

ผลของสาร oryzalin ต่อสนับดำ

Effects of oryzalin on physic nut (*Jatropha curcas* L.)

ธีระพงษ์ บุญปรุก¹, อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์^{1*}, อรวรรณ รักสงฆ์² และ ธีรพันธ์ บุญญัตริช²

Teerapong Boonprok¹, Ariyaporn Pongrat^{1*}, Orawan Raksong²

and Theeraphan Bunyatrachata²

บทคัดย่อ: สนับดำเป็นพืชพลังงานชนิดหนึ่งที่ให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ และสายพันธุ์สนับดำที่พบในประเทศไทยมีฐานพันธุกรรมแคบและให้ผลผลิตต่ำไม่แตกต่างกัน การกลายพันธุ์โดยการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับประชากร เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งสารเคมีที่นิยมใช้ คือ สารโคลชิซิน (colchicine) แต่สารชนิดนี้เป็นพิษต่อมนุษย์ แต่มีสาร ออไรซาลิน (oryzalin) ที่เป็นสารทางเลือก ซึ่งมีความเป็นพิษต่อมนุษย์น้อย ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของ oryzalin ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (polyploidy) ของสนับดำ โดยหดยอดสาร oryzalin ที่มีระดับความเข้มข้น 0, 0.0005, 0.0010, 0.0015 และ 0.0020% ที่มีวันเป็นส่วนผสมจำนวน 2-3 หยด บริเวณปลายยอดของต้นกล้าสนับดำ นาน 48 ชม. โดยใช้แผนการทดลองแบบ RCBD ทำ 4 ซ้ำ พบว่า ขนาดของปากใบของต้นสนับดำที่เป็นโพลีพลอยด์ (polyploidy) และต้นดิพลอยด์ (diploid) ปกติมีความแตกต่างกันทางสถิติ และระดับความเข้มข้นของสาร oryzalin 0.0015% สามารถชักนำให้เกิดต้นเทตระพลอยด์ (tetraploid) และมีมิซพลอยด์ (mixoploid) สูงสุด รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 0.0020% ตามลำดับ และสามารถใช้ลักษณะสัญญาณวิทยา เช่น ขนาดของปากใบ ในการตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์เบื้องต้นได้ดี นอกจากนี้สามารถใช้วิธี flow cytometry ในการตรวจสอบระดับ polyploid ควบคู่เพื่อความแม่นยำ

คำสำคัญ: ออไรซาลิน โพลีพลอยด์ ไฟโซโตเมเตอร์ การกลายพันธุ์

ABSTRACT: Physic nut (*Jatropha curcas* L.) was narrowing genetic based of energy plant, resulting in low productivity. Chromosome doubling was a mutation technique that could enhance genetic variation. The chemicals used for chromosome doubling is oryzalin. In this study, the physic nut seedlings were treated with, 0, 0.0005, 0.0010, 0.0015 and 0.0020%, oryzalin for 48 hours to induce polyploidy. The results showed that the stomata size of diploid and induced by oryzalin polyploidy were different significantly. The number of tetraploid and mixoploid mutants were increased mostly by 0.0015% of oryzalin. The morphology of characteristics such as stomata size can be used to detect polyploidy. In addition, the flow cytometry is one of efficient method to detect polyploidy level.

Keywords: oryzalin, polyploidy, flow cytometry, mutation

¹ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Faculty of Agriculture, Ubonratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand.

² มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตกาฬสินธุ์

Rajamangala University of Technology Isan Kalasin Campus, Kalasin 46000, Thailand.

* Corresponding author: a_pongrat@hotmail.com

บทนำ

สับดำเป็นพืชพลังงานชนิดหนึ่งที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทย ทนทานต่อสภาพพื้นที่แห้งแล้ง และเป็นพืชอายุหลายปี (ชำนาญ และคณะ, 2549) น้ำมันสับดำมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมาก (พรชัย, 2549) สามารถใช้เป็นส่วนผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงหลายชนิด เช่น น้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล และสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องบินโดยสารของประเทศนิวซีแลนด์ (ระพีพันธุ์ และสุชสันต์, 2548; Air New Zealand, 2011) แต่สายพันธุ์สับดำในประเทศไทยยังให้ผลผลิตต่ำ ประมาณ 343 กก./ไร่/ปี จึงไม่คุ้มค่าในการลงทุนเพื่อผลิตเชิงการค้า ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสายพันธุ์สับดำในประเทศไทยมีฐานพันธุกรรมแคบ ซึ่งคาดว่าน่าจะมาจากแหล่งพันธุกรรมเดียวกัน (Sukarin et al., 1987) จากเหตุผลดังกล่าวจึงควรปรับปรุงสายพันธุ์สับดำเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ซึ่งจะต้องสร้างฐานพันธุกรรมให้กว้างขึ้นหรือมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้น โดยเทคนิคหนึ่งที่ใช้กระตุ้นให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม คือ การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (สิรินุช, 2540) ในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมส่วนมากนิยมใช้สารไซโคลซิทิน ซึ่งมีประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมสูงขึ้น (Madon et al., 2005) แต่สารไซโคลซิทินมีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม แต่มีสารทางเลือกอื่นที่มีความเป็นพิษต่ำสามารถใช้ทดแทนสาร colchicine ซึ่งสารนี้คือ สาร oryzalin

สาร oryzalin เป็นสารออกฤทธิ์สังเคราะห์ในสารควบคุมวัชพืชใบกว้างประเภทก่อนงอก (pre-emergence) อีกประเภทหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศสหรัฐอเมริกา ในชื่อทางการค้าว่า Surflan AS Oryzalin AS และ Dirimal สารนี้สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์และทำให้พืชเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในพืชได้หลายชนิด เช่น ในพืชตระกูลแตง และไม้ดอก เป็นต้น และมีความเป็นพิษต่อคน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและ สิ่งแวดล้อมน้อย (Oregon State University and Intertox, Inc., 2012) ดังนั้นวัตถุประสงค์การทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาระดับความ

เข้มข้นของสาร oryzalin ที่เหมาะสมในการชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนยอดอ่อนของกล้าสับดำเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

วิธีการศึกษา

การชักนำสับดำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (polyploidy) โดยใช้สาร oryzalin ดำเนินการโดยนำเมล็ดสับดำ (physic nut) ที่มีลักษณะสมบูรณ์ ที่ได้จากสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขต 3 พืชไร่และพืชสวนขอนแก่น มาแกะเปลือกเมล็ดส่วนนอกออกให้เหลือส่วนเนื้อใน (kernal) แล้วนำมาเพาะในถุงเพาะกล้าจนได้ต้นกล้าที่มีใบเลี้ยงและกำลังคลีใบเลี้ยงออกคล้ายรูปตัววี (V) จึงหยดสาร oryzalin ที่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบจำนวน 2 - 3 หยด ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.0005, 0.0010, 0.0015 และ 0.0020% นาน 48 ชม. ตามลำดับ ตรงบริเวณปลายยอดอ่อนสับดำ (Madon et al., 2005) แล้วคลุมพลาสติกเพื่อควบคุมความชื้น (วรวิมล และ วิสา, 2542) ทำการศึกษาในเรือนทดลอง ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี วางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 25 ต้น เพื่อตรวจสอบลักษณะ polyploidy โดยการบันทึกขนาดปากใบและตรวจวัดปริมาณ DNA โดยใช้วิธี flow cytometry

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลของสาร oryzalin ต่อลักษณะต้นฐานวิทยา

การศึกษากการชักนำให้สับดำเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยใช้สาร oryzalin ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ขนาดความยาวปากใบของต้นสับดำเพาะพลอยด์ (tetraploid) และมิคซิพลอยด์ (mixoploid) มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดความยาวปากใบของต้นสับดำดิพลอยด์ (diploid) ปกติ โดยต้นที่เป็น diploid มีขนาดความยาวปากใบเฉลี่ยเท่ากับ 34 ไมครอน ส่วนต้นสับดำที่เป็น tetraploid และ mixoploid มีขนาดความยาวปากใบมากกว่า 53 ไมครอน (Figure 1) นอกจากนี้ยังพบว่าต้นกล้าที่เป็น polyploid

กับ mixoploid มีลักษณะก้านใบใหญ่ ใบหนา ก้านช่อดอกใหญ่และสั้น (Figure 2) เมื่อเปรียบเทียบกับต้น diploid ปกติ

ระดับความเข้มข้นของสาร oryzalin ต่อการเกิด polyploidy

ในการศึกษาระดับความเข้มข้นของสาร oryzalin ที่เหมาะสมในการชักนำสปีด้าเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม พบว่า สาร oryzalin ที่ระดับความเข้มข้น 0.0015% สามารถชักนำให้เกิดต้นสปีด้า tetraploid และ polyploid สูงสุด คือ 2.0 และ 5.0% ตามลำดับ รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 0.0020% ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นสปีด้า tetraploid และ polyploid สูงสุด คือ 0.5 และ 4.4% ตามลำดับ (Table 1) ซึ่งจะเห็นว่า สาร oryzalin สามารถชักนำให้เกิด tetraploid และ polyploid ในสปีด้า ส่วนผลการศึกษาของ Madon et al. (2005) พบว่าการแช่เมล็ดปาล์มด้วยสาร oryzalin ระดับความเข้มข้น 0.004% นาน 6 ชม. สามารถชักนำให้เกิดต้น mixoploid เพียงอย่างเดียว และ Glendon

et al. (2008) ศึกษาและรายงานว่า การชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมของต้น *Watsonia lepidota* N.E. brown ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มี สาร oryzalin ที่ระดับความเข้มข้น 0.004% นาน 24 ชม. สามารถชักนำให้เกิดต้น tetraploid 33% ของต้นที่รอดชีวิต ซึ่งจะเห็นว่าการใช้สาร oryzalin ในการชักนำให้เกิด polyploid จะขึ้นกับชนิดและส่วนของพืชที่ได้รับสาร oryzalin ที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาในการให้สารแตกต่างกัน

สำหรับการตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วยวิธี flow cytometry พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของต้นสปีด้า diploid, tetraploid และ mixoploid ได้ (Figure 3) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Kaewpoo and Te-chato (2010) ที่ใช้วิธีนี้ในการตรวจสอบระดับโพลีพอยด์ของสปีด้า และสอดคล้องกับการตรวจสอบระดับ polyploidy ในพืชอื่น เช่น ปาล์มน้ำมัน (Madon et al., 2005) และแตงโม (Muhammad et al., 2005)

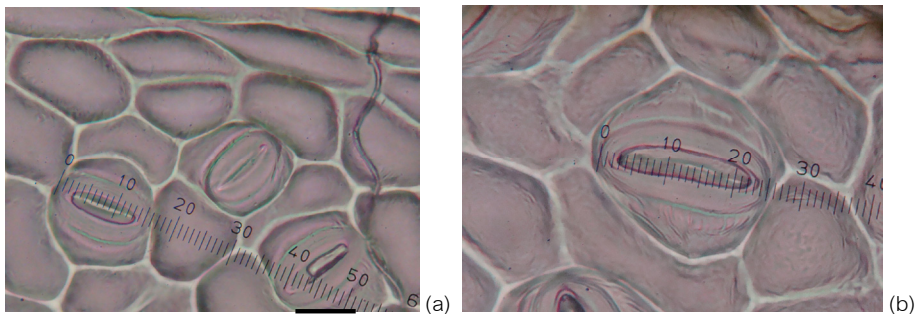


Figure 1 Stomata size on leaf of diploid (a) and tetraploid (b) *Jatropha curcas* L.

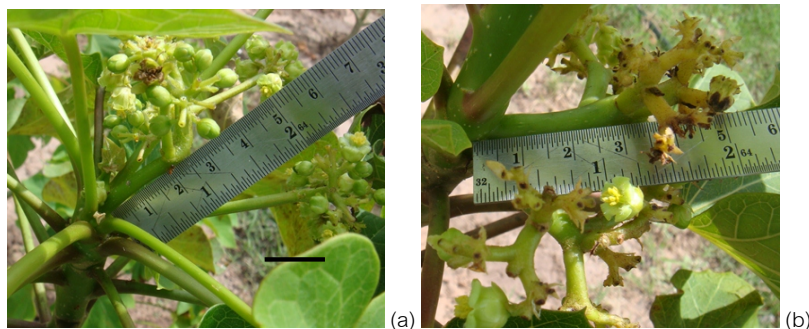


Figure 2 Peduncle feature of diploid (a) and tetraploid (b) *Jatropha curcas* L.

Table 1 The effects of oryzalin concentrations on percentage of stomata length changing and percentage of ploidy level.

oryzalin conc.(%)	stomata length changing (%)	ploidy level (%)		
		2n= 2x	2n= 4x	2n=2x+4x
0 (control)	0.0	100.0	0.0	0.0
0.0005	4.4	96.3	0.0	3.7
0.0010	0.6	98.9	0.0	1.1
0.0015	10.9	93.1	2.0	5.0
0.0020	9.0	95.1	0.5	4.4

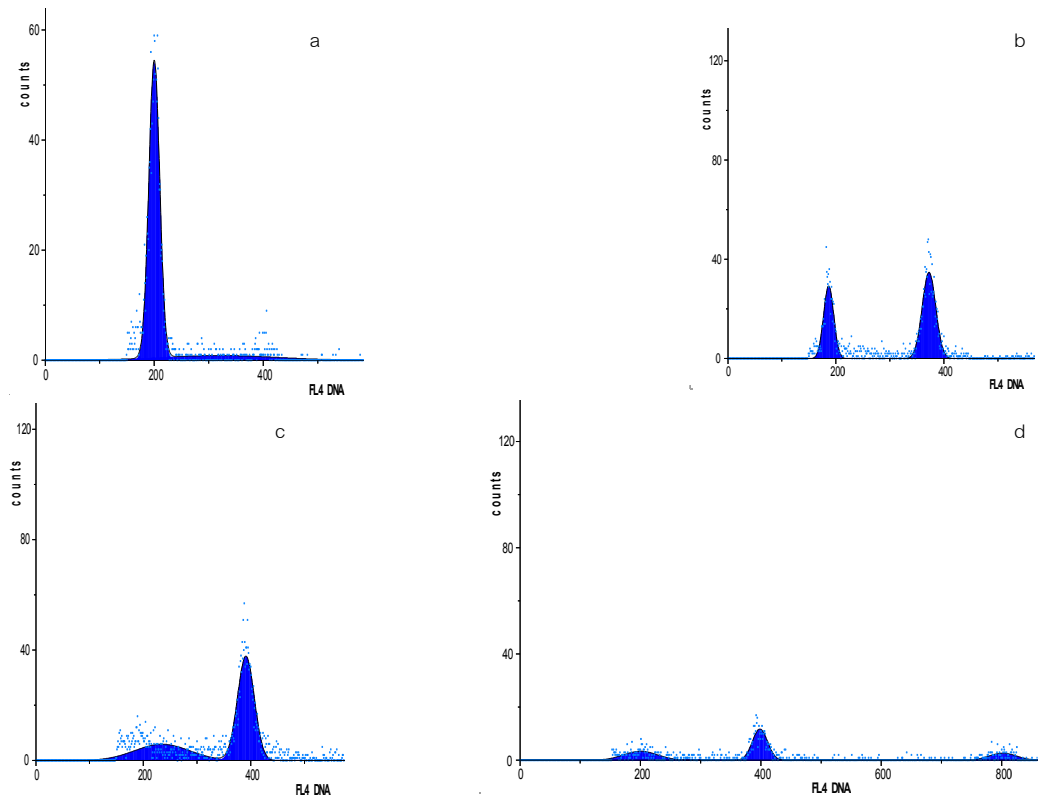


Figure 3 Examples of fluorescent intensity peaks for (a) diploid *Jatropha curcas* L.(control) (b) mixoploid (2n + 4n) *Jatropha curcas* L. (c) tetraploid *Jatropha curcas* L. and (d) mixoploid (2n + 4n+ 8n) *Jatropha curcas* L.

สรุป

ในการศึกษาการชักนำสปีด้าเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยใช้สาร oryzalin พบว่า สาร oryzalin เข้มข้น 0.0015% เป็นระดับที่เหมาะสมในการชักนำสปีด้าเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยพบต้นสปีด้า tetraploid และ mixoploid สูงสุด และสามารถใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ ขนาดของปากใบ และความหนาของใบ ในการตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์เบื้องต้นได้ดี นอกจากนี้สามารถใช้วิธี flow cytometry ในการตรวจสอบระดับ polyploid ควบคู่เพื่อความแม่นยำ

คำขอบคุณ

ในการวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตกาฬสินธุ์ และได้รับการสนับสนุนด้านสถานที่ แปลงทดลอง เครื่องมือ และอุปกรณ์จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี นักวิจัยขอขอบคุณหน่วยงานทั้งสองและเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- ชำนาญ ฉัตรแก้ว, กรีก นฤทรม, ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, ไพบูลย์ ประพฤติธรรม, ทวี เก่าศิริ, อวบ สารถ้อย, กิตติเดช โพธิ์นิยม, ประโยชน์ ดันติเจริญยศ, จีระพนม ศรีสวัสดิ์เล็ก และ บำรุง ไตรมนตรี. 2549. สปีด้าพืชพลังงาน. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟีนี ฟัปบลิชซิ่ง, กรุงเทพฯ.
- พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. สปีด้าเพื่อไบโอดีเซล. สำนักพิมพ์มติชน, กรุงเทพฯ.
- ระพีพันธุ์ ภาสบุตร และสุชนันต์ สุทธิผลไพบูลย์. 2548. น้ำมันสปีด้าพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซลและเบนซิน. เกษตรกรรมธรรมชาติ 8: 21-27.
- วรวิมล จุฬาลักษณ์นกุล และวิสา ฉิมน้อย. 2542. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในต้นบัวบกโดยใช้สารโคลชิซิน. ว.วิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 24: 55-65.
- สิริสุข ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Air New Zealand. 2011. The good oil. Available: <http://static.airnewzealand.com/assets/Resources-AirNZ/Environment/environment-booklet-november08.pdf>. Accessed June 10, 2011.
- Glendon, D.A., V.S. Johannes and E.E. John. 2008. Effectiveness of colchicine and oryzalin at inducing polyploidy in *Watsonia lepidota* N.E. brown. Hort. Sci. 43: 2248-2251.
- Kaewpoo, M. and S. Te-chato. 2010. Study on ploidy level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry. J. Agr. Tech. 6: 391-400.
- Madon, M., M.M. Clyde, H. Hashim, Y.M. Yusuf, H. Mat and S. Saratha. 2005. Polyploidy Induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. J. Palm Res. 17: 110-123.
- Oregon State University and Intertox, Inc., 2012. Washington state department of transportation oryzalin, roadside vegetation management herbicide fact sheet. Available: www.wsdot.wa.gov/oryzalin. Accessed July 18, 2012.
- Sukarin, W., Y. Yamada and S. Sakaguchi. 1987. Characteristics of physic nut, *Jatropha curcas* L. as a new biomass crop in the tropics. Jpn. Agric. Res. Quart. (Japan) 20: 302-303.