การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

Propagation of Hybrid Tenera of Oil Palm through Immature Zygotic Embryo Culture and Detection of Genetic Variation

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์

Sakulrat Sanputawong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Plant Science
Prince of Songkla University
2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ผู้เขียน นางสาวสกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

…….ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระ เอกสมทราเมษฐ์)

…….....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ขวัญจิตร สันติประชา)

……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สนธิชัย จันทร์เปรม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ผู้เขียน นางสาวสกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างแคลลัส และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ใช้คัพภะอ่อน (Immature zygotic embryos: IZE) ของปาล์มน้ำมัน 16 คู่ผสม โดยตัดแยกคัพภะและวางเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) เติม dicamba (3, 6-dichloro-oanisic acid) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในสภาพการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า หลังการวางเลี้ยง 4-5 สัปดาห์ เริ่มมีการสร้างแคลลัส หลังการวางเลี้ยง 3 เดือน พบการสร้างแคลลัส 4 รูปแบบ คือแคลลัสแบบเกาะกันแน่น แคลลัสแบบหลวมๆ แคลลัสแบบปม และแคลลัสคล้ายราก โดยคู่ผสมที่ 7 ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ และขนาดของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 11.7 มิลลิเมตร ส่วนคู่ผสมที่ 14 ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 18 เปอร์เซ็นต์ คู่ผสมที่ 16 ให้การสร้างปมสูงสุด 15.79 ปมต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ตลอดจนความเร็วในการสร้างแคลลัส 35.5 และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 20.17 จากนั้นย้ายแคลลัสเริ่มต้นไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพเดียวกับข้างต้น เพื่อชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า คู่ผสมที่ 9 และ 11 ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังการวางเลี้ยงเพียง 1 เดือน คู่ผสมที่ 1 ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 7.69 เปอร์เซ็นต์ และคู่ผสมที่ 7 ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 33.33 เอ็มบริโอ การวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ส่งเสริมการสร้างปมสูงสุด 32.99 ปมต่อแคลลัส โดยคู่ผสมที่ 8 ให้การสร้างปมสูงสุด 61.9 ปมต่อแคลลัส จากการทดลองพบว่า คู่ผสมที่ 7 และ 16 ให้การตอบสนองต่อการสร้างและเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอ รวมถึงสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะสร้างจาวสูงสุด ดังนั้นจึงนำโซมาติกเอ็มบริโอทั้งสองคู่ผสมมาใช้ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สอง (secondary somatic embryo:

SSE) และการงอกของต้นอ่อน โดยนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยง (haustorium embryos: HE) ขนาด 9 มิลลิเมตร มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า คู่ผสมที่ 7 ให้การสร้าง SSE สูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผสมที่ 16 ให้จำนวน SSE สูงสุด 16.8 SSE/HE การเติม GA_3 (gibberellic acid) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรชักนำ SSE ส่งเสริมการสร้าง SSE สูงสุดจำนวน 18.93 SSE/HE การลดความชื้นของ HE ลง 5-16.52 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณ SSE และการงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ การชักนำการงอกของ SSE บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตและผงถ่าน เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า HE ของคู่ผสมที่ 16 ให้การสร้างยอดสูงสุด 18.6 ยอดต่อชิ้นส่วน และให้การพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์สูงสุดเฉลี่ย 0.8 ต้นต่อชิ้นส่วน

การตรวจสอบพันธุ์ปาล์มลูกผสมเทเนอร่าระหว่างพันธุ์พ่อฟิสิเฟอร่ากับพันธุ์แม่ดูร่าของคู่ผสมที่ 7 และ 16 ด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ (simple sequence repeat: SSR) พบว่าไพรเมอร์ EgCIR008 ให้แถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนระหว่างพ่อแม่ และสามารถยืนยันความเป็นลูกผสมได้ทั้งสองคู่ผสม และใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าลูกผสม พบว่า มีความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอ และไม่พบความแปรปรวนจากกระบวนการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการข้างต้นจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSR ในทุกระยะคือ แคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และต้นกล้าลูกผสม

Thesis Title	Propagation of Hybrid Tenera of Oil Palm through Immature Zygotic Embryo Culture and Detection of Genetic Variation
Author	Miss Sakulrat Sanputawong
Major Program	Plant Science
Academic Year	2010

ABSTRACT

Immature zygotic embryos (IZE) of 16 crosses of oil palm were excised and cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2.5 mg/l dicamba (3,6-dichloro-o-anisic acid) to initiate callus. The cultures were placed under light conditions at 14 h photoperiod, 27±1°c for 3 months. The results revealed that the time employed for callus initiation of those embryos was 4-5 weeks after culture. The calli were classified into 4 types: compact, friable, nodular and root-like structure. The highest percentage of callus formation (33.33) and size of callus (11.7 mm) were obtained from cross number 7. The highest percentage of embryogenic callus formation (18) was obtained from cross number 14. The highest number of nodule formation per embryogenic callus (15.79) was obtained from cross number 16. As for the speed index of callus (35.5) and embryogenic callus (20.17) formation, cross 16 gave the highest of both parameters. The calli were transferred to MS medium supplemented with 1 mg/l dicamba and cultured under the same conditions for induced embryogenic callus and somatic embryo. The highest speed of embryogenic callus formation was obtained from cross number 1 and 9 after 1 month of culture. The highest percentage of embryogenic callus (7.69) was obtained from cross number 1 and average number of somatic embryo formation (33.33 embryos) was obtained from cross number 7. The result revealed that cross number 7 and 16 gave the highest response on somatic embryo formation and multiplication to haustorium stage. So, it represents good quality material for the study of biological factors affecting secondary somatic embryo (SSE) formation and germination of plantlet regeneration. Nine millimeter of haustorium embryos (HE) were cultured on

MS medium supplemented with 0.2 M sorbitol and 200 mg/l ascorbic acid for 2 months. The results revealed that SSEs were achieved at 80% obtained from cross number 7, and the highest number of SSE/HE formation at 18 SSE/HE from cross number 16. Addition of gibberellic acid (GA_3) at the concentration of 0.05 mg/l in the culture medium promoted SSE development at 18.93 SSE/HE. Partial desiccation of somatic embryo at approximately 5-16.52% before culturing on MS medium supplemented with 0.2 M sorbitol gave the SSE formation and germination of complete plantlets. Germination of SSE was obtained in hormone-free MS medium without activated charcoal after 3 months of culture. The highest number of shoot formation was obtained from cross number 16 at 18.6 shoot/HE.

Hybrid verification within the F1 populations (Tenera) between Pisifera and Dura of cross number 7 and 16 were detected by simple sequence repeat (SSR) analysis. The result revealed that EgCIR008 primer provided clear DNA patterns and could be used for verifying the hybridity of both crosses. Assessment of somaclonal variation derived from this protocol using this primer revealed that there was a uniformity within clones, and no somaclonal variation occurred in our propagation system by SSR marker in all level, callus, somatic embryo and plantlet status.

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(13)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(19)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	6
วัตถุประสงค์	22
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	23
วัสดุ อุปกรณ์	23
วิธีการ	28
3 ผล	44
4 วิจารณ์	105
5 สรุป	116
เอกสารอ้างอิง	121
ภาคผนวก	139
ประวัติผู้เขียน	167

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะพันธุ์ปาล์มน้ำมันแบบดูร่า เทเนอร่า และฟิสิเฟอร่า	2
2	ผลของคู่ผสม สูตรอาหาร และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	60
3	ผลของคู่ผสม ชนิด และความเข้มข้นของออกซินต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	61
4	ผลของคู่ผสม ชนิด และความเข้มข้นของออกซินต่อการสร้างปมของแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	62
5	ผลของคู่ผสม และระดับความเข้มแสง ต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	64
6	ผลของคู่ผสม และระดับความเข้มแสงต่อการสร้างปมของแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	65
7	ผลของคู่ผสม และขนาด HE ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้าง SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน	70
8	ผลของคู่ผสม และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการสร้าง SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน	71

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
9	ผลของคู่ผสม ระยะพัฒนาการ และขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอต่อการสร้าง SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน	72
10	ผลของคู่ผสม และขนาดของ HE ที่สร้าง SSE ต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	74
11	การงอกของ SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	75
12	ผลของคู่ผสม และขนาดของ HE ต่อการงอกยอดเฉลี่ยของปาล์มน้ำมันหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	76
13	ผลของคู่ผสม และขนาดของ HE ต่อการงอกรากเฉลี่ยของปาล์มน้ำมันหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	76
14	ผลของคู่ผสม และขนาดของ HE ต่อการงอกต้นที่สมบูรณ์เฉลี่ยของปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	77
15	ผลของชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อเปอร์เซ็นต์การสร้าง SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน	82

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	ผลของชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการสร้าง SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน	83
17	ผลของชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	84
18	ผลของชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการงอกของ SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	85
19	ผลของระดับความเข้มข้นของ GA_3 ต่อการสร้าง SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน	88
20	ผลของระดับความเข้มข้นของ GA_3 ต่อการงอกของ SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	88
21	ผลของวิธีการเพาะเลี้ยงต่อการงอกของ SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 แบบ เป็นระยะเวลา 3 เดือน	90
22	ผลของวิธีการเพาะเลี้ยงต่อการงอกยอด ราก และต้นที่สมบูรณ์ของ SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 แบบ เป็นระยะเวลา 3 เดือน	91

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
23	ความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยงที่ลดลงในคู่ผสมที่แตกต่างกัน หลังการผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลาต่างๆ	94
24	ผลของการลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอต่อการสร้าง SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน	95
25	ผลของการลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	96
26	ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยของแต่ละชิ้นส่วนที่นำมาสกัดดีเอ็นเอจากการวัดด้วยเครื่องสเป็กโตรโฟโตมิเตอร์ (Nano-Drop รุ่น ND-1000)	100

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ข้อเท็จจริงเกี่ยวกับปาล์มน้ำมันเทียบกับพืชน้ำมันอื่น ๆ	3
2	ลักษณะของทะลายลูกผสมเทเนอร่าอายุ 3-4 เดือน บนต้นแม่พันธุ์ดูร่าที่ใช้ในการศึกษา	24
3	ลักษณะผลปาล์มน้ำมันอายุ 3-4 เดือน ที่ตัดแยกออกจากทะลายก่อนนำมาตัดส่วนเนื้อปาล์มน้ำมันออก	30
4	ลักษณะเนื้อในเมล็ดของปาล์มน้ำมันหลังใช้ค้อนทุบแยกส่วนกะลาออก	30
5	ตัดเนื้อในเมล็ดที่มีคัพภะฝังอยู่เป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดประมาณ 3 x 3 x 8 ลูกบาศก์มิลลิเมตร	30
6	คัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันลูกผสมหลังจากแยกออกจากเนื้อในเมล็ดออก พร้อมที่จะเพาะเลี้ยง	30
7	อาหารแข็งที่ใช้ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ	37
8	อาหารสองชั้นที่ใช้ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ	38
9	อาหารเหลวที่ใช้ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ	38
10	ตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแปรปรวนโดยเทคนิค SSR	40
11	รูปแบบพัฒนาการของคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันคู่ผสมต่าง ๆ ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน	46
12	การตอบสนองของคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมทั้ง 16 คู่ผสมต่อการสร้างแคลลัส และความเร็วในการสร้างแคลลัส เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	47
13	การตอบสนองของคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมทั้ง 16 คู่ผสมต่อดัชนีความเร็วในการสร้างแคลลัส เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	47

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ประเภทของแคลลัสที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมทั้ง 16 คู่ผสม บนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน	49
15	การสร้างแคลลัสแบบต่างๆ ของปาล์มน้ำมันลูกผสมทั้ง 16 คู่ผสม หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน	50
16	ขนาดแคลลัสที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมทั้ง 16 คู่ผสมบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน	51
17	การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนปมต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน 16 คู่ผสม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน	52
18	ดัชนีความเร็วในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน 16 คู่ผสม ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน	53
19	ระยะเวลาการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน 16 คู่ผสม หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร	54
20	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อแคลลัสของปาล์มน้ำมัน 16 คู่ผสม หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลาต่างๆ	55

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันลูกผสม จากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์ = 2.5 มิลลิเมตร) เป็นเวลา 1 เดือน	55
22	ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันลูกผสม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน (บาร์ = 2 มิลลิเมตร)	56
23	ลักษณะของแคลลัสของปาล์มน้ำมันลูกผสม ที่ชักนำการเพิ่มปริมาณบนอาหาร 2 สูตรร่วมกับการเติม dicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 เดือน	59
24	แคลลัสที่มีลักษณะเป็นเส้นคล้ายราก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 เป็นเวลา 5 เดือน (บาร์ = 1.5 มิลลิเมตร)	59
25	พัฒนาการของ SSE ที่ชักนำจาก HE ขนาดต่างๆ หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน	69
26	พัฒนาการของ SSE จาก GE และ HE หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน	73
27	พัฒนาการของ SSE หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน	78
28	ลักษณะการตายของ HE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้าง SSE	81

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
29	พัฒนาการของ SSE จากบริเวณต่าง ๆ ของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยง หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	81
30	HE ที่ตายหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)	86
31	การงอกของ SSE เพาะเลี้ยงในอาหารด้วยวิธีการแบบต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน	92
32	การประเมินดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้นพ่อและแม่ ที่สกัดตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) ด้วยวิธีการทางคุณภาพเปรียบเทียบกับ λDNA	98
33	การประเมินดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้นกล้าลูกผสมที่ชักนำผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอ ตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) ด้วยวิธีการทางคุณภาพเปรียบเทียบกับ λDNA	99
34	การประเมินดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ ตามวิธีการของ Te-chato (2000) ด้วยวิธีการทางคุณภาพเปรียบเทียบกับ λDNA	99
35	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของพ่อแม่และแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 บนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสมขนาดต่างๆ	100
36	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของพ่อแม่และแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 16 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสมขนาดต่างๆ	101

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
37	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของพ่อแม่และแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 16 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 บนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสมขนาดต่างๆ	101
38	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอลูกผสมปาล์มน้ำมันคู่ที่ 7 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 บนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสมขนาดต่าง ๆ	102
39	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 โดยใช้เครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของต้นพ่อและแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม	102
40	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 16 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 บนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม	103
41	รูปแบบแถบดีเอ็นเอรูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 16 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม	103
42	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 บนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของต้นพ่อและแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม	104

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
43	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของต้นพ่อและแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม	104
44	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 16 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 บนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม	105
45	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 16 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม	105

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

MS	=	Murashige and Skoog medium
Y3	=	Eeuwens medium
NAA	=	α-naphthaleneacetic acid
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
dicamba	=	3,6-Dichloro-2-methoxybenzoic acid
BA	=	6-benzyladenine
GA_3	=	Gibberellic acid
2iP	=	N^6-(2-isopentenyl) adenine
PC	=	Primary callus
EC	=	Embryogenic callus
SE	=	Somatic embryo
GE	=	Globular embryo
HE	=	Haustorium embryo
SSE	=	Secondary somatic embryo
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan's multiple range test
SSR	=	Microsatellite
PCR	=	Polymerase chain reaction
M	=	โมลาร์
%	=	เปอร์เซ็นต์
มก/ล	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
มม.	=	มิลลิเมตร

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

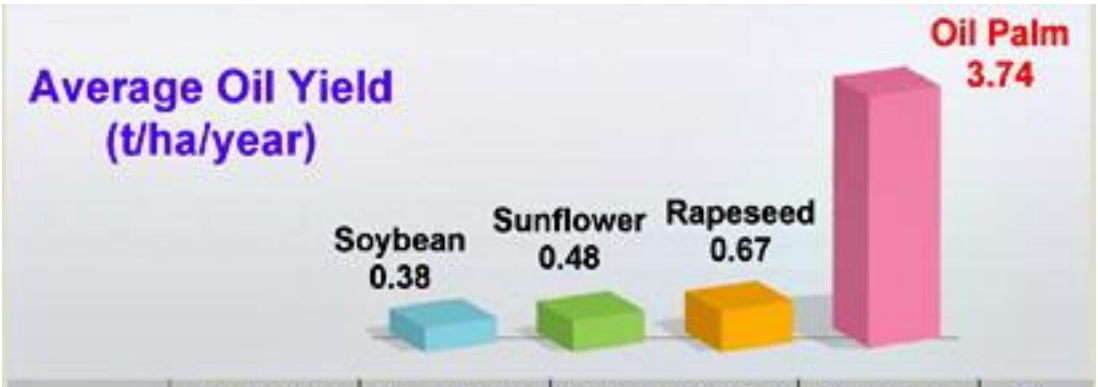
ปาล์มน้ำมัน (Oil palm: *Elaeis guineensis* Jacq.) จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดยืนต้น เป็นพืชผสมข้ามประเภทที่มีช่อดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกันแต่ช่วงเวลาการออกดอก หรือการบานของดอกไม่พร้อมกัน และเป็นพืชดิพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=32 ปาล์มน้ำมันมีหลายชนิด ชนิดที่นิยมปลูกเป็นการค้า เป็นปาล์มน้ำมันที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอัฟริกา จึงเรียกปาล์มชนิดนี้ว่า African oil palm อยู่ในสกุล *Elaeis* ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ *Elaeis guineensis* *E. oleifera* และ *E. odora* ทั้งนี้ปาล์มน้ำมันชนิด *E. guineensis* เป็นชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน สายพันธุ์ของปาล์มน้ำมันชนิดนี้สามารถจำแนกลักษณะความแตกต่างได้ 3 แบบ (ตารางที่ 1) คือ แบบดูร่า (Dura: D) ผลมีกะลาหนาถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ แบบฟิสิเฟอร่า (Pisifera: P) ผลไม่มีกะลาถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ และแบบเทเนอร่า (Tenera) ผลมีกะลาบางถูกควบคุมด้วยยีนพันธุ์ทาง 1 คู่ เกิดจากการผสมระหว่างดูร่ากับฟิสิเฟอร่า มีเปลือกสำหรับอัดน้ำมันมาก และให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง (บุษบา, 2548) ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งของโลก และของประเทศไทยด้วย ทั้งนี้เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันชนิดเดียวที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงกว่าพืชน้ำมันอื่นๆ ทุกชนิด ซึ่งให้ผลผลิตน้ำมันดิบเฉลี่ย 4-5 ตันต่อเฮกตาร์ และอาจเพิ่มขึ้นสูงถึง 7-8 ตันต่อเฮกตาร์ (Biofuel, 2007) แหล่งผลิตปาล์มน้ำมันหลักของโลกคือ ประเทศมาเลเซีย คิดเป็นประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ ของการผลิตทั่วโลก ผลผลิตปาล์มน้ำมันเฉลี่ยอยู่ที่ 3.74 ตันต่อเฮกตาร์ต่อปี ซึ่งสูงกว่าพืชตระกูลกะหล่ำ 2.5 เท่า และสูงกว่าถั่วเหลืองถึง 7 เท่า ดังนั้นการเพาะปลูกปาล์มน้ำมันสามารถเพิ่มความต้องการผลผลิตน้ำมันที่สูงขึ้นได้ในพื้นที่ทำการเกษตรที่มีอยู่อย่างจำกัด โดยพื้นที่ 9.86 ล้านเฮกตาร์ของต้นปาล์ม หรือคิดเป็น 4.5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตน้ำมันได้ 3.74 ตันต่อเฮกตาร์ต่อปี ในขณะที่ถั่วเหลืองใช้พื้นที่ 92.63 ล้านเฮกตาร์ หรือคิดเป็น 42.27

เปอร์เซ็นต์ ผลิตน้ำมันได้ 0.38 ตันต่อเฮกตาร์ต่อปี แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดพื้นที่ผลิต (ภาพที่ 1) (Malaysia's Sustainable Palm Oil, 2007) ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชที่เป็นแหล่งน้ำมันเพื่อการบริโภคที่สำคัญของโลกรองจากถั่วเหลือง (เกษตร, 2541) ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของภาคใต้ โดยมีพื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่บริเวณจังหวัดกระบี่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี สตูล และตรัง (สุรกิตติ, 2532) ซึ่งมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันที่สามารถให้ผลผลิตแล้ว 833,000 ไร่ ในปี พ.ศ. 2536 เพิ่มขึ้นเป็น 1.6 ล้านไร่ ในปี พ.ศ. 2545 มีมูลค่าที่เกษตรกรขายได้ 9,202 ล้านบาท และมีปริมาณการส่งออกที่สูงขึ้นถึง 177,417 ตัน คิดเป็นมูลค่า 4,202 ล้านบาท (พรชัย, 2549) ในปี 2547 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 1,935,000 ไร่ ให้ผลผลิต 2,678 กิโลกรัมต่อไร่ จัดเป็นอันดับ 4 ของโลก รองจากมาเลเซีย อินโดนีเซีย และไนจีเรีย ประเทศไทยผลิตน้ำมันปาล์มในปี 2548 ได้ 685,000 ตัน จัดเป็นลำดับ 6 ของโลก รองจากมาเลเซีย อินโดนีเซีย ไนจีเรีย โคลัมเบีย และโกตดิวัวร์ (เปรมปรี, 2549) น้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในของปาล์มประกอบด้วยกรดไขมันอิสระชนิดต่าง ๆ เช่น กรดโอเลอิกซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัว และกรดสเตียริกซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่สำคัญ สามารถแยกให้บริสุทธิ์นำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่อเนื่องเพื่อการบริโภค ได้แก่ อุตสาหกรรมนมข้นหวาน นมจืด บะหมี่สำเร็จรูป เนยแข็ง เนยเทียม ครีมเทียม สบู่ พลาสติก เครื่องสำอาง น้ำมันหล่อลื่น เป็นต้น สำหรับเนื้อไม้และวัสดุพลอยได้อื่น ๆ สามารถนำไปทำเป็นเฟอร์นิเจอร์ต่าง ๆ เชื้อเพลิง และกระดาษ เป็นต้น (ศักดิ์ศิลป์ และคณะ, 2541)

ตารางที่ 1 ลักษณะพันธุ์ปาล์มน้ำมันแบบดูร่า เทเนอร่า และฟิสิเฟอร่า

ลักษณะ	ดูร่า	เทเนอร่า	ฟิสิเฟอร่า
1. ความหนากะลา (มิลลิเมตร)	2-8	0.5-4	บางมาก
2. เส้นใยรอบกะลา	ไม่มี	มี	มี
3. ผล/ทะลาย (%)	60	60	มักเป็นหมัน
4. เปลือกนอก/ผล (%)	60-65	60-90	92-97
5. กะลา/ผล (%)	25-30	8-15	บางมาก
6. เนื้อใน/ผล (%)	4-20	3-28	3-8
7. น้ำมัน/เปลือกนอก (%)	50	50	30
8. น้ำมัน/ทะลาย(กิโลกรัม/ทะลาย)	18-19.5	22.5-25.5	25-30

ที่มา : กรมวิชาการเกษตร (2552)



Oil Crop	Production (mil tonnes)	% of Total Production	Average Oil Yield (t/ha/year)	Total Area (mil ha)	% Area
Soybean	35.19	34.24	0.38	92.63	42.27
Sunflower	11.09	10.79	0.48	22.95	10.47
Rapeseed	18.34	17.84	0.67	27.29	12.45
Oil Palm	**36.90**	**35.90**	**3.74**	**9.86**	**4.50**
Total	102.78[a]			219.15[b]	

ภาพที่ 1 ข้อเท็จจริงเกี่ยวกับน้ำมันปาล์มเทียบกับพืชน้ำมันอื่นๆ

ที่มา: Malaysia's Sustainable Palm Oil, 2007

จากสภาพวิกฤตด้านพลังงานที่มีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่ปี 2547 เป็นต้นมา ทำให้รัฐบาลต้องหันมาให้ความสำคัญในการผลิตปาล์มน้ำมันเพื่อผลิตพลังงานทดแทนน้ำมันที่เรียกว่า "ไบโอดีเซล" ซึ่งนับเป็น 1 ในยุทธศาสตร์การแก้ไขปัญหาด้านพลังงานของประเทศ แต่ละปีประเทศไทยต้องเสียงบประมาณนำเข้าน้ำมันไม่ต่ำกว่า 500,000 ล้านบาท และในปี 2555 รัฐบาลกำหนดเป้าหมายส่งเสริมการผลิตและการใช้ไบโอดีเซลให้ได้ร้อยละ 10 ของการใช้น้ำมันดีเซลทั้งหมดหรือจำนวน 8.5 ล้านลิตรต่อวัน และเป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืน (กระทรวงพลังงาน, 2549) ทั้งนี้การผลิตไบโอดีเซลมีความจำเป็นต้องใช้ปาล์มน้ำมันปริมาณมาก แต่ผลผลิตที่ได้ในแต่ละปีไม่สม่ำเสมอ อีกทั้งพื้นที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันมีจำกัด ดังนั้นการเพิ่มผลผลิตให้ได้มากที่สุดในพื้นที่ที่มีจำกัดจึงเป็นเป้าหมายหลัก มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ได้เล็งเห็นถึงความสำคัญในข้อนี้ จึงจัดให้ปาล์มน้ำมันเป็น 1 ใน 7 ยุทธศาสตร์หลักของมหาวิทยาลัยที่มุ่งพัฒนาการวิจัยให้มีความเชี่ยวชาญในสาขาที่เกี่ยวข้อง เพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไร่ให้สูงขึ้น และเพื่อรองรับอุตสาหกรรมการ

ผลิตไบโอดีเซล ทั้งนี้พื้นที่ที่เหมาะต่อการเพาะปลูกปาล์มน้ำมันที่สุดคือ ภาคใต้ของประเทศไทย เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะปลูก โดยกำหนดยุทธศาสตร์การพัฒนาปาล์มน้ำมันเพื่อผลิตไบโอดีเซลในปี 2549-2552 และมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันจากเดิม 2.04 ล้านไร่ (กระทรวงพลังงาน, 2548) เป็น 6 ล้านไร่ จนถึง 10 ล้านไร่ ในปี 2572 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548)

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อปลูกเชิงการค้าในปัจจุบันมีด้วยกัน 2 วิธี คือการขยายพันธุ์แบบดั้งเดิม และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์แบบดั้งเดิมเป็นการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดพันธุ์ ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมและใช้ได้กับพืชส่วนใหญ่ เมล็ดพันธุ์ของปาล์มน้ำมันประกอบด้วย กะลา (Shell) เนื้อผลชั้นใน (kernel) หรืออาหารสะสมเลี้ยงต้นอ่อน (endrosperm) และคัพภะ (embryo) ที่ใช้สำหรับการขยายพันธุ์ กะลาเป็นส่วนที่แข็ง มีความหนาบางแตกต่างกันตามลักษณะประจำพันธุ์ โดยปกติเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันมีกลไกการพักตัวจาก 2 ส่วนคือ การพักตัวเนื่องจากกะลาที่แข็ง และการพักตัวจากเนื้อผลชั้นใน การแก้การพักตัวทำโดยการอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50-90 วัน แช่น้ำ 7 วัน เพาะเมล็ดในห้องเพาะอีก 30-45 วัน จากนั้นคัดเมล็ดพันธุ์ที่สมบรูณ์ลงแปลงเพาะชำ (ธีระ และคณะ, 2548) หากปล่อยให้งอกตามสภาพธรรมชาติที่เปอร์เซ็นต์ความงอก 50 เปอร์เซ็นต์ จะต้องใช้เวลานาน 3-6 เดือน ในการเพาะเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันอาจได้ต้น 1-3 ต้นต่อเมล็ด (ปกติได้เพียง 1 ต้น) อย่างไรก็ตามการที่จะได้มาซึ่งปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูง ต้องผ่านการปรับปรุงพันธุ์เป็นระยะเวลานาน 10 ปี อีกทั้งไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์จากโคนต้นมาปลูกได้ เนื่องจากมีความแปรปรวนสูง โดยเฉพาะลักษณะของผลปาล์ม ซึ่งมีการการกระจายตัวในลูกรุ่น F2 จากการผสมตัวเอง (ได้พันธุ์ดูร่า เทเนอร่า และฟิสิเฟอร่าในอัตราส่วน 1:2:1) จึงไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ อีกทั้งเมล็ดที่ได้ยังไม่เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกรที่ต้องการปลูกปาล์มน้ำมันเพิ่มสูงขึ้นในปัจจุบัน นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์หรือต้นพันธุ์จากต่างประเทศไม่เหมาะกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทย และยังเสี่ยงต่อโรค และแมลงที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้า อีกทั้งยังมีราคาแพง (สุจินต์ และคณะ, 2530) ดังนั้นการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยจะทำให้สามารถขยายพันธุ์ และเพิ่มปริมาณต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีได้ทันกับความต้องการของเกษตรกร

อย่างไรก็ตามปาล์มน้ำมันที่ปลูกด้วยเมล็ดพันธุ์ในปัจจุบันให้ผลผลิตเฉลี่ยเพียง 2-2.5 ตันต่อไร่ และไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ใต้ต้นไปขยายพันธุ์ได้ เนื่องจากเป็นพันธุ์ทาง ส่วนเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าอาจเป็นเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ดี เนื่องจากความผิดพลาดในการผลิตเมล็ดพันธุ์หรือการ

ปลอมปนโดยตั้งใจ แม้จะมีการคัดเลือกและปลูกด้วยเมล็ดพันธุ์ดีก็ตามผลผลิตก็ยังคงต่ำเฉลี่ยไม่เกิน 3 ตันต่อไร่ ปัจจุบันได้มีการคัดเลือกลูกผสม D (ดูร่า) x P (ฟิสิเฟอร่า) ที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูงมากกว่า 5 ตันต่อไร่ นับเป็นการเพิ่มผลผลิตปาล์มน้ำมันในสภาพพื้นที่เพาะปลูกที่จำกัด แม้ว่าจะมีบริษัทพยายามผลิตลูกผสมพันธุ์เทเนอร่าออกจำหน่ายให้กับเกษตรกร แต่ยังไม่มีการรับ ประกันว่าเป็นพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูง และยังคงเก็บเมล็ดใต้โคนต้นมาเพาะเพื่อจำหน่ายต้นพันธุ์ในราคาถูก (สมปอง, 2544) และที่สำคัญเมล็ดปาล์มน้ำมันเมื่อสุกแก่จะมีการพักตัว เมื่อนำมาเพาะต้องใช้เวลานานกว่าเมล็ดจะงอก ทำให้ต้องผ่านกระบวนการเตรียมหลายขั้นตอน อีกทั้งคู่ผสมที่ดีมีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำเพียง 20-30 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีกะลาที่หนามาก จึงไม่สามารถที่จะผลิตทางการค้าได้

ปัจจุบันการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยไม่อาศัยเพศผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิธีซึ่งกำลังเป็นที่นิยมในการขยายพันธุ์พืชจากชิ้นส่วนของเซลล์ร่างกาย โดยมีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันตั้งแต่ปี 1970 ซึ่งเป็นการขยายพันธุ์โดยใช้เนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของปาล์มน้ำมัน ส่วนใหญ่เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์เทเนอร่าซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า โดยข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันคือ ได้ต้นกล้าจำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น ต้นกล้าที่ได้มีลักษณะเหมือนต้นแม่เดิมทุกประการ เช่น ผลผลิตต่อไร่ เปอร์เซ็นต์น้ำมัน เป็นต้น (สมปอง, 2539) มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันโดยใช้ชิ้นส่วนราก (Wooi, 1995) ใบอ่อน (สมปอง และคณะ, 2547) ช่อดอก (teixeira *et al*., 1994) และคัพภะ (Te-chato,1998a; Kanchanapoom and Domyoas, 1999) หลังจากได้ต้นขนาดเล็กแล้วนำไปอนุบาลในแปลงเพาะชำ กระบวนการสร้างพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 2 กระบวนการ คือ เอ็มบริโอเจนีซีส และออกาโนจีนีซีส ซึ่งพืชต้นใหม่ที่เกิดขึ้นอาจเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง หรือเกิดจากแคลลัส กระบวนการเอ็มบริโอจีนีซีสทำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่โดยมีการพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ เหมือนกับเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมพันธุ์ด้วยวิธีปกติ เรียกเอ็มบริโอที่มีพัฒนาการมาจากเซลล์ร่างกายว่า โซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo: SE) หรือเอ็มบริออยด์ (embryoid) การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถทำได้โดยการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 (primary somatic embryo: SE) และโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (secondary somatic embryo: SSE) ซึ่งนับวันเริ่มจะมีบทบาทมากขึ้น โดย Te-chato (1998a) ผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำนวนมาก จากการเพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันสายต้นเทเนอร่าผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซีส และเมื่อนำไปปลูกในแปลงพบลักษณะเด่นคือให้ผลผลิตทะลายสดสูง มีจำนวนช่อดอกตัว

เมียสูง 8-12 ช่อต่อปี ภายใต้การปลูกที่ไม่มีการให้น้ำและปุ๋ย และไม่พบอาการผิดปกติเกิดขึ้น Te-chato และคณะ (2002) สามารถร่นระยะเวลาในขั้นตอนการชักนำแคลลัสเริ่มแรก (primary callus: PC) และชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (embryogenic callus: EC) จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่าต้นโตที่ให้ผลผลิตสูงในเขตจังหวัดสงขลา ตรัง และกระบี่ ซึ่งสามารถชักนำต้นกล้าภายในเวลา 1 ปี 6 เดือน ถึง 1 ปี 8 เดือน จากเดิม 3-4 ปี และเมื่อนำไปปลูกในแปลงพบว่าเหมือนต้นแม่ทุกประการ Te-chato และ Hilae (2007) ขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีจำนวนมากผ่านการสร้าง SSE โดยเพิ่มจาก SE ซึ่งกระบวนการดังกล่าวสามารถขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันสายต้นพันธุ์ดีในเชิงพาณิชย์ได้ นอกจากนี้การดัดแปลงการเพาะเลี้ยงคัพภะแล้วชักนำ SE และ SSE จึงเป็นวิธีการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าที่มีคุณภาพดีได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นแนวทางสำคัญในการผลิตต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดี เพื่อเพิ่มศักยภาพในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลทั้งระบบในอนาคต ในการศึกษานี้จึงได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสร้างแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส/โซมาติกเอ็มบริโอ ได้แก่ ผลของคู่ผสม สารควบคุมการเจริญเติบโต และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตระดับต่าง ๆ และความเข้มแสง ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำ SSE และการงอกของต้นอ่อน ได้แก่ ระยะพัฒนาการ และขนาดโซมาติกเอ็มบริโอ แหล่งคาร์บอน และระดับความเข้มข้นของ GA_3 ผลของผงถ่านและการเติมอาหารเหลว และการลดความชื้น นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบความแปรปรวนของเนื้อเยื่อในระยะแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และต้นกล้า โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR เพื่อยืนยันว่าต้นใหม่ของปาล์มน้ำมันที่ได้มีลักษณะตรงตามพันธุ์ที่ต้องการ (true-to-type)

ตรวจเอกสาร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงได้แก่ ใบอ่อน คัพภะ และราก (Duval *et al*., 1995) การเพาะเลี้ยงรากไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากการเพาะเลี้ยงรากมักประสบปัญหาการปนเปื้อนของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง ส่วนการเพาะเลี้ยงช่อดอกมีวิธีการแยกชิ้นส่วนออกมาเพาะเลี้ยงซึ่งทำได้ยาก ทำให้

ได้รับความเสียหายและเกิดสีน้ำตาล หรือออกซิเดชันจำนวนมาก นอกจากนี้เซลล์ในช่อดอกมีทั้งเซลล์ร่างกายและเซลล์เพศ ดังนั้นต้นที่ได้อาจมีความแปรปรวน การเพาะเลี้ยงใบอ่อนอาจทำให้ต้นแม่ได้รับความเสียหายและยุ่งยาก ดังนั้นการเพาะเลี้ยงคัพภะจึงเป็นวิธีที่สะดวกในการเก็บตัวอย่างมากกว่าชิ้นส่วนอื่น และน่าจะมีการตอบสนองได้เร็วกว่าเนื่องจากเป็นต้นอ่อนอยู่แล้ว อีกทั้งยังสามารถร่นระยะเวลาในการงอก ช่วยชีวิตลูกผสม และยังเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากอย่างต่อเนื่องผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซีส การเพาะเลี้ยงคัพภะ คือ การนำเอาคัพภะ หรือต้นอ่อนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากการปฏิสนธิของละอองเกสร และไข่อ่อน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เพื่อส่งเสริมการงอกเป็นต้นกล้าโดยตรงหรือเกิดผ่านแคลลัส ซึ่งมีประโยชน์ในการแก้ไขปัญหาอัตราการงอกของเมล็ดที่ต่ำ หรือเป็นการช่วยชีวิตเมล็ดลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุลที่ยากต่อการเจริญเติบโต และพัฒนาในสภาพธรรมชาติ รวมทั้งแก้ไขปัญหาการพักตัวที่ยาวนานของเมล็ดพืชบางชนิด (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่มที่ 28, 2547 อ้างโดย ซูไฮมิน, 2551) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงคัพภะยังช่วยขยายพันธุ์โดยการชักนำให้คัพภะสร้างยอดจำนวนมาก หรือชักนำแคลลัสเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ได้ มีรายงานการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงคัพภะโดย Hussey (1958) รายงานการพักตัวของเมล็ดปาล์มน้ำมันอันเนื่องมาจากปัจจัยในเนื้อผล (kernel factor) ดังนั้นการเพาะเมล็ดต้องผ่านกระบวนการ stratification ก่อนนำไปเพาะปลูก Rabechault และ Martin (1976) ตัดแยกคัพภะปาล์มน้ำมันออกมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมออกซิน พบว่า สามารถส่งเสริมการงอกได้ อย่างไรก็ตามก่อนเพาะเลี้ยงคัพภะต้องผ่านการเตรียมด้วยวิธีการที่เหมาะสม เจริญ และคณะ (2532) เพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันเพื่อแก้การพักตัว ชักนำการสร้างต้นอ่อนมากกว่า 1 ต้น (polyembryony) และผลิตต้นกล้าเพื่อใช้ใบเป็นแหล่งในการแยกโปรโตพลาสต์ Te-chato (1998a) ผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำนวนมาก จากการเพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันจากต้นแม่เทเนอร่าผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส และพบว่าต้นที่ได้ไม่มีความผิดปกติของลักษณะทางสัณฐานแต่อย่างใด เมื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมพบว่าเหมือนต้นเดิมคือ 2n=2x=32 Rajesh และคณะ (2003) ชักนำแคลลัสจากคัพภะปาล์มน้ำมันลูกผสมระหว่าง 281(D)x18(P) ที่ได้มาจาก Regional Station, National Research Centre for Oil Palm, Palode, Kerala ประเทศอินเดีย พบว่า สามารถชักนำแคลลัสภายหลังการเพาะเลี้ยง 4-5 สัปดาห์ แคลลัสที่ได้มีสีขาวและมีลักษณะเป็นแคลลัสที่เกาะกันอย่างแน่น เมื่อได้แคลลัสแล้วจึงชักนำพืชต้นใหม่ต่อไป

1. ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำแคลลัส

แคลลัสเป็นเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) เพียงชนิดเดียว ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก (รังสฤษดิ์, 2541) เกิดจากการนำชิ้นส่วนพืชมาวางเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม และเนื้อเยื่อนั้นเกิดการพัฒนาซ่อมแซมตัวเองเกิดเป็นแคลลัสแบบต่าง ๆ ทั้งนี้การที่จะพัฒนาเป็นแคลลัสแบบใดนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง รวมถึงสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงเป็นหลัก โดยอาจแบ่งปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแคลลัส รวมถึงการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ออกได้เป็น 3 ปัจจัยหลักคือ ปัจจัยทางชีวภาพ เคมี และกายภาพ

1.1 ปัจจัยทางชีวภาพ

ปัจจัยทางชีวภาพในที่นี้ได้แก่ พันธุกรรมหรือจีโนไทป์ ชนิด และชิ้นส่วนพืช ระยะพัฒนาการทางสรีรวิทยาของพืช เป็นต้น พันธุกรรมหรือจีโนไทป์ของพืชที่แตกต่างกัน ย่อมมีผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมัน ทั้งนี้เนื่องจากแต่ละเมล็ดมีจีโนไทป์ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีการตอบสนองต่ออาหารและสารควบคุมที่แตกต่างกัน Steinmacher และคณะ (2007) รายงานว่า พันธุกรรมที่แตกต่างกันในพืชปาล์ม (peach palm) มีผลต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองแตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงดอกอ่อนจากต้นแม่ที่ได้รับการผสมจากละอองเกสรพันธุ์ที่ 1 บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้การพัฒนาของดอกได้สูงกว่าพันธุ์ที่ 2 ในขณะที่การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอเกิดขึ้นน้อยกว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ Eugene และคณะ (2006) ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ LMC 022 (DA115D x LM2T) LMC 051 (LM 2 T x DA8D) LMC 074 (LM452T x UR6D) และ LMC 088 (LM10T x DA28D) พบว่าพันธุ์ LMC 051 ให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดเฉลี่ย 2.32 เปอร์เซ็นต์ Karun และคณะ (2004) ศึกษาการตอบสนองต่อการชักนำแคลลัส ที่แตกต่างกันของหมาก 3 พันธุ์ คือพันธุ์ Mangala Sumangala และ Mohitnagar โดยนำชิ้นส่วนดอกจากต้นอายุ 12 ปี มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D หรือ dicamba (3,6-Dichloro-

2-methoxybenzoic acid) หรือ picloram (4-amino-3,5,6-trichloro picolinic acid) เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า พันธุ์ Sumangala ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 30 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอีก 2 พันธุ์ คือพันธุ์ Mangala และ Mohitnagar ซึ่งให้การสร้างแคลลัส 15 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ Eshraghi และคณะ (2005) รายงานว่า พันธุ์ที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอของอินทผลัม โดยชิ้นส่วนปลายยอดของอินทผลัมต้นโตอายุ 3-4 ปี 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ Khanizi และ Mordarsing ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสแตกต่างกัน พันธุ์ Khanizi ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารเติม 2,4-D ความเข้มข้น 453 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2iP (isopentenyl adenine) ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ และ BAP (6-benzylaminopurine) ความเข้มข้น 13 ไมโครโมลาร์ โดยเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีระยะพัฒนาการต่าง ๆ คือ ระยะรูปกลม หัวใจ ทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง เมื่อย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA (α-naphthylacetic acid) ความเข้มข้น 54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2iP ความเข้มข้น 148 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ ในขณะที่พันธุ์ Mordarsing ส่วนใหญ่ให้การสร้างแคลลัสที่ไม่มีเอ็มบริโอ หรือมีการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบางส่วน แต่พัฒนาการของเอ็มบริโอหยุดพัฒนาในระยะรูปกลม จึงไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้

ระยะพัฒนาการของชิ้นส่วนพืชมีผลต่อความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเช่นกัน Perera และคณะ (2006) รายงานการชักนำแคลลัสจากรังไข่ของดอกมะพร้าวระยะ 4 5 และ 6 เดือนก่อนดอกบาน พบว่า การชักนำแคลลัสจากรังไข่ระยะ 4 เดือน ก่อนดอกบานให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 30 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 5 และ 6 เดือนก่อนดอกบาน โดยให้การสร้างแคลลัส 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Teixeira และคณะ (1993) รายงานการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอายุ 77 91 100 114 128 140 และ 193 วันหลังการผสมเกสรและคัพภะที่สุกแก่เต็มที่ พบว่า อายุของคัพภะที่แตกต่างกันส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัสและลักษณะแคลลัสที่แตกต่างกัน โดยคัพภะอายุ 193 วันหลังการผสมเกสร ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 93 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่คัพภะอายุ 91 วันหลังการผสมเกสร ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 29 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังรายงานอีกว่า คัพภะที่อ่อนให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอน้อยกว่าคัพภะสุกแก่ Karun และ Sajini (1996) ชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่าอายุ 18 เดือน และดูร่าอายุ 6 เดือน พบว่า พันธุ์และอายุของต้นพันธุ์ที่แตกต่างกันให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสที่แตกต่างกัน โดยพันธุ์เทเนอร่าให้การสร้างแคลลัส 7

เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยง 150-180 วัน และพันธุ์ดูร่าให้การสร้างแคลลัส 10 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยง 100-120 วัน

1.2 ปัจจัยทางเคมี

ปัจจัยทางเคมีถือเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการชักนำแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอเป็นอย่างยิ่ง โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีด้วยกันหลายสูตร การนำมาใช้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมกับชนิด และชิ้นส่วนของพืช รวมถึงพันธุ์พืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนองค์ประกอบของสูตรอาหาร และการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับที่เหมาะสม เนื้อเยื่อพืชจะมีการแบ่งเซลล์พัฒนาเป็นแคลลัส ในขณะที่สารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชมีการตอบสนองต่อรูปแบบการสร้างแคลลัสที่แตกต่างกันออกไป (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2553) ซึ่งสารเคมีดังกล่าวถือเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการชักนำแคลลัส รวมถึงความสามารถในการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอด้วย โดยรูปแบบการสร้างแคลลัสเริ่มแรกถือว่ามีความสำคัญต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นจึงควรเลือกองค์ประกอบของสูตรอาหาร รวมถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช เพื่อผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น ๆ

1.2.1 สูตรอาหาร

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมันที่นิยมมีด้วยกัน 2 สูตรคือ Y_3 (Eeuwens, 1978) และ MS (Murashige and Skoog, 1962) ทั้งนี้ขึ้นกับชิ้นส่วนที่นำมาเพาะลี้ยง ด้วย สมปอง และคณะ (2530) ทำการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่าจากต้นกล้าอายุ 195 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงโดยตัดใบอ่อนสีขาวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ปรับระดับความเป็นกรดด่าง 5.7 พบว่า สามารถชักนำแคลลัสที่เจริญเติบโตช้า (Slow growing callus: SGC) บริเวณรอยตัดขอบใบ 40 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน Tisserat (1982) ชักนำน้ำหนักสดของแคลลัสอินทผลัมบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 1.47 และ 1.18 กรัม ตามลำดับ

Eshraghi และคณะ (2005) ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของอินทผลัมบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 453 ไมโครโมลาร์ 2iP ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ และ BAP ความเข้มข้น 13 ไมโครโมลาร์ ให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอของอินทผลัมพันธุ์ Khanizi สูงสุด

สำหรับสูตรอาหาร Y_3 นั้น Sogeke (1996) รายงานการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันโดยการนำแคลลัสเริ่มแรกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง Y_3 เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนตินความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Saenz และคณะ (2006) รายงานการชักนำแคลลัส และเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมะพร้าวบนอาหารสูตร Y_3 เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.65 มิลลิโมลาร์ และชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของมะพร้าวบนอาหารสูตร Y_3 เติม 2,4-D ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ และ BA (6-benzyladenine) ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ให้ผลดีที่สุด

1.2.2 **สารควบคุมการเจริญเติบโต**

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในช่วงแรกนั้นได้จากการนำต้นแม่ที่ไม่ได้รับการคัดเลือก และไม่มีการประเมินผลผลิตในแปลงปลูก มาเพาะเลี้ยงทำให้ผลผลิตของปาล์มน้ำมันที่ได้ต่ำ (Corley *et al*., 1986) รวมทั้งมีการกลายพันธุ์ของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งหากพิจารณาสาเหตุการกลายพันธุ์ที่สำคัญ พบว่า เกิดจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นสูงในช่วงของการชักนำการสร้างแคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่น ซึ่งมีรายงานว่าเกิดจากการใช้ 2,4-D ความเข้มข้นสูงถึง 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Teixeria *et al*., 1995; Aberlence-Bertossi *et al*., 1999) Te-chato (1998b) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยการใช้ NAA ความเข้มข้นตั้งแต่ 15 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 60 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสที่ชักนำบนอาหารเติม NAA เกิดเร็วกว่าแคลลัสที่ชักนำบนอาหารเติม 2,4-D ลักษณะของแคลลัสที่ได้แตกต่างกัน NAA ให้การสร้างแคลลัสสีเขียว และบางส่วนเกิดเป็นอวัยวะหรือออร์กาโนเจเนซิส ในขณะที่ 2,4-D ให้การสร้างแคลลัสสีเหลืองชนิดปมเกาะกันแน่น เมื่อย้ายแคลลัสจากอาหารเติม NAA ไปเลี้ยงบนอาหารที่ลดความเข้มข้นของ NAA ลง แคลลัสมีการ

เจริญเติบโตและพัฒนาเป็นสีน้ำตาลในที่สุด แต่เมื่อย้ายแคลลัสสีเขียวลงในอาหารที่ลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลง แคลลัสกลายเป็นสีเหลืองชนิดเกาะกันแน่น ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารเติม 2,4-D เมื่อลดความเข้มข้นลงเหลือ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การเพิ่มปริมาณและพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในขณะเดียวกันแคลลัสที่ย้ายเลี้ยงบนอาหารเติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเสทความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้เร็ว เมื่อย้ายโซมาติกเอ็มบริโอไปเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสทและกรดแอสคอร์บิค พบว่า ส่งเสริมการสุกแก่ของโซมาติกเอ็มบริโอ หรือโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยง (haustorium embryo: HE) ซึ่งเกิดขึ้นบนอาหารที่เติม dicamba มากกว่าอาหารที่เติม 2,4-D นอกจากนี้การใช้ dicamba สามารถร่นระยะเวลาในการชักนำแคลลัส และการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอได้ถึง 18 เดือน

สมปอง และคณะ (2547) รายงานการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี ในอาหารสูตร MS โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ dicamba หรือ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1 2.5 5 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยง 3 เดือน พบว่า dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 15 เปอร์เซ็นต์ ส่วน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัส 2.78 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ NAA มีประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสต่ำสุดเพียง 1.67 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น นอกจากนี้ยังศึกษาผลของความเข้มข้นของ dicamba ต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมหรือไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยง 3 เดือน พบว่า dicamba ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเสทให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ อาหารเติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีเคซีนไฮโดรไลเสทให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 56.41 เปอร์เซ็นต์ Wang และคณะ (2003) รายงานว่า dicamba ความเข้มข้น 18.1 ไมโครโมลาร์ ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 91.6 เปอร์เซ็นต์ จากการเพาะเลี้ยงคัพภะของหมากจากผลระยะสุกแก่บนอาหารสูตร MS หลังจากเพาะเลี้ยง 60 วัน Chehmalee และ Te-chato (2007) เพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร MS โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดออกซิน คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D หรือ dicamba ที่ระดับความเข้มข้นอย่างละ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า dicamba ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 54.44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 2,4-D

และ NAA ให้การสร้างแคลลัส 37.47 และ 1.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ dicamba ชักนำแคลลัสขนาดใหญ่และให้รูปแบบแคลลัสแบบปมจำนวนมาก

Karun และคณะ (2004) รายงานการชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนดอกของหมาก 3 พันธุ์คือ พันธุ์ Mangala Sumangala และ Mohitnagar โดยเปรียบเทียบการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 68 มิลลิโมลาร์ dicamba ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ และ picloram ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ พบว่า picloram ทั้งสองความเข้มข้นให้การสร้างแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด และเกิด browning มากที่สุด 92.53 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ 2,4-D ให้การสร้างแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอเช่นเดียวกัน และเกิด browning น้อยที่สุด Tisserat (1982) เปรียบเทียบการใช้ p-CPA (p-chlorophenoxyacetic acid) NAA หรือ 2,4- D ความเข้มข้น 0 0.1 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า NAA ความเข้มข้น 1 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 1.47 และ 1.18 มิลลิกรัมต่อการวางเลี้ยง ตามลำดับ

1.3 ปัจจัยทางกายภาพ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสมีความแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด และชิ้นส่วนพืชเป็นสำคัญ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการต่อการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีคือ 28±0.5 องศาเซลเซียส (อาสลัน, 2545) ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าวส่งผลให้ชิ้นส่วนมีการสร้างแคลลัสได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส Avril และคณะ (1986) รายงานว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันอยู่ระหว่าง 25-27 องศาเซลเซียส Masanori และ Nilshino (1999) รายงานผลของอุณหภูมิและความเข้มแสงต่อน้ำหนักหัว การงอกใบ และรากของ *Fritillaria camtschatcensis* Ker-Gawl. โดยนำชิ้นส่วนหัวมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 15 20 และ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 40 150 300 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที และวางเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่า การวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 150 และ 300 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที สามารถเพิ่มน้ำหนักหัว การงอกใบ และการสร้างรากได้สูงสุด (ไม่แสดงข้อมูล) และการวางเลี้ยงหัวในที่มืดไม่สามารถเพิ่มน้ำหนักหัว และการงอกใบได้ (ไม่แสดงข้อมูล) Ouyang และคณะ (2003) รายงานว่าความเข้มแสงมีผล

ต่อพัฒนาการของแคลลัสของ *Cistanche deserticola* โดยให้น้ำหนักแห้งและการสร้างสาร phenylethanoid glycosides (PeG) หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 (Gibberellic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง 24 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 30 วัน โดยให้น้ำหนักของแคลลัส 15.5 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร และผลผลิตของ PeG 1.7 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพของแสง (สีของแสงที่ใช้เพาะเลี้ยง) พบว่า การให้แสงสีน้ำเงิน (ความยาวช่วงคลื่น 435 นาโนเมตร) ให้น้ำหนักแห้งสูงสุด 18.4 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร และ PeG 2.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับแสงสีขาว

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำ SSE และการงอก

การขยายพันธุ์ด้วยโซมาติกเอ็มบริโอเป็นการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศที่มีความสำคัญของพืชหลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีตามปกติที่ทำได้ยาก (Stasolla and Yeung, 2003) แม้จะมีประสิทธิภาพในการผลิตต้นกล้าในปริมาณมากก็ตาม แต่สำหรับการขยายพันธุ์ด้วยโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 ยังคงมีน้อย ต่อมาได้มีการศึกษาการใช้โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 ซึ่งเป็นโซมาติกเอ็มบริโอใหม่ที่เกิดจากโซมาติกเอ็มบริโอเดิมสามารถเพิ่มปริมาณจำนวนพืชได้มากกว่าการใช้โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 (Hilae and Te-chato, 2005) มีรายงานการประสบผลสำเร็จจากการชักนำผ่านโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 ในพืชหลายชนิดทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น ปาล์มน้ำมัน (อาสลัน และสมปอง, 2545) มันสำปะหลัง (Stamp and Henshaw, 1987) และทานตะวัน (Vasic *et al*., 2001) เป็นต้น ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการชักนำ SSE และการงอกประกอบด้วยปัจจัยทางชีวภาพ ทางเคมี และกายภาพ โดยเฉพาะปัจจัยทางด้านเคมี ได้แก่ แหล่งคาร์บอน สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น

2.1 ปัจจัยทางชีวภาพ

ชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกันให้ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตกต่างกัน เนื่องจากแหล่งของชิ้นส่วนพืชรวมถึงอายุของพืชที่แตกต่างกัน ย่อมมีกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญที่แตกต่างกัน และให้ผลสำเร็จในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่แตกต่างกันไปด้วย Duong และคณะ (2001) รายงานการเพาะเลี้ยงหัวของลิลลี่ (*Lilium longiflorum*) โดยตัดให้มีขนาดที่แตกต่างกันคือ 0.5 1 2 และ 3 มิลลิเมตร พบว่า การตัดชิ้นส่วนให้มีขนาด 1 มิลลิเมตร ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด 4.1 ยอดต่อชิ้นส่วน เมื่อพิจารณาตำแหน่งของชิ้นส่วนพบว่า การตัดให้มีขนาด 1 มิลลิเมตร จำนวน 7 ชิ้น จากยอดลงมา พบว่า ชิ้นส่วนที่ 1 ให้จำนวนต้นต่อชิ้นส่วนสูงสุด 5.8 ต้นต่อชิ้นส่วน และลดลงเมื่อชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงห่างจากปลายยอดมากขึ้น ธนวดี (2551) ศึกษาผลของพันธุกรรมและขนาดของ HE ต่อการสร้าง SSE ของปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่าพบว่า HE ขนาด 11 และ 13 มิลลิเมตร ของสายต้นเทพา และ HE ขนาด 8 และ 10 มิลลิเมตร ของสายต้นกระบี่ ให้การสร้าง SSE สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจำนวน SSE เฉลี่ยต่อHE พบว่า สายต้นเทพาให้จำนวน SSE เฉลี่ยสูงกว่าสายต้นกระบี่ Teixeira และคณะ (1993) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงคัพภะอายุ 193 วันหลังผสมเกสร ให้การพัฒนาของยอดโดยไม่มีราก นอกจากนี้ยังรายงานอีกว่าคัพภะที่สุกแก่ให้การงอก และพัฒนาของยอดได้มากกว่าคัพภะอ่อน

2.2 ปัจจัยทางเคมี

ปัจจัยที่ถือว่ามีความสำคัญในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอคือ สภาพความเครียดจากการใช้สารเคมี โดยเฉพาะชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ Rajesh และคณะ (2003) ใช้สารเคมี polyamine ในการส่งเสริมพัฒนาการของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันพบว่า อาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ putrescine ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ SSE การงอก การสร้างยอด และการสร้างรากสูงสุด นอกจากน้ำตาลจะมีผลต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอแล้ว ยังมีผลต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโออีกด้วย น้ำตาลซูโครสจัดเป็นแหล่งของคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ซึ่งในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงแตงเทศพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอคือ 200 มิลลิโมลาร์ (Nakagawa *et al*., 2001) Lou และ Kako

(1995) รายงานว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง (250 และ 500 มิลลิโมลาร์) ส่งเสริมกระบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเพิ่มขึ้น โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่เหมาะสมร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอลหรือกลูโคส David และ Wayne (2001) เติมซอร์บิทอลในอาหารชักนำการงอกของถั่วลิสง พบว่า ส่งเสริมการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอเพิ่มขึ้น 2 เท่า ในขณะที่อาหารที่เติมแมนนิทอลเพียงอย่างเดียวไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ และทำให้เกิดความผิดปกติของลำต้นใต้ใบเลี้ยงอีกด้วย Lou และ Kako (1995) ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของแตงกวา จากการวางเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำจากใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ร่วมกับแมนนิทอลหรือกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าความเข้มข้นของแมนนิทอลหรือกลูโคสที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อจำนวน และเปอร์เซ็นต์ของเอ็มบริโอที่มีทั้งขั้วรากและยอด (bipolar embryo) โดยความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสยิ่งสูงขึ้นส่งเสริมให้จำนวนและเปอร์เซ็นต์โซมาติกเอ็มบริโอที่มีทั้งขั้วรากและยอดเพิ่มขึ้น

สมปอง (2539) และ Wilson และคณะ (1996) รายงานผลของน้ำตาลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่า เป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์แสงของพืช นิยมเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และที่สำคัญใช้ในกระบวนการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ Paiva และ Otoni (2003) รายงานว่าน้ำตาลแต่ละชนิดยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมติกโพเทนเชียล และค่าความเป็นกรดด่างในอาหารซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของพืชอีกด้วย

น้ำตาลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิดด้วยกันคือ ซูโครส กลูโคส ฟรุคโทส นอกจากนี้ยังใช้น้ำตาลที่อยู่ในรูปของแอลกอฮอล์คือ แมนนิทอล และซอร์บิทอล (Lou and Kako, 1995; Mamiya and Sakamoto, 2000; Nakagawa *et al*., 2001; Paiva and Otoni, 2003) ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอนั้น อาจจะใช้น้ำตาลเพียงชนิดเดียว หรือใช้หลายชนิดร่วมกันก็ได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เพาะเลี้ยง Mamiya และ Sakamoto (2000) รายงานการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของหน่อไม้ฝรั่งบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุคโทส ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า น้ำตาลทั้งสามชนิดส่งเสริมให้โซมาติกเอ็มบริโอมีการพัฒนาของยอดและราก แต่มีการเจริญของรากมากกว่ายอด การใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้การเจริญของรากเพิ่มขึ้นด้วย ในขณะที่การเจริญของยอดลดลง นอกจากน้ำตาลแล้วองค์ประกอบของธาตุอาหาร และองค์ประกอบของสูตรอาหารก็เป็นสิ่งที่

จำเป็นต่อการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอเช่นกัน Hilae และ Te-chato (2005) ศึกษาความเข้มข้นขององค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS 3 ระดับคือ 1/2 หรือ 1/5 และสูตรปกติร่วมกับน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส ฟรุกโทส แมนนิทอล หรือซอร์บิทอล ความเข้มข้น 0.1-0.3 โมลาร์ เพื่อชักนำการงอก หรือการสร้างยอด และรากของ HE พบว่า อาหารสูตร MS ปกติเติมซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ส่งเสริมการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ โดยให้การสร้างยอดเฉลี่ย 2.75 ยอดต่อชิ้นส่วน Te-chato และ Hilae (2007) รายงานว่าสูตรอาหาร MS ร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำการสร้าง SSE จาก HE ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 21.55 SSE/HE เมื่อย้าย SSE ที่ชักนำได้ในสูตรอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 3 เดือน ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปกติ ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำการงอก พบว่า SSE สามารถงอกได้ถึง 78 เปอร์เซ็นต์ และให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ 35.71 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน Kumria และคณะ (2003) รายงานการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของฝ้ายพบว่า องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS ปกติให้การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 70 เปอร์เซ็นต์ การลดความเข้มข้นองค์ประกอบของอาหารลงครึ่งหนึ่ง และหนึ่งในห้าเท่าของสูตรปกติ ส่งผลให้การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอลดลงเหลือ 40-50 เปอร์เซ็นต์ Levi และ Sink (1990) อ้างโดย Mamiya และ Sakamoto (2000) รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสมีผลส่งเสริมการเจริญของราก น้ำตาลฟรุคโทสส่งเสริมการพัฒนาของยอด ส่วนน้ำตาลซูโครสส่งเสริมการพัฒนาทั้งรากและยอด ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้กล่าวข้างต้นพบว่าน้ำตาลซูโครสจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยน้ำตาลดังกล่าวแม้จะผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในขั้นตอนของการเตรียมอาหารแล้วก็ตาม แต่ยังสามารถรักษาระดับความเป็นกรดด่างได้ใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรดด่างก่อนการนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร ส่วนการเติมน้ำตาลกลูโคสส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงจาก 5.70 เป็น 4.65 (Borges and Wagner, 2003) การชักนำการงอกของ SSE สามารถประยุกต์ใช้ได้กับพืชทุกชนิด มีรายงานการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันบนอาหารเหลวสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร (Te-chato, 1998b) หรือเพาะเลี้ยงบนอาหาร 2 ชั้น โดยชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร MS เติมผงถ่าน 0.25 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกัน แต่ลดองค์ประกอบของสูตรอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม NAA และ BA ความเข้มข้นเดียวกันกับอาหารเหลวข้างต้น สามารถชักนำรากปาล์มน้ำมันในอาหารสูตรเดียวกันนี้ 73 เปอร์เซ็นต์ (Te-chato and Muangkaewngam, 1992)

2.3 ปัจจัยทางกายภาพ

การลดความชื้นบางส่วนให้กับโซมาติกเอ็มบริโอก่อนการชักนำการงอกช่วยส่งเสริมให้โซมาติกเอ็มบริโองอกได้มากขึ้น Leal และคณะ (1995) รายงานการลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงกว่าการไม่ลดความชื้น ทั้งนี้เนื่องจากการลดความชื้นสัมพัทธ์ของโซมาติกเอ็มบริโอไปมีผลทำให้การสร้างโปรตีนสะสมที่เรียกว่าเบตาโคนิเฟอรินลดลง หากโปรตีนดังกล่าวมีปริมาณมากส่งผลให้โซมาติกเอ็มบริโอไม่พัฒนาเข้าสู่ระยะสุกแก่ จากการวางเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารที่เติม ABA (abscisic acid) และ PEG (polyethylene glycol) แล้วนำมาตรวจสอบปริมาณสารโคนิเฟอรินด้วยเทคนิค Northern blot เปรียบเทียบกับไซโกติกเอ็มบริโอปกติ พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติม ABA มีปริมาณโปรตีนดังกล่าวสูงกว่าอาหารที่เติม PEG ส่วนอาหารที่ไม่เติมทั้ง ABA และ PEG มีปริมาณโปรตีนต่ำสุด เมื่อลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอก่อนชักนำการงอกพบว่าปริมาณสารโคนิเฟอรินลดลง ส่งผลให้โซมาติกเอ็มบริโองอกได้ Find (1997) นำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นของสนนอร์เวย์สปรูซที่ชักนำการสุกแก่ในอาหารเติม BA ความเข้มข้น 15 และ 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับการเติมหรือไม่เติม PEG ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มาลดความชื้นบางส่วนโดยการนำโซมาติกเอ็มบริโอมาวางในจานเพาะเลี้ยงที่รองด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 54) จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงดังกล่าวไปวางในโถดูดความชื้นที่เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 0 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ แล้วนำเอ็มบริโอที่ผ่านการลดความชื้นตามระยะเวลาข้างต้นมาชักนำการงอกในจานเพาะเลี้ยงที่รองด้วยกระดาษกรองเติมอาหารเหลวสูตรชักนำการงอกปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 20 องศาเซียลเซียส ให้แสง 20 ชั่วโมงต่อวันพบว่า การลดความชื้นบางส่วนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด สำหรับโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่ได้ผ่านการลดความชื้นไม่สามารถงอกได้เลย

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นจะเห็นได้ว่าการเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอมีปัจจัยที่สำคัญ 3 ปัจจัยหลักด้วยกันคือ ปัจจัยทางชีวภาพ (แหล่งของ SE/SSE) ปัจจัยทางเคมี (น้ำตาล องค์ประกอบของอาหาร ผงถ่าน) และปัจจัยทางกายภาพ (ความชื้น) การประยุกต์ปัจจัยดังกล่าวเพื่อการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีคุณภาพดีจำนวนมากในเชิงพาณิชย์ จากการเพาะเลี้ยงคัพภะลูกผสมที่ให้ผลผลิตสูง (มากกว่า 5 ตันต่อไร่) จึงมีความเป็นไปได้สูงมาก

3. การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิค SSR

การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายในหลอดทดลองก่อให้เกิดความแปรปรวนในพืชหลายชนิด ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นอาจเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการ หรือต้องการเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต (Karkonen, 2001) ความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือที่เรียกว่า somaclonal variation เป็นการกลายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือชิ้นส่วนพืชที่ไม่เกี่ยวกับเพศแล้วก่อให้เกิดการกลายพันธุ์จนได้พืชที่มีลักษณะใหม่ขึ้นมา (สมปอง, 2539) สาเหตุหลักของความผิดปกติจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เกิดจากระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไปกระตุ้นให้เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโต และเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว (Rani and Raina, 2000) somaclonal variation ของพืชมีต้นกำเนิดมาจากการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Larkin and Scowcroft, 1981) ต้นพืชที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เรียกว่า โปรโตโคลน ส่วนต้นพืชที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงละอองเกสรหรือ microspore เรียกว่า แกมีโตโคลน จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสเรียกว่า แคลลิโคลน เนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดเรียกว่า เมอริโคลน เนื้อเยื่อใบและลำต้นเรียกว่า โซมาโคลน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่ผ่านมา อาจจะมีการตั้งสมมติฐานว่าจะมีการกลายพันธุ์หรือไม่ โดยลักษณะการกลายพันธุ์ที่พบ คือ การแตกกอ การพัฒนาของดอกที่ยอด การผลิตเฉพาะดอกเพศผู้ การผลิตเพาะดอกกระเทย และลักษณะของผลที่ผิดปกติ (ผลแบบเมนเทิ้ล) (สมปอง, 2544) หากพิจารณาสาเหตุการกลายพันธุ์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ปัจจัยหลัก ๆ คือ พันธุกรรม และสารเคมี โดยเฉพาะการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นสูง ในช่วงของการชักนำการสร้างแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชั่น ซึ่งมีรายงานการใช้ 2,4-D ความเข้มข้นสูงถึง 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (Teixeria *et al*., 1993; Aberlence-Bertossi *et al*., 1999) ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแคลลัส และชักนำการงอกของคัพภะที่พัฒนามาจากแคลลัสและในขั้นตอนสุดท้ายต้องใช้ GA_3 ความเข้มข้นสูงในช่วง 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำการงอกของปาล์มน้ำมัน ทำให้ต้นกล้าที่ได้มีลักษณะผิดปกติใบเรียวเล็ก (สมปอง, 2544) Nwanko และ Krikorian (1983) อ้างโดย สมปอง (2544) รายงานว่าการใช้ GA_3 ความเข้มข้นเพียง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็เพียงพอต่อการส่งเสริมอาการใบม้วน และยับยั้งการสร้างราก สำหรับการนำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของประเทศมาเลเซียออกปลูกทดสอบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 ภายใต้การดำเนินงานโดยหน่วยงานของเอกชนได้แก่ นิคมพัฒนาที่ดินสร้างตนเอง และบริษัทอะโกรคอมมากกว่า 100 โคลนในพื้นที่กว่า 9,000 ไร่ ในหลาย

สภาพแวดล้อม และหลายสภาพปลูกพบการกลายพันธุ์เพียง 1 เปอร์เซ็นต์ (Khaw and Ng, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าต้นพันธุ์ดังกล่าวให้ผลผลิตสูงกว่าต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเมล็ดอย่างน้อย 30 เปอร์เซ็นต์ (สมปอง, 2544) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการเพาะปลูกต้นปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน โดย Te-chato (1998b) โดยปลูกทดสอบตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533-2534 จนขณะนี้ผลผลิตที่ได้มีแนวโน้มสูงกว่าต้นที่ปลูกจากเมล็ด และยังไม่พบความผิดปกติแต่อย่างใด (ผลจากการสังเกต) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในช่วงของการชักนำแคลลัสจนกระทั่งได้พืชต้นใหม่มีการใช้ 2,4-D ในความเข้มข้นต่ำเพียง 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้น และช่วงการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอใช้ NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ไม่พบความผิดปกติใด ๆ และเพื่อสร้างความมั่นใจให้เกษตรกรผู้ปลูกปาล์มน้ำมัน จึงต้องมีการตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ด้วยเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล ซึ่งเป็นการตรวจสอบที่รวดเร็ว ทำได้โดยการนำชิ้นส่วนใบของต้นกล้า มาสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) และตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส ซึ่งผลที่ได้มีความแม่นยำและเชื่อถือได้ เกษตรกรไม่ต้องเสียเวลา และค่าใช้จ่ายในการปลูกทดสอบในแปลง ดังนั้นการตรวจสอบการตรงตามพันธุ์ของต้นที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมีความจำเป็นเพื่อยืนยันว่าพืชต้นใหม่ที่ได้ไม่มีความแปรปรวนเกิดขึ้นหรือมีความตรงตามพันธุ์นั่นเอง

เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่าง ๆ และลำดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของระดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในทุกระยะการเจริญเติบโต และสภาพทางสรีรวิทยาโดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม การตรวจสอบดีเอ็นเออาจตรวจสอบจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีน และมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้ จึงตรวจสอบได้ครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่าง ๆ ให้เลือกมากมาย เช่น Random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Zhang *et al*., 2003; Morimoto *et al*., 2006;) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Matthes *et al*., 2001) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Jaligot *et al*., 2002) และ Microsatellite (SSR) (Sasanuma *et al*.,

2004; Jian *et al*., 2006) เป็นต้น ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวางขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของงาน

ไมโครแซทเทลไลท์หรือลำดับเบสซ้ำ (microsatellite หรือ simple sequence repeats: SSR) เป็นลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำสั้นมากเพียง 1-4 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีลักษณะแตกต่างกันในแต่ละสิ่งมีชีวิต เนื่องจากดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ มีลักษณะเป็นเบสซ้ำขนาดสั้น ๆ ไม่ซับซ้อนจึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า short tandem repeat (STR) ซึ่งรอบ ๆ เบสซ้ำเหล่านี้ จะมีลำดับเบสที่มีจำเพาะเมื่อทำการโคลน และตรวจสอบลำดับเบสส่วนดังกล่าว จะทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้แม้จะแตกต่างกันเพียงเบสซ้ำเพียงตัวเดียว ทำให้สามารถตรวจสอบทุกอัลลีลที่เกิดขึ้นได้ ลำดับเบสซ้ำนี้จะให้ข้อมูลมาก เพราะเป็นเครื่องหมายแบบข่มร่วมและมีความหลากหลายสูง การตรวจสอบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำมาแยกขนาดโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยเบสซ้ำหนึ่งเบสเรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น $(A)_n$ ซ้ำสองเบสเรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น $(CA)_n$ ซ้ำสามเบสเรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น $(TAA)_n$ โดยที่ n เป็นจำนวนซ้ำลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์นี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนมประมาณ 10^4-10^5 แต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ (สุรินทร์, 2545)

ปัจจุบันมีการใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอกันมากในการศึกษาแผนที่ของจีโนมและแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การตรวจสอบความเป็นลูกผสม และความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Thawaro และ Te-chato (2009) รายงานการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของปาล์มน้ำมันคู่ผสม 366(D) x 72(P) ด้วยเครื่องหมาย SSR พบว่าไพรเมอร์ EgCIR1772 สามารถแยกแถบดีเอ็นเอของไซโกติกเอ็มบริโอที่มาจากทั้งของพ่อและแม่ รวมถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ Thawaro (2009) รายงานการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมาย SSR จาก 9 ไพรเมอร์ (EgCIR008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772) พบว่า มีเพียง 2 ไพรเมอร์ ที่สามารถตรวจสอบได้ คือไพรเมอร์ EgCIR008 กับคู่ผสมที่ 118 และ 119 และไพรเมอร์ EgCIR1772 กับคู่ผสมที่ 58 สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอซึ่งอาจเป็นแถบที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระหว่างการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้ Singh และคณะ

(2006) และ Singh และคณะ (2007) รายงานการใช้เครื่องหมาย SSR ในการทำแผนที่พันธุกรรมและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นเทเนอร่าที่ให้ผลผลิตดี คือ T128 จาก Malaysian Palm Oil Board (MPOB) และ UP1026 จาก Colombian *oleifera* โดยกำหนดให้ต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่าพันธุ์ดีเป็น ortet และต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น ramet แบ่งออกเป็น 6 ชุดการทดลอง แต่ละชุดมีปาล์มน้ำมันที่ได้จากแหล่งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในประเทศมาเลเซียเรียกปาล์มน้ำมันชุดนี้ว่า ramet และสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของแต่ละชุดการทดลองและเอ็มบริออยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากการใช้ 25 ไพรเมอร์ ในการแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่าง ortet และ ramet พบว่า มี 12 ไพรเมอร์ ที่สามารถแยกความแตกต่างได้ 48 เปอร์เซ็นต์ และแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *E. guineensis* (palm T128) และ *E. oleifera* (palm UP1026, a *oleifera* จาก MPOB's Colombian germplasm collection) โดยใช้ไพเมอร์ PCT14 และ PCT1 และพบเบสซ้ำที่ตำแหน่ง GA/CT มากที่สุดเช่นเดียวกัน ทำให้ *E. guineensis* และ *E. oleifera* มีความคล้ายคลึงกันมาก โดยเชื่อว่าทั้งสองพันธุ์มีลำดับเบสซ้ำที่ตำแหน่งเดียวกัน และทำการแยกการเพาะเลี้ยงที่ปะปนกันของพืชที่เพาะเลี้ยงออกจากกันด้วยเครื่องหมายดังกล่าว และได้สรุปว่าเครื่องหมาย SSR สามารถแยกสายต้น แยกการเพาะเลี้ยงที่ปะปนออกจากกันได้ และตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตลอดจนยืนยันว่าต้นที่ได้เหมือนต้นแม่ทุกประการ และเมื่อนำต้น ramet กลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ก็พบว่า ramet ใหม่ที่ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าโคลนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมขึ้น

วัตถุประสงค์

1) เพื่อขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราจำนวนมาก โดยพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงคัพภะ
2) เพื่อผลิตโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่หนึ่งและชุดที่สอง ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซีส
3) เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ในระยะต่าง ๆ เช่น แคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุพืช

ใช้คัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์เทเนอร่าทั้งหมด 16 คู่ผสม ซึ่งพ่อและแม่ได้ผ่านการคัดเลือกลักษณะพื้นฐานทางพืชกรรมในสวนปาล์มน้ำมันของเอกชนของคุณอเนก ลิ่มศรีวิไล จังหวัดกระบี่ ที่มีการบันทึกประวัติการให้ผลผลิตที่สูง ต้นพ่อและแม่พันธุ์อายุ 8 ปี อย่างละ 4 ต้น ผสมแบบพบกันหมด หลังการผสมเกสรเป็นเวลา 3-4 เดือน (ภาพที่ 2) เก็บรวบรวมผลปาล์มน้ำมันจากทุกคู่ผสมมายังห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เพื่อทำการตัดแยกคัพภะอ่อนออกมาเพาะเลี้ยงต่อไป

ภาพที่ 2 ลักษณะของทะลายลูกผสมเทเนอร่าอายุ 3-4 เดือน บนต้นแม่พันธ์ดูร่าที่ใช้ในการศึกษา

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS และ Y_3 (รายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 1 และ 2)
- น้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุคโทส แมนนิทอล ซอร์บิทอล
- กรดแอสคอร์บิค
- ผงถ่าน
- สารควบคุมการเจริญเติบโตได้แก่ dicamba 2,4-D NAA BA และ GA_3
- สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อและทำความสะอาดเครื่องแก้ว ประกอบด้วยแอลกอฮอล์ 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์ คลอร็อกซ์ ทวีน-20 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทีโพล

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- กรดเอธิลินไดอะมินเทตราอะซิติค
- กรดโซเดียมเอธิลินไดอะมินเทตราอะซิติค
- ทริส-กรดไฮโครคลอริค
- ไอโซโพรพานอล
- เอธานอล
- คลอโรฟอร์ม
- โซเดียมโดดิซิลซัลเฟต
- โซเดียมคลอไรด์
- แอมโมเนียมอะซิเตต
- พอลีไวนิลไพโรลิโดน 40
- เฮกซะเดคิลไตรเมธิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB)
- เมอร์แคบโตเอธานอล

2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับทำอิเลคโทรโฟรีซีส

- อะกาโรสเจล
- กรดอะซิติค
- กรดบอริค
- ทริสเบส
- เอธิเดียมโบรไมด์
- Loading buffer
- แลมด้าดีเอ็นเอ
- 100 bp และ 500 bp DNA Ladder (Operon, USA)
- โพลีอะคริลามายด์เจล
- โพลีอะคริลามายด์ : bis-acrylamide solution (29:1)
- ไบนด์ ไซเลน
- เรเพล
- ฟอร์มามายด์
- ฟอร์มาลดีไฮด์
- ยูเรีย
- เทมเมด (N,N,N',N'-tetramethyethyenediamine)
- แอมโมเนียมเพอซัลเฟท
- โซเดียมไทโอซัลเฟท ($Na_2S_2O_3$.$5H_2O$)
- โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
- ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$)

2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับทำพีซีอาร์

- dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- Primer จากบริษัท Operon Tech. (California, USA)
  (รายละเอียดในตารางผนวกที่ 3)
- แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)
- Ampli Taq Gold 360 (Promega, USA)

- 10X Taq buffer (Promega, USA)
- *Taq* DNA Polymerase (Promega, USA)

2.5 สารเคมีที่ใช้สำหรับเครื่อง E-gene

- QX DNA dilution buffer
- QX Wash buffer
- QX Separation buffer
- QX Mineral oil
- lamda DNA 50 bp

3. อุปกรณ์

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารและย้ายเลี้ยง

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
- หม้อนึ่งความดันไอ
- ตู้อบแห้งและอบฆ่าเชื้อ
- ตู้เย็น
- เครื่องกรองมิลลิพอร์
- กระดาษทิชชู
- กระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาดช่อง 0.45 ไมโครเมตร
- เครื่องแก้วประกอบด้วยฟลาสก์ ปิเปต กระบอกตวง volumetric flask
- จานเพาะเลี้ยง ขวดเพาะเลี้ยง หลอดทดลอง
- ปากคีบ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด พาราฟิล์ม
- แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตู้ย้ายเลี้ยง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องคนสารละลาย
- ไมโครปิเปต

- ตู้อบไมโครเวฟ

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างพืชภายนอกหลอดทดลอง

- ถุงพลาสติก
- กรรไกร
- กล่องโฟม
- ปากกาเขียนเครื่องแก้ว
- ยางเส้น

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การทำอิเลคโตรโฟรีซีส และการทำพีซีอาร์

- ตู้เย็น
- ตู้แช่แข็ง -20 และ -30 องศาเซลเซียส
- เครื่องไมโครเซ็นตริฟิวก์
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
- เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ
- เครื่องปั่นผสมสารตัวอย่าง
- แท่งแม่เหล็ก
- ปิเปตปรับปริมาตร
- เครื่องเขย่า
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ
- ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีส (LE Agarose, Promega,USA)
- เครื่อง XP Thermal Cycler (บริษัท Bioer Technology จำกัด รุ่น TC-XP ประเทศญี่ปุ่น)

- เครื่อง Verity Thermal Cycle (รุ่น Verity 200-1)
- เครื่องสเป็กโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Nano drop (ND-1000)
- เครื่อง E-gene รุ่น HAD-GT 12^{M}
- เครื่อง Multina
- หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์
- ตู้ไมโครเวฟ
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- ไมโครปิเปต
- น้ำแข็งและกระติกน้ำแข็ง
- แท่งแก้วสำหรับบดตัวอย่าง
- เครื่องแก้ว กระบอกตวง และขวดต่าง ๆ
- เครื่องเขย่า (vortex)

วิธีการ

การเตรียมวัสดุพืช

แยกผลปาล์มน้ำมันออกจากทลาย (ภาพที่ 3) ใช้กรรไกรตัดส่วนเส้นใย (mesocarp) ออกจนเห็นกะลาซึ่งเป็นส่วนของเมล็ด ใช้ค้อนทุบแยกส่วนกะลาออก (ภาพที่ 4) ตัดเนื้อในเมล็ด (kernel) ที่ห่อหุ้มคัพภะอยู่เป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาด 3 x 3 x 8 มิลลิเมตร (ภาพที่ 5) ทำความสะอาดบริเวณผิวด้านนอกโดยแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ พร้อมเขย่าเป็นเวลา 30 วินาที ฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน-20 1-2 หยด ต่อสารฟอกฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อภายในตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ใช้ปากคีบและมีดผ่าตัด ตัดแยกคัพภะออกจากเนื้อในเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ (ภาพที่ 6) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์

ภาพที่ 3 ลักษณะผลปาล์มน้ำมันอายุ 3-4 เดือน ที่ตัดแยกออกจากทะลายก่อนนำมาตัดส่วนเนื้อปาล์มน้ำมันออก

ภาพที่ 4 ลักษณะเนื้อในเมล็ดของปาล์มน้ำมันหลังใช้ค้อนทุบแยกส่วนกะลาออก

ภาพที่ 5 ตัดเนื้อในเมล็ดที่มีคัพภะฝังอยู่เป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดประมาณ 3 x 3 x 8 มิลลิเมตร

ภาพที่ 6 คัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันลูกผสมหลังจากแยกออกจากเนื้อในเมล็ดออก พร้อมที่จะเพาะเลี้ยง

วิธีการศึกษา

1 การชักนำแคลลัส/เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

1.1 ปัจจัยทางชีวภาพ

1.1.1 ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างแคลลัส

นำชิ้นส่วนคัพภะของปาล์มน้ำมันลูกผสม 16 คู่ผสม อายุ 3-4 เดือนหลังการผสมเกสร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7 และเติมวุ้น Agar-Agar 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เพื่อชักนำแคลลัสเริ่มแรก (primary callus: PC) ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน ตรวจสอบการตอบสนองของคัพภะ โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส ดัชนีความเร็วในการสร้างแคลลัส เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส ตามสูตรดังนี้คือ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนเอ็มบริโอที่สร้างแคลลัส}}{\text{จำนวนเอ็มบริโอทั้งหมดที่เพาะเลี้ยง}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนเอ็มบริโอที่สร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส}}{\text{จำนวนเอ็มบริโอทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ดัชนีความเร็วในการสร้างแคลลัส} = \frac{\text{ผลรวมของคัพภะที่สร้างแคลลัสในวันที่ตรวจนับ}}{\text{จำนวนวันที่ตรวจนับ}}$$

$$\text{ดัชนีความเร็วในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส} = \frac{\text{ผลรวมของคัพภะที่สร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในวันที่ตรวจนับ}}{\text{จำนวนวันที่ตรวจนับ}}$$

นอกจากนี้ยังศึกษาลักษณะและขนาดของแคลลัสเปรียบเทียบกันในปาล์มน้ำมันลูกผสมแต่ละคู่ผสม โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละคู่ผสมทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด (หนึ่งหลอดเพาะเลี้ยง 1 เอ็มบริโอ คิดเป็น 1 ซ้ำ)

1.1.2 ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส/โซมาติกเอ็มบริโอ

นำ PC ทุกคู่ผสมจากการศึกษาที่ 1.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7 เติมวุ้น Agar-Agar 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกระยะเวลา และอัตราการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละคู่ผสม โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRTแต่ละคู่ผสมทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

1.2 ปัจจัยทางเคมี

ผลของสูตรอาหาร ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มน้ำหนักสด และจำนวนปมต่อแคลลัส

นำแคลลัสของคู่ผสมที่ 2 3 6 7 8 9 10 12 13 และ 16 (หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ Y_3 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba ความเข้มข้น 1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 เติมวุ้น Agar-Agar 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกน้ำหนักสดแคลลัส และพัฒนาการของแคลลัสจากจำนวนปมที่เพิ่มขึ้นต่อแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละคู่ผสม สูตรอาหาร และระดับความเข้มข้นของ dicamba โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial design ใน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

นำแคลลัสคู่ผสมที่ 2 3 6 7 8 9 10 12 13 และ 16 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการศึกษาข้างต้นเติม 2,4-D และ dicamba ความเข้มข้น 0.1 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 เติมวุ้น Agar-Agar 0.75 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกับข้างต้น ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกน้ำหนักสดแคลลัส และจำนวนปมที่เพิ่มขึ้นต่อแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละคู่ผสม ชนิดและความเข้มข้นของออกซิน โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial design ใน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

1.3 ปัจจัยทางกายภาพ

ผลของความเข้มแสงต่อการเพิ่มน้ำหนักสด และจำนวนปมต่อแคลลัส

นำแคลลัสที่ได้จากการศึกษาที่ 1.3 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 19 22 25 และ 27 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกน้ำหนักสดแคลลัส และจำนวนปมที่เพิ่มขึ้นต่อแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละคู่ผสม และระดับความเข้มแสง โดยใช้แผนการทดลองแบบ Factorial design ใน CRD แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำๆ ละ 5 หลอด

2 ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำ SSE และการงอกของต้นอ่อน

2.1 ปัจจัยทางชีวภาพ

ผลของคู่ผสม ระยะพัฒนาการ และขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอต่อการชักนำ และการงอกของ SSE

นำโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม (globular embryo: GE) และระยะสร้างใบเลี้ยง (haustorium embryo: HE) จากคู่ผสมที่ 7 และ 16 ขนาด 3 5 7 9 และ 12 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (secondary somatic embryo: SSE) และจำนวน SEE/HE หลังจากเพาะเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกันระหว่างคู่ผสม ระยะพัฒนาการและขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอที่ใช้ในการชักนำ SSE โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial design ใน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ในแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด ๆ ละ 1 โซมาติกเอ็มบริโอ

จากนั้นนำ SSE จาก HE ทุกขนาด ในแต่ละคู่ผสมมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกของ SSE และการงอกยอด ราก และต้นที่สมบูรณ์ หลังจากเพาะเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละคู่ผสม และขนาดของ SE เริ่มต้นที่ใช้ในการชักนำ SSE โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial design ใน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ในแต่การทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด ๆ ละ 1 โซมาติกเอ็มบริโอ

2.2 ปัจจัยทางเคมี

2.2.1 ผลของแหล่งคาร์บอน และระดับความเข้มข้นต่อการชักนำและการงอกของ SSE

นำ HE ของคู่ผสมที่ 7 และ 16 ขนาดที่ดีที่สุดจากการศึกษา 2.1 วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมน้ำตาล 5 ชนิด คือ ซอร์บิทอล แมนนิทอล ซูโครส กลูโคส และ ฟรุกโตส ความเข้มข้นชนิดละ 0.1 และ 0.2 โมลาร์ จากนั้นนำไปวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้าง SSE และจำนวน SSE/HE หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่คู่ผสม และชนิดของน้ำตาล โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial design ใน CRD ในแต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด ๆ ละ 1 โซมาติกเอ็มบริโอ

จากนั้นนำ SSE จากแต่ละคู่ผสม และทุกแหล่งคาร์บอนมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE และการงอกยอด ราก และต้นที่สมบูรณ์ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่คู่ผสม และชนิดของน้ำตาล โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial design ใน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ในแต่การทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด ๆ ละ 1 โซมาติกเอ็มบริโอ

2.2.2 ผลของ GA_3 ต่อการชักนำ และการงอกของ SSE

นำ HE ของคู่ผสมที่ 7 และ 16 มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมแหล่งของคาร์บอน และความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการศึกษา 2.2.1 ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0 0.01 0.05 0.10 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกการสร้าง SSE/HE หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา

2 เดือน เปรียบเทียบกันระหว่างคู่ผสม และความเข้มข้นของ GA_3 โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial design ใน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ในแต่การทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด ๆ ละ 1 โซมาติกเอ็มบริโอ

จากนั้นนำ SSE จากแต่ละคู่ผสม และแต่ละระดับความเข้มข้นของ GA_3 มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 เดือน บันทึกการงอกของ SSE โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial design ใน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ในแต่การทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด ๆ ละ 1 โซมาติกเอ็มบริโอ

2.2.3 ผลของผงถ่าน และการเติมอาหารเหลวต่อการงอกของ SSE

นำ SSE ของคู่ผสมที่ 7 และ 16 จากสูตรอาหารที่ให้การสร้างได้ที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2.2.2 มาวางเลี้ยงในอาหาร 3 แบบ คือ

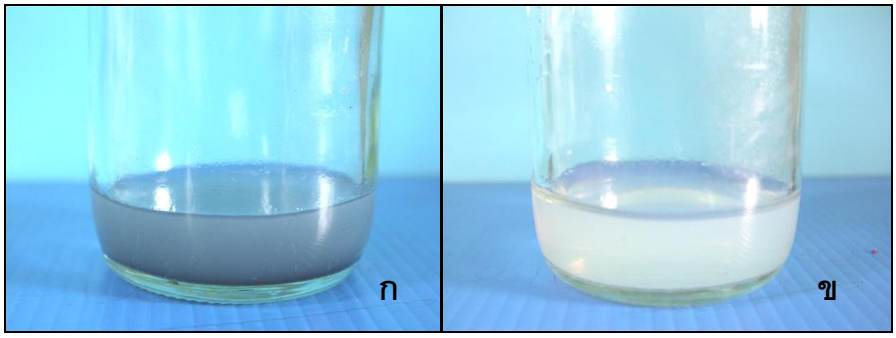
ก. อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับการเติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติม (ภาพที่ 7ก-ข)

ข. อาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตร MS เติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติม ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 8ก-ข)

ค. อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติม (ภาพที่ 9ก-ข)

จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกการงอกของ SSE/HE การงอกยอด ราก และต้นที่สมบรูณ์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละแบบของ

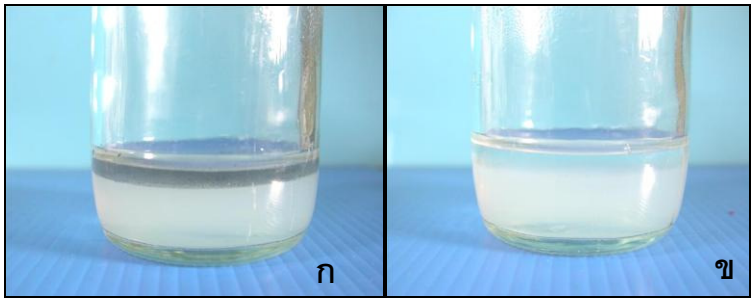
อาหาร โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial design ใน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ในแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด ๆ ละ 1 โซมาติกเอ็มบริโอ



ภาพที่ 7 อาหารแข็งที่ใช้ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

ก : อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์

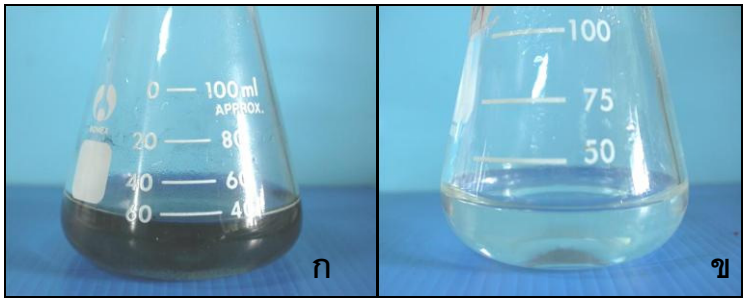
ข : อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และผงถ่าน



ภาพที่ 8 อาหาร 2 ชั้นที่ใช้ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

ก : อาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกันเติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์

ข : อาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกันเติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 9 อาหารเหลวที่ใช้ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

ก : อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข : อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3 ปัจจัยทางกายภาพ

ผลของการลดความชื้นต่อการชักนำ และการงอกของ SSE

นำ HE ของคู่ผสมที่ 7 และ 16 มาชั่งน้ำหนักสด แล้วใส่ในจานเพาะเลี้ยง นำไปผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงเพื่อลดความชื้น เป็นเวลา 0 5 10 20 30 และ 40 นาที จากนั้นตรวจสอบความชื้นที่ลดลง แล้วนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการลดความชื้นมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำ SSE จากการศึกษาที่ 2.2.1 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกการสร้าง SSE/HE หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละระยะเวลาในการลดความชื้น โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial design ใน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ในแต่การทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด ๆ ละ 1 โซมาติกเอ็มบริโอ

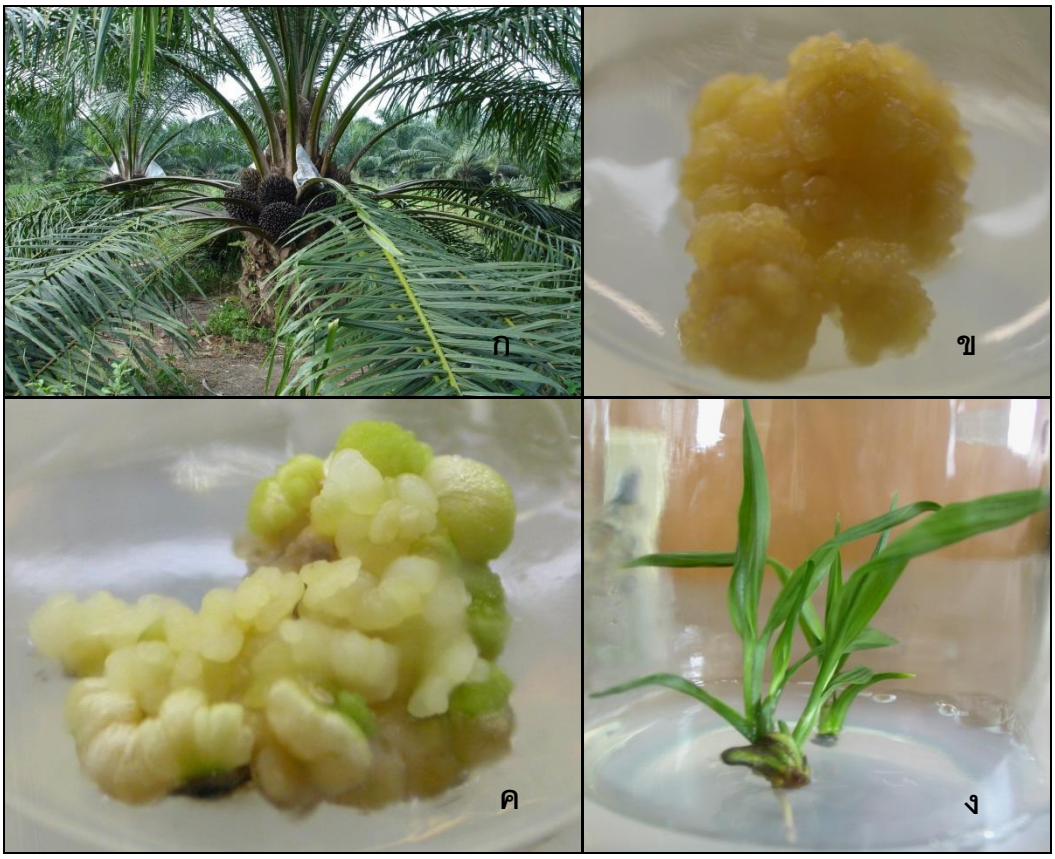
จากนั้นนำ SSE จากแต่ละคู่ผสม และแต่ละระยะเวลาการลดความชื้นมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2.2.3 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกความงอกของ SSE หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละระยะเวลาในการลดความชื้น โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial design ใน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ในแต่การทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด ๆ ละ 1 โซมาติกเอ็มบริโอ

3. การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิค SSR

3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปาล์มน้ำมันจาก 2 แหล่งคือ ชิ้นส่วนใบของต้นพ่อแม่ในสภาพแปลงปลูก (ภาพที่ 10ก) และชิ้นส่วนปาล์มน้ำมันภายในหลอดทดลองแบ่งเป็น 3 ระยะคือ ระยะแคลลัส (ภาพที่ 10ข) โซมาติกเอ็มบริโอ (ภาพที่ 10ค) และใบจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ชักนำจากกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิส (ภาพที่ 10ง) ของคู่ผสมที่ 7 และ 16 ที่ได้จากการทดลอง ใส่ในหลอด

ไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Te-chato (2000) และ Doyle และ Doyle (1990)



ภาพที่ 10 ตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแปรปรวนโดยเทคนิค SSR

ก : ต้นพ่อแม่พันธุ์อายุ 8 ปี ในสภาพแปลงปลูก

ข : แคลลัสที่ชักนำบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังการวางเลี้ยง 3 เดือน

ค : โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการวางเลี้ยง 1 ปี (ย้ายเลี้ยงทุกเดือน)

ง : ต้นกล้าที่ชักนำจาก SSE

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Te-chato (2000) โดยเก็บตัวอย่างแคลลัสโซมาติกเอ็มบริโอ หนัก 200 กรัม ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 และ EDTA 0.1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติมโซเดียมโดดิซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 110 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารตัวอย่างบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ เมื่อเห็นสายดีเอ็นเอแล้ววางไว้หรือนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที - 1 นาที จากนั้นเทไอโซโพรพานอลทิ้ง ล้างด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง เทเอธานอลทิ้ง ผึ่งให้แห้ง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

ในกรณีชิ้นส่วนใบจากต้นพ่อและแม่ และต้นกล้าที่พัฒนาจาก SSE สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) ดัดแปลงวิธีการโดยเติมโพลีไวนิลไพโรลิโดน 40 (PVP-40) 10 มิลลิกรัม ใช้ใบสดหนักประมาณ 200 มิลลิกรัม ตัดใส่ในโกร่ง เทไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียด เติมบัฟเฟอร์ CTAB (PVP–40, NaCl, EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0, CTAB 2 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บดให้เข้ากันอีกครั้ง ตักใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 800 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ได้สารละลายที่แยกชั้นใสส่วนบน ดูดสารละลายเฉพาะส่วนใสใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เมื่อเห็นสายดีเอ็นเอแล้ววางไว้หรือนำไปปั่นให้ตกตะกอน จากนั้นเทไอโซโพรพานอลทิ้ง ล้างด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง เทเอธานอลทิ้ง ผึ่งให้แห้ง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็คโตรโฟรีซิสบนแผ่นเจลอะกาโรส (LE Agarose, Promega,USA) ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0) เป็นเวลาประมาณ 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 15-20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5-10 นาที แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการใช้เครื่องสเป๊กโตรโฟโตมิเตอร์ (Nano-Drop รุ่น ND-1000) ใช้โปรแกรม ND-1000 V 3.5.2 ในการวิเคราะห์ ใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง โดยปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้แสดงผลบนหน้าจอคอมพิวเตอร์

3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่แยกได้จากหัวข้อ 3.2 ตามวิธีการของ Thawaro (2009) เพื่อนำไปตรวจสอบบนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ 8 ชนิด คือ EgCIR008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 และ EgCIR0905 ทั้งที่เป็น forward และ reverse โดยการทำ PCR จากปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 20 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* polymerase 1.5 ยูนิต ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 4.9 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิเครื่องพีซีอาร์ดังนี้คือ

1. Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
2. Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing ซึ่งในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายใช้อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4. Extention ขั้นตอนการเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอใช้อุณหภูมิ 72

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำทั้งสิ้น 35 รอบ

5. Final-extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้กับเครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ จากปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 5 นาโนกรัม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์เข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร Ampli taq Gold 360 (บัฟเฟอร์ร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTP) และเอนไซม์ *Taq* polymerase) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิเครื่องพีซีอาร์ดังนี้คือ

1. Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
2. Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing ซึ่งในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายใช้อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4. Extention ขั้นตอนการเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำทั้งสิ้น 35 รอบ
5. Final-extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที
6. หลังจากนั้นเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออกจากเครื่อง

3.5 ตรวจสอบลูกผสมและความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของต้นพ่อและต้นแม่ เพื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสม และความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ บนเจลอะคริลาไมด์อิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง โดยหลังจากทำพีซีอาร์นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะคริลาไมด์ นำมาทำให้เสียสภาพด้วยฟอร์มาไมด์ 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบใน loading buffer นำไปเพิ่มปริมาณที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยใช้ตัวกลางเจลอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 600 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท โดยนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย fixative (acetic

acid ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) นาน 20 นาที เขย่าเบา ๆ เมื่อครบเวลานำไปล้างในน้ำกลั่น 20 นาที เปลี่ยนน้ำล้างใหม่แล้วล้างต่ออีก 10 นาที นำแผ่นเจลมาย้อมในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ หลังจากนั้นนำแผ่นเจลจุ่มน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว (5 วินาที) เพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออก แล้วนำแผ่นเจลใส่ในสารละลาย developer (โซเดียมคาร์บอเนต 2.5 เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาลดีไฮด์ 40 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไทโอซัลเฟท 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่เตรียมใหม่ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เขย่าสม่ำเสมอ จนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยแช่สารละลายกรดอะซิติก (stop solution) นาน 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลล้างน้ำกลั่นอีก 10 นาที แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับการตรวจสอบความเป็นลูกผสม และความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์โดยใช้เครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ โดยหลังจากทำพีซีอาร์ นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 คู่เบส โดยใส่ภายในเครื่อง E-Gene ใช้เวลา 1 นาที 17 วินาทีต่อตัวอย่าง ผลจากการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างแสดงผลบนหน้าจอคอมพิวเตอร์

บทที่ 3

ผล

1. การชักนำแคลลัส/เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

1.1 ปัจจัยทางชีวภาพ

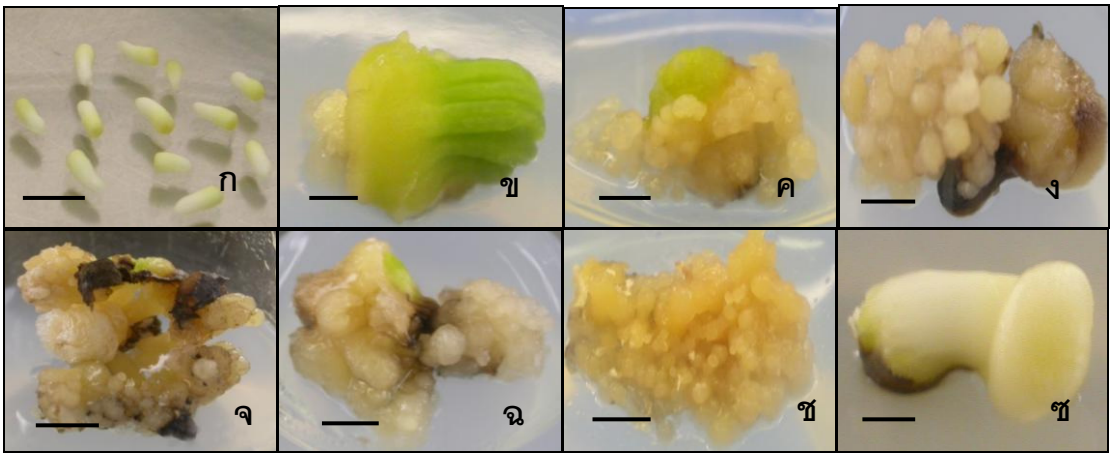
1.1.1 ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างแคลลัส/เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างแคลลัส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันลูกผสม 16 คู่ผสม บนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน เพื่อชักนำแคลลัส พบว่า หลังจากแยกคัพภะอ่อนออกจากเมล็ด (ภาพที่ 11ก) เพาะเลี้ยงบนอาหารข้างต้น คัพภะเริ่มมีการพัฒนาเข้าสู่เอ็มบริโอในระยะสร้างใบเลี้ยง (ภาพที่ 11ข) หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4-5 สัปดาห์ เริ่มสร้างแคลลัสบริเวณรอบฐานของคัพภะ (ภาพที่ 11ค) บริเวณส่วนปลายของคัพภะซึ่งเป็นส่วนของโคลีออฟไทล์ กำเนิดของยอดอ่อน (ภาพที่ 11ง) บริเวณใบเลี้ยงที่แยกออก (ภาพที่ 11จ) สำหรับส่วนอื่น ๆ ให้การสร้างแคลลัสในเวลาต่อมาจนเกิดทั้งบริเวณส่วนฐาน และปลายของคัพภะ (ภาพที่ 11ฉ) และสุดท้ายเกิดทั้งคัพภะ (ภาพที่ 11ช) มีคัพภะบางส่วนที่ไม่ตอบสนองต่อการวางเลี้ยง (ภาพที่ 11ซ) เมื่อพิจารณาการสร้างแคลลัสจากแต่ละคู่ผสม พบว่าคู่ผสมที่ 7 ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12) รองลงมาคือคู่ผสมที่ 14 และ 16 โดยให้การสร้างแคลลัส 30 และ 24.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 4) จากการวางเลี้ยงปาล์มน้ำมันลูกผสมที่มีพันธุกรรมที่แตกต่างกันให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสในช่วง 7-33 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียง 4 คู่ผสม คือคู่ผสมที่ 3 7 14 และ 16 ที่ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสในระดับสูง โดยให้การสร้างแคลลัสอยู่ในช่วง 24-33 เปอร์เซ็นต์

ในส่วนของดัชนีความเร็วในการสร้างแคลลัส พบว่า คู่ผสมที่ 16 ให้ดัชนีความเร็วในการสร้างแคลลัสสูงสุด 35.5 (ภาพที่ 13) รองลงมาคือคู่ผสมที่ 9 และ 5 โดยให้ดัชนี

ความเร็วในการสร้างแคลลัส 30.67 และ 26.5 ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 4) จากการวางเลี้ยงปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่แตกต่างกันให้ดัชนีความเร็วในการสร้างแคลลัสในช่วง 6-35 และมีเพียง 3 คู่ผสม คือคู่ผสมที่ 5 9 และ 16 ที่ให้ดัชนีความเร็วในการสร้างแคลลัสในระดับสูง โดยให้ดัชนีความเร็วในการสร้างแคลลัสในช่วง 26-35 (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 11 รูปแบบพัฒนาการของคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันคู่ผสมต่าง ๆ ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน

ก : คัพภะอ่อนที่เพิ่งตัดแยกจากเมล็ด (บาร์ = 2.5 มิลลิเมตร)

ข : คัพภะพัฒนาเข้าสู่ระยะจาวหลังเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ (บาร์ = 2.5 มิลลิเมตร)

ค : การสร้างแคลลัสที่บริเวณฐานของคัพภะ (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

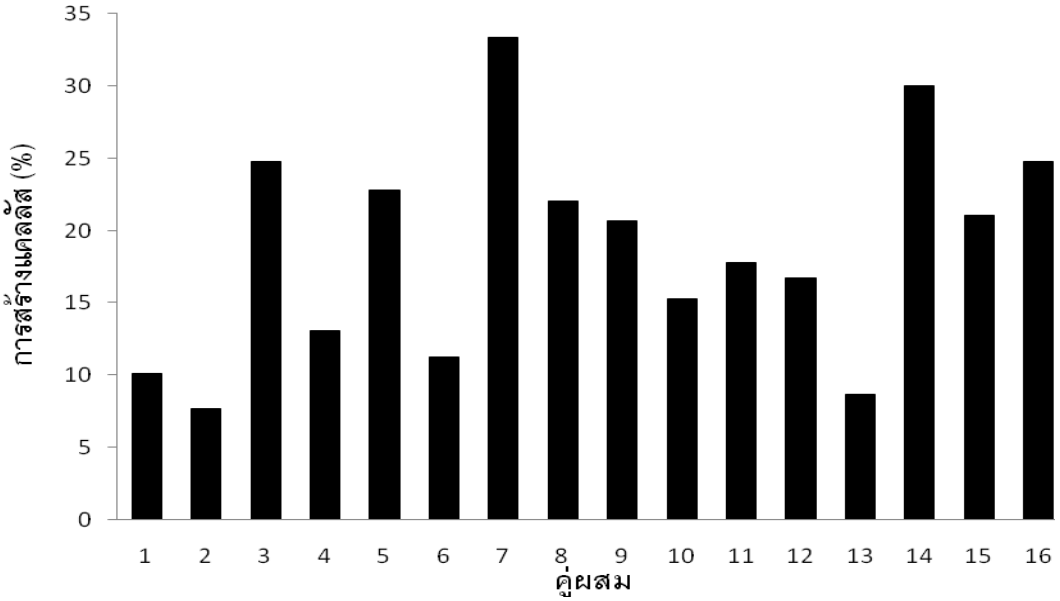
ง : การสร้างแคลลัสที่บริเวณส่วนปลายของคัพภะ (ขั้วที่เกิดยอด) (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

จ : การสร้างแคลลัสที่บริเวณส่วนใบเลี้ยงที่แยกออก (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

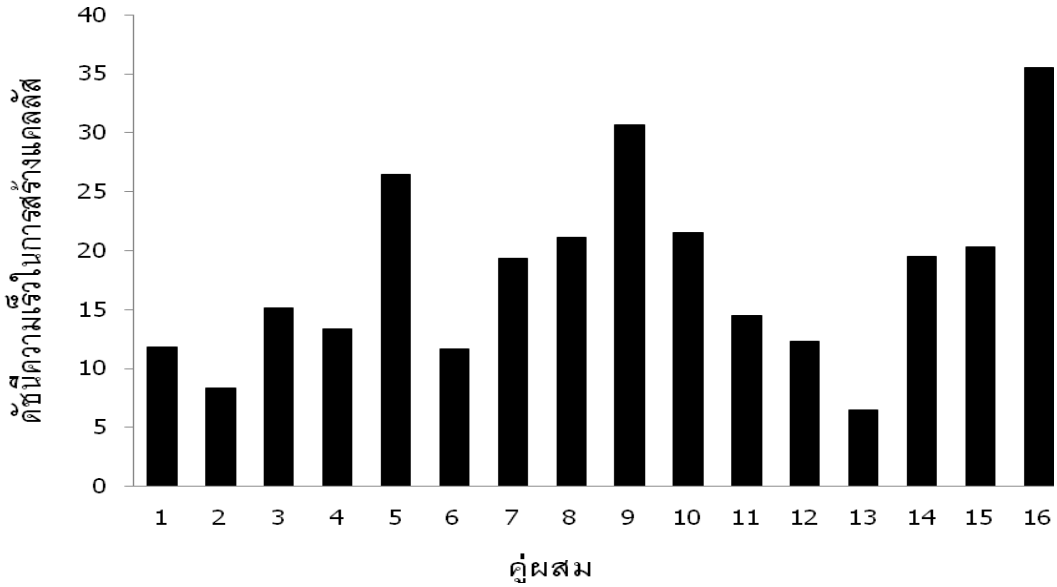
ฉ : การสร้างแคลลัสที่บริเวณส่วนฐานและปลายของคัพภะ (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ช : การสร้างแคลลัสทั้งคัพภะ (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ซ : คัพภะที่ไม่ตอบสนองต่อการวางเลี้ยงหลังเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ (บาร์ = 2.5 มิลลิเมตร)

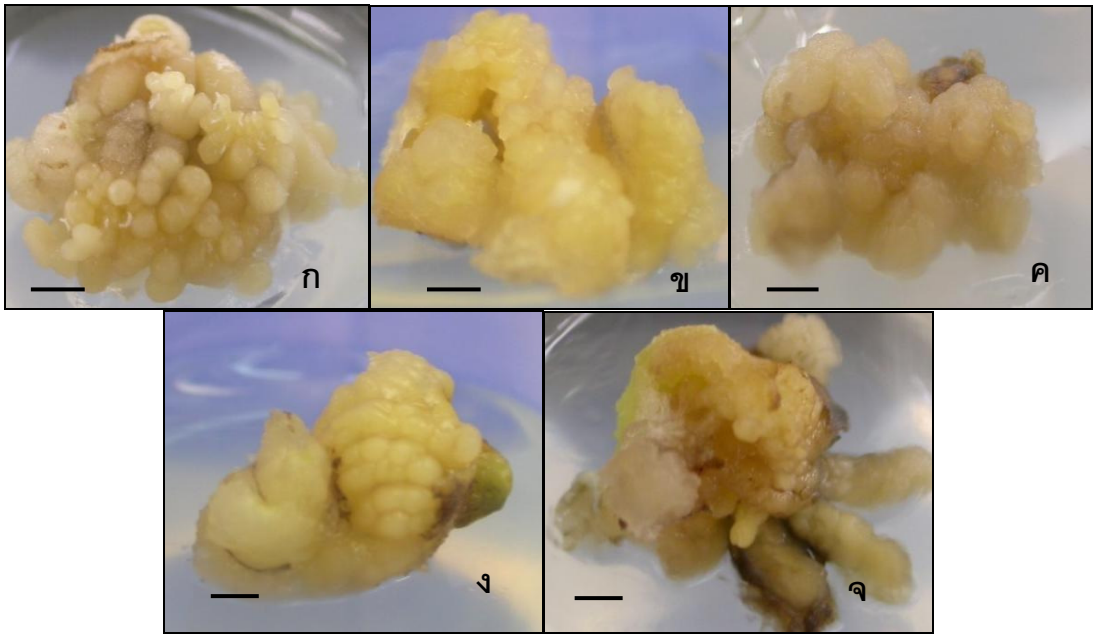


ภาพที่ 12 การตอบสนองของคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมทั้ง 16 คู่ผสมต่อการสร้างแคลลัส และความเร็วในการสร้างแคลลัส เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน



ภาพที่ 13 การตอบสนองของคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมทั้ง 16 คู่ผสมต่อดัชนีความเร็วในการสร้างแคลลัส เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

นอกจากนี้ยังพบว่า การเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมทั้ง 16 คู่ผสม ให้รูปแบบการสร้างแคลลัสที่แตกต่างกัน สามารถแบ่งแคลลัสออกได้เป็น 4 ประเภทด้วยกันคือ แคลลัสแบบเกาะกันแน่น (compact callus) มีสีเหลือง (ภาพที่ 14ก) ถึงหลืองเข้ม (ภาพที่ 14ข) แคลลัสที่เกาะกันแบบหลวม ๆ (friable callus) มีสีครีม (ภาพที่ 14ค) แคลลัสที่มีลักษณะเป็นปม (nodular callus) มีสีเหลืองเข้ม (ภาพที่ 14ง) และแคลลัสที่มีลักษณะเป็นเส้นคล้ายราก (root-like callus) มีสีเหลือง (ภาพที่ 14จ) จากการทดลองพบว่า คู่ผสมที่ 5 ให้การสร้างแคลลัสแบบเกาะกันแน่นสูงสุด 17.65 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) รองลงมาคือคู่ผสมที่รองลงมาคือ 7 และ 8 โดยให้การสร้างแคลลัสแบบเกาะกันแน่น 8.82 และ 7.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนคู่ผสมที่ 14 ให้การสร้างแคลลัสที่เกาะกันแบบหลวมๆ สูงสุด 44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคู่ผสมที่ 11 และ 12 โดยให้การสร้างแคลลัสที่เกาะกันแบบหลวม ๆ 40.32 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และคู่ผสมที่ 3 ให้การสร้างแคลลัสที่มีลักษณะเป็นเส้นคล้ายรากสูงสุด 37.14 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคู่ผสมที่ 16 และ 5 โดยให้การสร้างแคลลัสที่มีลักษณะดังกล่าว 15.60 และ 9.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนคู่ผสมที่ 7 ให้การสร้างแคลลัสแบบปมสูงสุด 52.94 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) รองลงมาคือคู่ผสมที่ 14 และ 15 โดยให้การสร้างแคลลัสแบบปม 40 และ 36.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 5) เมื่อพิจารณาประเภทของแคลลัสโดยภาพรวมพบว่าพันธุกรรมที่แตกต่างกันของคู่ผสมปาล์มน้ำมันให้การสร้างแคลลัสแบบปมสูงสุด รองลงมาคือแบบเกาะกันหลวม ๆ แบบเส้นคล้ายราก และแบบเกาะกันแน่น ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 5)



ภาพที่ 14 ประเภทของแคลลัสที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมทั้ง 16 คู่ผสม บนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน

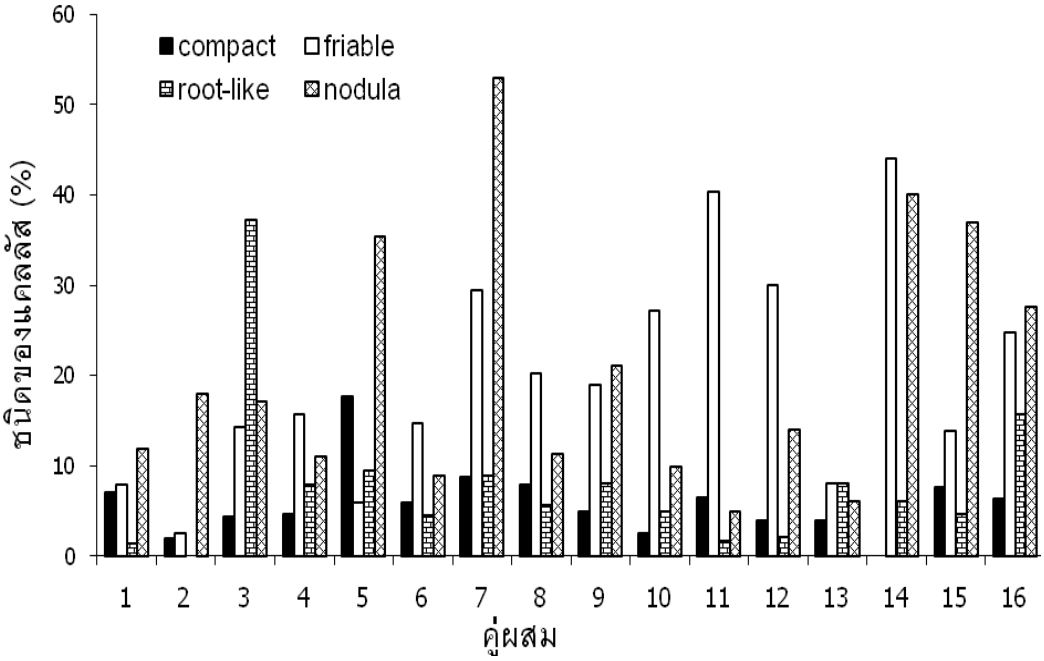
ก : แคลลัสแบบที่เกาะกันแน่นสีเหลือง (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ข : แคลลัสแบบที่เกาะกันแน่นสีเหลืองเข้ม (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ค : แคลลัสแบบที่เกาะกันอย่างหลวมๆ สีครีม (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

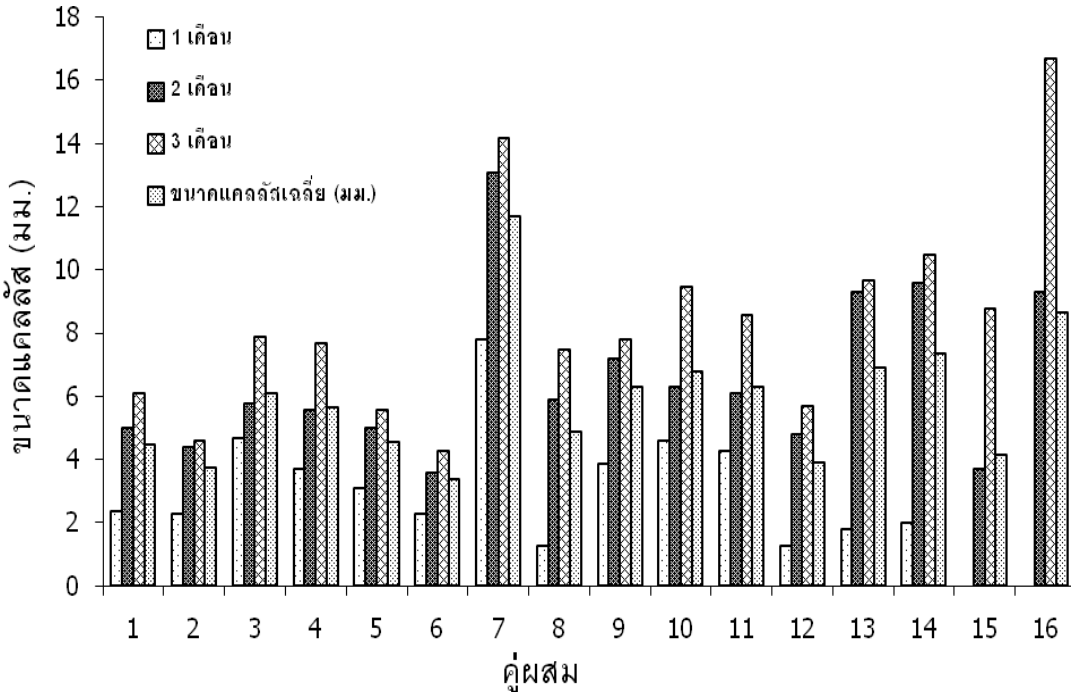
ง : แคลลัสแบบปม สีเหลืองเข้ม (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

จ : แคลลัสแบบเส้นคล้ายราก สีเหลือง (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 15 การสร้างแคลลัสแบบต่างๆ ของปาล์มน้ำมันลูกผสมทั้ง 16 คู่ผสม หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน

เมื่อพิจารณาผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อขนาดของแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน คู่ผสมที่ 7 ให้การสร้างแคลลัสขนาดใหญ่ที่สุด โดยให้การสร้างแคลลัสขนาด 13.1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 16) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน กลับพบว่าคู่ผสมที่ 16 ให้การสร้างแคลลัสขนาดใหญ่ที่สุด 16.7 มิลลิเมตร รองลงมาคือคู่ผสมที่ 7 และ 14 โดยให้การสร้างแคลลัสขนาด 14.2 และ 10.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 6) เมื่อพิจารณาขนาดแคลลัสเฉลี่ยพบว่า คู่ผสมที่ 7 ให้ขนาดของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 11.7 มิลลิเมตร (ภาพที่ 16) รองลงมาคือคู่ผสมที่ 16 และ 14 โดยให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ย 8.7 และ 7.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 6) จากการวางเลี้ยงปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่แตกต่างกันให้ขนาดแคลลัสในช่วง 4.3-16.7 มิลลิเมตร และขนาดแคลลัสเฉลี่ยในช่วง 3.4-11.7 มิลลิเมตร มีเพียง 2 คู่ผสม ที่ให้ขนาดแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ยใหญ่สุด คือคู่ผสมที่ 7 และ 16 โดยให้ขนาดแคลลัสในช่วง 14.2-16.7 มิลลิเมตร และขนาดแคลลัสเฉลี่ย 8.7-11.7 มิลลิเมตร (ตารางภาคผนวกที่ 6)

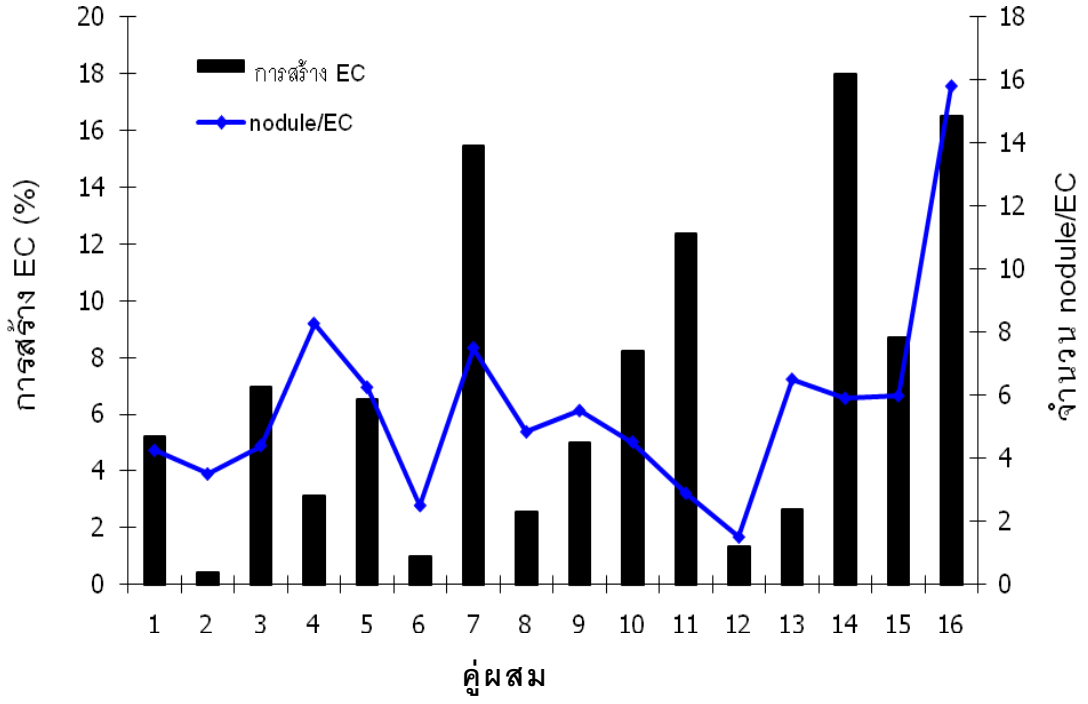


ภาพที่ 16 ขนาดแคลลัสที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมทั้ง 16 คู่ผสม บนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน

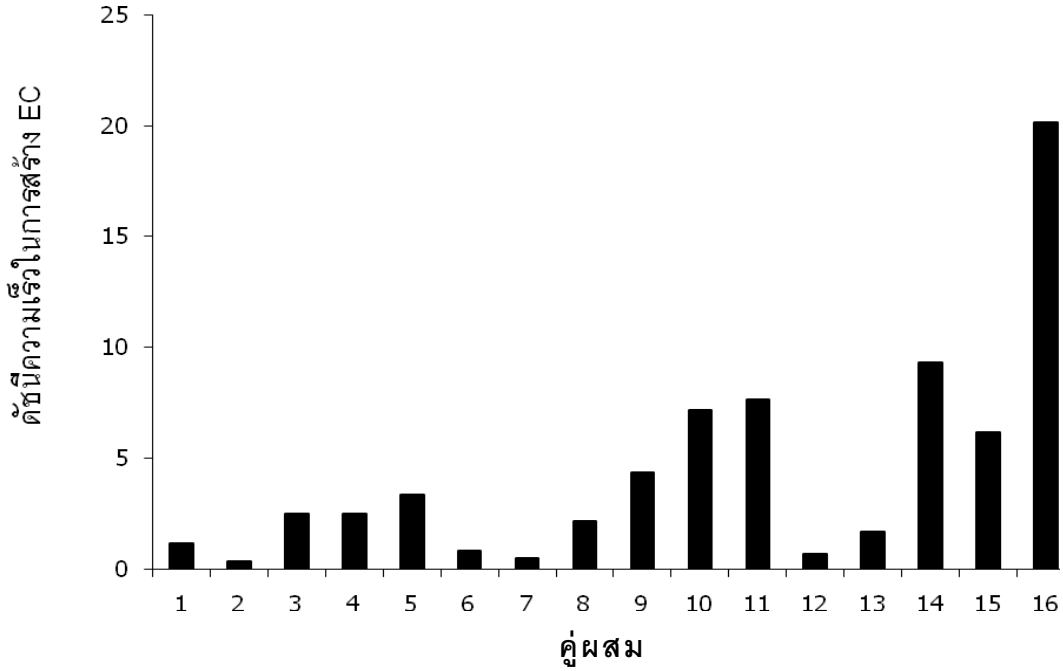
ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

แม้ว่ารูปแบบการสร้างแคลลัสจะแตกต่างกัน แต่แคลลัสทุกรูปแบบสามารถให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้เช่นเดียวกัน และให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่อชิ้นส่วนแตกต่างกัน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสส่วนใหญ่พัฒนามาจากแคลลัสชนิดที่มีลักษณะแบบปมรองลงมาคือ แคลลัสแบบเกาะกันแน่น แคลลัสที่เกาะกันแบบหลวม ๆ และแคลลัสที่มีลักษณะคล้ายราก ตามลำดับ จากการศึกษาผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่อชิ้นส่วน และความเร็วในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสพบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละคู่ผสม โดยคู่ผสมที่ 14 ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 18 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 17) รองลงมาคือ คู่ผสมที่ 16 และ 7 ให้การ

สร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 16.52 และ 15.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 7) พันธุกรรมที่แตกต่างกันส่งผลต่อการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในช่วง 0.4-18 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียง 4 คู่ผสมคือ คู่ผสมที่ 7 11 14 และ 16 ที่ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในระดับที่สูง โดยให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในช่วง 12-18 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 17) แม้ว่าคู่ผสมที่ 14 จะให้เปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด แต่เมื่อพิจารณาการสร้างปมต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส กลับพบว่า คู่ผสมที่ 16 ให้การสร้างปมสูงสุด 15.79 ปมต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (ภาพที่ 17) รองลงมาคือ คู่ผสมที่ 4 และ 7 ให้การสร้างปม 8.27 และ 7.5 ปมต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ตารางภาคผนวกที่ 7) เมื่อพิจารณาความเร็วในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสก็พบว่า คู่ผสมที่ 16 ให้ดัชนีความเร็วในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 20.17 (ภาพที่ 18) รองลงมาคือคู่ผสมที่ 14 และ 11 โดยให้ดัชนีความเร็วในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 9.33 และ 7.67 ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 7)



ภาพที่ 17 การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนปมต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน 16 คู่ผสม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน

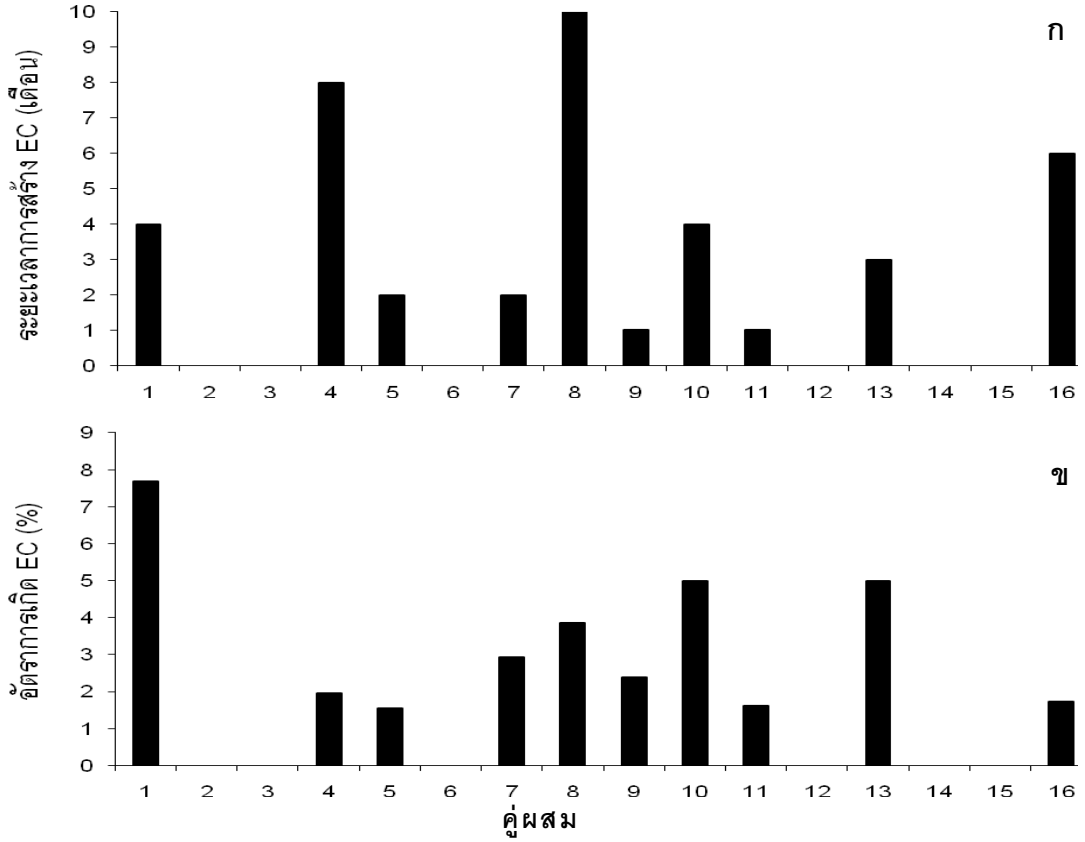


ภาพที่ 18 ดัชนีความเร็วในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน 16 คู่ผสม ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน

1.1.2 ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส/โซมาติกเอ็มบริโอ

จากการวางเลี้ยงแคลลัสอายุ 3 เดือน ของปาล์มน้ำมัน 16 คู่ผสม บนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่า แต่ละคู่ผสมเริ่มมีการสร้างแคลลัสแบบปมมากขึ้น และพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยคู่ผสมที่ 9 และ 11 ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้เร็วที่สุด 1 เดือนหลังการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือ คู่ผสมที่ 5 และ 7 โดยให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยง 2 เดือน (ภาพที่ 19ก) เมื่อพิจารณาอัตราการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส พบว่า คู่ผสมที่ 1 ให้อัตราการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 7.69 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ คู่ผสมที่ 10 และ 13 ให้อัตราการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเท่ากันคือ 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 19ข) สำหรับจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อแคลลัส

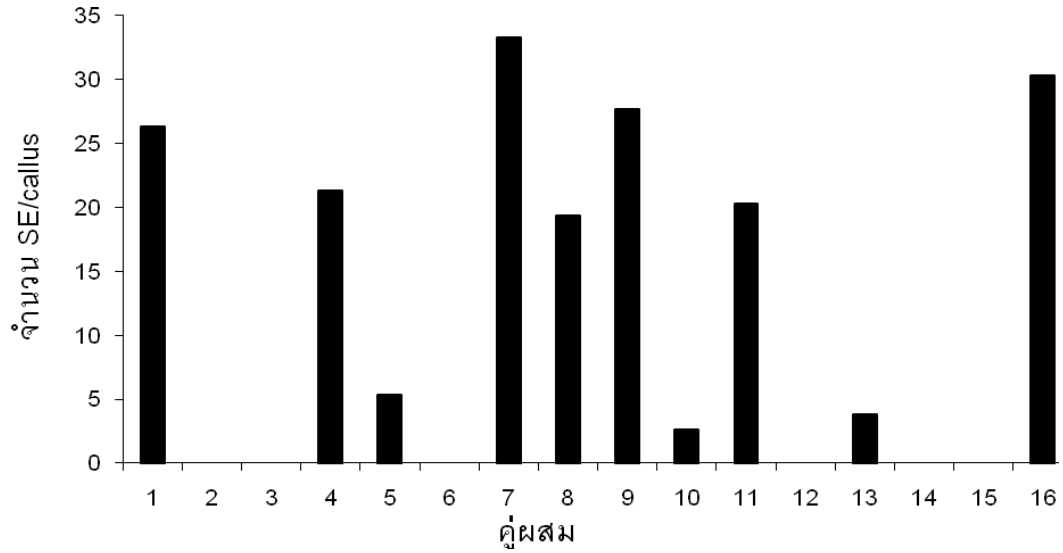
พบว่า คู่ผสมที่ 7 ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 33.33 เอ็มบริโอต่อแคลลัส รองลงมาคือคู่ผสมที่ 16 และ 9 โดยให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 30.33 และ 27.67 เอ็มบริโอต่อแคลลัส ตามลำดับ (ภาพที่ 20) แคลลัสมีการพัฒนาให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโออย่างรวดเร็วหลังการวางเลี้ยงบนอาหารที่เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งส่วนใหญ่เกิดบริเวณฐาน (ภาพที่ 21ก) และเซลล์ผิวด้านบนของแคลลัส (ภาพที่ 21ข) โดยระยะพัฒนาการของโซมาติคเอ็มบริโอที่พบ มีตั้งแต่ระยะรูปกลมไปจนถึงระยะสร้างใบเลี้ยง แตกต่างกันไปในแต่ละคู่ผสม ส่วนใหญ่จะเกาะกลุ่มไม่แยกให้เห็นเด่นชัด ยกเว้นคู่ผสมที่ 5 (ภาพที่ 22) ในขณะที่คู่ผสมที่ 2 3 6 12 14 และ 15 ไม่มีการสร้างทั้งเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ



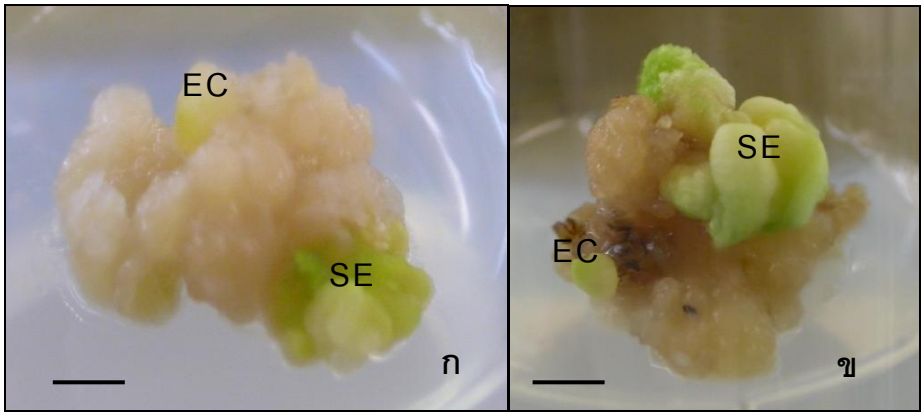
ภาพที่ 19 ระยะเวลาการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน 16 คู่ผสม หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก : ระยะเวลาการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ข : อัตราการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส



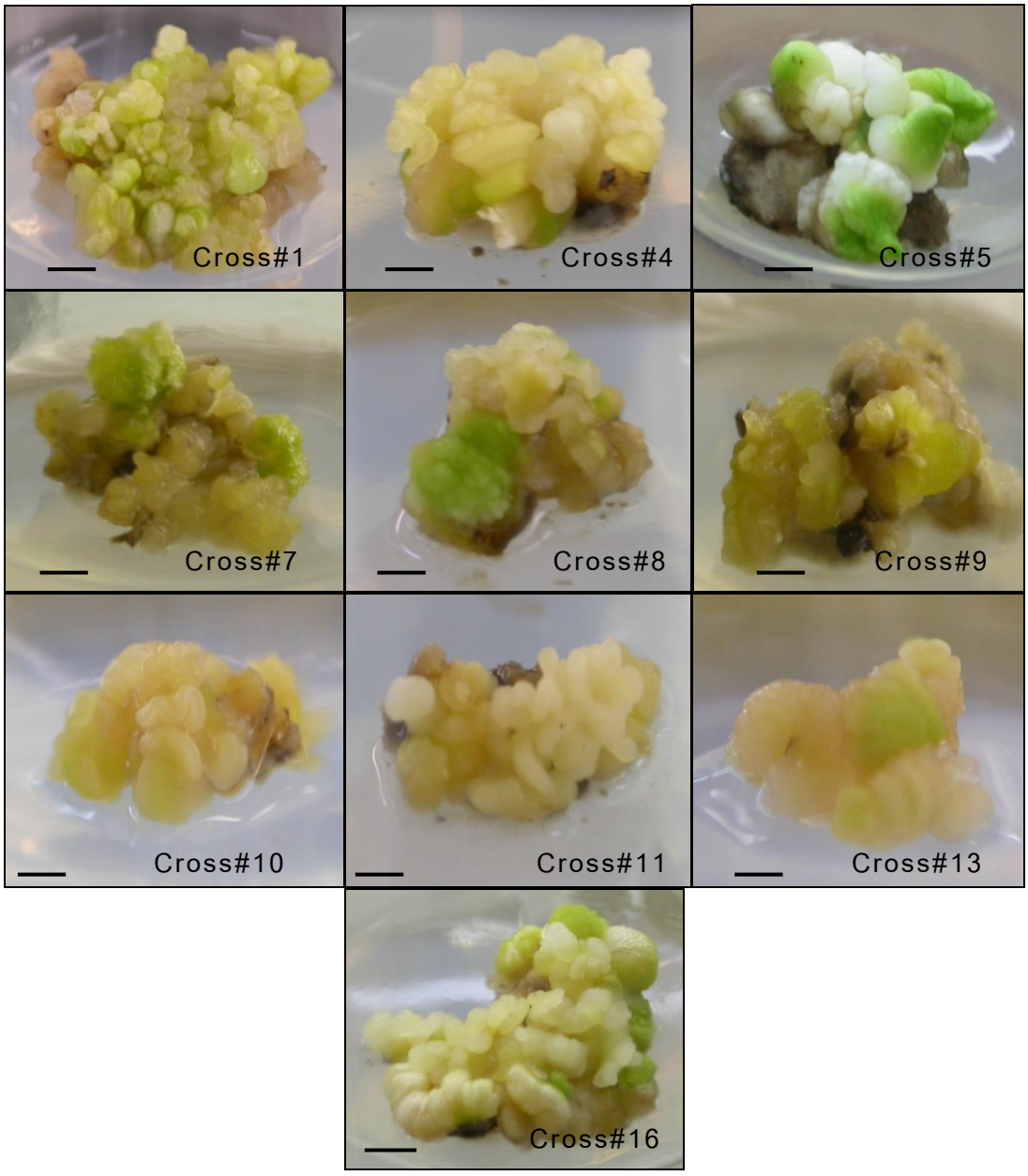
ภาพที่ 20 จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อแคลลัสของปาล์มน้ำมัน 16 คู่ผสม หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลาต่างๆ



ภาพที่ 21 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันลูกผสม จากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์ = 2.5 มิลลิเมตร) เป็นเวลา 1 เดือน

ก : EC/SE บริเวณฐานของแคลลัส

ข : EC/SE บริเวณเซลล์ผิวด้านบนแคลลัส



ภาพที่ 22 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันลูกผสม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน (บาร์ = 2 มิลลิเมตร)

1.2 ปัจจัยทางเคมี

ผลของสูตรอาหาร ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มน้ำหนักสด และจำนวนปมต่อแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่แตกต่างกัน 2 สูตร คือ สูตร MS และ Y_3 พบว่า อาหารสูตร MS ให้การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ย 316.39 สูงกว่าอาหารสูตร Y_3 ซึ่งให้น้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ย 315.93 กรัม ไม่แตกต่างทางสถิติ อาหารสูตร MS ให้การสร้างแคลลัสแบบปมสีเหลืองถึงเหลืองเข้ม (ภาพที่ 23ก-ง) พร้อมที่จะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในขณะที่การวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร Y_3 ให้การสร้างแคลลัสสีเหลืองเข้มมีลักษณะคล้ายเมือกปกคลุมที่ผิวแคลลัส (ภาพที่ 23จ-ซ) และเมื่อย้ายเลี้ยงเป็นระยะเวลานานแคลลัสเหล่านี้จะพัฒนาเป็นแคลลัสแบบเส้นคล้ายราก และไม่พัฒนาให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (ภาพที่ 24) อย่างไรก็ตามการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสในช่วงแรกเพิ่มขึ้นทีละน้อย และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในเดือนที่ 2 และ 3 ในขณะที่คู่ผสมที่ 1 4 5 11 14 และ 15 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย และตายในที่สุด

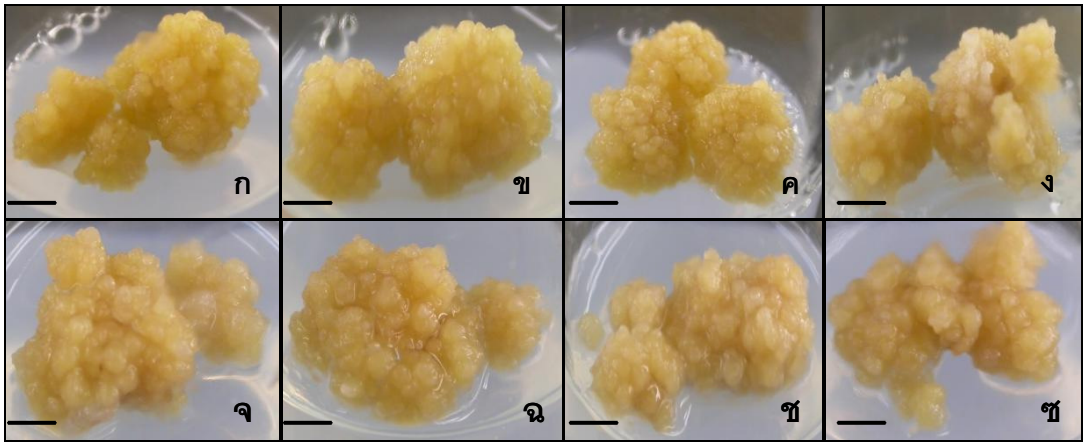
เมื่อพิจารณาผลของคู่ผสมต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสพบว่า คู่ผสมที่ 2 ให้การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 399 กรัม รองลงมาคือ คู่ผสมที่ 8 และ 13 โดยให้น้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ย 381.02 และ 347.38 กรัม ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 2) การวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่เติม dicamba ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ ที่ความเข้มข้น 2 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัสพบว่า การวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS และ Y_3 เติม dicamba ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ การเติม dicamba ความเข้มข้น 2 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.5 2 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ย 368.34 331.24 และ 293.82 กรัม ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตร Y_3 ให้น้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ย 345.2 337.14 และ 296.08 กรัม ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 2) ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสูตรอาหาร และระดับความเข้มข้นของ dicamba มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัสอย่าง

มีนัยสำคัญ ในขณะที่คู่ผสม สูตรอาหาร ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างคู่ผสมและสูตรอาหาร คู่ผสมและระดับความเข้มข้นของ dicamba รวมทั้งปฏิกิริยาสัมพันธ์ทั้ง 3 ปัจจัย มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 8) เมื่อพิจารณาโครงสร้างของแคลลัสที่ได้จากแต่ละระดับความเข้มข้นของ dicamba พบว่า dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนปมสูงสุด รวมถึงให้ลักษณะของแคลลัสสีเหลืองเข้ม ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นๆ ให้สีครีม ดังนั้นจึงนำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

เมื่อย้ายแคลลัสจากสูตรอาหารและระดับความเข้มข้นของ dicamba ที่ดีที่สุดจากข้างต้น มาวางเลี้ยงบนอาหารที่เติม dicamba และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-1 มิลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารที่เติม dicamba ให้การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ย 458.76 กรัม สูงกว่าอาหารที่เติม 2,4-D ซึ่งให้น้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ย 434.44 กรัม แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 3) การเติม dicamba และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-0.3 มิลิกรัมต่อลิตร ให้การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดในช่วง 453-512 กรัม เมื่อพิจารณาคู่ผสมต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสพบว่า คู่ผสมที่ 2 ให้การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 718 กรัม รองลงมาคือ คู่ผสมที่ 13 และ 8 โดยให้การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ย 688.83 และ 623.88 กรัม ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 3) คู่ผสม ชนิด และระดับความเข้มข้นของออกซิน และปฏิกิริยาสัมพันธ์ทั้ง 2 และ 3 ปัจจัย มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 9)

เมื่อพิจารณาการสร้างปมของแคลลัสพบว่า dicamba ส่งเสริมการสร้างปมเฉลี่ย 28 ปมต่อแคลลัส สูงกว่า 2,4-D ซึ่งให้การสร้างปมเฉลี่ย 25.59 ปมต่อแคลลัส แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 4) การเติม dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างปมเฉลี่ยสูงสุด 32.99 ปมต่อแคลลัส รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างปมเฉลี่ย 29.11 และ 25.68 ปมต่อแคลลัส ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 4) เมื่อพิจารณาคู่ผสมต่อการสร้างปมของแคลลัส พบว่าคู่ผสมที่ 8 ให้การสร้างปมเฉลี่ยสูงสุด 61.9 ปมต่อแคลลัส รองลงมาคือ คู่ผสมที่ 7 และ 3 โดยให้การสร้างปมเฉลี่ย 52.8 และ 40.3 ปมต่อแคลลัส ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 4) ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างชนิด และระดับความเข้มข้นของออกซิน มีผลต่อการสร้างปมของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่คู่ผสม ชนิด และระดับความเข้มข้นของออกซิน และ

ปฏิกิริยาสัมพันธ์ทั้ง 2 และ 3 ปัจจัย มีผลต่อการสร้างปมของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 10)



ภาพที่ 23 ลักษณะของแคลลัสของปาล์มน้ำมันลูกผสม ที่ชักนำการเพิ่มปริมาณบนอาหาร 2 สูตรร่วมกับการเติม dicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 เดือน

ก : MS + dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ข : MS + dicamba ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ค : MS + dicamba ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

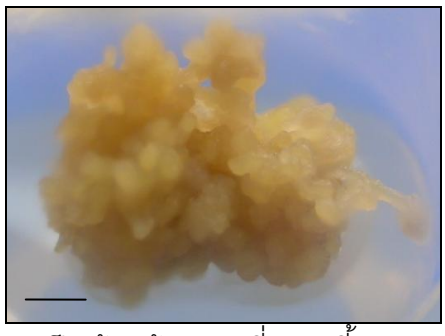
ง : MS + dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

จ : Y3 + dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ฉ : Y3 + dicamba ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ช : Y3 + dicamba ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ซ : Y3 + dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 24 แคลลัสที่มีลักษณะเป็นเส้นคล้ายราก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 เป็นเวลา 5 เดือน (บาร์ = 1.5 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 2 ผลของคู่ผสม สูตรอาหาร และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

คู่ผสม \ สูตรอาหาร	น้ำหนักสดคลลัส (มก.)								ค่าเฉลี่ย[3] คู่ผสม
	MS+Di (มก/ล)				Y3+Di (มก/ล)				
	1	1.5	2	2.5	1	1.5	2	2.5	
2	464	405	500	328	234	453	490	318	399.00A
3	260.6	291.2	225.8	201.8	237.4	328	307	289	267.60E
6	207	266.2	262	269	200	269.6	391	259	265.48E
7	365	340	404	259.8	348	385	331.6	312	343.18B
8	357	337	420	233.2	447	547	409	298	381.02A
9	247	567	236.6	278	282.4	240.2	255.8	266	296.63CD
10	276	468	216	299	242	258.2	210	290	282.40DE
12	228.6	351	314	233	274	268	269	223	270.08D
13	285	378	345	367	348	365	335	356	347.38B
16	248	280	389	253	348	338	373	242	308.88C
ค่าเฉลี่ย[1] ระดับความเข้มข้น	293.82C	368.34A	331.24B	272.18C	296.08C	345.20A	337.14B	285.30C	**
ค่าเฉลี่ย[2] สูตรอาหาร	316.39A				315.93A				C.V. (%) 21.62

** : แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

[1, 2, 3] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 3 ผลของคู่ผสม ชนิด และความเข้มข้นของออกซินต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

คู่ผสม \ ออกซิน	Dicamba				2,4-D				ค่าเฉลี่ย[3] คู่ผสม
	ระดับความเข้มข้น (มก/ล)								
	0.1	0.3	0.5	1	0.1	0.3	0.5	1	
2	766	838	770	622	712	858	588	590	718.00A
3	470	556	486	560	550	486	408	390	488.25D
6	160	136	114	118	134	126	142	106	129.50F
7	732	526	590	473	616	666	652	608	607.88B
8	760	834	540	548	534	740	539	496	623.88B
9	684	594	537	434	529	742	536	374	553.78C
10	146	130	112	116	108	136	104	112	120.50F
12	144	142	134	138	114	114	106	106	124.75F
13	718	874	694	580	792	765	605.6	482	688.83A
16	542	303	360	369	448	492	492	279	410.63E
ค่าเฉลี่ย[1] ระดับความเข้มข้น	512.20A	493.32AB	433.70CD	395.80D	453.70BC	512.50A	417.26CD	354.30E	**
ค่าเฉลี่ย[2] ออกซิน	458.76A				434.44B				C.V. (%) 25.03

** : แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

[1, 2, 3] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 4 ผลของคู่ผสม ชนิด และความเข้มข้นของออกซินต่อการสร้างปมของแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

ออกซิน / คู่ผสม	Dicamba				2,4-D				ค่าเฉลี่ย[3] คู่ผสม
	ระดับความเข้มข้น (มก/ล)								
	0.1	0.3	0.5	1	0.1	0.3	0.5	1	
2	43.4	49.4	31.2	31.8	38.6	39.8	29.4	26.2	36.23D
3	45.8	52	37.4	34.8	43.6	44.6	34.4	27.6	40.03C
6	3.6	3.9	3.3	2.6	3.3	3.9	3.8	3.9	3.54G
7	55	67.8	50.8	49	52.4	57.2	46	44.2	52.80B
8	64.6	75.8	61.2	54.8	64.6	67	56.4	50.8	61.90A
9	19.4	21.2	17.2	17.6	19.6	20.4	16.8	16.6	18.60F
10	3.9	3.9	4.2	2.9	3.5	3.5	4.2	3.8	3.74G
12	2.2	3.3	3.1	3	3.8	4	3.7	3.5	3.33G
13	33.8	35.8	28.6	26.8	32.8	34	25.2	25	30.25E
16	19.4	16.8	19.8	19	19	14.8	16.4	15.4	17.58F
ค่าเฉลี่ย[1] ระดับความเข้มข้น	29.11B	32.99A	25.68C	24.23CD	28.12B	28.92B	23.63D	21.70E	ns
ค่าเฉลี่ย[2] ออกซิน	28.00A				25.59B				C.V. (%) 18.68

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

[1, 2, 3] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

1.3 ปัจจัยทางกายภาพ

ผลของความเข้มแสงต่อการเพิ่มน้ำหนักสด และจำนวนปมต่อแคลลัส

จากการวางเลี้ยงแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มแสง 19 22 25 และ 27 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่า การวางเลี้ยงแคลลัสภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 478.50 กรัม รองลงมาคือ การวางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 27 และ 22 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยให้การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ย 461.30 และ 461.10 กรัม ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 5) และเมื่อพิจารณาคู่ผสมต่อการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัสพบว่า คู่ผสมที่ 7 ให้การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 673.50 กรัม รองลงมาคือ คู่ผสมที่ 2 และ 3 โดยให้น้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ย 642 และ 617 กรัม ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 5) คู่ผสม ระดับความเข้มแสง มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 11)

จากการวางเลี้ยงแคลลัสที่ความเข้มแสง 19 22 25 และ 27 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่า การวางเลี้ยงแคลลัสภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้การสร้างปมเฉลี่ยสูงสุด 32.96 ปมต่อแคลลัส รองลงมาคือ การวางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 25 และ 27 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้การสร้างปมเฉลี่ย 28.94 และ 25.68 ปมต่อแคลลัส ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อพิจารณาผลของคู่ผสมต่อการสร้างปมของแคลลัสพบว่า คู่ผสมที่ 8 ให้การสร้างปมเฉลี่ยสูงสุด 55 ปมต่อแคลลัส รองลงมาคือ คู่ผสมที่ 7 และ 3 ให้การสร้างปมเฉลี่ย 48.48 และ 39 ปมต่อแคลลัส ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 6) คู่ผสม ระดับความเข้มแสง และปฏิกิริยาสัมพันธ์ทั้ง 2 ปัจจัย มีผลต่อการสร้างปมของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 12)

ตารางที่ 5 ผลของคู่ผสม และระดับความเข้มแสง ต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสปาล์มน้ำมันหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

ความเข้มแสง[1] / คู่ผสม	19	22	25	27	ค่าเฉลี่ย[3] $_{\text{คู่ผสม}}$
2	626defgh	630defg	686ab	626defgh	642.00B
3	580hi	600efgh	646bcde	642bcde	617.00C
6	142l	136l	160l	154l	151.50E
7	660bcd	678abc	648bcde	708a	673.50A
8	588fghi	624defgh	637cdef	604efgh	613.25C
9	548i	618defgh	618defgh	581ghi	591.25C
10	134l	140l	146l	140l	141.25E
12	136l	142l	144l	142l	141.00E
13	588fghi	590fghi	658bcd	586ghi	605.50C
16	392k	438j	438j	430jk	424.50D
ค่าเฉลี่ย[2] $_{\text{ความเข้มแสง}}$	439.4C	461.10B	478.50A	461.30B	ns
					C.V. (%) 11.94

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

[1] : ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที

[2, 3] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 6 ผลของคู่ผสม และระดับความเข้มแสงต่อการสร้างปมของแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

คู่ผสม \ ความเข้มแสง[1]	19	22	25	27	ค่าเฉลี่ย[3] $_{\text{คู่ผสม}}$
2	18kl	43.4g	49.4ef	31.2ij	35.50D
3	20.8k	45.8fg	52de	37.4h	39.00C
6	3n	2n	3.2n	3.6n	2.95G
7	19.6k	55.7d	67.8b	50.8e	48.48B
8	18.4kl	64.6bc	75.8a	61.2c	55.00A
9	14.2l	19.4k	21.2k	17.2kl	18.00F
10	3n	2.5n	3.9n	4n	3.35G
12	3.3n	2.8n	3.7n	3n	3.20G
13	21.2k	33.8hi	35.8h	28.6j	29.85E
16	8.4m	19.4k	16.8kl	19.8k	16.10F
ค่าเฉลี่ย[2] $_{\text{ความเข้มแสง}}$	12.99D	28.94B	32.96A	25.68C	**
					C.V. (%) 22.66

** : แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

[1] : ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที

[2, 3] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำ SSE และการงอกของต้นอ่อน

2.1 ปัจจัยทางชีวภาพ

ผลของคู่ผสม ระยะพัฒนาการ และขนาดโซมาติกเอ็มบริโอต่อการชักนำและการงอกของ SSE

จากการชักนำ SSE ของคู่ผสมที่ 7 และ 16 โดยการวางเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม (GE) และระยะสร้างใบเลี้ยง (HE) ขนาดต่างๆ (ภาพที่ 25) บนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน ได้ผลการทดลองดังนี้

การสร้าง SSE

การวางเลี้ยง HE ของคู่ผสมที่ 7 ให้เปอร์เซ็นต์การสร้าง SSE เฉลี่ย 57.33 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าคู่ผสมที่ 16 ซึ่งให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 54.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) เมื่อพิจารณาขนาดของ HE ต่อการสร้าง SSE พบว่า HE ขนาด 9 มิลลิเมตร สูงสุดรองลงมาคือ ขนาด 7 และ 12 ตามลำดับ โดยคู่ผสมที่ 7 ให้การสร้าง 80 66.67 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่คู่ผสมที่ 16 ให้การสร้าง 73.33 66.67 และ 53.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

การวางเลี้ยง HE บนอาหารสูตรชักนำการสร้าง SSE ข้างต้น เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า หลังวางเลี้ยง 1 เดือน โซมาติกเอ็มบริโอเริ่มมีการสร้าง SSE โดยการวางเลี้ยง HE เป็นเวลา 2 เดือน ให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 15.9 SSE/HE สูงกว่าการวางเลี้ยง 1 เดือน ซึ่งให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 5.9 SSE/HE แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 8) โดยในช่วงเดือนแรกคู่ผสมที่ 16 ให้การสร้าง SSE สูงสุด 6.2 SSE/HE และเพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า ในเดือนที่ 2 โดยให้การสร้าง SSE 18 SSE/HE ในขณะที่คู่ผสมที่ 7 ให้การสร้าง SSE ในเดือนแรก 5.6 SSE/HE และเพิ่มขึ้นเป็น 2-3 เท่า ในเดือนที่ 2 โดยให้การสร้าง SSE 13.8 SSE/HE แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อพิจารณาผลของคู่ผสมต่อการสร้าง SSE พบว่า คู่ผสมที่ 16 ให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 12.1 SSE/HE สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การสร้างเฉลี่ย 9.7 SSE/HE แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่

8) คู่ผสม ระยะเวลาการวางเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอ และปฏิกิริยาสัมพันธ์ทั้ง 2 ปัจจัย มีผลต่อการสร้าง SSE อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 13)

การวางเลี้ยง GE และ HE บนอาหารสูตรข้างต้น พบว่า HE เท่านั้นที่ให้การสร้าง SSE โดยให้อัตราการสร้าง SSE เฉลี่ย 11.80 SSE/HE ในขณะที่ GE มีการพัฒนาเข้าสู่ HE แต่ไม่มีการสร้าง SSE (อัตราการสร้าง SSE เฉลี่ยเท่ากับ 0) แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 9) และ GE บางส่วนเกิดการสร้างแคลลัสแบบหลวมๆ (ภาพที่ 26) เมื่อพิจารณการสร้าง SSE พบว่า คู่ผสมที่ 16 ให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 7.20 SSE/HE สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 4.60 SSE/HE แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อพิจารณาผลของขนาด HE ต่อการสร้าง SSE พบว่า HE ขนาด 9 มิลลิเมตร ให้การสร้าง SSE เฉลี่ยสูงสุด 7.95 SSE/HE รองลงมาคือ ขนาด 12 และ 7 มิลลิเมตร ซึ่งให้การสร้าง 7.1 และ 6.9 SSE/HE ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 9)

เมื่อพิจารณาผลของคู่ผสมและขนาด HE ต่อการสร้าง SSE พบว่า การวางเลี้ยง HE ขนาด 9 มิลลิเมตร ของคู่ผสมที่ 16 ให้การสร้าง SSE สูงสุด 18 SSE/HE รองลงมาคือขนาด 7 และ 5 มิลลิเมตร ซึ่งให้การสร้าง SSE 16.8 และ 16 SSE/HE ตามลำดับ ในขณะที่การวางเลี้ยง HE ขนาด 9 มิลลิเมตร ของคู่ผสมที่ 7 ให้การสร้าง SSE สูงสุด 13.8 SSE/HE รองลงมาคือขนาด 12 และ 7 มิลลิเมตร ซึ่งให้การสร้าง SSE 13.6 และ 10.8 SSE/HE ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 9) คู่ผสม ระยะพัฒนาการ และขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอ รวมทั้งปฏิกิริยาสัมพันธทั้ง 2 และ 3 ปัจจัย มีผลต่อการสร้าง SSE อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 14)

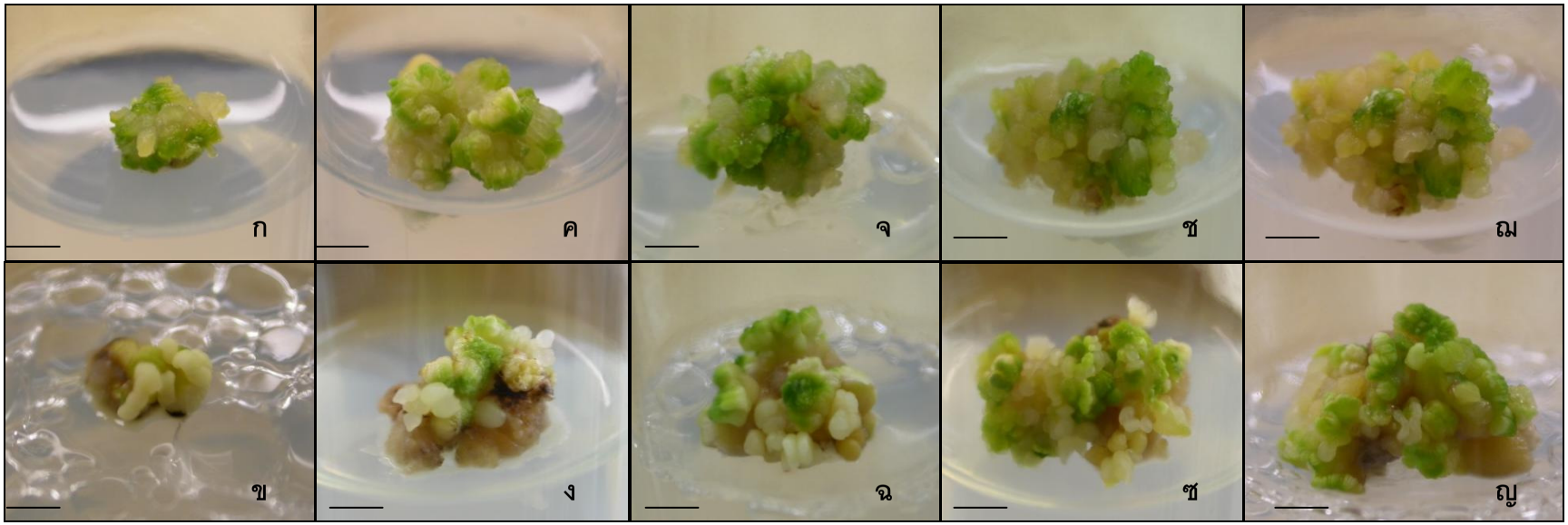
การงอกของ SSE

เมื่อนำ SSE ที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยงทุกขนาดมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในสภาพเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า คู่ผสมที่ 16 ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE เฉลี่ย 47.23 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE เฉลี่ย 40.27 เปอร์เซ็นต์ SSE ที่สร้างจาก HE ขนาด 9 มิลลิเมตร ของ

คู่ผสมที่ 16 ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด 63.63 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่คู่ผสมที่ 7 ให้เปอร์เซ็นต์การงอก 58.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10)

ระยะเวลาการวางเลี้ยงมีผลต่อการงอกของ SSE โดยในช่วงเดือนแรก SSE ยังไม่มีการงอกแต่อย่างใด แต่ในช่วงเดือนที่ 2 SSE เริ่มมีการงอกเป็นยอด และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบการงอกเป็นยอดเพิ่มขึ้น 4 เท่า ในคู่ผสมที่ 7 คือ จาก 4.07 เป็น 16.8 ยอดต่อชิ้นส่วน และเพิ่มขึ้น 2 เท่า ในคู่ผสมที่ 16 คือ จาก 7.2 เป็น 18.6 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 11) ในช่วงการวางเลี้ยง 1-2 เดือนแรกไม่พบการงอกเป็นรากและต้นที่สมบูรณ์ มีเพียงการงอกเป็นยอดเท่านั้น แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 3 เดือน จึงพบการงอกเป็นรากและต้นที่สมบูรณ์ โดยพบการงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์เฉลี่ย 0.6-0.8 ต้นต่อชิ้นส่วน และการงอกเป็นราก 0.2 รากต่อชิ้นส่วน เท่านั้น (ตารางที่ 11)

เมื่อพิจารณาผลของคู่ผสมต่อการงอกของ SSE พบว่า คู่ผสมที่ 7 ให้การงอกเฉลี่ย 4.27 สูงกว่าคู่ผสมที่ 16 ซึ่งให้การงอกเฉลี่ย 3.99 แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 12) ส่วนขนาดของ HE ต่อการงอกของ SSE พบว่า SSE ที่สร้างจาก HE ขนาด 9 มิลลิเมตร ให้การสร้างยอดเฉลี่ยสูงสุด 17.7 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือ ขนาด 7 และ 3 มิลลิเมตร ซึ่งให้การสร้างยอดเฉลี่ย 12.7 และ 9.3 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 12) เมื่อพิจารณาผลของคู่ผสมและขนาด HE ต่อการงอกของ SSE พบว่า HE ขนาด 9 มิลลิเมตร ของคู่ผสมที่ 16 ให้การสร้างยอดสูงสุด 18.6 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่คู่ผสมที่ 7 ให้การสร้าง 16.8 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อพิจารณาการงอกของ SSE พบว่า ส่วนใหญ่ให้การสร้างยอดเฉลี่ย 11.4 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 12) ขนาดของ HE ที่ใช้ในการชักนำ SSE เป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการงอกยอดอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 15) คู่ผสมที่ 7 ให้การงอกรากเฉลี่ย 0.44 รากต่อชิ้นส่วน สูงกว่าคู่ผสมที่ 16 ซึ่งให้การงอกราก 0.28 รากต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 13) ในขณะที่คู่ผสมที่ 16 ให้การงอกต้นที่สมบูรณ์เฉลี่ย 0.68 ต้นต่อชิ้นส่วน สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การงอกต้นที่สมบูรณ์ 0.56 ต้นต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 14) โดยพัฒนาการของ SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกข้างต้น เริ่มจาก SSE ซึ่งอยู่ในระยะรูปกลมจนถึงระยะทอร์ปิโดสีขาวขุ่น (ภาพที่ 27ก) เริ่มมีการงอก (ภาพที่ 27ข-ค) และให้การสร้างยอด (ภาพที่ 27ง) รวมถึงต้นที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 27จ) มี SSE บางกลุ่มที่มีการพัฒนาให้รากเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 27ฉ)



ภาพที่ 25 พัฒนาการของ SSE ที่ชักนำจาก HE ขนาดต่างๆ หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

ก-ข : HE ขนาด 3 มิลลิเมตร ของคู่ผสมที่ 7 และ 16 (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ค-ง : HE ขนาด 5 มิลลิเมตร ของคู่ผสมที่ 7 และ 16 (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

จ-ฉ : HE ขนาด 7 มิลลิเมตร ของคู่ผสมที่ 7 และ 16 (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ช-ซ : HE ขนาด 9 มิลลิเมตร ของคู่ผสมที่ 7 และ 16 (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ฌ-ญ : HE ขนาด 12 มิลลิเมตร ของคู่ผสมที่ 7 และ 16 (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 7 ผลของคู่ผสม และขนาด HE ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้าง SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

คู่ผสม	ขนาด HE (มม.)	การสร้าง SSE (%)	การสร้าง SSE เฉลี่ย (%)
7	3	33.33	57.33
	5	46.67	
	7	66.67	
	9	80	
	12	60	
16	3	26.67	54.67
	5	53.33	
	7	66.67	
	9	73.33	
	12	53.33	

ตารางที่ 8 ผลของคู่ผสม และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการสร้าง SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (เดือน) \ คู่ผสม	จำนวน SSE/HE		ค่าเฉลี่ย$^{2}_{\text{ระยะเวลา}}$
	7	16	
1	5.6c	6.2c	5.9B
2	13.8b	18a	15.9A
ค่าเฉลี่ย$^{1}_{\text{คู่ผสม}}$	9.7B	12.1A	**
			C.V. (%) 11.89

** : แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

[1, 2] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

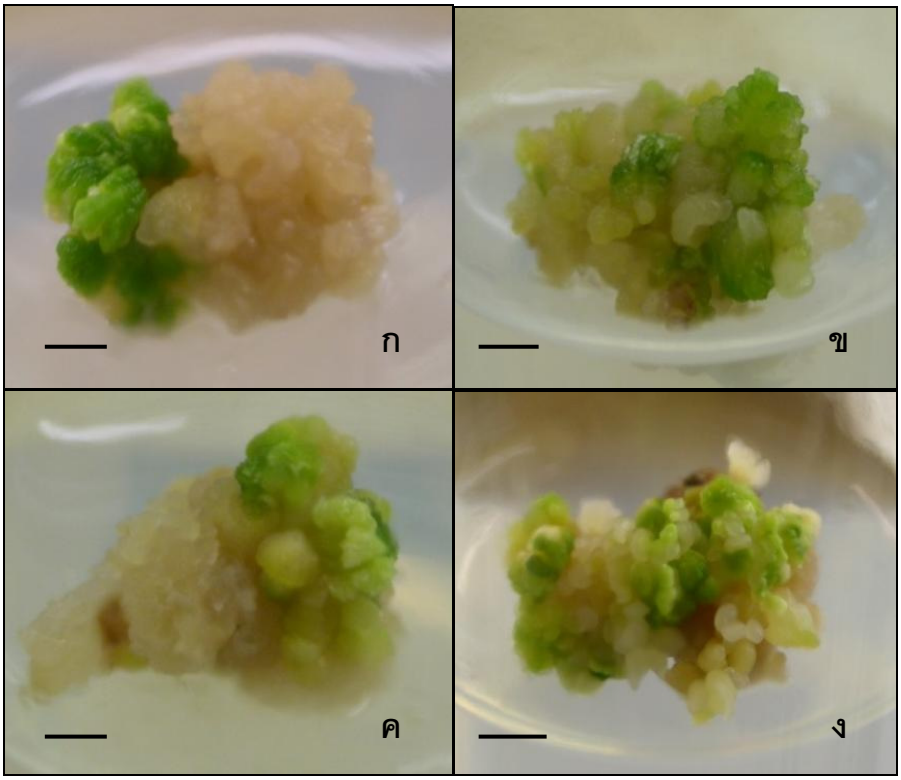
ตารางที่ 9 ผลของคู่ผสม ระยะพัฒนาการ และขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอต่อการสร้าง SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

คู่ผสม \ การสร้าง SSE	ระยะพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอ										
	GE					HE					
	ขนาดของ SE (มม.)										
	3	5	7	9	12	3	5	7	9	12	ค่าเฉลี่ย[3] คู่ผสม
7	0i	0i	0i	0i	0i	3h	4.8g	10.8e	13.8d	13.6d	4.60B
16	0i	0i	0i	0i	0i	6.4f	16b	16.8b	18a	14.8c	7.20A
ค่าเฉลี่ย[1] ขนาด SE	0.0E	0.0E	0.0E	0.0E	0.0E	2.35D	5.2C	6.9B	7.95A	7.1B	**
ค่าเฉลี่ย[2] ระยะพัฒนาการของ SE			0.00B					11.80A			
											C.V. (%) 23.69

** : แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

[1, 2, 3] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 26 พัฒนาการของ SSE จาก GE และ HE หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

ก : HE ของคู่ผสมที่ 7 (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ข : HE ของคู่ผสมที่ 16 (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ค : HE ของคู่ผสมที่ 7 (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ง : HE ของคู่ผสมที่ 16 (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 10 ผลของคู่ผสม และขนาดของ HE ที่สร้าง SSE ต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

คู่ผสม	ขนาด HE (มม.)	การงอกของ SSE (%)	การงอกของ SSE เฉลี่ย (%)
7	3	20	40.27
	5	28.57	
	7	50	
	9	58.33	
	12	44.44	
16	3	25	47.23
	5	37.5	
	7	60	
	9	63.63	
	12	50	

ตารางที่ 11 การงอกของ SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

คู่ผสม	การงอก (เดือน)	จำนวนยอดเฉลี่ย	จำนวนต้นที่สมบูรณ์เฉลี่ย	จำนวนรากเฉลี่ย
7	1	0d	0	0
	2	4.2c	0	0
	3	16.8a	0.6	0.2
16	1	0d	0	0
	2	7.2b	0	0
	3	18.6a	0.8	0.2
F-test		**	-	-
C.V. (%)		24.59		

** : แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

- : ไม่วิเคราะห์ข้อมูล

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 12 ผลของคู่ผสม และขนาดของ HE ต่อการงอกยอดเฉลี่ยของปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

ขนาด HE (มม.) / คู่ผสม	จำนวนยอดเฉลี่ย					
	3	5	7	9	12	ค่าเฉลี่ย[3] $_{\text{คู่ผสม}}$
7	9.2d	8d	12.4c	16.8b	8.4d	10.96A
16	9.4d	9.8d	13c	18.6a	8.4d	11.84A
ค่าเฉลี่ย[1] $_{\text{ขนาด SE}}$	9.3C	8.9C	12.7B	17.7A	8.4C	ns
						C.V. (%) 24.4

** : แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

[1, 2] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

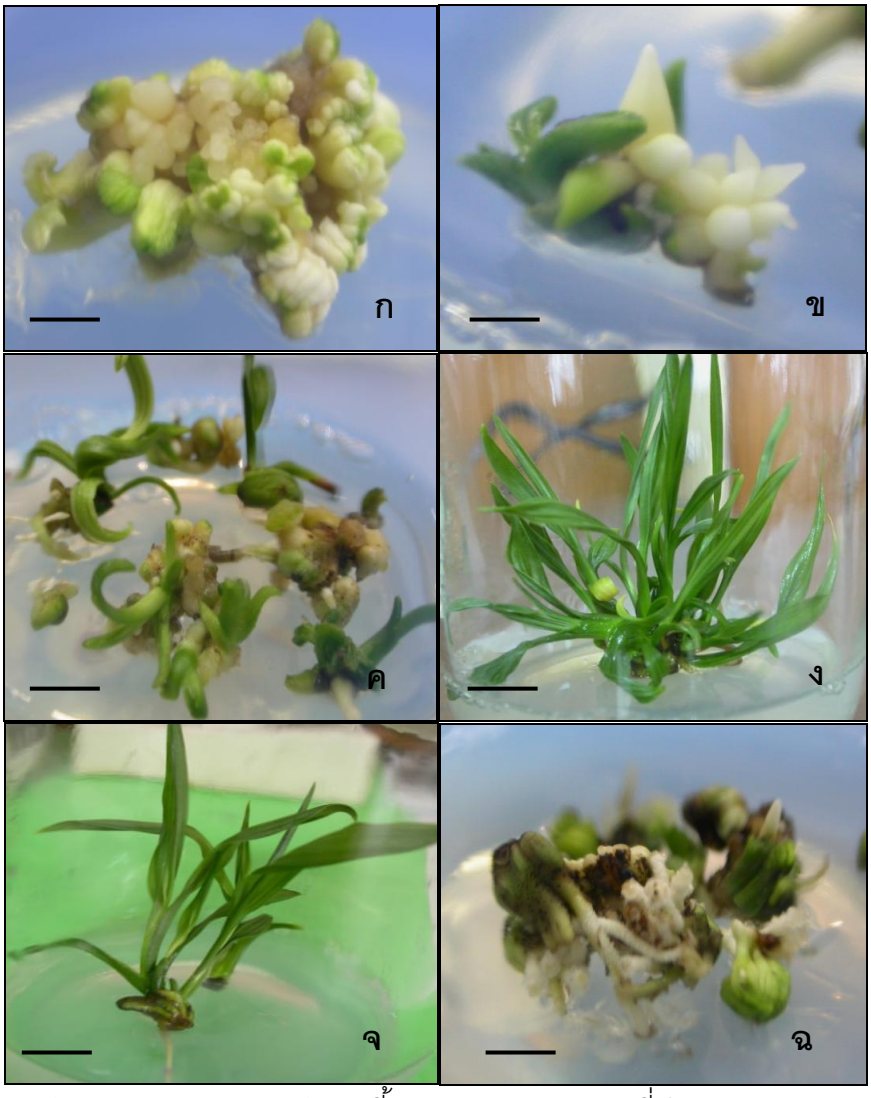
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 13 ผลของคู่ผสม และขนาดของ HE ต่อการงอกรากเฉลี่ยของปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

ขนาด HE (มม.) / คู่ผสม	จำนวนรากเฉลี่ย					
	3	5	7	9	12	เฉลี่ย
7	0.6	0.4	0.6	0.2	0.4	0.44
16	0.4	0.2	0.4	0.2	0.2	0.28

ตารางที่ 14 ผลของคู่ผสม และขนาดของ HE ต่อการงอกต้นที่สมบูรณ์เฉลี่ยของปาล์มน้ำมันหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

ขนาด HE (มม.) / คู่ผสม	จำนวนต้นที่สมบูรณ์เฉลี่ย					
	3	5	7	9	12	ค่าเฉลี่ย
7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.4	0.56
16	0.8	0.6	0.8	0.8	0.4	0.68



ภาพที่ 27 พัฒนาการของ SSE หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน

ก : SSE ที่เริ่มวางเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำการงอก (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ข : SSE ในระยะสร้างใบเลี้ยงกำลังงอก หลังเพาะเลี้ยง 1 เดือน (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ค : พัฒนาการของยอด และราก หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ง : พัฒนาการให้ยอดรวม หลังเพาะเลี้ยง 3 เดือน (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

จ : พัฒนาการให้ต้นที่สมบูรณ์ หลังเพาะเลี้ยง 3 เดือน (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ฉ : พัฒนาการเฉพาะราก หลังเพาะเลี้ยง 3 เดือน (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

2.2 ปัจจัยทางเคมี

2.2.1 ผลของแหล่งคาร์บอน และระดับความเข้มข้น ต่อการชักนำและการงอกของ SSE

จากการเพาะเลี้ยง HE ของคู่ผสมที่ 7 และ 16 บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาล 5 ชนิด คือ ซอร์บิทอล แมนนิทอล ซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส ความเข้มข้นชนิดละ 0.1 และ 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า การเพาะเลี้ยง HE บนอาหารที่เติมน้ำตาลทุกชนิด (ยกเว้นน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.2 โมลาร์) ส่งเสริมการสร้าง SSE และการงอกของ SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการสังเกตพบว่า การวางเลี้ยง HE เป็นเวลา 3 เดือน เกิดการตายของ HE จากชิ้นส่วนเดิมรุกรามไปยัง SSE ที่สร้างขึ้นใหม่ (ภาพที่ 28) และพบว่า SSE เกิดจากบริเวณฐาน และผิวด้านบนของ HE หลังการวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 เดือน (ภาพที่ 29) คู่ผสม แหล่งคาร์บอน และระดับความเข้มข้นมีผลต่อการสร้าง และการงอกของ SSE ดังนี้

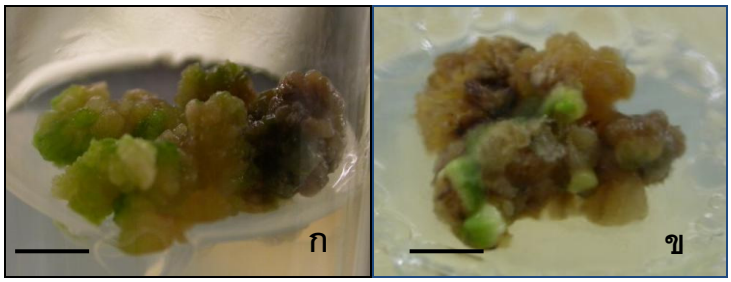
การสร้าง SSE

การวางเลี้ยง HE บนอาหารสูตร MS เติมแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า คู่ผสมที่ 16 ให้เปอร์เซ็นต์การสร้าง SSE เฉลี่ย 40 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การสร้าง 34 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15) เมื่อพิจารณาชนิดและระดับความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการสร้าง SSE พบว่า ในคู่ผสมที่ 7 น้ำตาลซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การสร้าง SSE สูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ น้ำตาลซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซึ่งให้การสร้าง SSE 66.67 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้การสร้าง SSE 53.33 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่คู่ผสมที่ 16 น้ำตาลซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การสร้าง SSE สูงสุด 73.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซึ่งให้การสร้าง SSE 66.67 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้การสร้าง SSE เท่ากันคือ 46.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15)

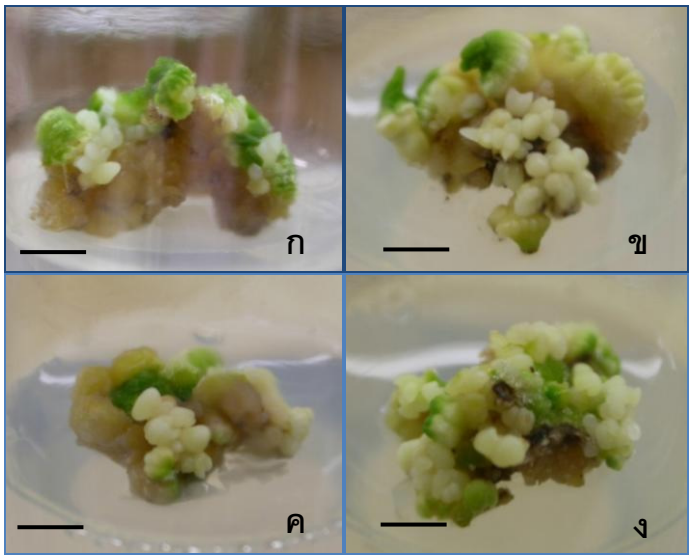
เมื่อพิจารณาชนิดของน้ำตาลต่อการสร้าง SSE พบว่า น้ำตาลซอร์บิทอลให้การสร้าง SSE เฉลี่ยสูงสุด 9.25 SSE/HE รองลงมาคือ น้ำตาลแมนนิทอล และฟรุกโตส ซึ่งให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 7.25 และ 1.9 SSE/HE ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และน้ำตาลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้การสร้าง SSE สูงกว่าความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และเมื่อพิจารณาคู่ผสมต่อการสร้าง SSE หลังการวางเลี้ยง HE บนอาหารที่เติมน้ำตาลชนิด และความเข้มข้นต่างๆ พบว่า คู่ผสมที่ 16 ให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 5.03 SSE/HE สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 3.22 SSE/HE แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 16) ในขณะที่การวางเลี้ยง HE บนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ส่งผลให้ HE เกิดการตายทั้งก้อน (ภาพที่ 30) คู่ผสม แหล่งคาร์บอน และระดับความเข้มข้น รวมทั้งปฏิกิริยาสัมพันธ์ทั้ง 2 และ 3 ปัจจัย มีผลต่อการสร้าง SSE อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 16)

การงอกของ SSE

เมื่อนำ SSE จากแต่ละแหล่งคาร์บอน และระดับความเข้มข้น มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า คู่ผสมที่ 16 ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE เฉลี่ย 39.19 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การงอก 37.42 เปอร์เซ็นต์ การวางเลี้ยง HE ของคู่ผสมที่ 16 และ 7 บนอาหารที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE สูงสุด 63.33 และ 58.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 17) SSE ที่ชักนำบนอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้การงอกสูงกว่าที่ชักนำจากความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และ SSE ของคู่ผสมที่ 16 ที่ได้จากทุกแหล่งคาร์บอน และทุกระดับความเข้มข้นให้การตอบสนองต่อการงอก หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตรข้างต้นเฉลี่ย 7.84 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การงอกเฉลี่ย 5.26 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และ SSE ที่ได้จากการชักนำบนอาหารที่เติมซอร์บิทอลให้การงอกเฉลี่ยสูงสุด 13 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือ แมนนิทอล และฟรุกโตส ซึ่งให้การงอกเฉลี่ย 8.7 และ 5.5 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 18) คู่ผสม แหล่งคาร์บอนและระดับความเข้มข้น และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างคู่ผสมและแหล่งคาร์บอน แหล่งคาร์บอนและระดับความเข้มข้น มีผลต่อการสร้าง SSE อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 17)



ภาพที่ 28 ลักษณะการตายของ HE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้าง SSE
ก : HE ที่สร้าง SSE เริ่มตาย หลังการวางเลี้ยง 2.5 เดือน
ข : HE ที่สร้าง SSE ตายทั้งชิ้นส่วน หลังการวางเลี้ยง 3 เดือน



ภาพที่ 29 พัฒนาการของ SSE จากบริเวณต่าง ๆ ของ HE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
ก : SSE ที่เกิดจากบริเวณฐานของ HE หลังเพาะเลี้ยง 1 เดือน (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)
ข : SSE ที่เกิดจากบริเวณฐานของ HE หลังเพาะเลี้ยง 2 เดือน (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)
ค : SSE ที่เกิดจากบริเวณผิวด้านบนของ HE หลังเพาะเลี้ยง 1 เดือน (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)
ง : SSE ที่เกิดจากบริเวณผิวด้านบนของ HE หลังการวางเลี้ยง 2 เดือน (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 15 ผลของชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อเปอร์เซ็นต์การสร้าง SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

คู่ผสม	แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (M)	การสร้าง SSE (%)	การสร้าง SSE เฉลี่ย (%)
7	Sorbitol	0.1	66.67	34
		0.2	80	
	Mannitol	0.1	33.33	
		0.2	53.33	
	Sucrose	0.1	33.33	
		0.2	0	
	Glucose	0.1	13.37	
		0.2	26.67	
	Fructose	0.1	13.33	
		0.2	20	
16	Sorbitol	0.1	46.67	40
		0.2	73.33	
	Mannitol	0.1	33.33d	
		0.2	46.67	
	Sucrose	0.1	66.67	
		0.2	0	
	Glucose	0.1	26.67	
		0.2	40	
	Fructose	0.1	33.33	
		0.2	33.33	

ตารางที่ 16 ผลของชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการสร้าง SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

คู่ผสม	การสร้าง SSE/HE										ค่าเฉลี่ย[3] คู่ผสม
	Sorbitol (M)		Mannitol (M)		Sucrose (M)		Glucose (M)		Fructose (M)		
	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	
7	3c	10.8b	5.2c	4.8c	2.2d	0e	1.4de	1.2de	2d	1.6de	3.22B
16	6.4c	16.8a	3d	16a	1.8de	0e	1.2de	1.6de	1.8de	2.2d	5.03A
ค่าเฉลี่ย[1] ระดับความเข้มข้น	4.7C	13.8A	4.1C	10.4B	2D	0E	1.3DE	1.4DE	1.9D	1.9D	**
ค่าเฉลี่ย[2] แหล่งของคาร์บอน	9.25A		7.25B		1C		1.35C		1.9C		
											C.V.(%) 34.9

** : แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

[1, 2, 3] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 17 ผลของชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

คู่ผสม	แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (M)	การงอก SSE (%)	การงอก SSE เฉลี่ย (%)
7	Sorbitol	0.1	50	37.42
		0.2	58.33	
	Mannitol	0.1	40	
		0.2	50	
	Sucrose	0.1	40	
		0.2	0	
	Glucose	0.1	50	
		0.2	25	
	Fructose	0.1	50	
		0.2	33.33	
16	Sorbitol	0.1	57.14	39.19
		0.2	63.63	
	Mannitol	0.1	40	
		0.2	42.86	
	Sucrose	0.1	50	
		0.2	0	
	Glucose	0.1	25	
		0.2	33.33	
	Fructose	0.1	40	
		0.2	40	

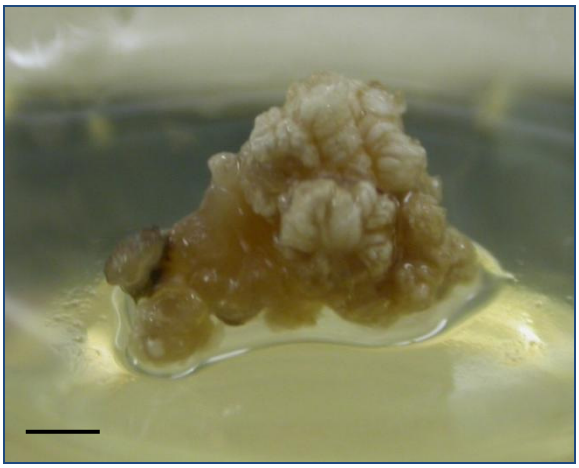
ตารางที่ 18 ผลของชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการงอกของ SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

คู่ผสม	การงอกของ SSE										ค่าเฉลี่ย[3] คู่ผสม
	Sorbitol (M)		Mannitol (M)		Sucrose (M)		Glucose (M)		Fructose (M)		
	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	
7	6.6cde	16.8a	3.2fg	7.4bcd	4.6defg	0h	2gh	2.4gh	4.6defg	5cdefg	5.26B
16	10b	18.6a	8.2bc	16a	5.2cdefg	0h	4.6defg	3.4efg	6cdef	6.4cdef	7.84A
ค่าเฉลี่ย[1] ระดับความเข้มข้น	8.3C	17.7A	5.7CD	11.7B	4.9D	0E	3.3D	2.9DE	5.3CD	5.7CD	ns
ค่าเฉลี่ย[2] แหล่งของคาร์บอน	13A		8.7B		2.45D		3.1D		5.5C		
											C.V.(%) 39.64

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

[1, 2, 3] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 30 HE ที่ตายหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (บาร์ = 3 มิลลิเมตร)

2.2.2 ผลของ GA_3 ต่อการชักนำ และการงอกของ SSE

จากการนำ HE ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติม GA_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 0.01 0.05 0.10 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำ SSE และการงอกของ SSE ให้ผลการทดลองดังนี้

การสร้าง SSE

จากการทดลองพบว่า GA_3 เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ช่วยส่งเสริมการสร้าง SSE โดยการวางเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยงบนอาหารที่เติม GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้าง SSE เฉลี่ย 17.3 SSE/HE รองลงมาคือ การเติม GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 16.23 และ 15.9 SSE/HE แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 19) คู่ผสมที่ 16 ให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 16.48 SSE/HE สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การสร้าง 14.81 SSE/HE แตกต่างทางสถิติอย่างมี

นัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 19) เมื่อพิจารณาผลของคู่ผสม และระดับความเข้มข้นของ GA_3 ต่อการสร้าง SSE พบว่า การวางเลี้ยง HE ของคู่ผสมที่ 16 บนอาหารที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้าง SSE สูงสุด 18.93 SSE/HE รองลงมาคือ การเติม GA_3 ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้การสร้าง 18 และ 17.4 SSE/HE ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และเมื่อระดับความเข้มข้นของ GA_3 เพิ่มขึ้นเป็น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการสร้าง SSE (ตารางที่ 19) คู่ผสม ระดับความเข้มข้นของ GA_3 และปฏิกิริยาสัมพันธ์ทั้ง 2 ปัจจัย มีผลต่อการสร้าง SSE อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 18)

การงอกของ SSE

จากการนำ SSE ที่ได้จากการศึกษาข้างต้น มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า GA_3 ช่วยส่งเสริมการงอกของ SSE โดย SSE ที่ชักนำบนอาหารที่เติม GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การงอกของ SSE เฉลี่ยสูงสุด 20.1 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือ การเติม GA_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้การงอกของ SSE เฉลี่ย 19.1 และ 18.7 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 20) เมื่อพิจารณาผลของคู่ผสมต่อการงอกของ SSE พบว่า คู่ผสมที่ 16 ให้การงอกของ SSE เฉลี่ย 19.48 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การงอก 17.37 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 20) เมื่อพิจารณาผลของคู่ผสม และระดับความเข้มข้นของ GA_3 ต่อการงอกของ SSE พบว่า การชักนำ SSE ของคู่ผสมที่ 16 บนอาหารที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การงอกของ SSE สูงสุด 21.8 SSE/HE รองลงมาคือ การเติม GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้การสร้าง 20.33 และ 19.6 SSE/HE ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และเมื่อระดับความเข้มข้นของ GA_3 เพิ่มขึ้นเป็น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากมีผลยับยั้งการสร้าง SSE แล้วยังส่งผลต่อการงอกของ SSE ด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 20) คู่ผสม และระดับความเข้มข้นของ GA_3 มีผลต่อการงอกของ SSE อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 19)

ตารางที่ 19 ผลของระดับความเข้มข้นของ GA_3 ต่อการสร้าง SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้น GA_3 (มก/ล) / คู่ผสม	จำนวน SSE/HE						
	0	0.01	0.05	0.1	0.25	0.5	ค่าเฉลี่ย[2] คู่ผสม
7	13.8d	14.8cd	15.67c	15.07cd	15cd	14.53cd	14.81B
16	18ab	14.8cd	18.93a	17.4b	16c	13.73d	16.48A
ค่าเฉลี่ย[1] ความเข้มข้นของ GA3	15.9AB	14.8BC	17.3A	16.23AB	15.5BC	14.13C	**
							C.V.(%) 14.05

** : แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

[1, 2] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 20 ผลของระดับความเข้มข้นของ GA_3 ต่อการงอกของ SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

ความเข้มข้น GA_3 (มก/ล) / คู่ผสม	การงอกของ SSE						
	0	0.01	0.05	0.1	0.25	0.5	ค่าเฉลี่ย[2] คู่ผสม
7	17.4de	18cde	18.4cde	17.87cde	17.13def	15.4f	17.37B
16	19.6bc	19.4bc	21.8a	20.33ab	18.93bcd	16.8ef	19.48A
ค่าเฉลี่ย[1] ความเข้มข้นของ GA3	18.5AB	18.7AB	20.1A	19.1AB	18.03B	16.1C	ns
							C.V.(%) 14.67

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

[1, 2] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

2.2.3 ผลของผงถ่าน และการเติมอาหารเหลวต่อการงอกของ SSE

จากการวางเลี้ยง SSE ของคู่ผสมที่ 16 และ 7 ในอาหาร 3 แบบ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 6 สูตร พบว่า คู่ผสมที่ 16 ให้การงอกของ SSE เฉลี่ย 13.87 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การงอกเฉลี่ย 12.51 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 21) ส่วนผลของสูตรอาหารต่อการงอกของ SSE พบว่า การวางเลี้ยง SSE ในอาหารเหลวหรือมีการเติมอาหารเหลว ส่งผลให้เกิดการงอกยอดของ SSE เพิ่มขึ้น โดยการวางเลี้ยง SSE บนอาหาร 2 ชั้น โดยชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกัน เติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมผงถ่าน ให้การงอกของ SSE เฉลี่ยสูงสุด 17.1 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือ การวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม ไม่เติมผงถ่าน และอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และผงถ่าน ให้การงอกของ SSE เฉลี่ย 17 และ 15.6 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 21) คู่ผสม สูตรอาหารที่เพาะเลี้ยง และปฏิกิริยาสัมพันธ์ทั้ง 2 ปัจจัย มีผลต่อการงอกของ SSE อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 20)

เมื่อพิจารณาการงอกเป็นยอด ราก และต้นที่สมบูรณ์ พบว่า การวางเลี้ยง SSE ของคู่ผสมที่ 7 บนอาหาร 2 ชั้น โดยชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกัน เติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมผงถ่าน และการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม ไม่เติมผงถ่าน ให้การสร้างยอดเฉลี่ยสูงสุด 14.8 ยอดต่อชิ้นส่วน และการวางเลี้ยง SSE ของคู่ผสมที่ 16 บนอาหารสูตรดังกล่าว ให้การสร้างยอด 14.6 และ 15 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 22) อย่างไรก็ตามอาหารทั้งสองสูตรให้การงอกเป็นราก และต้นที่สมบรูณ์น้อยกว่าอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม ไม่เติมผงถ่าน ซึ่งคู่ผสมที่ 7 และ 16 ให้การงอกรากเฉลี่ย 1.6 และ 2.6 รากต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ

และให้จำนวนต้นที่สมบูรณ์เฉลี่ย 3.4 และ 4.8 ต้นต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการวางเลี้ยงในสูตรอาหารอื่น ๆ (ตารางที่ 22) ในขณะที่การเติมผงถ่านในสูตรอาหารชักนำการงอก ส่งผลให้ SSE เกิดการตาย โดยเฉพาะการวางเลี้ยง SSE ในอาหารเหลวสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า SSE ที่โผล่ขึ้นมาจากอาหารเหลวเท่านั้นที่ให้การงอกได้ (จากการสังเกต) ดังนั้นผงถ่านจึงไม่เหมาะกับการนำมาชักนำการงอก ลักษณะการงอกของ SSE ในอาหารทั้ง 3 แบบ 6 สูตรแสดงดังภาพที่ 31

ตารางที่ 21 ผลของวิธีการเพาะเลี้ยงต่อการงอกของ SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 แบบ 6 สูตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน

สูตรอาหาร \ คู่ผสม	7	16	
	การงอกของ SSE		ค่าเฉลี่ย[2] สูตรอาหาร
1. อาหารแข็งสูตร MS	14.8bc	16.4ab	15.6A
2. อาหารแข็งสูตร MS + ผงถ่าน 0.2%	11.07d	11.4d	11.23B
3. อาหารแข็งสูตร MS + อาหารเหลวสูตร MS (0.06 NAA + 0.03 BA + ผงถ่าน 0.2%)	9.2e	14.4c	11.8B
4. อาหารแข็งสูตร MS + อาหารเหลวสูตร MS (0.06 NAA + 0.03 BA)	17.8a	16.4ab	17.1A
5. อาหารเหลวสูตร MS (0.06 NAA + 0.03 BA + ผงถ่าน 0.2%)	5.6f	7.2f	6.4C
6. อาหารเหลวสูตร MS (0.06 NAA + 0.03 BA)	16.6ab	17.4a	17A
ค่าเฉลี่ย[1] คู่ผสม	12.51B	13.87A	**
			C.V.(%) 21.74

** : แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

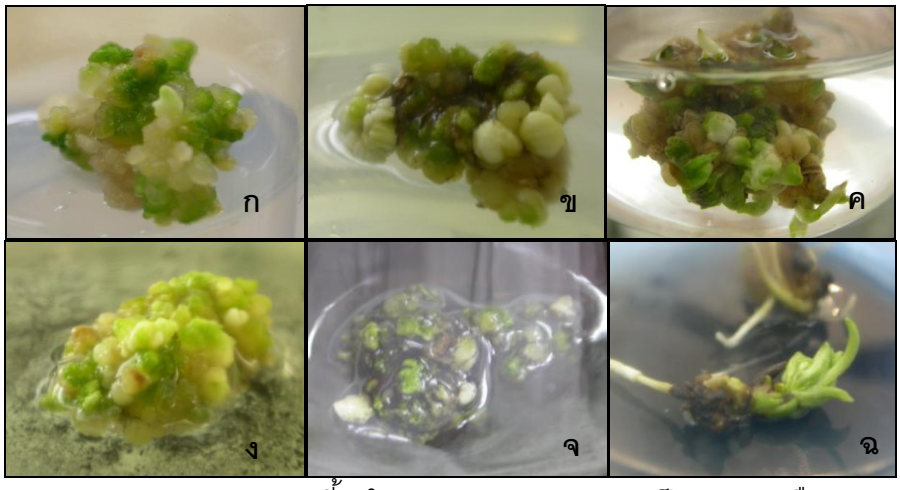
[1, 2] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 22 ผลของผงถ่าน และอาหารเหลวต่อการงอกยอด ราก และต้นที่สมบูรณ์ของ SSE ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน หลังเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 สูตร 6 แบบ เป็นระยะเวลา 3 เดือน

คู่ผสม	สูตรอาหาร	จำนวนยอด	จำนวนราก	จำนวนต้นที่สมบูรณ์
7	1. อาหารแข็งสูตร MS	9.8b	1.6bc	3.4b
	2. อาหารแข็งสูตร MS + ผงถ่าน 0.2%	7.2bc	1.8ab	2c
	3. อาหารแข็งสูตร MS + อาหารเหลว สูตร MS (0.06 NAA + 0.03 BA + ผงถ่าน 0.2%)	5.6c	1.8ab	1.8cd
	4. อาหารแข็งสูตร MS + อาหารเหลว สูตร MS (0.06 NAA + 0.03 BA)	14.8a	1.6bc	0.6de
	5. อาหารเหลวสูตร MS (0.06 NAA + 0.03 BA + ผงถ่าน 0.2%)	5.8c	0e	0e
	6. อาหารเหลวสูตร MS (0.06 NAA + 0.03 BA)	14.8a	0.8cde	1cde
16	1. อาหารแข็งสูตร MS	9b	2.6a	4.8a
	2. อาหารแข็งสูตร MS + ผงถ่าน 0.2%	7.8bc	1.6bc	2c
	3. อาหารแข็งสูตร MS + อาหารเหลว สูตร MS (0.06 NAA + 0.03 BA + ผงถ่าน 0.2%)	10b	1.6bc	2c
	4. อาหารแข็งสูตร MS + อาหารเหลว สูตร MS (0.06 NAA + 0.03 BA)	14.6a	0.6de	1.4cd
	5. อาหารเหลวสูตร MS (0.06 NAA + 0.03 BA + ผงถ่าน 0.2%)	7bc	0e	0e
	6. อาหารเหลวสูตร MS (0.06 NAA + 0.03 BA)	15a	1.2bcd	1.2cde
F-test		**	**	**
C.V.(%)		25.49	62.83	60.63

** : แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)



ภาพที่ 31 การงอกของ SSE เพาะเลี้ยงในอาหาร 3 แบบ 6 สูตร เป็นเวลา 1 เดือน

ก : อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และผงถ่าน

ข : อาหารสองชั้น ชั้นล่างอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกันเติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค : อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง : อาหารสองชั้น ชั้นล่างอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกันเติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์

จ : อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ : อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์

2.3 ปัจจัยทางกายภาพ

ผลของการลดความชื้นต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการนำ HE ของปาล์มน้ำมันมาลดความชื้น โดยผึ่งลมในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า ระยะเวลาการผึ่งลมที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความชื้นของ HE ลดลงตามไปด้วย โดย HE ของคู่ผสมที่ 7 มีความชื้นหลังจากผึ่งลมเป็นเวลา 0, 5, 10, 20, 30 และ 40 นาที เท่ากับ 100, 86.13, 83.48, 80.35, 75.61 และ 72.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับคู่ผสมที่ 16 มีความชื้นหลังจากผึ่งลมที่ระยะเวลาดังกล่าวเท่ากับ 100 95 94.01 92.33 87.23 และ 84 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 23) การลดความชื้นของ HE บางส่วนมีผลต่อการสร้าง SSE และการงอกของ SSE ดังนี้

การสร้าง SSE

จากการนำ HE ที่ผ่านการลดความชื้น โดยการผึ่งลมเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า การลดความชื้นของ HE เป็นเวลา 10 นาที (ความชื้นของ HE ลดลง 16.52 เปอร์เซ็นต์) ของคู่ผสมที่ 7 ให้การสร้าง SSE เพิ่มขึ้นจาก 13.8 SSE/HE ในชุดควบคุมเป็น 14.2 SSE/HE เฉลี่ยแล้วเพิ่มขึ้น 0.4 SSE/HE ในขณะที่การลดความชื้นของ HE เป็นเวลา 5 นาที (ความชื้นของ HE ลดลง 5 เปอร์เซ็นต์) ของคู่ผสมที่ 16 ส่งเสริมการสร้าง SSE เพิ่มแล้วขึ้นจาก 18 SSE/HE ในชุดควบคุมเป็น 18.13 SSE/HE เฉลี่ยเพิ่มขึ้น 0.13 SSE/HE แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 24) พันธุกรรมที่แตกต่างกันส่งผลให้การสร้าง SSE หลังการลดความชื้นแตกต่างกันไปด้วย โดยคู่ผสมที่ 16 ตอบสนองต่อการสร้าง SSE หลังการลดความชื้นเป็นเวลาต่างๆ เฉลี่ย 17.39 SSE/HE สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 13.54 SSE/HE แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ในขณะที่การลดความชื้นเป็นระยะเวลาต่างๆ ให้การสร้าง SSE เฉลี่ย ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 24) ปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างคู่ผสมและระยะเวลาการลดความชื้น มีผลต่อการสร้าง SSE อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่คู่ผสม ระยะเวลาการลดความชื้น มีผลต่อการสร้าง SSE อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 21)

การงอกของ SSE

จากการนำ HE ที่ผ่านการลดความชื้นโดยการผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำ SSE เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นนำไปชักนำการงอกบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าการลดความชื้นของ HE ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของ SSE โดยการลดความชื้นเป็นเวลา 10 นาที (ความชื้นของ HE ลดลง 16.52 เปอร์เซ็นต์) ของคู่ผสมที่ 7 ให้การงอกของ SSE เพิ่มขึ้นจาก 17.4 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน ในชุดควบคุมเป็น 18.2 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน เฉลี่ยแล้วเพิ่มขึ้น 0.8 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน ในขณะที่การลดความชื้นเป็นเวลา 5 นาที (ความชื้นของ HE ลดลง 5 เปอร์เซ็นต์) ของคู่ผสมที่ 16 ให้การงอกของ SSE เพิ่มขึ้นจาก 19.6 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน ในชุดควบคุมเป็น 19.67 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน เฉลี่ยแล้วเพิ่มขึ้น 0.07 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 25) พันธุกรรมที่แตกต่างกันส่งผลให้การงอกของ SSE หลังการลดความชื้นแตกต่างกันไปด้วย โดยคู่ผสมที่ 16 ตอบสนองต่อการงอก SSE หลังการลดความชื้นเฉลี่ย 19.18 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การงอกเฉลี่ย 17.57 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ในขณะที่การลดความชื้นเป็นระยะเวลาต่างๆ ให้การงอกของ SSE เฉลี่ย ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 25) คู่ผสมเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการงอกของ SSE อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 22)

ตารางที่ 23 ความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยงที่ลดลงในคู่ผสมที่แตกต่างกันหลังการผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลาต่างๆ

คู่ผสม / ระยะเวลาการผึ่งลม (นาที)	ความชื้น (%)	
	7	16
0	100.00	100.00
5	86.13	95.00
10	83.48	94.01
20	80.35	92.33
30	75.61	87.23
40	72.97	84.00

ตารางที่ 24 ผลของการลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอต่อการสร้าง SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

ระยะเวลาการผึ่งลม (นาที) / คู่ผสม	จำนวน SSE/HE						
	0	5	10	20	30	40	ค่าเฉลี่ย[2] $_{\text{คู่ผสม}}$
7	13.8c	12.47c	12.6c	13.67c	13.13c	12.73c	13.54B
16	18a	18.13a	17.93a	17.4ab	17.07ab	15.8b	17.39A
ค่าเฉลี่ย[1] $_{\text{ระยะเวลาการผึ่งลม}}$	15.9[ns]	15.9C	16.07	15.53	15.1	14.27	ns
							C.V.(%) 15.9

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

[1, 2] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 25 ผลของการลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอต่อการงอกของ SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

ระยะเวลาการผึ่งลม (นาที) / คู่ผสม	การงอกของ SSE						ค่าเฉลี่ย[2] คู่ผสม
	0	5	10	20	30	40	
7	17.4cd	18abcd	18.2abcd	17.73abcd	17.6bcd	16.47d	17.57B
16	19.6ab	19.67a	19.53ab	19.4ab	18.67abc	18.2abcd	19.18A
ค่าเฉลี่ย[1] ระยะเวลาการผึ่งลม	18.5[ns]	18.83	18.87	18.57	18.13	17.33	ns
							C.V.(%) 15.04

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

[1, 2] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

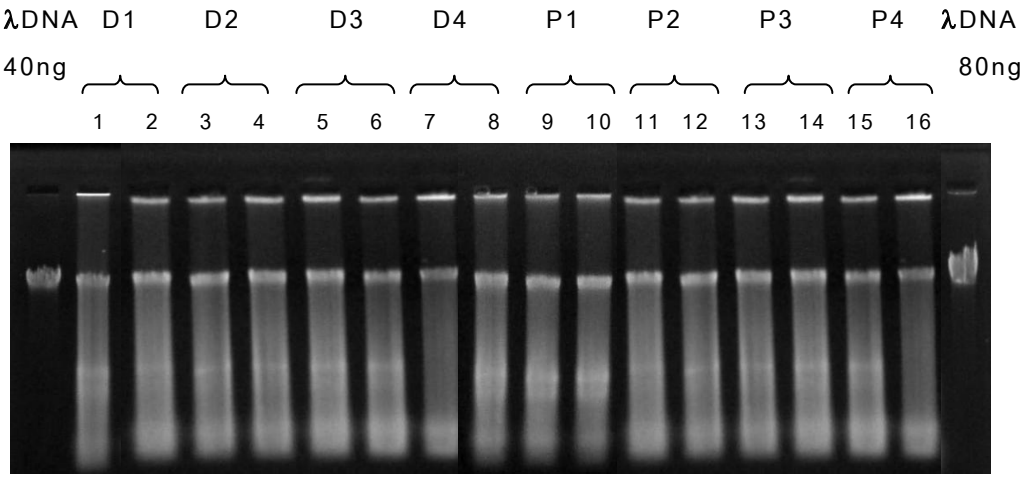
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

3. การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิค SSR

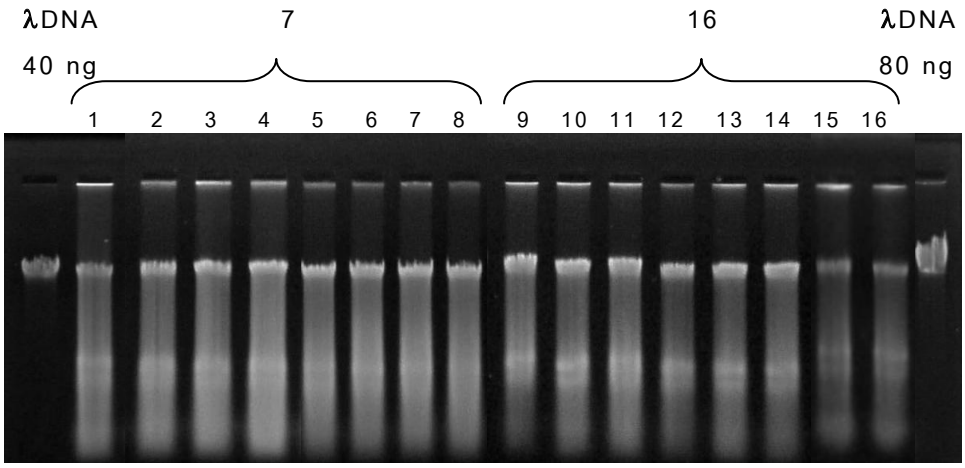
การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้นพ่อแม่ และใบจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสม ตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นส่วนใบจากต้นพ่อแม่มีปริมาณที่สูงมาก แต่ดีเอ็นเอไม่ค่อยสะอาด (ภาพที่ 32) มีสารประกอบฟีนอลปะปนอยู่ด้วย ส่วนปริมาณดีเอ็นเอจากต้นกล้าลูกผสมมีปริมาณน้อยกว่า แต่มีความสะอาดมากกว่าของพ่อแม่ (ภาพที่ 33) มีสีขาวใส ส่วนการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ ตามวิธีการของ Te-chato (2000) พบว่า มีปริมาณดีเอ็นเอสูงมาก และดีเอ็นเอที่ได้มีความสะอาดมากเมื่อเทียบกับชิ้นส่วนใบ (ภาพที่ 34) เมื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟลิซิส พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละชิ้นส่วนไม่แตกต่างกัน โดยมีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 30-60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 32-34) แต่เมื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเป็กโตรโฟโตมิเตอร์ (Nano-Drop รุ่น ND-1000) ซึ่งสามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอออกมาเป็นตัวเลขที่แน่นอน พบว่า ชิ้นส่วนใบจากต้นแม่มีปริมาณดีเอ็นเอ 2941.9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และใบจากต้นพ่อของคู่ผสมที่ 7 และ 16 มีปริมาณดีเอ็นเอ 2,811.5 และ 2,110.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ส่วนใบจากต้นกล้าลูกผสมคู่ที่ 7 และ 16 มีปริมาณดีเอ็นเอ 1135.31 และ 1171.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ สำหรับแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอมีปริมาณดีเอ็นเอสูงมาก โดยคู่ผสมที่ 7 มีปริมาณดีเอ็นเอ 3,954.94 และ 4,115.20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ส่วนคู่ผสมที่ 16 มีปริมาณดีเอ็นเอ 3,268.5 และ 5,152.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 26)

จากการตรวจสอบความเป็นลูกผสม และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันลูกผสมในระยะแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และต้นกล้า ด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 ไพรเมอร์ คือ EgCIR008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 และ EgCIR0905 โดยหลังทำ PCR นำมาตรวจสอบบนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง และเครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ พบว่า มีเพียงไพรเมอร์ EgCIR008 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอของพ่อและแม่ได้ ดังนั้นจึงนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาตรวจสอบความเป็นลูกผสมกับดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัส และพบว่า ดีเอ็นเอของแคลลัสที่นำมาตรวจสอบมีแถบดีเอ็นเอที่มาจากทั้งของพ่อและแม่ แสดงว่าแคลลัสเหล่านั้นเป็นลูกผสมทั้งหมด โดยคู่ผสมที่ 7 มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของต้นแม่ขนาด 560 และ 600 คู่เบส

และต้นพ่อขนาด 550 คู่เบส (ภาพที่ 35) ในขณะที่คู่ผสมที่ 16 มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของต้นแม่ขนาด 210 230 580 และ 600 คู่เบส และต้นพ่อขนาด 215 220 590 และ 610 คู่เบส (ภาพที่ 36-37) จากนั้นตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระยะแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการชักนำในหลอดทดลอง ด้วยไพรเมอร์ดังกล่าวกับเครื่องมือข้างต้น พบว่า จากการใช้เครื่องมือทั้งสองชนิดให้ผลการทดลองเหมือนกันคือ ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นในระหว่างการชักนำแคลลัส (ภาพที่ 35-37) โซมาติกเอ็มบริโอ (ภาพที่ 38-41) และต้นกล้าปาล์มน้ำมัน (ภาพที่ 42-45) จากการตรวจสอบด้วยเครื่องมือดังกล่าว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอไม่มีความแปรปรวนเกิดขึ้น และมีความตรงตามพันธุ์ จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSR



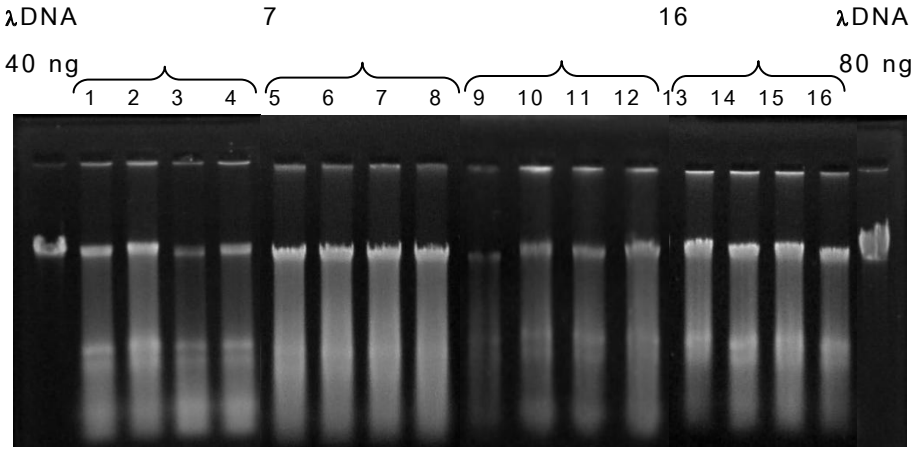
ภาพที่ 32 การประเมินดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้นพ่อและแม่ ที่สกัดตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) ด้วยวิธีการทางคุณภาพเปรียบเทียบกับ λDNA
lane 1-8 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้นแม่
lane 9-16 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้นพ่อ



ภาพที่ 33 การประเมินดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้นกล้าลูกผสมที่ชักนำผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอ ตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) ด้วยวิธีการทางคุณภาพเปรียบเทียบกับ λDNA

lane 1-8 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้นกล้าลูกผสมคู่ที่ 7

lane 9-16 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้นกล้าลูกผสมคู่ที่ 16



ภาพที่ 34 การประเมินดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ ตามวิธีการของ Te-chato (2000) ด้วยวิธีการทางคุณภาพเปรียบเทียบกับ λDNA

lane 1-4 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนแคลลัสของคู่ที่ 7

lane 1-8 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอของคู่ที่ 7

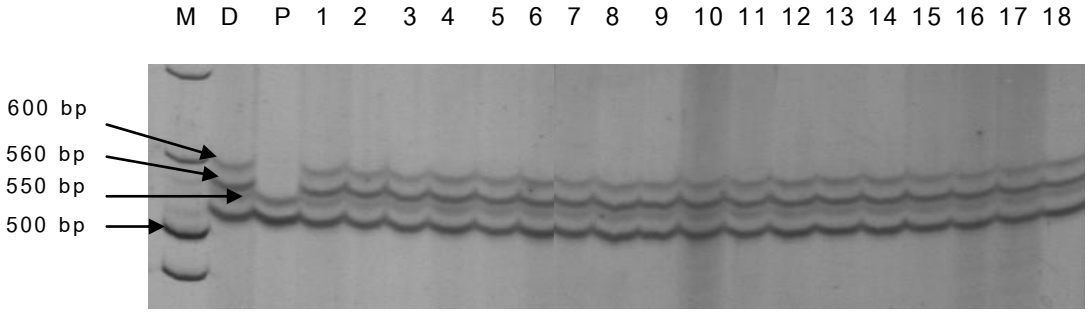
lane 9-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนแคลลัสของคู่ที่ 16

lane 13-16 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอของคู่ที่ 16

ตารางที่ 26 ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยของแต่ละชิ้นส่วนที่นำมาสกัดดีเอ็นเอจากการวัดด้วยเครื่องสเป๊กโตรโฟโตมิเตอร์ (Nano-Drop รุ่น ND-1000)

คู่ผสม	ชิ้นส่วน	ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย (ng/µl)
7	พ่อ	2811.5
	แม่*	2941.9
	แคลลัส	3954.94
	โซมาติกเอ็มบริโอ	4115.20
	ต้นกล้า	1135.3
16	พ่อ	2110.6
	แม่*	2941.9
	แคลลัส	3268.5
	โซมาติกเอ็มบริโอ	5152.6
	ต้นกล้า	1171.6

* ต้นแม่เดียวกัน



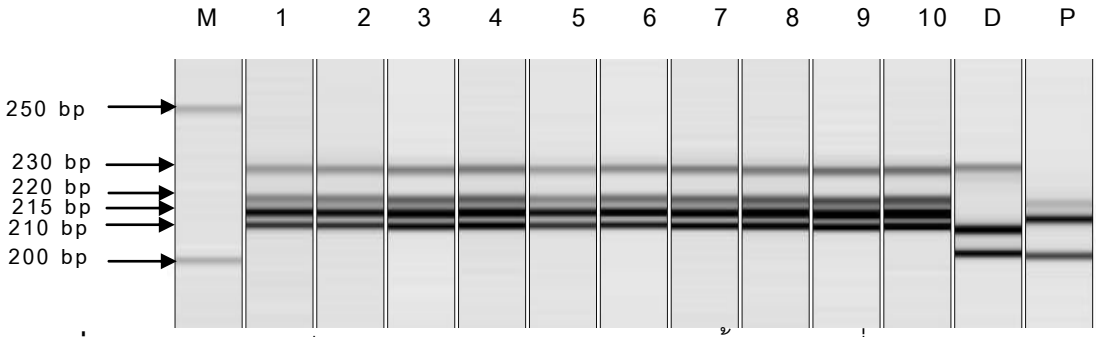
ภาพที่ 35 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของพ่อแม่และแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 บนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสมขนาดต่างๆ

D (ดูร่า) คือ ต้นแม่พันธุ์

P (ฟิสิเฟอร่า) คือ ต้นพ่อพันธุ์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของแคลลัส



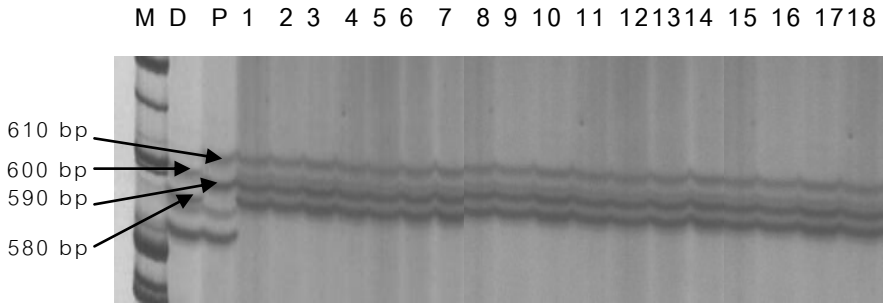
ภาพที่ 36 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของพ่อแม่และแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 16 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสมขนาดต่างๆ

D (ดูร่า) คือ ต้นแม่พันธุ์

P (ฟิสิเฟอร่า) คือ ต้นพ่อพันธุ์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส

lane 1-10 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของแคลลัส



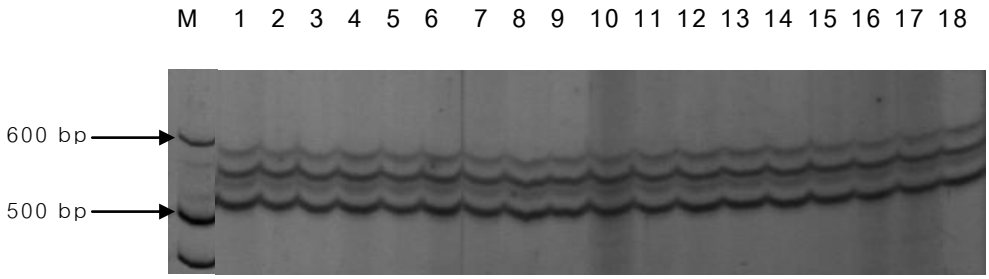
ภาพที่ 37 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของพ่อแม่และแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 16 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 บนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสมขนาดต่างๆ

D (ดูร่า) คือ ต้นแม่พันธุ์

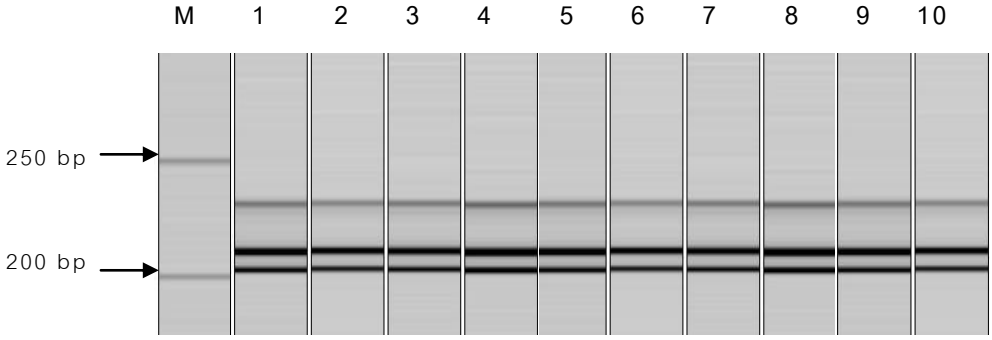
P (ฟิสิเฟอร่า) คือ ต้นพ่อพันธุ์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

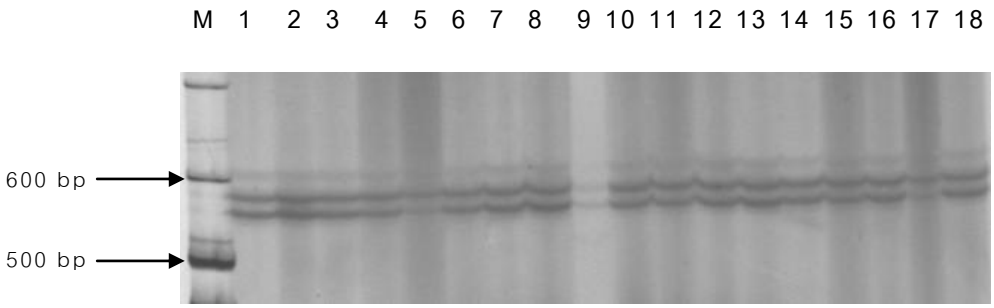
lane 1-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของแคลลัส



ภาพที่ 38 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอลูกผสมปาล์มน้ำมันคู่ที่ 7 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 บนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสมขนาดต่าง ๆ
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส
lane 1-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอ



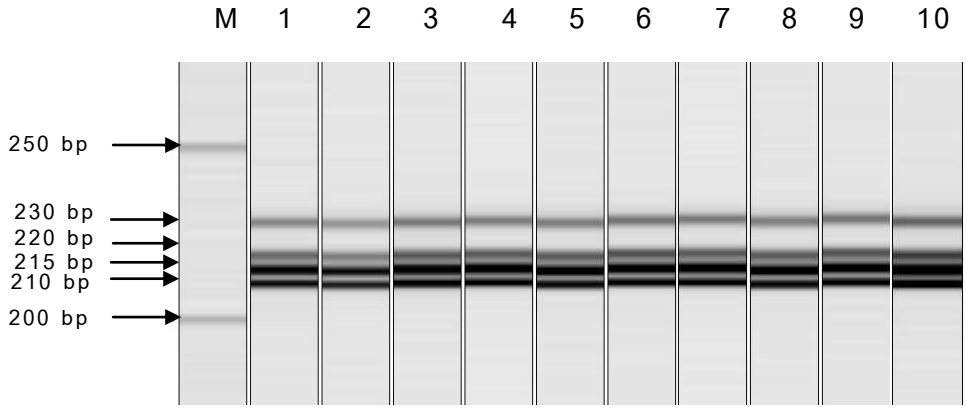
ภาพที่ 39 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 โดยใช้เครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของต้นพ่อและแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส
lane 1-10 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอ



ภาพที่ 40 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 16 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 บนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

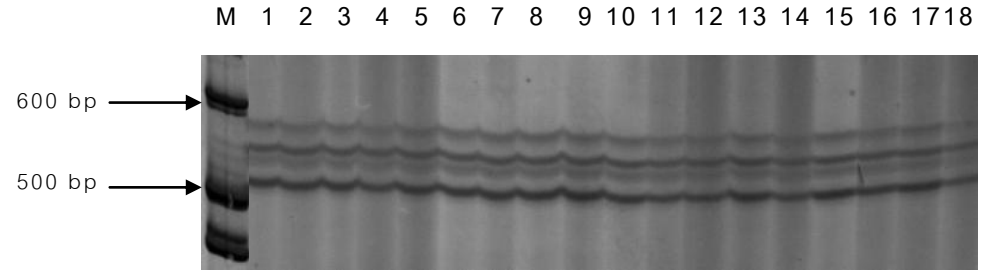
lane 1-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอ



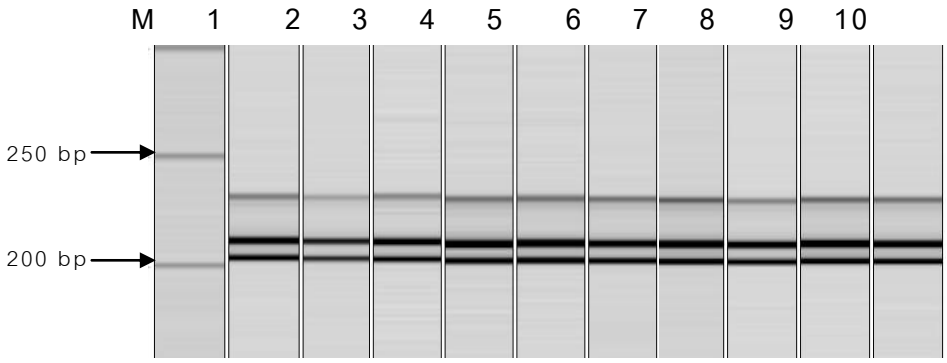
ภาพที่ 41 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 16 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส

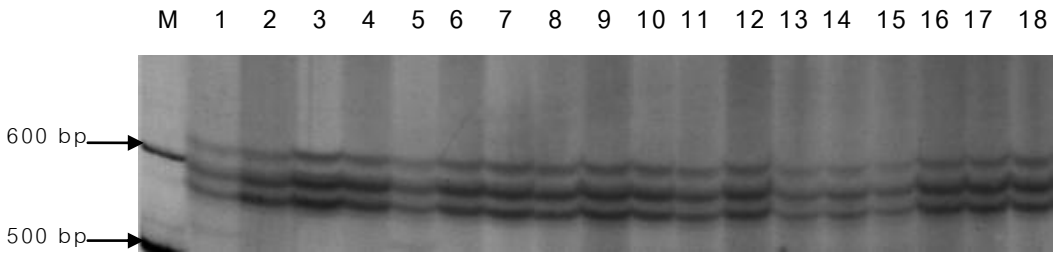
lane 1-10 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอ



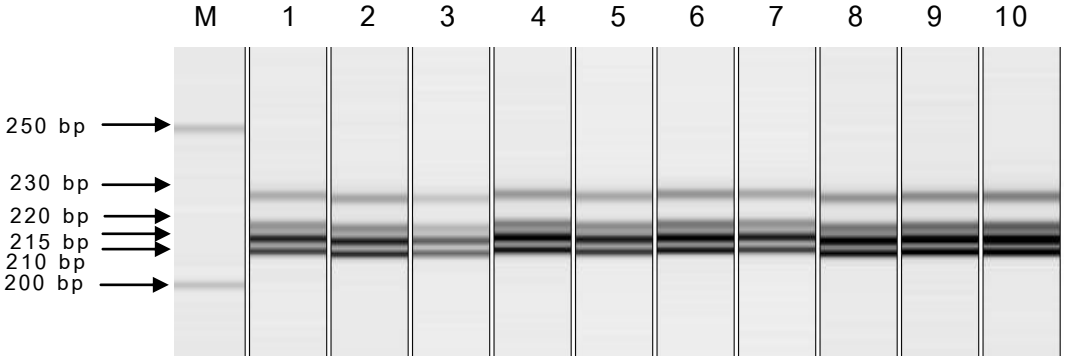
ภาพที่ 42 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 บนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของต้นพ่อและแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส
lane 1-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 43 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของต้นพ่อและแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส
lane 1-10 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 44 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 16 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 บนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิสแนวดิ่ง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส
lane 1-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 45 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 16 จากการใช้ไพเมอร์ EgCIR008 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง E-Gene รุ่น HAD-GT12™ ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อแม่ที่ปรากฏในปาล์มน้ำมันลูกผสม
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส
lane 1-10 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

บทที่ 4

วิจารณ์

พันธุกรรมที่แตกต่างกันทำให้ปาล์มน้ำมันมีการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน รวมถึงการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันออกไปด้วย จากการเพาะเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมันลูกผสมพบว่า คู่ผสมที่ 7 ให้การตอบสนองต่อการสร้างแคลลัสสูงกว่าคู่ผสมอื่น ๆ โดยแต่ละคู่ผสมให้การสร้างแคลลัสที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับการรายงานของ Karun และคณะ (2004) รายงานว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมมีผลต่อการตอบสนองของการสร้างแคลลัส และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ Steinmacher และคณะ (2007) คู่ผสมหรือจีโนไทป์มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส จากผลการทดลองในครั้งนี้ เมล็ดจากคู่ผสมที่ 7 และ 16 มีคัพภะขนาดใหญ่ คัพภะดังกล่าวมีเนื้อเยื่อเจริญและสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตได้มาก โดยเกิดจากการรวมตัวของยีนระหว่างพ่อและแม่ พันธุกรรมที่แข็งแรงส่งผลให้เกิดการติดเมล็ดของลูกผสมได้ดียิ่งขึ้น ต้นอ่อนที่ได้มีความแข็งแรง โดยสังเกตได้จากลักษณะเมล็ดพันธุ์ส่วนใหญ่มีองค์ประกอบภายในเมล็ดพันธุ์ครบสมบูรณ์ทุกส่วน ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์สร้างแคลลัสได้สูง Sarasan และคณะ (2005) รายงานในทำนองเดียวกันว่าคัพภะของ bottle palm ที่มีขนาดใหญ่ให้การงอก และสร้างแคลลัสได้ดี Viloria และคณะ (2005) รายงานในทำนองเดียวกันว่า คัพภะจากพ่อแม่ที่มีความแข็งแรงทางพันธุกรรมให้ประสิทธิภาพในการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงรวมถึงการงอกได้ดี นอกจากนี้สภาพแวดล้อม และการจัดการดูแลในแปลงปลูกที่แตกต่างกันมีผลต่อความแข็งแรงของลูกผสมแตกต่างกันด้วย (Zhang *et al*., 2003) จากพันธุกรรมที่แตกต่างกันนี้ส่งผลให้แต่ละคู่ผสมตอบสนองต่อรูปแบบการสร้างแคลลัสที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 รูปแบบด้วยกัน คือ แคลลัสแบบเกาะกันแน่น แคลลัสที่เกาะกันแบบหลวมๆ แคลลัสที่มีลักษณะเป็นปม และแคลลัสที่มีลักษณะเป็นเส้นคล้ายราก Thawaro และ Te-chato (2008) รายงานในทำนองเดียวกันว่าการชักนำแคลลัสจากคัพภะของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน 6 คู่ผสมจากสถานีวิจัย และฝึกภาคสนามคลองหอยโข่ง อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา ให้การสร้างแคลลัสที่แตกต่างกันออกไป และแบ่งแคลลัสออกเป็น 4 รูปแบบ เช่นเดียวกับในการศึกษานี้ นอกจากนี้พันธุกรรมยังส่งผลต่อการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอที่แตกต่างกันอีกด้วย

จากการทดลองพบว่าคัพภะจากคู่ผสมที่ 16 ให้การสร้างโซมาติกอ็มบริโอต่อชิ้นส่วนสูงกว่าคู่ผสมอื่น ๆ สอดคล้องกับการรายงานของ Eugene และคณะ (2006) ที่รายงานการชักนำ โซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน 4 พันธุ์ แต่ละพันธุ์ให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอแตกต่างกันไป Eshraghi และคณะ (2005) รายงานว่าพันธุ์ที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ระยะพัฒนาการของคัพภะ หรืออายุคัพภะมีผลต่อการสร้างแคลลัส โดยคัพภะที่สุกแก่ทางสรีรวิทยาให้การงอกเป็นต้นกล้าสูง ในขณะที่คัพภะที่อ่อนให้การสร้างแคลลัสได้ดีกว่าคัพภะที่สุกแก่ทางสรีรวิทยา เนื่องจากคัพภะที่อ่อนมีกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญมาก สอดคล้องกับ Perera และคณะ (2006) ที่รายงานว่าระยะพัฒนาการของดอกอ่อนปาล์มน้ำมันมีแนวโน้มในการเพิ่มปริมาณ และการสร้างแคลลัสได้เร็วกว่าดอกแก่ เนื่องจากเซลล์มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง

สูตรอาหารมีความสำคัญต่อความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยอาหารแต่ละสูตรมีองค์ประกอบของธาตุอาหารที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นต้องเลือกใช้ให้เหมาะกับชนิดและชิ้นส่วนด้วย สำหรับการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันนั้นอาหารสูตร MS ให้น้ำหนักสดของแคลลัส รวมถึงลักษณะสีของแคลลัสดีกว่าสูตรอาหาร Y_3 สอดคล้องกับ สมปอง และคณะ (2530) ที่ประสบผลสำเร็จจากการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่าจากต้นกล้าอายุ 195 วัน จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS นอกจากนี้ยังมีการใช้อาหารสูตรดังกล่าวในการชักนำการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสอินทผลัม (Tisserat, 1982) การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของอินทผลัมพันธุ์ Khanizi (Eshraghi *et al*., 2005) การชักนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอของ *Agave tequilana* Weber var. Azul (Rodrıguez-Sahagun *et al*., 2010) การสร้างแคลลัส ขนาดแคลลัส และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์แท้ (Usman *et al*., 2007) อย่างไรก็ตาม อรดี (2526) รายงานว่าสูตรอาหาร Y_3 เหมาะสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงใบอ่อนหรือช่อดอกของมะพร้าว และพืชสกุลปาล์มอื่น ๆ Kanchanapoom และ Domyoas (1999) รายงานผลสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร Y_3 แต่ไม่มีรายงานการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ในขณะที่ Sogeke (1996) รายงานการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน จากการเพาะเลี้ยงต้นกล้าปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตรดัดแปลง Y_3 ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสถึง 40 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอจำนวนน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารสูตร MS มีสารเคมีเป็นองค์ประกอบมากกว่าสูตร Y_3 อาหารสูตร Y_3 ไม่มีสารเคมีในกลุ่มวิตามิน โดยเฉพาะวิตามินบี 1 หรือ thiamine-HCl ที่ช่วยให้พืชมีการพัฒนาเป็นไป

ตามปกติ โดยเฉพาะการเจริญและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2553) และนิยมใช้อาหารสูตร Y_3 ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น จากองค์ประกอบของสูตรอาหารที่แตกต่างกันทำให้พืชที่วางเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรมีการตอบสนองต่อการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอรวมถึงพืชต้นใหม่ที่แตกต่างกัน

ปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอคือ ฮอร์โมนหรือสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเฉพาะในกลุ่มของออกซิน ออกซินที่แตกต่างกันให้ลักษณะและการสร้างแคลลัสแตกต่างกัน ออกซินที่ได้รับจากภายนอกมีผลต่อการพัฒนาเป็นอย่างมาก ออกซินชนิด dicamba ส่งเสริมการชักนำแคลลัส การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัส รวมถึงจำนวนปมต่อแคลลัสได้ดีกว่าชนิด 2,4-D สอดคล้องกับ Furini และ Jewell (1994) และ Rakshit และคณะ (2010) ที่รายงานการชักนำแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์แท้ในประเทศอินเดีย 5 สายพันธุ์ บนอาหารที่เติม 2,4-D และ dicamba ว่าการวางเลี้ยงข้าวโพดสายพันธุ์แท้ดังกล่าวบนอาหารที่เติม dicamba ให้การสร้างแคลลัสดีกว่าอาหารที่เติม 2,4-D Te-chato และคณะ (2003) และ Thawaro และ Te-chato (2007) รายงานผลการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาหลังการวางเลี้ยง 4 สัปดาห์ เพื่อดูกำเนิดของเซลล์ที่สร้างปม หรือโครงสร้างต้นอ่อนเริ่มต้น พบว่า 2,4-D ส่งเสริมการแบ่งเซลล์เฉพาะในชั้นอิพิเดอร์มิส ในขณะที่ dicamba ส่งเสริมกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงในชั้นอิพิเดอร์มิส พาเรนไคมา และชั้นของเนื้อเยื่อเจริญมัดท่อน้ำท่ออาหาร นอกจากนี้ dicamba ยังมีประสิทธิภาพในการช่วยส่งเสริมการสร้างและการพัฒนาของเซลล์ได้ดีกว่า 2,4-D การลดความเข้มข้นของ dicamba ลงเหลือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการศึกษานี้ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอแตกต่างกันในแต่ละคู่ผสม โดยคู่ผสมที่ 1 ให้ความเร็วในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และอัตราการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด ในขณะที่คู่ผสมที่ 16 ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อชิ้นส่วนสูงสุด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน และให้การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ภายใน 16 เดือน การทดลองดังกล่าวเกิดขึ้นไม่สม่ำเสมอเนื่องจากอิทธิพลของคู่ผสม รวมถึงสภาพแวดล้อมในขณะที่เก็บตัวอย่างคัพภะมาทำการทดลอง สมปอง และคณะ (2547) รายงานว่า dicamba ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ต้นอ่อนที่เกิดขึ้นบนอาหารที่เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การพัฒนาเข้าสู่ระยะสุกแก่ หรือ HE ได้เร็ว (Te-chato, 1998b) ซึ่งการใช้ dicamba สามารถร่นระยะเวลาในการชักนำแคลลัส และการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอเป็นพืชต้นใหม่รวม 18 เดือน และยังมีการรายงานอีกว่า การลดความเข้มข้นของ dicamba ลงส่งเสริม

กระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสของดอกอ่อนในพืชปาล์ม peach palm (Steinmacher *et al*., 2007) และแคลลัสของ *Areca catechu* (Wang *et al*., 2006) ผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า dicamba เป็นออกซินตัวใหม่ที่มีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการสร้างแคลลัส (สมปอง และคณะ, 2547; Sanputawong and Te-chato, 2008) โซมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ในปาล์มน้ำมัน (อาสลัน และสมปอง, 2545; สกุลรัตน์ และสมปอง, 2552; ซูไฮมิน, 2551; Thawaro, 2009)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ส่วนใหญ่เป็นไปตามสภาพแวดล้อมที่พืชนั้นอาศัยอยู่ รวมถึงชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นสำคัญ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนอยู่ที่ 28±0.5 องศาเซลเซียส (อาสลัน, 2545) คัพภะอยู่ที่ 27±1 องศาเซลเซียส (Chehmalee and Te-chato, 2007; Sanputawong and Te-chato, 2008) สอดคล้องกับการรายงานของ Kanchanapoom และ Domyoas (1999) ซึ่งเพาะเลี้ยงคัพภะที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และรายงานว่าช่วงอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงมาก (22-30 องศาเซลเซียส) อาจส่งเสริมการสร้างสารประกอบฟีนอล นอกจากนี้ยังทำให้เกิดไอน้ำที่ฝาภาชนะเพาะเลี้ยงก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนสูงด้วย ในขณะที่ Avril และคณะ (1986) รายงานว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันอยู่ระหว่าง 25-27 องศาเซลเซียส นอกจากอุณหภูมิแล้วความเข้มแสงก็มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของปาล์มน้ำมันเช่นเดียวกัน โดยในสภาพแปลงปลูกปาล์มน้ำมันต้องการอุณหภูมิที่ 22-30 องศาเซลเซียส ปริมาณแสงแดดอย่างน้อยวันละ 5 ชั่วโมง ในการเจริญเติบโต (ธีระ, 2548) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปาล์มน้ำมันเป็นพืชเขตร้อนที่ต้องการอุณหภูมิ และแสงแดดที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ดังนั้นเมื่อนำชิ้นส่วนมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองก็ย่อมต้องการอุณหภูมิและความเข้มแสงเช่นเดียวกับสภาพแปลงปลูก จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้การเพิ่มน้ำหนักสด และจำนวนปมต่อแคลลัสสูงสุด รวมถึงการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ในขณะที่ซูไฮมิน (2551) เพาะเลี้ยงคัพภะที่สุกแก่ทางสรีระของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน จากสถานีวิจัย และฝึกภาคสนามคลองหอยโข่ง อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา เพื่อชักนำแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ รวมถึงการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของปาล์มน้ำมันที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส และความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นอกจากนี้ Ouyang และคณะ (2003) รายงานว่าความเข้มแสงมีผลต่อพัฒนาการของแคลลัสของ

Cistanche deserticola โดยให้น้ำหนักแห้ง และการสร้างสาร phenylethanoid glycosides (PeG) สูงสุด หลังการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 24 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที และความเข้มแสงมากขึ้นไม่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักของแคลลัสและสาร PeG ความแตกต่างในการตอบสนองนี้อาจเนื่องมาจากพันธุกรรม และสภาพแวดล้อมในการดูแลต้นแม่ รวมถึงระยะพัฒนาการของคัพภะ ที่ส่งผลต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ภายใต้อุณหภูมิและความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

ระยะพัฒนาและขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอมีผลต่อการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (SSE) โดยจากผลการทดลองพบว่า โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยง (HE) เท่านั้นที่ให้การสร้าง SSE ในขณะที่โซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม (GE) ไม่มีการสร้าง SSE มีเพียงการสร้างแคลลัส และพัฒนาเข้าสู่ระยะ HE เท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสมบูรณ์ และความพร้อมของชิ้นส่วน ซึ่งควรอยู่ในระยะที่แก่เต็มที่พร้อมที่จะงอกเมื่อถูกทำให้เกิดสภาวะเครียด สอดคล้องกับการรายงานของอาสลัน (2545) ที่พบว่ากระบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันมีระยะการพัฒนาที่ปรากฏเด่นชัด 3 ระยะ ได้แก่ GE ทอร์ปิโด และ HE พบว่า HE เป็นระยะที่เหมาะสมต่อการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุด และจากการทดลองนี้พบว่า HE ของคู่ผสมที่ 16 ให้การสร้าง SSE สูงสุด 18 SSE/HE หลังการวางเลี้ยง HE บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน ซูไฮมิน (2551) รายงานระยะเวลาการชักนำ SSE 2-3 เดือน จากการวางเลี้ยง HE ที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงคัพภะแก่ ในขณะที่ Te-chato และ Hilae (2007) ใช้ระยะเวลาในการชักนำ SSE จาก HE ที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนถึง 4 เดือน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งชิ้นส่วนเริ่มต้นที่นำมาเพาะเลี้ยงแตกต่างกันส่งผลต่อการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอที่แตกต่างกัน โดยชิ้นส่วนใบอ่อนจากต้นพันธ์ที่มีอายุมากใช้เวลาในการชักนำแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอหลังการวางเลี้ยง 3 เดือน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงคัพภะให้การสร้างแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอหลังการวางเลี้ยงเพียง 1 เดือน เนื่องจากคัพภะประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญที่มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง ส่งผลให้มีการพัฒนาได้เร็วกว่าชิ้นส่วนใบ ด้วยเหตุนี้การเพาะเลี้ยงคัพภะจึงใช้เวลาในการชักนำ SSE สั้นตามไปด้วย อีกทั้งโซมาติกเอ็มบริโอจากใบอ่อนมีการเก็บสะสมน้ำหนักแห้งเป็นระยะเวลานานทำให้มีลักษณะแข็งและแน่นทึบ ดังนั้นจึงใช้ระยะเวลาในการชักนำ SSE นานตามไปด้วย นอกจากน้ำตาลซอร์บิทอลแล้วยังมีรายงานการใช้โพลีเอมีนเพื่อชักนำ SSE จากการเพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันด้วย แต่ให้เปอร์เซ็นต์ และจำนวนของเอ็มบริโอที่เกิดใหม่ต่ำ (Rajesh *et al*.,

2003) ดังนั้นการใช้น้ำตาลซอร์บิทอลเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดสภาวะเครียดน้ำ โดยการปรับออสโมติคัมให้เหมาะสมเพื่อส่งเสริมการเพิ่มจำนวน SSE จึงให้ผลดีกว่าการใช้โพลีเอมีน จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า SSE เกิดจากบริเวณส่วนฐานและชั้นผิวอิพิเดอร์มิสของ HE เดิม (จากการสังเกต) โดยมีลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มสีขาวขุ่น ประกอบด้วยเอ็มบริโอระยะ GE และทอร์ปิโดจำนวนมาก สอดคล้องกับการศึกษาของ ซูไฮมิน (2551) และ อาสลัน (2551) ที่พบการสร้าง SSE บริเวณฐานและผิวของ HE เดิม Promchan และ Te-chato (2007) ได้ศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของ SSE และพบว่า SSE เกิดขึ้นโดยตรงจากชั้นเอพิเดอร์มิสบริเวณฐาน ชั้นโพรแคมเบียมหรือวาสคิวลาร์ และชั้นพาเรนไคมา หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ตรวจสอบเนื้อเยื่อวิทยา แต่คาดว่าน่าจะมีกำเนิดมาจากเซลล์ 3 แหล่งดังกล่าว

ขนาดของ HE ที่วางเลี้ยงมีผลต่อการสร้าง SSE โดยปกติแล้ว HE ขนาดใหญ่มีการเก็บสะสมอาหารภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก ทำให้ HE อวบ อ้วน และอาหารสะสมเหล่านั้นมีผลส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอได้เป็นอย่างดี มีรายงานผลของ HE ต่อการชักนำ SSE โดย ธนวดี (2551) ใช้ HE ขนาดใหญ่ 11 และ 13 มิลลิเมตร ในการชักนำการสร้าง SSE จากสายต้นเทพา และ HE ขนาด 8 และ 10 มิลลิเมตร จากสายต้นกระบี่ แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า HE ขนาด 9 มิลลิเมตร เหมาะกับการนำมาชักนำการสร้าง SSE สูงสุด ในขณะที่ อาสลัน (2554) ใช้ HE ที่มีขนาด 5 มิลลิเมตร ในการชักนำ SSE ของปาล์มน้ำมัน จะเห็นได้ว่าแม้ขนาด HE ที่แตกต่างกัน แต่สามารถเก็บสะสมอาหารไว้เพียงพอสำหรับการสร้าง SSE ได้เช่นเดียวกัน โดย HE ขนาดใหญ่มีการเก็บสะสมอาหารได้มากกว่า HE ขนาดเล็ก จึงให้การสร้าง SSE ได้มาก

จนถึงปัจจุบันปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำ SSE ยังคงมีเพียง 2 รายงาน (Hilae and Te-chato, 2005; Te-chato and Hilae, 2007) ในจำนวนนี้น้ำตาลถือเป็นปัจจัยที่สำคัญ และให้ผลดีที่สุดในการชักนำ SSE ซึ่งน้ำตาลที่ใช้นั้นขึ้นกับชนิด และความเข้มข้นที่ใช้อีกด้วย นอกจากน้ำตาลจะมีผลต่อการสร้างสภาพเครียดแล้ว ยังมีผลต่อการชักนำการงอก และพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโออีกด้วย มีรายงานว่าน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งของคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ Lou และ Kako (1995) รายงานว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง (0.25 และ 0.50 โมลาร์) ส่งเสริมกระบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดในแตงกวา โดยความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสยิ่งสูงขึ้นจะส่งเสริมให้จำนวน และเปอร์เซ็นต์โซมาติกเอ็มบริโอที่มีทั้งขั้วยอดและรากเพิ่มมากขึ้น แต่จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า การใช้น้ำตาลซูโครสที่ระดับ 0.2 โมลาร์ เกิดการตายของโซมาติกเอ็มบริโอหลังการวางเลี้ยงเพียง 2 สัปดาห์ ทั้งในคู่ผสมที่ 7 และ 16 ทั้งนี้

เนื่องจากพืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อน้ำตาลต่างกัน ในขณะที่การชักนำ SSE บนอาหารที่เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้การสร้าง SSE สูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ ในคู่ผสมที่ 7 และ 73.33 เปอร์เซ็นต์ ในคู่ผสมที่ 16 เช่นเดียวกับ Te-chato และ Hilae (2007) ที่ศึกษาการวางเลี้ยง HE ที่ชักนำจากใบอ่อนบนอาหารที่เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เพื่อชักนำ SSE ของปาล์มน้ำมันสายต้นเทพา พบว่าสามารถชักนำการสร้าง SSE ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Chehmalee และ Te-chato (2008) ชักนำ SSE จาก HE ที่ชักนำจากคัพภะแก่ของปาล์มน้ำมันสายต้นจากสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง พบว่า ให้การสร้าง SSE 80 เปอร์เซ็นต์ Thawaro (2009) ชักนำ SSE ของปาล์มน้ำมันสายต้นจากสถานีวิจัยคลองหอยโข่งแต่ต่างพันธุกรรมกับซูไฮมิน (2551) พบว่า ให้การสร้าง SSE เพียง 36 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าแม้เป็นปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่าเหมือนกันแต่เมื่อใช้ชิ้นส่วน และพันธุกรรมที่ต่างกัน ย่อมให้เปอร์เซ็นต์การสร้าง SSE ต่างกันไปด้วย โดยระดับความเข้มข้นของซอร์บิทอลที่เหมาะสมส่งผลให้เซลล์เกิดสภาวะเครียด มีการสะสมกรดอะมิโน และคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์เพิ่มขึ้น และเกิดการสร้าง SSE ขึ้น นอกจากนี้ซอร์บิทอลยังมีผลในทางส่งเสริมการงอกเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (Mamiya and Sakamoto, 2000) สอดคล้องกับการรายงานของ David และ Wayne (2001) ที่พบว่าการเติมซอร์บิทอลในอาหารชักนำการงอกช่วยส่งเสริมการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอเพิ่มขึ้น 2 เท่า

นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ GA_3 ในการเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำ SSE และการงอกของ SSE ในปาล์มน้ำมัน โดยอาสลัน (2551) รายงานการใช้ GA_3 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ว่า สามารถส่งเสริมการสร้าง SSE สูงสุด 33.7 SSE/HE และการงอกของ SSE 35.74 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าการใช้ซอร์บิทอลเพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับในการศึกษานี้ที่พบว่า การเติม GA_3 ความเข้มข้นต่ำเพียง 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซอร์บิทอลสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำ SSE โดยให้การสร้าง 18.93 SSE/HE และการงอกของ SSE เฉลี่ย 20.1 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน สูงกว่าการใช้ซอร์บิทอลเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ GA_3 ในการชักนำการงอกของไซโกติกเอ็มบริโอมะพร้าว (Magdalita *et al.,* 2004) และการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอมันฮ่อ (English walnut) ว่าสามารถชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ 25-28 เปอร์เซ็นต์ (Tang *et al*., 2000)

จากการศึกษาผลของผงถ่าน และการเติมอาหารเหลวต่อการชักนำการงอกของ SSE ของคู่ผสมที่ 16 และ 7 ในอาหาร 3 แบบ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 6 สูตร พบว่า คู่ผสมที่ 16 ให้การงอกของ SSE เฉลี่ยมากกว่าคู่ผสมที่ 7 ส่วนผลของสูตรอาหารต่อการวางเลี้ยงพบว่า การวางเลี้ยง

SSE บนอาหาร 2 ชั้น โดยชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกัน เติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมผงถ่าน ให้การงอกของ SSE เฉลี่ยสูงสุด ในขณะที่ Te-chato (1998a) รายงานว่าการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันเป็นไปได้ดีบนอาหารเหลวสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเพาะเลี้ยงบนอาหาร 2 ชั้น โดยชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร MS เติมผงถ่าน 0.25 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกัน แต่ลดองค์ประกอบของสูตรอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม NAA และ BA ความเข้มข้นเดียวกันกับอาหารเหลวข้างต้น และยังสามารถชักนำรากปาล์มน้ำมันในอาหารสูตรเดียวกันนี้ 73 เปอร์เซ็นต์ (Te-chato and Muangkaewngam, 1992) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้การวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตให้การงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์มากกว่าวิธีอื่น ๆ สอดคล้องกับการรายงานของ Kumria และคณะ (2003) ที่ชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของฝ้ายบนอาหารสูตร MS ปกติให้การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 70 เปอร์เซ็นต์ การลดความเข้มข้นองค์ประกอบของอาหารลงครึ่งหนึ่ง (1/2MS) และหนึ่งในห้าเท่าของสูตรปกติ (1/5MS) ส่งผลให้การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอลดลงเหลือ 40-50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการวางเลี้ยงบนสูตรอาหารดังกล่าวก็น่าจะเพียงพอสำหรับการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

การลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอเพื่อชักนำการงอกในการศึกษานี้ทำโดยการผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างๆ เป็นการเพิ่มปัจจัยเพื่อส่งเสริมประสิทธิภาพในการชักนำและการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ โดยการลดความชื้นของคู่ผสมที่ 7 เป็นเวลา 10 นาที (ความชื้นของ HE ลดลง 16.52 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่คู่ผสมที่ 16 เป็นเวลา 5 นาที (ความชื้นของ HE ลดลง 5 เปอร์เซ็นต์) ส่งเสริมการสร้างและการงอกของ SSE สูงสุด ในขณะที่อาสลัน (2551) ลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอลงประมาณ 10-12 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโถดูดความชื้น หรือผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงประมาณ 20-25 นาที (ความชื้นของ HE ลดลงประมาณ 14.28 เปอร์เซ็นต์) ส่งผลให้เกิดการสร้าง SSE 25.21 SSE/HE และการงอกสูงสุด 39.61 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการลดความชื้นบางส่วน นอกจากส่งเสริมให้การสร้าง SSE เพิ่มขึ้นแล้ว ยังกระตุ้นให้ SSE งอกเพิ่มขึ้นอีกด้วย Find (1997) ที่ลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอของสนนอร์เวย์ โดยใช้โถดูดความชื้นพบว่าส่งเสริมการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอถึง 76 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการ

ลดความชื้นไม่สามารถงอกได้ Corredoira และคณะ (2003) ลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอเกาลัดลง 14 เปอร์เซ็นต์ พบว่าส่งเสริมการงอกได้ 41.7 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้การลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอมีผลทำให้การสร้าง และสะสมโปรตีนที่เรียกว่าเบตาโคนิเฟอรินลดลง ส่งผลให้เกิดการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ (Leal *et al* .,1995)

นอกจากนี้ยังพบว่า เมล็ดจากคู่ผสมเดียวกันให้การสร้างแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ รวมถึงการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้าม การรวมกันของยีนภายในลูกผสมแต่ละเมล็ดจึงไม่เหมือนกัน ซึ่งเป็นการรวมตัวของยีนแบบกระจายตัวต่อเนื่อง และลูกที่ได้มีลักษณะเป็นเฮเทอโรไซกัส ซึ่งการรวมกันของยีนจากพ่อและแม่อาจรวมกันแล้วส่งเสริมกันหรือหักล้างกันก็ได้ โดยเมล็ดที่มีศักยภาพขนาดใหญ่จะให้การพัฒนาดีกว่าเมล็ดที่มีศักยภาพขนาดเล็ก ซึ่งศักยภาพขนาดเล็กนี้อาจไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยง อีกทั้งแคลลัสที่ได้มีลักษณะแตกต่างกันออกไปอีกด้วย สอดคล้องกับการรายงานของ Sarasan และคณะ (2005) ที่พบว่าแต่ละเมล็ดจากคู่ผสมเดียวกันให้การงอกเป็นต้นที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เกิดจากยีนที่อยู่ภายในต้นลูกที่แตกต่างกันนั่นเอง อย่างไรก็ตามมีหลายปัจจัยที่จำเป็นต่อกระบวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโต แสง องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง และปฏิกิริยาสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างปัจจัยดังกล่าว ถือว่ามีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ และส่งเสริมกระบวนการงอกอีกด้วย (Aslam *et al*., 2008; Gow *et al*., 2009)

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้ามประเภทที่มีช่อดอกตัวผู้ และตัวเมียแยกกันบนต้นเดียวกัน (monoecious) แต่ช่วงเวลาการบานของดอกไม่พร้อมกัน ซึ่งโอกาสที่จะเกิดการผสมตัวเองก็เป็นไปได้ ดังนั้นจึงต้องตรวจสอบว่าเมล็ดที่ได้เป็นเมล็ดลูกผสม ไม่ได้เกิดจากการผสมตัวเอง เพราะจะทำให้สูญเสียเวลา และค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของศักยภาปาล์มน้ำมันที่นำมาเพาะเลี้ยง โดยใช้ 8 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ EgCIR008 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นพ่อแม่พันธุ์ได้ และสามารถยืนยันได้ว่าลูกผสมที่ได้ เป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างพ่อและแม่ที่แท้จริง ในขณะที่ Thawaro และ Te-chato (2009) รายงานการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของปาล์มน้ำมันคู่ผสม 366(D) x 72(P) ด้วยเครื่องหมาย SSR พบว่าไพรเมอร์ EgCIR1772 สามารถบ่งบอกความเป็นลูกผสมได้ โดยสามารถแยกแถบดีเอ็นเอของไซโกติกเอ็มบริโอที่มาจากทั้งพ่อและแม่ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ไพรเมอร์อื่นๆ ในเทคนิค SSR เพื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมในข้าว (Nandakumr *et al*.,

2004; Garg *et al*., 2006; Hashemi *et al*., 2009) และชา (Anonymous, 2009) พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่ได้ รวมถึงแถบดีเอ็นเอของลูกผสมได้เช่นกัน มีรายงานการใช้เครื่องหมาย SSR ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฝ้าย (Dongre and Parkhi, 2005) ชา (Borchetia, 2009) แตงกวา (Watcharawongpaiboon and Chunwongse, 2008) และข้าว (Sundaram *et al*., 2008) พบว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถแยกความแปรปรวนที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่ผ่านมามักมีข้อสงสัยเกี่ยวกับการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระหว่างการเพาะเลี้ยง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระยะของการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ เพื่อยืนยันว่าพืชต้นใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 ไม่ทำให้เกิดความแปรปรวน โดยได้ทำการตรวจสอบในระยะแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสม ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งสามระยะให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน ทำให้มั่นใจว่าไม่มีความแปรปรวนเกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงจนพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ อย่างไรก็ตามมีบางเครื่องมือที่พบแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมา หรือเกิดการยืดหดของแถบ ทั้งนี้เนื่องจากความคลาดเคลื่อน หรือความผิดพลาดของเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบทำให้เกิดลักษณะดังกล่าวเพิ่มขึ้นมา ไม่น่าจะเกิดจากความแปรปรวนทางพันธุกรรม เพราะดีเอ็นเอที่ใช้มาจากแหล่งเดียวกันนำมาใช้กับเครื่องวิเคราะห์ที่ต่างกัน สอดคล้องกับการรายงายของ Te-chato (1998a) ที่ผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันที่เก็บเกี่ยวจากต้นแม่เทเนอร่าผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส และพบว่าต้นที่ได้ไม่มีความผิดปกติของลักษณะทางสัณฐานแต่อย่างใด เมื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมพบว่าเหมือนต้นเดิมคือ 2n=2x=32 Singh และคณะ (2006) และ Singh และคณะ (2007) รายงานการใช้เครื่องหมาย SSR ในการทำแผนที่พันธุกรรม และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นเทเนอร่าที่ให้ผลผลิตดี คือ T128 จาก Malaysian Palm Oil Board (MPOB) และ UP1026 จาก Colombian โดยกำหนดให้ต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่าพันธุ์ดีเป็น ortets และต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น ramet พบว่า เครื่องหมายดังกล่าวสามารถแยกสายต้นปาล์มน้ำมันจากทั้ง 2 แหล่งได้ และเมื่อพิจารณาสายต้นปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าไม่มีความแปรปรวนเกิดขึ้นทั้งภายในและภายนอกกลุ่ม เมื่อนำสายต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ก็ไม่มีการความแปรปรวน หรือการเปลี่ยนแปลงของแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น เป็นการ

ยืนยันได้ว่าสายต้นปาล์มน้ำมันที่ชักนำผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ก่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม และเทคนิค SSR เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยสามารถใช้ 1) แยกสายต้น 2) แยกการเพาะเลี้ยงที่ปะปนออกจากกัน 3) ตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ของต้นที่ได้ และ 4) ยืนยันว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหมือนต้นแม่ทุกประการ และเมื่อนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกลับมาเพาะเลี้ยงอีกรอบต้นใหม่ที่ได้ก็ไม่เกิดความแปรปรวน มีรายงานที่ยืนยันได้ว่าต้นปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ผลผลิตสูงกว่าต้นที่ปลูกจากเมล็ดที่ได้จากการผสม อีกทั้งผลผลิตที่ได้มีความสม่ำเสมอ (Mutert and Fairhurst, 1999) นอกจากนี้ Borchetia และคณะ (2009) รายงานว่าการใช้เทคนิค SSR สามารถตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ได้เป็นอย่างดี และจากประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเทคนิคในการตรวจสอบความแปรปรวนดังกล่าว สามารถนำมาช่วยในการขยายพันธุ์ชาพันธุ์ดีจำนวนมากในทางการค้าได้เป็นอย่างดี

บทที่ 5

สรุป

1. การชักนำแคลลัส/เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

1.1 ปัจจัยทางชีวภาพ

1.1.1 ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างแคลลัส

คู่ผสมที่ 7 ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนคู่ผสมที่ 16 ให้ดัชนีความเร็วในการสร้างแคลลัสสูงสุด 35.5

แคลลัสที่สร้างมี 4 รูปแบบคือ แคลลัสแบบเกาะกันแน่น (compact callus) แคลลัสที่เกาะกันแบบหลวมๆ (friable callus) แคลลัสที่มีลักษณะเป็นปม (nodular callus) และแคลลัสที่มีลักษณะยืดยาว (linear callus)

คู่ผสมที่ 7 ให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ยใหญ่สุด 11.7 มิลลิเมตร

คู่ผสมที่ 14 ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 18 เปอร์เซ็นต์ คู่ผสมที่ 16 ให้การสร้างปมสูงสุด 15.79 ต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และให้ความเร็วในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 20.17 หลังการเพาะเลี้ยง 3 เดือน

1.1.2 ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส/โซมาติกเอ็มบริโอ

คู่ผสมที่ 9 และ 11 ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้เร็วที่สุดหลังการวางเลี้ยง 1 เดือน และคู่ผสมที่ 1 ให้อัตราการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 7.69 เปอร์เซ็นต์ ส่วนคู่ผสมที่ 7 ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 33.33 เอ็มบริโอต่อแคลลัส

1.2 ปัจจัยทางเคมี

ผลของสูตรอาหาร ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มน้ำหนักสด และจำนวนปมต่อแคลลัส

อาหารสูตร MS ให้การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสสูงกว่าอาหารสูตร Y_3 และให้การสร้างแคลลัสแบบปมสีเหลืองพร้อมที่จะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

dicamba ให้การเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ยสูงกว่าอาหารที่เติม 2,4-D

dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ให้น้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 512.20 กรัม โดยคู่ผสมที่ 2 ให้น้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 718 กรัม ในขณะที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างปมของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 32.99 ปมต่อแคลลัส และคู่ผสมที่ 8 ให้การสร้างปมของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 61.9 ปมต่อแคลลัส

1.3 ปัจจัยทางกายภาพ

ผลของความเข้มแสงต่อต่อการเพิ่มน้ำหนักสด และจำนวนปมต่อแคลลัส

ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 478.50 กรัม รวมถึงให้การสร้างปมต่อแคลลัสสูงสุด 32.96 ปมต่อแคลลัส โดยคู่ผสมที่ 7 ให้การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 673.50 กรัม ในขณะที่คู่ผสมที่ 8 ให้การสร้างปมสูงสุด 55 ปมต่อแคลลัส

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำ SSE และการงอกของต้นอ่อน

2.1 ปัจจัยทางชีวภาพ

คู่ผสม ระยะพัฒนาการ และขนาดของโซมาติกเอ็มบริโอต่อการชักนำและการงอกของ SSE

HE เท่านั้นที่ให้การสร้าง SSE
คู่ผสมที่ 16 ให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 57.33 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้การสร้าง 54.67 เปอร์เซ็นต์
HE ขนาด 9 มิลลิเมตร ของคู่ผสมที่ 16 ให้การสร้าง SSE สูงสุด 18 SSE/HE
คู่ผสมที่ 16 ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE เฉลี่ย สูงกว่าคู่ผสมที่ 7
HE ขนาด 9 มิลลิเมตร ของคู่ผสมที่ 16 ให้การสร้างยอดสูงสุด 18.6 ยอดต่อชิ้นส่วน และให้การพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์สูงสุดเฉลี่ย 0.8 ต้นต่อชิ้นส่วน

2.2 ปัจจัยทางเคมี

2.2.1 ผลของแหล่งคาร์บอน และระดับความเข้มข้นต่อการชักนำ และการงอกของ SSE

ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้การสร้าง SSE 80 เปอร์เซ็นต์ ในคู่ผสมที่ 7 และ 73.33 เปอร์เซ็นต์ ในคู่ผสมที่ 16

คู่ผสมที่ 16 ให้เปอร์เซ็นต์การสร้าง SSE เฉลี่ย 40 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การสร้างเฉลี่ย 34 เปอร์เซ็นต์

คู่ผสมที่ 16 ให้การสร้าง SSE เฉลี่ย 5.03 SSE/HE และการงอกเฉลี่ย 7.84 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน

2.2.2 ผลของ GA_3 ต่อการชักนำ และการงอกของ SSE

GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้าง SSE สูงสุด 18.93 SSE/HE และคู่ผสมที่ 16 ให้ค่าเฉลี่ยในการสร้าง SSE สูงกว่าคู่ผสมที่ 7 และเมื่อระดับความเข้มข้นของ GA_3 เพิ่มขึ้นเป็น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการสร้าง SSE รวมถึงการงอกของ SSE

2.2.3 ผลของผงถ่าน และการเติมอาหารเหลวต่อการงอกของ SSE

เมื่อนำ SSE ที่พัฒนาจาก HE มาวางเลี้ยงในอาหารเหลว หรือการวางเลี้ยงบนอาหาร 2 ชั้น เป็นเวลา 3 เดือน ให้การส่งเสริมการสร้างยอดสูงสุด 17.1 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่การวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และผงถ่าน เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์สูงสุดทั้งสองคู่ผสม ส่วนผงถ่านไม่เหมาะกับการนำมาชักนำการงอกของ SSE

2.3 ปัจจัยทางกายภาพ

ผลของการลดความชื้นต่อการชักนำและการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

การลดความชื้น โดยการผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณ SSE และการงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์เพียงเล็กน้อย

3. การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิค SSR

การตรวจสอบความเป็นลูกผสม และความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระยะแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงคัพภะลูกผสมคู่ที่ 7

และ 16 ในหลอดทดลอง พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR008 สามารถบ่งบอกความเป็นลูกผสมได้ และจากการตรวจสอบความแปรปรวนพบว่ามีความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอ ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSR

ปัจจุบันต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอยังคงมีน้อย และคาดว่าในอีก 6 เดือนข้างหน้าจะสามารถเพิ่มจำนวนต้นกล้าจากกระบวนการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 ได้เป็นจำนวนมาก สำหรับขั้นตอนการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่า และการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม แสดงในภาพภาคผนวกที่ 1

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพลังงาน. 2548. วิจัยสู้วิกฤติพลังงาน ‘ปาล์มน้ำมัน’ ไม่ใช่แค่ ‘ไบโอดีเซล’. หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ ปีที่ 28 ฉบับที่ 20430 หน้า 27.

กระทรวงพลังงาน. 2549. “ไบโอดีเซล” จากพืชสวนสู่พลังงานชาติ. หนังสือพิมพ์ข่าวสด ปีที่ 16 ฉบับที่ 5774 หน้า 33.

กรมวิชาการเกษตร. 2552. ฐานข้อมูลปาล์มน้ำมัน. เข้าถึงได้จาก htt://www.ait.nisit.kps.ku.ac.th/dbfieldcrop/maincrop/oilplam/mainoilplam1.htm (เข้าถึงเมื่อ 2 กุมภาพันธ์ 2552).

เกษตร เมืองใต้. 2541. อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันของประเทศมาเลเซีย...ก้าวที่ชาวสวนไทยต้องติดตาม. วารสารเคหการเกษตร 22: 53-65.

เจริญ สิงห์ลอ, สมปอง เตชะโต, อารี กังแฮ และสาลี ดนัยสร. 2532. การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมันเพื่อทวีจำนวนต้นและย่นระยะเวลาการงอก. การสัมมนาทางวิชาการปาล์มน้ำมัน ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ 16-17 พฤษภาคม 2532 หน้า 72 - 85.

ซูไฮมิน เจ๊ะมะลี. 2551. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราโดยการเพาะเลี้ยงคัพภะ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธนวดี พรหมจันทร์. 2551. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต้นปาล์มน้ำมันที่พัฒนาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2548. พันธุ์ การผลิตเมล็ดพันธุ์ และการอนุบาลต้นกล้าปาล์มน้ำมัน. *ใน* เส้นทางสู่ความสำเร็จการผลิตปาล์มน้ำมัน (บรรณาธิการ ธีระ เอกสมทราเมษฐ์), หน้า 25-49. สงขลา: นีโอพริ้น.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำ และสมเกียรติ สีสนอง. 2548. เส้นทางสู่ความสำเร็จการผลิตปาล์มน้ำมัน. สงขลา: คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บุษบา ล้อประเสริฐ. 2548. คู่มือการปลูกปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ: ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตร.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2549. ผู้ยิ่งใหญ่แห่งปาล์มน้ำมัน. วารสารเคหการเกษตร 11: 76-98.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. คัมภีร์ปาล์มน้ำมันพืชเศรษฐกิจเพื่อการบริโภคและอุปโภค. กรุงเทพฯ: มติชน.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศักดิ์ศิลป์ โชติสกุล, วินาภรณ์ กุฎีรัตน์ และกิจจารักษ์ วงษ์กุดเลาะ. 2541. ปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ: กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์ และสมปอง เตชะโต. 2552. ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 40 (พิเศษ): 226-229.

สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง. 2553. ความรู้ทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. เข้าถึงได้จาก http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/Tissue%20Culture/media.html#text2 (เข้าถึงเมื่อ 21 กรกฎาคม 2553).

สุจินต์ จินายน, ประเสริฐ ชิตพงศ์, พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และสมปอง เตชะโต. 2530. ภาวะ ปัญหา และแนวทางแก้ไขการขาดแคลนต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีในประเทศไทย. วารสารสงขลานครินทร์ 9: 105-110.

สุรกิตติ ศรีกุล. 2532. การปลูก. *ใน* ปาล์มน้ำมัน. หน้า 16-20. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนม และเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมปอง เตชะโต. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันใช้เพื่อการขยายพันธุ์ได้จริงหรือ: กรณีการวิจัยที่ผ่านมา. วารสารสงขลานครินทร์ (ฉบับพิเศษ) 23: 753-761

สมปอง เตชะโต, อาสลัน หิเล และอิบรอเฮม ยีดำ. 2547. การชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสและพืชต้นใหม่จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี. วารสารสงขลานครินทร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 26: 617-628.

สมปอง เตชะโต, พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, จรัสศรี นวลศรี และวันทนา เอ้งย่อง. 2530. การชักนำแคลลัสปฐมภูมิในปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบอ่อน. วารสารสงขลานครินทร์ 8: 1-6.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2548. แผนยุทธศาสตร์ปาล์มน้ำมัน. การประชุมสัมมนาวิชาการปาล์มน้ำมัน: เส้นทางสู่ความสำเร็จของเกษตรกร. ณ โรงแรมมารีไทม์ ปาร์ค แอนด์ สปา รีสอร์ท จังหวัดกระบี่ 8-9 กันยายน 2548 หน้า 1-7.

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อาสลัน หิเล. 2551. การเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี. ดุษฎีนิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อาสลัน หิเล และสมปอง เตชะโต. 2545. การปรับปรุงวิธีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาของประเทศไทย ครั้งที่ 3 ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 18-19 กรกฎาคม 2545 หน้า 31-32.

อรดี สหวัชรินทร์. 2526. อาหารวิทยาศาสตร์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Aberlence-Bertossi, F., Noirot, M. and Duval, Y. 1999. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 53-57.

Anonymous. 2009. Application studies of EST-SSR and ISSR markers in tea germplasms *(Camellia* spp.) from Yunnan. Agricultural Science 134.

Aslam, J., Mujib, A., Fatima, S. and Sharma, M. P. 2008. Cultural conditions affect somatic embryogenesis in *Catharanthus roseus* L. (G.) Don. Plant Biotechnology Reports 2: 179–189.

Avril, L. B., Richard, L. B. and Jennet, B. 1986. Regeneration in palms. *In* Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants (ed. I. K. Vasil) Vol.3, pp. 207-222. London: Academic Press.

Biofuel. 2007. Journey to forever-how to make your own clean burning biofuel, biodisel from cooking oil, fuel alcohol, renewable energy, glycine, soap making. Available from: http://journeytoforever.org/biofuel.html (Access 12 June 2007).

Borchetia, S., Das, S. C., Handique, P. J. and Das, S. 2009. High multiplication frequency and genetic stability for commercialization of the three varieties of micropropagated tea plants (*Camellia* spp.). Scientia Horticulturae 120: 544-550.

Borges, V. P. N. and Wagner, C. O. 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter?. Scientia Horticulturae 97: 193–202.

Chehmalee, S. and Te-chato, S. 2007. Genotypes, physiological ages of zygotic embryos and auxin as affect on germination and callus formation of oil palm. International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development, Bangkok, Thailand, 26 – 27 April 2007, pp. 166-169.

Chehmalee, S., and Te-chato, S. 2008. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. Journal of Agricultural Technology 4: 137–46.

Corley, R. H. V., Lee, C. H., Law, I. H. and Wong, C. Y. 1986. Abnormal flower development in oil palm clones. Planter 62: 233-240.

Corredoira, E., Ballester, A. and Vieitez, A. M. 2003. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. Annals of Botany 92: 129-136.

David, R. W. and Wayne, A. P. 2001. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryos germination and conversion. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 55-62.

Dongre, A. and Parkhi, V. 2005. Identification of cotton hybrid through the combination of PCR base RAPD, ISSR and microsatellite markers. Plant Biochemistry and Biotechnology 14: 53-55.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13–15.

Duong, T. N., Bui, V. L., Seiichi, F., Michio, T. and Thanh-Van, K. T. 2001. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. Plant Growth Regulation 33: 59–65.

Duval, Y., Engezmann, F. and Durand-Gasselin, T. 1995. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry (ed. Y.P.S. Bajaj) Vol. 30, pp. 335-352. Heidelberg: Springer-Verlag.

Eeuwens, C. J. 1978. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date palms (*Phoenix dactylifera*) cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum 42: 173–178.

Eshraghi, P., Reza, Z. and Mitra, M. 2005. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. African Journal of Biotechnology 4: 1309-1312.

Eugene E. K., Durand-Gasselin, T., Kouadio, J. Y., Flori, A. and Rival, A. 2006. A modeling approach of the *in vitro* conversion of oil palm (*Elaeis guineensis*) somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 99–112.

Find, J. I. 1997. Changes in endogenous ABA level in developing somatic embryos of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] in relation to maturation medium, desiccation and germination. Plant Science 128: 75-78.

Furini, A. and Jewell, D. C. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature and mature embryos of tropical and subtropical *Zea Mays* L. genotypes. Maydica 39: 155–164.

Garg, A., Singh, A. K., Prabhu, K. V., Mohapatra, T., Tyagi, N. K., Nandakumar, N., Singh, R., and Zaman, F. U. 2006. Utility of a fertility restorer gene linked marker for testing genetic purity of hybrid seeds in rice (*Oryza sativa* L.). Seed Science and Technology 34: 9-18.

Gow, W. P., Chen, J. T. and Chang, W. C. 2009. Effects of genotype, light regime, explants position and orientation on indirect somatic embryogenesis from leaf explants of Phalaenopsis orchids. Acta Physiologia Plantarum 31: 363–369.

Hashemi, S. H., Sayyed, A., Mohammad, M. M., Ghorban, A. N., and Ahmad, A. 2009. Identification of rice hybrids using microsatellite and RAPD markers. African Journal of Biotechnology 8: 2094-2101.

Hilae, A., and Te-chato, S. 2005. Effect of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis quineensis* Jacq.). Songklanakarin Journal Science Technology 27: 629-635.

Hussey, G. 1958. An analysis of the factors controlling the germination of the seed of oil palm, *Elaeis guineensis* (Jacq.). Annals of Botany 22: 259-284.

Jaligot, E., Beul, T. and Rival, A. 2002. Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. Theoretical and Applied Genetics 104: 1263 -1269.

Jian, S., Yang, Z., Nian, L., Zezheng, G., Qiang, W., Zhenhua, X. and Hai, R. 2006. Genetic variation in the endangered endemic species *Cycas fairylakea* (Cycadaceae) in China and implications for conservation. Biodiversity and Conservation 15: 1681–1694.

Kanchanapoom, K. and Domyoas, P. 1999. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis quineensis* Jacq.) embryo culture. ScienceAsia 25: 195-202.

Karkonen, A. 2001. Plant tissue cultures as models for tree physiology: somatic embryogenesis of *Tilia corda* and Lignin biosynthesis in *Picea abies* suspension cultures as case studies. Viikki: Department of Biosciences Division of Plant Physiology University of Helsinki.

Karun, A. and Sajini, K. K. 1996. Plantlet regeneration from leaf explants of oil palm seedlings. Current Science 71: 922-926.

Karun, A, Siril, E. A., Radha, E. and Parthasarathy, V. A. 2004. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). Current Science 86: 1623-1628.

Khaw, C. H. and Ng. S. K. 1999. Agrocom's proven tissue culture technology for oil palm. Presented at the Special Meeting on "Potential of the Oil Palm Industry and Clonal Tissue-Cultured Oil Palm Development in South Thailand", Meritime Hotel, Krabi, 6th November 1999, pp. 1-10.

Kumria, R., Sunnichan, V. G., Das, D. K., Gupta, S. K., Reddy, V. S., Bhatnager, R. K. and Leelavathi, S. 2003. High-frequency somatic embryos production and maturation into normal plant in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. Plant Cell Reports 21: 635-639.

Larkin, P. J. and W. R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics 60: 197-214.

Leal, I., Misra, S., Attree, S. M. and Fowke, L. C. 1995. Effect of abscisic acid, osmoticum and desiccation on 11S storage protein gene expression in somatic embryos of white spruce. Plant Science 106: 121-128.

Lou, H. and Kako, S. 1995. Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. Scientia Horticulturae 64: 11–20.

Magdalita, P. M., Damasco, O. P., Beredo, J. C. and Adkins, S. W. 2004. Effect of physical, chemical and light-treatments on germination and growth of tissue culture coconut. Proceeding of 4th International Science Congress, Brisbane Convention and Exhibition Centre, Australia, 26 September -1 October 2004., pp. 253.

Malaysia's Sustainable Palm Oil. 2007. Palm oil facts. Available from: http://www. Soyatech.com/Palm_Oil_Facts.htm (Access 19 August 2007).

Mamiya, K. and Sakamoto, Y. 2000. Effects of sugar concentration and strenght of basal medium on conversion of somatic embryos in *Asparagus officinalis* L. Scientia Horticulturae 84: 15-26.

Masanori, O. and Nishino, K. 1999. Effect of temperature and light intensity on growth of the regenerated bulblet of *Fritillaria camtschatcensis* Ker-Gawl. *in vitro* culture. Environment Control in Biology 37: 243-247.

Matthes, M., Singh, R., Cheah, S. C. and Karp, A. 2001. Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. Theoretical and Applied Genetics 102: 971-979.

Morimoto, Y., Patrick, M., Makoto, K., Hiroshi, F. and Hiroko, M. 2006. RAPD polymorphism of the white-flowered gourd (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. landraces and its wild relatives in Kenya. Genetic Resources and Crop Evolution 53: 963–974.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Mutert, E. and Fairhurst, T. H. 1999. Oil palm clones: Productivity enhancement for the future. Better Crops International 13: 45-47.

Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S. and Ito, A. 2001. Effects of sugar and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. Scientia Horticulturae 90: 85-92.

Nandakumr, N., Singh, A., Sharma, K., Mohapara, R. K., Prabhu, T. K. V. and Zaman, F. U. 2004. Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. Euphytica 136: 257-264.

Ouyang, J., Wang, X., Zhao, B. and Wang, Y. 2003. Light intensity and spectral quality influencing the callus growth of *Cistanche deserticola* and biosynthesis of phenylethanoid glycosides. Plant Science 165: 657-661.

Paiva, N. V. B. and Otoni, W. C. 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter?. Scientia Horticulturae 97: 193-202.

Perera, P. I. P., Hocher, V., Verdeil, J. L., Doulbeau, S., Yakandawala, D. M. D. and Weerakoon, L. K. 2006. Unfertilized ovary: anovel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 26: 21-28.

Promchan, T. and Te-chato, S. 2007. Size of haustorium embryo affecting secondary somatic embryo formation of oil palm and its origin. International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development, Bangkok, Thailand. 26-27 April 2007. pp. 22-25.

Rabechault, H. and Martin, J. P. 1976. Multiplication vegetative du palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) a laide de culture de tissus foliaires. Comptes Rendus de l Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie (Paris) 283: 1735–1737.

Rakshit, S., Zerka, R., Sekha, J. C., Fatma, T. and Sain, D. 2010. Callus induction and whole plant regeneration in elite Indianmaize (*Zea mays* L.) inbreds. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 100: 31-37.

Rajesh, M. K., Radha, E., Karun A. and Parthasarathy, V. A. 2003. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm–the effect of exogenous polyamines. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 41–47.

Rani, V., and Raina, S. N. 2000. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant 36: 319-330.

Rodriguez-Sahagun, A., Gustavo, A. H., Jose, M. R. D., Benjamın, R. G., Jesus, C. M. and Osvaldo, A. C. H. 2010. Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. *Azul*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1: 1-5.

Saenz, L., Azpeitia, A., Chuc-Armendariz, B., Chan, J. L., Verdeil, J. L., Hocher, V. and Oropeza, C. 2006. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 42: 19–25.

Sanputawong, S. and Te-chato, S. 2008. Effect of genotypes of oil palm as indicator for speed of callus and embryogenic callus formation. Journal of Agricultural Technology 4: 147-156.

Sarasan, V., Ramsay, M. M. and Roberts, A. V. 2005. Rescue of endangered palms by *in vitro* methods: the case of 'bottle palm'. *In* Protocol for Somatic Embryogenesis in Wood Plants (eds. S. M. Jain and P. K. Gupta) Vol. 77, pp. 267-274. London: Springer.

Sasanuma, T., Chabane, K., Endo, T. R. and Valkoun, J. 2004. Characterization of genetic variation in and phylogenetic relationships among diploid Aegilops species by AFLP: incongruity of chloroplast and nuclear data. Theoretical and Applied Genetics 108: 612–618.

Singh, R., Jayanthi, N., Soon-Guan, T., Jothi, M. P. and Suan-Choo, C. 2007. Development of simple sequence repeat (SSR) markers for oil palm and their application in genetic mapping and fingerprinting of tissue culture clones. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 15: 121-131.

Singh, R., Rahimah, A. R., Leslie, O. C. L. and Cheah, S. C. 2006. Microsatellite probes for fingerprinting oil palm clones. *In* Malaysian Palm Oil Board. Vol. 305, pp. 312-314. Kuala Lumpur : Ministry of Plantation Industries and Commodities.

Sogeke, A. K. 1996. Rapid callus proliferation, somatic embryogenesis and organogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Elaeis 8: 92-103.

Stamp, J. A. and G. G., Henshaw. 1987. Somatic embryogenesis from clonal leaf tissue of cassava. Annals of Botany 59: 445-450.

Stasolla, C. and E. C., Yeung. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 15-35.

Steinmacher, D. A., Clement, C. R. and Guerra M. P. 2007. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 89: 15–22.

Sundaram, R. M., Vishnupriya, M. R., Biradar, S. K., Laha, G. S., Reddy G. A., Rani, S. N., Sarma, N. P. and Sonti, R. V. 2008. Marker assisted introgression of bacterial blight resistance in Samba Mahsuri, an elite indica rice variety. Euphytica 80: 411-422.

Tang, H., Ren, Z., and Krezal, G. 2000. Improvement of English walnut somatic embryo germination and conversion by desiccation treatments and plantlet development by lower medium salts. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 36: 47-50.

Te-chato, S. 1998a. Callus induction from cultured zygotic embryo of oil palm subsequent to plantlet regeneration. Songklanakarin Journal Science Technology 20: 1-6.

Te-chato, S. 1998b. Fertile plant from young leaves-derived somatic embryos of oil palm. Songklanakarin Journal Science Technology 20: 7-13.

Te-chato, S. 2000. Random amplified polomorphic DNA (RAPD) makers for genetic analysis in somaclones of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Thai Journal Agricultural Science 33: 137-145.

Te-chato, S. and Muangkaewngam, A. 1992. Tissue culture of oil palm: Root induction efficiency from young leaf-derived shoot. Songklanakarin Journal Science Technology 14: 223-229.

Te-chato, S. and Hilae, A. 2007. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. *var. tenera*). Journal of Agricultural Technology 3: 345-357.

Te-chato, S., Hilae, A. and Yeedum, I. 2003. Histological study on oil palm of somatic embryos development as affected by sources of leaf explants and auxin. Journal of Agricultural Science 36: 243-250.

Te-chato, S., Hilae, A. and Yeedum, I. 2002. Improve callus induction and embryogenic callus formation from cultured young leaves of oil palm seedling. Thai Journal Agriculture Science 35: 407-413.

Teixeira, J. B., Sondahl, M. R. and Kirby, E. G. 1994. Somatic embryogenesis from immature inflorescences oil palm. Plant Cell Reports 13: 247-250.

Teixeira, J. B., Sondahl, M. R., Nakamura, T. and Kirby, E. G. 1995. Establishment of oil palm cell suspension and plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 105-111.

Teixeira, J. B., Sondahl, M. R., Nakamura, T. and Kirby, E. G. 1993. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34: 227-233.

Thawaro, S. 2009. Screening and detection of hybrid oil palms by DNA markers and theirs propagation. Ph.D Dissertation. Prince of Songkla University.

Thawaro, S. and Te-chato, S. 2007. Auxins as an effect on types of callus formation from mature zygotic embryo culture of hybrid oil palms. International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development, Bangkok, Thailand. 26 – 27 April 2007. pp. 166-169.

Thawaro, S. and Te-chato, S. 2008. RAPD (random amplified polymorphic DNA) marker as a tool for hybrid oil palm verification from half mature zygotic embryo culture. Journal of Agricultural Technology 4: 165-176.

Thawaro, S. and Te-chato, S. 2009. Application of molecular markers in the hybrid verification and assessment of somaclonal variation from oil palm propagated *in vitro*. ScienceAsia 35: 142–149.

Tisserat, B. 1982. Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. Euphytica 31: 201-214.

Usman, S. I., Ado, G. S. and Ng, S. Y. 2007. Media appraisal for somatic embryogenesis of elite inbred lines of Maize. African Crop Science Society 8: 769-772.

Vasic, D., Alibert, G. and Skoric, D. 2001. Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schrader). Plant Cell Reports 20: 121-125.

Viloria, Z., Grosser, J. W. and Bracho, B. 2005. Immature embryo rescue, culture and seedling development of acid citrus fruit derived from interploid hybridization. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 82: 159–167.

Wang, H. C., Chen, J. T., Wu, S. P., Lin, M. C. and Chang, W. C. 2003. Plant regeneration through somatic embryogenesis from zygrotic embryo-derived callus of *Areca catechu* L. (Arecaceae). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 39: 34–36.

Wang, H. C., Chen, J. T. and Chang, W. C. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. Journal of Plant Biology 50: 279-282.

Watcharawongpaiboon, N. J. and Chunwongse, J. 2008. Development and characterization of microsatellite markers from an enriched genomic library of cucumber (*Cucumis sativus*). Plant Breeding 127: 74-81.

Wilson, D. P. M, Sullivan, J. A., Marsolais, A. A., Tsujita, M. J. and Senaratna, T. 1996. Improvement of somatic embryogenesis in zonal geranium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 27-32.

Wooi, K. C. 1995. Oil palm tissue culture – current practice and constraints. *In* Recent Developments in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology (eds. V. Rao, I. E. Henson and N. Rajanaidu) pp. 21-32. Bangi : Malaysian Palm Oil Board.

Zhang, G. Q., Zhou, W. J., Gu, H. H., Song, W. J. and Momoh, E. J. 2003. Plant regeneration from the hybridization of *Brassica juncea* and *B. napus* through embryo culture. Journal of Agronomy and Crop Science 189: 347-350.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ และสารละลายอื่น ๆ

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990)

1. CTAB บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

PVP-40	1.00	กรัม
NaCl	8.12	กรัม
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	4 .00	มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCl (pH 8.0)	10.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติม CTAB ปริมาณ 2 กรัม และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าสารละลายได้หมด ไปนึ่งฆ่าเชื้อ เติมสาร β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 % ก่อนนำมาใช้

2. TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.0 M Tris-HCl (pH 7.5)	500	ไมโครลิตร
0.25 M Na_2EDTA (pH 7.0)	200	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. TAE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	121.1	กรัม
Acetic acid	28.5	มิลลิลิตร
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	50.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

4. TBE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	216.0	กรัม
Boric acid	110.0	กรัม
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	80.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 4 ลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

5. DNA sample บัฟเฟอร์

Bromophenol blue	125.0	มิลลิกรัม
Xylene cyanol	125.0	มิลลิกรัม
Glycerol	15.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Te-chato และ คณะ (2000)

1. TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	500	ไมโครลิตร
0.1 M EDTA (pH 8.0)	200	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. SDS ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

SDS	5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. Ammonium acetate ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ammonium acetate	38.54	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยมิลลิพอร์

สารเคมีที่ใช้ในการทำ denaturing electrophoresis

1. 30% Acrylamide Bis-Acrylamide solution ที่ผสมแล้ว ในอัตราส่วน 29:1 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. 6% polyacrylamide gel (Acrylamide : Bisacrylamide = 29:1) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

30% Acrylamide Bis-Acrylamide solution (29:1)	60	มิลลิลิตร
5X TBE	60	มิลลิลิตร
Urea	135	กรัม

น้ำกลั่น	105	มิลลิลิตร

3. TBE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tris Base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5M Na_2EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

4. 10% (w/v) Ammonium persulfate (APS) เตรียมปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Ammonium persulfate	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. 6X gel loading buffer (สำหรับ denaturing polyacrylamide gel) เตรียมปริมาตร 1 มิลลิลิตร

Formamide	950	ไมโครลิตร
5% Bromophenol blue	10	ไมโครลิตร
5% Xylene cyanol	10	ไมโครลิตร
1 M EDTA	20	ไมโครลิตร

ควรแบ่งสารละลายใส่หลอดเล็ก แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. Bind silane สำหรับทากระจกแผ่นหลังที่ติดกับเจล

Bind silane	1.0	ไมโครลิตร
Glacial acetic acid	2.5	ไมโครลิตร
95% Ethanol	500	ไมโครลิตร

สารเคมีที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอด้วย Silver nitrate

1. Fixative และ Stop solution (10% Acetic acid) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

2. 0.2% Silver nitrate ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Silver nitrate	2.0	กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. Develop solution ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Sodium carbonate 25.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้เย็นจัดก่อนนำมาใช้ ขณะใช้ให้เติม 40% Formaldehyde 500 ไมโครลิตร และ Sodium thiosulfate เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยเครื่อง E-gene

1. WP (Washing solution)

QX DNA dilution buffer	7	มิลลิลิตร
QX Mineral oil	5	มิลลิลิตร

2. WI (Washing solution)

QX Wash buffer	7	มิลลิลิตร
QX Mineral oil	5	มิลลิลิตร

3. Buffer

QX Separation buffer	15	มิลลิลิตร
QX Mineral oil	5	มิลลิลิตร

4. ดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 คู่เบส

Ampli Taq Gold 360	10	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 คู่เบส	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
KH_2PO_4	170.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
ธาตุเหล็ก	
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10
Glycine	2.00
Sucrose	30,000.00
วุ้น	7,500.00

pH 5.7

ตารางภาคผนวกที่ 2 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร Y3

องค์ประกอบ	**ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)**
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4Cl	535.00
KNO_3	2,020.00
KCl	1,492.00
ธาตุอาหารรอง	
$NH_2PO_4 1H_2O$	312.00
KI	0.83
H_3BO_3	3.10
$CaCl_2 2H_2O$	294.00
$MnSO_4.H_2O$	11.20
$ZnSO_4.7H_2O$	7.20
$CuSO_4.5H_2O$	0.16
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.24
$CoCl_2.6H_2O$	0.24
$NiCl_2 6H_2O$	0.024
$MgSO_4 7H_2O$	247.00
ธาตุเหล็ก	
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
Sucrose	30,000.00
วุ้น	7,500.00

pH 5.7

ตารางภาคผนวกที่ 3 ไพรเมอร์ SSR ที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis quineensis* Jacq.)

Primer name	Repeat motif	5'-3' Forward primer	5'-3' Reverse primer
EgCIR008	$(GA)_{17}$	CGGAAAGAGGGAAGATG	ACCTTGATGATTGATGTGA
EgCIR0243	$(GA)_{17}$	TGGAACTCCTATTTTACTGA	GCCTCGTAATCCTTGTCA
EgCIR0337	$(GT)_{6}$	GTCTGCTAAAACATCAACTG	GAGGAGGAGGGGAACGATAA
	$(GC)_{4}$		
EgCIR0409	$(CCG)_{6}$	AGGGAATTGGAAGAAAAGAAAG	TCCTGAGCTGGGGTGGTC
EgCIR0446	$(CCG)_{7}$	CCCCTTCGAATCCACTAT	CAAATCCGACAAATCAAC
EgCIR0465	$(CCG)_{6}$	TCCCCCACGACCCATTC	GGCAGGAGAGGCAGCATTC
EgCIR0781	$(GA)_{17}$	CCCCTCCCTACCACGTTCCA	TGTTTGCTGTTGCTCTTTGATTTTC
EgCIR0905	$(GT)_{14}$ctca	CACCACATGAAGCAAGCAGT	CCTACCACAACCCCAGTCTC
	$(GA)_{11}$		

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างแคลลัส และดัชนีความเร็วในการสร้างแคลลัส หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน

คู่ผสม	การสร้างแคลลัส (%)	ดัชนีความเร็วในการสร้างแคลลัส
1	10.09ij	11.83ef
2	7.69j	8.33fg
3	24.76bc	15.17e
4	13.02ghij	13.33e
5	22.75cd	26.5c
6	11.27hij	11.67ef
7	33.33a	19.33d
8	22.05cde	21.17d
9	20.67cdef	30.67b
10	15.23fghi	21.5d
11	17.74defg	14.5e
12	16.67efgh	12.33e
13	8.67j	6.5g
14	30ab	19.5d
15	21.03cde	20.33d
16	24.77bc	35.5a
F-test	**	**
C.V. (%)	16.23	11.19

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างแคลลัสชนิดต่างๆ หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน

คู่ผสม	ชนิดของแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)			
	Compact	Friable	linear	Nodular
1	7de	7.9h	1.32hi	11.84gh
2	1.95g	2.56i	0i	17.95ef
3	4.34f	14.29g	37.14a	17.14ef
4	4.69ef	15.62g	7.81cdef	10.94gh
5	17.65a	5.88h	9.41c	35.29c
6	5.89de	14.71g	4.41fgh	8.82hij
7	8.82b	29.41cd	8.82cd	52.94a
8	7.86b	20.23f	5.62def	11.23gh
9	5def	19f	8cde	21e
10	2.47g	27.16de	4.94efg	9.88ghi
11	6.45cd	40.32b	1.61ghi	4.84j
12	4f	30c	2ghi	14fg
13	4f	8h	8cde	6ij
14	0h	44a	6cdef	40b
15	7.69bc	13.85g	4.62efgh	36.92bc
16	6.42cd	24.77e	15.6b	27.52d
รวม	94.24	317.71	125.3	326.31
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	13.567	8.160	23.647	11.378

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อขนาดแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ย หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

คู่ผสมที่	ขนาดแคลลัส (มม.)			ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (มม.)
	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	
1	2.4f	5.0cde	6.1f	4.5efg
2	2.3f	4.4de	4.6g	3.8g
3	4.7b	5.8cde	7.9e	6.1cde
4	3.7de	5.6cde	7.7e	5.7cdef
5	3.1e	5.0cde	5.6fg	4.6efg
6	2.3f	3.6e	4.3g	3.4g
7	7.8a	13.1a	14.2b	11.7a
8	1.3g	5.9cde	7.5e	4.9defg
9	3.9cd	7.2bc	7.8e	6.3cd
10	4.6bc	6.3cd	9.5cd	6.8c
11	4.3bcd	6.1cde	8.6de	6.3cd
12	1.3g	4.8cde	5.7fg	3.9g
13	1.8fg	9.3b	9.7cd	6.9c
14	2.0fg	9.6b	10.5c	7.4bc
15	0h	3.7de	8.8de	4.2fg
16	0h	9.3b	16.7a	8.7b
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	14.61	20.91	9.67	15.28

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จำนวนปมต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และดัชนีความเร็วในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

คู่ผสม	การเกิด EC (%)	จำนวนnodule/ EC	ความเร็วในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส
1	5.21g	4.25efgh	1.167ghi
2	0.427k	3.5fghi	0.333i
3	6.943ef	4.4defgh	2.5fg
4	3.123h	8.27b	2.5fg
5	6.507fg	6.25cde	3.333ef
6	0.98jk	2.5hi	0.833hi
7	15.477b	7.5bc	0.5i
8	2.567hij	4.835defg	2.167fgh
9	5g	5.51cdef	4.333e
10	8.23de	4.515defgh	7.167cd
11	12.363c	2.89ghi	7.667c
12	1.333ijk	1.5i	0.667hi
13	2.667hi	6.5bcd	1.667ghi
14	18a	5.9cde	9.333b
15	8.72d	5.98cde	6.167d
16	16.517ab	15.795a	20.167a
F-test	**	**	**
C.V. (%)	13.121	19.855	18.894

ตารางภาคผนวกที่ 8 ความแปรปรวนของการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัสของปาล์มน้ำมันลูกผสม 10 คู่ผสม (T) หลังการวางเลี้ยงบนอาหาร 2 สูตร (M) คือ MS และ Y3 เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ dicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (N) คือ 1 1.5 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	9	137608.73	15289.86	3.27**	0.0006
M	1	43.25	43.25	0.01ns	0.9234
N	3	764874.7	254958.2	54.57**	0.0001
M×N	3	37332.34	12444.11	2.66*	0.0470
T	9	1711953.23	190217	40.71**	0.0001
M×T	9	483462.11	53718.01	11.50**	0.0001
N×T	27	1120240.76	41490.4	8.88**	0.0001
M×N×T	27	1169783.32	43325.31	9.27**	0.0001
Error	711	3322052.48	4672.366		
Total	799	8747350.88			

C.V. 21.62 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

*: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($0.01<p<0.05$)

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 9 ความแปรปรวนของการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสปาล์มน้ำมันลูกผสม 10 คู่ผสม (T) หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ออกซิน 2 ชนิด (M) คือ 2,4-D และ dicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (N) คือ 0.1 0.3 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	9	57080.9	6342.322	0.52ns	0.8695
M	1	118243.85	118243.9	9.46**	0.0022
N	3	2011519.1	670506.4	53.67**	0.0001
M×N	3	170888.46	56962.82	4.56**	0.0036
T	9	41181072.65	4575675	366.26**	0.0001
M×T	9	375276.41	41697.38	3.34**	0.0005
N×T	27	1813849.66	67179.62	5.38**	0.0001
M×N×T	27	1148458.3	42535.49	3.4**	0.0001
Error	711	8882429.11	12492.87		
Total	799	55758818.4			

C.V. 25.03 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 10 ความแปรปรวนของการเพิ่มจำนวนปมของแคลลัสปาล์มน้ำมันลูกผสม 10 คู่ผสม (T) หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ออกซิน 2 ชนิด (M) คือ 2,4-D และ dicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (N) คือ 0.1 0.3 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	9	236.17	26.24111	1.05ns	0.4006
M	1	1161.62	1161.62	46.38**	0.0001
N	3	7973.3	2657.767	106.03**	0.0001
M×N	3	245.8	81.93333	3.27*	0.0209
T	9	316806.62	35200.74	1404.38**	0.0001
M×T	9	1172.21	130.2456	5.20**	0.0001
N×T	27	7760.38	287.4215	11.47**	0.0001
M×N×T	27	461.88	17.10667	0.68ns	0.8871
Error	711	17821.23	25.06502		
Total	799	353639.2			

C.V. 18.68 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

*: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($0.01<p<0.05$)

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 11 ความแปรปรวนของการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสของปาล์มน้ำมันลูกผสม 10 คู่ผสม (T) หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ (N) คือ 19 22 25 และ 27 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	9	11857.25	1317.472	0.44ns	0.9148
N	3	75486.75	25162.25	8.34**	0.0001
T	9	18626847.25	2069650	686.25**	0.0001
N×T	27	104335.75	3864.287	1.28ns	0.1616
Error	351	1058572.75	3015.877		
Total	399	19877099.75			

C.V. 11.94 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 12 ความแปรปรวนของการเพิ่มจำนวนปมของแคลลัสของปาล์มน้ำมันลูกผสม 10 คู่ผสม (T) หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ (N) คือ 19 22 25 และ 27 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	9	408	45.33333	1.40ns	0.1881
N	3	22350.65	7450.217	229.48**	0.0001
T	9	133560.8	14840.09	457.11**	0.0001
N×T	27	23044.13	853.4863	26.29**	0.0001
Error	351	11395.3	32.46524		
Total	399	190758.88			

C.V. 22.66 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 13 ความแปรปรวนของการสร้าง SSE ของปาล์มน้ำมันลูกผสม 2 คู่ผสม (M) คือ คู่ผสมที่ 7 และ 16 หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน (N)

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	14	75.9	5.421429	3.23**	0.0016
M	1	86.4	86.4	51.47**	0.0001
N	1	1500	1500	893.62**	0.0001
M*N	1	48.6	48.6	28.95**	0.0001
Error	42	70.5	1.678571		
Total	59	1781.4			

C.V. 11.89 %

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 14 ความแปรปรวนของระยะพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอ (N) คือระยะรูปกลม และสร้างใบเลี้ยงขนาดต่างๆ (T) คือ 3, 5, 7, 9 และ 12 มิลลิเมตร ของปาล์มน้ำมัน 2 คู่ผสม (M) คือ คู่ผสมที่ 7 และ 16 เพื่อชักนำ SSE หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	14	41.1	2.935714	1.54ns	0.0958
M	1	507	507	266.47**	0.0001
N	1	10443	10443	5488.71**	0.0001
M×N	1	507	507	266.47**	0.0001
T	4	1184.1	296.025	155.59**	0.0001
M×T	4	213.3	53.325	28.03**	0.0001
N×T	4	1184.1	296.025	155.59**	0.0001
M×N×T	4	213.3	53.325	28.03**	0.0001
Error	266	506.1	1.902632		
Total	299	14799			

C.V. 23.38 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 15 ความแปรปรวนของการงอกของ SSE ที่ชักนำจากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยงขนาดต่างๆ (N) คือ 3, 5, 7, 9 และ 12 มิลลิเมตร ของปาล์มน้ำมัน 2 คู่ผสม (T) คือ คู่ผสมที่ 7 และ 16 ต่อการงอกยอดบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	14	106.2	7.585714	0.98ns	0.4772
T	1	29.04	29.04	3.75ns	0.0550
N	4	1831.2	457.8	59.16**	0.0001
T*N	4	22.56	5.64	0.73ns	0.5739
Error	126	975	7.738095		
Total	149	2964			

C.V. 24.4 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 16 ความแปรปรวนของการสร้าง SSE ของปาล์มน้ำมันลูกผสม 2 คู่ผสม (N) คือ คู่ผสมที่ 7 และ 16 หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ (T) ที่ 2 ระดับความเข้มข้น (D) คือ 0.1 และ 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	4	13.4	3.35	1.6ns	0.1837
N	1	86.49	86.49	41.24**	0.0001
T	4	1168.9	292.225	139.33**	0.0001
N×T	4	125.66	31.415	14.98**	0.0001
D	1	182.25	182.25	89.89**	0.0001
N*D	1	79.21	79.21	37.77**	0.0001
T*D	4	450.3	112.575	53.67**	0.0001
N*T*D	4	155.14	38.785	18.49**	0.0001
Error	76	159.4	2.097368		
Total	99	2420.75			

C.V. 34.9 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 17 ความแปรปรวนของการงอกของ SSE ของปาล์มน้ำมันลูกผสม 2 คู่ผสม (N) คือ คู่ผสมที่ 7 และ 16 จากการชักนำ SSE บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ (T) ที่ 2 ระดับความเข้มข้น (D) คือ 0.1 และ 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำมาชักนำการงอกบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	4	51.7	12.925	1.92ns	0.1161
N	1	166.41	166.41	24.69**	0.0001
T	4	1520.8	380.2	46.4**	0.0001
N×T	4	125.04	31.26	4.64**	0.0021
D	1	110.25	110.25	16.36**	0.0001
N*D	1	0.01	0.01	0.0ns	0.9694
T*D	4	633.2	158.3	23.48**	0.0001
N*T*D	4	23.04	5.76	0.85ns	0.4953
Error	76	512.3	6.740789		
Total	99	3142.75			

C.V. 39.64 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 18 ความแปรปรวนของการสร้าง SSE ของปาล์มน้ำมันลูกผสม 2 คู่ผสม (N) คือ คู่ผสมที่ 7 และ 16 หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับ GA_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (T) คือ 0.01 0.05 0.1 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	14	116.24	8.302857	172ns	0.0571
N	1	125	125	25.85**	0.0001
T	5	185.11	37.022	7.66**	0.0001
N×T	5	140.47	28.094	5.81**	0.0001
Error	154	744.42	4.833896		
Total	179	1311.24			

C.V. 14.05 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 19 ความแปรปรวนของการงอกของ SSE ของปาล์มน้ำมันลูกผสม 2 คู่ผสม (N) คือ คู่ผสมที่ 7 และ 16 หลังการชักนำ SSE บนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับ GA_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (T) คือ 0.01 0.05 0.1 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำมาชักนำการงอกบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	14	151.58	10.82714	1.48ns	0.1236
N	1	200.56	200.56	27.45**	0.0001
T	5	267.04	53.408	7.31**	0.0001
N×T	5	21.78	4.356	0.6 ns	0.7029
Error	154	1124.96	7.304935		
Total	179	1765.91			

C.V. 14.67 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 20 ความแปรปรวนของการงอกของ SSE ของปาล์มน้ำมันลูกผสม 2 คู่ผสม (N) คือ 7 และ 16 ที่วางเลี้ยงในอาหาร 3 แบบ 6 วิธี (T) เป็นเวลา 3 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	14	101.57	7.255	0.88ns	0.5790
N	5	82.69	16.538	10.06**	0.0018
T	1	2624.31	2624.31	63.84**	0.0001
N×T	5	178.84	35.768	4.35**	0.0010
Error	154	1266.16	8.221818		
Total	179	4253.58			

C.V. 21.74 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 21 ความแปรปรวนของการสร้าง SSE ของปาล์มน้ำมันลูกผสม 2 คู่ผสม (N) คือ คู่ผสมที่ 7 และ 16 หลังจากลดความชื้นเป็นเวลาต่าง ๆ (T) คือ 0 5 10 20 30 และ 40 นาที และนำมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	14	229.8	16.41429	2.71**	0.0014
N	1	665.09	665.09	109.95**	0.0001
T	5	70.33	14.066	2.33*	0.0454
N×T	5	8.04	1.608	0.27ns	0.9311
Error	154	931.53	6.048896		
Total	179	1904.8			

C.V. 15.9 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

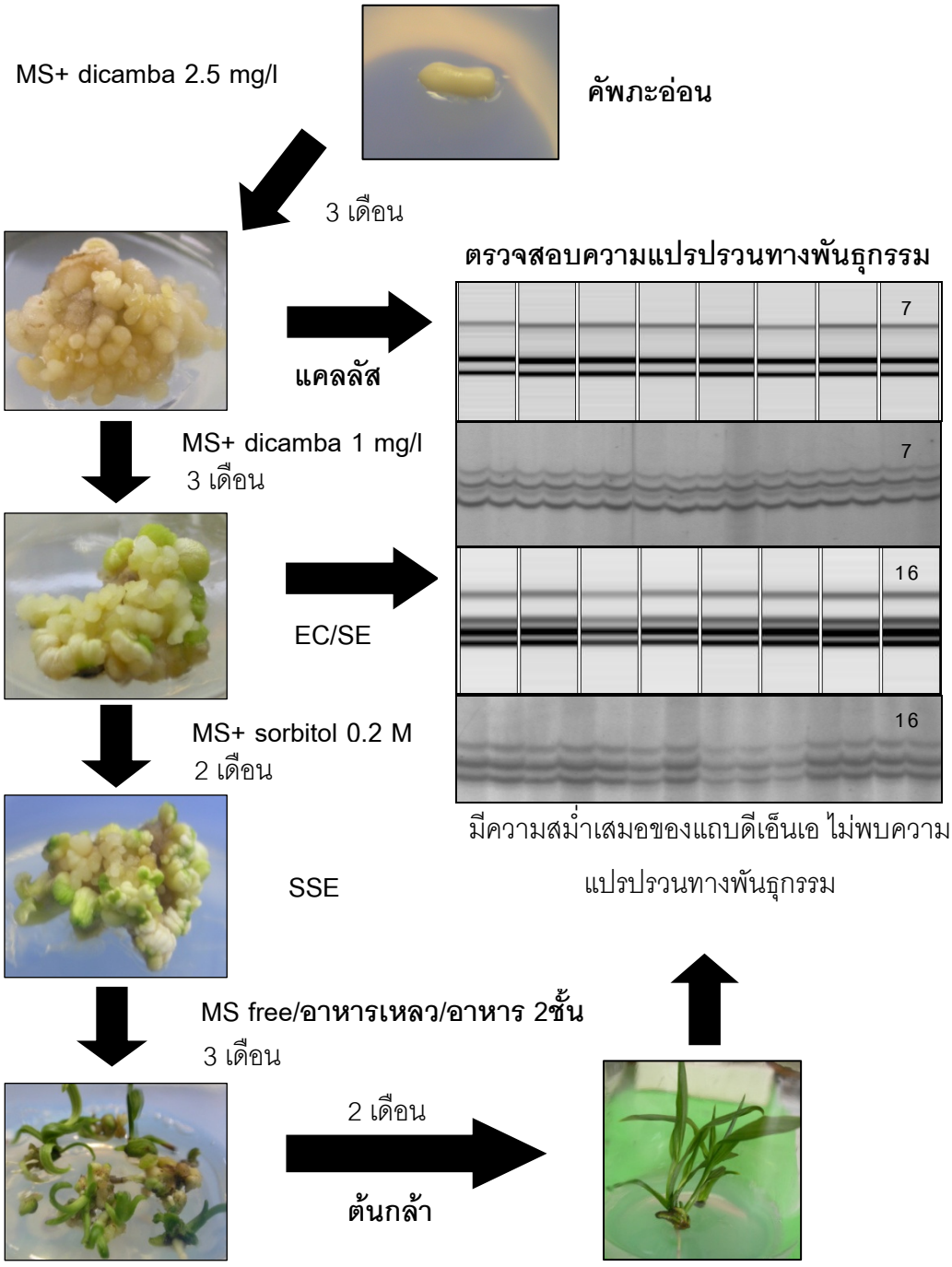
ตารางภาคผนวกที่ 22 ความแปรปรวนของการงอกของ SSE ของปาล์มน้ำมันลูกผสม 2 คู่ผสม (N) คือ คู่ผสมที่ 7 และ 16 หลังจากลดความชื้นเป็นเวลา (T) คือ 0 5 10 20 30 และ 40 นาที และนำมาชักนำการงอกบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
Replications	14	130.64	9.331429	1.22ns	0.2643
N	1	116.81	116.81	15.3**	0.0001
T	5	49.43	9.886	1.29ns	0.2689
N×T	5	5.56	1.112	0.15ns	0.9811
Error	154	1175.62	7.633896		
Total	179	1478.06			

C.V. 15.04 %

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)



ภาพภาคผนวกที่ 1 ขั้นตอนการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อน และการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010630006

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย	2547
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนบัณฑิตศึกษาสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนการศึกษาสำหรับบุคคลทั่วไป มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ทุนภายใต้ความร่วมมือ (MOU) ระหว่างคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กับมหาวิทยาลัย Miyazaki ประเทศญี่ปุ่น สนับสนุนเงินทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์ สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งอาจารย์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Sanputawong, S. and Te-chato, S. 2008. Effect of genotypes of oil palm as indicator for speed of callus and embryogenic callus formation. Journal of Agricultural Technology 4: 147-156.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์ และสมปอง เตชะโต. 2552. ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 40 (พิเศษ): 226-229.

Sanputawong, S. and Te-chato, S. 2010. Biological factors affecting secondary somatic embryo formation and plantlet regeneration in hybrids oil palm. Agricultural Science Journal (peer review).

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์ และสมปอง เตชะโต. 2553. ปัจจัยทางชีวภาพที่มีผลต่อการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สอง และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของคู่ผสมปาล์มน้ำมัน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (ได้รับการตอบรับลงตีพิมพ์แล้ว)