สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

จำนวนโครโมโซมของต้นสบู่ดำ

นายจิรยุทธ์ ศึกษาศิลป์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67301
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549

b 11622194
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chromosome number of *Jartropha curcas*

Mr. Jirayouth Sueksasin

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for

the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง จำนวนโครโมโซมของต้นสปู่ดำ

นักศึกษา นายจิรยุทธ์ ศึกษาศิลป์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ	ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ	ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชรวาลย์	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง จำนวนโครโมโซมของต้นสบู่ดำ
นักศึกษา นายจิรยุทธ์ ศึกษาศิลป์
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2548
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

เนื่องจากผลผลิตของต้นสบู่ดำนั้น สามารถนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลได้ และยังมีการศึกษาวิจัยถึงเรื่องโครโมโซมในต้นสบู่ดำกันอยู่น้อยมาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมของต้นสบู่ดำ โดยใช้ปลายรากในการเตรียมสไลด์ เพื่อการนำมาพัฒนาเป็นเทคนิคที่ใช้นับโครโมโซมได้ โดยในส่วนของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโครโมโซมนั้น จะแยกเป็น 3 กลุ่ม แบ่งตามลักษณะการ pretreatment ก่อนนำมาทำการเตรียมโครโมโซม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นการ pretreatment ด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 เป็นการ pretreatment ด้วยสารละลาย 8-ไฮดรอกซี่ควิโนลินความเข้มข้น 2 มิลลิโมล และกลุ่มที่ 3 เป็นการศึกษาตัวอย่างโดยไม่มีการ pretreatment ก่อนนำมาทำการเตรียมโครโมโซม และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์หรือเพคติเนสความเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์หรือส่วนผสมระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์หรือเพคติเนสความเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์ในอัตราส่วน 1:1 และไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอมอล จนได้พบสภาวะที่เหมาะสมคือ แช่ปลายรากใน 8-ไฮดรอกซี่ควิโนลินความเข้มข้น 2 มิลลิโมล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืด นำมาใส่สารละลายที่ใช้ตรึงเซลล์ชนิดเมธานอล : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 3 : 1 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที จากการศึกษาพบว่าต้นสบู่ดำมีโครโมโซม 2n = 20 ซึ่งมีขนาดเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Chromosome number of *Jartropha curcas*
Name	Mr. Jirayouth Sucksasin
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic year	2005
Spacial Project Advisor	Assist. Prof. Dr. Supattra Poeaim

ABSTRACT

Because *Jartropha curcas*'s products can be produced as biodiesel and there are few *J.cuscas*'s chromosomes were researched. So, in this experiment we have studied in different methods to get the best slide preparation and counted chromosome numbers of *J. cuscas*. By using root tips in slide preparation for developed technique to count the chromosomes. Studying chromosome slide preparation in optimum condition can be divided into 3 groups by pretreatment. Group 1, pretreated the root tips with 0.1% and 0.2% colchicines solution. Group 2, pretreated the root tips with 2mM 8-hydroxyquinoline solution and without pretreatment. Then hydrolyzed with 2% cellulose or 2% pectinase or mixture between 2% cellulase : 2% pectinase (1:1) and 1 N hydrochloric. The optimum condition was treated the root tips with 2mM 8-hydroxyquiniline at 4°c for 24 hours in the dark. Then was fixed in fixative solution (methanol : acetic acid, 3 : 1) at 4°c for 24 hours and hydrolyzed with 2% cellulase for 2.30 hours . According this experiment, *J. cuscas*'s chromosome number are 2n = 20 and very small size.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่องจำนวนโครโมโซมของต้นสบู่ดำ โครงงานพิเศษนี้จะไม่สามารถลุล่วงไปด้วยดีหากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ให้ความรู้และคำแนะนำที่มีประโยชน์ตลอดทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆ จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ ผศ. ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์ กรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ ในการใช้เครื่องมือและเบิกอุปกรณ์หรือสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาตรีทุกท่านที่ได้ให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆทุกครั้งเป็นอย่างดีเสมอมา ทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินงานต่อไปได้อย่างดี และขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาของข้าพเจ้า ที่เป็นกำลังใจให้ตลอดมา

ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานที่ได้จัดทำขึ้นฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษฉบับนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นายจิรยุทธ์ ศึกษาศิลป์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญรูป.....ฉ
สารบัญตาราง.....ช
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ.....2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....3
2.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับสบู่ดำ.....3
2.2 การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis).....5
2.3 วัฏจักรของเซลล์.....5
2.4 การจำแนกสายพันธุ์โดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์.....7
2.5 งานวิจัยโครโมโซมของต้นสบู่ดำที่เกี่ยวข้อง.....9
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....11
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง.....11
3.2 วัสดุอุปกรณ์.....11
3.2-สารเคมี.....11
3.3 แผนการทดลอง.....12
3.4 วิธีการทดลอง.....12
3.4.1 สายพันธุ์.....12
3.4.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อปลายรากของต้นสบู่ดำ.....12
3.4.2.1 การตัดรากโดยตรงจากต้นสบู่ดำ.....12
3.4.2.2 การเพาะเมล็ด.....12
3.4.3 การเตรียมโครโมโซม.....13
3.4.3.1 การเตรียมตัวอย่าง.....13
3.4.3.2 การตรึงเซลล์.....13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.4.3.3 การย่อย..... 13
3.4.3.4 การเตรียมสไลด์และการย้อมสี..... 13
3.4.3.5 การตรวจนับจำนวนโครโมโซม..... 14
3.4.3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ..... 14
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล..... 15
4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโครโมโซมของต้นสบู่ดำ..... 15
4.1.1 ผลจากการใช้ Colchicines..... 15
4.1.2 ผลจากการใช้ 2 mM 8-hydroxyquinoline..... 15
4.1.3 ผลจากการไม่ได้ผ่านการ Pretreatment..... 15
4.1.4 ผลจากการ Hydrolysis..... 15
4.2 การนับจำนวนโครโมโซมของต้นสบู่ดำ..... 18
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 20
ภาคผนวก..... 21
เอกสารอ้างอิง..... 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของผลอ่อนและเมล็ดของสบู่ดำ.....3
รูปที่ 2 แสดงวัฏจักรของเซลล์.....6
รูปที่ 3 แสดงโครโมโซมของพืชในตระกูล *Jartropha* ในแต่ละสปีชีส์.....10
รูปที่ 4 แสดงลักษณะโครโมโซมของสบู่ดำในระยะเมทาเฟส.....16
รูปที่ 5 แสดงลักษณะการกระจายตัวของโครโมโซมสบู่ดำในระยะเมทาเฟส..... 17
รูปที่ 6 แสดงลักษณะโครโมโซมของสบู่ดำในระยะแอนาเฟส.....18
รูปที่ 7 แผนภูมิแสดงการนับจำนวนโครโมโซมเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์.....19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบข้อดีของสบู่ดำกับปาล์มน้ำมัน.....4
ตารางที่ 2 แสดงผลจากการนับจำนวนโครโมโซมของต้นสบู่ดำ.....18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบันนี้มนุษย์ได้ให้ความสำคัญกับพลังงานทดแทนใหม่ๆเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากพลังงานจากแหล่งต่างๆในโลกเริ่มน้อยลง โดยเฉพาะน้ำมันซึ่งกล่าวกันว่าในอีกไม่กี่ปีข้างหน้านี้น้ำมันที่มีอยู่ได้พิกพนี้ก็จะหมดไป และน้ำมันอาจมีราคาสูงขึ้นไปอีก เพราะฉะนั้น การหาพลังงานทดแทนใหม่ๆเพิ่มขึ้นมานั้นย่อมเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งในตอนนี้นักวิจัยพลังงานทดแทน หลายท่านในประเทศไทยก็ได้ค้นพบว่ายังมีพืชอีกหลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตน้ำมันเชื้อเพลิง ที่สามารถใช้ทดแทนได้ทั้งน้ำมันเบนซินและดีเซล โดยเฉพาะน้ำมันดีเซลที่สามารถนำผลผลิตจากพืชมาใช้ทดแทนได้ถึง 100% ซึ่งเรียกผลผลิตเหล่านี้ว่า ไบโอดีเซล (Biodesel) โดยพืชชนิดที่ให้น้ำมันที่มีความเป็นไปได้ในเชิงเศรษฐกิจที่สุดก็คือ ปาล์ม และ สบู่ดำ

จากสถานการณ์ในปัจจุบันที่น้ำมันในตลาดโลกปรับตัวสูงขึ้น ทำให้ราคาน้ำมันเชื้อเพลิงสูงขึ้นตามไปด้วย และมีแนวโน้มสูงมากขึ้นเรื่อยๆในอนาคต ซึ่งส่งผลกระทบต่อภาคเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก จากการคาดการณ์ ในการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงในประเทศในอนาคต พบว่าจะใช้น้ำมันดีเซลเพิ่มมากขึ้นประมาณ 85 ล้านลิตรต่อวัน รัฐบาลจึงได้มีนโยบายส่งเสริมให้มีการผลิตไบโอดีเซลจากพืชให้มีปริมาณเป็นร้อยละ 10 ของน้ำมันดีเซลทั้งหมดในประเทศ ดังนั้น สบู่ดำจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติหลายประการที่เหมือนกับน้ำมันดีเซล

สบู่ดำ (*Jatropha curcas*) เป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกาใต้ ซึ่งชาวโปรตุเกสได้นำเข้ามาในช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยา เพื่อรับซื้อเมล็ดไปบีบเอาน้ำมันมาทำเป็นสบู่ เพราะมีฟองที่เป็นลักษณะพิเศษนอกจากนี้สบู่ดำยังเป็นยาสมุนไพรชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถใช้รักษาโรคได้หลายอย่าง เช่น ใช้ยางจากก้านใบป้ายรักษาโรคปากนกกระจอก ห้ามเลือด หรือแก้ปวดฟันได้ ส่วนของลำต้นสามารถต้มแก้โรคซาง น้ำมันสามารถใช้บำรุงรากผม และกากสบู่ดำสามารถทำเป็นปุ๋ยอินทรีย์ได้อีกด้วย (http://www.thaijatropha.com)

นอกจากนี้ ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 ประเทศไทยขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับ รถ เรือ หรือแม้แต่จุดตะเกียง ชาวบ้านจึงได้นำเอาเมล็ดสบู่ดำมาตำให้ละเอียด ใส่กระบอกไม่ไผ่ และจุดไฟให้แสงสว่างได้ ดังนั้นจึงได้มีการนำแนวคิดนี้มาใช้ในการสร้างพลังงานทดแทนจากเมล็ดสบู่ดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเวลานี้ หลายๆประเทศในเอเชียก็สามารถผลิตไบโอดีเซลจากสบู่ดำได้สำเร็จ โดยเฉพาะอินเดียและญี่ปุ่น ส่วนในประเทศไทยก็ได้มีการศึกษากันมานาน โดยในตอนแรกๆได้นำเอาน้ำมันจากเมล็ดต่างๆ นำมาทดสอบเดินเครื่องยนต์ดีเซล ซึ่งได้แก่ น้ำมันละหุ่ง น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วลิสง และน้ำมันพืชต่างๆ ผลปรากฏว่าสามารถเดินเครื่องยนต์ดีเซลได้ แต่ถ้าทิ้งไว้หลายวันเครื่องจะติดยากเนื่องจากมียางเหนียวติดที่ลูกสูบ ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการเดินเครื่อง ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาน้ำมันสบู่ดำมาลอง ซึ่งก็สามารถเดินเครื่องได้ดี ไม่มีปัญหาใดๆเกิดขึ้น และยังมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกับน้ำมันดีเซล นอกจากนี้ยังมีไอเสียน้อยกว่าน้ำมันดีเซลอีกด้วย (รักษ์, 2549)

จากที่กล่าวมาข้างต้นนั้น ทำให้เราได้ทราบถึงประโยชน์ของน้ำมันจากต้นสบู่ดำมากขึ้น และเกษตรกรก็หันมาสนใจปลูกพืชชนิดนี้กันมากขึ้นเรื่อยๆ โดยหวังว่าจะขายได้ราคาดี แต่เกษตรกรก็ไม่ได้ทราบถึงสายพันธุ์ ของต้นสบู่ดำว่ามีกี่สายพันธุ์ และสายพันธุ์ใดให้ผลผลิตดี และคุ้มกับต้นทุนในการเพาะปลูกในปริมาณมากๆ และได้ทำการเพราะปลูกไปโดยไม่ทราบถึงข้อมูลที่แท้จริง ดังนั้นจึงได้มีการวิจัยทางพันธุศาสตร์ เพื่อจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีต่างๆ หนึ่งในนั้นคือการศึกษาจำนวนโครโมโซมเพื่อจำแนกสายพันธุ์

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมของต้นสบู่ดำ
2. ศึกษาจำนวนโครโมโซมของต้นสบู่ดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

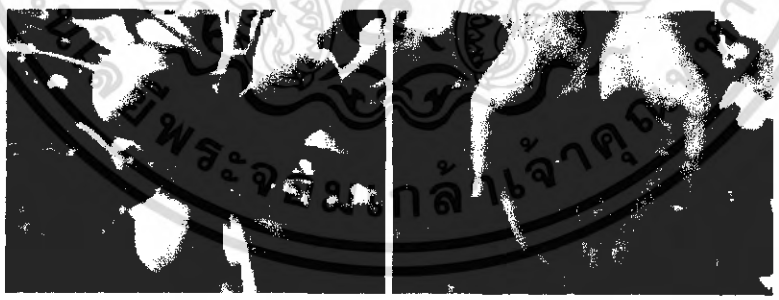
2.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับสบู่ดำ

2.1.1 ชื่อและถิ่นกำเนิด

สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jartropha curcas* เป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกากลาง อยู่ในวงศ์เดียวกันกับยางพารา สบู่แดง เปล้าน้อย ฯลฯ ซึ่งชาวโปรตุเกสนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยในสมัยกรุงศรีอยุธยาตอนปลาย เพื่อรับซื้อเมล็ดกลับไปบีบอัดเอาน้ำมันสำหรับทำสบู่ เพราะมีฟองอันเป็นคุณสมบัติพิเศษ เฉพาะตัว ชาวบ้านทางภาคกลางเรียกว่า "สบู่ดำ" เนื่องจากเปลือก เมล็ดมีสีดำ ภาคเหนือเรียก "มะหุ่งฮั้ว" ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียก "มะเยา" ชาวนครราชสีมาเรียก "สีหลอด" ภาคใต้เรียก "หงเทศ" ภาษายาวีทางภาคใต้เรียก "ยาเคาะ" (http://www.thaijatropha.com)

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลางสูง 2-7 เมตร อายุยืนไม่น้อยกว่า 20 ปี ลำต้นและยอดคล้ายละหุ่งแต่ไม่มีขน ลำต้นเกลี้ยงเกลา เนื้อไม้ไม่มีแก่น ใบคล้ายใบฝ้าย ใบพุดตาน แต่หนากว่า ใบหยัก คล้ายใบละหุ่งแต่หยักตื้น ออกดอกเป็นช่อพวงที่ข้อส่วนปลายของยอด ผลกลมรีเล็กน้อย เมื่อดิบสีเขียวอ่อนดังรูปที่ 1 ก. เวลาแก่สีเหลืองสด แล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ผลหนึ่งมี 2-3 เมล็ดซึ่งเล็กกว่าเมล็ดละหุ่งพันธุ์ขาวดำเล็กน้อย เปลือกเมล็ดสีดำ เนื้อในสีขาว ดังรูปที่ 1 ข. (http://www.thaijatropha.com)



ก. ข.

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของผลอ่อน (ก.) และเมล็ด (ข.) ของสบู่ดำ

แหล่งที่มา : http://www.thaijartropha.com

2.1.3 ประโยชน์และโทษของสบู่ดำ

ปกติเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือปลูกต้นสบู่ดำ เป็นรั้วธรรมชาติบริเวณบ้านเรือน และแปลงปลูกพืชต่างๆ เพื่อป้องกันไม่ให้สัตว์เลี้ยงอันได้แก่ โค กระบือ ม้า แพะ แกะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้าไปทำลายกัดกิน เพราะสัตว์ดังกล่าวไม่กล้าเข้าใกล้เนื่องจากส่วนต่างๆของต้นสบู่ดำมีกลิ่นเหม็นเขียวของกรดไซยานิคเช่นเดียวกับหัวมันสำปะหลัง นอกจากนี้น้ำมันสบู่ดำมีสารที่เรียกว่า เคอร์ซิน (curcin) หากบริโภคแล้วทำให้ท้องเดินเหมือนสลอด ถ้าอาการรุนแรงถ่ายเป็นเลือดอาจถึงตายได้ วิธีแก้ไข เบื้องต้นคือล้างท้องด้วยการทำให้อาเจียน แล้วรีบนำส่งแพทย์โดยเร็ว กากที่บีบอัดเอาน้ำมันออกแล้วใช้เลี้ยงสัตว์ไม่ได้ แต่ใช้เป็นปุ๋ย อินทรีย์ใส่ไม้ผล นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณทางยาคือ สามารถใช้ยางจากก้านใบป้ายริมฝีปากรักษาโรคปากนกกระจอก ใช้ห้ามเลือด และแก้ปวดฟันได้ ใช้ยางผสมกับน้ำนมมารดากวาดปลายลิ้นเด็ก ที่เป็นฝ้าหรือคอเป็นตุ่ม ใช้ส่วนของลำต้นตัดเป็นท่อนต้มน้ำให้เด็กกินแก้โรคซางหรือตาลขโมย หรือแช่น้ำอาบแก้โรคพุพอง และใช้น้ำมันใส่ผมเพื่อบำรุงรากผม ประโยชน์อย่างอื่นใช้เป็นส่วนประกอบทำสบู่ อุตสาหกรรม ทอผ้าขนสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถนำเมล็ดมาผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซล ที่สามารถนำมาใช้แทนน้ำมันดีเซลได้อีกด้วย (รักษ์, 2549)

เมื่อเปรียบเทียบข้อดีของสบู่ดำกับปาล์มน้ำมันจะพบว่าสบู่ดำนั้นจะมีข้อดีมากกว่า เพราะสามารถปลูกได้ในทุกพื้นที่ ทนแล้ง ส่วนราคาไม่ผันผวนมากเหมือนปาล์ม จึงอาจกล่าวว่า ในอนาคตสบู่ดำจะนำหน้าปาล์มสำหรับการใช้เป็นพลังงานทดแทนดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 . แสดงการเปรียบเทียบข้อดีของสบู่ดำกับปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน	สบู่ดำ
1. ใช้เวลามากกว่า 3 ปี จึงจะได้ผล	1. ใช้เวลา 4 เดือนสำหรับกิ่งชำและ 8 เดือนสำหรับเมล็ด
2. พื้นที่หากไม่เหมาะสม ผลผลิตและน้ำมันจะไม่ได้มาตรฐาน ไม่คุ้มค่าการสกัด	2. ปลูกได้ทุกพื้นที่ถึงแม้ผลผลิตต่ำแต่ ก็ยังใช้สกัดน้ำมันได้
3. ต้องมีโรงงานขนาดใหญ่ เพื่อสกัดน้ำมัน	3. เกษตรกรสามารถสกัดน้ำมันได้เอง จากเครื่องชนิดใช้มือหมุน

2.1.4 การขยายพันธุ์

การขยายพันธุ์สบู่ดำมี 2 แบบด้วยกัน แบบแรกคือ ใช้เมล็ดซึ่งไม่มีระยะพักตัว ควรเก็บฝักขณะสีเหลืองแก่แกมสีน้ำตาล แล้วรีบแกะเมล็ดเพาะทันที ซึ่งจะให้ผลผลิตประมาณ 8 เดือนขึ้นไปหลังปลูก แบบที่ 2 คือใช้ท่อนพันธุ์ที่ มีสีน้ำตาลปนเขียวเล็กน้อยยาวประมาณ 45-50 เซนติเมตร เริ่มออกดอกให้ผลผลิต 6-8 เดือน (http://www.thaijartropha.com)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5 สภาพการเพาะปลูก

ฤดูปลูกที่เหมาะสมคือเมษายน ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าเดือนพฤษภาคมถึงกันยายน เนื่องจากธรรมชาติของต้นสบู่ดำส่วนมากเจริญเติบโตสูงขึ้นไปเรื่อยๆ ไม่ค่อยแตกกิ่งแขนงจึงให้ผลผลิตน้อย ดังนั้น ควรตัดแต่ง กิ่งให้แตกกิ่งแขนงเป็นพุ่มสัก 2-3 ครั้งหรือขั้น และมีบางพันธุ์ต้นสูงไม่เกิน 1 เมตรก็แตกกิ่งแขนงเอง ควรใช้ระยะปลูก 2-2.5 เมตรจะได้ผลผลิตสูง แมลงศัตรูที่ควรระวังดูแลพิเศษได้แก่ เพลี้ยหอย เพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง ไรขาว ไรแดง ส่วนโรคเกิดจากเชื้อราซึ่ง จะประสบบ้างและทำความเสียหายพอสมควร ต้นสบู่ดำทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี ส่วนมากให้ผลผลิต 2 ช่วงคือ เดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม และตุลาคมถึงธันวาคม หลังจากนั้นจะทิ้งใบหมดในช่วงฤดูร้อนเมื่อฝนตกจะแตกใบอ่อนออกดอกติดฝัก บางพันธุ์ทยอยให้ผลตลอดปี เมื่อต้นสบู่ดำสูงกว่า 2 เมตร ก็ควรตัดกิ่งลำต้นนำมาขยายพันธุ์ สำหรับพื้นที่ที่จะปลูก ควรเลือกที่ดอน น้ำไม่ท่วมขัง กลางแจ้งแดดจัด ไม่อยู่ใต้ร่มเงาต้นไม้ใหญ่ และปลูกบนคันนา (http://www.thaijartropha.com)

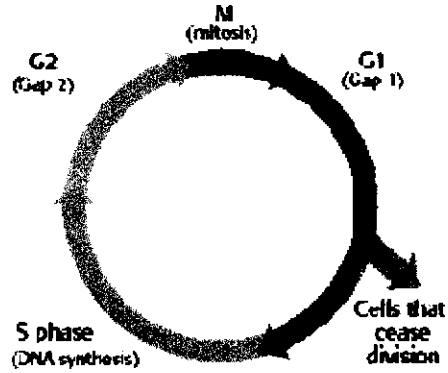
2.2 การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis)

การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส เป็นการแบ่งเซลล์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ของร่างกายในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ หรือแบ่งเซลล์เพื่อการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว และหลายเซลล์บางชนิดเช่นพืช ซึ่งการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสนั้นจะไม่มีการลดจำนวนชุดโครโมโซม เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์จะได้ 2 เซลล์ใหม่ที่มีโครโมโซมเท่าๆ กัน และเท่ากับเซลล์ตั้งต้น พบที่เนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายยอด, ปลายราก, แคมเบียม ของพืช ซึ่งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสนั้นจะแบ่งออกเป็น 5 ระยะ คือ อินเตอร์เฟส (interphase), โพรเฟส (prophase), เมตาเฟส (metaphase), แอนาเฟส (anaphase) และเทโลเฟส (telophase) ซึ่งรวมเรียกว่า วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) (www.anamai.moph.go.th)

2.3 วัฏจักรของเซลล์ (www.anamai.moph.go.th)

วัฏจักรของเซลล์ หมายถึง ช่วงระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ในขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัว ซึ่งประกอบด้วย 2 ระยะได้แก่ ระยะ interphase ที่ประกอบด้วยระยะ G1, S, G2 และระยะของกระบวนการแบ่งเซลล์ (mitosis) ดังรูปที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงวัฏจักรของเซลล์

ที่มา : http://www.anamai.moph.go.th

2.3.1 ระยะอินเตอร์เฟส

ระยะนี้เป็นระยะเตรียมตัว ที่จะแบ่งเซลล์ในวัฏจักรของเซลล์ แบ่งออกเป็น 3 ระยะย่อย คือ ระยะ G1 เป็นระยะก่อนการสร้าง DNA ซึ่งเซลล์มีการเจริญเติบโตเต็มที่ ระยะนี้จะมีการสร้างสารบางอย่าง เพื่อใช้สร้าง DNA ระยะต่อไปคือระยะ S เป็นระยะสร้าง DNA (DNA replication) โดยเซลล์มีการเจริญเติบโต และมีการสังเคราะห์ DNA อีก 1 ชุด หรือมีการจำลองโครโมโซม อีก 1 เท่าตัว แต่โครโมโซมที่จำลองขึ้น ยังติดกับแท่งเก่า ที่ปมเซนโทรเมียร์ (centromere) หรือไคเนโตคอร์ (kinetochore) ระยะนี้ใช้เวลานานที่สุด ระยะสุดท้ายคือระยะ G2 เป็นระยะหลังสร้าง DNA ซึ่งเซลล์มีการเจริญเติบโต และเตรียมพร้อมที่จะแบ่งโครโมโซม และไซโทพลาสซึมต่อไป

2.3.2 ระยะไมโทซิส

ระยะไมโทซิส เป็นระยะที่มีการแบ่งนิวเคลียส และแบ่งไซโทพลาสซึม ซึ่งโครโมโซมจะมีการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน ก่อนที่จะถูกแบ่งแยกออกจากกัน ประกอบด้วย 4 ระยะย่อย คือ โพรเฟส เมทาเฟส แอนาเฟส และเทโลเฟส

2.3.2.1 ระยะโพรเฟส

ระยะนี้โครมาทิดจะหดตัว โดยการบิดเป็นเกลียวสั้นลง ทำให้เห็นได้ชัดเจนมากขึ้นว่า โครโมโซม 1 แท่งมี 2 โครมาทิดโดยที่เซนทริโอล (centrioles) ในเซลล์สัตว์ และโพรติสท์บางชนิด เช่น สาหร่าย รา จะเคลื่อนที่แยกไปอยู่ตรงข้ามกัน ในแต่ละขั้วเซลล์และสร้างเส้นใยโปรตีน (microtubule) เรียกว่า ไมโทติกสปินเดิล (mitotic spindle) และสปินเดิลไฟเบอร์ (spindle fiber) ไปเกาะที่เซนโทรเมียร์ของทุกโครมาทิด ดังนั้น รอบๆ เซนทริโอล จึงมีไมโทติกสปินเดิล ยื่นออกมาโดยรอบมากมาย เรียกว่า แอสเทอร์ (aster) สำหรับในเซลล์พืช ไม่มีเซนทริโอลแต่มีไมโทติกสปินเดิลการกระจายออกจากขั้วที่อยู่ตรงข้ามกัน (polar cap)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.2 ระยะเมทาเฟส

ระยะนี้ไมโทติกสปินเดิลจะหดตัว ดึงให้โครมาทิดไปเรียงตัวอยู่ในแนวกึ่งกลางเซลล์ (equatorial plate) ซึ่งเป็นระยะที่โครมาทิดหดสั้นมากที่สุด จึงเหมาะต่อการนับจำนวนโครโมโซมและจัดเรียงโครโมโซมเป็นคู่ๆ หรือที่เรียกว่าคารีโอไทป์ (karyotype) และเหมาะต่อการศึกษารูปร่าง ความผิดปกติของโครโมโซม ตอนปลายของระยะนี้มีการแบ่งตัวของเซนโทรเมียร์ทำให้โครมาทิดพร้อมที่จะแยกจากกัน

2.3.2.3 ระยะแอนาเฟส

ระยะนี้ไมโทติกสปินเดิล หดสั้นเข้า ดึงให้โครมาทิดแยกตัวออกจากกัน แล้วโครมาทิด จะค่อยๆ เคลื่อนไปยังแต่ละขั้วของเซลล์ โครโมโซมจะเพิ่มจาก 2n เป็น 4n ระยะนี้จะเห็นโครโมโซม มีรูปร่างคล้ายอักษรตัววี (V), ตัวเจ (J) และตัวไอ (I) ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ว่าอยู่กึ่งกลางของโครโมโซม หรือค่อนข้างปลาย หรือเกือบปลายสุด

2.3.2.4 ระยะเทโลเฟส

เป็นระยะสุดท้ายของการแบ่งเซลล์ โดยโครมาทิดที่แยกออกจากกัน จะเรียกเป็นโครโมโซมลูก (daughter chromosome) ซึ่งจะไปรวมกลุ่มในแต่ละขั้วของเซลล์ มีการสร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียส ล้อมรอบโครโมโซม และนิวคลีโอลัสปรากฏขึ้น ไมโทติกสปินเดิลสลายไป มีการแบ่งไซโทพลาสซึมเกิดขึ้น ซึ่งในเซลล์พืชนั้น กอลจิคอมเพลกซ์จะสร้างเซลลูโลส มาก่อตัวเป็นเซลล์เพลท (cell plate) หรือแผ่นกั้นเซลล์ ตรงกลางเซลล์ ขยายไป 2 ข้างของเซลล์ ซึ่งต่อมาเซลล์เพลทจะกลายเป็นส่วนของผนังเซลล์ ผลสุดท้าย จะได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ ที่มีขนาดเท่ากันเสมอ โดยนิวเคลียสของเซลล์ใหม่ มีองค์ประกอบ และสมบัติเหมือนกัน และมีสภาพเหมือนกับนิวเคลียสในระยะอินเตอร์เฟสของเซลล์เริ่มต้น

2.4 การจำแนกสายพันธุ์โดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์

การจำแนกสายพันธุ์โดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์นั้นแบ่งการศึกษาออกได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ การศึกษาจำนวนโครโมโซม เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และเทคนิค RFLP (Restriction Fracment Length Polymorphism) ซึ่งด้านการศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชนั้นมีการศึกษาดังต่อไปนี้

Martinez-Gomez และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาเทคนิคการนับโครโมโซมของอัลมอนด์ โดยนำปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย 0.2% colchicine เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงตรึงใน methanol, propionic acid, chloroform (6 : 3 : 2) ที่ 5 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาย่อยด้วย 1N HCl ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 20 นาที แล้วจึงย้อมสีด้วย 45% aceto-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

orcein เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปทำการนับโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งผลการทดลองพบว่า อัลมอนด์มีโครโมโซมเป็น 2n = 16

Forni-Martins และ Calligaris (2002) ได้ทำการศึกษาเทคนิคการนับโครโมโซมของพืชในแฟมิลี่ Limnocharitaceae ซึ่งได้ทำการศึกษากับ *L. flava*, *L. laforestii* และ *H. nymphoides* ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ นำปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย paradichlorobenzene (PDB) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วจึงตรึงใน Carnoy solution เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาย่อยด้วย 5N HCl เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงย้อมด้วยสี 2% Giemsa เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปทำการนับโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งผลการทดลองพบว่า *L. flava* กับ *L. laforestii* มีโครโมโซมเป็น 2n = 20 และ *H. nymphoides* มีโครโมโซมเป็น 2n = 16

Rout และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาเทคนิคการนับโครโมโซมของ*Cephaelis ipecacuanha* ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ นำปลายรากมาบ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงตรึงใน acetic acid-ethanol (1:3, v/v) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้วจึงย้อมสีด้วย Feulgen และนำไปทำการนับโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งผลการทดลองก็คือ *Cephaelis ipecacuanha* มีโครโมโซมเป็น 2n = 22

Lin และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาโครโมโซมของพืชในตระกูล *Phalaenopsis* โดยนำปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย 2mM 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงตรึงใน ethanol-glacial acetic acid (3:1)ข้ามคืน พบว่า *phalaenopsis* มีโครโมโซมเป็น 2n = 38 ทุกสปีชีส์

Speranza และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาคารีโอไทป์ของ *Paspalum quadrifarium* โดยนำปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย 2mM 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงตรึงใน ethanol-glacial acetic acid (3:1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่า *Paspalum quadrifarium* มีโครโมโซมเป็น 2n = 3x = 30

Garcia-Jacas (1998) ได้ทำการศึกษาโครโมโซมของ *Centaurea kunkelii* โดยนำปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย 2mM 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วจึงตรึงใน ethanol-glacial acetic acid (3:1)เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่า *Centaurea kunkelii* มีโครโมโซมเป็น 2n = 110

Demelo และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาโครโมโซมของพืชในตระกูล *Passiflora* โดยนำปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย 2mM 8-hydroxyquinoline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงตรึงใน ethanol-glacial acetic acid (3:1) ข้ามคืน ซึ่งพบว่า *Passiflora* แต่ละสายพันธุ์นั้นมีโครโมโซมดังนี้คือ *P. misera* มีโครโมโซมเป็น 2n = 36 และ *P. herbertiana, P.capsularis, P. tricuspis, P. curiacea, P. morifolia* นั้นมีโครโมโซมเป็น 2n = 12

Frame (2001) ได้ทำการศึกษาโครโมโซมของพืชในตระกูล *Schoenocaulon* โดยนำปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย μ-bromonaphthalene ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วจึงตรึงใน ethanol-glacial acetic acid (3:1)เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาย่อยด้วย 1N HCl เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งพบว่า พืชในตระกูล *Schoenocaulon* มีโครโมโซมเป็น 2n = 16 ทุกสปีชีส์

Mraz (2003) ได้ทำการศึกษาโครโมโซมของ *Hieracium pietroszense* โดยนำปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย 0.5% colchicine เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วจึงตรึงใน ethanol-glacial acetic acid (3:1) จากนั้นนำมาย่อยด้วย 1N HCl เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งพบว่า *Hieracium pietroszense* มีโครโมโซมเป็น 2n = 36

Nassar (2003) ได้ทำการเตรียมโครโมโซมของ *Manihot esculenta* โดยนำปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย 0.2% colchicineเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงตรึงใน acetic alcohol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย่อยด้วย 1N HCl เป็นเวลา 10 นาที ซึ่ง *Manihot esculenta* มีโครโมโซมเป็น 2n = 36

Hayirlioglu-Ayaz (2000) ได้ทำการศึกษาโครโมโซมของพืชในตระกูล *Alchemilla* โดยนำปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย 0.5% colchicines เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงตรึงใน ethanol-glacial acetic acid (3:1)เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย่อยด้วย 1N HCl เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งพบว่า 75% ของพืชในตระกูล *Alchemilla* มีโครโมโซมตั้งแต่ 2n = 86 ขึ้นไป

Ivanova และ Piekos-mirkowa H. (2003) ได้ทำการศึกษาโครโมโซมของ Polish fern ซึ่งได้แก่ *Asplenium viride, Athyrium filix-femina, Dryopteris filix-mas, Gymnocarpium dryopteris, Gymnocarpium robertianum, Phegopteris connectilis, Phyllitis scolopendrium subsp. scolopendrium* โดยนำปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย 0.5% colchicineเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงตรึงใน 96%ethanol-glacial acetic acid (3:1) ซึ่งพบว่า *Asplenium viride* มีโครโมโซมเป็น 2n = 72 *Athyrium filix-femina* มีโครโมโซมเป็น 2n = 80 *Dryopteris filix-mas* มีโครโมโซมเป็น 2n = 164 *Gymnocarpium dryopteris* มีโครโมโซมเป็น 2n = 160 *Gymnocarpium robertianum* มีโครโมโซมเป็น2n=160 *Phegopteris connectilis* มีโครโมโซมเป็น 2n = 90 *Phyllitis scolopendrium subsp. scolopendrium* มีโครโมโซมเป็น 2n = 72

2.5 งานวิจัยโครโมโซมของต้นสบู่ดำที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่ได้เคยศึกษากันมาก่อนหน้านี้ดังเช่นงานวิจัยของ Soontornchainaksaeng และ Jenjittikul (2003) ซึ่งได้ศึกษาโครโมโซมของต้นสบู่ดำ (*J. curcas*) ในประเทศไทยรวมทั้งสปีชีส์ข้างเคียงด้วยได้แก่ *J. gossypifolia, J. integerrima, J. multifida* และ *J. podagrica* ได้รายงานว่า ต้นสบู่ดำและสปีชีส์ข้างเคียงทุกๆตัวนั้น มีโครโมโซม 2n = 22 และมีขนาดเล็กมาก โดยทำการศึกษาจากเซลล์บริเวณตาดอก (flower bud) โดยการย้อมด้วยสี propionocarmine และได้นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดที่กำลังขยาย 100 เท่า เป็นจำนวน 25 เซลล์ พบว่าทุกสปีชีส์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n = 22 ดังแสดงในรูปที่ 3ก, ข, ค, ง, จ และ ฉ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3 แสดงโครโมโซมของพืชในตระกูล *Jartropha* ในแต่ละสปีชีส์ โดยที่

รูป ก. แสดงโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของ *J. curcas*

รูป ข. แสดงโครโมโซมในระยะแอนาเฟสของ *J. gossypifolia*

รูป ค. แสดงโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของ *J. integerrima*

รูป ง. แสดงโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของ *J. integerrima*

รูป จ. แสดงโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของ *j. multifida*

รูป ฉ. แสดงโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของ *j. podagrica*

แหล่งที่มา : Soontornchainaksaeng และ Jenjittikul (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างเนื้อเยื่อปลายรากของต้นสบู่ดำสายพันธุ์ต่างๆ 3 สายพันธุ์

3.2 วัสดุอุปกรณ์

1. มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
2. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
3. ปากคีบ
4. เข็มเขี่ย
5. จานเพาะเชื้อ
6. หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
7. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
8. ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
9. กล้องจุลทรรศน์แบบพื้นหลังสว่างพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
10. กล้องถ่ายภาพ
11. เครื่องนับเซลล์
12. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ
13. ฟอยล์
14. ผ้าก๊อซสำหรับเช็ดสไลด์

3.2 สารเคมี

1. HCl
2. Colchicine
3. 8-hydroxyquinolin
4. Cellulase
5. Pectinase
6. Methanol
7. Glacial acetic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. 70% alcohol
9. Aceto-orcein

3.3 แผนการทดลอง

การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโครโมโซมของต้นสบู่ดำโดยในส่วนนี้นั้น จะแยกเป็น 3 กลุ่ม แบ่งตามลักษณะการ pretreatment ก่อนนำมาทำการเตรียมโครโมโซม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นการ pretreatment ด้วยสารละลาย 0.1% และ 0.2% colchicine กลุ่มที่ 2 เป็นการ pretreatment ด้วยสารละลาย 2mM 8-hydroxyquinoline และกลุ่มที่ 3 เป็นการศึกษาตัวอย่างโดยงดการ pretreatment ก่อนนำมาทำการเตรียมโครโมโซม

ส่วนที่ 2 ศึกษาจำนวนโครโมโซมของต้นสบู่ดำ

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 สายพันธุ์ (Sample)

สายพันธุ์ของต้นสบู่ดำที่ได้นำมาทำการทดลองนั้น มีด้วยกัน 3 สายพันธุ์คือ

- สายพันธุ์คอมโพสิท
- สายพันธุ์ที่นำมาจากกรมวิชาการเกษตร
- สายพันธุ์ที่นำมาจากสมาคมศิษย์เก่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.4.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อปลายรากของต้นสบู่ดำ (Root Preparation)

3.4.2.1 การตัดรากโดยตรงจากต้นสบู่ดำ

1. นำต้นสบู่ดำที่ยังมีขนาดเล็กอยู่ขึ้นมาจากดิน ล้างน้ำแล้วทำการตัดรากฝอยออกเพื่อเป็นการกระตุ้นให้เกิดการงอกรากใหม่ขึ้นมา
2. นำรากลงไปวางไว้ในถุงพลาสติกที่มีดินผสมรวมกับน้ำแล้วทิ้งไว้ 1-2 วัน เพื่อให้เกิดรากใหม่งอกขึ้นมา
3. ตัดเอาปลายรากออกมาประมาณ 1-2 เซนติเมตรและล้างน้ำเพื่อเอาดินออก แล้วจึงนำมาทำการทดลอง

3.4.2.2 การเพาะเมล็ด

1. นำเมล็ดสบู่ดำมาแช่ในน้ำแล้วทิ้งไว้ 1 คืน
2. นำเมล็ดสบู่ดำมาวางบนจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษทิชชู่ที่ชุ่มน้ำวางอยู่
3. ทิ้งไว้ประมาณ 3 วันเพื่อให้เกิดรากงอกออกมาแล้วจึงตัดปลายรากมาทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การเตรียมโครโมโซม (Chromosome preparation)

3.4.3.1 การเตรียมตัวอย่าง (Pretreatment)

แบ่งตัวอย่างเนื้อเยื่อรากที่จะทำการ pretreatment ออกเป็น 3 การทดลอง

- การทดลองที่ 1 ทำการ pretreatment ด้วย 0.1% และ 0.2% colchicine ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง
- การทดลองที่ 2 ทำการ pretreatment ด้วย 2 mM 8-hydroxyquinoline โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 อยู่ในอุณหภูมิห้อง ส่วนที่ 2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยที่แต่ละส่วนใช้เวลา 4 , 8 และ 24 ชั่วโมงในที่มืด
- การทดลองที่ 3 ไม่ทำการ pretreatment โดยใช้รากที่ตัดออกมาใหม่ๆมาทำการทดลองโดยไม่ผ่านการ pretreatment ด้วย colchicine และ 8-hydroxyquinoline

3.4.3.2 การตรึงเซลล์ (Fixation of sample)

หลังจากทำการ pretreatment ตามเวลาที่กำหนดไว้แล้วจึงนำตัวอย่างรากมาแช่ในน้ำยา fixative ซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่าง methanol และ acitic acid ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้ หลังจากนั้นจึงเก็บไว้ใน 70% ethanol จนกว่าจะใช้อีกครั้ง

3.4.3.3 การย่อย (Hydrolysis)

เมื่อผ่านการแช่น้ำยาคงสภาพ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเข้าสู่ขั้นตอนการย่อย ซึ่งการย่อยก็จะแบ่งเป็นการย่อย 4 แบบ ดังนี้

- แบบที่ 1 ย่อยด้วยเอนไซม์ 2% cellulase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที
- แบบที่ 2 ย่อยด้วยเอนไซม์ 2% pectinase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที
- แบบที่ 3 ย่อยด้วยส่วนผสมระหว่างเอนไซม์ 2% cellulase และ 2% pectinase ในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที
- แบบที่ 4 ย่อยด้วย 1N HCl เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที

3.4.3.4 การเตรียมสไลด์และการย้อมสี (Slide preparation and staining)

หลังจากผ่านการ hydrolysis แล้ว จึงนำสไลด์มาย้อมสีโดยการนำตัวอย่างรากที่ผ่านการย่อยแล้วมาตัดเอาเฉพาะส่วนปลายรากแล้วนำมาวางบนสไลด์ ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำยาคงสภาพ และเช็ดด้วยผ้าก๊อซแล้ว จากนั้นตัดแบ่งครึ่งปลายรากออกเป็น 2 ส่วนเพื่อทำให้ได้เนื้อเยื่อรากที่บางลงแล้วจึงหยดน้ำยาคงสภาพ ลงไปบนตัวอย่าง 3-5 หยด เพื่อเป็นการล้างเนื้อเยื่อรากให้สะอาด หยดสี 2% aceto-orcein ลงไปบนตัวอย่าง 3-5 หยด ทิ้งไว้ 5 นาที ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำเอาปลายของเข็มเขี่ยกดลงไปบนกระจกปิดสไลด์ อีก 2-3 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างรากแบนราบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ พอให้สไลด์อุ่น เพื่อให้โครโมโซมกระจายตัวได้ดีขึ้น แล้วทำ squash technique โดยการใช้กระดาษทิชชู่วางบนสไลด์ แล้วใช้หัวแม่มือกดทับลงไป

3.4.3.5 การตรวจนับจำนวนโครโมโซม (Microscopic observation and counting)

นำสไลด์ที่ได้มาศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 4 เท่า, 10 เท่า, 40 เท่า และ 100 เท่า จากนั้นจึงถ่ายรูปเซลล์ที่มีโครโมโซมในระยะเมทาเฟส และทำการนับโครโมโซม

3.4.3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ทำการนับจำนวนโครโมโซมในระยะเมทาเฟสจำนวนไม่น้อยกว่า 50 เซลล์ นำมาหาค่าความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่นับได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโครโมโซมของต้นสบู่ดำ

4.1.1 ผลจากการใช้ colchicine

เมื่อนำตัวอย่างปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย 0.1% และ 0.2% colchicine ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 , 2 , 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่าการใช้ 0.1% colchicine ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง นั้นสามารถพบโครโมโซมในระยะเมทาเฟสได้มากที่สุด โดยที่หลังจากชั่วโมงที่ 2 ไปแล้วจะเห็นโครโมโซมในระยะเมทาเฟสน้อยหรือหดสั้นลงจึงทำให้นับโครโมโซมได้ยาก ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Nassar (2003) ที่ใช้ 0.2% colchicine ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง แล้วให้ผลดีที่สุด ซึ่งอาจจะเป็นเพราะสายพันธุ์ของพืชนั้นแตกต่างกัน

4.1.2 ผลจากการใช้ 2 mM 8-hydroxyquinoline

เมื่อนำตัวอย่างปลายรากมาทำการ pretreatment ด้วย 2 mM 8-hydroxyquinoline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ที่เวลา 4, 8 และ 24 ชั่วโมงในที่มืด พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซียลเซียสนั้นสามารถพบโครโมโซมในระยะเมทาเฟสได้ดีที่สุด และสามารถนับโครโมโซมได้ง่ายกว่าการใช้ colchicine ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Demelo และคณะ (2001) ที่ใช้ 2 mM 8-hydroxyquinoline ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซียลเซียส แล้วให้ผลดีที่สุดถึงแม้ว่าจะเป็นพืชที่ต่างสายพันธุ์กัน

4.1.3 ผลจากการไม่ได้ผ่านการ pretreatment

เนื้อเยื่อรากที่ไม่ได้ผ่านการ pretreatment นั้น จะพบเพียงโครโมโซมที่อยู่ในระยะอินเตอร์เฟสเท่านั้น ซึ่งมีระยะเมทาเฟสอยู่น้อยมาก ซึ่งแตกต่างกับการทดลองของ Rout และคณะ (2000) ซึ่งได้ใช้แคลลัสในการทดลองและไม่ได้ทำการ pretreatment แต่สามารถนับโครโมโซมในระยะเมทาเฟสได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะแคลลัสนั้นไม่มีผนังเซลล์จึงสามารถพบโครโมโซมในระยะเมทาเฟสได้มากขึ้น

4.1.4 ผลจากการ Hydrolysis

ในขั้นตอนของการย่อยเนื้อเยื่อรากนั้น จากการย่อยด้วยเอนไซม์ 2% cellulase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงครึ่งนั้น สามารถย่อยผนังเซลล์ได้ดีที่สุดเนื่องจากสามารถเห็นโครโมโซมภายในเซลล์ได้ชัดเจนที่สุด 1N HCl นั้นย่อยผนังเซลล์ได้น้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากสภาพของเซลล์นั้นยังมีผนังเซลล์ให้เห็นอยู่มาก และมองเห็นโครโมโซมภายในได้ไม่ชัดเจนซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Framec (2001), Mraz (2003), Nassar (2003), Hayirlioglu-Ayaz และ Beyazoglu (2000) ซึ่งใช้ 1N HCl ในการย่อยแล้วสามารถศึกษาโครโมโซมในระยะเมตาเฟสได้โดยไม่ต้องใช้เอนไซม์เลย ซึ่งอาจเป็นเพราะความหนาของผนังเซลล์ของพืชนั้นแตกต่างกันทำให้สามารถย่อยผนังเซลล์ได้

จากผลการทดลองสามารถศึกษาโครโมโซมได้โดยใช้สภาวะที่ดีที่สุดนั่นก็คือทำการ pretreatment ด้วย 2 mM 8-hydroxyquinoline ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซียลเซียส และย่อยด้วยเอนไซม์ 2% cellulase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาทีซึ่งสามารถเห็นโครโมโซมในระยะเมทาเฟสได้ดังรูปที่ 4 สามารถเห็นการกระจายตัวของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสได้ดังรูปที่ 5 ซึ่งสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ในระนาบหนึ่งๆ ดังรูปที่ 5 ก, ข และ ค ซึ่งสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ 14, 16 และ 18 เซลล์ตามลำดับ และบางเซลล์นั้นสามารถเห็นโครโมโซมในระยะแอนาเฟสดังรูปที่ 6

รูปที่ 4 แสดงโครโมโซมของสบู่ดำในระยะเมทาเฟส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 5 แสดงการกระจายตัวของโครโมโซมสบู่ดำในระยะเมทาเฟส
ก. นับจำนวนโครโมโซมได้ 14 แท่ง
ข. นับจำนวนโครโมโซมได้ 16 แท่ง
ค. นับจำนวนโครโมโซมได้ 18 แท่ง

67301
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 6 แสดงโครโมโซมของสบู่ดำในระยะแอนาเฟส

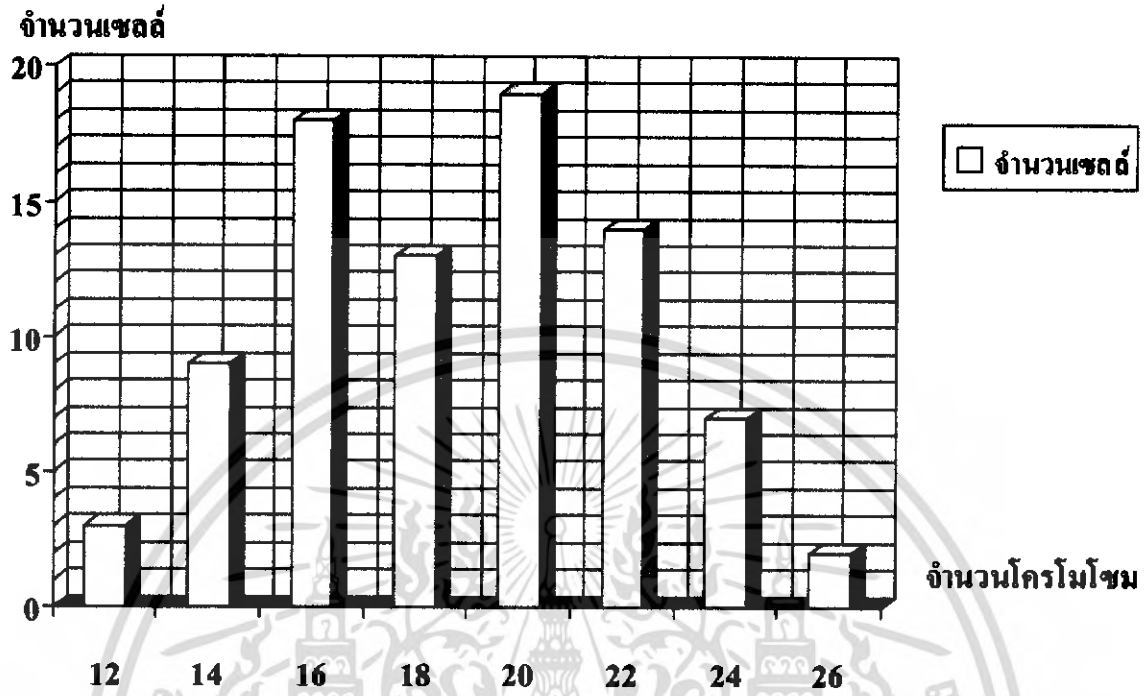
4.2 การนับจำนวนโครโมโซมของต้นสบู่ดำ

จากการเลือกเอาสไลด์ของตัวอย่างสายพันธุ์ที่นำมาจากกรมวิชาการเกษตรมาศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า และนับโครโมโซมในระยะเมทาเฟสจำนวน 85 เซลล์พบจำนวนโครโมโซมในแต่ละเซลล์มีจำนวนตั้งแต่ 12 แท่งถึง 26 แท่งและสามารถนำมาวิเคราะห์หาจำนวนโครโมโซมได้จากค่าความถี่และแสดงผลได้ดังตารางที่ 2 สามารถแสดงเป็นแผนภูมิได้ดังรูปที่ 7

ตารางที่ 2 แสดงผลจากการนับจำนวนโครโมโซมของต้นสบู่ดำ

จำนวนโครโมโซม	จำนวนเซลล์ทั้งหมด	อัตราส่วนของเซลล์ทั้งหมด 85 เซลล์ (%)	จำนวนโครโมโซม	จำนวนเซลล์ทั้งหมด	อัตราส่วนของเซลล์ทั้งหมด 85 เซลล์ (%)
12	3	3.53	**20**	19	22.35
14	9	10.59	**22**	14	16.47
16	18	21.18	**24**	7	8.24
18	13	15.29	**26**	2	2.35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 แผนภูมิแสดงจำนวนโครโมโซมที่นับได้เปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์

จากแผนภูมิพบว่าจำนวนโครโมโซมที่นับได้ 20 โครโมโซมพบในความถี่สูงสุด ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าสบู่ดำมีโครโมโซม 20 แท่ง ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาโครโมโซมสบู่ดำของ Soontornchainaksaeng และ Jenjittikul (2003) ที่พบว่า *J. curcas* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 อาจมีปัจจัยหลายประการตั้งแต่สายพันธุ์ของสบู่ดำที่นำมาศึกษา วิธีการเตรียมสไลด์ รวมทั้งขั้นตอนการนับจำนวนโครโมโซม โดยสายพันธุ์ของสบู่ดำนั้น ในปัจจุบันมีการผสมข้ามสายพันธุ์ จึงทำให้มีโครโมโซมต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโครโมโซมของต้นสบู่ดำนั้น สามารถสรุปวิธีการที่เหมาะสมได้ดังนี้คือ นำตัวอย่างเนื้อเยื่อรากของต้นสบู่ดำมาทำการ pretreatment ด้วย 2 mM 8-hydroxyquinoline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในที่มืดหลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างรากมาแช่ในน้ำยาคงสภาพ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มด้วยเอนไซม์ 2% cellulase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30นาที และนับโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า จากการทดลองการนับโครโมโซมของต้นสบู่ดำได้ 20 แท่ง มีความถี่สูงสุด

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากต้นสบู่ดำนั้นมีโครโมโซมขนาดเล็กมากถ้าจะให้ผลการศึกษาแม่นยำมากขึ้นควรศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายมากกว่า 100 เท่า ควรทำการนับจำนวนเมทาเฟสเซลล์มากขึ้นและมีการศึกษาเปรียบเทียบในหลายๆสายพันธุ์ รวมทั้งศึกษาสบู่ดำจากแหล่งหรือพื้นที่ต่างๆด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

รักษ์ พฤกษชาติ. 2549. การปลูกและการพัฒนาสบู่ดำเพื่อทดแทนน้ำมันดีเซล. นนทบุรี : สำนักพิมพ์นีออนบุ๊คมีเดีย.

Adetula O. A., Fatokun C. A. and Obigbesan G. 2005. Centromeric banding pattern of mitotic chromosome in *Vigna vexillata* (TVnu73). *African Journal of Biotechnology*. 4(5) : 400-405.

Ateeq B., Farah M. A., Ali M. N. and Ahmad W. 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2, 4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutation Research*. 514 : 105-113.

Baluska F., Samaj J.,Volkmann D. and Barlow P. W. 1997. Impact of taxol-mediat destabilization of microtubules on nuclear morphology, ploidy levels and cell growth in maize roots. *biology of the cell*. 89 : 221-231 .

Costa J. Y. and Forni-martins E. R. 2004. A triploid cytotype of *Echinodorus tennellus*. *Aquatic Botany*. 79 : 325-332.

Demelo N. F., Cervi A. C. and Guerra M. 2001. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant Syst . Evol*. 226 : 69-84.

Forni-Martins E. R. and Calligaris K. P. 2002.Chromosomal studies on Neotropical Limnocharitaceae (Alismatales). *Aquatic Botany*. 74 : 33-41.

Frame D. 2001. Chromosome studies in *Schoenozaulon* (Liliaceceae : Melanthieae) a relict genus . *Serie botanica*.72(2) : 123-129.

Garcia-Jarcas N. 1998. *Centaurea kunkelii* (Asteraceae, Cardueae), a new hybridogenic endecaploid species of sect. *Acrocentron* from Spain. *Ann. Bot. Fennici*. 35 : 159-167.

Hayirlioglu-Ayaz S. and Osman Beyazoglu. 2000. Chromosome numbers in species of *Alchemilla* ser. *Elatae* (Rosaceae) in Turkey. *Ann. Bot. Fennici*. 37 : 173-182.

Ivanova D. and Piekos-mirkowa H. 2003. Chromosome numbers of polish ferns. *Acta biologica cracoviensia series botanica*. 45/2 : 93-99.

Jahan Q. and Vahidy A. A. 1929. Karyotype analysis of hexaploid wheat, *Triticum aestirum* L. CV. 'Sarsabz'. *Journal of islamic Academy of Science S*. 2, 3 : 179-181.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lim K., Jong H., Yang T., Park J., Kwon S., Kim J. S., Lim M., Kim J. A., Jin M., Jin Y., Kim S.H., Lim P.L., Bang J., Kim H. and Park B. 2005. Characterization of rDNAs Tendem Repeats in the Heterochromatin of *Brassica rapa*. *Mol . Cell.* 19 : 436-444.

Lin C., Chen Y., Chen W., Chen W., Chen C. and Kao Y. 2005. Genome organization and relationships of *Phalaenopsis* orchids inferred form genomic in situ hybridization. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46 : 339-345.

Martinez-Gomez P., Sanchez-Perez R. and Vaknin Y. 2005. Improved technique for counting chromosomes in almond. *Scientia Horticulturae*. 105 : 139-143.

Meric C. and Dane F. 1999. Karyological Studies On *Vicia satira* L. subsp. *Incise* (Bieb.) Arc. var. *incisa*. *Tr. J. of Botany*. 23 : 63-67.

Mraz P. 2003. The *Hieraciun deylii* group in the Carpathians. *Folia Geobotanica*. 38 : 299-318.

Nassar M. A. 2003. Gene flow between cassava, *Manihot esculenta* Crantz, and wild relatives . *Genet. Mol. Res*. 2(4) : 334-347.

Qu L., Wang X., Hood E., Wang M. and Scalzo R. 2004. Chromosome Karyotypes of *Echinacea angustifolia* var. *angustifolia* and *E. purpurea*. *Hort Science*. 39(2) : 368-370.

Rout G. R., Samantaray S. and Das P. 2000. In vitro somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae*. 86 : 71-79.

Saito H., Reiko M., Tanaka S., Adachi Y. and Nakano M. 2003. ploidy estimation in *Hemerocallis* species and cultivars by flow cytometry. *Scientia Horticulturae*. 97 : 185-192.

Soontornchainaksaeng P. and Jenjittikul T. 2003. Karyology of *Jartropha* (Euphorbiaceae) in Thailand. *Thai for bull (BOT.)*. 31 : 105-112.

Speranza P., Vaio M. and Mazzella C. 2003. Karyotypes of two cytotypes of *Paspalum Quadrifarium* Lam. (Poaceae). An alternative technique for small chromosomes in plants. *Genetics and Molecular Biology*. 26 : 499-503.

Weiss H., Sun B., Stuessy T. F., Kim C. H., Kato H. and Wakabayashi M. 2002. Karyology of plant species endemic to Ullung Island (Korea) and selected relatives in peninsular Korea and Japan. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 138 : 93-105.

Yihua C., Lihua Z., Yihua Z., Yuxuang G. and Zhenghua C. 2000. Inducing somatic meiosis-like reduction at hight frequency by caffeine in root-tip cells of *Vicia faba*. *Mutation Research*. 452 : 67-72.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zaka R., Chenal C. and Misset M. T. 2002. Study of external low irradiation dose effects on induction of chromosome aberrations in *Pisum sativum* root tip meristem. *Mutation Research*. 517 : 87-99.

www.anamai.moph.go.th/healthteen/cell/meitosis.html

www.thaijatropha.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลาย

- **0.1% colchicine** **เตรียม 50 มิลลิลิตร**

  Colchicine 0.05 กรัม
  น้ำกลั่น
  ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

- **0.2% colchicine** **เตรียม 50 มิลลิลิตร**

  Colchicine 0.1 กรัม
  น้ำกลั่น
  ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

- **2mM 8-hydroxyquinoline** **เตรียม 100 มิลลิลิตร**

  8-hydroxyquinoline 0.029 กรัม
  น้ำกลั่น
  ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
  กวนในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- **2% cellulase** **เตรียม 20 มิลลิลิตร**

  Cellulase 0.4 กรัม
  น้ำกลั่น
  ปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร

- **2% pectinase** **เตรียม 20 มิลลิลิตร**

  Pectinase 0.4 กรัม
  น้ำกลั่น
  ปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **Fixative**

Methanol	3	ส่วน
Acetic acid	1	ส่วน

เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

- **สีย้อม 2% aceto-orcine** **เตรียม 100 มิลลิลิตร**

Orcein	2	กรัม
45% acetic acid	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้