การชักนำโพลีพลอยด์ในปาล์มน้ำมันโดยใช้สารโคลชิซินในเมล็ดงอก

Polyploidy Induction in Oil Palm Germinated Seeds by Colchicine Treatment

สิทธิพงษ์ พรมมา

Sitthipong Promma

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Master of Science in Plant Science

Prince of Songkla University

2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำโพลีพลอยด์ในปาล์มน้ำมันโดยใช้สารโคลชิซินในเมล็ดงอก
ผู้เขียน นายสิทธิพงษ์ พรมมา
สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระ เอกสมทราเมษฐ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วินิจ เสรีประเสริฐ)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

…….....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระ เอกสมทราเมษฐ์)

…….....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วินิจ เสรีประเสริฐ)

…….....กรรมการ
(ดร.กิตติ สัจจาวัฒนา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำโพลีพลอยด์ในปาล์มน้ำมันโดยใช้สารโคลชิซินในเมล็ดงอก

ผู้เขียน นายสิทธิพงษ์ พรมมา

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า โดยใช้เมล็ดงอกปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมเทเนอราจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จุ่มแช่สารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 2.5 5.0 และ 7.5 mM และระยะเวลาในการจุ่มแช่สาร 5 เวลา คือ 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการประเมินผลของโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิต ลักษณะทางสัณฐาน และการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซมเบื้องต้นด้วยวิธีการวัดขนาด และความหนาแน่นเซลล์คุม หลังจากนั้นทำการยืนยันด้วยการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก ผลการศึกษา พบว่า เมล็ดงอกที่ผ่านการจุ่มแช่สารที่ระดับความเข้มข้นสูง และระยะเวลานานมีแนวโน้มให้ต้นกล้าปาล์มมีอัตราการรอดชีวิตน้อยลง โดยมีระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ทำให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาจุ่มแช่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 5.57 mM ต้นที่รอดชีวิตเมื่อผ่านการทรีต โคลชิซินความเข้มข้นสูงและระยะเวลานานโดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 7.5 mM ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ปรากฏลักษณะการเจริญเติบโตทุกลักษณะต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่คาดว่าเป็นต้นพอลีพลอยด์พบในทรีทเมนต์ต่าง ๆ มีความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 2.70 - 50% ของต้นที่รอดชีวิต แต่เฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 7.5 mM จุ่มแช่สารนาน 48 ชั่วโมง เท่านั้นที่พบกล้าปาล์มแบบเททระพลอยด์ คิดเป็น 7.69 และ 12.5% ของต้นที่รอดชีวิต ตามลำดับ ต้นพอลีพลอยด์ที่ได้มีลักษณะทางสัณฐาน เช่น ความสูง ขนาดโคนต้น การสร้างใบขนนก พื้นที่ใบแรก และลักษณะความหนาแน่นของเซลล์คุม ต่ำกว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีขนาดของเซลล์คุมใหญ่กว่า และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์มากกว่า โดยระดับโครโมโซมในปาล์มน้ำมันมีสหสัมพันธ์ในทางบวกกับความกว้าง ยาวของเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ แต่มีสหสัมพันธ์ในทางลบกับความหนาแน่นของเซลล์คุม

Thesis Title	Polyploidy Induction in Oil Palm Germinated Seeds by Colchicine Treatment
Author	Mr. Sitthipong Promma
Major Program	Plant Science
Academic Year	2009

Abstract

This study aimed to induce polyploidy in oil palm germinated seeds and determine their morphological characters. The germinated seeds of a hybrid tenera variety derived from PSU breeding program were used in the experiment. The treatments consisted of three colchicine concentrations (2.5, 5.0 and 7.5 mM) and five immersions at different times (3, 6, 12, 24 and 48 hr). Effects of colchicine on survival rate and morphological characters were evaluated from different treatments. The putative polyploidy palms were observed via sizes (width and length) and densities of stomata from all the seedlings that survived. These putative polyploidy palms were confirmed via chromosome counting of root tips. The results found that the survival rate of treated palms tended to decrease with the high concentrations and immersion time. 50% of the oil palm seedlings treated with colchicine at 5.57 mM for 48 hr died. All morphological characters of survived oil palm seedlings changed in high concentration and immersion time especially, at colchicines concentration 7.5 mM, 48 hr that gave morphological characters significantly lower than that of control. The putative polyploidy palms which were observed in most treatments varied from 2.70 to 50.00% of survived palms. But only the treatments of 5.0 and 7.5 mM with 48 hr provided the tetraploids at 7.69 and 12.5% of survived palms, respectively. Morphological characters of polyploidy palms including height, width of bulb, number of pinnate leaves, 1st leaves area and densities of stomata were significantly lower than the diploid palms, except stomata sizes and chloroplast number. Highly positive correlations were observed between stomata sizes, chloroplast number and ploidy levels. In contrast, the stomatal densities showed highly negative correlations between ploidy levels.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	12
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	13
วัสดุ อุปกรณ์	13
วิธีดำเนินการวิจัย	15
3. ผลและวิจารณ์	19
4. สรุป	40
เอกสารอ้างอิง	41
ประวัติผู้เขียน	47

รายการตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	การโผล่พ้นดินของยอด (%) ในปาล์มน้ำมันระยะอนุบาลแรก 5 สายพันธุ์	5
ตารางที่ 2	เปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ ในระยะอนุบาลแรกของปาล์มน้ำมัน 5 สายพันธุ์	5
ตารางที่ 3	ผลของสารโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิตในกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 6 และ 12 เดือน	20
ตารางที่ 4	ค่า % corrected mortality ของกล้าปาล์มน้ำมันที่อายุ 12 เดือน	21
ตารางที่ 5	ค่า Mean squares ของลักษณะการเจริญเติบโตของกล้าปาล์มน้ำมัน	22
ตารางที่ 6	ผลของสารโคลชิซินต่อการปรากฏใบแรก และการสร้างใบชนิดต่างๆของกล้าปาล์มน้ำมัน	25
ตารางที่ 7	ผลของสารโคลชิซินต่อความสูงของกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 6 และ 12 เดือน	27
ตารางที่ 8	ผลของสารโคลชิซินต่อความกว้างโคนต้นของกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 6 และ 12 เดือน	28
ตารางที่ 9	ค่า Mean squares ของลักษณะเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในกล้าปาล์มน้ำมัน	29
ตารางที่ 10	ผลของสารโคลชิซินต่อลักษณะเซลล์คุม และ จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน	31
ตารางที่ 11	ผลของสารโคลชิซินต่อการชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ของกล้าปาล์มน้ำมัน	33
ตารางที่ 12	ลักษณะสัณฐานของกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือนที่ระดับพลอยด์ดีต่างกัน	37
ตารางที่ 13	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะเซลล์คุม จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ และ จำนวนชุดโครโมโซม	39

รายการรูป

	หน้า
รูปที่ 1 เมล็ดงอกปาล์มน้ำมันที่ผ่านการทำลายการพักตัวอายุ 30 วัน	14
รูปที่ 2 ค่า LD_{50} ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือนเมื่อจุ่มแช่สาร 48 ชั่วโมง	21
รูปที่ 3 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปรากฏใบแรก ในช่วงอายุ 1 เดือน	24
รูปที่ 4 ลักษณะผิดปกติของใบกล้าปาล์มน้ำมันที่ อายุ 2 เดือน	24
รูปที่ 5 โครโมโซม จากปลายรากของต้นกล้าปาล์มน้ำมันแบบมิกโซพลอยด์	34
รูปที่ 6 ผลของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน	34
รูปที่ 7 ผลของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานต้นกล้าอายุ 12 เดือน	36
รูปที่ 8 ผลของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน	38

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq., 2n=2x=32) เป็นพืชน้ำมันที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อไร่ต่อปีสูงที่สุดในบรรดาพืชน้ำมันทั้งหมด (Corley and Tinker, 2003) พันธุ์การค้าที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือพันธุ์เทเนอรา (Tenera) ที่มีกะลาบางเป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างแม่พันธุ์ดูรา (Dura) ที่มีกะลาหนาและพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา (Pisifera) ที่ไม่มีกะลา ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชยืนต้นผสมข้ามปกติใช้เมล็ดในการขยายพันธุ์เริ่มให้ผลผลิตเมื่ออายุประมาณ 3 ปี และสามารถให้ผลผลิตได้ต่อเนื่องนานกว่า 25 ปีขึ้นไป ปาล์มน้ำมันสกัดได้นำไปใช้ประโยชน์อย่างมากมายทั้งในด้านอุปโภคและบริโภคและในปัจจุบันยังเป็นพืชพลังงานทดแทนในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล (ธีระ และคณะ, 2544; ธีระ, 2548)

การสร้างพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีในปัจจุบันที่เกี่ยวข้องจึงเชื่อพันธุกรรมที่ค่อนข้างแคบ (Kushairi and Rajanaidu, 2000) การจัดการเกี่ยวกับยีนและโครโมโซมโดยการชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ (polyploidy) เป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันได้ ซึ่งที่ผ่านมาวิธีการชักนำพอลีพลอยด์ที่นิยมใช้สารโคลชิซินการเกิดพอลีพลอยด์มักจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้ลักษณะที่ดีเกิดขึ้นมากขึ้นเช่นผลที่ใหญ่ขึ้นมีผลผลิตที่เพิ่มขึ้นให้ปริมาณสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นในพืชสมุนไพรเป็นต้นจึงให้ฐานพันธุกรรมที่กว้างขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ (Yang *et al*., 2003) สำหรับวิธีการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซมในพืชที่นิยมปัจจุบันคือวิธีโฟลไซโตเมทรี (flow cytometry) ซึ่งเป็นวิธีที่แม่นยำและรวดเร็วแต่ก็จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงมาก การวัดขนาดและความหนาแน่นเซลล์คุมเป็นวิธีการที่สามารถใช้ทดแทนเพื่อการตรวจสอบพอลีพลอยด์ในเบื้องต้นได้ (Yang *et al*., 2006) สำหรับในปาล์มน้ำมันจึงคาดหวังในเรื่องของผลผลิตที่เพิ่มขึ้นอัตราการเพิ่มความสูงในรอบปีช้าลงและการให้ผลผลิตที่ดีขึ้นหรือลักษณะพิเศษอื่นๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบขั้นต้นที่สามารถชี้ปัจจัยที่เหมาะสมในการทรีตสารโคลชิซินกับเมล็ดเพื่อชักนำให้ปาล์มน้ำมันเกิดพอลีพลอยด์และตรวจสอบผลของสารโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิตการเจริญเติบโตการเปลี่ยนแปลงขนาดความหนาแน่นของเซลล์เซลล์คุมและจำนวนโครโมโซมในเซลล์คุมของ

ปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการปลูกเพื่อดูการสร้างผลผลิตต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ Arecaceae (เดิมชื่อวงศ์ Palmae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Elaeis guineensis* Jacq. จัดเป็นพืชยืนต้นโดยมีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious plants) เมื่อปลูกลงแปลงจะเริ่มให้ผลผลิตที่อายุ 2 ปีครึ่งและสามารถให้ผลผลิตได้ต่อเนื่องมากกว่า 25 ปีขึ้นไป ต้นมีขนาดความสูง 15-18 เมตร ขนาดลำต้น 45-60 เซนติเมตร มีอัตราการสร้างทางใบเฉลี่ยปีละ 20-40 ทางใบ ที่ผลสุกจะมีสีแดงอมม่วง-ส้ม พันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าปัจจุบันได้แก่พันธุ์ลูกผสมเทเนอรา (Tenera P) (ธีระ, 2548)

2. พฤกษศาสตร์ของปาล์มน้ำมัน

ราก เป็นแบบรากฝอยประกอบด้วยรากชุดต่างๆประมาณ 4 ชุด รากชุดแรกอยู่ในระดับแนวนอนยาว 3-4 เมตรจากต้น ถ้าอยู่แนวดิ่งจะยาว 1-2 เมตร รากชุดที่ 2 3 และ 4 เกิดเรียงกันมา

ลำต้น มีลักษณะตั้งตรง ไม่มีกิ่งแขนงมีจำนวนข้อเกิดบนต้นแต่ละข้อมีหนึ่งทางใบเกิดเวียนเป็นเกลียวรอบลำต้น (spiral) พบมีทั้งการเวียนซ้ายและขวา (ธีระ, 2548)

ใบ เป็นใบประกอบแบบขนนก (pinnate) มีลักษณะไม่สมดุล ทางใบแบ่งออกเป็นสองส่วนได้แก่ แกนกลางใบ และก้านใบ (เรวัต, 2541)

ช่อดอกและดอก เป็นแบบ compound spike หรือ spadix พัฒนามาจากตาที่ซอกใบ แยกเป็นช่อดอกตัวผู้และช่อดอกตัวเมียแต่อยู่บนต้นเดียวกัน มีกาบเรียกว่า spathe จำนวน 2 อัน ก้านช่อดอกมีขนาดใหญ่ ช่อดอกตัวผู้มีความยาวมากกว่าช่อดอกตัวเมีย ดอกไม่มีก้าน ภายในกลุ่มดอกเดียวกันดอกย่อยที่อยู่บริเวณฐานจะบานก่อน

ผล เป็นแบบ drupe เกิดเป็นช่อ เรียกว่า ทะลาย เปลือกแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ได้แก่เปลือกชั้นนอก (exocarp) ชั้นกลางหรือเนื้อผล (mesocarp) และชั้นในสุด (endocarp)

3. โครโมโซมของปาล์มน้ำมัน

สกุล *Elaeis* มีโครโมโซมอยู่ด้วยกัน 16 คู่ เป็นแบบดิพลอยด์ 2x (2n = 32) และได้จัดกลุ่มโครโมโซมของปาล์มน้ำมันออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแบ่งตามขนาดความยาวของโครโมโซม พบว่า กลุ่มที่มีความยาวสูงสุดมีโครโมโซม 1 คู่ กลุ่มที่มีความยาวปานกลางมี 8 คู่ และกลุ่มที่มีความยาวสั้นสุดมี 7 คู่ โครโมโซมของ *Elaeis oleifera* ใช้ขนาดความยาวของโครโมโซมเป็นตัวแบ่งกลุ่มเช่นเดียวกัน และมีความยาวเหมือนกันกับโครโมโซมของ *Elaeis guineensis* (Corley and Tinker, 2003)

4. โครโมโซมและการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม

โครโมโซม คือ โครงสร้างทางพันธุกรรมที่เป็นที่อยู่ของหน่วยพันธุกรรม โครโมโซมทำหน้าที่เก็บรักษาถ่ายทอดและแสดงออกของข้อมูลทางพันธุกรรม จีโนม (genome) หมายถึงจำนวนโครโมโซมหรือปริมาณดีเอ็นเอใน 1 ชุดถ่ายทอดจากพ่อแม่ให้กับลูกดังนั้น 1x หมายถึง 1 ชุด โดยที่สิ่งมีชีวิตชนิดดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมในแกมีโตไฟต์เป็น 1ชุด และในเซลล์ร่างกายเป็น 2x ในสภาพปกติ จะพบสิ่งมีชีวิตที่เป็นดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2ชุด และมีองค์ประกอบของโครโมโซมเป็นจีโนมชุดเดียวกัน 2 ชุด ส่วนพอลีพลอยด์เป็นสิ่งมีชีวิตที่เซลล์ร่างกายมีจีโนมมากกว่า 2 ชุดขึ้นไป เช่น 3 ชุด (triploid) และ 4 ชุด (tetraploid) เป็นต้น โดยแต่ละชุดของจีโนมอาจเหมือนกันหรือแตกต่างกันก็ได้ สำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานครบเรียกว่า ยูพลอยด์ (euploid) ส่วนสิ่งมีชีวิตที่มีโครโมโซมไม่ครบตามพื้นฐานขาดหายไปหรือเพิ่มมาบางแท่งเรียกว่า อัลนิวพลอยด์ (aneuploid) พอลีพลอยด์อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จากการที่เซลล์มีการจำลองตัวของโครโมโซมเกิดขึ้นแต่กลับไม่มีการแบ่งเซลล์ ตามมาจึงทำให้เซลล์นั้นมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น พอลีพลอยด์สามารถแบ่งได้เป็นสองประเภทคือ

1) อัลโลพอลีพลอยด์ (allopolyploid) หมายถึง การเพิ่มจำนวนโครโมโซมจากพืชต่างชนิดกันหรือพืชที่มีจีโนมแตกต่างกันเป็นชนิดที่โครโมโซมที่เพิ่มขึ้นเป็นชุดมีจีโนมต่างกันเป็นพอลีพลอยด์ที่เกิดจากการผสมระหว่างสปีชีส์ หรือเป็นการผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) ซึ่งเป็นชุดของโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นไม่เหมือนกันเพราะเกิดมาจากพ่อแม่ที่ต่างกันมีโครโมโซมของพ่อแม่ของพอลีพลอยด์ชนิดหนึ่งมีจีโนมเป็น AA และ BB ลูกผสมชั่วที่ (F_1) ที่จะเป็น AB ซึ่งลูกผสมที่ได้มักจะเป็นหมันเพราะขาดคู่โครโมโซมที่เป็นโฮโมโลกัสแต่เมื่อชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมแล้วจะได้โครโมโซมที่เป็น AABB ลูกผสมที่ได้รับการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ปกติ

การเกิดอัลโลพอลีพลอยด์ ในพืชมักให้ผลผลิตสูงกว่าพืชดิพลอยด์ ปกติ ตัวอย่างเช่น ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ยาสูบ สตรอเบอรี่ และฝ้ายเป็นต้น (อมรา, 2540)

2) ออโตพอลีพลอยด์ (autopolyploid) หมายถึงการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซมจากพืชชนิดเดียวกันเป็นชนิดที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดเดิมการเข้าคู่กันของโฮโมโลกัสโครโมโซมประกอบด้วยโครโมโซมที่มากกว่า 2 แท่งขึ้นไป เช่น ดิพลอยด์ มีจีโนมเป็น AA ซึ่งเมื่อกลายเป็น ออโตพอลีพลอยด์ จะมีจีโนมเป็น AAAA ตัวอย่างที่เกิดกับพืช เช่น กล้วย ถั่วลิสง และมันเทศ พืชชนิดนี้มักมีผลผลิตสูงกว่าพืชดิพลอยด์ ปกติ (อมรา, 2540

5. เมล็ดงอก และคุณภาพของเมล็ดงอกปาล์มน้ำมัน

ภายใต้สภาวะแวดล้อมธรรมชาติ ปกติเมล็ดของปาล์มน้ำมันมีการพักตัว และต้องใช้ระยะเวลานานหลายปีถึงสามารถงอกได้ และงอกแบบไม่มีความสม่ำเสมอ การทำธุรกิจต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำเป็นต้องมีเมล็ดงอกที่มีความสม่ำเสมอสูงและแข็งแรง เพื่องายต่อการวางแผนและการจัดการ จึงต้องมีวิธีการทำลายการพักตัวของเมล็ด ดังนั้นวิธีการทำลายการพักตัวของเมล็ดปาล์มน้ำมันที่นิยมในปัจจุบันมีอยู่ 2 วิธี ได้แก่ วิธีแห้ง (dry heat method) และวิธีการอบความร้อนเปียก (wet heat method) คุณภาพของเมล็ดงอกนั้นมีอิทธิพลมาจากปัจจัยทางพันธุกรรม และปัจจัยสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการงอก เช่น ความชื้นเมล็ด อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น (Kushairi and Rajanaidu, 2000) นอกจากนี้ Mora และคณะ (2007) ยังพบว่ามีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องต่อคุณภาพของเมล็ดงอกอีก

1) เวลาที่ใช้สำหรับการงอก

การทำลายการพักตัวของเมล็ดปาล์มน้ำมันทำได้โดยการใช้ความร้อน และเร่งการงอกด้วยการเพิ่มปริมาณความชื้นโดยการแช่เมล็ดในน้ำ ถึงแม้ว่าเมล็ดทุกเมล็ดไม่สามารถงอกได้ที่เวลาเดียวกัน ซึ่งพบว่าความแข็งแรงของเมล็ดงอกนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยพันธุกรรมแล้วยังพบว่ามีความสัมพันธ์ในทางตรงข้ามกับเวลาที่ใช้ในการงอก เมล็ดที่ใช้เวลาในการงอกนานจะมีความแข็งแรงต่ำซึ่งวัดได้จากความสามารถในการปรากฏโคลีออปไทล์ของยอดเมื่อนำเมล็ดไปเพาะในถุงและพบลักษณะผิดปกติเกิดมากขึ้นในต้นกล้าเมื่อใช้เวลาในการงอกเร็วกว่ามีแนวโน้มเป็นต้นกล้าที่ปกติ ซึ่งจากการทดลองการทำเมล็ดงอกของปาล์มน้ำมัน พบว่าทั้ง 5 คู่ผสมมีแนวโน้มเป็นเมล็ดที่มีความแข็งแรงต่ำและมีผิดปกติมากขึ้นเมื่อเมล็ดใช้เวลาในการงอกนาน (ตารางที่ 1 และ 2) เมล็ดที่ไม่สามารถงอกได้หรืองอกเร็วหลังจากผ่านขั้นตอนการ

ทำลายการพักตัวแล้วนั้นอาจเกิดมาจากการสูญเสียความงอกเอ็มบริโอซึ่งมีสาเหตุมาจากความเครียดในระหว่างขั้นตอนการทำงอกเมล็ดที่ใช้เวลานานกว่า 4 สัปดาห์มักอ่อนแอและอาจจะปรากฏลักษณะผิดปกติได้ซึ่งทำให้ได้ลักษณะที่ไม่ดีออกมาเช่นกัน

ตารางที่ 1 การโผล่พ้นดินของยอด (%) ในปาล์มน้ำมันระยะอนุบาลแรกเริ่มของสายพ

	Number of week after break dormancy				
Variety	1	2	3	4	5
Deli x Ekona	99.2	98.4	79.2	80.0	45.6
Deli x Ghana	100.0	100.0	92.8	92.8	90.4
Deli x LaMe	100.0	99.2	76.0	72.8	83.2
Deli x AVROS	99.2	100.0	83.2	86.4	95
Deli x Nigeria	100.0	87.2	90.4	77.6	83.2
Average	99.7	97.0	84.3	81.9	79.5

ที่มา : Mora และคณะ (2007)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติในระยะอนุบาลแรกของปาล์มน้ำมันสาย

	Number of week after break dormancy				
Variety	1	2	3	4	5
Deli x Ekona	0.0	4.0	13.6	17.6	21.6
Deli x Ghana	0.8	0.0	6.4	8.8	1.6
Deli x LaMe	0.0	2.4	13.6	17.6	16.8
Deli x AVROS	0.8	1.6	6.4	7.2	8.0
Deli x Nigeria	4.0	1.6	2.4	7.2	10.4
Average	1.1	1.9	8.5	11.7	11.7

ที่มา : Mora และคณะ (2007)

2) เชื้ อราที่ เกี่ ยวข้ องกับการงอกของเมล็ ด

มีเชื้ อรามากกว่า 20 ชนิ ดที่ เกี่ ยวข้ องกับกระบวนการงอกของเมล็ ดปาล์ มน้ ำมั น เช่น *Penicillium* spp. *Aspergillus* spp *Schizophyllum* spp. และ *Fusarium* spp. ซึ่ งอาจเป็นผลร้ ายต่อกระบวนการงอกและการพั ฒนาไปเป็นต้ นกล้ าของเมล็ ด เชื้ อราเหล่านี้ จะเกี่ ยวข้ องต่อการแสดงลั กษณะ browngerm เชื้ อราอีกชนิ ดหนึ่ งคือ *Fusarium oxysporum* f sp. elaeidis เป็นเชื้ อราชนิ ด seed-born ซึ่ งมีผลต่อการงอกและการพั ฒนาของต้ นพืช ส่วนเชื้ อราที่ เป็นสาเหตุ โรคพืชที่ พบมากที่ สุ ดคือ *penicilium* spp. เชื้ อราเหล่านี้ สามารถที่ จะทำให้ ความสามารถในการงอกของเมล็ ดลดเปอร์ เซ็ นต์ การโผล่พ้ นดิ นของยอดหลั งจากปลู กและยั งให้ โอกาสเป็นเชื้ อก่อโรคสู งขึ้ น การปนเปื้ อนและทำความเสียหายของเชื้ อราเป็นการเพิ่ มความเครียดให้ กับเมล็ ดมากกว่าที่ จะสร้ างความเสียหายโดยตรง ส่วนที่ เหลือของเนื้ อผลที่ ติ ดอยู่ กับเมล็ ดเป็นสิ่ งที่ เชื้ อราชอบมาก นอกจากนี้ การเข้ าทำลายของเชื้ อราจะรุ นแรงมากถ้ ามีอุ ณหภู มิ และความชื้ นที่ เหมาะสม ลั กษณะเส้ นใยของเชื้ อราซึ่ งก่อให้ เกิ ดความเครียดต่อเอ็ มบริ โอได้ มากขึ้ น การเพิ่ มความเครียดสามารถทำได้ โดยการปั่ นทะลายให้ ดีขึ้ นเพื่ อใช้ในการปั่ นเอาส่วนของเนื้ อผลออกให้ ได้ สะอาด และการควบคุ มอุ ณหภู มิ และความชื้ นของเมล็ ดให้ ดี ช่วยลดการปนเปื้ อนของเชื้ อราได้ การใช้ สารป้ องกันกำจั ดเชื้ อราและการคั ดเลือกเมล็ ดที่ มีคุ ณภาพดีไม่มีการปนเปื้ อนเชื้ อราก่อนและหลั งการงอกเป็นพื้ นฐานการปฏิ บั ติ ที่ ช่วยเพิ่ มคุ ณภาพของเมล็ ดงอกได้

ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเมล็ ดปาล์ มน้ ำมั นที่ งอกสมบูรณ์ แล้ วประกอบด้ วย 4 ส่วนสำคั ญคือ ส่วนยอด ส่วนราก ส่วนสะสมอาหารเพื่ อการเจริ ญเติ บโตในระยะแรกของต้ นกล้ า และส่วนกะลา ซึ่ งส่วนยอดและรากที่ จะเจริ ญเติ บโตต่อไปนั้ นมีความสั มพั นธ์ กับส่วนสะสมอาหารในช่วง 10 สั ปดาห์ แรกของการพั ฒนา หากส่วนดั งกล่าวหลุ ดออกจากเมล็ ดจะทำให้ ต้ นกล้ าปาล์ มน้ ำมั นตาย (Ian and Thomas, 1998)

เมล็ ดปาล์ มน้ ำมั นลู กผสมเทเนอราที่ มีการผลิ ตเป็นการค้ า มี 3 ชนิ ด (ภาพที่ 2.1) คือ เมล็ ดพั นธุ์ แห้ ง (dry seed) เมล็ ดพั นธุ์ ชนิ ดนี้ ยั งไม่ผ่านการทำลายการพั กตั ว โดยการอบความร้ อนที่ อุ ณหภู มิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40-90 วั น จะต้ องนำเมล็ ดไปเพาะให้ งอกซึ่ งต้ องใช้ เวลาเพิ่ มอีก 20-45 วั น ชนิ ดต่อมาคือเมล็ ดพั นธุ์ ที่ ผ่านการทำลายการพั กตั ว (pre – heated seed) เมล็ ดพั นธุ์ ชนิ ดนี้ จะต้ องนำไปเพาะให้ งอก ใช้ เวลา 20-45 วั น และชนิ ดสุ ดท้ าย คือ เมล็ ดพั นธุ์ ที่ งอกแล้ ว (germinated seed) เมล็ ดชนิ ดนี้ เป็นที่ นิ ยมกั นอย่างแพร่หลาย เพราะไม่ต้ องนำเมล็ ดมาผ่านขั้ นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการเพาะให้ งอก ซึ่ งขั้ นตอนต่าง ๆ เหล่านี้ มีความยุ่ งยากและไม่สามารถควบคุ มอั ตราการงอกของเมล็ ดได้

6. การเพาะกล้า และการเจริญเติบโตของกล้าปาล์มน้ำมัน

การจัดรูปแบบการจัดการต้นกล้าปาล์มน้ำมันมี 2 วิธี คือ การเพาะกล้าปาล์มน้ำมันแบบอนุบาลครั้งเดียว และการเพาะกล้าปาล์มน้ำมันแบบอนุบาลสองครั้ง ซึ่งมีความแตกต่างกันในด้านค่าใช้จ่ายและต้นทุนต่าง ๆ ระหว่างรูปแบบการจัดการแปลงเพาะกล้าปาล์มน้ำมันทั้งสองวิธีนั้นทำได้ค่อนข้างยากและไม่มีความแตกต่างกันมากนัก (Turner and Gillbanks, 1982) ทำให้การตัดสินใจเลือกวิธีการเพาะในรูปแบบใดนั้นควรพิจารณาถึงความเหมาะสมกับขนาดของแปลงประสบการณ์ ความชำนาญและข้อดีในด้านต่าง ๆ ของทั้งสองวิธีการ (กรมวิชาการ, 2542 ; Tan and Mohan, 1981 ; Turner and Gillbanks, 1982) ข้อดีของวิธีการเพาะกล้าปาล์มน้ำมันแบบอนุบาลสองครั้ง คือ สะดวกในการดูแลรักษากล้าปาล์มน้ำมันในระยะเริ่มต้นที่มีขนาดเล็กซึ่งต่างจากแปลงเพาะมีขนาดเล็กจึงใช้แรงงานและการให้น้ำน้อยกว่าการเพาะแบบอนุบาลครั้งเดียวสามารถคัดกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติได้ง่ายและยังสามารถลดพื้นที่สำหรับการเพาะกล้าปาล์มน้ำมันในระยะอนุบาลเล็กได้ ในกรณีที่ต้องเพาะกล้าปาล์มน้ำมันแบบต่อเนื่องทุกปีถ้ากล้าปาล์มน้ำมันจำหน่ายไม่หมดก็สามารถเพาะกล้าปาล์มน้ำมันได้อย่างต่อเนื่องเพื่อใช้ขยายส่วนข้อดีของการเพาะปลูกกล้าปาล์มน้ำมันแบบอนุบาลครั้งเดียว คือ กล้าปาล์มน้ำมันมีโอกาสตั้งตัวได้ดีกว่าการเพาะแบบอนุบาลสองครั้ง เพราะกล้าปาล์มน้ำมันไม่ได้รับการกระทบกระเทือนจากการย้ายปลูกซึ่งสามารถลดระยะเวลาการเพาะกล้าปาล์มน้ำมันลงได้ 1-2 เดือน ลดค่าใช้จ่ายได้ ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการซื้ออุปกรณ์พลาสติกขนาดเล็กและการใช้แรงงานในการปลูกลงถุงเพาะชำ ก็ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการย้ายกล้าปาล์มน้ำมันลงปลูกในถุงใหญ่

ส่วนลักษณะการเจริญเติบโตของกล้าปาล์มน้ำมันในช่วงสัปดาห์แรกที่ต้นกล้าปาล์มน้ำมันมีการใช้อาหารที่สะสมในส่วนของเอนโดสเปิร์มในการเจริญเติบโตของเอนโดสเปิร์มประกอบด้วยไขมัน 47% และคาร์โบไฮเดรต 36% การพัฒนาของต้นกล้าให้ประโยชน์จากส่วนของคาร์โบไฮเดรตก่อนส่วนของไขมันต้นกล้าปาล์มน้ำมันจะใช้ไขมันในการเจริญเติบโต 80% ในช่วง 3 เดือนแรก และใช้ 98% ในช่วง 5 เดือนหลังจากงอก ไขมันบางส่วนถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจ และน้ำหนักของเมล็ดลดลง 20% หลังจากที่กล้ามีอายุ 3 สัปดาห์ พื้นที่ใบของต้นกล้าช่วงอนุบาลแรกมีความสัมพันธ์ทางบวกแบบเกาส์เซียนกับลักษณะของน้ำหนักเนื้อในเมล็ด (kernel) แต่ลักษณะดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์เมื่อต้นกล้าเข้าสู่ระยะอนุบาลหลักซึ่งชี้ให้เห็นว่าส่วนของเนื้อในเมล็ดมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในช่วงแรก ส่วนของยอดในต้นกล้าปาล์มน้ำมันจะไม่แทงยอดจากส่วนของปลายยอดถ้าหากว่า

รากยังยาวไม่ถึง 1 เซนติเมตร รากแขนงชุดแรกถูกสร้างมาบริเวณวงแหวนบนรอยเชื่อมต่อระหว่างส่วนของรากกับลำต้นและสร้างรากแขนงชุดที่สองก่อนที่รากปฐมภูมิจะงอกออกมา

การเจริญเติบโตและการพัฒนาของกล้าปาล์มน้ำมันจะมีใบในระยะเริ่มต้นช่วง 6 เดือนแรกค่อนข้างช้าโดยสร้างเพียงเดือนละ 1 ใบ และใบที่ 1-4 มีลักษณะเป็นใบรูปหอก (lanceolate) หลังจากเดือนที่ 3-4 ส่วนฐานของลำต้นจะมีขยายใหญ่ขึ้นและรากจริงอันแรกงอกออกมาจากส่วนฐานลำต้นซึ่งมีขนาดใหญ่และหนากว่ารากอื่นและเจริญลงไปทำมุม 45 องศากับพื้นดินเดือนที่ 4-6 ของการพัฒนาต้นกล้าจะมีใบสร้างมาเป็นใบรูปสองแฉก (bifurcate) เดือนที่ 7 เป็นต้นไปกล้าปาล์มน้ำมันจะสร้างใบขนนก (pinnate) โดยใบรูปขนนกอยู่ในตำแหน่งใบที่ 9-20 และพบว่าต้นกล้าอายุ 6 เดือนจะมีใบเกิดขึ้น 2 ชุด คือ ใบลักษณะเป็นรูปหอกและใบเป็นรูปสองแฉกเมื่อต้นกล้าอายุ 7 เดือนขึ้นไปจะเป็นใบหอกและใบรูปสองแฉกจะแห้งตาย (ชูจิตและคณะ, 2536; Tan and Mohan, 1981; Chin *et al*., 1998)

7. การชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในพืช และการใช้ประโยชน์

การเกิดพอลีพลอยด์ เป็นการที่โครโมโซมมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดไปมากกว่าสองชุดขึ้นไป อาจเกิดขึ้นเองในธรรมชาติ จากการทำงานผิดปกติของเส้นใยสปินเดิลทำให้โครโมโซมที่จำลองตัวเองขึ้นมาไม่ถูกดึงออกจากกันหรือในขั้นตอนการแบ่งแบบไมโอซิส (meiosis) เซลล์สืบพันธุ์ที่ได้ไม่ลดจำนวนลงและเมื่อมีการผสมเกิดขึ้นได้จึงเกิดเป็นต้นพอลีพลอยด์ อย่างไรก็ตามการเกิดพอลีพลอยด์ในธรรมชาติมีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมาก จึงได้มีการศึกษาทดลองชักนำพอลีพลอยด์ขึ้นซึ่งมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน เช่น การใช้รังสีและการใช้สารเคมีเพราะเนื้อเยื่อและการผสมพันธุ์ระหว่างต้นดิพลอยด์กับต้นเททระพลอยด์จะได้ในระดับทริปพลอยด์ (3x) เป็นต้นซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีโอกาสเกิดพอลีพลอยด์ในธรรมชาติเนื่องจากเซลล์มีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลาในสภาพแวดล้อมที่สร้างขึ้นให้เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ภายในหลอดทดลอง แต่วิธีการที่นิยมใช้กันอย่างมากในปัจจุบันคือการใช้สารเคมีซึ่งพบว่าการใช้สารโคลชิซินให้ผลการเพิ่มชุดโครโมโซมได้อย่างดี (Ezwan, 2009) โคลชิซินเป็นสารพวก alkaloid ที่สกัดมาจากพืช *Colchicum autumnale* L. ซึ่งจะไปทำให้ไม่มีการสร้างเส้นใยสปินเดิลส่งผลให้โครโมโซมไม่ถูกดึงไปที่ขั้วในระยะแอนนาเฟสทำให้โครโมโซมเพิ่มจำนวนชุดเกิดขึ้น (Caperta *et al*., 2006) Blakeslee และ Avery (1937) ประสบผลสำเร็จครั้งแรกในการใช้สารโคลชิซินในการชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในพืชไร่ สารอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ทำเพื่อชักนำพอลีพลอยด์ คือ ออไรซาริน โดยประสบผลสำเร็จครั้งแรกในการใช้เพิ่มโครโมโซมในต้นโป๊ยมันฝรั่ง (Ramulu *et al*.,

1991) ออไรซาริ นมีพิ ษน้ อยกว่าโคลชิ ซิ น และมีความเหมาะสมกว่าที่ จะใช้ ในการเพิ่ มจำ นวน ชุ ดโครโมโซมในพืชหลาย ๆ ชนิ ด (Ramulu *et al*., 1991; van Tuyl *et al*., 1992; Tosca *et al*., 1995) การเกิ ดพอลีพลอยด์ ส่วนมากทำ ให้ เกิ ดลั กษณะที่ ดีทางการเกษตร เช่น การเพิ่ มขึ้ นของผลผลิ ต การเพิ่ มขนาดของผลให้ ใหญ่ขึ้ น การเพิ่ มปริ มาณสารเกิ ดขึ้ นในพืชสมุ นไพร และการมีลั กษณะที่ สวยงามเกิ ดขึ้ นในพืชประดับ เป็นต้ น การใช้ ประโยชน์ จากการเพิ่ มชุ ดโครโมโซมมีหลายวัตถุ ประสงค์ เช่น การสร้ างสายพันธุ์ เป็นหมันโดยการสร้ างต้ นทริ พพลอยด์ (3x) จากการชักนำ ให้ เกิ ดเททระพลอยด์ (4x) ในพ่อหรือแม่แล้ วนำ ไปผสมกับพ่อหรือแม่ที่ เป็น 2x เกิ ดเป็นลู กทริ พพลอยด์ (3x) ซึ่ งในส้ มนั้ นใช้ ประโยชน์ เพื่ อทำ ให้ ไม่มีเมล็ ด (Wu and Mooney, 2002) ในพืช London plane (*Plantanus acerifolia*) การสร้ างต้ นทริ พพลอยด์ มีวัตถุ ประสงค์ เพื่ อช่วยลดปัญหาของ pollen และการหลุ ดร่วงของเมล็ ดซึ่ งอาจเป็ นpollution ที่มีผลต่อสุ ขภาพมนุ ษย์ (Guofeng *et al*., 2007) ในพืช *Scutellaria* (Gao *et al*., 2002) *Artemisia* (DE Jesus-Gonzalez and Weathers, 2003) และ Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) (Viehmannova *et al*., 2009) มีการชักนำ ให้ เกิ ดเททระพลอยด์ เพื่ อเพิ่ มปริ มาณของสารทุ ติ ยภู มิ ซึ่ งเป็นสารสำ คัญที่ สกัดมาใช้ เป็นยาต่อไป

8. การทดลองชักนำพอลีพลอยด์ในพืช และผลที่ได้ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐาน

ได้ มีการทดลองชักนำ พอลีพลอยด์ กันอย่างมากมายในพืชหลายชนิ ดผ่านสารเคมี ซึ่ งพืชที่เลือกมาใช้ ศึกษาทดลองนั้ นก็ ขึ้ นอยู่กับวัตถุ ประสงค์ ของผู้ที่ ได้ ต่อการนำ ไปใช้ ประโยชน์ ซึ่ งได้ กล่าวมาแล้ วข้ างต้ น ผลของต้ นพอลีพลอยด์ ที่ได้ จะมีลั กษณะที่ แตกต่างกันไปขึ้ นอยู่กับพืชแต่ละชนิ ดเช่นกัน เช่น Li และคณะ (2007) ทำ การทดลองชักนำ พอลีพลอยด์ กับ *Lespedeza formosa* โดยใช้ สารโคลชิ ซิ นที่ ระดับความเข้ มข้ นต่างๆ ผ่านเข้ าทาง hypocotyls และส่วนยอดผลที่ ได้ พบว่าการใช้ สารโคลชิ ซิ นกับส่วนยอดจะดีกว่าที่ ระดับความเข้ มข้ น 0.1% ระยะเวลา 36 ชั่ วโมงให้ ผลการชักนำ พอลีพลอยดีที่ ได้ ถึง 44 % ต้ น *Lespedeza formosa* ที่ผ่านการชักนำ มีลั กษณะการเจริ ญเติ บโตที่ ช้ ามีส่วนใบของลำ ต้ นและใบที่ กว้ างมากกว่าต้ นปกติ Thao และคณะ (2003) ทำ การทดลองชักนำ เททระพลอยด์ ในพืช *Jatropha curcasia* โดยใช้ สารเคมี โคลชิ ซิ น และ ออไรซาริ น ที่ ระดับความเข้ มข้ นและเวลาต่าง ๆ กันแล้ วนำ ส่วนของปลายยอดจำ นวนทั้ งสิ้ น 396 ต้ น ผลที่ ได้ พบว่า ชุ ดควบคุ มมีโครโมโซมเป็นแบบดิ พลอยด์ (2n = 22) ส่วนชุ ดที่ ใช้ สารโคลชิ ซิ น และ ออไรซาริ น พบว่า มีเททระพลอยด์ 22 ต้ น และมีลั กษณะไคเมร่า 22 ชุ ดที่ ให้ ผลการชักนำ เททระพลอยด์ ได้ ดีที่ สุ ดคือ ชุ ดที่ ชักนำ ด้ วยสารเคมี ออไรซาริ น ที่ 0.01% ระยะเวลา 24 ชั่ วโมง

ลักษณะทางสัณฐานที่พบในต้นที่เป็นพอลีพลอยด์ คือจะมีใบที่เปลี่ยนไปเป็นรูปคล้ายวงกลมซึ่งต่างจากชุดควบคุมที่ใบเป็นรูปหัวใจ มันต์ชูเกตะคณะ (2548) ทดลองชักนำพอลีพลอยด์ในฝ้ายพื้นเมืองด้วยสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.2% โดยทดลองทั้งหมด 2 วิธีการได้แก่ หยดที่ยอดต้นกล้าอายุ 4 วันแช่เมล็ดในน้ำ 24 ชั่วโมงแล้วนำมาแช่สารโคลชิซิน 24 ชั่วโมง และแช่เมล็ดในน้ำ 48 ชั่วโมงแล้วนำมาแช่สารโคลชิซิน 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราการงอกของทั้งสองวิธีการเท่ากับ 9.55 และ 14.5 % ตามลำดับ ลักษณะต้นกลายพันธุ์ที่ได้มีลักษณะใบใหญ่กว่า มีสีเขียวและขนาดเซลล์คุมมากกว่าต้นปกติ ศรีสุดา วรวิสา (2542) ทำการทดลองชักนำพอลีพลอยด์ในต้นบัวบกด้วยสารโคลชิซิน 1-2 % โดยทดลองชักนำได้สองวิธีใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซินแล้ววางบนต้นอ่อน และผสมสารโคลชิซินกับวุ้นทาบริเวณยอดของต้นอ่อน พบว่าวิธีแรกสามารถชักนำให้เกิดต้นพอลีพลอยด์ได้ดีที่สุด นที่ได้มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมและจำนวนโครโมโซมสูงกว่าต้นปกติ Arif และคณะ (2000) ทดลองชักนำต้นพอลีพลอยด์ในกล้วยป่าโดยใช้สารโคลชิซินกับ 0.5% dimethylsulfoxide 2% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผ่านทางส่วนยอด สามารถให้ต้นเททระพลอยด์ได้ โดยตรวจสอบด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรีและการนับจำนวนโครโมโซม สมพรและวิทูล (2547) ศึกษาผลของสารโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของหน้าวัวที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่มีระดับความเข้มข้น 0 0.01 0.05 และ 1 % ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง กับแคลลัสและข้อพบว่าอัตราการรอดชีวิตมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินเพิ่มขึ้น ผลของโคลชิซินไม่มีผลต่อการเกิดปากใบในต้นหน้าวัว

ในพืชตระกูลกล้วยไม้ Silva และคณะ (2000) ศึกษาผลของสารโคลชิซินต่อการชักนำพอลีพลอยด์ใน protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้ *Cattleya* ในสภาพปลอดเชื้อโดยได้ทดลองทรีตสารโคลชิซิน 4 ระดับความเข้มข้น 0.00 0.05 และ 0.20% 2 ระยะเวลา คือ 4 และ 8 วัน พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.05 และ 0.20% ชักนำต้นมิกโซพลอยด์และเททระพลอยด์ที่ดีต้นเททระพลอยด์ที่ได้มีขนาดเซลล์คุมและจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมแตกต่างจากดิพลอยด์ปกติ และสามารถใช้ลักษณะเซลล์คุมเป็นตัวชี้โครโมโซมได้ Athichart และ Bunnag (2007) ได้ทำการชักนำพอลีพลอยด์ในกล้วยไม้ *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้ระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ใช้คือ 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 % ระยะเวลาการจุ่มแช่สาร 5 เวลาได้แก่ 1 2 3 4 และ 5 วัน พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.05 % ระยะเวลา 1 วันให้ผลดีที่สุดในการชักนำพอลีพลอยด์ ลักษณะทางสัณฐานของใบลำต้นรากขนาดดอกต้นพอลีพลอยด์มีขนาดใหญ่และหนากว่าต้นดิพลอยด์ปกติ และมีขนาดเซลล์คุมใหญ่กว่าแต่มีความหนาแน่นน้อยกว่า

สำหรับในพืชปาล์มน้ำมันได้มีการทดลองชักนำพอลีพลอยด์ บ้างแล้ว เช่น Mahdi และคณะ (2005) ได้ทำการทดลองชักนำพอลีพลอยด์ ในปาล์มโดยใช้สารเคมีโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 2.5 mM ถึง 10.0 mM และสารออไรซาลินที่ความเข้มข้น 15 mM ถึง 120 mM กับเมล็ดงอกที่ระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้สารโคลชิซินนำให้เกิดเททระพลอยด์ 9 ต้น ทริปพลอยด์ 2 ต้น และมิกโซพลอยด์จำนวนมาก ส่วนการใช้สารออไรซาลินชักนำให้เกิดทริปพลอยด์ 4 ต้น และมิกโซพลอยด์ (2x+3x และ 3x+4x) จำนวนมาก แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชนิดของสารเคมีและความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ ที่ใช้ กล่าวโดยทางสัณฐานวิทยาในต้นกล้านั้น พบว่าต้นที่เกิดพอลีพลอยด์ จะมีลักษณะต้นที่เตี้ยและมีใบที่หนาและสีเขียวเข้มกว่าต้นปกติ

9. วิธีการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในพืช

การชักนำพอลีพลอยด์ ในพืชจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจสอบชุดโครโมโซมมาเพื่อยืนยันผลที่ได้ วิธีที่นิยมใช้ตรวจสอบมีอยู่หลายวิธี ซึ่งผลที่ได้ก็มีความแม่นยำมากน้อยแล้วแต่วิธีการที่ใช้ และความชำนาญของผู้ทดลอง ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของพืชและอายุพืช วิธีการตรวจสอบที่นิยมใช้กันในปัจจุบันมีดังนี้

1) วิธีการนับจำนวนโครโมโซม เป็นวิธีการที่แม่นยำที่สุดในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม ส่วนใหญ่นิยมใช้ส่วนของปลายราก แต่มีบางพืชที่ใช้ส่วนปลายยอดมาตรวจสอบ เช่น พืช Crape myrtle (Zhang *et al*., 2009) วิธีการนี้ค่อนข้างจำกัดในเรื่องของเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างให้ได้ช่วงที่มีการแบ่งเซลล์บ่อยในระยะเมทาเฟสซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมในการตรวจนับจำนวนโครโมโซม

2) วิธีวัดขนาดและความหนาแน่นของเซลล์ คุมขนาดเซลล์ในพืชที่มีระดับโครโมโซมเพิ่มขึ้นจะมีขนาดความกว้าง ความยาวที่มากกว่าต้นดิพลอยด์ปกติ แต่มีความหนาแน่นต่อหน่วยพื้นที่น้อยกว่า (Tsao *et al*., 2003; Gu *et al*., 2005) การวัดขนาดเซลล์คุมเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ใช้เครื่องมือเยอะค่าใช้จ่ายต่ำ และไม่ทำลายต้นพืช (Yu *et al*., 2006)

3) วิธีโฟลไซโตเมทรีเป็นวิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอในชิ้นส่วนพืช ให้ผลค่อนข้างแม่นยำรวดเร็วนิยมใช้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซมมากกว่าวิธีการนับจำนวนโครโมโซม และการวัดขนาดเซลล์คุม (Pinheiro *et al*., 2000) แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงในการตรวจสอบ ในปาล์มน้ำมันได้มีการใช้วิธีนี้สอบปริมาณ DNA มาแล้วโดย Rival และคณะ (1997) ทำการประเมินปริมาณดีเอ็นเอจากปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราโดยวิธีโฟลไซโตเมทรี พบว่าขนาดของจีโนม 2C=3.76 พิโคแกรม ธีระและคณะ (2548) วิเคราะห์ปริมาณ

ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรีเทียบกับพืชอ้างอิงที่ต่างกัน พบว่าการใช้ข้าวโพดเป็นพืชอ้างอิงให้ปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 4.72 พิโคแกรมตามลำดับ เมื่อใช้ถั่วเหลืองและมะเขือเทศเป็นพืชอ้างอิงให้ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 4.17 และ 4.25 พิโคแกรมตามลำดับ ปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ดูราเทเนอราและพิสิเฟอราเท่ากับ 3.46 3.24 และ 3.76 ตามลำดับ (ใช้ถั่วเหลืองเป็นพืชอ้างอิง) Masani et al. (2008) ได้ทำการประเมินปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมทรีพบว่าปาล์มน้ำมันชนิดดูราพิสิเฟอราและเทเนอราเท่ากับ 4.10 3.64 และ 3.83 พิโคแกรมตามลำดับ

4) วิธีนับเม็ดคลอโรพลาสต์ จากเซลล์คุมเป็นวิธีการที่ง่ายสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดระดับโครโมโซมในพืชได้ทำได้ง่ายมีความรวดเร็วและแม่นยำซึ่งมีวิธีที่คล้ายกับการวัดขนาดเซลล์คุมจึงสามารถทำควบคู่กันไปได้ โดยในพืช เช่น poplar black locust ใช้วิธีการนับเม็ดคลอโรพลาสต์เป็นตัวคัดเลือกเบื้องต้นเพื่อหาต้นเททระพลอยด์ที่ชื่อเรดที่ได้มีปริมาณเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อเทียบกับต้นดิพลอยด์ (Li et al., 2009; Arnold et al., 2009)

5) วิธีวัดขนาดละอองเกสรมีรายงานกล่าวไว้ว่าในมะม่วงที่เป็นต้นพอลีพลอยด์นั้นมีขนาดของละอองเกสรที่ใหญ่กว่าดิพลอยด์ (นคร, 2550; Sahl, 1983 อ้างโดย จรัสศรี, 2548) แต่การเลือกใช้วิธีการนี้จำเป็นต้องคำนึงถึงอายุของต้นพืชที่ศึกษาด้วย

6) วิธีการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานพืชเททระพลอยด์มักมีขนาดของต้น ดอก ใบ และการสร้างผลผลิตที่ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ แต่ก็ไม่เสมอไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ ประการ เช่น ชนิดการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซมจึงมีผลต่อการเจริญเติบโตที่เปลี่ยนแปลงไปจากการวัดลักษณะทางสัณฐานเป็นวิธีการที่มีความรวดเร็วที่สุดเพราะสามารถประเมินผลได้ด้วยสายตาแต่ผลที่ได้จำเป็นต้องอาศัยวิธีการตรวจสอบแบบอื่นๆ ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นช่วยตรวจสอบเพื่อเพิ่มความแม่นยำให้มากขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบหาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำโครโมโซมดงอกด้วยสารโคลชิซินเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในปาล์มน้ำมัน
2. เพื่อศึกษาผลของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานของต้นกล้าและจำนวนโครโมโซมของปาล์มน้ำมัน

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ใช้เมล็ดงอกพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา (DxP) ที่มาจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผ่านกระบวนการทำลายการพักตัวด้วยวิธีการอบความร้อนแห้ง เพื่อทำเมล็ดงอก คัดเลือกเมล็ดงอกที่สมบูรณ์แข็งแรงอายุ 30 วัน (รูปที่ 1) จำนวน 1,000 เมล็ด ซึ่งผ่านการตรวจสอบว่ามี 1 ต้นต่อเมล็ด

1.2 สารเคมี

- โคลชิซิน
- ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15
- สารเคมี คาร์โบฟูราน
- แอลกอฮอล์
- กรดไฮโดรคลอริค
- อะซีโตน
- คาร์มีน
- กรดอะซีติก
- 8-ไฮดรอกซิลคิวโนลีน
- กรดอะซีติก
- น้ำยาทาเล็บ

2. อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ และ ชุดบันทึกภาพ
- สไลด์
- แผ่นปิดสไลด์

- ถุงพลาสติกสีดำขนาด 15 x 23 ซม. หนา 250 เกจ
- ถุงพลาสติกสีดำขนาด 40 x 45 ซม. หนา 500 เกจ
- ดินผสม
- ปากกาเขียนเปอร์มาเน็นท์
- ช้อนพรวน
- จอบ
- เวอร์เนีย
- ไม้บรรทัด
- จานเพาะเลี้ยง
- ปากคีบ และ ใบมีด
- กระดาษซับและกระดาษทิชชู่

รูปที่ 1 เมล็ดงอกปาล์มน้ำมันที่ผ่านการทำลายการพักตัวอายุ 30 วัน

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การประเมินผลของโคลชิซินต่อการมีชีวิตรอด และการเจริญเติบโตของกล้าปาล์มน้ำมัน

คัดเลือกเมล็ดงอกที่สมบูรณ์ และมีจำนวนยอดเพียง 1 ต้นต่อเมล็ดมาทดลองทรีตสารโคลชิซินที่ละลายในน้ำกลั่นในระดับความเข้มข้น จำนวน 3 ระดับ คือ 2.5 5.0 และ 7.5 mM และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารจำนวน 5 ระยะเวลา คือ 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง แต่ละระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่สารใช้เมล็ดงอกจำนวน 45 เมล็ด นำเมล็ดงอกมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นภายหลังการจุ่มแช่สารทุกครั้ง แล้วจึงนำไปปลูกภายใต้สภาพการให้แสง 50% ในถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 15x23 ซม. หนา 250 เกจ ที่บรรจุวัสดุปลูกซึ่งประกอบด้วยดิน 3 ส่วน แกลบ 1 ส่วน และปุ๋ยคอก 1 ส่วน ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน เมื่อกล้าปาล์มมีอายุครบ 3 เดือน ทำการย้ายต้นกล้าลงในถุงพลาสติกขนาด 45 x 45 ซม. หนา 500 เกจ ที่บรรจุวัสดุปลูกเช่นเดียวกันภายใต้สภาพการให้แสง หลังจากทรีตสารโคลชิซินผ่านส่วนเมล็ดงอกที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว จึงทำการตรวจสอบผลของโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยการบันทึกลักษณะทางสันฐาน ได้แก่ ความสูง ความกว้างโคนต้น จำนวนใบหอก จำนวนใบหางปลา จำนวนใบขนนก และบันทึกจำนวนต้นที่รอดชีวิตทุกทรีทเมนต์ในเดือนที่ 3 6 และ 12 สำหรับในเดือนที่ 1 บันทึกจำนวนต้นที่ปรากฏใบแรกของแต่ละทรีทเมนต์ และทำการหาค่า LD_{50} ของสารโคลชิซิน โดยวิธีการสมการถดถอย (Simple regression) โดยมีวิธีการ คือ นำข้อมูลจำนวนต้นปาล์มน้ำมันที่รอดชีวิตในแต่ละทรีทเมนต์ที่อายุ 12 เดือนหลังเพาะเมล็ด มาคำนวณเป็น % corrected mortality (Y) โดยเทียบกับชุดควบคุม จากนั้นจึงนำค่าที่ได้มาหาค่า LD_{50} (Y_{50}) จากสูตรดังนี้

Y_{50} = $\bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$

Y_{50} = เปอร์เซ็นต์การตาย 50%

X_{50} = อัตราความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ LD_{50}

$$b = \frac{\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

n = จำนวนทรีทเมนต์

3.2 การประเมินผลของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะเซลล์คุม และ จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ ของกล้าปาล์มน้ำมัน

เมื่อกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือน ทำการวัดความกว้าง ยาว และความหนาแน่นของเซลล์คุม และนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในต้นกล้าที่รอดชีวิตทุกต้นในทุกทรีทเมนต์ โดยมีวิธีการคือ ทำการสุ่มตัดใบปาล์มน้ำมันขนาดประมาณ 3x3 ซม. นำตัวอย่างใบที่ได้มาลอกเนื้อเยื่อใต้ท้องใบด้วยใบมีดโกน และดึงออกด้วยปากคีบแล้วนำมาวางบนแผ่นสไลด์ที่หยดน้ำไว้ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ที่กำลังขยาย 400 เท่า หลังจากนั้นจึงทำการสุ่มวัดขนาดความกว้าง ความยาว ของเซลล์คุม และสุ่มนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม จำนวน 10 เซลล์ต่อใบ ทำต้นละ 3 ใบ สำหรับการวัดความหนาแน่นของเซลล์คุม จะนับจำนวนเซลล์คุมจากพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร จำนวน 5 พื้นที่ต่อ 1 ต้น

3.3 การประเมินผลของสารโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม

1) การตรวจสอบการเพิ่มชุดโครโมโซมเบื้องต้น

นำข้อมูลขนาดกว้าง ยาว และความหนาแน่นเซลล์คุมรายต้นที่บันทึกได้จากข้อที่ 3.2 มาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ (t-test, $p<0.05$) ของแต่ละต้นกับตัวอย่างของชุดควบคุม บันทึกและคัดเลือกต้นที่มีความแตกต่างทางสถิติไปตรวจสอบและยืนยันผลการเพิ่มชุดโครโมโซมด้วยวิธีการนับจำนวนโครโมโซมต่อไป

2) การนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก

นำต้นปาล์มน้ำมันที่ผ่านการคัดเลือกด้วยวิธีการวัดขนาด และความหนาแน่นของเซลล์คุมทั้งหมดมายืนยันผลการเพิ่มชุดโครโมโซมด้วยวิธีการนับจำนวนโครโมโซม ทำการเก็บปลายรากของกล้าปาล์มน้ำมันเพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซม โดยเริ่มตัดส่วนปลายรากขนาดเล็ก ยาว 1-2 เซนติเมตรในช่วงเวลา 10-11 นาฬิกา มาใส่ในหลอดแก้วที่บรรจุสารพรีทรีทเมนต์ (8-hydroxyquinoline) นาน 5-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำปลายรากใส่ในหลอดที่บรรจุ Canoy's fluid (absolute ethanol : glacial acetic acid อัตราส่วน 3:1) นาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เก็บในที่มืด และนำปลายรากล้างด้วยน้ำกลั่น และแช่ในกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 1 N ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที นำปลายรากที่ได้ไปล้างในน้ำกลั่นแล้วนำมาตัดส่วนปลายรากประมาณ 1-2 มิลลิเมตร นำมาวางบนสไลด์ และหยดอะซีโตคาร์มีนเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 1-2 หยด นาน 15 นาที ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วใช้ปลายดินสอที่มีด้านเป็นยางลบเคาะเบาๆ ให้เซลล์แตก แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า นับเซลล์ในระยะเมทาเฟส จำนวน 5 เซลล์ต่อราก ทำ 3 รากต่อต้น บันทึกจำนวนต้นที่ได้รับการยืนยันว่ามีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น ในแต่ละทรีทเมนต์แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเพิ่มชุดโครโมโซมต่อต้นที่รอดชีวิตต่อทรีทเมนต์

3) การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐาน

แบ่งกลุ่มของกล้าปาล์มน้ำมันโดยใช้ระดับความแตกต่างของโครโมโซม เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม ดิพลอยด์ ที่มาจากชุดควบคุมที่ไม่ได้ทรีตสารโคลชิซิน ดิพลอยด์ที่ทรีตสารโคลชิซิน กลุ่มเททระพลอยด์ และกลุ่มมิกโซพลอยด์ หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานของกล้าปาล์มน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ลักษณะ ความสูง ความกว้างโคนต้น จำนวนใบหอก จำนวนใบหางปลา จำนวนใบขนนก จำนวนใบรวม พื้นที่ใบของใบที่ 1 ขนาดความกว้าง ความยาว ความหนาแน่นของเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ (F-test, $p<0.05$) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มโดยวิธี LSD (Least Significant Difference, $p<0.05$)

3.4 การประเมินค่าสหสัมพันธ์ของลักษณะเซลล์คุม จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ และ จำนวนโครโมโซม

ทำการสุ่มคัดเลือกต้นที่มีระดับโครโมโซมแบบดิพลอยด์จากชุดควบคุม และแบบเททระพลอยด์ ที่ผ่านการยืนยันผลด้วยวิธีการนับโครโมโซมมาอย่างละ 3 ต้น นำข้อมูลที่บันทึกไว้รายต้น

จากข้อที่ 3.2 มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Steel and Torrie, 1980) ระหว่างลักษณะความกว้างเซลล์คุม ความยาวเซลล์คุม ความหนาแน่นเซลล์คุม จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม และ จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ ดังสูตรต่อไปนี้

$$r = \frac{\sum (X_i - \overline{X})(Y_i - \overline{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \overline{X})^2 . \sum (Y_i - \overline{Y})^2}}$$

r = ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะ X และ Y

X_i = ค่าสังเกตที่ i ของตัวแปรลักษณะ X (เมื่อ i คือค่าสังเกตที่ 1 ถึง n)

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยของลักษณะ X

Y_i = ค่าสังเกตที่ i ของตัวแปรลักษณะ Y (เมื่อ i คือค่าสังเกตที่ 1 ถึง n)

$\overline{Y}$ = ค่าเฉลี่ยของลักษณะ Y

3.5 การวางแผนการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้แผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลรวมกับทรีทเมนต์อื่น โดยมีการทดลอง 3 x 5 แฟกทอเรียล (factorial set) ประกอบด้วยปัจจัย A คือ ระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซิน 3 ระดับ และมีปัจจัย B คือ ระยะเวลาในการทรีตสารโคลชิซิน 5 ระดับ ทดลองร่วมกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ทรีตโคลชิซิน ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 15 เมล็ด วิเคราะห์ความแปรปรวนทั้ง 16 ทรีทเมนต์ตามแผนการทดลองการสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomize design, CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเทียบกับชุดควบคุมโดยวิธี LSD

ตัวแบบเชิงคณิตศาสตร์ของ CRD มีดังนี้

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

เมื่อ Y_{ij} = ค่าสังเกตแต่ละค่าที่ได้จากทรีทเมนต์ i ซ้ำ j

i = 1,…,t (t = จำนวนทรีทเมนต์)

j = 1,…,r (r = จำนวนซ้ำ)

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดในการทดลอง

T_i = อิทธิพลของทรีทเมนต์ i

ε_{ij} = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

บทที่ 3

ผล และ วิจารณ์

1. การประเมินผลของโคลชิซินต่อการรอดชีวิต และการเจริญเติบโตของกล้าปาล์มน้ำมัน

1.1) การรอดชีวิตของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน และค่า LD_{50}

ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านการจุ่มแช่ด้วยสารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่าง ๆ มีแนวโน้มให้การรอดชีวิตต่ำลงเมื่อความเข้มข้นของสารโคลชิซิน และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารนั้นสูงขึ้น โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 7.5 mM ระยะเวลาจุ่มแช่สาร 48 ชั่วโมง พบว่า ต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้ง 3 อายุ (3 6 และ 12 เดือน) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุด (46.67% 20.00% และ 15.56% ตามลำดับ) และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านการจุ่มแช่โคลชิซินความเข้มข้น 7.5 mM ระยะเวลาจุ่มแช่สารนาน 24 ชั่วโมง ให้ผลการรอดชีวิตของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่อายุ 6 และ 12 เดือนน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุมเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับรายงานของ Madon และคณะ (2005); Viehmannova และคณะ (2009); และ สมพร และวิทูล (2547) ที่พบว่าการรอดชีวิตในพืชทดลองจะต่ำลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นในการจุ่มแช่สารสูงขึ้น ความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่สารที่มาก มีผลโดยตรงทำให้ต้นกล้ามีอัตราการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติเพิ่มขึ้น และไม่สามารถมีชีวิตรอดได้เนื่องจากการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ (Swanson, 1957) และไม่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ซึ่งสามารถสังเกตได้จากการที่ต้นกล้าตายเพิ่มขึ้นในทุกเดือน (ตารางที่ 3)

เมื่อนำค่าจำนวนต้นที่รอดชีวิตของกล้าปาล์มน้ำมันเมื่ออายุ 12 เดือน มาคำนวณค่า % corrected mortality พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 7.5 mM ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ต้นกล้าปาล์มน้ำมันตายมากที่สุด 78.94% และ ตายน้อยลงเมื่อลดระดับความเข้มข้นของโคลชิซินที่เวลาจุ่มแช่สารเดียวกันลง (5.0 mM และ 2.5 mM) โดยมีค่าเท่ากับ 31.57 และ 15.79 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4) นำข้อมูลการตายของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้มาคำนวณหาค่าระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่จุ่มแช่เมล็ดงอกระยะเวลา 48 ชั่วโมง และทำให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือนตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีการสมการถดถอยค่าที่ได้เท่ากับ 5.57 mM (รูปที่ 2) ในการทดลองนี้เมื่อนำค่า LD_{50} ที่ได้มาคำนวณเป็นความเข้มข้นโดยเปอร์เซ็นต์น้ำหนัก มีค่าเท่ากับ 0.227% (w/v) ในขณะที่ นคร (2550)

พบว่าค่า LD_{50} ของสารโคลชิซินที่จุ่มแช่กับเมล็ดมะนาวฝรั่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.50 – 1.88 % ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าในการทดลองจุ่มแช่กับเมล็ดปาล์มน้ำมัน ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากเมล็ดของมะนาวฝรั่งที่นำมาทดลองจุ่มแช่โคลชิซินนั้นยังไม่มีส่วนของต้นอ่อนที่โผล่ออกมาสัมผัสกับสารโคลชิซิน เหมือนกับเมล็ดของปาล์มน้ำมันที่ปรากฏส่วนต้นอ่อนโผล่ออกมาจากเมล็ดชัดเจน แสดงให้เห็นว่าชนิดของชิ้นส่วนที่นำมาทดลองจุ่มแช่โคลชิซิน และพันธุ์พืชที่ใช้ทดลองนั้นตอบสนองต่อความเข้มข้นของสารโคลชิซินแตกต่างกัน

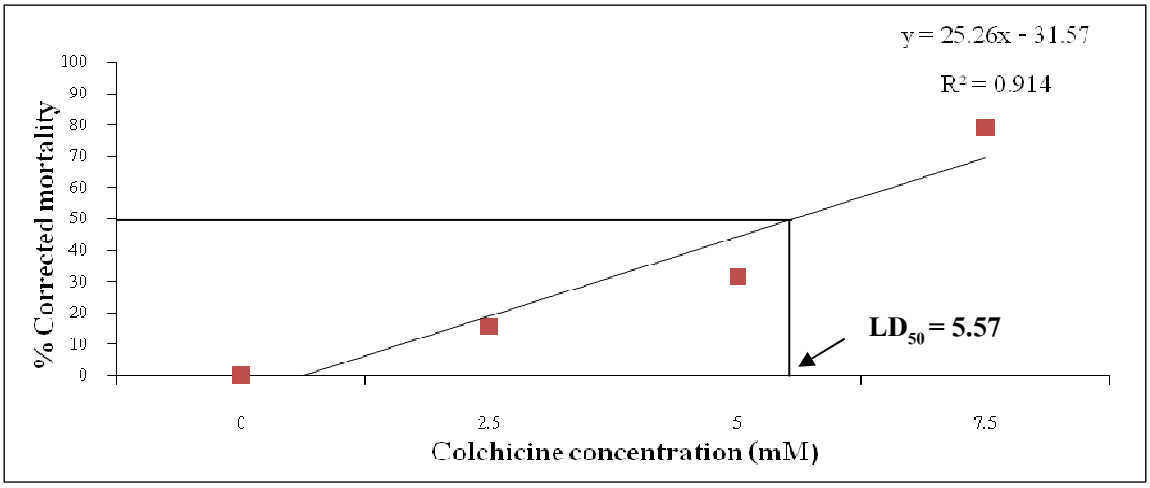
ตารางที่ 3 ผลของสารโคลชิซินต่อการรอดชีวิตในกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 6 และ 12 เดือน

Colchicine concentration (mM)	Duration of immersion (hr)	Survivals (%)		
		3 mo.	6 mo.	12 mo.
0 (control)		86.67	84.44	80.00
2.5	3	93.33	84.44	82.22
	6	91.11	88.89	82.22
	12	91.11	88.89	86.67
	24	86.67	80.00	77.78
	48	80.00	73.33	64.44
5	3	86.67	77.78	71.11
	6	93.33	88.89	80.00
	12	86.67	75.56	71.11
	24	80.00	66.67	66.67
	48	77.78	60.00	51.11
7.5	3	84.44	77.78	75.56
	6	88.89	82.22	80.00
	12	93.33	84.44	75.56
	24	68.89	53.33	53.33
	48	46.67	20.00	15.56
F-test		**	**	**
C.V. (%)		51.74	43.76	34.78
$LSD_{0.01}$		19.13	25.29	23.78

ตารางที่ 4 ค่า % corrected mortality ของกล้าปาล์มน้ำมันที่จุ่มแช่โคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

Colchicine concentration (mM)	Survivals* (%)	% corrected mortality
0	84.44	0.00
2.5	71.11	15.79
5	57.78	31.57
7.5	17.78	78.94

* เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดจากจำนวนต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือน



รูปที่ 2 ค่า LD_{50} ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันเมื่ออายุ 12 เดือน

1.2) การเจริญเติบโตของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

1.2.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของสารโคลชิซินต่อลักษณะการเจริญเติบโตของปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าในบางลักษณะ คือ การปรากฏใบแรก การสร้างใบหอก ใบหางปลา ใบขนนก ความสูง และความกว้างลำต้น แสดงในตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญเติบโตดังกล่าวของต้นกล้าปาล์มน้ำมันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่จุ่มแช่โคลชิซิน กับกลุ่มที่ไม่ได้จุ่มแช่โคลชิซิน

พบว่า ทั้งสองกลุ่มมี 2 ลักษณะที่มีความแตกต่างทางสถิติกัน คือ การสร้างจำนวนใบหางปลา และความกว้างลำต้น ซึ่งแสดงว่าการทดลองนี้เมื่อจุ่มแช่โคลชิซินผ่านเมล็ดงอกแล้วนำไปปลูก โคลชิซินนั้นส่งผลต่อการสร้างจำนวนใบหางปลา และขนาดลำต้นของต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยตรง ส่วนการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้าปาล์มน้ำมันภายในกลุ่มที่มีการจุ่มแช่สารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น (A) และระยะเวลา (B) ต่าง ๆ กันนั้น พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทุกลักษณะ ซึ่งก็แสดงว่าการจุ่มแช่โคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น หรือระยะเวลาที่แตกต่างกันส่งผลให้การเจริญเติบโตของต้นกล้าปาล์มเปลี่ยนแปลงไปแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างสองปัจจัยดังกล่าว ทุกลักษณะไม่มีปฏิสัมพันธ์กันทางสถิติ (ตารางที่ 5) ซึ่งก็แสดงถึงการเพิ่มระดับความเข้มข้นของโคลชิซินทำให้การเจริญเติบโตลดลงไม่เท่ากันในทุกระยะเวลาการจุ่มแช่สาร

ตารางที่ 5 ค่า Mean squares ของลักษณะการเจริญเติบโตของกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือน

Source of variation	df	Mean squares					
		No. of plant appeared 1st leaves [a]	No. of lanceolate leaves [b]	No. of bifurcate leaves [c]	No. of pinnate leaves	Plant height	Width of bulb
treatment	15	43.309**	0.448**	5.159**	12.858**	38.592**	1.768**
factorial set vs control	1	0.001ns	0.068ns	1.987**	1.621ns	1.550ns	0.632*
among factorial set	14	46.403**	0.475**	5.386**	13.660**	41.238**	1.850**
concentration (A)	2	95.155**	2.386**	26.671**	51.709**	176.471**	4.297**
time (B)	4	47.144**	0.198**	0.689*	7.728**	8.279**	1.787**
AxB	8	33.844**	0.136**	2.414**	7.115**	23.924**	1.269**
error	32	2.91	0.040	0.225	0.968	1.728	0.131

*, ** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับ 5 และ 1% ตามลำดับ

ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

[a]= บันทึกข้อมูลเมื่อกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือน

[b]= บันทึกข้อมูลเมื่อกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 เดือน

[c]= บันทึกข้อมูลเมื่อกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 6 เดือน

1.2.2 การปรากฏใบแรก และการสร้างจำนวนใบแต่ละชนิดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

ภายหลังการจุ่มแช่เมล็ดงอกด้วยโคลชิซิน ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาระดับต่าง ๆ ส่งผลอย่างมากต่อการปรากฏใบแรกของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในช่วงอายุ 1 เดือน (รูปที่ 3) ซึ่งพบว่าจำนวนต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปรากฏใบแรกลดน้อยลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารมากขึ้น ทรีทเมนต์ส่วนใหญ่แสดงการปรากฏใบแรกแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม (ตารางที่ 6) โดยเฉพาะที่โคลชิซินระดับความเข้มข้น 7.5 mM ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ส่งผลให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่อายุ 1 เดือนไม่พบการปรากฏใบแรกเกิดขึ้นเลย สอดคล้องกับรายงานของ Guofeng และคณะ (2007) ที่ได้ศึกษาถึงผลของโคลชิซินต่อเวลาที่ใช้ในการงอกของเมล็ดพืช London plane ซึ่งเมล็ดจะใช้เวลาในการงอกที่นานขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารโคลชิซินเข้าไป ถึงแม้ว่ากล้าปาล์มน้ำมันมีการสร้างใบแรกเกิดขึ้นตามมาเหมือนกันเมื่ออายุมากขึ้น แต่สังเกตได้ว่าในทรีทเมนต์ที่มีการจุ่มแช่โคลชิซินความเข้มข้น และระยะเวลาสูง ลักษณะใบแรกที่พบนั้นมีลักษณะรูปร่างของใบที่ผิดปกติเกิดขึ้น (รูปที่ 4) แต่ลักษณะความผิดปกติดังกล่าวจะค่อย ๆ หายไปเมื่อต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุมากขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการซ่อมแซมเซลล์ส่วนที่เสียหายภายในของต้นกล้าปาล์มน้ำมันเองจึงทำให้ใบที่สร้างขึ้นมาใหม่มีลักษณะเป็นปกติ นอกจากนี้สารโคลชิซินยังส่งผลต่อการสร้างจำนวนใบแต่ละชนิดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอีกด้วย เมื่อพบว่า ต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 เดือนมีการสร้างจำนวนใบหอกเฉลี่ยลดน้อยลงเมื่อผ่านการจุ่มแช่ด้วยสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น และระยะเวลาสูง ๆ โดยที่โคลชิซินความเข้มข้น 5.0 และ 7.5 mM ระยะเวลาจุ่มแช่สาร 48 ชั่วโมง ต้นกล้าปาล์มน้ำมันมีจำนวนใบหอกเท่ากับ 2.58 และ 2.48 ใบ ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ซึ่งชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 3.52 ใบ เมื่อกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 6 เดือนจะเริ่มสร้างใบหางปลาเกิดขึ้น ซึ่งต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านการจุ่มแช่โคลชิซินที่ความเข้มข้น และ ระยะเวลาสูง ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยการสร้างใบหางปลานั้นน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้าปาล์มน้ำมันในชุดควบคุมเช่นเดียวกัน (2.5 5.0 และ 7.5 mM ระยะเวลา 48 ชั่วโมง) โดยเฉพาะที่โคลชิซินความเข้มข้น 7.5 mM ระยะเวลา 48 ชั่วโมงพบค่าเฉลี่ยการสร้างใบหางปลาเกิดขึ้นเพียง 0.33 ใบ (ตารางที่ 6) สำหรับการสร้างใบขนนกของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่อายุ 12 เดือน ทรีทเมนต์ส่วนใหญ่ให้ผลการสร้างใบขนนกไม่แตกต่างทางสถิติ และพบว่ามีเพียงที่โคลชิซินระดับความเข้มข้น 7.5 mM ระยะเวลา 48 ชั่วโมงเท่านั้น ที่ส่งผลให้การสร้างใบขนนกต่ำที่สุดเท่ากับ 0.50 ใบ และแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้าปาล์มน้ำมันในชุดควบคุม ที่มีค่าเท่ากับ 6.44 ใบ (ตารางที่ 6)

รูปที่ 3 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปรากฏใบแรก ในช่วงอายุ 1 เดือน

รูปที่ 4 ลักษณะผิดปกติของใบกล้าปาล์มน้ำมันที่ อายุ 2 เดือน เมื่อผ่านการจุ่มแช่โคลชิซินที่ความเข้มข้น 7.5 mM ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 ผลของสารโคลชิซินต่อการปรากฏใบแรก และการสร้างใบชนิดต่างๆของกล้าปาล์มน้ำมัน

Colchicine concentration (mM)	Duration of immersion (hr)	No.of plants appeared 1^{st} leaves	No. of lanceolate leaves 3 mo.	No. of bifurcate leaves 6 mo.	No. of pinnate leaves 12 mo.
0 (control)		13.33	3.52	5.02	6.44
2.5	3	13.00	3.57	5.10	7.89
	6	10.33	3.73	4.23	8.78
	12	11.67	3.59	4.73	8.22
	24	8.67	3.54	4.29	6.89
	48	6.33	3.35	3.66	7.44
5	3	8.00	3.51	4.75	8.22
	6	6.67	3.69	5.37	9.33
	12	7.67	3.36	4.89	8.33
	24	4.33	3.18	4.24	6.89
	48	0.33	2.58	2.20	5.89
7.5	3	6.00	3.47	3.93	6.22
	6	3.67	3.89	5.05	9.11
	12	9.00	3.51	5.56	8.00
	24	3.67	3.07	4.29	6.33
	48	0.00	2.48	0.33	0.50
F-test		**	**	**	**
C.V. (%)		26.87	5.95	11.22	13.75
$LSD_{0.01}$		3.82	0.45	1.06	2.20

1.2.3 ความสูง และความกว้างโคนต้น

เมื่อจุ่มแช่เมล็ดงอกปาล์มน้ำมันด้วยสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่าง ๆ ปลูกเลี้ยงดู และทำการบันทึกลักษณะความสูง และความกว้างโคนต้นในกล้าปาล์มน้ำมัน 3 อายุ คือ 3 6 และ 12 เดือน พบว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้ง 3 อายุ มีแนวโน้มลดการเจริญเติบโตทางด้านความสูง

และความกว้างโคนต้นลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารโคลชิซินขึ้น (ตารางที่ 7 และ 8) โดยที่ต้นกล้าปาล์มน้ำมันมีความสูงลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้าปาล์มน้ำมันในชุดควบคุมเมื่อจุ่มแช่เมล็ดงอกด้วยสารโคลชิซินเข้มข้น 5.0 mM ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 7.5 mM ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แต่เฉพาะที่ความเข้มข้น 7.5 mM ระยะเวลาจุ่มแช่สาร 48 ชั่วโมงเท่านั้นที่ส่งผลให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้ง 3 อายุมีความสูงน้อยลงอย่างชัดเจนโดยมีค่าเพียง 1.95 3.64 และ 6.75 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ส่วนการเจริญเติบโตทางด้านความกว้างโคนต้นก็ให้ผลในลักษณะเดียวกัน คือ ที่ระดับความเข้มข้น 7.5 mM ระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีผลทำให้ความกว้างโคนต้นมีขนาดเล็กกว่าในทรีทเมนต์อื่นๆ อย่างชัดเจน โดยมีค่าความกว้างโคนต้นทั้ง 3 อายุ (3 6 และ 12 เดือน) เท่ากับ 0.63 1.16 และ 1.94 เซนติเมตร ตามลำดับ แม้ว่าค่าเฉลี่ยของลักษณะความกว้างโคนต้นของต้นกล้าปาล์มเมื่ออายุ 3 เดือนไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมแล้ว แต่ก็สังเกตได้ว่าค่านี้มีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้นของโคลชิซินที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 8) สอดคล้องกับ Chen และ Gao (2007) ที่รายงานว่าเมื่อพืชผ่านการจุ่มแช่โคลชิซินแล้ว ผลกระทบที่ปรากฏให้เห็นชัดเจนอย่างแรก คือ การลดลักษณะการเจริญเติบโตลง เช่นเดียวกันกับในไม้ยืนต้นจำพวก London plane ในระยะต้นกล้า ที่จุ่มแช่โคลชิซินระดับความเข้มข้นสูงขึ้น ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของต้นกล้าจะลดลง (Guofeng *et al*., 2007) โคลชิซินเป็นสารที่ค่อนข้างเป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและมีผลโดยตรงต่อการกระบวนการแบ่งเซลล์ เมื่อจุ่มแช่ชิ้นส่วนพืชด้วยโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูง หรือจุ่มแช่ในระยะเวลาที่นานเกินไป ชิ้นส่วนพืชที่สัมผัสกับโคลชิซินโดยตรงมักเกิดความเป็นพิษมากขึ้น ส่งผลให้เมื่อมีการนำไปปลูกหรือเลี้ยงดูต่อไปเซลล์เหล่านั้นจึงเกิดการลดการเจริญเติบโตลง

ตารางที่ 7 ผลของสารโคลชิซินต่อความสูงของกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 6 และ 12 เดือน

Colchicine concentration (mM)	Duration of immersion (hr)	Plant height (cm)		
		3 mo.	6 mo.	12 mo.
0 (control)		4.79	9.20	18.78
2.5	3	5.11	11.12	20.61
	6	4.98	9.56	22.04
	12	5.28	8.77	18.28
	24	4.11	9.08	17.18
	48	3.45	7.21	17.06
5	3	4.94	9.89	18.72
	6	5.03	10.62	21.17
	12	4.20	8.88	17.39
	24	3.43	7.46	18.28
	48	2.30	5.07	15.11
7.5	3	4.25	8.82	17.50
	6	4.92	10.31	21.17
	12	4.56	9.46	21.39
	24	3.35	7.07	17.89
	48	1.95	3.64	6.75
F-test		**	**	**
C.V. (%)		8.26	6.39	7.27
$LSD_{0.01}$		0.77	1.22	2.94

ตารางที่ 8 ผลของสารโคลชิซินต่อความกว้างโคนต้นของกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 6 และ 12 เดือน

Colchicine concentration (mM)	Duration of immersion (hr)	Width of bulb (cm)		
		3 mo.	6 mo.	12 mo.
0 (control)		0.72	2.22	4.94
2.5	3	0.82	2.37	4.90
	6	0.85	2.43	4.88
	12	0.94	2.21	4.80
	24	0.74	2.14	4.84
	48	0.66	1.66	4.93
5	3	0.82	2.36	4.78
	6	0.84	2.57	4.73
	12	0.72	2.14	4.90
	24	0.73	1.81	4.54
	48	0.65	1.67	4.11
7.5	3	0.71	2.06	4.21
	6	0.85	2.45	5.16
	12	0.79	2.38	4.50
	24	0.96	1.72	3.82
	48	0.63	1.16	1.94
F-test		ns	**	**
C.V.(%)		15.57	11.16	8.07
$LSD_{0.01}$		-	0.52	0.81

2. การประเมินผลของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือน

2.1) การวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะเซลล์คุม ได้แก่ ความกว้าง ความยาว ความหนาแน่น ของเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ของต้น

กล้าปาล์มน้ำมันภายหลังการจุ่มแช่โคลชิซินแสดงในตารางที่ 9 พบว่า ลักษณะเซลล์คุมดังกล่าว ระหว่างกลุ่มของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่จุ่มแช่โคลชิซิน กับกลุ่มที่ไม่ได้จุ่มแช่โคลชิซิน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าสารโคลชิซินไม่มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะเหล่านี้ แต่ทั้ง 4 ลักษณะมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกันภายในกลุ่มของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการจุ่มแช่โคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่าง ๆ ซึ่งแสดงว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น หรือระยะเวลาในการจุ่มแช่โคลชิซินเข้าไปจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะเซลล์คุมขึ้น ซึ่งพบว่า ความยาว และ ความหนาแน่นของเซลล์คุมมีความแตกต่างกันเมื่อระยะเวลาในการจุ่มแช่โคลชิซินต่างกัน และมีเพียงจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เท่านั้นที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้นที่ใช้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างปฏิสัมพันธ์ของความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สาร แสดงว่า การเพิ่มความเข้มข้นเข้าไปส่งผลให้จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้นไม่เท่ากันในแต่ละระยะเวลาในการจุ่มแช่สาร

ตารางที่ 9 ค่า Mean squares ของลักษณะเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในกล้าปาล์มน้ำมัน

Source of variation	df	Mean squares			
		Guard cell width	Guard cell length	Guard cell density	Chloroplast no.
treatment	15	4.309**	2.528**	10.335**	3.597*
factorial set vs control	1	3.787ns	1.662ns	2.353ns	0.112ns
among factorial set	14	4.347**	2.590**	10.905**	3.846*
concentration (A)	2	16.610**	8.212**	34.572**	3.726ns
time (B)	4	0.557ns	2.943**	8.159*	2.573ns
AxB	8	3.176ns	1.008ns	6.362ns	4.512*
error	32	1.431	0.611	3.036	1.597

*, ** แตกต่างทางสถิติที่ระดับ 5 และ 1 % ตามลำดับ

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

2.2) ขนาด และความหนาแน่นของเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์

ภายหลังการจุ่มแช่เมล็ดงอกด้วยโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่าง ๆ ส่งผลทำให้ความกว้าง ยาว ความหนาแน่นเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม ลักษณะเหล่านี้มีความแปรปรวนในแต่ละทรีทเมนต์สูง และไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สาร มีเพียงลักษณะความ

ยาวของเซลล์คุมเท่านั้นที่พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้น และระยะเวลาสูงขึ้น มีแนวโน้มให้ เซลล์คุมมีความยาวมากขึ้นตามไปด้วย โดยเฉพาะที่โคลชิซินความเข้มข้น 7.5 mM ระยะเวลาจุ่มแช่สารนาน 48 ชั่วโมง ต้นกล้าปาล์มน้ำมันมีทุกลักษณะดังกล่าวที่แตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างชัดเจน (ตารางที่ 10) อาจเนื่องจากว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่อยู่ในทรีทเมนต์นี้มีการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซมเกิดขึ้นหลายต้นจึงทำให้ค่าเฉลี่ยของลักษณะต่าง ๆ ที่ได้มีค่าที่สูงขึ้น ซึ่งก็สอดคล้องกับงานทดลองที่กล่าวไว้ว่า ขนาด และความหนาแน่นของเซลล์คุมเป็นตัวบ่งบอกถึงระดับโครโมโซมที่เปลี่ยนแปลงไป โดยในต้นที่มีระดับโครโมโซมเพิ่มขึ้น มักมีขนาดเซลล์คุมใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ปกติ และมีความหนาแน่นต่อหน่วยพื้นที่น้อยกว่า (Thao *et al.,* 2003; Gu *et al.,* 2005; Chen and Gao, 2007) เช่นเดียวกับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของพืช *Colophospermum mopane* ตามรายงานของ Rubuluza และคณะ (2007) และต้นบัวบก (วรวุฒ และวิสา, 2542) ที่พบว่าจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้นเมื่อระดับพลอยด์ดีมากขึ้น จึงทำให้บางการทดลองมักใช้วิธีการวัดขนาดและความหนาแน่นของเซลล์คุมเพื่อคัดเลือกต้นพอลีพลอยด์ในเบื้องต้น จากผลที่ได้อาจเป็นไปได้ว่าที่โคลชิซินความเข้มข้น 7.5mM ระยะเวลา 48 ชั่วโมงเป็นทรีทเมนต์ที่เหมาะสมต่อการชักนำพอลีพลอยด์ในปาล์มน้ำมันผ่านส่วนเมล็ดงอก

ตารางที่ 10 ผลของสารโคลชิซินต่อลักษณะเซลล์คุม และ จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ ของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน

Colchicine concentration (mM)	Duration of immersion (hr)	Guard cell width(μm)	Guard cell length(μm)	Guard cell density (no./mm^2)	No. of chloroplast (no./guard cell)
0 (control)		21.11	30.56	63.12	9.89
2.5	3	19.38	29.96	74.68	10.67
	6	20.49	31.43	70.68	10.11
	12	19.86	30.89	73.32	9.44
	24	19.79	30.30	73.32	10.11
	48	19.56	30.70	61.56	8.83
5	3	20.05	30.59	74.24	8.89
	6	19.43	30.91	65.76	9.67
	12	18.89	31.20	65.32	8.78
	24	18.73	31.47	66.24	9.11
	48	21.77	32.90	64.44	8.78
7.5	3	19.66	30.84	60.88	10.00
	6	20.22	31.63	71.56	8.78
	12	18.86	31.69	70.68	8.78
	24	19.25	31.86	64.00	10.39
	48	23.33	33.47	44.88	13.00
F-test		**	**	**	*
C.V. (%)		5.97	2.50	10.47	13.02
$LSD_{0.05}$		-	-	-	2.10
$LSD_{0.01}$		2.68	1.75	15.6	-

3. ผลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของกล้าปาล์มน้ำมัน

การชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมในต้นกล้าปาล์มน้ำมันนั้น เมื่อตรวจสอบกล้าปาล์มที่รอดชีวิตทั้งหมดในเบื้องต้นด้วยวิธีการวัดความแตกต่างของขนาด และความหนาแน่นของเซลล์คุมเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ได้ต้นที่คาดว่าจะเป็นต้นพอลีพลอยด์ทั้งหมด 30 ต้นซึ่งกระจายกันอยู่ในแต่ละทรีทเมนต์ตั้งแต่ 1 – 8 ต้น (คิดเป็น 2.70-50% จากต้นกล้าที่รอดชีวิต) โดยที่ระดับความเข้มข้น 5 mM ที่ระยะเวลาการจุ่มแช่สารต่าง ๆ มีโอกาสพบต้นที่คาดว่าเป็นพอลีพลอยด์สูงสุด และเมื่อนำต้นดังกล่าวไปตรวจสอบและยืนยันผลด้วยวิธีการนับโครโมโซมจากปลายราก พบว่า การเพิ่มชุดโครโมโซมของกล้าปาล์มน้ำมันเกิดขึ้นได้สองแบบ คือ แบบ มิกโซพลอยด์ (รูปที่ 5) และแบบเททระพลอยด์ (รูปที่ 6) โดยกล้าปาล์มน้ำมันแบบมิกโซพลอยด์มีโอกาสเกิดขึ้นได้สูงกว่าแบบเททระพลอยด์ (ตารางที่ 11) ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่เป็นมิกโซพลอยด์ จำนวน 17 ต้น แต่ละเซลล์ภายในรากเดียวกัน ประกอบไปด้วยโครโมโซมแบบ 2x 3x และ 4x รวมอยู่ด้วยกัน และพบได้ในทุกระดับความเข้มข้นของสาร โดยมีระยะเวลาในการจุ่มแช่สารเป็นปัจจัยสำคัญต่อการชักนำ คือที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (2.5 mM) ต้องใช้ระยะเวลาในการจุ่มแช่สาร (24 และ 48 ชั่วโมง) มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น (5 และ 7.5 mM) ซึ่งใช้ระยะเวลาในการจุ่มแช่สารตั้งแต่ 12 ชั่วโมง เป็นต้นไป สอดคล้องกับ Li และคณะ (2007) ที่รายงานว่าระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซิน และระยะเวลาการจุ่มแช่สารมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกัน สำหรับพอลีพลอยด์แบบเททระพลอยด์ทั้ง 3 ต้น จะพบเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 7.5 mM ที่ระยะเวลาการจุ่มแช่สารนาน 48 ชั่วโมง โดยพบ 2 และ 1 ต้น ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 2.5 mM ไม่พบต้นเททระพลอยด์ ทั้งนี้อาจเพราะความเข้มข้นที่น้อยเกินไป อย่างไรก็ตามหากเพิ่มระยะเวลาในการจุ่มแช่สารให้นานขึ้นก็อาจได้ต้นเททระพลอยด์เพิ่มขึ้นได้ สอดคล้องกับ Madon และคณะ (2005) ที่ทดลองจุ่มแช่เมล็ดงอกปาล์มน้ำมันด้วยโคลชิซินแล้วไม่พบต้นเททระพลอยด์เกิดขึ้นที่ความเข้มข้น 2.5 mM แต่พบที่ความเข้มข้น 5.0 mM ที่จุ่มแช่สารนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างจากการทดลองนี้ที่ต้องใช้ระยะเวลาในการจุ่มแช่สารนาน 48 ชั่วโมง จึงพบต้นเททระพลอยด์ แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของยีโนไทป์ และสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องของปาล์มน้ำมันอาจตอบสนองต่อระยะเวลาที่ใช้ในการจุ่มแช่สารที่แตกต่างกันเพื่อชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์แบบเททระพลอยด์

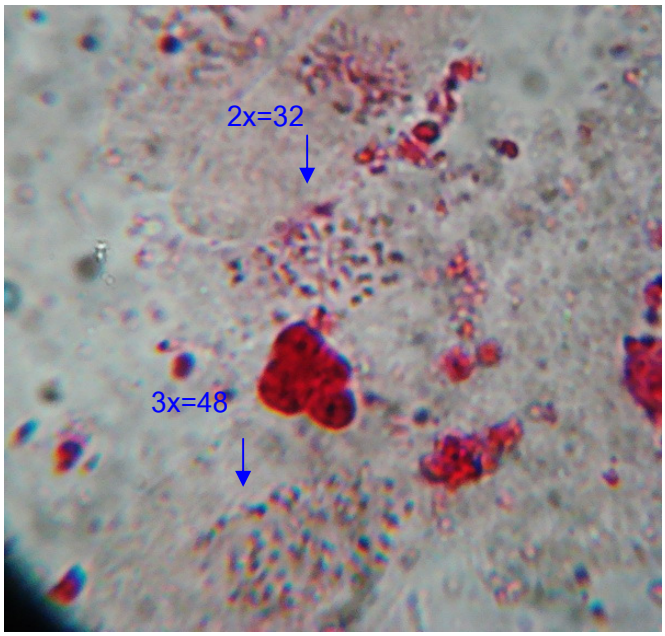
ตารางที่ 11 ผลของสารโคลชิซินต่อการชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ของกล้าปาล์มน้ำมัน

Colchicine concentration (mM)	Duration of immersion (hr)	No. of germinated seeds		No. of putative polyploidy plants[1]	No. of mixoploid plants[2]	No. of tetraploid Plants[2]
		Treated	Survivals			
0 (control)		45	38	0 (0[3])	0 (0)	0 (0)
2.5	3	45	38	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	6	45	41	2 (4.48)	0 (0)	0 (0)
	12	45	40	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	24	45	37	1 (2.70)	1 (2.70)	0 (0)
	48	45	32	4 (12.5)	3 (9.38)	0 (0)
5	3	45	35	2 (5.71)	0 (0)	0 (0)
	6	45	40	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	12	45	34	1 (2.94)	1 (2.94)	0 (0)
	24	45	31	2 (6.45)	2 (6.45)	0 (0)
	48	45	26	8 (30.77)	6 (23.08)	2 (7.69)
7.5	3	45	35	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	6	45	37	2 (5.41)	0 (0)	0 (0)
	12	45	38	1 (2.63)	1 (2.63)	0 (0)
	24	45	24	3 (12.5)	1 (4.16)	0 (0)
	48	45	8	4 (50.00)	2 (25.00)	1 (12.50)

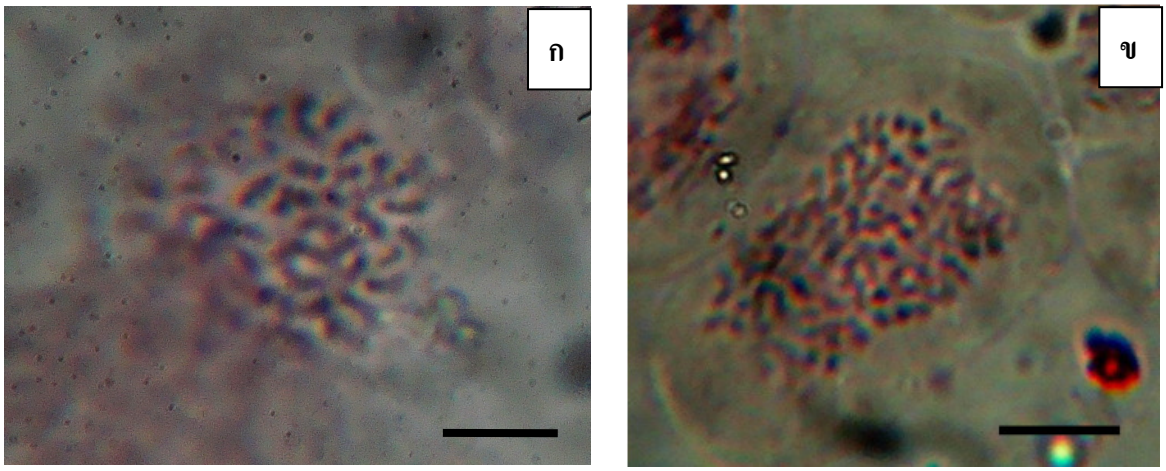
[1] จำนวนต้นที่คาดว่าเป็นพอลีพลอยด์ ที่มีขนาดและความหนาแน่นของเซลล์คุมแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม (t-test, $p<0.01$)

[2] จำนวนต้นพอลีพลอยด์ที่ได้จากการตรวจสอบ และยืนยันการเพิ่มชุดโครโมโซมด้วยวิธีการนับจำนวนโครโมโซม

[3] คิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากต้นที่รอดชีวิต



รูปที่ 5 โครโมโซม จากปลายรากของต้นกล้าปาล์มน้ำมันแบบ มิกโซพลอยด์



รูปที่ 6 ผลของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน; โครโมโซมจากส่วนปลายรากของต้น ดิพลอยด์ 2n=2x=32 (ก) และต้น เททระพลอยด์ 2n=4x=64 (ข) (บาร์= 5 µm)

4. ผลของระดับพลอยด์ดีต่อลักษณะทางสัณฐาน ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน

ผลการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานของกล้าปาล์มพอลีพลอยด์กับดิพลอยด์ ที่อายุ 12 เดือน พบว่า ต้นเททระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์ มีความสูง ขนาดโคนต้น จำนวนใบรูปขนนก และ พื้นที่ใบแรก น้อยกว่าต้นปาล์มดิพลอยด์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12 และรูปที่ 7) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติสำหรับลักษณะจำนวนใบรูปหอกกับใบรูปหางปลา สอดคล้องกับรายงานของ Madon และคณะ (2005) ที่พบว่า ต้นพอลีพลอยด์ของปาล์มน้ำมันมีลักษณะต้นที่เตี้ยกว่าต้นดิพลอยด์ปกติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างต้นเททระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์ พบว่า ต้นเททระพลอยด์ยังไม่มีการสร้างใบรูปขนนก ในขณะที่ต้นมิกโซพลอยด์มีใบขนนกเกิดขึ้นเฉลี่ย 3.26 ใบ ส่วนความสูงและขนาดโคนต้นมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ปกติการสร้างใบใหม่เป็นตัวบอกถึงการเจริญของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน (ชูจิต และคณะ, 2536) การที่ต้นเททระพลอยด์มีการเจริญช้า และยังไม่มีการสร้างใบขนนกเกิดขึ้นอาจเนื่องจากการสะสมน้ำหนักแห้งเพื่อเพิ่มขนาดโคนต้นและความสูงยังไม่เพียงพอต่อการผลิตใบขนนกขึ้นมา ซึ่งตามรายงานของ น้ำอ้อย และ ธีระ (2552) ซึ่งทำการประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะการสร้างใบรูปขนนก กับขนาดโคนต้น และ ความสูง พบว่าสัมพันธ์ในทางบวก นอกจากนี้อาจมี สาเหตุมาจากการทำงานที่ผิดปกติทางสรีรวิทยาที่เกิดจากการลดอัตราการแบ่งเซลล์ลง (Swanson, 1957) สำหรับต้นมิกโซพลอยด์ซึ่งมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นเททระพลอยด์ อาจเนื่องมาจากเซลล์บางส่วนไม่ได้ถูกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมจึงยังคงมีกระบวนการทางสรีรวิทยาที่ปกติ ส่วนต้นดิพลอยด์ที่มาจากการจุ่มแช่สารโคลชิซินแต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซม ก็ไม่พบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้จุ่มแช่สาร แสดงให้เห็นว่าสารโคลชิซินไม่มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของกล้าปาล์มน้ำมัน

เมื่อพิจารณา ความกว้าง ยาว ความหนาแน่น ของเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม พบว่าในกล้าปาล์มพอลีพลอยด์ ทั้งแบบเททระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์ มีขนาดเซลล์คุมใหญ่กว่า จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์มากกว่า แต่มีความหนาแน่นเซลล์คุมต่ำกว่าต้นดิพลอยด์ในชุดควบคุม (ตารางที่ 12 และ รูปที่ 8 ก, ข) สอดคล้องกับรายงานที่ได้กล่าวว่าลักษณะขนาด และความหนาแน่นของเซลล์คุมเป็นตัวบ่งบอกถึงระดับโครโมโซมที่เปลี่ยนแปลงไป โดยในต้นที่มีระดับโครโมโซมเพิ่มขึ้น มีขนาดเซลล์คุมใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ปกติ และมีความหนาแน่นต่อหน่วยพื้นที่น้อยกว่า (Hamill *et al*., 1992; Kadota and Niimi, 2002) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างต้นเททระพลอยด์ และต้นมิกโซพลอยด์ พบว่า ลักษณะจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในต้นเททระพลอยด์มีจำนวนมากกว่า ต้นมิกโซพลอยด์ ซึ่งก็สอดคล้องกับรายงานของ Ewald และคณะ (2009) ที่พบว่า

จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้นเมื่อระดับพลอยด์ดีมากขึ้น ส่วนขนาด และความหนาแน่นเซลล์คุมต้นปาล์มแบบเททระพลอยด์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับต้นปาล์มมิกโซพลอยด์

ดิพลอยด์ เททระพลอยด์

รูปที่ 7 ผลของระดับโครโมโซมต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานต้นกล้าอายุ 12 เดือน (บาร์= 10 ซม.)

ตารางที่ 12 ลักษณะสัณฐานของกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือนที่ระดับพลอยด์ดีต่างกัน

Characters	Control	Diploids[1]	Mixoploids	Tetraploids	F -test	C.V.(%)
Height (cm)	18.78[a]	18.24[a]	11.53[b]	9.50[b]	**	30.29
Width of bulb (cm)	4.94[a]	4.16[ab]	3.32[b]	2.70[b]	**	28.21
Number of lanceolate leaves [2]	3.44	3.12	2.90	3.40	ns	26.64
Number of bifurcate leaves	6.20	5.00	5.80	6.33	ns	28.63
Number of pinnate leaves	6.44[a]	6.60[a]	3.26[b]	0.00[c]	**	52.57
Total leaves production	12.88[a]	12.37[a]	10.26[ab]	8.33[b]	**	20.82
1 st leaves area (cm^2)	944.66[a]	948.66[a]	336.66[b]	227.33[b]	**	37.33
Guard cell width (µm)	20.25[ab]	17.58[b]	22.50[a]	23.40[a]	*	8.27
Guard cell length (µm)	30.75[b]	30.65[b]	36.65[a]	37.08[a]	**	5.61
Guard cell density (no./mm^2)	76.00[a]	68.00[ab]	46.12[b]	46.40[b]	*	21.75
Chloroplast / guard cell	11.46[c]	12.16[bc]	15.06[b]	19.06[a]	**	12.02

[1] = ดิพลอยด์ที่มาจากต้นที่จุ่มแช่สารโคลชิซิน

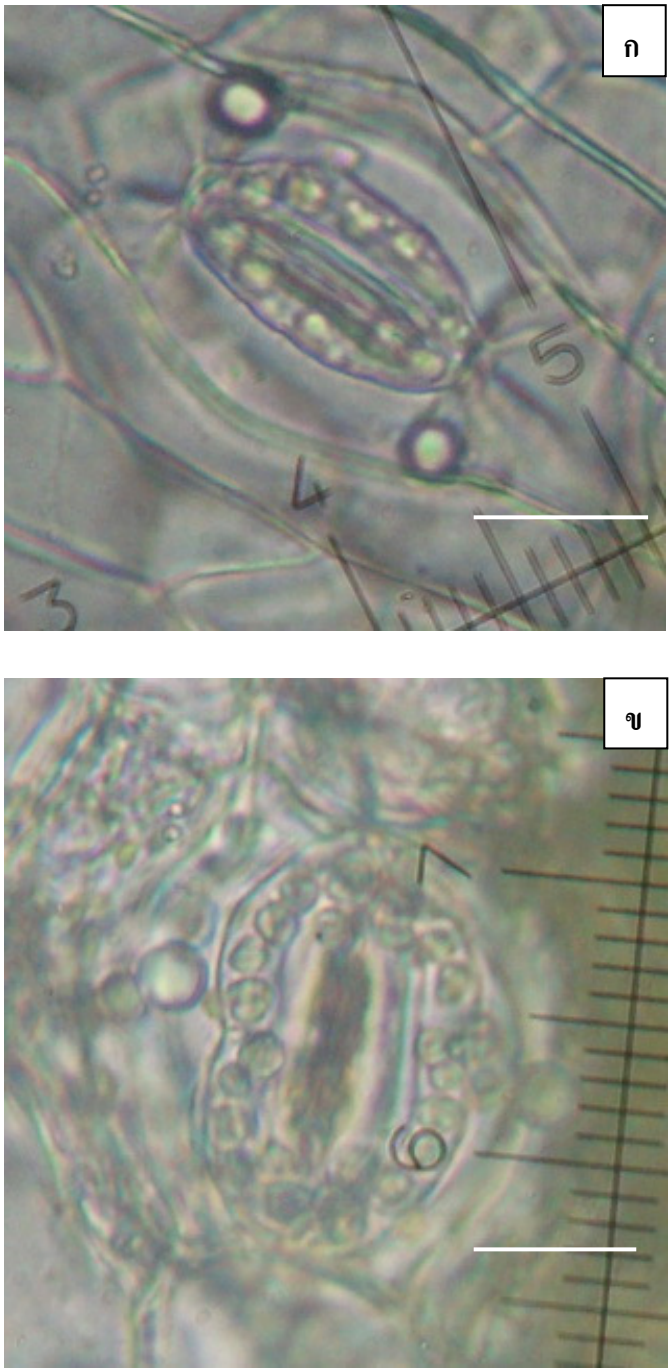
[2] = บันทึกข้อมูลกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 เดือน

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$)

* = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรชนิดเดียวกันบนแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (LSD, $p < 0.05$)



รูปที่ 8 ผลของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน; เซลล์คุมของต้น ดิพลอยด์ 2n=2x=32 (ก) และต้น เททระพลอยด์ 2n=4x=64 (ข) (บาร์= 15 μm)

5. สหสัมพันธ์ของลักษณะเซลล์คุม จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ และ จำนวนชุดโครโมโซม

จาก การประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์พบว่า การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมนั้นมีความสัมพันธ์ทางบวกกับความกว้าง ยาวของเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (r = 0.60 0.81 และ 0.83 ตามลำดับ) แต่มีความสัมพันธ์ในทางลบต่อความหนาแน่นของเซลล์คุมต่อพื้นที่ (r = -0.67) แสดงว่าหากมีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเกิดขึ้นขนาดความกว้าง ยาวเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ก็จะเพิ่มขึ้น แต่จะมีจำนวนเซลล์เซลล์คุมต่อพื้นที่ลดลง ส่วนขนาดความกว้างของเซลล์คุมนั้นมีความสัมพันธ์ในทางบวกต่อขนาดความยาวของเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ แต่มีความสัมพันธ์ทางลบกับความหนาแน่นของเซลล์คุม (r = 0.37 0.40 และ -0.59 ตามลำดับ) ขนาดความยาวของเซลล์คุมก็พบว่ามีความสัมพันธ์สัมพันธ์ทางบวกต่อเม็ดคลอโรพลาสต์ แต่สัมพันธ์ทางลบต่อความหนาแน่นของเซลล์คุมเช่นเดียวกัน (r = 0.67 และ -0.50 ตามลำดับ) (ตารางที่ 13) ตารางค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์นี้สร้างขึ้นมาเพื่อช่วยยืนยันผลของความสอดคล้องกันระหว่างลักษณะทางเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ที่สัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม และช่วยบอกถึงความสำคัญของวิธีการวัดขนาดเซลล์คุมว่าเหมาะสมในการใช้คัดเลือกเบื้องต้นเพื่อหาต้นพอลีพลอยด์ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ทำลายต้น ไม่เสียค่าใช้จ่ายมาก (Yang *et al*., 2006) และให้ผลค่อนข้างแม่นยำ

ตารางที่ 13 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะเซลล์คุม จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ และ จำนวนชุดโครโมโซม

	ploidy level	Guard cell width	Guard cell length	Guard cell density	Chloroplast number
ploidy level	1				
Guard cell width	0.60**	1			
Guard cell length	0.81**	0.37**	1		
Guard cell density	-0.67**	-0.59**	-0.50**	1	
Chloroplast number	0.83**	0.40**	0.67**	-0.54**	1

** แตกต่างทางสถิติที่ระดับ 1 % ($p<0.01$)

บทที่ 4

สรุป

การศึกษาในครั้งนี้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านการทรีตด้วยโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาสูง มีผลทำให้ลักษณะการเจริญเติบโตทุกลักษณะต่ำกว่าต้นกล้าที่ไม่ได้ทรีตสารโคลชิซิน และมีอัตราการรอดชีวิตที่น้อยลง โดยระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ทำให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือนตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 5.57 mM

การชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในปาล์มน้ำมันสามารถพบต้นแบบมิกโซพลอยด์ มากกว่าแบบเททระพลอยด์ การชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ จากเมล็ดงอกปาล์มน้ำมันควรใช้ สารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 7.5 mM โดยมีระยะเวลาในการจุ่มแช่สารนาน 48 ชั่วโมง ต้นพอลีพลอยด์ที่ได้มีลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่ ความสูง ขนาดโคนต้น การสร้างใบขนนก พื้นที่ใบแรก และลักษณะความหนาแน่นของเซลล์คุม ต่ำกว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีขนาดของเซลล์คุมใหญ่กว่า และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์มากกว่า โดยระดับโครโมโซมในปาล์มน้ำมันมีสหสัมพันธ์ในทางบวกกับความกว้าง ความยาวของเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ ($r = 0.60$ 0.81 และ 0.83 ตามลำดับ) แต่มีความสัมพันธ์ในทางลบกับความหนาแน่นของเซลล์คุม ($r = -0.67$) การใช้วิธีการวัดขนาด และความหนาแน่นของเซลล์คุมจึงเป็นวิธีการเบื้องต้นที่เหมาะสมเพื่อช่วยคัดเลือกต้นพอลีพลอยด์ของปาล์มน้ำมัน ก่อนการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก

ต้นกล้าปาล์มพอลิพลอยด์ที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ได้นำไปปลูกในแปลงปลูกทดลองเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตเปรียบเทียบกับกล้าปาล์มปกติ และใช้เป็นเชื้อพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2542. การจัดการแปลงเพาะต้นกล้าปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.

จรัสศรี นวลศรี. 2548. การเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซม และการปรับปรุงพันธุ์พืช. *ใน* เอกสารคำสอนวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชสวน. หน้า 73-97. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

ชูจิต มามีวัฒนะ วัชรี บุญช่วย และชาย โฆรวิส. 2536. ศึกษาการเจริญเติบโตของกล้าปาล์มน้ำมันเทเนอราที่ได้รับปุ๋ยอัตราและระยะเวลาต่างกัน. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.

ชูติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา รังสี เจริญสถาพร และอนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ. 2548. การชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในฝ้ายพื้นเมือง. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.

ธีร ศรีสวัสดิ์ คำนูญ กาญจนภูมิ โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์ สุรกิต ศรีสกุล และ วราวุธ ชูธรรมทัช. 2548. การวิเคราะห์ปาล์มน้ำมันโดยใช้โฟลไซโตรเมทรี : การจำแนกเบื้องต้นสำหรับสายพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงของจีโนมดีเอ็นเอ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 27 : 645-652.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2548. ภาพรวมอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมัน. *ใน* เส้นทางสู่การผลิตปาล์มน้ำมัน (ชื่อบรรณาธิการ ธีระ เอกสมทราเมษฐ์). หน้า 24. สงขลา: นีโอพอยท์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ นิทัศน์ สองศรี ธีระพงศ์ จันทรนิยม ประกิจ ทองคำ ชัยรัตน์ นิลนนท์ และยงยุทธ เชื้อมงคล. 2544. การกระจายตัว สหสัมพันธ์ และอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะต่างๆ ในลูกชั่วที่ 2 ของปาล์มน้ำมัน. ว. สงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23 (ฉบับพิเศษ ปาล์มน้ำมัน) : 705-715.

นคร สาระคุณ. 2540. การจัดการแปลงเพาะชำปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.

นคร สารวัตร์. 2550. ผลของสารโคลชิซินต่อความงอกของเมล็ด การพัฒนาการของต้นกล้า และการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในมะนาวฝรั่ง [*Citrus limon* (lin.) burm.f.]. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

น้ำอ้อย ศรีประสม และธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2551. สหสัมพันธ์และอัตราพันธุกรรมของลักษณะทางลำต้นในระยะกล้าปาล์มน้ำมัน. ว. หาดใหญ่วิชาการ 6(2) : 109-115.

เรวัต เลิศฤทัยโยธิน. 2541. ปาล์มน้ำมัน. *ใน* พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และวิสา ฉิมน้อย. 2542. การชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในต้นบัวบก โดยใช้สารโคลชิซิน. ว. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 24: 55-58.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล และ วิทูล ไชยภักดี. 2547. ผลของโคลชิซินต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ทรอปิคอลโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. เทคนิคการศึกษาโครโมโซม. *ใน* พันธุศาสตร์ของเซลล์. 250 หน้า. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Asif, M.J., Mak, C. and Rofina, Y.O. 2000. Polyploid induction in local wild banana (*Musa acuminata* ssp. *malaccensis*). Pakistan J. Biol. Sci. 3: 740-743.

Atichart, P. and Bunnag, S. 2007. Polyploid Induction in *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. by *in vitro* Techniques. Thai J. Agri. Sci. 40: 91-95.

Blakeslee, A.F. and Avery, A.G. 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. J. Hered. 28: 393-411.

Caperta, A.D., Delgado, M., Ressurreicao, F., Meister, A., Jones, R.N., Viegas, W. and Houben, A. 2006. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. Protoplasma 227: 147-153.

Chinchilla, C.M., Bulgarelli, J., Castillo, G. and Sales, A. 1998. Advance oil palm planting material: Vegetative growth and yield. ASD Oil Palm Papers 17: 1-19.

Chen, L.L. and Gao, S.L. 2007. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. Scientia Horticulturae 112: 339-344.

Coley, R.H.V. and Tinker, P.B. 2003. The Oil Palm. Oxford: Blackwell Science Ltd.

De jesus-Gonzalez, L. and Weathers, P.J. 2003. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Rep. 2: 809-813.

Ewald, D., Ulrich, K., Naujoks, G. and Schröder, M.B. 2009. Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 99: 353-357.

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

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

Guofeng, L., Zhineng, L. and Manzho, B. 2007. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. Euphytica 157: 145-154.

Hamill, S.D., Smith, M.K. and Dodd, W.A. 1992. *In vitro* induction of banana autotetraploidy by colchicine treatment of micropropagated diploids. Aust. J. Bot. 40: 887-896.

Ian, R. and Thomas, F. 1998. Field handbook: oil palm series, Vol. 1. Singapore: Potash and Phosphate Institute.

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

Kushairi, A. and Rajanaidu, N. 2000. Breeding populations, seed production and nursery management. *In* Advances in Oil Palm Research (eds. B. Yusof, B.S. Jalani and W.C. Kook) Vol. 1, pp. 39-96. Kuala Lumpur: Malaysian Palm Oil Board.

Li, W., Hu, D.N., Li, H. and Chen, X.Y. 2007. Polyploid induction of *Lespedeza formosa* by colchicine treatment. For. Stud. China 9: 283-286.

Madon, M., Clyde, M.M., Hashim, H., Mohd, Y.Y., Mat, H., and Saratha, S. 2005. Polyploidy induction of oil palm through colchicines and oryzarin treatments. J. Oil Palm Research 17: 110-123.

Madon, M., Phoon, L.Q., Clyde, M.M. and Mohd, D.A. 2008. Application of flow cytometry for estimation of nuclear DNA content in *Elaeis.* J. Oil Palm Research 20: 447-452.

Mora, S., Chinchilla, C., Sanchez, A. and Escobar, R. 2007. Germinated oil palm (*Elaeis guineensis*) seeds: process innovations to improve seed quality and performance of nursery plants. Planter 83: 435-448.

Pinheiro, A. A., Pozzobon, M. T. and Carneiro, V. T. C. 2000. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. Plant Cell Rep. 19:274-278.

Ramulu, K.S., Verhoeven. H.A. and Dijkhuis, P. 1991. Mitotic blocking, micronucleation and chromosome doubling by oryzalin, amiprophosmethyl and colchicine in potato. Protoplasma 160: 65-71.

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

Rubuluzaa, T., Nikolova, R.V., Smith, M.T. and Hannweg, K. 2007. *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicines. J. S. Afr. Bot. 73: 259-261.

Silva, P.A.K.X., Jacques, S.C. and Zanettini, M.H.B. 2000. Induction and identrification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidacea) by *in vitro* techniques. Ciencia Rural, Santa Maria 30:105-111.

Steel, R.G.D. and Torie, J.H. 1980. Princible and Procedures of Statistics. New York: McGraw – Hill International Book Co., Inc.

Swanson, C.P. 1957. Cytology and Cytogenetics. New Jersy: Prentice Hall.

Tan, Y.P. and Mohan, E. 1981. Optimum depth of sowing and transplanting in the oil palm nursery. *In* The Oil Palm in Agriculture in the Eighties (eds. E. Pushparajah and P.S. Chew) Vol.1, pp. 415-424. Kuala Lumpur : Incorporated Society of Planters.

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

Tosca, A., Pandolfi, R., Citterio, S., Fasoli, A. and Sgorbati, S. 1995. Determination of flow cytometry of the chromosome doubling capacity of oryzalin and colchicine in gynogenetic haploid of gerbera. Plant Cell Rep. 14: 455-458.

Turner, P.D. and Gillbanks, R.A. 1982. Oil Palm Cultivation and Management. Kuala Lumpur : Incorporated Society of Planters.

Van Tuyl, J.M., Meijer, B. and Van din, M.P. 1992. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in *in vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. Acta Horticultural 325: 625-630.

Viehmannova, I., Cusimamani, E. F., Bechyne, M. Vyvadilova, M. and Greplova, M. 2009. *In vitro* induction of polyploidy in yacon (*Smallanthus sonchifolius*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 97: 21-25.

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

Yang, X.M., Cao, Z.Y., AN, L.Z., Wang, Y.M. and Fang, X.M. 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Euphytica 152: 217-224.

Zhang, Q., Luo, F., Liu, L. and Guo, F. 2009. *In vitro* induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica L.*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 101: 41-47.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายสิทธิพงษ์ พรมมา

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110620062

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วท.บ. (พืชศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับ 1	มหาวิทยาลัยนเรศวร	2550

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

สิทธิพงษ์ พรมมา และ ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2553. การชักนำพอลีพลอยด์และลักษณะสัณฐานของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน. ว. เกษตรพระจอมเกล้า. (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)