้น จากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายคอลชิซีนหรือออรีซาลินมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยโฟลไซโทเมทรี พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอไม่เปลี่ยนแปลง เป็น 2C หรือดิพลอยด์ ($2n = 2x = 22$) (ภาพที่ 33ก) และชิ้นส่วนใบจากต้นที่ได้รับสารละลายคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 33ข) หรือออรีซาลินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 33ค) มาศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอไม่เปลี่ยนแปลงเช่นกัน แสดงว่า ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารยังไม่เหมาะสมหรือเพียงพอ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาผิดปกติเพียงภายนอกเท่านั้น เช่น ใบหนา ผิวใบขรุขระ ขอบใบหยัก เซลล์ปากใบบิดเบี้ยวเสียรูปร่าง และมีการเจริญเติบโตของต้นช้ากว่าปกติ



ภาพที่ 33 ฮีสโตแกรมแสดงปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบในชุดการทดลองต่าง ๆ

(ก) ชุดควบคุม

(ข) ได้รับสารคอลชิซีน เข้มข้น 0.1 % นาน 48 ชม.

(ค) ได้รับสารออรีซาลิน เข้มข้น 0.1 % นาน 72 ชม.

บทที่ 4

วิจารณ์

1. ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ

โดยทั่วไปการเพาะเมล็ด หรือ การเพาะเลี้ยงคัพภะในสภาพปลอดเชื้อนั้นส่งเสริมการงอกเป็นต้นกล้าปกติที่มีทั้งยอดและรากในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ชิ้นส่วนของต้นกล้าดังกล่าวสามารถใช้เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเพื่อวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันออกไปโดยไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อ วิธีการนี้นับว่าให้ผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างดี (Liu *et al.*, 2007) ทำนองเดียวกับการเพาะเมล็ดสบู่ดำในการศึกษานี้ พบว่าคัพภะงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์บนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นเพียงอย่างเดียวก็ส่งเสริมการงอกของใบเลี้ยง 2 ใบและมีรากปกติ ในขณะที่พืชบางชนิดมีการตอบสนองต่อการสร้างยอดรวม หรือยอดแขนงเมื่อใช้ BA ในระดับความเข้มข้นสูงกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉัตรนภา และคณะ, 2551; Chuenboonngarm *et al.*, 2001) BA เป็นไซโตไคนินที่มีผลต่อการแตกแขนงของตายอดบริเวณซอกใบ หรือตาด้านข้าง ผลดังกล่าวแตกต่างกันออกไปในพืชแต่ละชนิด ในกรณีของสบู่ดำการสร้างยอดรวมไม่มีการตอบสนองต่อ BA ในระดับความเข้มข้นต่ำ (0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือสูง (3 มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ BA ความเข้มข้น 0.25-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างยอดรวมได้ (ภาพที่ 6 ข) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสมดุลของ BA และ IBA มีผลต่อการแบ่งเซลล์และการพัฒนาของตายอดตรงซอกใบ และตาด้านข้าง ในกรณีนี้ลำต้นที่พัฒนาไม่แบ่งให้เห็นลำต้นใต้ และเหนือใบเลี้ยงชัดเจน คงเป็นเพียงลำต้น ซึ่งใช้เป็นชิ้นส่วนในการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์ต่อไปด้วย เมื่อเพิ่มความเข้มข้น BA สูงขึ้นเป็น 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IBA ทุกระดับความเข้มข้นส่งเสริมการสร้างแคลลัส การงอกของยอดสูญเสียไป โดยเฉพาะ BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้สูงสุด แคลลัสมีลักษณะเป็นคอมแพ็คแคลลัสเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว ภายใน 15 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลบริเวณที่สัมผัสกับอาหารและตายในเวลาต่อมา ไม่สามารถงอกเป็นพืชต้นใหม่ได้แม้ว่าจะย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่ดัดแปลงเพื่อการงอกเป็นต้นใหม่แล้วก็ตาม

เมื่อนำชิ้นส่วนต่าง ๆ คือ ลำต้นอ่อน (ลำต้นใต้ และเหนือใบเลี้ยง) ก้านใบ และใบเลี้ยงของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารเติม BA อย่างเดียว ไปเลี้ยงบนอาหารเติมออกซิน หรือไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ เพียงอย่างเดียว หรือใช้ร่วมกัน พบว่า ชิ้นส่วนใบ ก้านใบสร้างแคลลัสประเภทคอมแพ็คได้หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน สอดคล้องกับรายงานของ Jha และคณะ (2007) และ Deore (2008) ซึ่งเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS เติม KN หรือ TDZ ตามลำดับ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เช่นเดียวกับรายงานของศิริวรรณ และรุ่งทิพย์ (2551) เพาะเลี้ยงใบอ่อน ก้านใบ และลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารเติม KN BA หรือ TDZ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้อย่างรวดเร็ว และจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนบนอาหารเติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโพรลีนเข้มข้น 300-500 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเคซีนไฮโดรไลเสท เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดรวมได้จำนวนมากโดยไม่ผ่านกระบวนการเกิดแคลลัส อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่จากคอมแพคแคลลัสที่ชักนำจากใบและก้านใบได้ ในขณะที่ Sujatha และคณะ (2000) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงและก้านใบบนอาหารเติม BA เข้มข้นต่ำ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้นสูง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรมีการปรับอัตราส่วนของ BA และ IBA ใหม่ และศึกษาการใช้สารประกอบเชิงซ้อนในรูปของเคซีนไฮโดรไลเซท หรือเพิ่มแหล่งของไนโตรเจนในรูปของกรดอะมิโน เช่นโพรลีน เพื่อส่งเสริมพัฒนาการของแคลลัสไปเป็นพืชต้นใหม่ อย่างไรก็ตามในขั้นต้นไม่ได้เลือกใช้ชิ้นส่วนใบ และก้านใบเพื่อการขยายพันธุ์สบู่ดำในการศึกษานี้ สำหรับชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงตอบสนองการสร้างแคลลัสต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน 2,4-D ให้แคลลัสเป็นประเภทฟรายเอเบิลเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ออกซินชนิดอื่น ๆ รวมทั้งไซโตไคนินให้แคลลัสประเภทคอมแพค สอดคล้องกับ Soomro และ Memon (2007) ซึ่งรายงานว่าชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม 2,4-D หรือร่วมกับน้ำมะพร้าว ให้แคลลัสเป็นประเภทฟรายเอเบิล นอกจากนี้ Sujatha และ Mukta (1996) รายงานว่า การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนก้านใบในอาหารเติม 2,4-D ส่งเสริมการสร้างฟรายเอเบิลแคลลัส และเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วเมื่อทำการย้ายเลี้ยง หากเพาะเลี้ยงนานแล้วยังไม่ได้ย้ายเลี้ยง ทำให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย เนื่องจากมีการสะสมของสารฟีนอล Ozyigit และคณะ (2007) รายงานว่าสารประกอบฟีนอลมีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดฝ้ายจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เมื่อพืชมีการสร้างสารประกอบฟีนอลเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์บางส่วนตาย รวมทั้งมีผลยับยั้งความสามารถในการสร้างยอดรวม และจำนวนยอดรวมลดลงด้วย แคลลัสที่ได้ในการศึกษานี้มักเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืชก่อน แล้วจึงเกิดบริเวณผิวของลำต้นอ่อน ก้านใบ หรือบริเวณแผ่นใบ สอดคล้องกับการศึกษาของ Qin และคณะ (2004) ซึ่งรายงานว่า แคลลัส

จากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง เกิดตรงบริเวณรอยตัดของของชิ้นส่วน ที่เป็นเช่นนี้เพราะบริเวณรอยตัดเป็นแหล่งสะสมของสารโดยเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สร้างโดยชิ้นส่วนพืชจากกระบวนการสังเคราะห์แสง แล้วมาสะสมบริเวณดังกล่าว ส่งเสริมให้มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงก็ช่วยเพิ่มกิจกรรมดังกล่าวให้เป็นไปได้เร็ว และมากขึ้น

แคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชมีพัฒนาการไปเป็นพืชต้นใหม่โดยกระบวนการที่สำคัญ 2 กระบวนการคือออร์กาโนเจนิซิส และเอ็มบริโอเจนิซิส ซึ่งความแตกต่างนี้ขึ้นกับปัจจัยทั้งพันธุกรรม ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงตลอดจนสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง ในสบู่ดำมีรายงานการชักนำยอดรวมโดยผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสจากชิ้นส่วนใบ (Jha *et al*., 2007) ก้านใบ (Sujatha and Mukta, 1996) แต่ในศึกษานี้ไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะชนิดหรือความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตยังไม่เหมาะสมต่อการชักนำกระบวนการดังกล่าว อย่างไรก็ตามแคลลัสที่ชักนำได้ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ Qin และคณะ (2004) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงบนอาหารเติม BA ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เพียงอย่างเดียว แต่ไม่สามารถชักนำการสร้างยอดรวมได้ ในขณะที่ นันท์นภัส และคณะ (2550) เพาะเลี้ยงก้านใบจากข้อที่ 2 3 และ 4 บนอาหารเติม BA เข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.049 ไมโครโมลาร์ ชักนำให้เกิดยอดรวมเฉลี่ย 5.4 4.1 และ 2.2 ยอด ตามลำดับ Sujatha และคณะ (2005) ชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารเติม BA ร่วมกับ IBA การตอบสนองมีความแตกต่างกันนี้อาจเป็นเพราะชิ้นส่วนของพืชตลอดจนตำแหน่งของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงมีความแตกต่างกัน ดังนั้น ชนิดหรือความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ย่อมมีความแตกต่างกัน เช่นเดียวกับรายงานของ Sujatha และ Mukta (1996) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง และชิ้นส่วนใบที่ 3 บนอาหารเติม BA เข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA เข้มข้น 4.9 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ แต่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบที่ 4 บนอาหารเติม BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA เข้มข้น 4.9 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดรวมได้

ดังได้กล่าวข้างต้นแล้วว่าการชักนำต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดขึ้นจาก 2 กระบวนการ คือ ออร์กาโนเจนีซีส เป็นกระบวนการสร้าง รากหรือยอด จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงโดยไม่มีการเชื่อมต่อกันของท่อน้ำและอาหารระหว่างอวัยวะทั้งสอง ส่วนเอ็มบริโอเจนีซีส เป็นกระบวนการกำเนิดและพัฒนาการไปเป็นต้นอ่อนซึ่งมีสองขั้ว คือขั้วยอด และราก ทั้งสองขั้วมีท่อน้ำและอาหารเชื่อมต่อกัน ชิ้นส่วนที่ต่างกันมีกระบวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่ต่างกัน

การพัฒนาพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการออร์กาโนเจนีซีสอาจเกิดขึ้นจากชิ้นส่วนที่มีจุดกำเนิดของยอดหรือรากอยู่แล้ว เช่น ข้อ ปลายยอด ตาข้าง ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง และใต้ใบเลี้ยง เป็นต้น ชิ้นส่วนดังกล่าวเจริญให้ยอดโดยตรง จากการเพาะเลี้ยงลำต้นอ่อน และคัพภะบนอาหารเติม BA เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ มีใบ และตาข้างจำนวนมาก คัพภะมีการเจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อนประกอบด้วย ส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง และใต้ใบเลี้ยง แต่จากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารเติม BA ร่วมกับ IBA เป็นเวลา 1 เดือน สามารถชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ ประกอบด้วยปลายยอด ใบ และตาข้างจำนวนมาก เมื่อตัดแยกชิ้นส่วนลำต้น ตาข้าง และปลายยอด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมเฉลี่ยได้ใกล้เคียงกันคือ 5.1 5.3 และ 5.25 ยอด ตามลำดับ อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนตาข้างให้การสร้างยอดรวมสูงกว่าชิ้นส่วนอื่น ๆ สอดคล้องกับรายงานของนันท์นภัส และคณะ (2549) ซึ่งชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงตาข้างสบู่ดำบนอาหารเติม BA ร่วมกับ IBA ชักนำให้เกิดยอดรวมได้ 5.9 ยอด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดในชิ้นส่วนดังกล่าวมีมากกว่าส่วนปลายยอด กิจกรรมการแบ่งเซลล์ของชิ้นส่วนดังกล่าวมีมากกว่า นอกจากนี้สัดส่วนของไซโตไคนินและออกซินเหมาะสมกว่า ชิ้นส่วนปลายยอดอาจมีออกซินภายในชิ้นส่วนพืชมากกว่าส่งผลยับยั้งการสร้างยอดในลักษณะคล้ายอาการข่มโดยยอด (apical dominace) ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ตาข้างสร้างยอดรวมได้สูงกว่าโดยทั่วไปการส่งเสริมการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนดังกล่าวไม่มีความจำเป็นต้องใช้สารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซิน ไซโตไคนินเพียงลำพังส่งเสริมการสร้างยอดรวมได้จำนวนมาก ความเข้มข้นที่ใช้ตั้งแต่ 3-5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดพืช เช่น Sujatha และคณะ (2005) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างสบู่ดำ บนอาหารเติม BA KN หรือ TDZ เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ ในขณะที่ Datta และคณะ (2007) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างสบู่ดำบนอาหารเติมอะดีนีนซัลเฟต ร่วมกับ BA ในช่วงเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงชักนำให้เกิดยอดรวมได้ และเมื่อย้ายกลุ่มยอดรวมไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA ร่วมกับ IBA และ KN สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดรวมได้มากขึ้น 30.8 ยอด นอกจากนี้ Shrivastava และ Banerjee (2008) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงตาข้างสบู่ดำ บนอาหารเติม BA ร่วมกับ IBA อะดีนีน ซัลเฟต กลูตามีน แอล-อาจีนีน และกรดซิตริก ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้เช่นกัน พืชต่างชนิดกัน แม้จะเป็นชิ้นส่วนเดียวกันแต่มีองค์ประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโตตลอดจนสารเคมีอื่น ๆ แตกต่างกัน ดังนั้นการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันออกไป จากการศึกษานี้เห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่มีองค์ประกอบเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดของสบู่ดำบนอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินร่วมกับออกซิน สามารถส่งเสริมให้เกิดการสร้าง

ยอดรวมได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้วิตามินบางชนิด และกรดอะมิโนเชิงซ้อนที่เติมลงไปในอาหาร ส่งเสริมการพัฒนาเป็นต้นใหม่ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตด้วย

การชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารเติม TDZ ร่วมกับ 2,4-D หรือ 2,4-D อย่างเดียว ให้กลุ่มเซลล์สีเหลืองอ่อน หลุดแยกออกจากกันได้ง่าย ลักษณะเป็นฟรายเอเบิล เช่นเดียวกับรายงานของ Soomro และ Memon (2007) ชักนำแคลลัสประเภทฟรายเอเบิลจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D อย่างเดียว เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์ จำนวน 2 ครั้ง เซลล์มีการเจริญเติบโต และพัฒนาได้ และเปลี่ยนสีจากเหลืองเป็นเขียวอ่อน สำหรับ Soomro และ Memon (2007) ย้ายเลี้ยงแคลลัสที่มีลักษณะเป็นฟรายเอเบิล ซึ่งมีต้นอ่อนอยู่ในระยะโกลบูลาร์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเติม 2, 4-D สามารถชักนำให้เกิดเซลล์ซัสเพนชั่นได้ อาจเป็นไปได้ว่า 2,4-D ในอาหารเหลวส่งเสริมการพัฒนาของเซลล์เอ็มบริโอระยะต่าง ๆ แต่ในการศึกษานี้ย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ไม่ได้เติม 2,4-D ในอาหารเพาะเลี้ยง) ดังนั้น จึงไม่สามารถชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นได้ เซลล์ในซัสเพนชั่นมีการพัฒนาเป็นก้อนกลม ๆ สีเขียว มีโครงสร้างคล้ายต้นอ่อนระยะรูปกลม แต่ไม่สามารถที่จะพัฒนาเข้าสู่ระยะรูปหัวใจ ทอร์ปิโด และงอกเป็นต้นกล้าที่ปกติได้ ในการศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นสบู่ดำในครั้งต่อไปควรเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลง (ประมาณ 5-10 เท่าของสูตรอาหารเริ่มต้น) เพื่อส่งเสริมการพัฒนาของต้นอ่อนไปสู่ระยะที่แก่ จากนั้นจึงค่อยย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อส่งเสริมการงอกเป็นต้นกล้าปกติต่อไป

ในการชักนำให้เกิดรากนั้น รากจะเกิดในอาหารที่มีออกซินสูง ร่วมกับไซโทไคนินต่ำ หรือออกซินเพียงอย่างเดียว จากการทดลองครั้งนี้ เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารเติมออกซินเพียงอย่างเดียว คือ IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน ชักนำให้เกิดรากได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Datta และคณะ (2007) ใช้ IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ Shrivastava และBanerjee (2008) ใช้ IBA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และจากรายงานของนันท์นภัส และคณะ (2550) เพาะเลี้ยงยอดบนอาหารเติม IBA เข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ นาน 5 สัปดาห์ แล้วย้ายลงบนอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ในขณะที่ Qin และคณะ (2004) และ Sujatha และคณะ (1996) เพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะชิ้นส่วนยอดได้มาจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA ร่วมกับ IBA ดังนั้นสารดังกล่าวจึงส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาของรากได้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสาร

ควบคุมการเจริญเติบโต หรือยอดที่ได้มีความแข็งแรงสามารถสร้างสารสังเคราะห์ และออกซิน โดยเฉพาะ IAA จากนั้นเคลื่อนย้ายมาสะสมที่ฐานของยอด ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และสร้างรากได้ในเวลาต่อมา รากที่สร้างมีสีขาว ขนาดใหญ่ แตกรากแขนงจำนวนมาก เช่นเดียวกับรายงานของ Sujatha และคณะ (1993) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ บนอาหารเติม BA เข้มข้นต่ำ 4.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA เข้มข้นสูง 4.9 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ นอกจากสามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้แล้ว ยังสามารถชักนำให้เกิดรากได้โดยตรงเช่นกัน

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในพืช ส่วนมากจะใช้ใบอ่อนมาแยกเซลล์และย้อมนิวเคลียสในสารละลายบัพเฟอร์ ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ชิ้นส่วนใบ ลำต้น และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นต่าง ๆ มาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโฟลไซโทเมทรี และย้อมนิวเคลียสด้วย PI พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณดีเอ็น ปริมาณดีเอ็นเอของทุกชิ้นส่วนที่ศึกษา เป็น 2C หรือดิพลอยด์ (2n = 2x = 22) เช่นเดียวกับรายงานของ Allum (2007) ซึ่งนำใบอ่อนของกุหลาบจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาย้อมนิวเคลียสด้วย PI ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณดีเอ็นเอเช่นกัน อย่างไรก็ตาม Rival และคณะ (1997) นำใบและแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเมล็ด และเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมาแยกเซลล์และย้อมนิวเคลียสด้วย PI ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า ปริมาณดีเอ็นจากใบ เท่ากับ 384.1 พิโคแกรม และจากแคลลัส เท่ากับ 344.7 พิโคแกรม ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนพืชทั้ง 2 แหล่ง แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัสปาล์มน้ำมันในอาหารร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยเฉพาะ 2,4-D ความเข้มข้นสูง (100-150 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลานาน ส่งผลให้มีปริมาณดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป แต่จากการศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างเนื่องจากใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่ำ และชนิดที่ใช้ (BA และ IBA) ไม่มีรายงานว่าก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณดีเอ็นเอ อีกทั้งการชักนำใช้เวลาสั้นเพียง 30 ถึง 60 วัน นอกจากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนแล้ว ยังมีรายงานแยกเซลล์จากราก แล้วย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI สามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอได้เช่นกัน เช่นใน *Medicago truncatula* (Elmaghrabi and Ochatt, 2006) ถั่ว (Kovárová *et al*., 2007) และจากรายงานการศึกษาของ Yokoya และคณะ (2000) วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากใบอ่อนกุหลาบ ย้อมนิวเคลียสด้วย PI และ DAPI พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการศึกษานี้ไม่ได้ใช้ DAPI จากการย้อมสีนิวเคลียสด้วย PI เพียงอย่างเดียวก็ให้ peak ปริมาณดีเอ็นเอที่ชัดเจน สามารถ

ใช้แยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ทำนองเดียวกับ Meesawat และคณะ (2008) นำใบของกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ ย้อมนิวเคลียสด้วย PI พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในครั้งแรกไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณดีเอ็นเอ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานจะส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว ยังสามารถวิเคราะห์จากพืชในแปลงปลูกได้ด้วย จากรายงานของ Martínez และคณะ (1994) วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากใบข้าวจำนวน 10 ชนิด ย้อมนิวเคลียสด้วย PI พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นได้เช่นกัน

3. ผลของสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินต่อการชักนำพอลิพลอยด์

โดยทั่วไปในการชักนำการกลายพันธุ์หรือการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมในหลอดทดลองโดยใช้สารเคมีนั้น พบว่า การใช้สารเคมีความเข้มข้นสูงส่งผลให้อัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนลดลง ในทำนองเดียวกันระยะเวลาการให้สารเคมีนานขึ้นก็ส่งผลให้อัตรารอดชีวิตลดลง ดังนั้นประสิทธิภาพในการชักนำการกลายพันธุ์หรือการเพิ่มชุดโครโมโซมจึงคำนึงถึงปัจจัยทั้งสอง ในทางปฏิบัตินั้นอาจให้ความเข้มข้นสูงระยะเวลาสั้นซึ่งเรียกว่าการให้เฉียบพลัน หรือการให้ความเข้มข้นต่ำระยะเวลานานที่เรียกว่าการให้เรื้อรัง ค่าที่เป็นเกณฑ์ในการเลือกการให้สารเคมีข้างต้นคือ LD_{50} ค่าดังกล่าวแตกต่างกันในแต่ละพืช จากการศึกษาอัตรารอดชีวิตของยอดสบู่ดำที่ได้รับสารเคมีเพิ่มชุดโครโมโซมในการศึกษานี้ พบว่าที่ความเข้มข้นสูง และระยะเวลาในการทรีตนาน ส่งผลให้อัตรารอดชีวิตลดลง เมื่อพิจารณาถึงค่า LD_{50} ของสารละลายคอลชิซีนอยู่ในช่วง 0.016 ถึง 0.06 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารละลายออรีซาลิน 0.003 ถึง 0.031 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทรีตเป็นเวลา 24 ถึง 72 ชั่วโมง ในพืชบางชนิดอาจทรีตที่ระดับความเข้มข้นต่ำเป็นเวลานานนับวัน เช่น Ghaffari (2006) ทรีตสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 และ 3 วัน จึงจะให้อัตรารอดชีวิตลดลง 50% ในกรณีที่เติมสารลงในอาหารเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มข้นต่ำอาจต้องทรีตเป็นเวลานานถึงหนึ่งช่วงเวลาของการย้ายเลี้ยง (3-4 สัปดาห์) ดังเช่นรายงานของ Rose และคณะ (2000) และ Kadota และ Niimi (2002) ใช้สารคอลชิซีนที่ความเข้มข้นสูง และเวลาทรีตสารนาน 24-192 ชั่วโมง จึงให้อัตรารอดชีวิตต่ำลง ในการศึกษานี้ไม่ได้ทรีตเป็นเวลานานกว่า 72 ชั่วโมง ดังนั้นเป็นที่น่าสนใจว่าการเติมสารทั้งสองลงในอาหารเพาะเลี้ยงความเข้มข้นต่ำแล้วเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด หรือตาข้างของสบู่ดำเป็นเวลานานหนึ่งรอบของการย้ายเลี้ยงอาจมีผลดี ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงชุดของโครโมโซมได้ อย่างไรก็ตาม Thao และคณะ (2003) ทรีตปลายยอด *Alocasia* ด้วยสารคอลชิซีนความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ พบว่า ส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากความเป็นพิษของคอลชิซีนต่อชิ้นส่วนพืช ในขณะที่การทรีตด้วยสารออรี

ซาลินในการศึกษานี้ให้อัตรารอดชีวิตสูงแต่ต้องใช้ความเข้มข้นต่ำกว่าคอลชิซีน 10-20 เท่า ความแตกต่างในการตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีทั้งสองขึ้นกับชนิด หรือพันธุ์พืช อายุ และแหล่งของชิ้นส่วนพืช Carvalho และคณะ (2005) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ ใบเลี้ยงของ *Bixa orellana* บนอาหารร่วมกับสารคอลชิซีน (25 250 และ 1,250 ไมโครโมลาร์) หรือออรีซาลิน (5 15 และ 30 ไมโครโมลาร์) นาน 15 และ 30 วัน พบว่า ชิ้นส่วนพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเน่าตาย ไม่พบอัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชที่ย้ายเลี้ยง Zeng และคณะ (2006) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของส้ม ซึ่งเป็นเซลล์เดี่ยวที่ไร้ผนังร่วมกับสารคอลชิซีนที่ความเข้มข้นสูง 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลานาน 8 ชั่วโมง ยังคงให้อัตรารอดชีวิตและสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสก้อนเล็ก ๆ ได้ แต่ไม่สามารถเจริญเป็นพืชต้นใหม่ได้ แต่จากการทรีตชิ้นส่วนแคลลัสกับสารคอลชิซีนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 8 ชั่วโมง พบว่า แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ นอกจากนี้การหยดสารคอลชิซีนเข้มข้นสูง (2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) นาน 1-5 วัน บนปลายยอดคาร์เนชั่นยังให้อัตรารอดชีวิตของปลายยอดได้ (Nimura *et al.,* 2006)

เมื่อพิจารณาพัฒนาของยอดรวมจากชิ้นส่วนที่ทรีตด้วยสารเคมีเพิ่มชุดโครโมโซม พบว่า ความเข้มข้นของสารทั้งสองเพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการสร้างยอดรวม อย่างไรก็ตาม การใช้ความเข้มข้นต่ำ หรือระยะเวลาที่ให้ต่ำส่งเสริมการสร้างยอดรวมเฉลี่ยได้สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารทั้งสองชนิดเป็นไปในทำนองเดียวกัน ผลดังกล่าวเป็นไปในทำนองเดียวกับการให้รังสีกับพืชที่ระดับต่ำ ๆ ซึ่งพบว่า หลังจากย้ายเลี้ยงสามารถให้จำนวนเฉลี่ยของต้นพืชเพิ่มสูงขึ้น (Ahloowalia, 1992) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารต่ำไม่ส่งเสริมการสร้างสารเคมีบางชนิด ที่อาจจะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษภายในเซลล์ พืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสารเคมีต่างกัน แม้ว่าพืชชนิดเดียวกัน แต่ระยะการพัฒนาต่างกัน ส่งผลให้ตอบสนองต่างกัน แม้ว่าคอลชิซีนส่งผลต่ออัตรารอดชีวิตของตาข้างต่ำกว่าออรีซาลิน แต่ตาข้างที่รอดชีวิตให้การสร้างยอดรวมเฉลี่ยสูงกว่า (ตารางที่ 8 9 และ 10) อาจเป็นไปได้ว่าออรีซาลินมีพิษตกค้างในเนื้อเยื่อพืชเป็นเวลานานกว่าคอลชิซีน ส่งผลต่อการตายและการฟื้นตัวของเซลล์โดยเฉพาะเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด สอดคล้องกับรายงานผลการศึกษาของ Thao และคณะ (2003) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดของ *Alocasia* ร่วมกับสารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน พบว่า สารคอลชิซีนส่งผลให้อัตรารอดชีวิตลดลง และมีความเป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืชมากกว่าสารออรีซาลิน แต่ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมสูงกว่า อย่างไรก็ตาม ผลการตอบสนองดังกล่าวแตกต่างกันขึ้นกับชนิด และพันธุ์พืชด้วย จากรายงานผลการศึกษาของ Petersen และคณะ (2002) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และปลายยอดของ *Miscanthus sinensis* บนอาหารร่วมกับสารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน พบว่า สารคอลชิซีนที่ความเข้มข้นสูงส่งเสริมการสร้างแคลลัสและให้เปอร์เซ็นต์การเกิดพืชเตตระพลอยด์สูงกว่าออรีซาลิน เมื่อพิจารณาลักษณะทาง

สัณฐานของต้นสบู่ดำที่ได้จากการศึกษานี้ พบว่า ต้นที่พัฒนาจากตาข้างซึ่งทรีตด้วยคอลชิซีน ความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง เข้มข้น 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง และเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง ตามลำดับ หรือออรีซาลินเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง เข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง มีลักษณะทางสัณฐานเปลี่ยนแปลงไป ใบมีขนาดใหญ่ หนา และหยิกงอ สีเขียวเข้ม ผิวใบขรุขระไม่เรียบ ขอบใบหยัก บิดเบี้ยวเสียรูปร่าง ก้านใบอวบอ้วน (รูปที่ 26 และ 27) สอดคล้องกับรายงานการเพาะเลี้ยงตาข้างของพืช *Scoparia montevidiensis* บนอาหารร่วมกับสารคอลชิซีน เข้มข้น 0.001-0.01 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 และ 48 ชั่วโมง (Escandon *et al*., 2005) รากที่พัฒนาจากยอดข้างต้นมีลักษณะอ้วน สั้น มีสีขาวขุ่น เกิดรากแขนงน้อย สอดคล้องกับรายงานของ Wei และคณะ (2007) ซึ่งจุ่มแช่เมล็ดด้วยสารคอลชิซีนส่งผลให้เกิดรากที่พัฒนามีลักษณะสั้น เกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อน

นอกจากนี้ สารคอลชิซีน หรือออรีซาลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปากใบดังนี้คือ ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น ความหนาแน่นของปากใบ(จำนวนปากใบต่อพื้นที่) ลดลง ลักษณะบิดเบี้ยว รูปร่างผิดปกติ สอดคล้องกับรายงานของ Kadota และ Niimi (2002) ซึ่งตรวจสอบลักษณะปากใบของแพร์ญี่ปุ่นหลังจากทรีตด้วยสารคอลชิซีน พบว่า มีขนาดใหญ่กว่าปกติ นอกจากนี้ Gao และคณะ (2003) และ Thao และคณะ (2003) รายงานว่าการทรีต *Scutellaria baicalensis* และปลายยอด *Alocasia* ด้วยสารคอลชิซีน และ ออรีซาลิน ตามลำดับส่งผลให้ปากใบมีลักษณะเรียวยาวขึ้น อย่างไรก็ตามจากการตรวจนับจำนวนชุดโครโมโซม และวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอนเอจากใบอ่อนด้วยโฟลไซโตเมทรีไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนชุดโครโมโซม และปริมาณดีเอ็นเอ อาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้น และระยะเวลาในการทรีตสารไม่เพียงพอ จึงไม่สามารถชักนำให้เกิดพืชพอลิพลอยด์ได้ คงมีเพียงลักษณะทางสัณฐาน และสรีรวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป อันเนื่องมาจากพิษของสารเพิ่มชุดโครโมโซมทั้งสองชนิด

บทที่ 5

สรุป

1. การเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS เติม BA เพียงอย่างเดียว ให้การงอกเป็นต้นกล้าได้ปกติ การใช้ BA เข้มข้น 0.25 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 หรือ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างแคลลัส และการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้

2. เมื่อตัดแยกชิ้นส่วนก้านใบ ใบเลี้ยง และชิ้นส่วนลำต้นอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA TDZ หรือ IBA ทุกความเข้มข้น สามารถส่งเสริมการสร้างแคลลัสประเภทคอมแพ็ค ส่วนลำต้นอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม 2,4-D ทุกความเข้มข้น ส่งเสริมการสร้างแคลลัสประเภทฟรายเอเบิล

3. ชิ้นส่วนตาข้างให้การเกิดยอดรวมได้ดี โดยเฉลี่ย 5.3 ยอด บนอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงให้ยอดรวมได้ดี โดยเฉลี่ย 15 ยอด บนอาหารเติม KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และชิ้นส่วนใต้ใบเลี้ยงให้ยอดรวมได้ดี 22.76 ยอด บนอาหารเติม KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

5. การชักนำรากจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารเติม IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 วัน ลักษณะรากสีขาว มีขนาดใหญ่ และแตกรากแขนงจำนวนมาก

6. การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารเติม TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 สัปดาห์ ส่งเสริมการสร้างแคลลัสบริเวณรอยตัด มีสีเหลืองอ่อน ลักษณะเซลล์เกาะตัวกันหลวม ๆ หลุดร่วนง่าย เมื่อนำแคลลัสดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แคลลัสมีการเจริญพัฒนาเป็นก้อนแข็ง เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียวอ่อน เซลล์เพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว

7. การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบ ลำต้น และแคลลัส ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอ เป็น 2C หรือดิพลอยด์

8. การวิเคราะห์ค่า LD_{50} ได้จากการใช้สารคอลชิซีน 0.016 0.065 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง และสารออรีซาลิน 0.031 0.003 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

9. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดร่วมกับสารคอลชิซีนหรือออรีซาลินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ ไม่สามารถชักนำให้เกิดพืชพอลิพลอยด์ได้ แต่จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วนพืชที่ได้รับสารคอลชิซีน หรือสารออรีซาลินที่ความเข้มข้นหรือระยะเวลาต่าง ๆ มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบมีขนาดใหญ่ หนา สีเขียวเข้ม ขอบใบหยัก บิดเบี้ยวเสียรูปร่าง การเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ ปากใบบิดเบี้ยวเสียรูปร่าง ขนาดไม่สม่ำเสมอ

10. การตรวจนับจำนวนโครโมโซม และวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคโฟลไซโทเมทรีจากพืชที่ทรีตด้วยสารคอลชิซีนหรือออรีซาลิน พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอไม่เปลี่ยนแปลง เป็น 2C หรือดิพลอยด์

เอกสารอ้างอิง

กรมพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2549. พลังงานไบโอดีเซล. [Online] Available: http://www.dede.go.th/dede/index.php?id=173. (เข้าถึงเมื่อ 11/12/2549)

จรูญ ค้อมคำพันธุ์ และโยซิมูนิ ทาเคตะ. 2550. น้ำมันสบู่ดำกับเครื่องยนต์ดีเซล. [Online] Available: http://www.electron.rmutphysics.com. (เข้าถึงเมื่อ 5/01/2550)

ฉัตรนภา ข่มอาวุธ, สนธิชัย จันทร์เปรม และพีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเขียวเพื่อการถ่ายยีน. นครปฐม: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. [Online] Available: http://www.kukr.lib.ku.ac.th. (เข้าถึงเมื่อ 25/11/2552)

เทคโนโลยีการเกษตร. 2550. “สบู่ดำ” พืชพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซล. [Online] Available: http://www.matichon.co.th. (เข้าถึงเมื่อ 5/01/2550)

ไทยรัฐ. 2551. สบู่ดำทำไบโอดีเซลมาแรงคู่แข่งปาล์ม. [Online] Available: http://www.thairah.co. th. (เข้าถึงเมื่อ 10/01/2551)

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2525. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของถั่วเขียวโดยใช้รังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันท์นภัส เทพสำราญ, โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา และอารีย์ ทองภักดี. 2549. การชักนำให้เกิดยอดทวีคูณในหลอดทดลองของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.). นครปฐม: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. [Online] Available: http://www. google.co.th. (เข้าถึงเมื่อ 15/12/2551)

นันท์นภัส เทพสำราญ, โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา และอารีย์ ทองภักดี. 2550. การชักนำให้เกิดแคลลัสและการเกิดยอดจากชิ้นส่วนก้านใบของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.). นครปฐม: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. [Online] Available: http://www. google.co.th. (เข้าถึงเมื่อ15/15/2551)

นิสากร. 2551. สบู่ดำความหวังแห่งพลังงานทดแทน. [Online] Available: http://update.se-ed. com/227/physic-nut.htm. (เข้าถึงเมื่อ 10/01/2551)

รัตนา ลาสุข, ราตรี บุญเรืองรอด และจุลภาค คุ้นวงศ์. 2552. การเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า. [Online] Available: http://www.scisoc.or.th. (เข้าถึงเมื่อ 28/01/2552)

วนิภา ศรีโชติ. 2525. ผลของรังสีที่มีต่อการเจริญเติบโตและการกลายพันธุ์ของถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พงศ์เทพ อันตะริกานนท์. 2551. เทคโนโลยีการปลูกสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) เพื่อสกัดน้ำมันใช้เป็นพลังงานทดแทนในชนบท. [Online] Available: http://www. dpu. ac. th/ clicic tech/download.asp. (เข้าถึงเมื่อ 10/01/2551)

ศิริวรรณ บุรีคำ และรุ่งทิพย์ กาวิตา. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ. ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนา. [Online] Available: http://www. google.co.th. (เข้าถึงเมื่อ 10/12/2551)

ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดชัยนาท (จักรกลเกษตร). 2550. สบู่ดำ. ชัยนาท: ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร ตำบลเขาท่าพระ อำเภอเมือง จังหวัดชัยนาท.

อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ. 2551. “สบู่ดำ”. [Online] Available: http://www.doa.go.th. (เข้าถึงเมื่อ 10/01/2551)

Ahloowalia, B.S. 1992. *In vitro* induced mutants *Chrysanthemum*. Mutation Breeding Newsletter 39: 6.

Allum, J.F., D. H. Bringloe and A.V. Roberts. 2007. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. Plant Cell Reports 26: 1977-1984.

Arumuganathan, K., S.P. Tallury, M.L. Fraser, A.H. Bruneau and R. Qu. 1999. Nuclear DNA content of thirteen turfgrass species by flow cytometry. Crop Sciences 39: 1518-1521.

Blakesley, D., A. Allen, T.K. Pellny and A.V. Roberts. 2002. Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd. Annals of Botany 90: 391-398.

Carvalho, J.F., C.R. Carvalho and W.C. Otoni. 2005. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 69-75.

Chauvin, J.E., C. Souchet, J.P. Dantec and D. Ellissèche. 2003. Chromosome doubling of 2x *Solanum* species by oryzalin method development and comparison with spontaneous chromosome doubling *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 65-73.

Chen, Q.F., C.L. Wang, Y.M. Lu, M. Shen, R. Afza, M.V. Duren and H. Brunner. 2001. Anther culture in connection with induced mutations for rice improvement. Euphytica 120: 401-408.

Chuenboonngarm, N., S. Charoonsote and S. Bhamarapravati. 2001. Effect of BA and 2iP on shoot proliferation and somaclonal variation of *Gardenia jasminoides* Ellis *in vitro* culture. ScienceAsia 27: 137-141.

Constantin, M.J. and J.E. Love. 1967. Seedling response of *Vigna sinensis* (L.) Savi to gamma and neutron seed irradiation. Radiation Botany 7: 497-506.

Datta, M.M., T.B. Jha and P. Mukherjee. 2007. *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). Current Sciences 30: 1438 -1442.

Davidson, D., R.D. Macleod and M.O. Riordan. 1966. Changes in mitotic index induced by colchicines. Nature 212: 1541-1542.

Deore A.C. and T.S. Johnson. 2008. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. Plant Biotechnology Reports 2: 7-11.

Doležel, J. and J. Bartoš. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Annals of Botany 95: 99-110.

Doležel, J., P. Binarová and S. Lucretti. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biologia Plantarum 31: 113-120.

Eeckhaut, G.R., P.O. Werbrouck, W.H. Leus, J.V. Bockstaele and P.C. Debergh. 2004. Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 241-246.

Elmaghrabi, A. and S. Ochatt. 2006. Isoenzymes and flow cytometry for the assessment of true-to-typeness of calluses and cell suspensions of barrel medic prior to regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 85: 31-43.

Escandon, A.S., I. Miyajima., M. Alderete., J.C. Hagiwara., G. Facciuto., D. Mata and S.M. Soto. 2005. Wild ornamental germplasm exploration and domestication based on biotechnological approaches. *In vitro* colchicine treatment to obtain a new cultivar of *Scoparia montevidiensis*. Electronic Journal of Biotechnology 8: 204-211.

Escandon, A.S., J.C. Hagiwara and L.M. Alderete. 2006. A new variety *Bacopa monnieri* obtained by *in vitro* polyploidization. Electronic Journal of Biotechnology 9: 181-186.

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

Ghaffari, S.M. 2006. Occurrence of diploid and polyploidy microspores in *Sorghum bicolor* (Poaceae) is the result of cytomixis. African Journal of Biotechnology 5: 1450-1453.

Gu, X.F., A.F. Yang, H. Meng and J. R. Zhang. 2005. *In vitro* induction of tetraploid *Zizyphus jujuba* Mill. Cv. Zhanhua. Plant Cell Reports 24: 671-676.

Hancock, J.F. 1997. The Colchicine Story. HortScience 32: 1011-1012.

Hayashi, L., N.S. Yokoya and D.M. Kikuchi. 2007. Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phytoregulators in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). Journal of Applied Phycology. [Online] Available: http://www.google. co.th. (accessed on 2/06/2008)

Herrera, L.C., L.G. Moreno, J.R. Acuña, M.D. Peña and D. Osorio. 2002. Colchicine-induced microspore embryogenesis of coffee. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71: 89-91.

Hirano, T., T. Godo and K. Ishikawa. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. Plant Cell Reports 23: 534-539.

Jha, T., P. Mukherjee and M.M. Datta. 2007. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. Plant Biotechnology Reports 1: 135-140.

Kadota, M. and Y. Nimii. 2002. *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). Plant Cell Reports 21: 282-286.

Kawakami, S.M., J. Kato, S. Kawakami and S. Serizawa. 2007. Ploidy chimeras induced in haploid sporophytes of *Osmunda claytoniana* and *Osmunda japonica*. Japanese Plant Research 120: 641-645.

Kermani, M.J., V. Sarasan, A.V. Roberts, K. Yokoya, J. Wentworth and V.K. Sieber. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. Theory Applied Genetic 107: 1195-1200.

Khosravi, P., M.J. Kermani, G.A. Nematzadeh, M.R. Bihamta and K. Yokoya. 2008. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. Euphytica 160: 267-275.

Konzen, P.A., X.M. Silva, S.C. Jacquea and M.H.B. Zanettini. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. Ciência Rural, Santa Maria 30: 105-111.

Koutoulis, A., A.T. Roy, A. Price, L. Sherriff and G. Leggett. 2005. DNA ploidy level of colchicine-treated hops (*Humulus lupulus* L.). Scientia Horticulturae 105: 263-268.

Kovárová, P., A. Navrátilová and J. Doležel. 2007. Chromosome analysis and sorting in *Vicia sativa* using flow cytometry. Biologia Plantarum 51: 43-48.

Loureiro, J., E. Eleazar, J. Doležel and D. Santos. 2007. Two new nuclear isolation buffers for

plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. Annals of Botany 100: 875-888.

Liu, G., Z. Li and M. Bao. 2007. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. Euphytica 157: 145-154.

Lysák, M.A., M. Doleželova and J.P. Horry. 1999. Flow cytometry analysis of nuclear DNA content in *Musa*. Theory Applied Genetic 98: 1344-1350.

Martínez, C.P., K. Arumuganathan, H. Kikuchi and E.D. Earle. 1994. Nuclear DNA content of ten rice species as determined by flow cytometry. Japan Journal Genetics 69: 513-523.

Matthew, J.D. 1998. Colchicine. [Online] Available: http://www.google.co.th. (accessed on 2/06/2008).

Mehetre, S.S., A.R. Atier, V.L., Gawande., V.R. Patil and A.S. Mokate. 2003. Induced polyploidy in *Gossypium*: A tool to overcome interspecific incompatibility of cultured tetraploid and diploid cottons. Current Sciences 84: 1510-1512.

Morgan, E.R. and B.L.Hofmann. 2003. Production of tetraploid *Gentiana trifler* var. *japonica* 'Royal Blue' plants. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 31: 65-68.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15:473–97.

Nair, R.M. 2004. Developing tetraploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. New Zealand Journal of Agricultural Research 47: 45-49.

Nimura, M., J. Kato., H., Horaguchi., M. Mii and K. Sakai. 2006. Induction of fertile amphidiploids by artificial chromosome-doubling in interspecific hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus* Thunb. Breeding Sciences 56: 303-310.

Obert, B. and B. Barnabás. 2004. Colchicine induced embryogenesis in maize. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 283-285.

Olfa S.A. and S.A. Hajer. 2007. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) through culture of unpollinated ovaries. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 91: 125-133.

Omran, A. and B.N. Mohammad. 2008. Polyploidization effect in two diploid cotton (*Gossypium herbaceum* L. and *G. arboretum* L.) species by colchicine treatments. African Journal of Biotechnology 7: 102-108.

Oryzalin. http://www.alanwood.net/pesticides/oryzalin.html (accessed on 2/06/2008)

Ozyigit, I.I., M.V. Kahraman, and O. Eracn. 2007. Relationship between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). African Journal of Biotechnology 6: 3-8.

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: 137-146.

Qin, W., L. Wei-Da., P. Shu-Lin., T. Lin and C. Fang. 2004. Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology 4: 475-478.

Rey, H.Y., P.A. Sansberro, M.M. Collavino, J.R. Daviña, A.M. Gonzàlez and L.A. Mrogunski. 2002. Colchicine, trifluralin and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). Euphytica 123: 49-56.

Rival, A., T. Beule, P. Barre, S. Hamon, Y. Duval and M. Noirot. 1997. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineesis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. Plant Cell Reports 16: 884-887.

Rose, J.B., J. Kubba and K.R. Tobutt. 2000. Chromosome doubling in sterile *Syringa vulgaris* × *S. pinnatifolia* hybrids by *in vitro* culture of nodal explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 127-132.

Sariano, M., L. Cistué, M.P. Vallés and A.M. Castillo. 2007. Effects of colchicines on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 91: 225-234.

Seker, M., O. Tuzcu and P. Ollitrault. 2003. Comparison of nuclear DNA content of citrus rootstock population by flow cytometry analysis. Plant Breeding 122: 169-172.

Seneviratne, K.A.C.N. and D.S.A. Wijesundara. 2004. New African violets (*Saintpaulia ionantha*, H. Wendl.) induced by colchicine. Current Sciences 87: 2: 138-140.

Shao, J., C. Chen and X. Deng. 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 241-246.

Shrivastava, S. and M. Banerjee. 2008. *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. International Journal of Integrative Biology 3: 73-79.

Snyder, L.A. "Description and Natural History of the Autumn Crocus". http://biotech.icmb. utexas.edu/botany/acrohst.html. (accessed on 2/06/2008)

Soomro, R. and R.R. Memon. 2007. Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. Pakistan Journal Botany 39: 2431-2441.

Stanys, V., A. Weckman, G. Staniene and P. Duchovskis. 2006. *In vitro* induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 263-268.

Sujatha, M. and M. Dhingra. 1993. Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 293-296.

Sujatha, M. and N. Mukta. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 135-141.

Sujatha, M., H.P.S. Makkar and K. Becker. 2005. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. Plant Growth Regulation 47: 83-90.

Sujatha, M., N. Sivaraj and M.S. Prasad. 2000. Biochemical and histological changes during *in vitro* organogenesis in *Jatropha integerrima*. Biologia Plantarum 43: 167-171.

Szakács, É. and B. Barnabás. 2004. Development of diploid pollen in spikelet cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) and rye (*Secale cereale* L.). Acta Agronomica Hungarica 52: 1-8.

Thao, N.T.P., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki and H. Okubo. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72: 19-25.

Thepsamran, N., C. Thepsithar and A. Thongpukdee.(2006a). Callus and shoot regeneration from petiole segments of physic nut (*Jatropha curcas* L.) Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand.

Thepsamran, N., C. Thepsithar and A. Thongpukdee.(2006b). *In vitro* multiple shoot induction of physic nut (*Jatropha curcas*). Department of Biology. Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand.

Ulrich, I. and W. Ulrich. 1991. High-resolution flow cytometry of nuclear DNA in higher plants. Protoplasm 165: 212-215.

Urwin, N. A. R. and J. Horsnell. 2007. Generation and characterization of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. Euphytica 156: 257-266.

Wei, L., H. Dong-nan and C. Xiao-yang. 2007. Polyploid induction of *Lespedeza formosa* by colchicine treatment. Forestry Studies in China 9: 283-286.

Wu, J.H. and P. Mooney. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro Citrus* somatic embryogenesis callus treated with colchicine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: 99-104.

Yokoya, K. A.V. Roberts, J. Mottley, R. Lewis and P.E. Brandham. 2000. Nuclear DNA amounts in Roses. Annals of Botany 85: 557-561.

Zeng, S.H., C.W. Chen., L. Hong., J. H. Liu and X. X. Deng. 2006. *In vitro* induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicines in *Citrus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 87: 85-93.

Zhang, Z., H. Dai and M. Xiao. 2008. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L.. Euphytica 159: 59-65.

Zhou, W.J., P. Hagberg and G.X. Tang. 2002. Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus*. Euphytica 128: 27-34.

Zonneveld, B.J.M. and F.V. Iren. 2000. Flow cytometric analysis of DNA content in *Hosta* reveals ploidy chimeras. Euphytica 111: 105-110.

Zonneveld, B.J.M. 2001. Nuclear DNA contents of all species of *Helleborus* (Ranunculaceae) discriminate between species and section divisions. Plant Systematics and Evolution 229: 125-130.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS

องค์ประกอบ	**ปริมาณสาร (มก./ล.)**
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
KH_4PO_4	170.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10
Glycine	2.00
Sucrose (กรัม)	30.00
วุ้น (กรัม)	7.50
pH	5.7

ตารางภาคผนวกที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์พอลิพลอยด์โดยโฟลไซโทเมทรี

สารเคมี	ปริมาณสาร
Lysis buffer LB01 (Dolezel *et al*., 1989)	
15 mM Tris	363.4 มก.
2 mM Na_2EDTA	148.9 มก.
0.5 mM spermine tetrahydrochloride	34.8 มก.
80 mM KCl	1193 มก.
20 mM NaCl	233.8 มก.
0.1% (v/v) Triton X-100	20 (ไมโครลิตร)
adjust volume to 200 ml	
adjust to pH 7.5 with 1N HCl	
add 200 µl ß–mercaptoethanol (15 mM)	
filter through a 0.22 µm filter	
store at -20 °C in 10 ml aliquots	
Tris buffer	
100 mM NaCl	1461 มก.
10 mM Na_2EDTA	930.6 มก.
0.1% (v/v) Triton X-100	250 (ไมโครลิตร)
10 mM Tris	302.85 มก.
adjust volume to 500 ml	
adjust pH to 7.5	
store at 4 °C	
Propidium iodide stock solution	
1 mg/ml propidium iodide	50 มก.
dissolve in 50 ml H_2O	
filter through a 0.22 µm filter to remove small particles	
store at -20 °C in 0.5 ml aliquots	
PI is available from Molecular Probes Inc., (Eugene, Oregon)	

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

สารเคมี	**ปริมาณสาร**
RNase stock solution	
1 mg/ml RNase (IIA Sigma)	25 มก.
dissolve in 25 ml H_2O	
filter through a 0.22 µm filter to remove small particles	
heat to 90 °C for 15 min to inactivate DNases	
store at -20 °C in 0.5 ml aliquots	

ตารางภาคผนวกที่ 3 สารเคมีที่ใช้ศึกษาโครโมโซม

สารเคมี	**ปริมาณสาร**
Paradichlorobenzene	50 มล.
acetic acid : alcohol	1 : 3
hydrochloric acid	1 (นอร์มอล)
Carbon fuchsin	2%

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวมยุรี แก้วภู่

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110630006

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
ครุศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทั่วไป)	สถาบันราชภัฏภูเก็ต	2541
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยทักษิณ	2546