

ผลของปริมาณแคลลัสต่อการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมัน ของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.)

กฤษฎีพงศ์ ภาษิตวิไลธรรม* และ ธนะชัย พันธเกษมสุข
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่

*corresponding author e-mail: pankasemsuk@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปริมาณแคลลัสเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) โดยได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ กับแคลลัสที่มีเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) ในปริมาณที่ต่างกัน 3 ระดับ คือ 1, 2 และ 3 กรัม ในอาหารเหลวสูตร MS (1962) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ 1-Naphthaleneacetic (NAA) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงในสภาพเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส สภาพมืด เป็นเวลา 20 วัน พบว่า การเพิ่มปริมาณแคลลัสทำให้การเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มเพิ่มขึ้น โดยการใช้ปริมาณแคลลัส 3 กรัม ให้ผลการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันสูงสุด โดยค่าการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำหนักสด (FW), น้ำหนักแห้ง (DW), จำนวนเซลล์, ปริมาณเซลล์อัดแน่น (packed cell volume, PCV) และปริมาณน้ำมัน (% w/w) มีเท่ากับ 9.0561 ± 0.003 กรัม, 1.0670 ± 0.017 กรัม, $19.917 \pm 0.795 \times 10^4$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร, 1.75 ± 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และร้อยละ 45.79 $\pm$ 0.56 (w/w) ตามลำดับ รองลงมาคือการใช้ปริมาณแคลลัส 2 กรัม มีการเจริญเติบโตและให้ปริมาณน้ำมันเท่ากับ 6.0722 ± 0.059 กรัม, 0.3151 ± 0.001 กรัม, $14.780 \pm 0.518 \times 10^4$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร, 1.23 ± 0.03 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และร้อยละ 35.85 $\pm$ 0.96 (w/w) ตามลำดับ โดยการใช้ปริมาณแคลลัส 1 กรัม ให้ผลการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันต่ำสุดเท่ากับ 3.7708 ± 0.057 กรัม, 0.1698 ± 0.010 กรัม, $8.527 \pm 0.055 \times 10^4$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร, 0.63 ± 0.03 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และร้อยละ 26.41 $\pm$ 0.86 (w/w) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาปริมาณของน้ำมันที่เพิ่มขึ้นจากการเพิ่มปริมาณแคลลัส 1 กรัมเป็น 2 กรัม เปรียบเทียบกับการเพิ่มปริมาณแคลลัส 2 กรัมเป็น 3 กรัม พบว่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 35.74 และร้อยละ 22.72 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบู่ดำมีแนวโน้มลดลงแม้ว่าจะมีการเพิ่มปริมาณแคลลัสก็ตาม ดังนั้นการใช้ปริมาณแคลลัสเริ่มต้น 2 กรัม จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและน้ำมันของเซลล์แขวนลอยสบู่ดำ

คำสำคัญ : สบู่ดำ เซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์ม ปริมาณน้ำมัน

Effect of callus content on growth and oil content in physic nut (*Jatropha curcas* L.) endosperm suspended cells

Kritsaphong Phasitvilaitham^{*} and Tanachai Pankasemsuk
Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
^{*}corresponding author e-mail: pankasemsuk@gmail.com

Abstract

The objectives of this study were to find out effect of initial callus contents on growth and oil content in *Jatropha curcas* L. endosperm suspended cells. Completely Randomized Design (CRD) was set up with 3 replicates of 3 different friable callus contents; 1, 2 and 3 grams. Friable callus derived from endosperm were cultured in MS liquid medium supplemented with 30 g/L sucrose and 10 μ M 1-Naphthaleneacetic. The cultures were placed on 120 rpm rotary shaker and kept under darkness at 25 ± 2 °C for 20 days. The results indicated that the growth and oil content in *Jatropha curcas* L. endosperm suspended cell could be increased with an increasing of initial callus content. The highest fresh weight (FW), dry weight (DW), the number of cells, packed cell volume (PCV) and oil content (% w/w) (mean $\pm$ standard error of the mean, SEM) (9.0561 ± 0.003 grams, 1.0670 ± 0.017 grams, $19.917\pm 0.795 \times 10^4$ cell/cm³, 1.75 ± 0.02 cm³/cm³, 45.79 ± 0.56 % (w/w)) received from endosperm suspended cells could obtain when 3 grams of initial callus was used as starting inoculums followed by 2 grams (6.0722 ± 0.059 grams, 0.3151 ± 0.001 grams, $14.780 \times 10^4 \pm 0.518$ cell/cm³, 1.23 ± 0.03 cm³/cm³ and 35.85 ± 0.96 % (w/w)) and 1 g of initial callus (3.7708 ± 0.057 grams, 0.1698 ± 0.010 grams, $8.527\pm 0.055 \times 10^4$ cell/cm³, 0.63 ± 0.03 cm³/cm³ and 26.41 ± 0.86 % (w/w)), respectively. However, an increasing of initial callus content from 1 gram to 2 grams trended to promote higher oil content (35.75 %) than that increasing callus content from 2 grams to 3 grams (22.72 %). From the results, the researchers recommended that the use 2 gram of initial callus was optimal for growth and oil content production in *Jatropha curcas* L. endosperm suspended cell.

keywords : *Jatropha curcas* L., Endosperm suspended cell, Oil content

บทนำ

สบู่ดำ (physic nut) เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกับมันสำปะหลังและยางพารา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. และมีการปลูกที่แพร่หลายในทุกภาคของประเทศ จึงมีชื่อ

พื้นเมืองแตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น ภาคเหนือเรียก มะหุ้งฮั่ว ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่า มะเยาหรือสีหลอด เป็นต้น (พรชัย, 2549; อนุวัฒน์, 2551; กรมวิชาการเกษตร, 2553) ในเมล็ดของสบู่ดำมีน้ำมันประมาณร้อยละ 35-40 ด้วยเหตุนี้ สบู่ดำจึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ โดยน้ำมันสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการตัวอย่างเช่น ทำเครื่องสำอาง, สารเคมีกำจัดศัตรูพืช และพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิง เป็นต้น (อนุวัฒน์, 2551) ข้อได้เปรียบของสบู่ดำที่ดีกว่ากว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นคือ มีการเจริญเติบโตดี ขยายพันธุ์ง่าย ตลอดจนสกัดน้ำมันได้ ไม่ซับซ้อน (ชำนาญ และคณะ, 2549; อนุวัฒน์, 2551) อย่างไรก็ตาม ในการปลูกและการเก็บเกี่ยวผลผลิตของสบู่ดำนั้นพบว่า มีข้อจำกัดในเรื่องความคงตัวของพันธุ์กรรมของสบู่ดำ เนื่องจากสบู่ดำเป็นพืชผสมข้ามและทยอยออกดอกทำให้การเก็บเกี่ยวทำได้ไม่พร้อมกัน ส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการปลูกสูงขึ้นเพราะต้องอาศัยแรงงานทั้งหมด

การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชทั้งรูปแบบของแคลลัส (callus culture) และเซลล์แขวนลอย (cell suspension culture) นับว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องมือสร้างน้ำมันจากสบู่ดำทดแทนน้ำมันที่ได้จากเมล็ดของสบู่ดำที่ปลูกตามธรรมชาติได้ ซึ่งผลผลิตจากการปลูกนั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพภูมิประเทศ ฤดูกาล หรือสภาพแวดล้อมอื่นๆ นอกจากนี้การที่เซลล์พืชมีเยื่อหุ้มเซลล์เราสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการชีวสังเคราะห์ได้โดยการผลิตสารจากพืชโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชนั้นทำให้ได้สารปริมาณมากกว่าการปลูกพืชตามธรรมชาติอีกด้วย (วรารณ, 2551) อย่างไรก็ตาม การศึกษาการสร้างไขมันจากเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำนั้น ยังคงมีรายงานการศึกษาน้อยเช่น รายงานของ Hapsari et al. (2008) ที่ศึกษาถึงการสร้างน้ำมันจากการเลี้ยงไขมันจากเอมบริโอของสบู่ดำ และรายงานของ Correa & Atehortúa (2012) ที่ศึกษาถึงรูปแบบการสร้างไขมันจากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของสบู่ดำ แต่ปัจจัยอื่นๆ อีกหลายประการที่มีผลต่อการสร้างไขมันจากเซลล์เพาะเลี้ยงสบู่ดำนั้น ยังคงไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Makawat & Tanachai (2012) พบว่า การสร้างไขมันโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบู่ดำได้ผลผลิตน้ำมันในปริมาณต่ำคือร้อยละ 16.08 (w/w) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมต่อเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบู่ดำโดยมุ่งศึกษาผลของปริมาณแคลลัสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบู่ดำเป็นปัจจัยแรก

วิธีดำเนินการวิจัย

พืชทดลอง (plant material)

เก็บตัวอย่างเมล็ดสบู่ดำ (mature seed) จากต้นสบู่ดำที่ปลูกภายในศูนย์วิจัย สาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหิยะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

การเตรียมแคลลัสและการเพาะเลี้ยงแคลลัส (Initiation of callus and maintenance)

การชักนำให้เกิดแคลลัสทำได้โดยนำเมล็ดแก่ (mature seed) ของสบู่ดำมาล้างด้วยน้ำไหลเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเมล็ดไปแช่ในแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 (v/v) เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดด้วยสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/w) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้ออีก 3 ครั้ง ทำการตัดเอาเฉพาะส่วนเอนโดสเปิร์มจากเมล็ดสบู่ดำให้ได้ขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige & Skoog (MS) (1962) ที่เติม 1- Naphthaleneacetic

acid (NAA) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร (pH) เป็น 5.6 เลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นนำแคลลัสที่ได้จากการชักนำมาเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็งสูตรเดียวกันจนได้ปริมาณที่เพียงพอสำหรับการทดลอง โดยแคลลัสที่มีอายุครบ 1 เดือนจะถูกนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

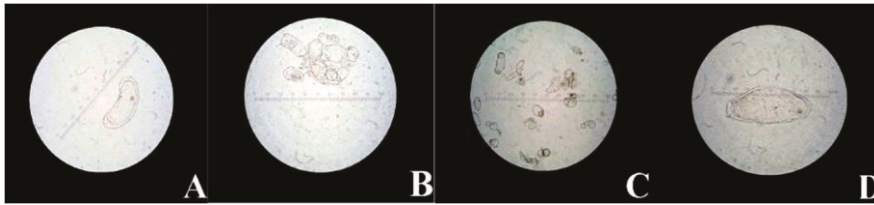
การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 3 ขวด ประกอบด้วยปัจจัยคือ ปริมาณแคลลัสจำนวน 3 ระดับ คือ 1, 2 และ 3 กรัม เริ่มต้นจากการคัดเลือกแคลลัสที่มีเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม NAA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ที่ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.6 ± 0.02 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงในสภาพเขย่า บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เลี้ยงในที่มืด ในห้องที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส หลังจากการเพาะเลี้ยงได้ 5 วัน ทำการวัดและเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบูดำได้แก่ น้ำหนักสด (fresh weight), น้ำหนักแห้ง (dry weight), จำนวนเซลล์ (the number of cells), ค่าปริมาณเซลล์อัดแน่น (packed cell volume, PCV) และร้อยละปริมาณน้ำมัน (percentage of total lipid extract, % TLE) โดยใช้เทคนิคของ Zou et al. (1995) และวัดต่อเนื่องทุก 5 วัน จนครบ 20 วัน

ผลการทดลองที่ได้ในแต่ละช่วง จะถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วยสถิติ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบูดำให้มีการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้น โดยศึกษาผลของปริมาณแคลลัสต่อการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันของเซลล์แขวนลอยสบูดำ ซึ่งผลจากการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำจากเอนโดสเปิร์มที่มีลักษณะการเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ปริมาณ 1 กรัม เปรียบเทียบกับแคลลัสปริมาณ 2 และ 3 กรัม ในอาหารเหลวสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.6 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำวัดการเจริญเติบโตจากน้ำหนักสด, น้ำหนักแห้ง, จำนวนเซลล์, ค่าปริมาณเซลล์อัดแน่น และปริมาณน้ำมัน ต่อเนื่องทุก 5 วัน จนครบ 20 วัน พบว่า เอนโดสเปิร์มแคลลัสสบูดำในแต่ละปริมาณ สามารถเจริญเติบโตได้ โดยแคลลัสสามารถกระจายตัวเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก 5 - 10 เซลล์และเซลล์เดี่ยวๆ ที่สามารถสังเกตเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์เอนโดสเปิร์มที่พบมีรูปร่างที่แตกต่างกันและบางเซลล์พบลักษณะการมีแวคิวโอล (vacuole) ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 1)

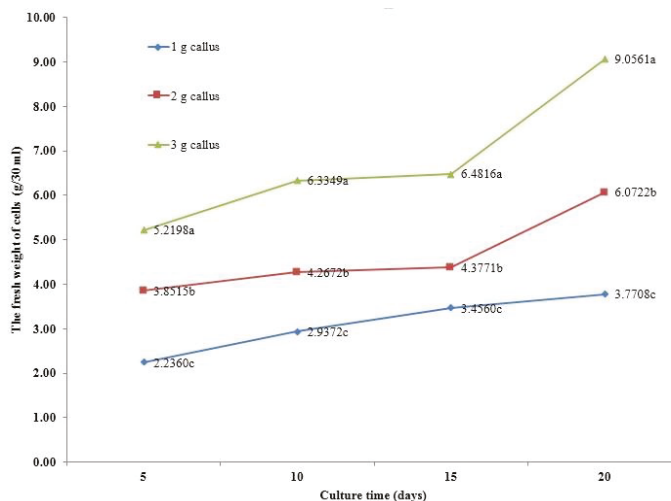


(กำลังขยายภาพ 400 เท่า, Olympus CX31)

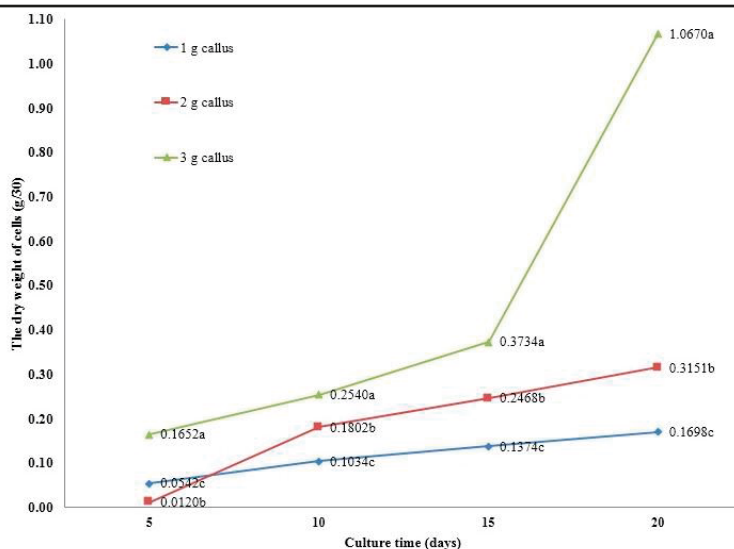
ภาพที่ 1 เซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบูดำลักษณะต่างๆ ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (A: เซลล์เอนโดสเปิร์มเดี่ยวๆ, B: กลุ่มเซลล์เอนโดสเปิร์ม, C: รูปร่างของเซลล์ที่พบในระหว่างการเพาะเลี้ยง และ D: เซลล์ที่มีแวคิโอลขนาดใหญ่)

น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

จากการศึกษาผลของปริมาณแคลลัสที่ต่างกันต่อการสร้างน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบูดำ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยการเพิ่มปริมาณแคลลัสมีผลทำให้ค่าน้ำหนักสดและค่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3) อย่างต่อเนื่องจนถึงในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง และพบว่า การใช้ปริมาณแคลลัส 3 กรัม ให้ค่าน้ำหนักสดและค่าน้ำหนักแห้ง (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย) สูงที่สุดเท่ากับ 9.0561 ± 0.003 กรัมและ 1.0670 ± 0.017 กรัมตามลำดับ รองลงมาคือการใช้ปริมาณแคลลัส 2 กรัม ให้ค่าน้ำหนักสดและค่าน้ำหนักแห้งเท่ากับ 6.0722 ± 0.059 กรัม และ 0.3151 ± 0.001 กรัม ตามลำดับ และการใช้ปริมาณแคลลัส 1 กรัม จะให้ค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์น้อยที่สุดเท่ากับ 3.7708 ± 0.057 กรัมและ 0.1698 ± 0.010 กรัม ตามลำดับ



ภาพที่ 2 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบูดำเมื่อใช้แคลลัสเริ่มต้นในปริมาณต่างๆ (*อักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$))



ภาพที่ 3 น้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบู่ดำเมื่อใช้แคลลัสเริ่มต้นในปริมาณต่างๆ (*อักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$))

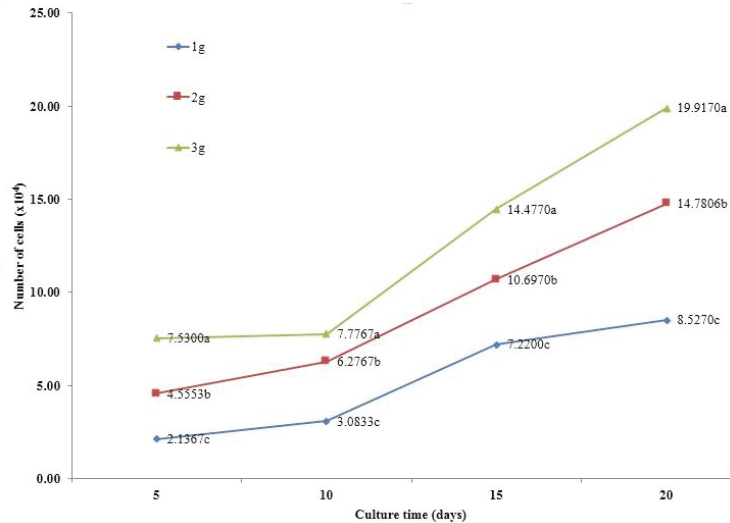
จำนวนเซลล์

จากการศึกษาถึงผลของปริมาณแคลลัสต่อการสร้างเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบู่ดำ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยการเพิ่มปริมาณแคลลัสเริ่มต้นนั้นส่งผลทำให้จำนวนเซลล์แขวนลอยของเอนโดสเปิร์มสบู่ดำเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามไปด้วยจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง และการใช้ปริมาณแคลลัสเริ่มต้น 3 กรัม มีผลทำให้จำนวนเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์ม (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย) สูงที่สุดเท่ากับ $19.917 \pm 0.795 \times 10^4$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร รองลงมาคือ การใช้ปริมาณแคลลัสเริ่มต้น 2 กรัม และ 1 กรัม ที่มีผลทำให้จำนวนเซลล์แขวนลอยที่สร้างขึ้นนั้นเท่ากับ $14.7805 \pm 0.518 \times 10^4$ และ $8.527 \pm 0.055 \times 10^4$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ ตามลำดับ (ภาพที่ 4)

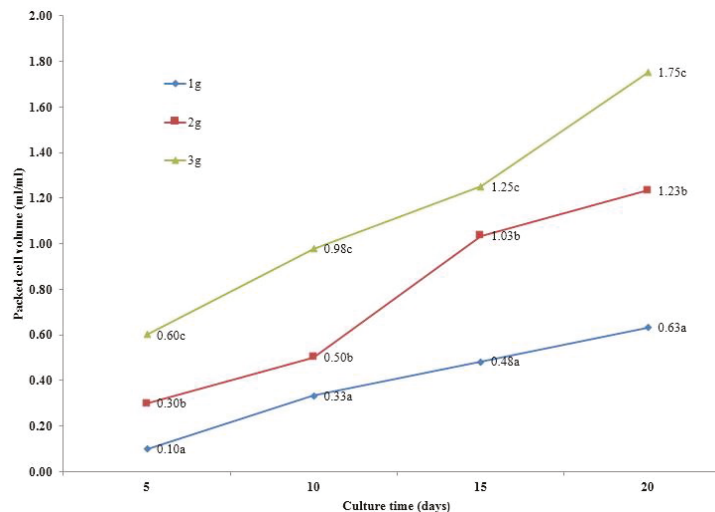
ปริมาณเซลล์อัดแน่น

จากผลการทดลองจะพบว่าการสร้างเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบู่ดำจากแคลลัสเริ่มต้นปริมาณที่แตกต่างกันนั้น ส่งผลต่อค่าปริมาณเซลล์อัดแน่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยเช่นกัน โดยพบว่าการเพิ่มปริมาณแคลลัสมีผลทำให้ค่าปริมาณเซลล์อัดแน่นมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันสุดท้ายของการเลี้ยง พบว่าการใช้ปริมาณแคลลัส 3 กรัม ให้ค่าปริมาณเซลล์อัดแน่น (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย) สูงที่สุดเท่ากับ 1.75 ± 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร รองลงมาคือ การใช้ปริมาณแคลลัส 2 กรัม ให้ผลของค่าปริมาณเซลล์อัดแน่นเท่ากับ 1.23 ± 0.03 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และการใช้ปริมาณแคลลัส 1 กรัม จะ

ให้ค่าปริมาณเซลล์อัดแน่นต่ำที่สุด คิดเป็น 0.63 ± 0.03 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (ภาพที่ 5) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลการทดลองในส่วนของการจำนวนเซลล์



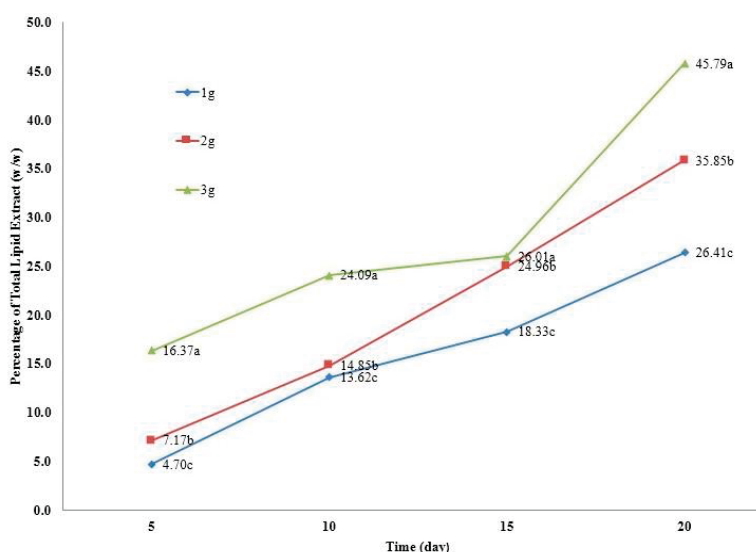
ภาพที่ 4 จำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปูดำเมื่อใช้แคลลัสเริ่มต้นในปริมาณต่างๆ (*อักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$))



ภาพที่ 5 ค่าปริมาณเซลล์อัดแน่นที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปูดำเมื่อใช้แคลลัสเริ่มต้นในปริมาณต่างๆ (*อักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$))

ร้อยละปริมาณน้ำมัน

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าปริมาณน้ำมันที่สร้างขึ้นจากเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปูดำนั้น มีความแตกต่างกันออกไปตามปริมาณแคลลัสเริ่มต้นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยการเพิ่มปริมาณแคลลัสเริ่มต้นมากขึ้นจาก 1 กรัม เป็น 2 และ 3 กรัม นั้น ส่งผลทำให้การสร้างปริมาณน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปูดำสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตามไปด้วย (ภาพที่ 6) พบว่า การใช้ปริมาณแคลลัสเริ่มต้น 3 กรัม สามารถทำให้เซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปูดำสร้างน้ำมัน ในปริมาณสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 45.79 ± 0.56 (w/w) รองลงมาคือ การใช้ปริมาณแคลลัสเริ่มต้น 2 กรัม และ 1 กรัม จะมีผลทำให้เซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปูดำสร้างน้ำมันได้เท่ากับร้อยละ 35.85 ± 0.96 (w/w) และร้อยละ 26.41 ± 0.86 (w/w) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของน้ำมันที่เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสเริ่มต้นจาก 1 กรัม เป็น 2 กรัม เปรียบเทียบกับการเพิ่มปริมาณแคลลัสเริ่มต้นจาก 2 กรัม เป็น 3 กรัม พบว่า สามารถสร้างน้ำมันได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 35.74 และ 22.72 ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ปริมาณน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปูดำมีแนวโน้มลดลงแม้ว่าจะมีการเพิ่มปริมาณแคลลัสก็ตาม



ภาพที่ 6 ร้อยละปริมาณน้ำมันที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปูดำเมื่อใช้แคลลัสเริ่มต้นในปริมาณต่างๆ (*อักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$))

อภิปรายผล

กระบวนการชีวสังเคราะห์และการเปลี่ยนวิถีชีวสังเคราะห์ไขมันจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช มีรายงานการศึกษามากมายต่อเนื่อง (Staba et al., 1971; James, 1985; Mangold, 1986) และการศึกษาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุลที่เกี่ยวข้องและใกล้เคียงกับสปูดำ อาทิ ละหุ่ง (*Rhicinus*

communis) เคยมีรายงานการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ (Brown et al., 1970; Alam et al., 2010) สำหรับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสปีดำนั้น พบว่ามีรายงานการศึกษามาอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะงานการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการขยายพันธุ์สปีดำนในสภาพปลอดเชื้อ (Attaya et al., 2012) รวมไปถึงการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสและเซลล์แขวนลอยในสปีดำน (Soomro & Memon, 2007) อย่างไรก็ตามการศึกษการสร้างไขมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสปีดำนังมีรายงานการศึกษาน้อย เช่น รายงานของ Hapsari et al. (2008) ที่ศึกษาถึงการสร้างน้ำมันจากการเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอของสปีดำน และรายงานของ Correa & Atehortúa (2012) ที่ศึกษาถึงรูปแบบการสร้างไขมันจากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของสปีดำน และยังขาดรายงานถึงมีปัจจัยอื่นๆ อีกหลายประการที่มีผลต่อการสร้างไขมันจากเซลล์เพาะเลี้ยงสปีดำน โดยผลจากการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปีดำนในการทดลองนี้ พบว่าได้ผลที่สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Makawat & Tanachai (2012) ที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ว่า เซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปีดำนสามารถเจริญและสร้างน้ำมันได้ดีในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มปริมาณแคลลัสเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปีดำน โดยปริมาณของแคลลัสเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้นสามารถทำให้การเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปีดำนเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของสมพร (2552) ที่พบว่า ปริมาณแคลลัสเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารของเซลล์แขวนลอย โดยการเพิ่มปริมาณแคลลัสสามารถปรับปรุงให้การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตและการสร้างสารที่ต้องการได้เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการเพิ่มปริมาณแคลลัสสามารถทำให้การเจริญเติบโตและการสร้างน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปีดำนเพิ่มขึ้น แต่จากการเปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำมัน (ร้อยละ w/w) ที่สร้างขึ้น กลับพบว่า การเพิ่มปริมาณแคลลัสเริ่มต้นจาก 2 กรัมเป็น 3 กรัม มีผลทำให้ค่าปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้นเพียงร้อยละ 22.72 ซึ่งน้อยกว่าการเพิ่มปริมาณแคลลัสเริ่มต้นจาก 1 กรัมเป็น 2 กรัม ที่ให้ค่าปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 35.74 อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองพบว่า ถึงแม้ว่าการเพิ่มปริมาณแคลลัสจะสามารถทำให้เซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปีดำนมีการเจริญเติบโตและการสร้างน้ำมันในปริมาณที่เพิ่มขึ้นก็ตาม แต่การใช้แคลลัสเริ่มต้นในปริมาณเพิ่มมากขึ้นนั้น มักประสบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณของน้ำมันที่เพิ่มขึ้นจากการเพิ่มปริมาณแคลลัสเริ่มต้น 1 กรัมเป็น 2 กรัม เทียบกับการเพิ่มปริมาณแคลลัสเริ่มต้นจาก 2 กรัมเป็น 3 กรัม แสดงให้เห็นว่า ปริมาณน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปีดำนมีแนวโน้มลดลง ดังนั้นจากผลการทดลองในครั้งนี้ จึงสรุปได้ว่า การใช้ปริมาณแคลลัสเริ่มต้น 2 กรัมต่อปริมาณอาหารเหลว 30 มิลลิลิตร เป็นสภาวะที่ดีที่สุดที่มีผลทำให้เซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปีดำนมีการเจริญเติบโตและการสร้างน้ำมันในปริมาณที่สูง โดยผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการสร้างน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสปีดำนในระดับขยายส่วนการผลิตที่ใหญ่ขึ้น โดยการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพพืช (plant bioreactor) เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เอนโดสเปิร์มสปีดำนในระดับที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรมต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาผลของปริมาณแคลลัสต่อการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบู่ดำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์จำนวน 3 ซ้ำประกอบด้วยปริมาณแคลลัสเริ่มต้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับได้แก่ 1, 2 และ 3 กรัม พบว่า การเพิ่มปริมาณแคลลัสทำให้การเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบู่ดำเพิ่มขึ้น โดยการใช้ปริมาณแคลลัสเริ่มต้น 3 กรัม มีผลทำให้ค่าน้ำหนักสด, น้ำหนักแห้ง, จำนวนเซลล์, ปริมาณเซลล์อัดแน่น และร้อยละปริมาณน้ำมัน (ร้อยละ w/w) สูงที่สุด เท่ากับ 9.0561 ± 0.003 กรัม, 1.0670 ± 0.017 กรัม, $19.917 \pm 0.795 \times 10^4$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร, 1.75 ± 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และร้อยละ 45.79 ± 0.56 (w/w) ตามลำดับ รองลงมาคือ การใช้ปริมาณแคลลัสเริ่มต้น 2 กรัม (6.0722 ± 0.059 กรัม, 0.3151 ± 0.001 กรัม, $14.780 \pm 0.518 \times 10^4$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร, 1.23 ± 0.03 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และร้อยละ 35.85 ± 0.96 (w/w) ตามลำดับ และการใช้ปริมาณแคลลัสเริ่มต้น 1 กรัม (3.7708 ± 0.057 กรัม, 0.1698 ± 0.010 กรัม, $8.527 \pm 0.055 \times 10^4$ เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร, 0.63 ± 0.03 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และร้อยละ 26.41 ± 0.86 (w/w) ตามลำดับ) จากผลการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของน้ำมันที่เพิ่มขึ้นจากการเพิ่มปริมาณแคลลัส 1 กรัมเป็น 2 กรัมเทียบกับการเพิ่มปริมาณแคลลัส 2 กรัมเป็น 3 กรัม พบว่าเพิ่มขึ้น ร้อยละ 35.74 และร้อยละ 22.72 ตามลำดับ ดังนั้นการใช้แคลลัสเริ่มต้น 2 กรัม จึงเป็นปริมาณแคลลัสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างน้ำมันของเซลล์แขวนลอยเอนโดสเปิร์มสบู่ดำ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อการผลิตและพัฒนาอาจารย์ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่สนับสนุนทุนในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ และภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่และโปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในระหว่างการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. (2553). สบู่ดำ. <http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=15>. เข้าถึง 10 พฤษภาคม 2557.
- ชำนาญ ฉัตรแก้ว และคณะ. (2549). สบู่ดำพืชพลังงาน. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด พันธุ์ พลับพลึง.
- พรชัย เหลืองอาภางค์. (2549). ความรู้พื้นฐานการปลูกสบู่ดำ. เชียงใหม่: โรงพิมพ์เมือง.
- วราภรณ์ ภูตะลุน. (2551). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร: แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. ขอนแก่น: บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนาจำกัด.
- สมพร ประเสริฐสูงสกุล. (2552). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ โพธิ์เพชร.
- อนุวัฒน์ จันทรสวรรณ. (2551). สบู่ดำ. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.
- Alam, I., Sharmin, S.A., Mondal, S.C., Alam, Md.J., Khalekuzzaman, M., Anisuzzaman, M., & Alam, M.F. (2010). *In vitro* micropropagation through cotyledonary node culture of castor bean (*Ricinus communis* L.). Australian journal of crop science, 4(2), 81-84.

- Attaya, A.S., Geelen, D., & Belal, A.E.H. (2012). **Progress in *Jatropha curcas* tissue culture**. American-Eurasian journal of sustainable agriculture, 6(1), 6-13.
- Brown, D.J., Canvin, D.T., & Zilkey, B.F. (1970). **Growth and metabolism of *Ricinus communis* endosperm in tissue culture**. Canadian journal of botany, 48(12), 2323-2331.
- Correa, S.M., & Atehortúa, L. (2012). **Lipid profile of in vitro oil produced through cell culture of *Jatropha curcas***. Journal of association of official analytical chemists international, 95(4), 1161-1169.
- Hapsari, B.W., Iriawati, Esyanti, R.R., Martin, A.F., & Mariani, T.S. (2008). **In vitro oil production in somatic embryo of *Jatropha curcas* L.: Microscopic analysis**. Proceeding of 2nd of International conference on mathematics and natural sciences (ICMNS) 2008. Indonesia: Bandung.
- James, A.T. (1985). **The biotechnology of oil seed crops**. Journal of the American oil chemical society, 62(2), 204-206.
- Makawat, P., & Tanachai, P. (2012). **Endosperm culture of *Jatropha curcas* L.** Chiang Mai University, Journal of natural sciences, special issue on agriculture & natural resources, 11(1), 97-102.
- Mangold, H.K. (1986). **Biosynthesis and biotransformation of lipid in plant cell cultures and algae**. Chemistry and industry, 8, 260-267.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). **A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures**. Physiological plant, 15(3), 473-497.
- Soomro, R., & Memon, R.A. (2007). **Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas***. Pakistan journal of botany, 39(7), 2431-2441.
- Staba, E.J., Shin, B.S., & Mangold, H.K. (1971). **Lipid in plant tissue cultures: I. the fatty acid composition of triglycerides in rape and turnip rape cultures**. Chemistry Physic of Lipids, 6(3), 291-295.
- Zou, J., Abrams, G.D., Barton, D.L., Taylor, D.C., Pomeroy, M.K., & Abrams, S.R. (1995). **Induction of lipid and oleosin biosynthesis by (+) -abscisic acid and its metabolites in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. cv. Reston. (Biological responses in the presence of 8'-hydroxy abscisic acid)**. Plant Physiology, 108(2), 563-571.