ผลของโคลชิซินและออรีซาลินต่อการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมในต้นอ่อนชุดที่ 2 ของปาล์มน้ำมัน

Effect of Colchicine and Oryzalin Treatments on Chromosome Duplication in Secondary Somatic Embryos of Oil Palm

ไซนีย๊ะ สะมาลา

Sainiya Samala

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
2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของโคลชิซินและออรีซาลินต่อการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซม ในต้นอ่อนชุดที่ 2 ของปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นางไซนีย๊ะ สะมาลา

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

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

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

……...กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สนธิชัย จันทร์เปรม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของโคลชิซินและออรีซาลินต่อการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซม ในต้นอ่อนชุดที่ 2 ของปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นางไซนีย๊ะ สะมาลา

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของโคลชิซิน และออรีซาลิน โดยวิธีการให้สาร ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาการให้สารที่แตกต่างกัน ต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมปาล์มน้ำมัน โดยใช้ต้นอ่อนชุดที่สอง (secondary somatic embryo: SSE) จุ่มแช่หรือเททับด้วยสารดังกล่าว ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE ลดลงตามความเข้มข้นของโคลชิซินหรือออรีซาลินที่เพิ่มขึ้น โดยการจุ่มแช่ SSE ในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และให้ต้นเททระพลอยด์ ส่วนการจุ่มแช่ SSE ในสารละลายออรีซาลินทุกความเข้มข้นต้นกล้าชะงักการเจริญเติบโต สำหรับวิธีการเททับด้วยโคลชิซิน หรือออรีซาลิน พบว่า SSE ไม่พัฒนาเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นเททระพลอยด์ พบว่ามีการเจริญเติบโตช้า ใบหนา สีเขียวเข้ม ใบใหญ่ขึ้น แต่ความยาวใบลดลง และให้รากขนาดใหญ่ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม ส่วนลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นเททระพลอยด์ มีความสัมพันธ์กับเซลล์คุม โดยมีขนาดของเซลล์คุมใหญ่ ความหนาแน่นของเซลล์คุมน้อย จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุมมาก ขนาดเม็ดคลอโรพลาสต์เล็ก และปริมาณคลอโรฟิลล์รวมมากกว่าชุดควบคุม และจากการตรวจสอบลักษณะทางเซลล์วิทยา โดยศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายราก พบว่าต้นที่เจริญมาจากกลุ่ม SSE ที่แช่สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีจำนวนโครโมโซม 2n=4x=64 ส่วนชุดควบคุม มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=32 การยืนยันระดับพลอยดีโดยการศึกษาระดับพลอยดีของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ พบว่าการแช่ SSE ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ดีที่สุด คิดเป็น 16.67 เปอร์เซ็นต์ และให้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าชุดควบคุม 2 เท่า คือ 7.45 พิโคกรัม

Thesis Title	Effect of Colchicine and Oryzalin Treatments on Chromosome Duplication in Secondary Somatic Embryos of Oil Palm
Author	Mrs. Sainiya Samala
Major Program	Plant Science
Academic Year	2011

ABSTRACT

This study aimed to observe the effects of different application methods of colchicine or oryzalin at different concentrations and durations of treatment on chromosome doubling in oil palm which were carried out using secondary somatic embryos (SSEs). SSEs which were immersed or overlaid in various concentrations and exposure times of treatments were transferred to culture on MS medium without plant growth regulator for 1 month. The results revealed that survival percentage of SSEs decreased with the increase in either concentration or period of treatment with colchicine or oryzalin. The immersion in colchicine at 0.20% for 24 hr resulted in decrement of survival percentage of SSEs at nearly 50% and defined as tetraploid plant at 16.67%. Growth rate of SSEs treated with all concentrations of oryzalin was inhibited whereas overlay treatment of SSEs with colchicine or oryzalin prevented the development of the embryos into complete plantlets. Morphological observations demonstrated that tetraploid plants showed slow growth of shoots. The leaves were thick, dark green color and significantly increased in leaf width. Root diameter of those plants was also increased. Anatomical and physiological characteristics of tetraploid plants showed to be closely related to guard cell size and density. The size of guard cells was bigger than that of control while their density was far lower. As for the percentage of chloroplasts per guard cell, tetraploid plants had a higher number than that of controlled plants. However, the size of chloroplasts was smaller than that of controlled plants. As for the chlorophyll content, the total chlorophyll content in tetraploid plants increased. Cytological observation of root tip revealed that the chromosome number of tetraploid plants obtained from colchicine treatment at concentration of 0.20% for 24 hr and 0.10% for 12 hr was 2n=4x=64 while controlled plants was 2n=2x=32. Flow cytometry analysis also showed that DNA content of tetraploid plants was 7.45 pg which is two times higher than that of controlled plants.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(17)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	22
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	23
วัสดุ	23
อุปกรณ์	25
วิธีการ	27
3 ผล	36
4 วิจารณ์	92
5 สรุป	102
เอกสารอ้างอิง	103
ภาคผนวก	117
ประวัติผู้เขียน	120

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของความเข้มข้น (ปัจจัย A) และระยะเวลาการทรีตสารโคลชิซิน (ปัจจัย B) ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (n=30)	39
2	ผลของความเข้มข้น (ปัจจัย A) และระยะเวลาการทรีตสารออรีซาลิน (ปัจจัย B) ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (n=30)	41
3	ผลของความเข้มข้น (ปัจจัย A) และระยะเวลาการเททับด้วยอาหารเหลวที่เติมโคลชิซิน (ปัจจัย B) ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (n=30)	42
4	ผลของความเข้มข้น (ปัจจัย A) และระยะเวลาการเททับด้วยอาหารเหลวที่เติมออรีซาลิน (ปัจจัย B) ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (n=30)	44
5	จำนวนยอด ใบ ราก และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ที่พัฒนาจาก SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่โคลชิซินที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน	46
6	แสดงจำนวนยอด ใบ ราก และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ของชิ้นส่วน SSE ที่ รอดชีวิต จากการจุ่มแช่ออรีซาลินที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน	51
7	จำนวนยอด ใบ ราก และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ ที่พัฒนาจาก SSE ที่รอดชีวิตบนอาหารที่เททับด้วยโคลชิซิน ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน	56

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	จำนวนยอด ใบ ราก และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ ที่พัฒนาจาก SSE ที่รอดชีวิต จากการเททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลิน ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน	60
9	ความกว้าง ความยาวของใบ ของต้นควบคุม และต้นที่ผ่านการแช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 12 เดือน	64
10	ความกว้าง ความยาวของราก ของต้นควบคุม เปรียบเทียบกับต้นจากสิ่งทดลองที่ผ่านการแช่โคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ARDA เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำรากเป็นเวลา 1 เดือน	68
11	เปอร์เซ็นต์การเกิดช่อดอกในหลอดทดลอง ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ผ่านการจุ่มแช่สารโคลชิซินความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน	71
12	ความกว้าง ความยาว และความหนาแน่นของเซลล์คุม ของต้นควบคุม และต้นกล้าที่ผ่านการแช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน	77
13	ขนาด และจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุม ของต้นควบคุม และต้นกล้าที่ผ่านการแช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน	81

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ บี และคลอโรฟิลล์รวม จากใบของต้นกล้าชุดควบคุม และต้นกล้าที่คาดว่าเป็นต้นเตตราพลอยด์ ที่ผ่านการแช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน	85
15	ผลของสารละลายโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตราพลอยด์ จากการศึกษาระดับพลอยดีด้วยโฟลไซโทเมทรี (n=30)	89
16	ปริมาณดีเอ็นเอ ของต้นกล้าชุดควบคุม และต้นเตตราพลอยด์ ที่ผ่านการแช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กับปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานของข้าวญี่ปุ่น หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน	91

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	EC ที่ชักนำจากใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี อายุ 10 ปี ซึ่งวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)	28
2	กลุ่ม SSE ที่ชักนำจาก HE เพียง 1 ชุด ซึ่งประกอบด้วย SSE ในระยะทอร์ปิโด (บาร์ 7 มิลลิเมตร)	30
3	วิธีการทรีตกลุ่ม SSE ด้วยสารละลายโคลชิซิน หรือออรีซาลิน	30
4	ดอกติดบนแท่น silver paint และผ่านการเคลือบทองด้วยเครื่อง sputter coater (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)	32
5	ลักษณะการพัฒนาของ SE (ศรชี้) บนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุกเดือน เป็นเวลา 3 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)	36
6	ลักษณะของ HE (ศรชี้) จากการเพาะเลี้ยง EC บนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)	37
7	ลักษณะของ SSE หลังจากเพาะเลี้ยง HE บนอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2โมลาร์ เป็นเวลา 3 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)	38
8	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของ SSE ที่จุ่มแช่ด้วยโคลชิซินความเข้มข้น และเวลาต่างๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบ โตเป็นเวลา 30 วัน	40
9	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของ SSE ที่จุ่มแช่ด้วยออรีซาลินความเข้มข้น และเวลาต่าง ๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน	41

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของ SSE ที่เททับด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซินความเข้มข้น และเวลาต่าง ๆ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน	43
11	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของ SSE ที่เททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลินความเข้มข้นต่างๆ แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน	44
12	พัฒนาการของยอด และ MSE จาก SSE ที่จุ่มแช่ด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เฉลี่ยจาก 3ระยะเวลา (12 24 และ 48 ชั่วโมง)..แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน	45
13	พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)	47
14	พัฒนาการ SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)	48
15	พัฒนาการ SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)	49
16	พัฒนาการของยอด และ MSE จาก SSE ที่จุ่มแช่ด้วยออรีซาลินความเข้มข้นต่างๆ เฉลี่ยจาก 3 ระยะเวลา (12 24 และ 48 ชั่วโมง)..แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน	50
17	พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ด้วยออรีซาลินเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญ เติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)	52
18	พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ด้วยออรีซาลินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญ เติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)	53

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ด้วยออรีซาลิน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)	54
20	พัฒนาการของยอด จาก SSE ที่เททับด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่าง เฉลี่ยจาก 2 ระยะเวลา (1 และ 2 สัปดาห์).แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน	55
21	พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการเททับด้วยอาหารเหลว เติมโคลชิซิน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)	57
22	พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการเททับด้วยอาหารเหลว เติมโคลชิซิน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)	58
23	พัฒนาการของยอด จาก SSE ที่เททับ ด้วยสารละลายออรีซาลิน ความเข้มข้นต่างๆ เฉลี่ยจาก 2 ระยะเวลา (1 และ 2 สัปดาห์) แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน	59
24	พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการเททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลิน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)	61
25	พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการเททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลิน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)	62
26	การเจริญเติบโตของต้นกล้าปาล์มน้ำมันต้นควบคุม (ซ้าย) และต้นที่ผ่านการแช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (กลาง) และความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ขวา) หลังจากย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)	64

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
27	ความหนาของใบจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันชุดควบคุม (ก ซ้าย) และกล้อง SEM (ข ซ้าย) และต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก ขวา และ ข ขวา) หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)	65
28	ใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีขนสีน้ำตาล (ศรชี้ ก และ ข) ใบสั้น และมีสีเขียวเข้ม (ค ขวา) เมื่อเปรียบเทียบกับใบของต้นควบคุม (ค ซ้าย) ต้นดังกล่าวเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)	65
29	ลักษณะของ SSE ที่มีลักษณะคล้าย ใบ และยอด แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นกล้า หลังจากได้รับสารออรีซาลินความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)	66
30	ต้นกล้าที่พัฒนาจาก SSE ซึ่งผ่านการเททับด้วยโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลาต่างๆ มีการพัฒนาคล้ายดอก (ศรชี้) หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)	67
31	ต้นกล้าที่พัฒนาจาก SSE ซึ่ง ผ่านการเททับด้วยออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลาต่างๆ	67
32	รากของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน และย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ARDA ต่ออีก เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 0.2 เซนติเมตร)	69
33	ลักษณะของช่อดอกเพศเมีย (ก) และช่อดอกเพศผู้ (ข) จากต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)	72

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
34	ลักษณะช่อดอกเพศเมีย ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.3 เซนติเมตร)	72
35	ลักษณะช่อดอกเพศเมีย (ก) และช่อดอกเพศผู้ (ข) ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)	72
36	ลักษณะของช่อดอกเพศเมีย และเพศผู้ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน (SEM) จากสิ่งทดลอง ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน	73
37	ผลปาล์มจากต้นปาล์มน้ำมันที่ออกดอกในหลอดทดลอง ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บริเวณปลายยอด หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน และย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ARDA เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่ออีกเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)	74
38	ลักษณะผลปาล์มจากต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีผลยาวรี (ก และ ข) และผลลีบ (ค)	75
39	ผลปาล์มที่พัฒนาจากต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 12 เดือน และย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ARDA เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่ออีกเป็นเวลา 1 เดือน	75
40	เนื้อปาล์ม (mesocarp) ของผลที่พัฒนาจากต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	76

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
41	ขนาดของเซลล์คุม (ก) ชุดควบคุม (ข) ชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ค) ชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน	78
42	ความหนาแน่นของเซลล์คุม (ก) ชุดควบคุม (ข) ชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ค) ชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน	79
43	ลักษณะความผิดปกติแบบต่างๆของเซลล์คุม ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	80
44	คลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน	82
45	คลอโรพลาสต์ และลักษณะเซลล์คุมของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบ โต เป็นเวลา 12 เดือน	83
46	ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันชุดควบคุมที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน	85
47	จำนวนโครโมโซมจากปลายราก ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันหลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์= 0.2 ไมโครเมตร)	87
48	ฮีสโตแกรมแสดงระดับพลอยดี ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันชนิดต่างๆ	90

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
49	ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณดีเอ็นเอของ (ก) ต้นข้าวญี่ปุ่น ซึ่งเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (ข) ต้นกล้าปาล์มน้ำมันชุดควบคุม ที่เป็นดิพลอยด์ (2n=2x) และ (ค) ต้นเตตราพลอยด์ ของชุดที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (2n = 4x) หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน	91

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ARDA	=	Agricultural Research Development Agency
BA	=	6-benzyladenine
bp	=	base pair
CRD	=	completely random design
2,4-D	=	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
DMRT	=	Duncan's multiple range test
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EC	=	Embryogenic callus
HE	=	Haustorium embryo
MS	=	Murashige and Skoog (medium)
NAA	=	α- naphthalene acetic acid
*p*DB	=	*p*-Dichlorobenzene
pg	=	picogram
PI	=	Propidium iodide
PVP	=	Polyvinyl pyrolidone
SE	=	Somatic embryo
SSE	=	Secondary somatic embryo
SEM	=	Scanning electron microscope

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชตระกูลปาล์มที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอัฟริกา จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและเป็นพืชยืนต้น (Konan *et al*., 2006) เป็นพืชผสมข้าม ที่มีช่อดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน แต่ช่วงเวลาการออกดอกไม่พร้อมกัน ปาล์มน้ำมันเป็นพืชดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 32 (Corley, 2003) ปาล์มน้ำมันที่ปลูกเป็นการค้าคือชนิดเทเนอรา (tenera) ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างชนิดดูรา (dura) และชนิดพิสิเฟอรา (pisifera) น้ำมันที่สกัดจากผลปาล์มมาจาก 2 แหล่ง คือ น้ำมันจากเปลือกผล เรียกว่าน้ำมันปาล์ม (palm oil) และน้ำมันจากเมล็ดในปาล์ม เรียกว่าน้ำมันเมล็ดในปาล์ม (palm kernel oil) น้ำมันปาล์มมีองค์ประกอบทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับวิตามินที่สำคัญอยู่ 2 ชนิด คือ วิตามินอี และสารแคโรทีนอยด์ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างวิตามินเอ ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่ให้น้ำมันปริมาณสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น ๆ (640-800 กิโลกรัมน้ำมันต่อพื้นที่ปลูก 1 ไร่) (Konan *et al*., 2006) การผลิตน้ำมันจากปาล์มน้ำมัน มีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่นๆ และน้ำมันปาล์มสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลายทั้งในด้านอุปโภคและบริโภค เช่น ทำเป็นน้ำมันปรุงอาหาร น้ำมันทอด ผลิตนมข้น ไอศกรีม เนยเทียม เนยขาว ไขมันทำขนมปัง สบู่ เทียนไข ผงซักฟอก ยาสีฟัน ใช้ในอุตสาหกรรมโอลิโอเคมิคัลอย่างกว้างขวาง และที่สำคัญที่สุดในยุคน้ำมันปิโตรเลียมแพง ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเมทิลเอสเตอร์ นำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซล หรือที่นิยมเรียกว่าไบโอดีเซล

ปาล์มน้ำมันนับว่าเป็นพืชน้ำมันที่ยังคงมีแนวโน้มความต้องการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตาม 60% ของพื้นที่เพาะปลูก ยังมีปัญหาเรื่องต้นทุนการผลิตสูง และให้ผลผลิตต่ำ เนื่องจากสายพันธุ์ปาล์มที่ใช้ยังไม่ดีพอและไม่เหมาะสมกับพื้นที่ พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่เกษตรกรปลูกในปัจจุบันเป็นพันธุ์ลูกผสม ซึ่งเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ไปขยายต่อจะเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ส่งผลให้ผลผลิตต่อต้นไม่สม่ำเสมอ (ธีระ และคณะ, 2543) ทำให้เกษตรกรไม่สามารถเก็บเมล็ดใต้ต้นไปปลูกต่อได้ จากปัญหาการขาดแคลนปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตต่อไร่สูงของประเทศไทย จึงได้มีการพัฒนาหาแนวทางเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวโดยการศึกษาครั้งนี้จะได้ปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารเคมีก่อกลายพันธุ์ คือ โคลชิซิน

(colchicine) และออรีซาลิน (oryzalin) เพื่อชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์โดยใช้ชิ้นส่วนต้นอ่อนชุดที่สอง (secondary somatic embryo: SSE) เนื่องจากสามารถชักนำเป็นต้นพืชใหม่ได้ในปริมาณมาก (Te-chato and Hilae, 2007) โดยคาดว่าผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นแนวทางหนึ่งในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในปัจจุบันแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ตามความหนากะลาของผลปาล์ม (นพพร และคณะ, 2546) ดังนี้ คือ

1. ชนิดดูรา เป็นชนิดที่มีกะลาหนาประมาณ 2 - 8 มิลลิเมตร มีชั้นเปลือกนอก (mesocarp) ที่ให้น้ำมัน ประมาณ 35 - 60% ของน้ำหนักผล มีจีโนไทป์ที่ควบคุมความหนาของกะลาเป็น homozygous dominance (ShSh) ปาล์มชนิดดูราที่มีกะลาหนามาก ๆ คือ มาโครคายา (macrocarya) กะลาหนาประมาณ 6 - 8 มิลลิเมตร ดูราชนิดนี้พบมากแถบตะวันออกไกล เช่น เดลีดูรา (deli dura) ซึ่งเป็นชนิดที่ให้ผลผลิตค่อนข้างสูง ปัจจุบันชนิดดูรา มักใช้เป็นต้นแม่สำหรับปรับปรุงพันธุ์เพื่อผลิตลูกผสมเป็นการค้า

2. ชนิดพิสิเฟอรา เป็นชนิดที่มีกะลาบางมาก หรือบางครั้งไม่มีกะลา มีจีโนไทป์ที่ควบคุมความหนาของกะลาเป็น homozygous recessive (shsh) เมล็ดในมีขนาดเล็ก ผลเล็ก ช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมัน ผลผลิตทะลายต่อต้นต่ำ ไม่เหมาะที่จะปลูกเป็นการค้า นิยมใช้ปาล์มน้ำมันชนิดนี้เป็นต้นพ่อสำหรับผลิตพันธุ์ลูกผสม

3. ชนิดเทเนอรา เป็นลูกผสมระหว่างชนิดแม่ดูรา และชนิดพ่อพิสิเฟอรา เป็นพันธุ์ที่มีกะลาบางประมาณ 0.5 - 4 มิลลิเมตร มีจีโนไทป์ที่ควบคุมความหนาของกะลาเป็น heterozygous (Shsh) มีปริมาณของเส้นใยหรือ mesocarp 60-90% ของน้ำหนักผล ผลผลิตทะลายสูง นิยมปลูกเป็นการค้า

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันสามารถขยายพันธุ์ได้วิธีเดียว คือการเพาะเมล็ด เนื่องจากไม่สามารถขยายพันธุ์โดยวิธีไม่อาศัยเพศทั่วไป เช่น การปักชำ ตอนกิ่ง และการติดตาได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยขยายพันธุ์ ทำให้สามารถขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยไม่อาศัยเพศได้ผลสำเร็จ และได้ใช้วิธีนี้ในเชิงการค้า เพราะให้ผลผลิตสม่ำเสมอตรงตามพันธุ์ (นภาพร, 2548)

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือการนำเอาเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะบางส่วนของพืช เช่น ยอด ลำต้น ใบ ราก ส่วนต่างๆ ของดอกหรือผล มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ในสภาพปลอดเชื้อ การขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีนี้ สามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้เป็นจำนวนมากในคราวเดียวกัน และใช้ระยะเวลาสั้น ปัจจุบันสามารถเพาะเลี้ยงส่วนของคัพภะ และใบอ่อน ของปาล์มน้ำมัน ซึ่งสามารถสร้างยอดใหม่ได้จำนวนมาก และยังสามารถใช้แคลลัสเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ได้ การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ 1) การชักนำแคลลัสเริ่มแรก (primary callus) จากชิ้นส่วนพืช 2) การชักนำให้เกิดแคลลัสเจริญเร็ว (fast growing callus) จากแคลลัสเริ่มแรก 3) การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) และ 4) การทำให้ได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ (Lioret, 1981)

2.1.1 การเพาะเลี้ยงคัพภะ

การเพาะเลี้ยงคัพภะช่วยให้เมล็ดงอกได้เร็วขึ้น และเพิ่มปริมาณได้จำนวนมากซึ่งผ่านกระบวนการชักนำแคลลัสโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตพวกออกซิน และชักนำเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส มีรายงานผลสำเร็จจากการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ด้วยการเพาะเลี้ยงคัพภะ เช่น Kanchanapoom และ Damyaos (1999) ตัดแยกคัพภะปาล์มน้ำมันมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 (Eeuwens) เติม 2,4-D (2,4-dichorophenoxy-acetic acid) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวสามารถชักนำแคลลัสได้ภายใน 8 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยง และชักนำเอ็มบริออยด์ (embryoid) บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่พบการเจริญเป็นต้นอ่อน อายุของคัพภะที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสที่แตกต่างกันด้วย คัพภะปาล์มน้ำมันที่อายุ 193 วันหลังการผสม ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 93 เปอร์เซ็นต์ (Teixeira *et al.*, 1993) Teixeira และคณะ (1995) ทำการทดลองโดยใช้เอ็มบริโอที่ยังอ่อน และสุกแก่ของปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรามาชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าการใช้เอ็มบริโอที่ยังอ่อนสามารถชักนำ primary globular callus (PGC) ได้ในอาหารสูตร Y_3 เติม 2,4-D เข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับผงถ่าน 0.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้เอ็มบริโอที่สุกแก่สามารถชักนำ friable embryogenic tissue (FET) ได้ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 475 ไมโครโมลาร์ หรือ picloram เข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับผงถ่าน 0.3 เปอร์เซ็นต์

Te-chato (1998) ผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันจากต้นแม่เทเนอรา โดยผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซีส บนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมเคซีนไฮโดรไลเสท เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D หรือ dicamba เข้มข้น 0.1 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 10 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-6 เดือน เมื่อแคลลัสพัฒนาเป็นโซ-มาติกเอ็มบริโอ หรือต้นอ่อนชุดแรก (somatic embryo : SE) ย้ายลงอาหารเหลวสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร จนกระทั่งพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (haustorium embryo : HE) จึงย้ายลงอาหารสองชั้น ชั้นล่างคืออาหารสูตร MS เติมผงถ่าน 0.25 เปอร์เซ็นต์ และชั้นบนคือ อาหารเหลวสูตร ½ MS เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อได้ต้นที่สมบูรณ์ นำไปจุ่มลงใน NAA เข้มข้น 4,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 นาที พบว่าต้นที่ได้ไม่มีความผิดปกติของลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมพบว่ามี 2n=2x=32 เท่ากับต้นแม่เดิม Rajesh และคณะ (2003) ใช้ polyamine ในการส่งเสริมพัฒนาการของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน พบว่า อาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ putrescine เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (embryogenic callus : EC) 0.70 เปอร์เซ็นต์ โซมาติกเอ็มบริโอ 5.60 เปอร์เซ็นต์ โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สอง หรือต้นอ่อนชุดที่สอง (secondary somatic embryo : SSE) 2.97 เปอร์เซ็นต์ การงอก 5.50 เปอร์เซ็นต์ การสร้างยอด 1.27 เปอร์เซ็นต์ และการสร้างรากสูงสุดโดยเฉลี่ย 0.37 เปอร์เซ็นต์

2.1.2 การเพาะเลี้ยงใบอ่อน

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากใบอ่อนโดย สมปอง และคณะ (2547) รายงานการชักนำแคลลัส โดยเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตร MS เติม NAA หรือ dicamba หรือ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1 2.5 5 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 15 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัส 2.78 เปอร์เซ็นต์ และ NAA มีประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสต่ำสุดเพียง 1.67 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ dicamba ต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยย้ายเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1 0.5 และ 1

มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมหรือไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยง 3 เดือน พบว่า dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเสท ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ อาหารเติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 56.41 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของ dicamba ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.1 - 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน พบว่าสามารถร่นระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเหลือเพียง 6 - 9 เดือน โดยการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันในต้นที่ให้ผลผลิตที่ดีที่มีอายุ 10 - 20 ปี ในสูตรอาหาร MS เติม dicamba เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส เมื่อย้ายแคลลัสดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในสูตรเดิม แต่ลดความเข้มข้นของ dicamba ลงเหลือเพียง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวได้สำเร็จ (อาสลัน และสมปอง, 2545)

เพ็ญติมาส และสมปอง (2552) รายงานการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอจากแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีอายุ 10 ปี บนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ว่าสามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 16.88 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น โดยให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ (packed cell volume : PCV) เป็น 2 เท่า หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ในส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า 2,4-D เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.25 มิลลิลิตร และมีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 2 - 4 มิลลิเมตร จำนวน 20 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ ส่วนการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 2 - 4 มิลลิเมตร บนอาหารแข็ง พบว่า อาหารแข็งสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวสูงสุด 32 เปอร์เซ็นต์

2.2 การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันภายใต้สภาวะปลอดเชื้อที่สามารถชักนำเป็นต้นพืชใหม่ปริมาณมาก คือ การขยายพันธุ์พืชโดยการใช้ต้นอ่อนชุดแรก (SE) และการขยายพันธุ์พืชโดยการใช้ต้นอ่อนชุดที่สอง (SSE)

2.2.1 การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการใช้ต้นอ่อนชุดแรก (SE)

การขยายพันธุ์ด้วย SE เป็นการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศที่มีความสำคัญในพืชหลายๆ ชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีตามปกติที่ทำได้ยาก (Stasolla and Yeung, 2003) เช่น ปาล์มน้ำมัน (อาสลัน และ สมปอง, 2545) มะพร้าว (Chan *et al*., 1998) และอินทผลัม (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2001) เป็นต้น ซึ่งระยะของพัฒนาการของ SE แบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ ระยะรูปกลม ระยะรูปหัวใจ ระยะทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง (สมปอง, 2537) อาสลัน (2545) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันจากต้นที่ให้ผลผลิตแล้ว 10 ปี บนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิด คือ NAA dicamba และ 2,4-D ในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 26 ± 4 และ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยง 2-3 เดือน ชิ้นส่วนเริ่มสร้างแคลลัส โดยแคลลัสมีลักษณะเป็นปมสีเหลืองอ่อนเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดและผิวของชิ้นส่วน การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ โดยมีการสร้างแคลลัส 5.55 และ 7.93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 4 และ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่การเติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้าง แคลลัสได้ 2.78 เปอร์เซ็นต์ เฉพาะที่ อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส เท่านั้น สำหรับการเติม NAA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างแคลลัสได้ 1.67 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 26 ± 4 องศาเซลเซียส เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบการสร้างแคลลัสระหว่างต้นที่มีอายุ 1 10 และ 20 ปี พบว่า ต้นกล้าอายุ 1 ปี สามารถสร้างแคลลัสได้เร็วกว่า (หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน) โดยสร้างแคลลัสได้ 12.5 ± 5.00 เปอร์เซ็นต์

Te-chato (2002) ชักนำ SE โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตสองชนิด คือ 2,4-D หรือ dicamba ที่ความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้การให้แสงความเข้ม 2,500 ลักซ์เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าการใช้ dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมแคลลัสเริ่มต้นให้พัฒนาเป็นแคลลัสที่เจริญเร็ว 61.11 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน ผลดังกล่าวทำให้ร่นระยะเวลาในการชักนำเป็นต้นได้ในเวลา 8-10 เดือน เมื่อชักนำการงอกของ SE และอนุบาลต้นกล้าลงดินปลูกไม่พบการผิดปกติของต้นกล้าแต่อย่างใด น้ำตาลที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญต่อการพัฒนา การสุก-แก่ และการงอกของ SE

2.2.2 การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการใช้ต้นอ่อนชุดที่สอง (SSE)

SSE เป็นโซมาติกเอ็มบริโอใหม่ที่เกิดจาก SE เดิม สามารถเกิดได้ 2 ทาง คือ เกิดจากการแบ่งตัว และพัฒนาของเซลล์เดี่ยว ๆ คล้ายกับการพัฒนาของคัพภะ หรือจากกลุ่มเซลล์ (Maximova *et al*., 2002) จุดกำเนิดของ SSE ปาล์มน้ำมัน มาจาก 3 แหล่ง คือ เซลล์บริเวณชั้นอิพิเดอร์มิส พาเรนไคมา และโปรแคมเบียม หรือวาสคิวลาร์แคมเบียม (ธนวดี, 2551) โดยเซลล์บริเวณดังกล่าวย้อมติดสีชัดเจน มีไซโตพลาสซึมเข้มข้นสูง และนิวเคลียสขนาดใหญ่ เซลล์บริเวณนี้มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว พัฒนาเป็นจุดกำเนิดยอดและราก เรียกว่า SSE ซึ่งส่วนใหญ่พัฒนาจากเซลล์ชั้นอิพิเดอร์มิส มีรูปร่างคล้ายกระสุนทอร์ปิโดเหมือนคัพภะที่เกิดจากการผสมภายในเมล็ด ในกรณีของ SSE ที่พัฒนาจากโปรแคมเบียม หรือเนื้อเยื่อมัดท่อน้ำ ท่ออาหาร และชั้นพาเรนไคมานั้น เอ็มบริโอมีรูปร่างกลม มีมัดท่อน้ำท่ออาหาร เชื่อมต่อกันเป็นวงกลม Hilae และ Te-chato (2005) ศึกษาผลของชนิดน้ำตาล และความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำการงอกของ SE พบว่าน้ำตาลบางชนิด โดยเฉพาะน้ำตาลแอลกอฮอล์ส่งเสริมการเกิด SSE อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ชักนำการสร้าง SSE ได้ 11.55 เปอร์เซ็นต์ SSE ที่ชักนำได้มีเปอร์เซ็นต์การงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้สูงถึง 77.92 เปอร์เซ็นต์ จากการค้นพบดังกล่าว SSE จึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพในอนาคต

จากการศึกษาการใช้ SSE ในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณจำนวนพืชได้มากกว่าการใช้ SE (Hilae and Te-chato, 2005) สำหรับพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และพืชใบเลี้ยงคู่อื่นๆ เช่น มันสำปะหลัง (Stamp and Henshaw, 1987) และทานตะวัน (Vasic *et al*., 2001) พบว่าการขยายพันธุ์ด้วยวิธีดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณพืชได้จำนวนมากเช่นเดียวกับปาล์มน้ำมัน การพัฒนาของ SSE จาก SE นั้นอาศัยปัจจัยที่เหมาะสมหลายประการ ทั้งปัจจัยทางเคมี ชีวภาพ และ ทางกายภาพ ปัจจัยทางด้านเคมี ได้แก่ องค์ประกอบของสูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และสารเสริมอื่นๆ เช่น น้ำตาลซอร์บิทอล น้ำมะพร้าว ตลอดจน polyamine เป็นต้น Hilae และ Te-chato (2005) รายงานการใช้น้ำตาลซอร์บิทอล ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำ SSE ในปาล์มน้ำมันได้ 22.0 เอ็มบริโอต่อ SE สำหรับการใช้น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ในอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้เกิด SSE ในกล้วย (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) ได้ (Khalil *et al*., 2002) สำหรับปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้ในการชักนำการเกิด SSE ในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันออกไป เช่น กล้วย (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) นั้นพบว่า ตาดอกตัวผู้จากกลุ่มตาดอกอายุ 1 เดือน ให้การสร้าง SSE ได้ดี (Khalil *et al*.,

2002) ส่วนแอปเปิ้ล (*Mulus* x *domestica* Bokh cv. 'Gloster 69') นั้นชิ้นส่วนใบเลี้ยงที่พัฒนาจากคัพภะให้การสร้าง SSE ได้ดี (Daigny *et al*., 1996) เป็นต้น สำหรับปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ สภาพแสง อุณหภูมิ เป็นต้น มีผลต่อการชักนำ SSE ในพืชหลายๆ ชนิด ส่วนใหญ่ในระยะชักนำให้เกิดแคลลัส มักวางเลี้ยงในที่มืด เมื่อเข้าสู่การชักนำการเกิด SSE เพาะเลี้ยงในที่มีแสง เช่น มันสำปะหลัง (Groll *et al*., 2001) แต่ในพืชหลายชนิด มีการนำชิ้นส่วนพืชไปวางเลี้ยงในที่มืด ก่อนนำมาวางเลี้ยงในที่มีแสงเพื่อให้เกิดการสร้าง SSE (Stamp and Henshaw, 1987)

3. การกลายพันธุ์ในพืช

การกลายพันธุ์หมายถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน หรือโครโมโซม ผลจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจจะทำให้พืชแสดงลักษณะใหม่ๆ ซึ่งแตกต่างจากลักษณะเดิมโดยสามารถถ่ายทอดจากรุ่นที่หนึ่งไปยังรุ่นต่อไปได้ (Ram, 2000) สาเหตุของการกลายพันธุ์มี 2 ประการ (Sigurbjornsson, 1983) คือ

3.1. การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ

พบในอัตราที่ต่ำ เช่น ยีน Y ที่ควบคุมการเกิดสีเหลืองของเมล็ดข้าวโพดมีอัตราเกิดการกลายพันธุ์ในธรรมชาติเพียง $2x10^{-6}$ เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น สาเหตุการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ อาจเกิดจากรังสี สารเคมี หรืออุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยที่มนุษย์ไม่ได้ชักนำให้เกิดขึ้น

3.2. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสิ่งก่อกลายพันธุ์

สิ่งก่อกลายพันธุ์แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี กับสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ สำหรับสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี ได้แก่ สารเคมีที่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น ethylmethane sulphonate (EMS) และ ethylethane sulphonate (EES) รวมถึงสารเคมีเพิ่มชุดโครโมโซม เช่น โคลชิซิน และออรีซาลิน เป็นต้น ส่วนสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ ได้แก่ รังสีซึ่งจำแนกเป็น 2 ประเภท คือรังสีที่ไม่เกิดจากการแตกตัวของประจุ (non ionizing radiation) เช่น คลื่นเสียง คลื่นวิทยุ รังสีอุลตร้าไวโอเลต เป็นต้น และรังสีที่เกิดจากการแตกตัวของประจุ (ionizing radiation) เช่น รังสีแกมมาซึ่งมีแหล่งกำเนิดจากโคบอลท์ 60 และซีเซียม 137 เป็นต้น

3.2.1 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี

สารเคมีหลายชนิดที่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ในสิ่งมีชีวิต โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีนมากกว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือจำนวนชุดของโครโมโซม สารเคมีที่มีการศึกษาและนิยมใช้อย่างกว้างขวางในการทำให้เปลี่ยนแปลงที่ยีนมี 4 กลุ่ม คือ 1) สารเคมีที่มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับเบสในดีเอ็นเอ 2) กลุ่มที่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับเบสในดีเอ็นเอ 3) สารที่สามารถเข้าแทนที่เบส purine ในสายดีเอ็นเอได้ เช่นพวก alkylating agents และ 4) สารที่มีสมบัติในการลดหรือเพิ่มเบสในดีเอ็นเอ เช่น สี acridine (กฤษฎา, 2546) สำหรับสารเคมีที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซม หรือพอลิพลอยด์ คือโคลชิซิน และออรีซาลิน (Blakeslee and Avery, 1937; Wan *et al*., 1991; Dhooghe *et al*., 2011)

3.2.1.1 โคลชิซิน

โคลชิซินเป็นสารประกอบอโรมาติกในกลุ่มอัลคาลอยด์ พบในพืชบางชนิด เช่น *Colchicum autumnale* L. มีสมบัติในการเพิ่มชุดของโครโมโซม โดยสารเคมีเหล่านี้จะจับกับโมเลกุลทูบูลินของสปินเดิล ทำให้โมเลกุลไม่ทำหน้าที่ ไม่สามารถรวมตัวสร้างไมโครทูบูล ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ จึงไม่สามารถแยกโครโมโซมไปที่ขั้วเซลล์ได้ ทำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมจากดิพลอยด์เป็นพอลิพลอยด์ (Petersen *et al*., 2003) การใช้โคลชิซินเพื่อเพิ่มชุดโครโมโซมในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อและอวัยวะนั้น อาจเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และล้างออกหลังจากเพาะเลี้ยงไปช่วงระยะเวลาหนึ่ง มักใช้กับเมล็ดที่กำลังงอกหรือส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ ความเข้มข้นที่ใช้กันทั่วไปคือ 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่นิยมและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ใช้ประโยชน์ได้คือ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สารโคลชิซินนี้มีผู้นำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อต้นพืช แม้จะใช้ในอัตราสูง เพราะเป็นสารที่สกัดจากพืช เคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยยังคงรักษารูปเดิมและทำหน้าที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นเวลานาน อีกทั้งไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีน (นพพร และคณะ, 2546) เนื่องจากโคลชิซินสลายตัวเมื่อโดนความร้อนชื้น ส่งผลให้การเพิ่มชุดโครโมโซมลดลงหรือหายไป (Zhang *et al*., 2007) ดังนั้นจึงต้องกรองด้วยกระดาษกรองมิลลิพอร์ ทำให้สะดวกในการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมภายใต้สภาวะปลอด

เชื้อ อย่างไรก็ตาม ในพืชบางชนิดโคลชิซินส่งผลให้พืชเป็นหมัน การเจริญเติบโตผิดปกติ และเกิดการขาดของโครโมโซมได้ (Luckett, 1989)

3.2.1.2 ออรีซาลิน

ออรีซาลินมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง ทำหน้าที่ยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส โดยจะเข้าจับกับทูบูลินที่ตำแหน่งต่างกับโคลชิซิน ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้เช่นเดียวกับโคลชิซิน เป็นสารกำจัดวัชพืชพวกไดไนโทรแอนิลีน นิยมใช้กับเซลล์พืช เนื่องจากราคาถูกกว่า และใช้ในปริมาณน้อยกว่าโคลชิซิน ให้ผลดีกับส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ และมักไม่ก่อให้เกิดการแตกหักหรือสูญหายของโครโมโซม (นิตย์ศรี, 2551; Anderson *et al*., 1991)

3.2.2 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ

สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้แก่ รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา รังสีอุลตร้าไวโอเลต และอนุภาคนิวตรอน (Sigurbjornsson, 1983) รังสีมีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยมีผลตั้งแต่ระดับโมเลกุลไปจนกระทั่งถึงระดับเซลล์ เนื้อเยื่อและระบบอวัยวะ ผลทางตรงได้แก่การที่รังสีที่เกิดจากการแตกตัวของประจุ ทำลายโมเลกุลของสารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ หรือเป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลิอิก โดยเฉพาะดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสารที่เก็บข้อมูลและถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรม ส่วนผลทางอ้อมคือ รังสีจะทำให้น้ำซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของเซลล์สิ่งมีชีวิตถูกไอออไนซ์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นอาจรวมตัวกับโมเลกุลอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์หรืออยู่ภายในเซลล์ ทำให้โครงสร้างทางเคมีของสารนั้นเปลี่ยนแปลงไป หรืออนุมูลอิสระอาจรวมตัวกันใหม่กลายเป็นสารอื่นๆ ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์หรือสารต่างๆ ภายในเซลล์ จากผลของอนุมูลอิสระดังกล่าว อาจทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต จนกระทั่งถึงตายได้ (Constantin, 1975)

4. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชโดยใช้สารโคลชิซิน และออรีซาลิน

การชักนำต้นพอลิพลอยด์ในหลอดทดลองโดยการใช้สารโคลชิซิน และออรีซาลิน ได้มีการศึกษากันในพืชหลายชนิด เช่น *Scuctellaria baicalensis* (Gao *et al.*, 2002) ทับทิม (Shao *et al*., 2003) และลาเวนเดอร์ (Urwin and Horsnell., 2007) พอลิพลอยด์นับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะพืชมีดอกมีรายงานว่าประมาณ 47 เปอร์เซ็นต์ เป็นพอลิ-พลอยด์ซึ่งสาเหตุการเกิดพอลิพลอยด์ ที่เป็นไปได้มีดังนี้คือ

1. การเพิ่มชุดโครโมโซมของเซลล์ร่างกาย อาจเนื่องจากการทำงานที่ผิดปกติของสายสปินเดิล หรือการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ด้วยสารเคมี ที่มีสมบัติยับยั้งการสร้างสปินเดิลในการแบ่งเซลล์ แบบไมโทซิส เช่น โคลชิซิน และออรีซาลิน

2. การเพิ่มชุดโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับเซลล์สืบพันธุ์ เป็นการผสมระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซม เนื่องจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสที่ผิดปกติ ดังนั้นเซลล์สืบพันธุ์จึงมีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด (จรัสศรี, 2548)

การชักนำต้นพอลิพลอยด์เป็นวิธีการหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการพัฒนาสายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพสูง (Adaniya and Shirai, 2001; Zeng *et al*., 2006) ซึ่งอาจจะทำให้ส่วนของ ใบ ลำต้น ราก และดอกของต้นที่เป็นพอลิพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ ดังนั้นต้นพอลิพลอยด์อาจจะให้ผลผลิตสูงขึ้น ซึ่งการชักนำต้นพอลิพลอยด์ในสภาพหลอดทดลองได้มีการศึกษากันอย่างต่อเนื่อง เช่นการศึกษาในพืชสมุนไพร *Datura stramonium* สามารถเพิ่มปริมาณสารอัลคาลอยด์ในใบ ลำต้น และราก ได้มากกว่าต้นดิพลอยด์สองเท่า (Rowson, 1949) ในทำนองเดียวกันกับต้น *Atropa belladonna* ที่เป็นเททระพลอยด์ มีปริมาณสารอัลคาลอยด์ 154 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าต้นดิพลอยด์ (Jackson and Rowson, 1953) และต้น *Artemisia annua* ที่เป็นเททระ-พลอยด์มีปริมาณสาร artemisinin เพิ่มขึ้นเป็นหกเท่าของต้นดิพลอยด์ (Jesus-Gonzalez and Weathers, 2003)

การชักนำต้นพอลิพลอยด์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลอง ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อเป็นที่นิยม เนื่องจากให้ประสิทธิภาพสูง เหมาะสมในการผลิตเพื่อการค้า (Gao *et al*., 1996) ปัจจุบันเมล็ดพืชมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ได้มีการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ โดยเฉพาะในไม้ผล เนื่องจากให้ผลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ต้นแข็งแรง ให้ผลผลิตสูง ต้านทานโรค และมีเมล็ดน้อยหรือไม่มีเมล็ด (Predieri, 2001) เช่น องุ่น (Derman, 1954) ท้อ (Derman, 1965) สตรอเบอร์รี่ (Sebastiampillai and Jones, 1976; James *et al*., 1987) บลูเบอร์รี่ (Perry and Lyrene, 1984) กล้วย (Hamil *et al*., 1992; van Duren *et al*., 1996) แอปเปิ้ล (Liu *et al*., 2001) และสาลี่ (Kadota and

Niimi, 2002) โดยพบว่า ต้นเททระพลอยด์ให้ผลผลิตที่มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ นอกจากนี้ ขนาดของใบ ลำต้น และราก ของต้นเททระพลอยด์ ยังมีขนาดใหญ่กว่าต้นควบคุม และมีผลผลิตมวลรวม มากกว่าต้นควบคุม (Dubcovsky and Dvorak, 2007; Leitch and Leicth, 2008; Zhang *et al*., 2008) อย่างไรก็ตามในไม้ผลบางชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน (Madon *et al*., 2005) พบว่าต้นเททระ-พลอยด์ให้ต้นกล้าที่มีขนาดเล็กกว่าต้นดิพลอยด์

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้สารโคลชิซิน และออรีซาลินชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมในพืช

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการชักนำต้นเททระพลอยด์ คือ ชิ้นส่วนพืช ระดับความเข้มข้นของสารเคมี ร่วมกับระยะเวลาการจุ่มแช่ชิ้นส่วน และวิธีการให้สาร (Kermani *et al*., 2003; Petersen *et al*., 2003) โดยพืชแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อสารแตกต่างกัน

5.1 ชิ้นส่วนพืช

ประสิทธิภาพของการเกิดพอลิพลอยด์นั้น ขึ้นกับชนิดของชิ้นส่วนพืช และความสามารถของเนื้อเยื่อพืชในการลำเลียงสารโคลชิซิน และออรีซาลินเข้าสู่เนื้อเยื่อเจริญ (Allum *et al*., 2007) จากการศึกษาพบว่า การใช้ชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกัน ในการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซม ส่งผลให้พืชมีลักษณะจีโนไทป์แตกต่างกันด้วย (de Mello *et al*., 2000; Chauvin *et al*., 2005; Stanys *et al*., 2006; Khosravi *et al*., 2008) โดยทั่วไป นิยมใช้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญ ในการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซม เช่น ปลายยอด ตาข้าง ลำต้นใต้ใบเลี้ยง ข้อ ใบเลี้ยง ปล้อง เมล็ด ใบเลี้ยง แคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ คัพภะ อับเรณู เป็นต้น (Dhooghe *et al*., 2011) สำหรับการศึกษาการชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ในปาล์มน้ำมันนั้น Madon และคณะ (2005) ใช้เมล็ดที่กำลังงอก

นอกจากนี้ มีรายงานการศึกษา การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในพืชชนิดอื่นๆ โดยใช้ชิ้นส่วนพืชแตกต่างกัน เช่น ชิ้นส่วนปลายยอดของส้ม (Aleza *et al*., 2009) พุทรา (Gu *et al*., 2005) กล้วย (van Duren *et al*., 1996; Ganga and Chezhiyan, 2002) กุหลาบ (Kermani *et al*., 2003) ชิ้นส่วนยอดในกล้วย (Hamill *et al*., 1992) ชิ้นส่วนตายอดใน *Dioscorea zingiberensis* (Zhang *et al*., 2010a) ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มในกล้วยไม้แคทลียา (de Mello *et al*., 2000) แคลลัสของส้ม (Zhang *et al*., 2007) และ *Dioscorea zingiberensis* (Heping *et al*., 2008) นอกจากนี้มีรายงานการใช้ชิ้นส่วนใบในสาลี่ (Sun *et al*., 2009) ชิ้นส่วนข้อของมะเขือเทศ (Greplova *et al*.,

2009) ทับทิม (Shao *et al*., 2003) กุหลาบ (Allum *et al*., 2007; Khosravi *et al*., 2008) ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง และข้อใบเลี้ยงของต้นคำเงาะ (de Carvalho *et al*., 2005) ต้นอ่อนของแตงโม (Omran *et al*., 2008) เซลล์ซัสเพนชั่นของส้ม (Dutt *et al*., 2010) โพรโทพลาสต์ของส้ม (Zeng *et al*., 2006) โซมาติกเอ็มบริโอขององุ่น (Yang *et al*., 2006) และ SSE ในพืช *Spathiphyllum wallisii* (Eeckhaut *et al*., 2004)

5.2 ความเข้มข้น ระยะเวลา และวิธีการให้สาร

ความเข้มข้นของโคลชิซิน และออรีซาลิน ร่วมกับระยะเวลาที่จุ่มแช่สารมีผลต่ออัตราการเกิดพอลิพลอยด์ ซึ่งพืชแต่ละชนิดจะตอบสนองแตกต่างกัน การศึกษาโดยใช้สารความเข้มข้นต่ำอาจจะไม่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมได้ และเมื่อใช้สารความเข้มข้นสูง ส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชอาจตายได้ ดังนั้นระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสม เป็นปัจจัยสำคัญที่สามารถเพิ่มอัตราการชักนำต้นพอลิพลอยด์ได้ Tang และคณะ (2010) รายงานการใช้สารโคลชิซินว่าที่ความเข้มข้นต่ำ แต่ใช้เวลาในการจุ่มแช่ชิ้นส่วนแคลลัสของ *Paulownia tomentosa* ในสารละลายนานขึ้น สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นพอลิพลอยด์ให้สูงขึ้นได้ นอกจากนี้การใช้สารที่มีความเข้มข้นสูง แต่ใช้เวลาในการจุ่มแช่ชิ้นส่วนสั้นลง สามารถชักนำต้นพอลิพลอยด์ได้เช่นเดียวกัน (Allum *et al*., 2007)

Madon และคณะ (2005) ชักนำการกลายพันธุ์ในปาล์มน้ำมันโดยใช้สารโคลชิซิน และออรีซาลินความเข้มข้นต่างๆ จุ่มแช่เมล็ดงอกภายนอกสภาพหลอดทดลอง พบว่าโคลชิซินเข้มข้น 10.0 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 8 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด 48 เปอร์เซ็นต์ และโคลชิซินเข้มข้น 12.5 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 6 ชั่วโมง เกิดต้นเททระพลอยด์ ส่วนออรีซาลิน เข้มข้น 90 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 8 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด 72 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบต้นพอลิพลอยด์ สำหรับการศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซม โดยใช้สารละลายโคลชิซิน ภายนอกสภาพหลอดทดลองในพืชชนิดอื่นนั้น Urwin และ Horsnell (2007) จุ่มแช่เมล็ดลาเวนเดอร์ ในอาหารเหลวร่วมกับสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าเกิดต้นเททระพลอยด์ Omidbaigi และคณะ (2010) นำเมล็ด ใบเลี้ยงของต้นอ่อน และรากของโหระพา มาแช่สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 - 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 6 12 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่า การหยดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ บนใบเลี้ยงของต้นอ่อนเท่านั้น ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ

ชิ้นส่วนพืช ลดลงตามความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่สูงขึ้น และระยะเวลาการแช่สารที่นานขึ้น

มีรายงานการเพิ่มชุดโครโมโซม โดยใช้สารละลายโคลชิซิน และออรีซาลินภายในสภาพหลอดทดลอง ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เช่น Gantait และคณะ (2011) นำปลายยอดของเยอบีร่า แช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ดีที่สุด แต่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยกว่าต้นควบคุม Gu และคณะ (2005) เพาะเลี้ยงปลายยอดพุทราบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับสารโคลชิซินเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง และความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ 3 เปอร์เซ็นต์ Stanys และคณะ (2004) ศึกษาการชักนำการเกิดพอลิพลอยด์ใน *Ribes* โดยการเพาะเลี้ยงปลายยอด และเอ็มบริโอร่วมกับสารโคลชิซินเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ และออรีซาลินเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดพืชพอลิพลอยด์ได้ Nguyen และคณะ (2003) ชักนำปลายยอด *Alocasia* ให้เกิดต้นเททระพลอยด์ โดยแช่ในสารโคลชิซิน และออรีซาลินความเข้มข้นต่างๆ พบว่าโคลชิซินเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตดีที่สุด และมีการสร้างยอดรวมมากกว่าต้นควบคุม แต่ไม่พบต้นเททระพลอยด์ ส่วนออรีซาลินเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด และออรีซาลิน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง เกิดต้นเททระพลอยด์ดีที่สุด

Liu และ Gao (2007) นำตายอดของเบญจมาศ จุ่มแช่ในสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ พบว่าเกิดต้นเททระพลอยด์ได้ดีที่สุด Liu และคณะ (2007) จุ่มแช่เมล็ด *Platanus acerifolia* ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.1 - 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ อย่างไรก็ตามต้นอ่อนไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ Omran และ Mohammad (2008) จุ่มแช่เมล็ดฝ้าย ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารโคลชิซิน เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าสามารถชักนำต้นเททระพลอยด์ได้ แต่เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำลง Rego และคณะ (2011) นำชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของเสาวรสผลสีเหลือง ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดภายใต้สภาวะปลอดเชื้อมาจุ่มแช่ในอาหารเหลวที่เติมสารละลายโคลชิซิน และออรีซาลิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วัน พบว่าการจุ่มแช่ชิ้นส่วนในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 15 วัน เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ดีที่สุด ส่วนการจุ่มแช่ในสารละลายออรีซาลินทุกความเข้มข้น (5 - 30 ไมโครโมลาร์) ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ Sun และคณะ (2009) ใช้ชิ้นส่วนใบของสาลี่วางบนกระดาษกรองที่หยดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำไปชักนำให้เกิดยอดภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ พบว่า การวางชิ้นส่วนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ดีที่สุด และการวางชิ้นส่วนบนสารละลายโคลชิซินเป็นเวลานานขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเททระพลอยด์ลดลง

Koarapatchaikol (2007) แช่แคลลัสของกล้วยสาในสารละลายออรีซาลินเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เกิดต้นเททระพลอยด์มากที่สุด Heping และคณะ (2008) นำแคลลัสของ *Dioscorea zingiberensis* จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ 4 8 12 16 20 24 และ 30 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำต้นเททระพลอยด์ได้ทุกระยะเวลา แต่การจุ่มแช่แคลลัสเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ดีที่สุด Sariano และคณะ (2007) รายงานผลการศึกษาการชักนำการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) พันธุ์ต่างๆ โดยใช้ชิ้นส่วนอับเรณูและเรณูมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับสารโคลชิซินเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถชักนำพืชไดแฮพลอยด์ (dihaploid)ได้สูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ Escandon และคณะ (2005) ศึกษาการเพาะเลี้ยงข้อของพืชสมุนไพรกรดน้ำ (*Scoparia montevidiensis*) บนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับสารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.001 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดเททระพลอยด์ได้ โดยที่ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดเททระพลอยด์มากที่สุด และที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ชักนำให้เกิดมิกโซพลอยด์มากที่สุดเช่นกัน

วิธีการให้สารโคลชิซิน และออรีซาลิน มี 2 วิธี คือ การหยดสารละลายโดยตรงกับต้นพืชบริเวณปลายยอด และการนำเมล็ด หรือชิ้นส่วนพืชแช่สารละลายดังกล่าว ซึ่งสามารถศึกษาในพืชที่เจริญเติบโตในแปลงปลูก และในหลอดทดลองภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ (Rubuluza *et al*., 2007) การให้สารโคลชิซิน และออรีซาลินแก่พืชต้องพยายามให้สารแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อเจริญ หรือเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตและสมบูรณ์ ระยะเวลาและความยาวนานของการให้สารแก่เนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับวัฏจักรของการแบ่งเซลล์พืช หากระยะเวลาที่ให้สารสั้นอาจไม่แสดงผล ถ้านานเกินไปอาจแสดงผลมาก คือพืชที่ได้จะมีโครโมโซมมากเกินระดับที่ต้องการ

6. การตรวจสอบการกลายพันธุ์ในพืช

วิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของพืช ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารโคลชิซิน และออรีซาลินนั้น สามารถตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยา และการตรวจสอบลักษณะทางเซลล์วิทยา

6.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ความแปรปรวนจากการกลายพันธุ์ สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ง่าย จากการสังเกตลักษณะที่เกิดขึ้น มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านยีนบนโครโมโซม ภายหลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งลักษณะที่ปรากฏ เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงข้อมูลที่เป็นองค์ประกอบทางจีโนไทป์ และสิ่งแวดล้อมส่งผลให้แสดงลักษณะนั้นๆ ออกมา เช่น ลักษณะของการเจริญเติบโต ลำต้น ใบ ดอก ผล ราก เป็นต้น Zhang และคณะ (2007) รายงานว่า ลักษณะ และขนาดของใบ สามารถประเมินการเกิดพอลิพลอยด์ได้ อย่างไรก็ตาม Zhang และคณะ (2010b) รายงานว่าจากการประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่คาดว่าเป็นต้นเททระพลอยด์ (putative tetraploid) นั้น หลังจากยืนยันผลโดยการศึกษาลักษณะทางเซลล์วิทยา พบว่าเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นที่จัดเป็นต้นเททระพลอยด์ ส่วนที่เหลือเป็นต้นมิกโซพลอยด์ สำหรับการประเมินการเกิดเททระพลอยด์ในปาล์มน้ำมันนั้น Madon และคณะ (2005) พบว่าต้นเททระพลอยด์ของปาล์มน้ำมัน ที่ชักนำจากการแช่เมล็ดที่งอกในสารละลายโคลชิซิน มีการเจริญเติบโตช้า และมีใบสีเขียวเข้ม หนากว่าต้นควบคุม นอกจากนี้ มีรายงานการประเมินการเกิดเททระพลอยด์ โดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาในพืชชนิดอื่น เช่น Shao และคณะ (2003) รายงานว่าต้นเททระพลอยด์ของทับทิมให้ขนาดของยอด ใบ และราก ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ Sun และคณะ (2009) รายงานว่าต้นเททระพลอยด์ของสาลี่ ให้ใบ และยอดสีเขียวเข้ม หนา แต่ขนาดของใบลดลง ลำต้นและข้อสั้นกว่าต้นดิพลอยด์ Liu และ Gao (2007) รายงานว่า ต้นเททระพลอยด์ของเบญจมาศ มีการเจริญเติบโตช้า ลำต้น ใบ และ ราก มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ นอกจากนี้ Heping และคณะ (2008) รายงานว่า ต้นเททระพลอยด์ของ *Dioscorea zingiberensis* ให้ขนาดของใบ และเหง้า ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ และ Omidbaigi และคณะ (2010) รายงานว่าต้นเททระพลอยด์ของโหระพา มีใบสีเขียวเข้ม หนา และรูปร่างของใบเปลี่ยนแปลงไปแตกต่างจากต้นควบคุม ขนาดของใบ เมล็ด และละอองเรณู มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นเททระพลอยด์ในพุทรา Gu และคณะ (2005) รายงานว่าต้นเททระพลอยด์ ให้ต้นขนาดใหญ่ ใบหนา และให้ดอกขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ Escandon และคณะ (2005) รายงานว่าต้นเททระพลอยด์ของกรดน้ำ ให้ลำต้น ใบ และดอกขนาดใหญ่ขึ้น Nimura และคณะ (2006) รายงานการเกิดพอลิพลอยด์ ในดอกคาร์เนชั่นลูกผสม (*Dianthus caryophyllus* L. และ *D. japonicus* Thunb) ส่งผลให้ขนาดดอกใหญ่ขึ้น ระยะเวลาบานของดอกนานกว่ากลุ่มควบคุม และ Allum และคณะ (2007) รายงานว่าต้นเททระ-พลอยด์ของดอกกุหลาบ มีจำนวนกลีบดอกมากกว่าต้นดิพลอยด์ นอกจากนี้ Tang และคณะ (2010) รายงานว่าต้นเททระพลอยด์ของ *Paulownia tomentosa* เตี้ยลง มีข้อของลำต้นสั้นลง รูปร่างของใบเปลี่ยนเป็นใบกลม ให้ดอกขนาดใหญ่ ก้านดอกยาว และรังไข่ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ และ Gantait และคณะ (2011) รายงานว่า ต้นเททระพลอยด์มีการเจริญเติบโตช้า ใบมีขนาดใหญ่ และหนา รากมีขนาดใหญ่และสั้น ดอก และช่อดอกมีขนาดใหญ่ ก้านดอกยาว และระยะเวลาการออกดอกช้ากว่าต้นควบคุมเป็นเวลา 5 วัน จากการศึกษาต้นเททระพลอยด์ขององุ่น พบว่าให้ผลขนาดใหญ่กว่าต้นควบคุม (Notsuka *et al*., 2000) สำหรับต้นเททระพลอยด์ของ *Chaenomeles japonica* นั้น มีเมล็ดลดลง แต่ให้น้ำหนักผลสดเพิ่มขึ้น (Stanys *et al*..2006) นอกจากนี้ Rego และคณะ (2011) รายงานว่า ต้นเททระพลอยด์ของเสาวรสผลสีเหลือง ให้ใบ ผลขนาดใหญ่ และให้น้ำในผลมากกว่าต้นดิ-พลอยด์

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชในต้นเททระพลอยด์นั้น ก่อให้เกิดมูลค่าเพิ่มทางเศรษฐกิจ เช่น ต้นพืชที่ทนต่อสภาวะแล้ง ต้านทานโรค ให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น และสามารถเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยวได้นานขึ้น (Riddle *et al*., 2006; Xiong *et al*., 2006) ดังเช่นรายงานของ Li และคณะ (2009) รายงานว่าต้นเตตราพลอยด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยขนาดของใบลดลง ให้มวลของใบต่อพื้นที่เพิ่มขึ้น เนื้อเยื่อ epidermal และ palisade cell หนากว่าเดิม ส่งผลให้ทนต่อสภาวะแล้งได้ดีกว่าต้นควบคุม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าต้นเตตราพลอยด์ของ *Prunus salicina* (Pustovoitova *et al*., 1996) และ *Betula papyrifera* (Li *et al*., 1996) ต้านทานต่อภาวะน้ำท่วมได้ดีกว่าต้นควบคุม Dewey (1980) รายงานว่าต้นเตตราพลอยด์ของ *Lolium perenne* และ *Lolium multiflorum* ต้านทานโรคได้ดีกว่าต้นควบคุม ไฟเบอร์นุ่มขึ้น และย่อยได้ง่ายกว่าเดิม และ Zhang และคณะ (2010a) รายงานว่าต้นเตตราพลอยด์ ใน *Dioscorea* ต้านทานต่อสภาวะร้อนได้ดีกว่าต้นควบคุม

6.2 การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยา

การตรวจสอบความแปรปรวนของปาล์มน้ำมัน ที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ สามารถคัดเลือกได้โดยการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา เช่น ขนาดเซลล์คุม ปริมาณคลอโรฟิลล์ จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ และปริมาณสารทุติยภูมิ เป็นต้น โดยทั่วไปแล้วลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสรีรวิทยา ดังนั้นจึงสามารถคัดเลือกต้นที่คาดว่าเป็นเททระพลอยด์ โดยการศึกษาเบื้องต้นจากลักษณะภายนอก และนำมาตรวจสอบขนาดของเซลล์คุม และนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบที่ทำได้ง่าย สะดวก และประหยัด (Tal, 1980; Cohen and Yao, 1996) ขนาดของเซลล์คุมนั้น สามารถนำมาประเมินต้นเทท-ระพลอยด์ได้ โดยต้นเททระพลอยด์ให้ขนาดเซลล์คุมใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ (Hodgson *et al*., 2010) มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับต้นเททระพลอยด์ ให้ขนาดเซลล์คุมใหญ่กว่าต้นควบคุม และความหนาแน่นของเซลล์คุมน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ ในเสาวรสผลสีเหลือง (Rego *et al*., 2011) สาลี่ (Kadota and Nimii, 2002; Sun *et al*., 2009) *Chaemomeles japonica* (Stanys *et al*., 2006) องุ่น (Yang *et al*., 2006) กล้วย (Hamill *et al*., 1992) พุทรา (Gu *et al*., 2005) หม่อน (Chakraborti *et al*., 1998) หน่อไม้ฝรั่ง (Shiga *et al*., 2009) โหระพา (Omibaigi *et al*., 2010) *Pennisetum* spp. (Campos *et al*., 2009) *Lagerstroemia indica* (Zhang *et al*., 2010b) เยอบีร่า (Gantait *et al*., 2011) เบญจมาศ (Liu *et al*., 2007) *Zantedeschia* (Cohen and Yao, 1996) *Aegilops neglecta* (Aryavand *et al*., 2003) และ*Alocasia* (Thao *et al*., 2003) สำหรับปาล์มน้ำมัน Madon และคณะ (2005) รายงานว่า ขนาดเซลล์คุมของต้นเททระพลอยด์ และต้นดิพลอยด์ไม่มีความแตกต่างกัน

นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบการเกิดเททระพลอยด์ โดยการนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ ซึ่งมีการยืนยันผลว่าจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในต้นเททระพลอยด์ มีจำนวนมากกว่าต้นดิพลอยด์ ในหม่อน (Chakraborti *et al*., 1998) พุทรา (Gu *et al*., 2005) Poplar และ black locus (Edward *et al*., 2009) *Lagerstoemia indica* (Zhang *et al*., 2010b) โหระพา (Omibaigi *et al*., 2010) และเสาวรสผลสีเหลือง (Rego *et al*., 2011)

6.3 การตรวจสอบจำนวนโครโมโซม

การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก หรือเนื้อเยื่อเจริญส่วนอื่น เช่น ยอด ด้วยวิธี Feulgen squash สามารถประเมินการเกิดพอลิพลอยด์ได้อย่างแม่นยำ (Dolezel *et al*., 2007) สำหรับปาล์มน้ำมัน Madon และคณะ (2005) รายงานว่าปาล์มน้ำมันเป็นพืชดิพลอยด์ มี

จำนวนโครโมโซม 2n=2x=32 และต้นเททระพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 2n=4x=64 นอกจากนี้ Madon และคณะ (2008) รายงานว่า จากการศึกษาปลายรากปาล์มน้ำมันต้นดิพลอยด์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=32 เช่นเดียวกัน สำหรับการตรวจสอบการเกิดเททระพลอยด์ในพืชชนิดอื่นจากการนับจำนวนโครโมโซม Liu และ Gao (2007) รายงานว่าต้นเททระพลอยด์ของเบญจมาศ มีจำนวนโครโมโซม 2n=4x=36 ส่วนต้นดิพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=18 Rego และคณะ (2011) รายงานการศึกษาปลายรากของเสาวรสผลสีเหลืองต้นเททระพลอยด์ และดิพลอยด์ พบว่าต้นเททระพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 2n=4x=36 และต้นดิพลอยด์ 2n=2x=18

นอกจากนี้ มีหลายการศึกษาที่รายงานการยืนยันผลการเกิดต้นเททระพลอยด์ของพืชต่างๆ จากการนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก เช่น *Lagerstoemia indica* (Zhang *et al*., 2010b) *Paulownia tomentosa* (Tang *et al*., 2010) โหระพา (Omidbaigi *et al*., 2010) แพร์ (Sun *et al*., 2009) *Dioscorea zingiberensis* (Heping *et al*., 2008) กรดน้ำ (Escandon *et al*., 2005) พุทรา (Gu *et al*., 2005) และ *Alocasia* (Thao *et al*., 2003)

6.4 การตวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี

โฟลไซโทเมทรี เป็นเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยอ่านค่านิวเคลียสของเซลล์พืชที่ต้องการศึกษาด้วยแสงเลเซอร์ ทำให้สามารถประมาณดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบในนิวเคลียสและขนาดของจีโนมพืชที่ต้องการศึกษาได้ นอกจากนี้ยังสามารถบ่งชี้ถึงระดับการเปลี่ยนแปลงเพิ่มหรือลดของจำนวนชุดโครโมโซม รวมทั้งสามารถยืนยันถึงความเสถียรของโครโมโซมพืชที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อเป็นเวลานาน การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอสามารถปฏิบัติได้อย่างรวดเร็ว และให้ผลที่แม่นยำ (Galbraith *et al.,* 1983; Eeckhaut *et al.,* 2005; Dolezel *et al*., 2007) ปัจจุบันเทคนิคดังกล่าวเป็นที่นิยม เนื่องจากการตรวจสอบการเกิดพอลิพลอยด์โดยการนับจำนวนโครโมโซมนั้นมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก สารเคมีที่ใช้ในการศึกษามีความจำเพาะต่อชนิดพืช และต้องใช้ความชำนาญของผู้ปฏิบัติการสูง (Bohanec, 2003) การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โฟลไซโทเมทรีจากเนื้อเยื่อเจริญของพืช เช่น แคลลัส ยอด ใบอ่อน และเอ็มบริโอ ได้รับความนิยมสูง วิธีการคือการแยกเซลล์พืชให้เป็นเซลล์เดี่ยว ด้วยการสับเนื้อเยื่อพืชด้วยใบมีด หรือการตีด้วยเม็ดบีท (Roberts, 2007) ในสารละลายบัฟเฟอร์ และย้อมนิวเคลียสด้วยสารละลาย propidium iodide (PI) หรือ 4’, 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) หลังจากนั้นวิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ ซึ่งเครื่องจะวิเคราะห์ขณะที่เซลล์เคลื่อนที่ผ่านลำแสงเลเซอร์เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยการตรวจจับนิวเคลียส และสามารถนับได้เป็นพันเซลล์ และเครื่องดังกล่าวจะ

วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากนิวเคลียส ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับพลอยดี (Cousin *et al*., 2009) จึงสามารถตรวจสอบระดับพลอยดีของพืชได้ปริมาณมาก ในระยะเวลาอันสั้น

สำหรับการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอในปาล์มน้ำมัน โดยเทคนิคโฟลไซโทเมทรีนั้น Rival และคณะ (1997) รายงานว่า ปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันคือ 3.786 ± 0.125 pg Srisawat และคณะ (2005) รายงานว่าปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันมีค่าสูงกว่าของ Rival เล็กน้อย คือ 3.97 ± 0.31 pg และ Madon และคณะ (2008) รายงานปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันมีค่า 3.76 ± 0.02 pg สำหรับการศึกษาระดับพลอยดีของพืชนั้น Madon และคณะ (2005) จุ่มแช่เมล็ดงอกของปาล์มน้ำมันในสารละลายโคลชิซินเพื่อชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ หลังจากนั้นนำใบอ่อนมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าระดับพลอยดีเพิ่มขึ้นเป็นเททระพลอยด์ คือจาก 2 ชุด เป็น 4 ชุด Gantait และคณะ(2011) รายงานการนำยอดของเยอบีร่าต้นเททระพลอยด์มาศึกษาระดับพลอยดี พบว่าต้นเททระพลอยด์มีระดับพลอยดีสูงกว่าต้นดิพลอยด์สองเท่า Zhang และคณะ (2010a) นำใบของต้น *Dioscorea zingiberensis* ที่ได้รับการจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อประเมินจำนวนชุดโครโมโซม พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอของต้นเททระพลอยด์มากกว่าต้นดิพลอยด์สองเท่า Tang และคณะ (2010) ใช้ใบของ *Paulownia tomentosa* ตรวจสอบระดับพลอยดี พบว่าต้นที่ใช้สารโคลชิซินสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมเป็นต้นเททระพลอยด์ Sun และ คณะ (2009) ตรวจสอบระดับพลอยดีของใบสาลี่ที่ชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ โดยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี พบว่ามีระดับพลอยดีเปลี่ยนเป็น ทริพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเททระพลอยด์ นอกจากนี้ Barbara และ Elwira (2002) ใช้โฟลไซโทเมทรีกับ cloudberry พบว่าปริมาณดีเอ็นเอจากยอดที่พัฒนามาจากเมล็ดเทียมซึ่งเก็บไว้เป็นเวลานานที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะปลอดเชื้อ มีจำนวนชุดโครโมโซมเท่าเดิม ส่วนแคลลัสที่เกิดขึ้นมีจำนวนชุดโครโมโซมเปลี่ยนเป็น 4 ชุด และ 8 ชุด Gajdosova และคณะ (1995) พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของต้น silver fir จากยอดที่ย้ายเลี้ยงเป็นเวลานานยังคงมีจำนวนชุดโครโมโซมคงเดิม ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาผลของโคลชิซินและออรีซาลินต่อการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมในต้นอ่อนชุดที่ 2 ของปาล์มน้ำมันครั้งนี้มีวัตถุประสงค์คือ

1. เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้น ระยะเวลา และวิธีการจุ่มแช่ชิ้นส่วนในสารโคลชิซิน และออรีซาลินต่ออัตรารอดชีวิต และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จาก SSE
2. เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้น ระยะเวลา และวิธีการจุ่มแช่ชิ้นส่วนในสารโคลชิซิน และออรีซาลินต่ออัตราการเกิด putative tetraploid จาก SSE
3. เพื่อศึกษาวิธีการตรวจสอบการเพิ่มชุดโครโมโซมจากการใช้สารโคลชิซิน และออรีซาลินที่เหมาะสม รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย เพื่อใช้ในการประเมินต้นเททระพลอยด์ และคัดเลือกวิธีการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตปาล์มน้ำมันเททระพลอยด์ต่อไป

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ และอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (EC) ที่ชักนำจากใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีอายุ 10 ปี จากสถานีวิจัยและฝึกภาคสนามเทพา คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ดูแลแคลลัสโดยย้ายเลี้ยงทุกเดือนบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นเวลา 1 เดือน ชักนำให้เกิดต้นอ่อนระยะสร้างจาว (haustorium embryo: HE) แยกตัวเป็นอิสระออกมาจากแคลลัส จากนั้นย้าย HE เดี่ยวๆ ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน จะได้ SSE จำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษาผลของโคลชิซิน และออรีซาลินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมต่อไป

1.2 สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง

สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นสูตร MS ดัดแปลงให้มีความเหมาะสมกับการชักนำพัฒนาการของปาล์มน้ำมัน ในแต่ละระดับดังนี้คือ

1.2.1 สูตรอาหารเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส คือ อาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2.2 สูตรอาหารชักนำต้นอ่อนระยะสร้างจาว คือ อาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2.3 สูตรอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สอง (SSE) คือ อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2.4 สูตรอาหารชักนำต้นกล้า คือ อาหารแข็งสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

1.2.5 สูตรอาหารชักนำราก คือ อาหารแข็งสูตร ARDA (Agricultural Research Development Agency) เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.3 วัสดุสารเคมี

1.3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS และ ARDA (รายละเอียดแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1)

1.3.2 น้ำตาลซูโครส ซอร์บิทอล

1.3.3 กรดแอสคอร์บิค

1.3.4 สารควบคุมการเจริญเติบโต คือ dicamba และ NAA

1.3.5 สารเคมีชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ คือ โคลชิซิน และออรีซาลิน

1.3.6 สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ คือ แอลกอฮอล์

1.3.7 สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร คือกรดไฮโดรคลอริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์

1.3.8 สารเคมีที่ใช้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของดอก และลักษณะของเซลล์คุม คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Na_2HPO_4–NaH_2PO_4) และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)

1.3.9 สารเคมีที่ใช้ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ คือ อะซีโตน

1.3.10 สารเคมีที่ใช้ศึกษาโครโมโซมของพืช คือ พาราไดคลอโรเบนซีน (*P*-dichlorobenzene : PDB) กรดเกลเชียลอะซิติก (glacial acetic acid) กรดไฮโดรคลอริก สีย้อมโครโมโซมคาร์บอลฟุกซิน (carbol fuchsin) และ oil immersion (รายละเอียดแสดงในตารางภาคผนวกที่ 2)

1.3.11 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ [Tris-HCl, Triton-X, PVP (polyvinyl pyrolidone)] และ สีย้อมดีเอ็นเอ propidium iodide (PI) (รายละเอียดแสดงในตารางภาคผนวกที่ 3)

1.4 วัสดุเกษตร

1.4.1 กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว
1.4.2 ปุ๋ยละลายช้าสูตร 14-14-14
1.4.3 สารสกัดชีวภาพกำจัดเชื้อรา แบคทีเรีย ตราไบซัน
1.4.4 แลนเนต

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.1.1 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
2.1.2 เครื่องคนสารละลายพร้อมแท่งแม่เหล็ก
2.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
2.1.4 หม้อนึ่งความดันไอ
2.1.5 ตู้อบไมโครเวฟ
2.1.6 เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง เช่น จานเพาะเลี้ยง ฟลาสก์ บีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร
2.1.7 ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง
2.1.8 เครื่องกลั่นน้ำ

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยง และวางเลี้ยง

2.2.1 ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
2.2.2 เครื่องเขย่าเลี้ยง

2.2.3 ชุดเครื่องมือย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ปากคีบ และมีดผ่าตัด

2.2.4 ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยง ซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 8.73 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะดอก และลักษณะของเซลล์คุม

2.3.1 อุปกรณ์ในการศึกษาจำนวนเซลล์คุม ได้แก่ ใบมีด ปากคีบ แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์

2.3.2 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ (compound light microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น BH2-RFL-T2

2.3.3 เครื่องเคลือบอนุภาคทอง (sputter-coater) รุ่น Spi module

2.3.4 กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) รุ่น Quanta 400, FEI

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์

2.4.1 อุปกรณ์ในการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ ได้แก่กรวยกรอง กระดาษกรองเบอร์1 และโกร่ง

2.4.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น MAPADA (v-1200/uv-1100/uv-1200)

2.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาจำนวนโครโมโซม

2.5.1 อุปกรณ์ในการศึกษาจำนวนโครโมโซม ได้แก่ แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์ เข็มเขี่ย ใบมีด ดินสอปลายเรียบ

2.5.2 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ (compound light microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น BH2-RFL-T2

2.5.3 กล้องถ่ายรูปดิจิตอล ยี่ห้อ Sony รุ่น DSC-H10

2.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ

2.6.1 อุปกรณ์ในการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ ใบมีด หลอดทดลองขนาดเล็ก กระดาษกรองขนาด 20 ไมโครเมตร

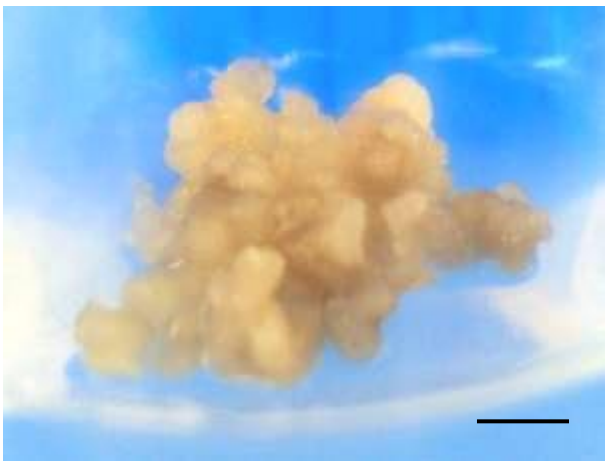
2.6.2 เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ FACScalibur Flow Cytometer รุ่น Becton-Dickinson Japan

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

1.1 การชักนำ และเพิ่มปริมาณ EC

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (EC) (ภาพที่ 1) ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน ที่ยังไม่คลี่ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีอายุ 10 ปี จากสถานีวิจัยและฝึกภาคสนามเทพา คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ อาหารดังกล่าวบรรจุในหลอดทดลองขนาด 25×150 มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 8.73 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกการพัฒนาของแคลลัสชนิดต่างๆขนาดของ EC และ HE โดยย้ายเลี้ยงทุกเดือน เป็นเวลา 3 เดือน



ภาพที่ 1 EC ที่ชักนำจากใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี อายุ 10 ปี ซึ่งวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)

1.2 การชักนำ SE

นำ EC จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงที่สภาพแวดล้อมเดียวกับการชักนำ และเพิ่มปริมาณ EC ในข้อ 1.1 บันทึกอัตราการสร้างและจำนวนของ HE หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

1.3 การชักนำ SSE

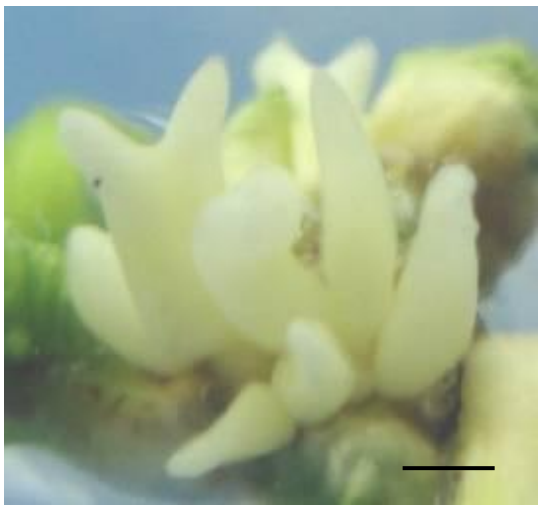
นำ HE มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงที่สภาพแวดล้อมเดียวกับการชักนำ SE ในข้อ 1.2

บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกเป็นยอดหรือต้นที่สมบูรณ์ การสร้าง SSE และจำนวน SSE/HE หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน นำ SSE ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยง HE บนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มาเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลองด้วยสารโคลชิซิน และออรีซาลิน

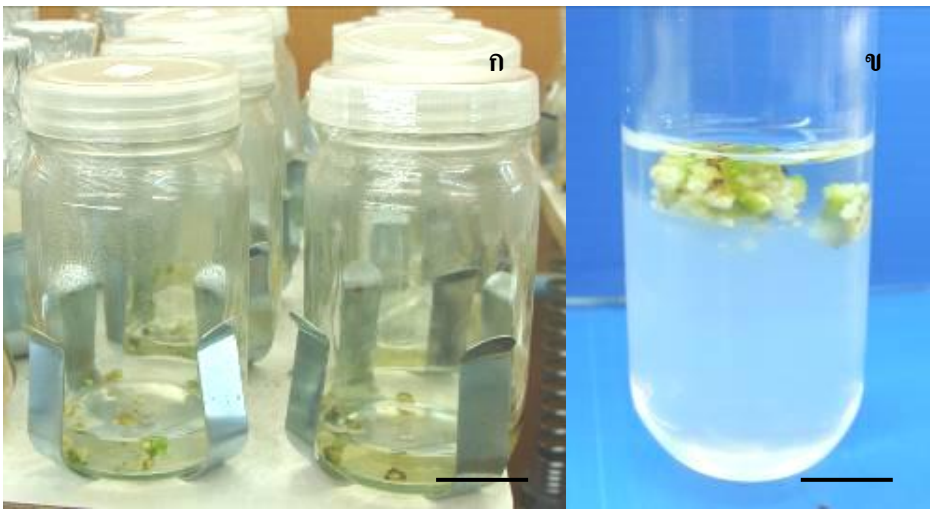
2. ศึกษาการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์โดยสารโคลชิซิน และออรีซาลิน

2.1 ผลของโคลชิซิน และออรีซาลินต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

ใช้กลุ่มชิ้นส่วน SSE ที่ชักนำจาก HE เพียง 1 ชุด ซึ่งประกอบด้วย SSE ในระยะทอร์ปิโด จำนวน 10 - 15 SSE (ภาพที่ 2) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมสารละลายโคลชิซินหรือออรีซาลินที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่าง ๆ ในกรณีสารละลายโคลชิซิน ใช้ความเข้มข้น 0 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสารละลายออรีซาลิน ใช้ความเข้มข้น 0 0.001 0.002 0.003 และ 0.004 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดคือ ชุดที่ 1 จุ่มแช่กลุ่ม SSE ในสารละลายโคลชิซิน หรือออรีซาลิน (ภาพที่ 3ก) เป็นเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงย้ายชิ้นส่วนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ส่วนการทดลองชุดที่ 2 ใช้โคลชิซิน หรือออรีซาลินความเข้มข้นดังกล่าวเททับ (overlay) บนอาหารแข็งสูตรเดียวกันกับการทดลองชุดที่ 1 (ภาพที่ 3ข) ซึ่งเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิม แต่ละหน่วยการทดลองใช้กลุ่ม SSE จำนวน 10 กลุ่มต่อซ้ำ ทำ 3 ซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปรียบเทียบกันในแต่ละวิธีการให้สาร ชนิด และความเข้มข้นของโคลชิซิน หรือออรีซาลิน หลังจากทรีตและย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 1 เดือน เพื่อหาความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโต 50 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 2 ปัจจัย ในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomize design : CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)



ภาพที่ 2 กลุ่ม SSE ระยะทอร์ปิโด ที่ชักนำจาก HE เพียง 1 ชุด (บาร์ 7 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 3 วิธีการทรีตกลุ่ม SSE ด้วยสารละลายโคลชิซิน หรือออรีซาลิน

ก การทดลองชุดที่ 1 กลุ่ม SSE จุ่มแช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมโคลชิซิน และออรี-ซาลิน ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิม (บาร์ 2 เซนติเมตร)

ข การทดลองชุดที่ 2 กลุ่ม SSE ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เททับด้วยอาหารเหลวสูตรเดียวกัน ที่เติมโคลชิซิน และออรีซาลิน ความเข้มข้นเดียวกันกับการทดลองชุดที่ 1 เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิม (บาร์ 2 เซนติเมตร)

2.2 ผลของโคลชิซิน และออรีซาลินต่อการเจริญ และพัฒนาของต้นกล้า

หลังจากศึกษาเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของกลุ่ม SSE บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน ในข้อ 2.1 แล้ว นำกลุ่ม SSE ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม และเพาะเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 30 วัน เพื่อชักนำการงอกของ SSE บันทึกอัตราการเจริญ การเกิดยอด ใบ และราก เปรียบเทียบกันในแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้แผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 2 ปัจจัย ในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT

3. การศึกษาลักษณะพืชดิพลอยด์ และพอลิพลอยด์ในหลอดทดลอง

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.1.1 ลักษณะภายนอกของต้น ใบ และราก

เมื่อ SSE พัฒนาเป็นต้นกล้า นำต้นกล้าที่ยังไม่มีการสร้างรากไปชักนำให้เกิดราก โดยย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ARDA เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นสุ่มตัวอย่างจากแต่ละสิ่งทดลองจำนวน10 ต้น ตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกัน สำหรับลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ และรากนั้น สุ่มเลือกตัวอย่างใบ 3 ใบ และ 3 ราก นำมาวัดความยาว ความหนา และสังเกตสีของใบ รูปร่างของใบ การเกิดแขนงของราก จากต้นที่สุ่มเลือกมาในแต่ละความเข้มข้นของโคลชิซิน และออรีซาลีน บันทึกลักษณะดังกล่าวในแต่ละสิ่งทดลองเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลอง CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้วิธี DMRT

3.1.2 ลักษณะภายนอกของดอก และผล

เมื่อต้นกล้าเกิดดอกในหลอดทดลอง นำดอกมาศึกษาลักษณะภายนอกภายใต้กล้อง SEM โดยเตรียมตัวอย่างดอกดังนี้ คือ นำดอกตรึงด้วยสารละลาย glutaraldehyde ($C_5H_8O_2$) เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง ดึงน้ำออกจากดอกโดยใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นเป็นลำดับ (50-100 เปอร์เซ็นต์) ชนิดละ 15-30 นาที

และทำดอกให้แห้งจนถึงระดับ critical point drying จากนั้นนำดอกติดบนแท่น ใช้ carbon paint หรือ silver paint เป็นตัวยึด นำดอกเคลือบทองด้วยเครื่อง sputter coater (ภาพที่ 4) และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 1200 เท่า เมื่อดอกมีการพัฒนาเป็นผล ศึกษาลักษณะของผล โดยนำผลปาล์มศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอ และศึกษาเนื้อเยื่อของผลจากการผ่าตัดตามขวาง และตามยาว ภายใต้กล้อง SEM เช่นเดียวกับการศึกษาของดอกข้างต้น บันทึกภาพด้วยกล้อง SEM เปรียบเทียบกันในแต่ละสิ่งทดลอง

ภาพที่ 4 ดอกติดบนแท่น silver paint และ ผ่านการเคลือบทองด้วยเครื่อง sputter coater (บาร์ 0.2 เซนติเมตร)

3.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา

3.2.1 รูปร่าง ขนาด และความหนาแน่นของเซลล์คุม

เมื่อ SSE พัฒนาเป็นต้นกล้า สุ่มตัวอย่างต้นกล้าจากการทดลองที่ 3.1.1 จำนวน 10 ต้น แต่ละต้นใช้ตัวอย่างใบ 3 ใบ เตรียมตัวอย่างใบเช่นเดียวกับการศึกษาลักษณะภายนอกของดอก และผลในการศึกษาที่ 3.1.2 บันทึกขนาดของเซลล์คุม (ความกว้างและความยาว) ความหนาแน่นของเซลล์คุมต่อพื้นที่ 25 มิลลิเมตร บริเวณท้องใบ จากแต่ละความเข้มข้นของโคลชิ-ซิน และออรีซาลินภายใต้กล้อง SEM กำลังขยาย 1200 เท่า เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้ DMRT

3.2.2 จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม

เมื่อ SSE พัฒนาเป็นต้นกล้า สุ่มตัวอย่างต้นกล้าจากการทดลองที่ 3.1.1 จำนวน 10 ต้น แต่ละต้นใช้ตัวอย่างใบ 3 ใบ โดยสุ่มลอกผิวใบบริเวณท้องใบเป็นแผ่นบางๆ นำมาวางบนแผ่นสไลด์ หยดน้ำกลั่นลงบนชิ้นส่วนใบและปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกจำนวน และขนาดเม็ดคลอโรพลาสต์ ในแต่ละความเข้มข้นของโคลชิซิน และออรีซาลิน ที่ทดสอบเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้วิธี DMRT

3.2.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์

เมื่อ SSE พัฒนาเป็นต้นกล้า เก็บรวบรวมใบต้นกล้าที่คาดว่าเป็นต้นเททระพลอยด์จากการศึกษาที่ 3.1.1 จำนวน 10 ต้น หนัก 0.1 กรัมน้ำหนักสด มาสกัดคลอโรฟิลล์โดยบดด้วยสารละลายอะซีโตนเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ในโกร่งให้ละเอียด กรองสารที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนตะกอนที่เหลือมาบดอีกครั้งในสารละลายเดียวกัน จากนั้นผสมสารที่กรองได้ครั้งที่ 1 และ 2 เข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร นำมาวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณของคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวม โดยดัดแปลงจากสูตรของ Witham และคณะ (1986) อ้างโดยราตรี (2540) ดังนี้ คือ

$$\text{chlorophyll a} = \frac{[12.7\,(D_{663}) - 2.69\,(D_{645})]}{1000 \times W} \times V$$

$$\text{chlorophyll b} = \frac{[22.9\,(D_{645}) - 4.68\,(D_{663})]}{1000 \times W} \times V$$

$$\text{total chlorophyll} = \frac{[20.2\,(D_{663}) + 8.02\,(D_{645})]}{1000 \times W} \times V$$

D_{645} = การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร

D_{663} = การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร

V = ปริมาตรคลอโรฟิลล์รวม

W = น้ำหนักใบ

3.3 การตรวจสอบลักษณะทางเซลล์วิทยา

3.3.1 ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

เก็บตัวอย่างเซลล์ปลายรากจากต้นที่คัดเลือกภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ซึ่งคาดว่าเป็นต้นเททระพลอยด์ และต้นควบคุม ในช่วงเวลา 11.00 - 14.00 น. แต่ละสิ่งทดลอง (ความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่ในโคลชิซิน) ใช้จำนวนต้น 5 ต้น แต่ละต้นใช้ 2 ราก และศึกษาด้วยวิธี Feulgen squash ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Sharma และ Sharma (1980) ดังนี้คือ เลือกปลายรากที่มีลักษณะขาวใสปลายขุ่นเล็กน้อยตัดให้มีความยาว 1 เซนติเมตร ใส่ในสารละลายอิ่มตัวพาราไดคลอโรเบนซีน เก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 4 - 5 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น 1-2 ครั้ง หลังจากนั้นคงสภาพรากในน้ำยาฟิกเซทีฟ (fixative) ที่ประกอบด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ กับกรดเกลเชียลอะซิติกในอัตราส่วน 3:1 เก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ล้างรากด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 1 - 2 ครั้ง จากนั้นนำรากมาไฮโดรไลซิสในกรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ย้อมสีด้วยคาร์บอลฟุกซิน นาน 4 - 5 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบกำลังขยาย 1000 เท่า บันทึกภาพโครโมโซมปลายรากระยะเมทาเฟส เปรียบเทียบกันระหว่างต้นควบคุม และต้นซึ่งคาดว่าเป็นต้นเททระพลอยด์

3.3.2 การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอโดยโฟลไซโทเมทรี

นำชิ้นส่วนใบจากต้นกล้าที่คาดว่าเป็นต้นเททระพลอยด์ และต้นควบคุมจากการทดลองที่ 3.1.1 มาเป็นตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา แต่ละสิ่งทดลอง (ความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่ในโคลชิซิน) ใช้ต้นกล้า 10 ต้น แต่ละต้นใช้ 1 ใบ มาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเพื่อยืนยันการเกิดเททระพลอยด์ตามวิธีการของ Uozu และคณะ (1997) ดังนี้คือ นำใบอ่อนหนักประมาณ 30 มิลลิกรัม ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเล็ก เติมสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร สับชิ้นส่วนด้วยใบมีดโกนให้ละเอียด กรองสารละลายด้วยผ้ากรองขนาด 20 ไมโครเมตรใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติมสารละลาย PI ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จึงนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ โดยการนับนิวเคลียสของปาล์มน้ำมัน 4,000 นิวเคลียส ต่อตัวอย่าง วิเคราะห์ผลที่ได้ และเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของต้นที่คาดว่าเป็นต้นเททระพลอยด์ และต้นควบคุม เพื่อหาระดับพลอยดีด้วยเครื่อง FACS Calibur

cytometer โดยใช้ดีเอ็นเอของข้าวญี่ปุ่นสายพันธุ์ Nipponbare [*Oryza sativa* (cv. 'Nipponbare'] ซึ่งทราบระดับพลอยดีแน่นอนแล้วเป็น DNA มาตรฐาน คำนวณปริมาณดีเอ็นเอดังสมการต่อไปนี้

$$\text{sample (2C DNA)} = \frac{\text{G1peak channel of sample}}{\text{G1peak channel of } \textit{Oryza sativa}} \times 0.91 \text{ pg}$$

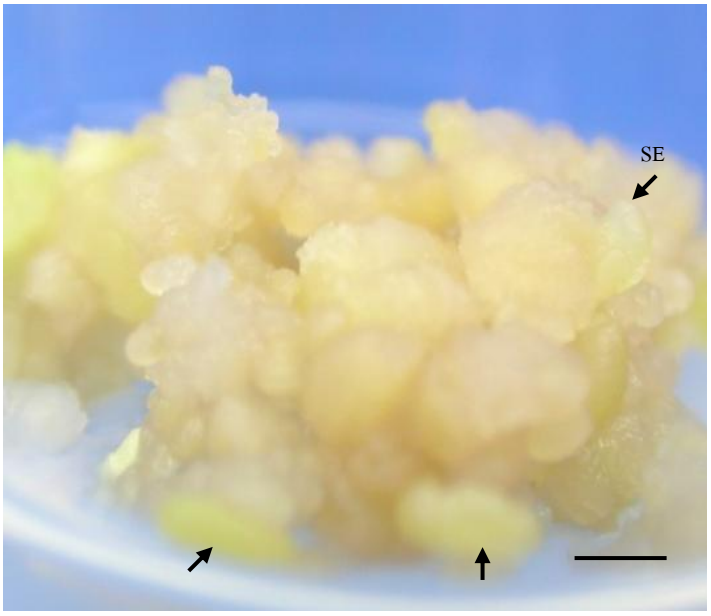
บทที่ 3

ผล

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

1.1 การชักนำ และเพิ่มปริมาณ EC

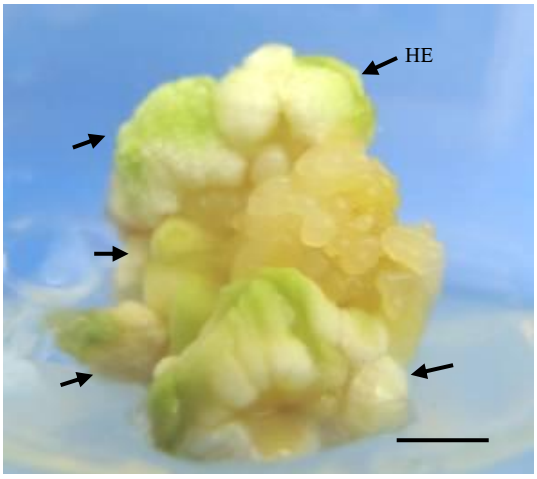
การเพาะเลี้ยง EC บนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ โดยย้ายเลี้ยงทุกเดือน เป็นเวลา 3 เดือน ให้การเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของก้อนแคลลัส 0.2 เซนติเมตร แคลลัสมีสีน้ำตาลอ่อน และให้ SE เฉลี่ยสูงถึง 16.55 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง (ภาพที่ 5) ลักษณะของ EC ที่เกิดขึ้นมีโครงสร้างกลม ขนาดเล็ก สีเหลือง



ภาพที่ 5 ลักษณะการพัฒนาของ SE (ศรชี้) บนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)

1.2 การชักนำ HE

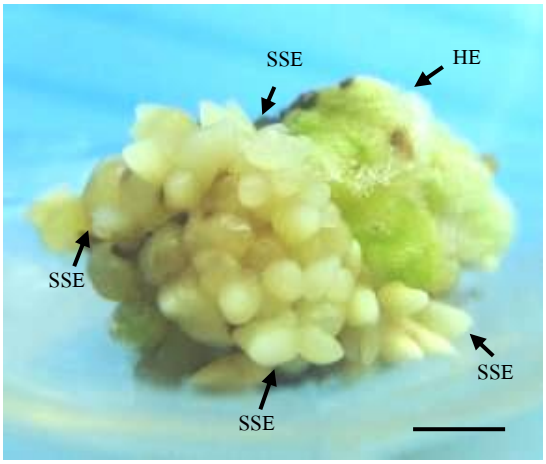
เมื่อย้าย EC ที่มี SE รวมอยู่ด้วย ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ส่งเสริมการสร้างเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (HE) ได้ จำนวน HE ที่สร้างเฉลี่ยสูงสุด 9 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง ลักษณะของ HE ที่เกิดขึ้นมีโครงสร้างไม่แน่นอนและมีสีเขียว (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ลักษณะของ HE (ศรชี้) จากการเพาะเลี้ยง EC บนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)

1.3 การชักนำ SSE

จากการนำ HE มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า HE เริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น และสร้าง SSE จำนวนมาก เฉลี่ย 20 SSE ต่อ HE แต่ยังไม่เกิด ยอดและราก (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ลักษณะของ SSE หลังจากเพาะเลี้ยง HE บนอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2โมลาร์ เป็นเวลา 3 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)

2. ศึกษาการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์โดยสารโคลชิซิน และออรีซาลิน

2.1 ผลของโคลชิซิน และออรีซาลินต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

2.1.1 วิธีการการจุ่มแช่

ผลของโคลชิซิน และออรีซาลินต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของ SSE เมื่อย้ายกลุ่มของ SSE ที่พัฒนาบน HE ซึ่งผ่านการจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน และออรีซาลินความเข้มข้นต่างๆ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน พบว่าชิ้นส่วนที่ได้รับสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 80 68.78 56.22 และ 50.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 70.11 57.33 48.66 และ 42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อให้สารเป็นเวลานานขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง 41 26.55 12.11 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยเฉลี่ย พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE ลดลง หลังจากจุ่มแช่ด้วยโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้น และการให้สารเป็นระยะเวลานานขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 1) เมื่อวิเคราะห์ค่า LD_{50} ในแต่ละความเข้มข้น และเวลาต่างๆ พบว่า ค่า LD_{50}

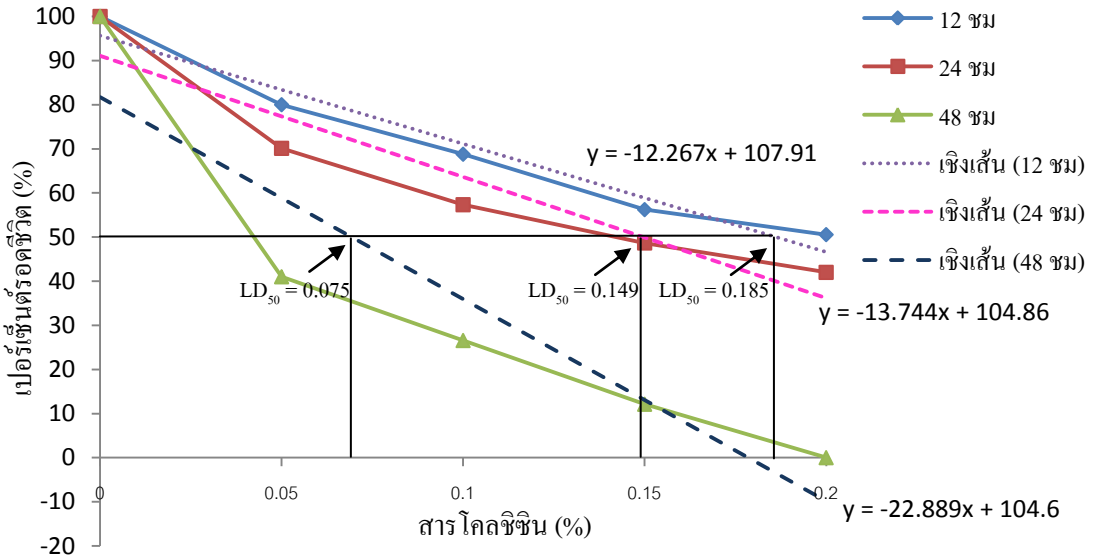
สำหรับการจุ่มแช่โคลชิซิน 12 24 และ 48 ชั่วโมงคือ 0.185 0.149 และ 0.075 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้น (ปัจจัย A) และระยะเวลาการจุ่มแช่สารโคลชิซิน (ปัจจัย B) ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (n=30)

โคลชิซิน (%)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ± SE หลังจากจุ่มแช่เป็นเวลา			เฉลี่ย	F-test (A)
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง		
0	100.00±0.00 a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00A	
0.05	80.00±2.27b	70.11±1.72c	41.00±1.90f	63.70±4.13B	
0.10	68.78±2.45c	57.33±2.38d	26.55±2.25g	50.89±4.33C	**
0.15	56.22±2.06d	48.66±1.99e	12.11±1.89h	38.99±4.02D	
0.20	50.56±1.95e	42.00±2.03f	0.00±1.61i	30.85±4.06E	
เฉลี่ย	71.11±4.27A	63.62±4.57B	35.93±5.62C		
F-test (B)		**			
F-test (AXB)		**			
C.V. (%)		6.704			

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 8 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของ SSE ที่จุ่มแช่ด้วยโคลชิซินความเข้มข้นและเวลาต่างๆ หลัง จากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน

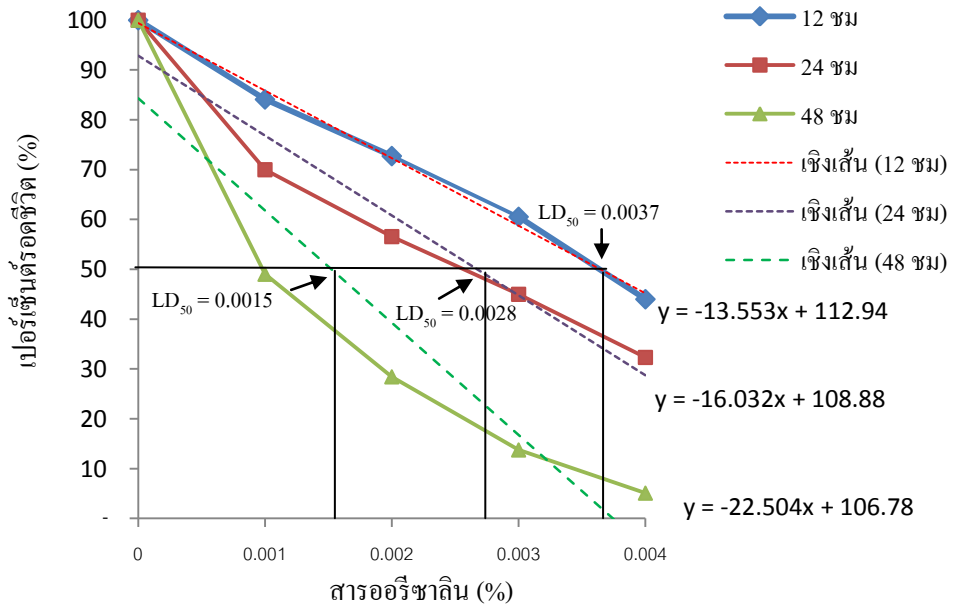
สำหรับการจุ่มแช่ SSE ในสารออรีซาลิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายชิ้นส่วนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน พบว่าชิ้นส่วนที่ได้รับสารออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.001 0.002 0.003 และ 0.004 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 84.11 72.74 60.54 และ 44.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการให้สารที่ความเข้มข้นเดียวกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 70.00 56.58 45.00 และ 32.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อให้สารเป็นเวลานานขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 49.03 28.44 13.77 และ 5.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยเฉลี่ย พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE ลดลง หลังจากจุ่มแช่ด้วยออรีซาลินความเข้มข้นสูงขึ้น และการให้สารเป็นระยะเวลานานขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 2) เมื่อวิเคราะห์ค่า LD_{50} ในแต่ละความเข้มข้น และเวลาต่างๆ นั้น พบว่าค่า LD_{50} จากการจุ่มแช่ออรีซาลิน เป็นเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงคือ 0.0015 0.0028 และ 0.0037 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้น (ปัจจัย A) และระยะเวลาการจุ่มแช่สารออรีซาลิน (ปัจจัย B) ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (n=30)

ออรีซาลิน	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ± SE หลังจากจุ่มแช่เป็นเวลา			เฉลี่ย	F-test
(%)	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง		(A)
0	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00A	
0.001	84.11±2.32b	70.00±2.09c	49.03±2.03f	61.71±3.83B	
0.002	72.74±2.13c	56.58±2.85e	28.44±2.21i	52.59±4.33C	**
0.003	60.54±2.48d	45.00±2.20g	13.77±1.93j	39.77±4.43D	
0.004	44.02±2.07g	32.34±1.606h	5.11±1.73k	27.16±4.01E	
เฉลี่ย	72.28±4.50A	60.78±4.90B	39.27±5.85C		
F-test (B)		**			
F-test (AXB)		**			
C.V. (%)		7.75			

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 9 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของ SSE ที่จุ่มแช่ด้วยออรีซาลินความเข้มข้น และเวลาต่างๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน

2.1.2 การเททับด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซิน และออรีซาลิน

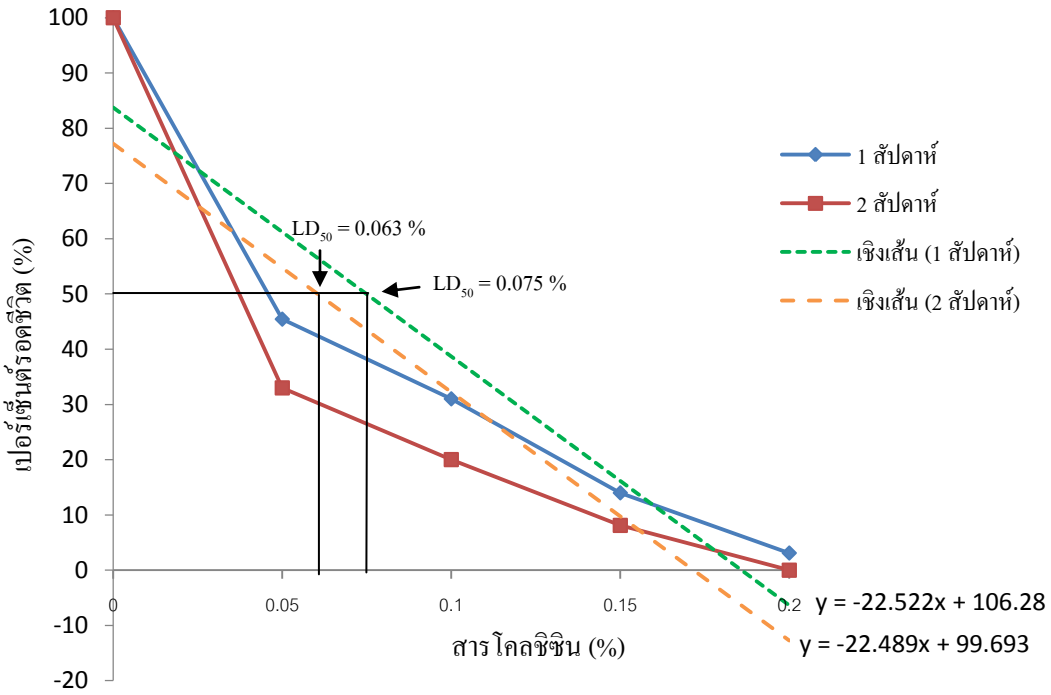
ผลของการเททับด้วยอาหารเหลวที่เติมโคลชิซิน และออรีซาลิน ความเข้มข้นต่างๆ บนชิ้นส่วน HE ที่พัฒนาให้ SSE ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ชิ้นส่วนที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 45.44 31.02 14.00 และ 3.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการให้สารที่ความเข้มข้นเดียวกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 33.00 20.20 8.11 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยเฉลี่ย พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE ลดลง หลังจากเททับด้วยโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้น และการให้สารเป็นระยะเวลานานขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์ค่า LD_{50} ของชิ้นส่วน SSE ที่จุ่มแช่โคลชิซิน เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ ให้ค่า 0.063 และ 0.075 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 3 ผลของความเข้มข้น (ปัจจัย A) และระยะเวลาการเททับด้วยอาหารเหลวที่เติมโคลชิซิน (ปัจจัย B) ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (n=30)

โคลชิซิน (%)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ± SE หลังจากเททับอาหารเหลวเติมโคลชิซินเป็นเวลา		เฉลี่ย	F-test (A)
	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์		
0	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00A	
0.05	45.44±0.53b	33.00±1.00c	39.22±2.63B	
0.10	31.02±1.23d	20.20±0.51e	25.61±2.48C	**
0.15	14.00±0.24f	8.11±0.39g	11.05±1.80D	
0.20	3.11±0.56h	0.00±0.00i	1.55±1.33E	
เฉลี่ย	38.71±5.91A	32.26±6.07B		
F-test (B)	**			
F-test (AXB)	**			
C.V. (%)	1.692			

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของ SSE ที่เททับด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซินความเข้มข้น และเวลาต่างๆ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน

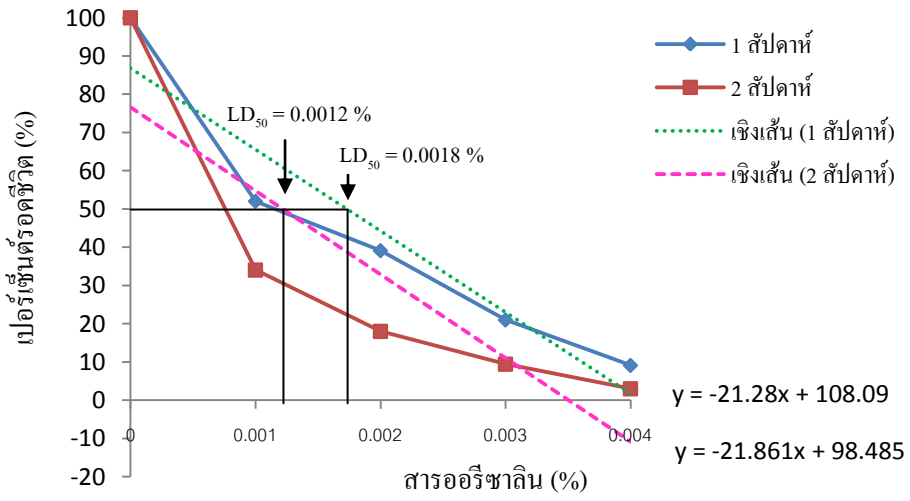
สำหรับผลของการเททับด้วยอาหารเหลวที่เติมออรีซาลินความเข้มข้นต่างๆ บนชิ้นส่วน HE ที่มี SSE ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน พบว่าชิ้นส่วนที่ได้รับสารออรีซาลินความเข้มข้น 0.001 0.002 0.003 และ 0.004 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 52.02 39.11 21.00 และ 9.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการให้สารที่ความเข้มข้นเดียวกัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 34.05 18.02 9.44 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยเฉลี่ย พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE ลดลง หลังจากเททับด้วยออรีซาลินความเข้มข้นสูงขึ้น และการให้สารเป็นระยะเวลานานขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 4) เมื่อวิเคราะห์ค่า LD_{50} ในแต่ละความเข้มข้นและเวลาต่างๆ นั้น พบว่าค่า LD_{50} สำหรับการเททับด้วยออรีซาลิน เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์คือ 0.0012 และ 0.0018 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 11)

ตารางที่ 4 ผลของความเข้มข้น (ปัจจัย A) และระยะเวลาการเททับด้วยอาหารเหลวที่เติมออรีซาลิน (ปัจจัย B) ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ SSE หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (n=30)

ออรีซาลิน (%)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ± SE หลังจากเททับอาหารเหลวเติมออรีซาลินเป็นเวลา		เฉลี่ย	F-test (A)
	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์		
0	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100±0.00A	
0.001	52.02± 1.00b	34.05±1.23d	43.03±3.12B	
0.002	39.11±0.31c	18.02±1.00f	28.56±3.40C	**
0.003	21.00±1.00e	9.44±0.75g	15.22±2.53D	
0.004	9.11±1.23g	3.00±0.00h	6.05±1.89E	
เฉลี่ย	44.25±5.70A	32.90±6.03B		
F-test (B)		**		
F-test (AXB)		**		
C.V. (%)		2.318		

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤ 0.01)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

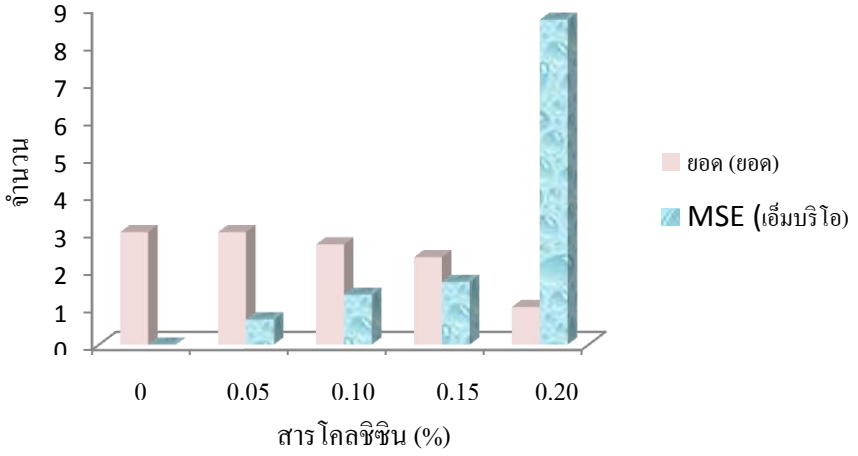


ภาพที่ 11 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของ SSE ที่เททับด้วยอาหารเหลวเติมออ-รีซาลินความเข้มข้นต่างๆ แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน

2.2 ผลของโคลชิซิน และออรีซาลินต่อการเจริญ และการพัฒนาของต้นกล้า

2.2.1 โคลชิซิน

การพัฒนาเป็นต้นกล้าของชิ้นส่วน HE ที่มี SSE ที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ นั้น หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน พบว่าโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง เกิดการพัฒนาเป็นยอด ใบ และรากได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอด ใบ และรากเฉลี่ย 4 ยอด 2.34 ใบ และ 2.87 รากต่อ SSE ตามลำดับ ส่วนโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง เกิดโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ (mature somatic embryo : MSE) เพิ่มจำนวนมากที่สุด 14 เอ็มบริโอต่อ SSE (ตารางที่ 5) จากการพิจารณาผลของความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาการให้สารโดยเฉลี่ย ต่อการพัฒนาเป็นยอด และ MSE พบว่าการพัฒนาเป็นยอดลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เมื่อความเข้มข้นโคลชิซินเพิ่มขึ้น และเกิด MSE จำนวนมากขึ้นหลังจากจุ่มแช่ด้วยโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้น โดยโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ ให้ MSE เฉลี่ยมากที่สุด คือ 8.67 เอ็มบริโอ (ภาพที่ 12) นอกจากนี้ยอดของต้นกล้าที่ผ่านการจุ่มแช่โคลชิซิน มีลักษณะบวม ซีด และชิ้นส่วนที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้นสูง ระยะเวลานาน ส่งผลให้เนื้อเยื่อไหม้ ตาย และบางชิ้นส่วนไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นกล้าได้ (ภาพที่ 13-15)



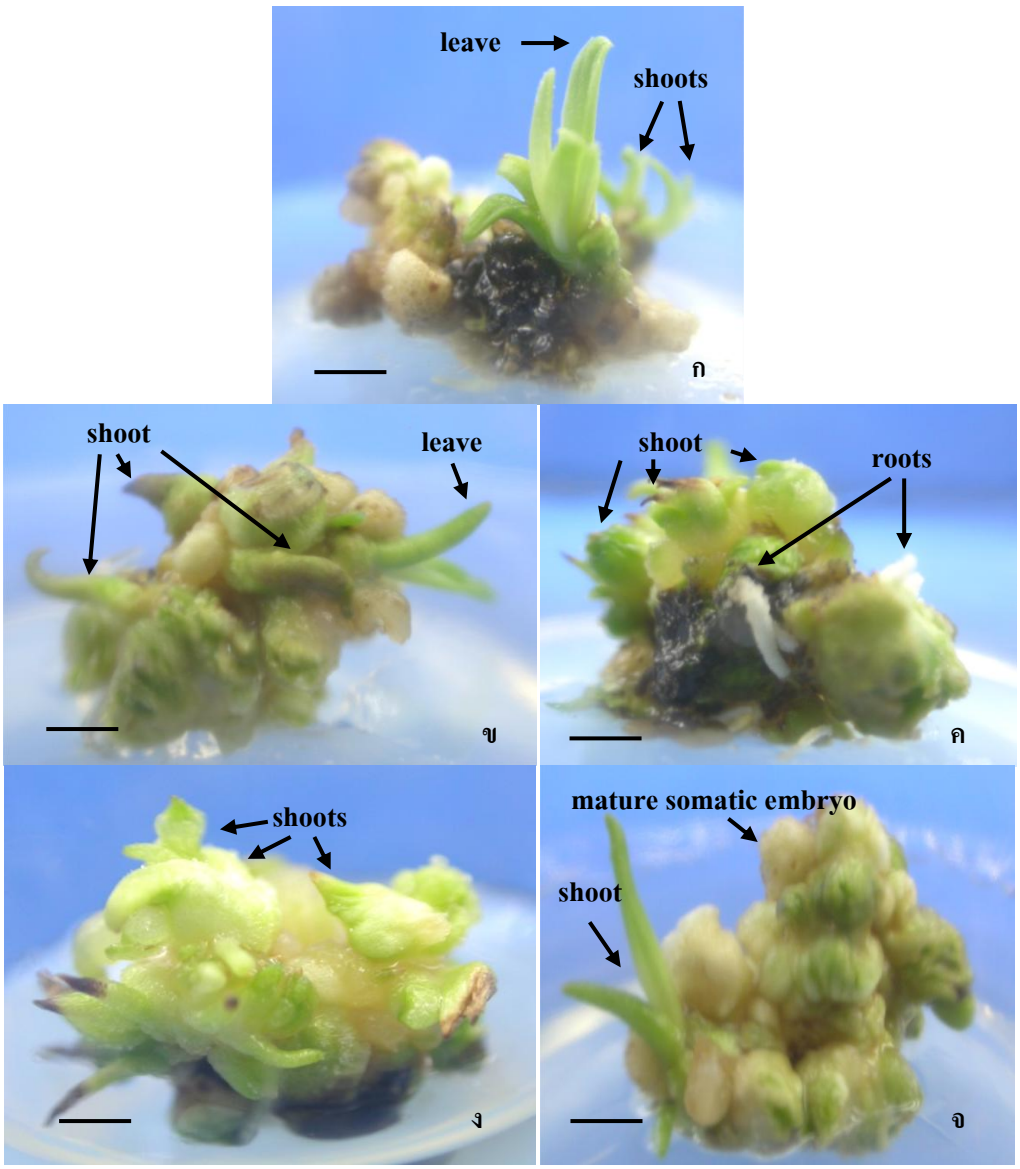
ภาพที่ 12 พัฒนาการของยอด และ MSE จาก SSE ที่จุ่มแช่ด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เฉลี่ยจาก 3 ระยะเวลา (12 24 และ 48 ชั่วโมง) แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน

ตารางที่ 5 จำนวนยอด ใบ ราก และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ที่พัฒนาจาก SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่โคลชิซินที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน

โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชม.)	จำนวนยอด ± SE (ยอด)	จำนวนใบ ± SE (ใบ)	จำนวนราก ± SE (ราก)	จำนวน MSE ± SE (เอ็มบริโอ)
0.00	0	3 ± 0.00ab	4 ± 0.00a	0b	0e
	เฉลี่ย	3 ± 0.00A	4 ± 0.00A	0B	0D
0.05	12	3± 0.00ab	2 ± 0.00b	0b	2 ± 0.00d
	24	3 ± 1.00ab	2 ± 0.00b	0b	0e
	48	3 ± 0.00ab	2 ± 0.00b	0b	0e
	เฉลี่ย	3 ± 0.71A	2 ± 0.71B	0B	0.67 ± 1.00C
0.10	12	4 ± 0.00a	2.34 ± 0.76b	2.67 ± 0.76a	4 ± 1.00c
	24	2 ± 1.00b	2 ± 0.00b	0b	0e
	48	2 ± 1.00b	2 ± 0.00b	0b	0e
	เฉลี่ย	2.67 ± 1.11A	2 ± 0.58B	0.89 ± 1.17A	1.33 ± 1.44BC
0.15	12	2 ± 0.00ab	0c	0b	3 ± 1.00cd
	24	2 ± 0.00b	0c	0b	2 ± 0.00d
	48	2 ± 0.00b	0c	0b	0e
เฉลี่ย		2.33 ± 0.71A	0D	0B	1.67 ± 1.19B
0.20	12	3 ± 0.00ab	2 ± 0.00b	0b	12 ± 1.00b
	24	0c	0c	0b	14 ± 1.00a
	48	0c	0c	0b	0e
เฉลี่ย		1 ± 1.22B	0.67 ± 1.00C	0B	8.67 ± 2.57A
F-test		**	**	**	**
C.V. (%)		20.83	30.00	18.62	19.49

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 13 พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)

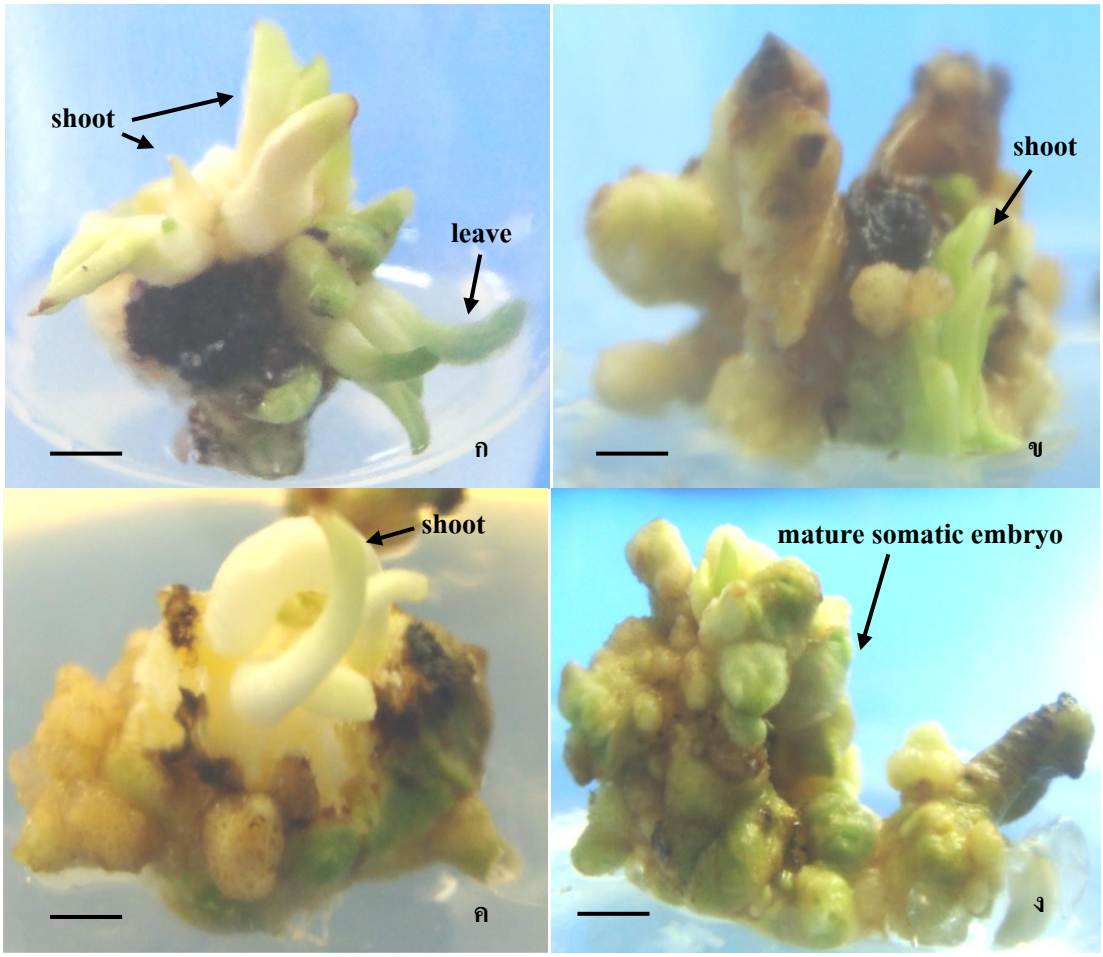
ก. ต้นกล้าที่พัฒนาจาก SSE ที่ไม่ได้แช่โคลชิซิน (ชิ้นส่วนควบคุม)

ข. ยอด และใบที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์

ค. ยอด และรากที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์

ง. ยอด ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์

จ. ยอด และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์



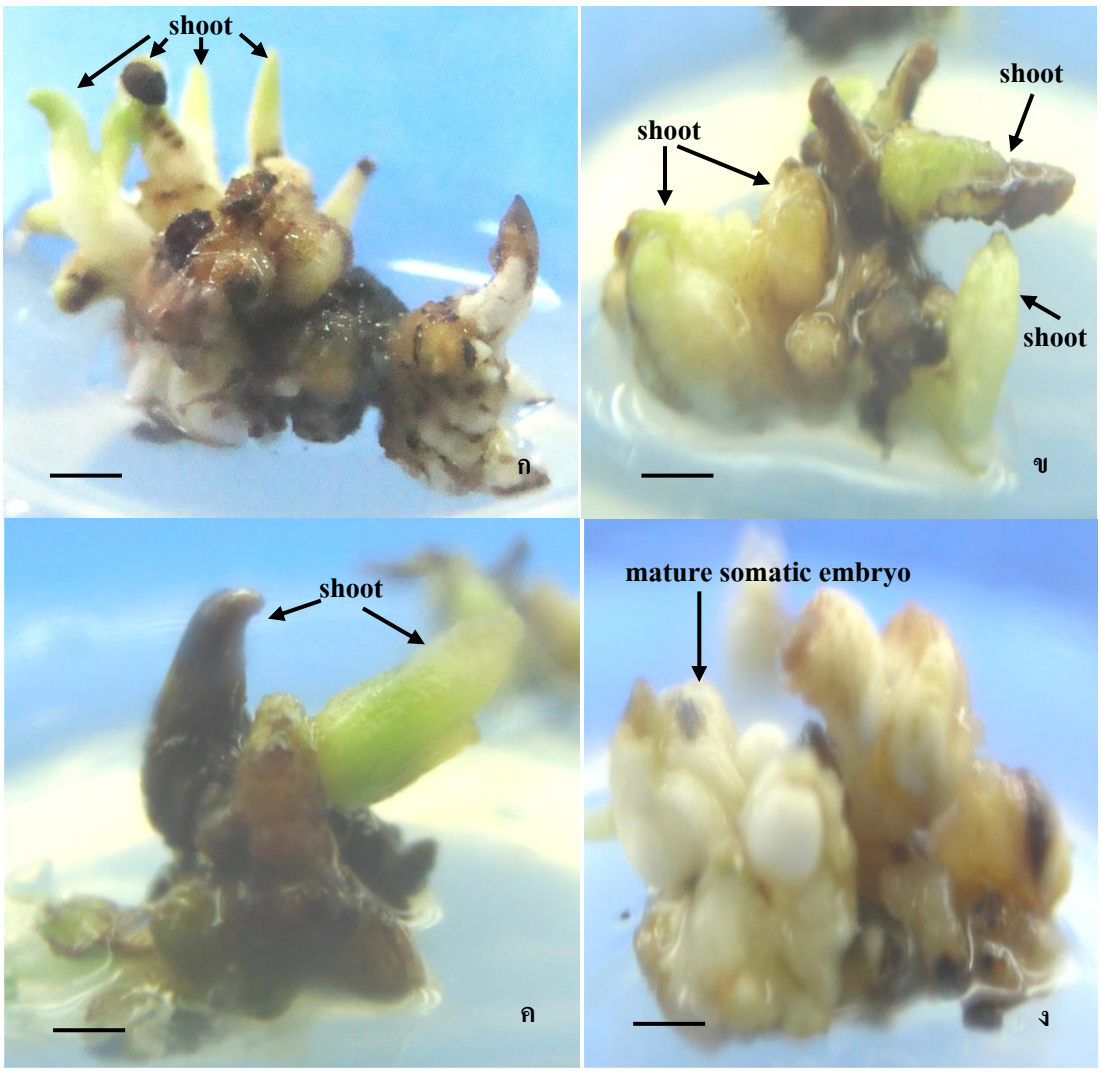
ภาพที่ 14 พัฒนาการ SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)

ก. ยอด และใบที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์

ข. ยอด ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์

ค. ยอด ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์

ง. โซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 15 พัฒนาการ SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)

ก. ยอด ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์

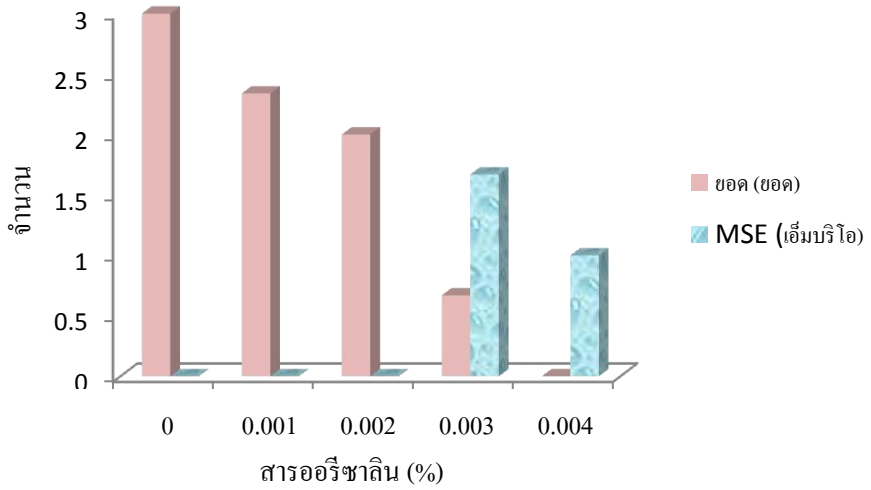
ข. ยอดที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์

ค. ยอด ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์

ง. โซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 ออรีซาลิน

การพัฒนาเป็นต้นกล้าของ HE ที่มี SSE ที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลายออรีซาลิน ที่ระดับความเข้มข้น และให้ระยะเวลาต่างๆ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ออรีซาลินทุกความเข้มข้นไม่เกิดราก ส่วนออรีซาลินความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ให้การพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุด 3 ยอด ต่อ SSE และชิ้นส่วนที่สามารถพัฒนา และสร้างใบได้ คือ ออรีซาลินความเข้มข้น 0.001 และ 0.002 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ให้ 2 ใบต่อต้นกล้า สำหรับออรีซาลินความเข้มข้น 0.003 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง เกิดโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่เพิ่มจำนวนมากที่สุด 5 เอ็มบริโอต่อ SSE แต่ไม่พัฒนาเป็นยอด รากและใบ (ตารางที่ 6) จากการพิจารณาผลของความเข้มข้นของออรีซาลิน และระยะเวลาการให้สารโดยเฉลี่ยต่อการพัฒนาเป็นยอด และ MSE พบว่าการพัฒนาเป็นยอดลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เมื่อจุ่มแช่ด้วยออรีซาลินความเข้มข้นสูงขึ้น และเกิด MSE จำนวนเฉลี่ยมากที่สุดเมื่อทรีตด้วยออรีซาลินความเข้มข้น 0.003 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเกิด MSE ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อจุ่มแช่ด้วยออรีซาลินความเข้มข้นสูงขึ้น (ภาพที่ 16) ชิ้นส่วนที่ผ่านการแช่สารออรีซาลินทุกความเข้มข้น มีลักษณะบวม ซีด การพัฒนาเป็นยอด และใบลดลงเมื่อได้รับออรีซาลินระดับความเข้มข้นสูงขึ้น และให้เวลานานขึ้น ภาพที่ (17-19)

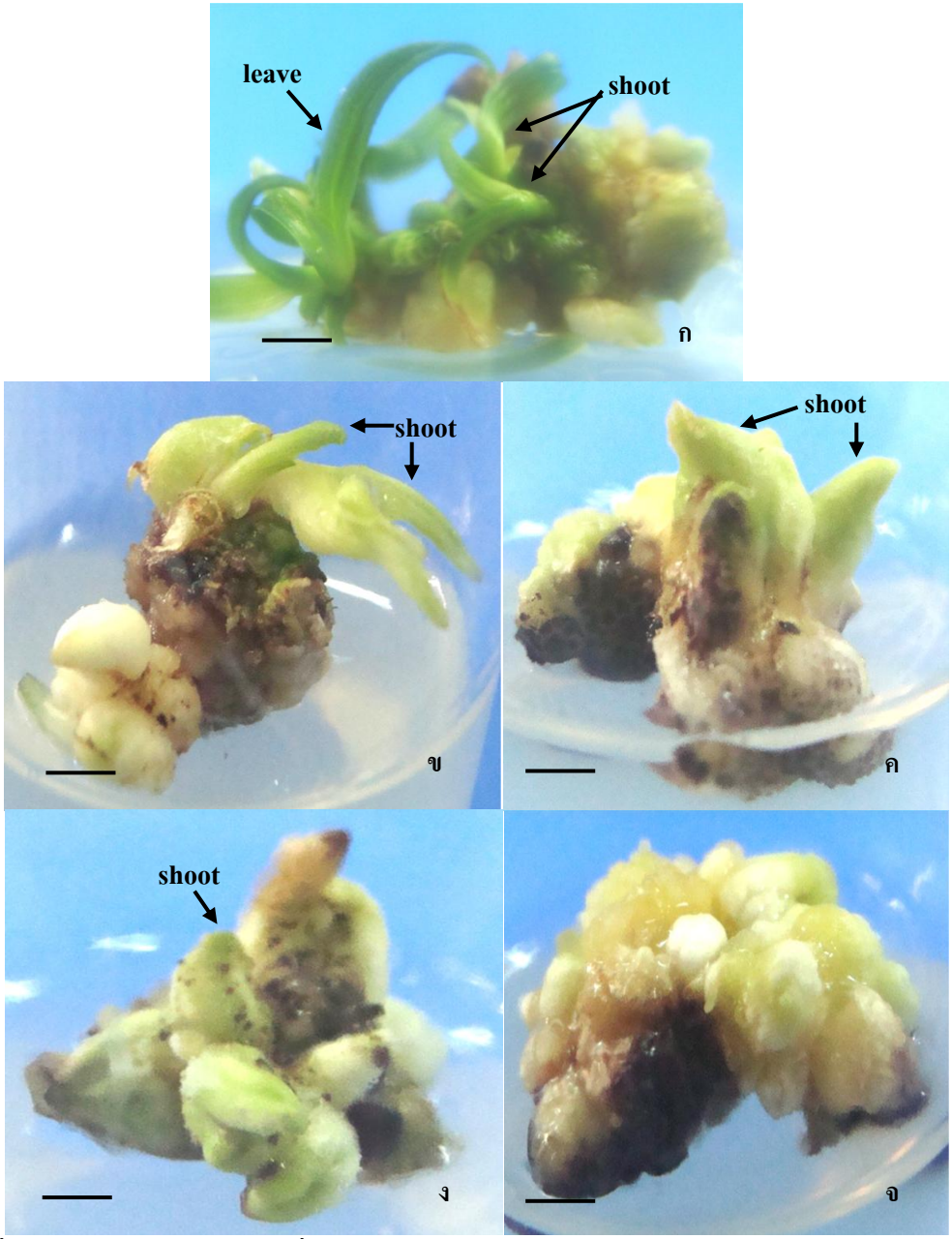


ภาพที่ 16 พัฒนาการของยอด และ MSE จาก SSE ที่จุ่มแช่ด้วยออรีซาลินความเข้มข้นต่างๆ เฉลี่ยจาก 3 ระยะเวลา (12 24 และ 48 ชั่วโมง) แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนยอด ใบ ราก และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ของชิ้นส่วน SSE ที่ รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ออรีซาลินที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน

ออรีซาลิน (%)	ระยะเวลา (ชม.)	จำนวนยอด (ยอด)	จำนวนใบ (ใบ)	จำนวนราก (ราก)	จำนวน MSE (เอ็มบริโอ)
0.00	0	3 ± 0.00a	4 ± 00a	0	0c
	เฉลี่ย	3 ± 0.00A	4 ± 00A	0	0C
0.001	12	3 ± 1.00a	2 ± 1.00b	0	0c
	24	2 ±1.00b	2 ± 0.00b	0	0c
	48	2 ± 0.00b	0c	0	0c
	เฉลี่ย	2.34 ± 0.84B	1.34 ± 1.06B	0	0C
0.002	12	2 ± 0.00b	2 ± 0.00b	0	0c
	24	1 ± 0.00b	0c	0	0c
	48	2 ± 0.00b	0c	0	0c
	เฉลี่ย	2 ± 0.00B	0.67 ± 1.00C	0	0C
0.003	12	2 ± 0.00b	0c	0	0c
	24	0c	0c	0	5 ± 1.00a
	48	0c	0c	0	0c
	เฉลี่ย	0.67 ± 1.00C	0D	0	1.67 ± 1.60A
0.004	12	0c	0c	0	0c
	24	0c	0c	0	3 ± 0.00b
	48	0c	0c	0	0c
	เฉลี่ย	0D	0D	0	1 ± 1.22B
F-test		**	**	-	*
C.V. (%)		20.04	36.07	-	45.09

** , * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 17 พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ด้วยออรีซาลินเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)

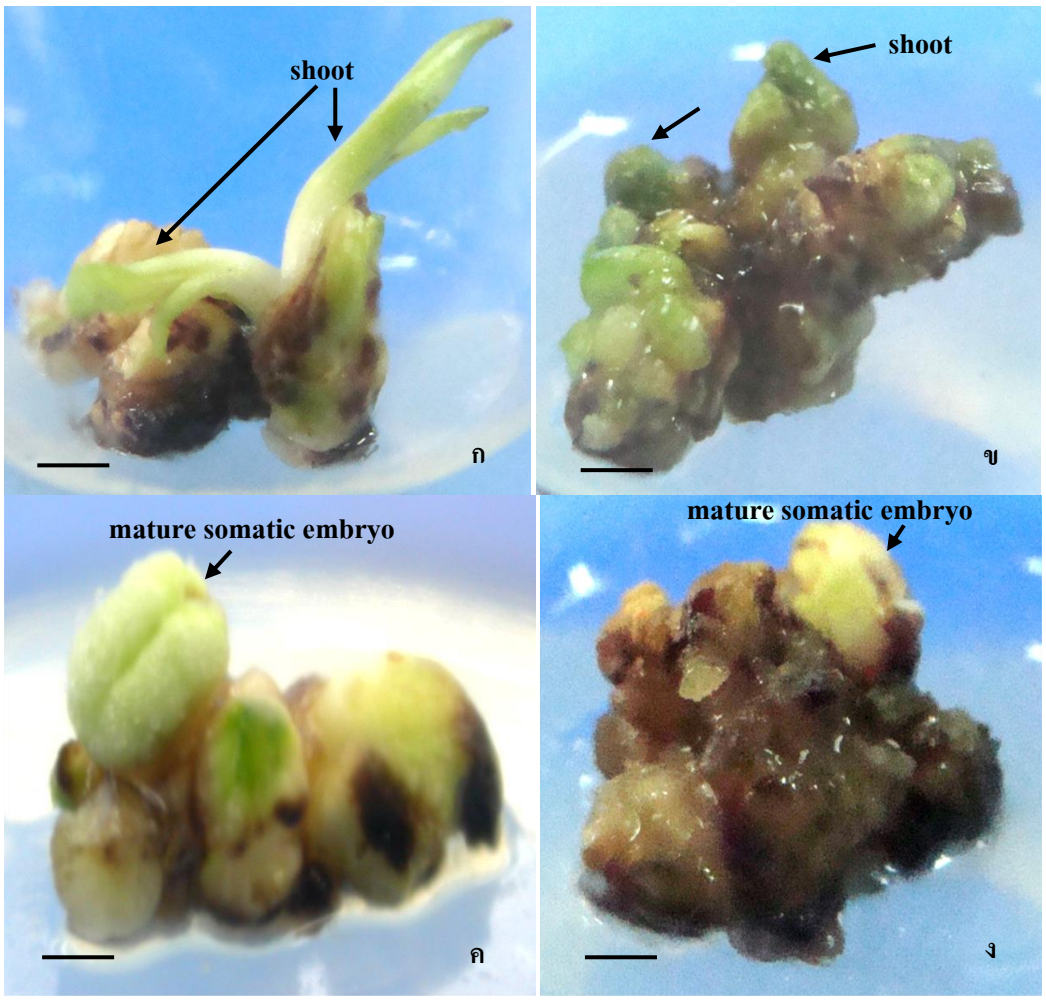
ก. ต้นกล้าที่พัฒนาจาก SSE ที่ไม่ได้แช่ออรีซาลิน (ชิ้นส่วนควบคุม)

ข. ยอดที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่ออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์

ค. ยอดที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่ออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.002 เปอร์เซ็นต์

ง. ยอดที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่ออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.003 เปอร์เซ็นต์

จ. SSE ที่แช่ออรีซาลินความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์



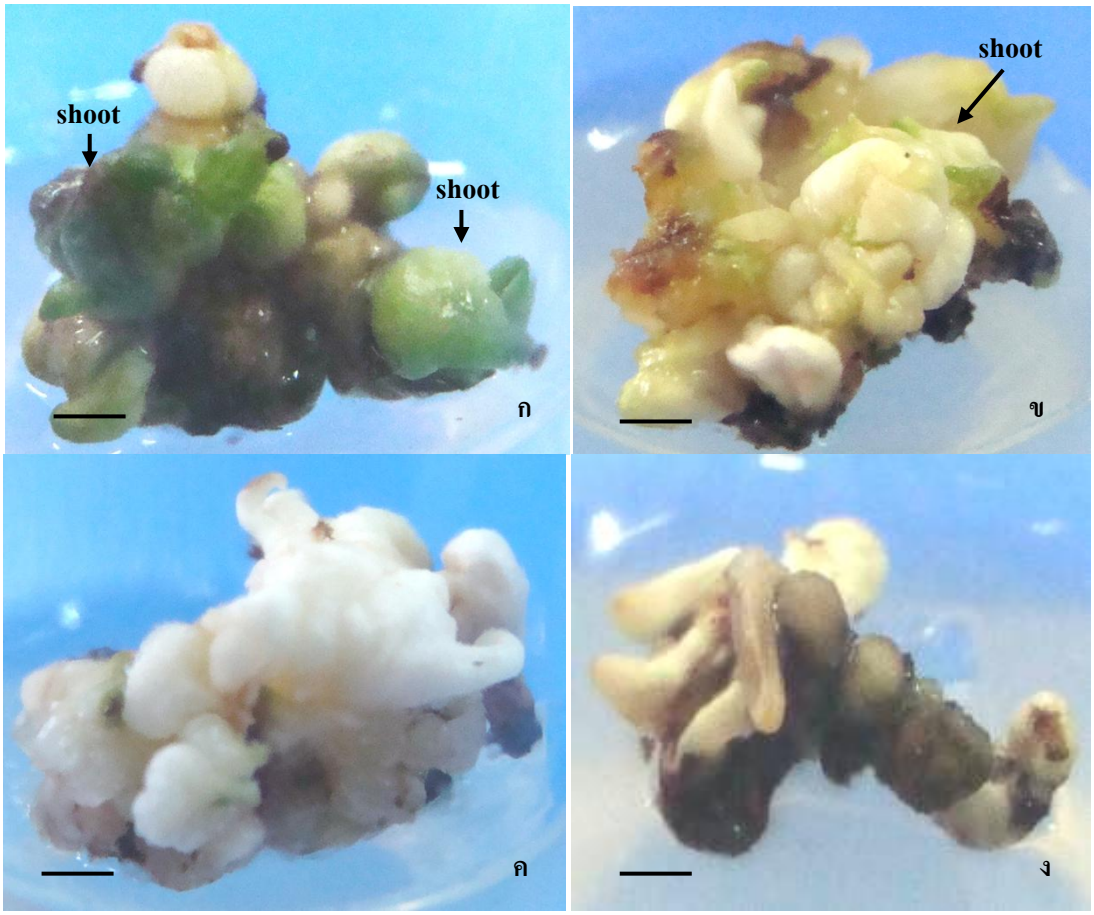
ภาพที่ 18 พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ด้วยออรีซาลินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)

ก. ยอด ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่ออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์

ข. ยอด ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่ออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.002 เปอร์เซ็นต์

ค. โซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่ออรีซาลินความเข้มข้น 0.003 เปอร์เซ็นต์

ง. โซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่ออรีซาลินความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 19 พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่ด้วยออรีซาลินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)

ก. ยอด ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่ออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์

ข. ยอด ที่พัฒนาจาก SSE ที่แช่ออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.002 เปอร์เซ็นต์

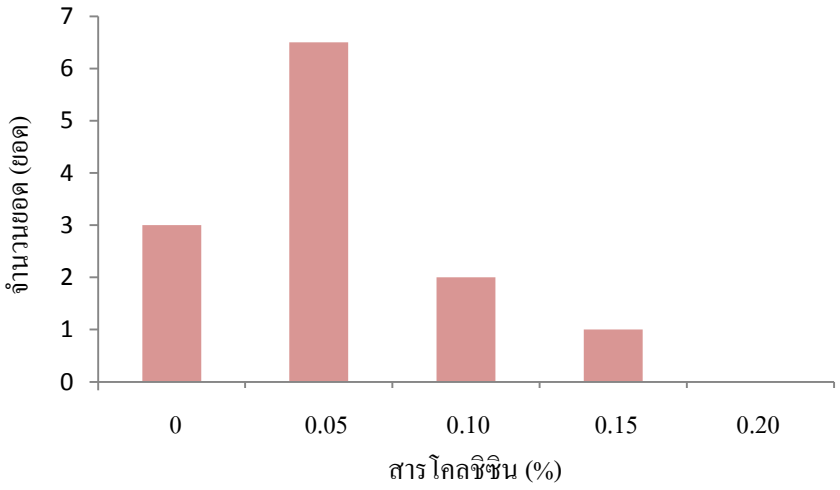
ค. SSE ที่แช่ออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.003 เปอร์เซ็นต์

ง. SSE ที่แช่ออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์

2.3 ผลของการเททับด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซิน และออรีซาลิน ต่อการเจริญ และการพัฒนาของต้นกล้า

2.3.1 โคลชิซิน

การพัฒนาเป็นต้นกล้าของ SSE ที่เททับด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารละลายโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน จากการพิจารณาผลของความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาการให้สารโดยเฉลี่ยต่อการพัฒนาเป็นยอด พบว่าการพัฒนาเป็นยอดลดลงเมื่อเททับด้วยโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 6.5 ยอด หลังจากเททับด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 20) และโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 2 สัปดาห์ ให้การพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุด 8 ยอด ต่อ SSE แต่ไม่เกิดใบ และราก โดยยอดมีสีเขียวเข้ม รูปร่างแบนคล้ายใบ และที่ความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 1 สัปดาห์ ยอดสามารถพัฒนาเป็นใบได้ 2 ใบต่อต้นกล้า นอกจากนี้การให้สารโคลชิซินด้วยวิธีการเททับทุกระดับความเข้มข้น ไม่ส่งเสริมการสร้างราก และเอ็มบริโอระยะสุกแก่ (ตารางที่ 7 และ ภาพที่ 21-22)



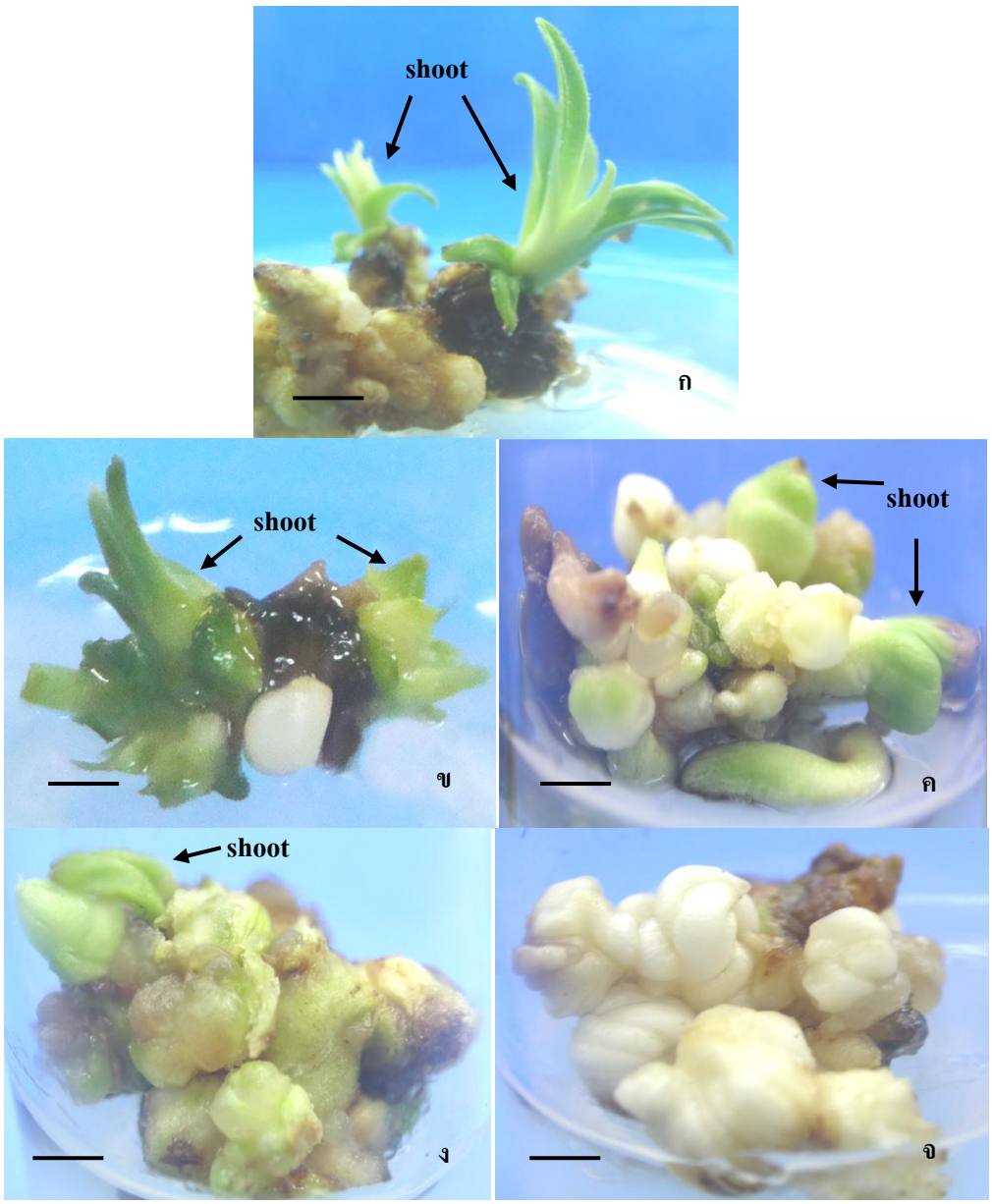
ภาพที่ 20 พัฒนาการของยอด จาก SSE ที่เททับด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เฉลี่ยจาก 2 ระยะเวลา (1 และ 2 สัปดาห์) แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน

ตารางที่ 7 จำนวนยอด ใบ ราก และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ที่พัฒนาจาก SSE ที่รอดชีวิตบนอาหารที่เททับด้วยโคลชิซิน ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน

โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (สัปดาห์)	จำนวนยอด ± SE (ยอด)	จำนวนใบ ± SE (ใบ)	จำนวนราก (ราก)	จำนวน MSE (เอ็มบริโอ)
0.00	0	3 ± 0.00c	4 ± 1.00a	0	0
	เฉลี่ย	3 ± 0.00B	4 ± 1.00A	0	0
0.05	1	5 ± 1.00b	2 ± 0.00b	0	0
	2	8 ± 1.00a	0c	0	0
	เฉลี่ย	6.5 ± 1.37A	1 ± 1.05B	0	0
0.10	1	3 ± 0.00c	0c	0	0
	2	1 ± 0.00de	0c	0	0
	เฉลี่ย	2 ± 1.05C	0C	0	0
0.15	1	2 ± 0.00cd	0c	0	0
	2	0e	0c	0	0
	เฉลี่ย	1 ± 1.04D	0C	0	0
0.20	1	0e	0c	0	0
	2	0e	0c	0	0
	เฉลี่ย	0E	0C	0	0
F-test		**	**	-	-
C.V. (%)		19.27	19.97	-	-

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 21 พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการเททับด้วยอาหารเหลว เติมโคลชิซินเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)

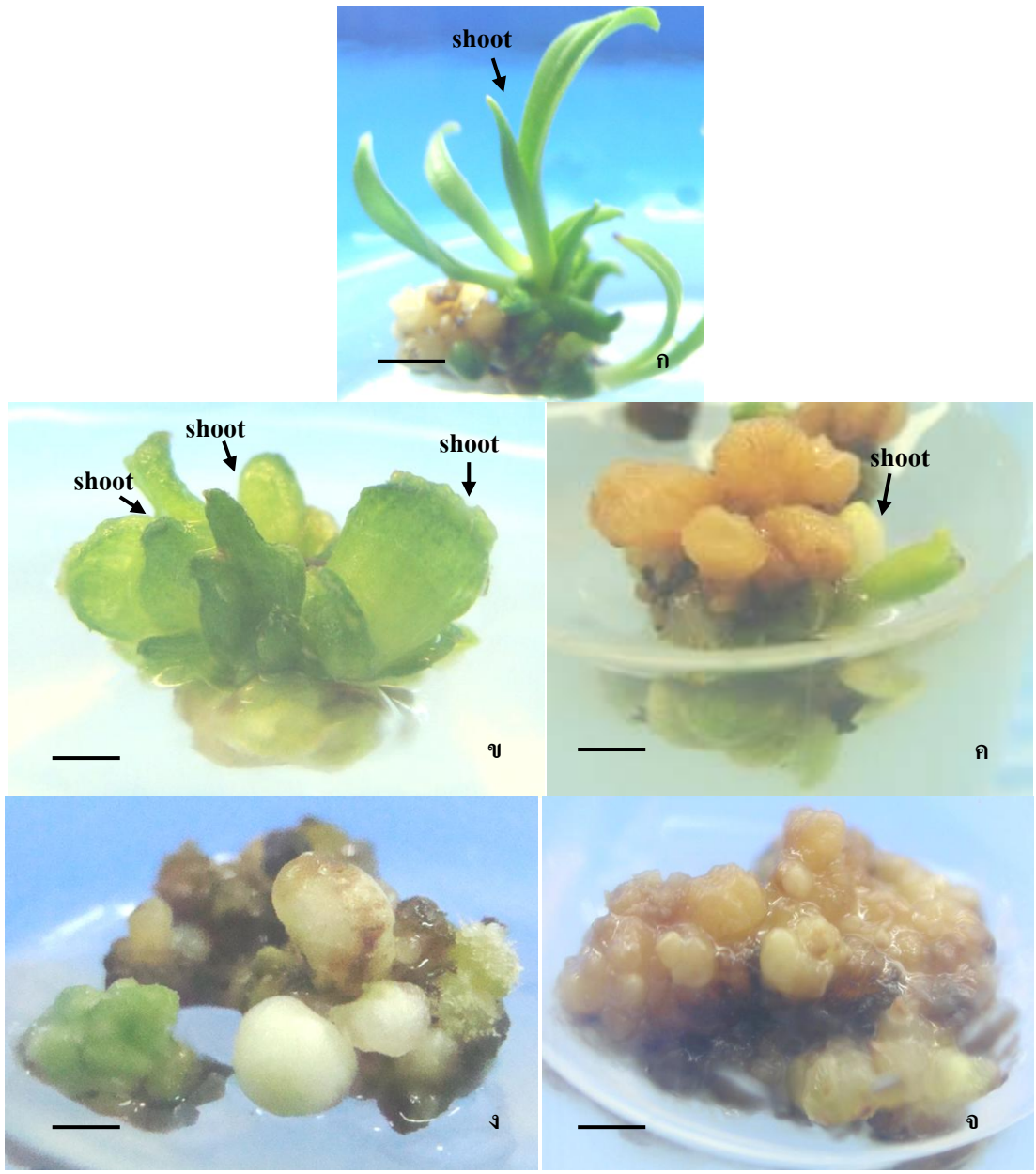
ก. เททับด้วยอาหารเหลวที่ปราศจากโคลชิซิน (ชุดควบคุม)

ข. เททับด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์

ค. เททับด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์

ง. เททับด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์

จ. เททับด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 22 พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการเททับด้วยอาหารเหลว เติมโคลชิซินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)

ก. เททับด้วยอาหารเหลวที่ปราศจากโคลชิซิน (ชุดควบคุม)

ข. เททับด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์

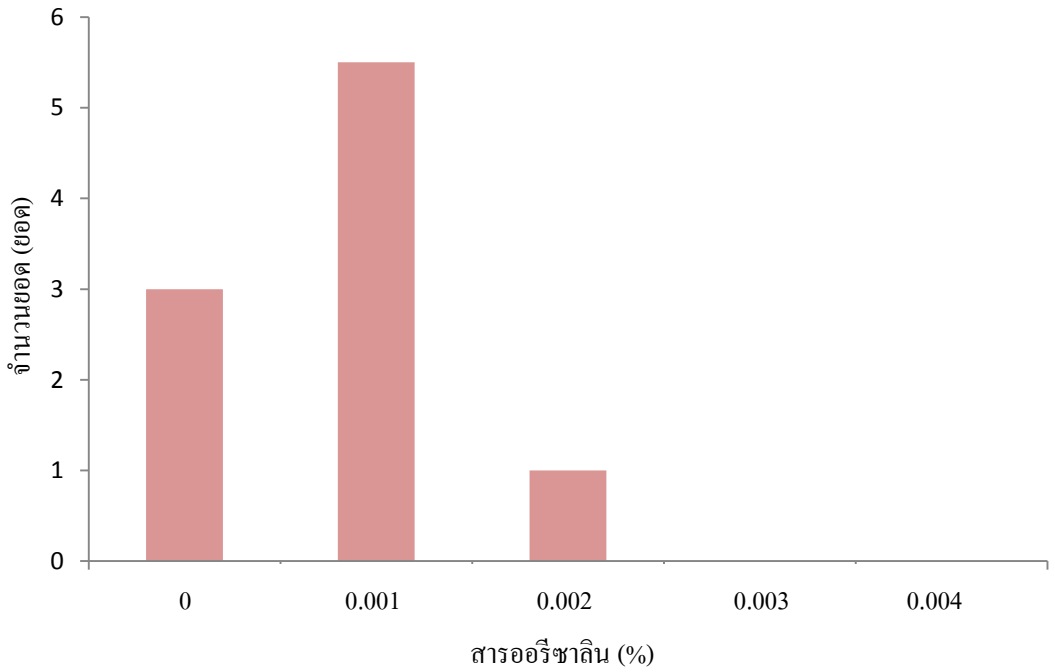
ค. เททับด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์

ง. เททับด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์

จ. เททับด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์

2.3.2 ออรีซาลิน

การพัฒนาเป็นต้นกล้าจาก SSE ที่เททับด้วยอาหารเหลวสูตร MS เติมสารละลายออรีซาลิน ระดับความเข้มข้น และให้ระยะเวลาต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน จากการพิจารณาผลของความเข้มข้นของออรีซาลิน และระยะเวลาการให้สารโดยเฉลี่ยต่อการพัฒนาเป็นยอด พบว่าการพัฒนาเป็นยอดลดลงเมื่อเททับด้วยออรีซาลินความเข้มข้นสูงขึ้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 5.5 ยอด หลังจากเททับด้วยออรีซาลินความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 23) และออรีซาลินความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ให้การพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุด คือ 10 ยอด ต่อ SSE อย่างไรก็ตามไม่พบการสร้างใบและราก โดยยอดมีรูปร่างยาว ขนาดเล็ก คล้ายใบ ส่วนออรีซาลินความเข้มข้นเดียวกัน ที่เวลา 2 สัปดาห์ ให้ยอดเพียง 1 ยอด ต่อ SSE ยอดสามารถพัฒนาเป็นใบได้ 2 ใบ ต่อต้นกล้า มีสีเขียวเข้มขนาดใหญ่ มีลักษณะม้วนเข้าหาชิ้นส่วน SSE นอกจากนี้ยังพบว่าออรีซาลินทุกระดับความเข้มข้น ไม่ส่งเสริมการสร้าง ราก และ เอ็มบริโอระยะสุกแก่ (ตารางที่ 8 และ ภาพที่ 24-25)



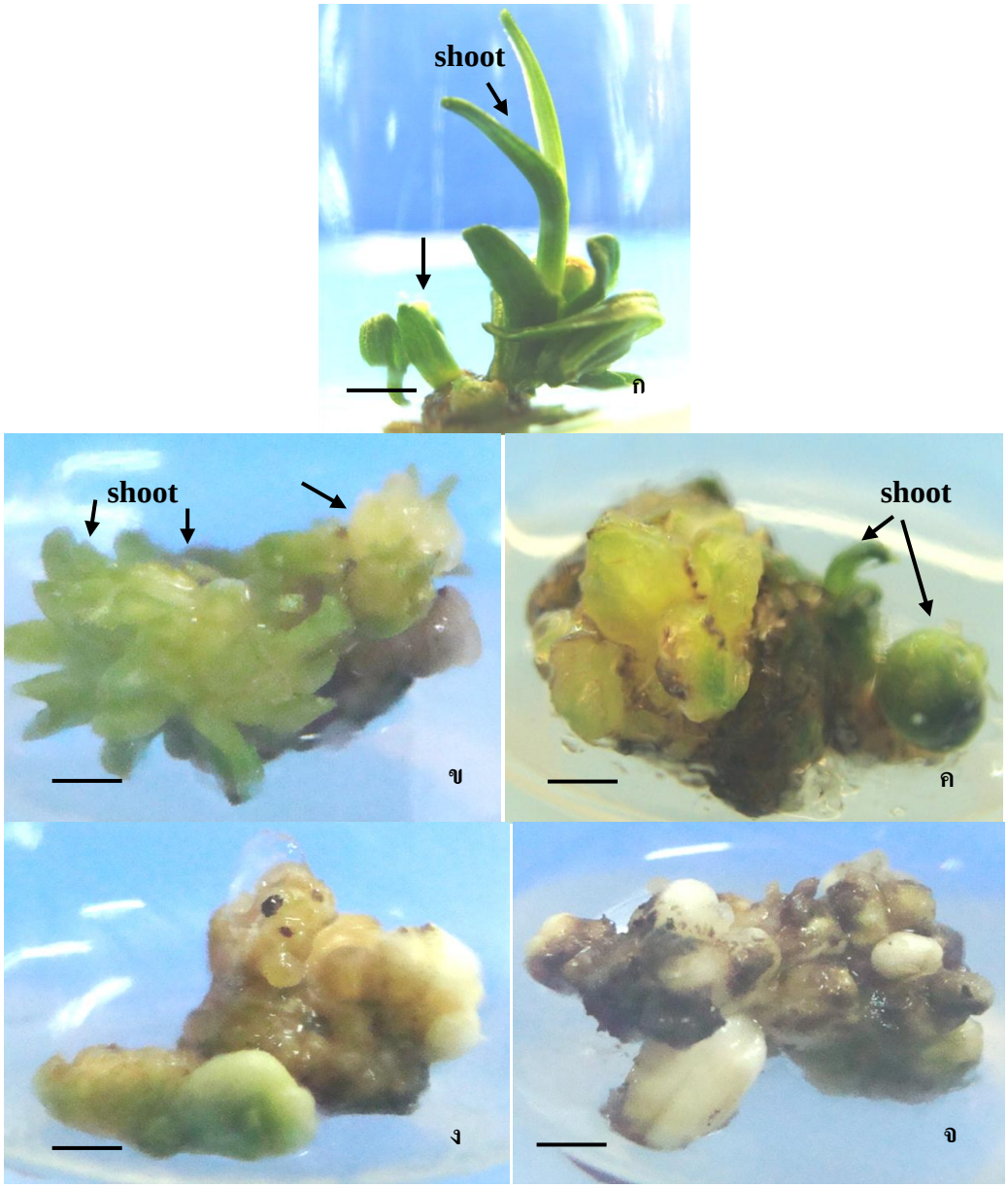
ภาพที่ 23 พัฒนาการของยอด จาก SSE ที่เททับด้วยสารละลายออรีซาลินความเข้มข้นต่างๆ เฉลี่ยจาก 2 ระยะเวลา (1 และ 2 สัปดาห์) แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน

ตารางที่ 8 จำนวนยอด ใบ ราก และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ที่พัฒนาจาก SSE ที่รอดชีวิตจากการเททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลิน ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน

ออรีซาลิน (%)	ระยะเวลา (สัปดาห์)	จำนวนยอด ± SE (ยอด)	จำนวนใบ ± SE (ใบ)	จำนวนราก (ราก)	จำนวน MSE (เอ็มบริโอ)
0.00	0	3 ± 0.00b	4 ± 1.00a	0	0
	เฉลี่ย	3 ± 00B	4 ± 1.00A	0	0
0.001	1	10 ± 1.00a	2 ± 0.00b	0	0
	2	1 ± 0.00d	1 ± 0.00c	0	0
	เฉลี่ย	5.5 ± 2.23A	1.5 ± 0.74B	0	0
0.002	1	2 ± 0.00c	0d	0	0
	2	0e	0d	0	0
	เฉลี่ย	1 ± 0.00C	0C	0	0
0.003	1	0e	0d	0	0
	2	0e	0d	0	0
	เฉลี่ย	0D	0C	0	0
0.004	1	0e	0d	0	0
	2	0e	0d	0	0
	เฉลี่ย	0E	0C	0	0
F-test		**	**	-	-
C.V. (%)		14.99	33	-	-

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 24 พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการเททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลินเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)

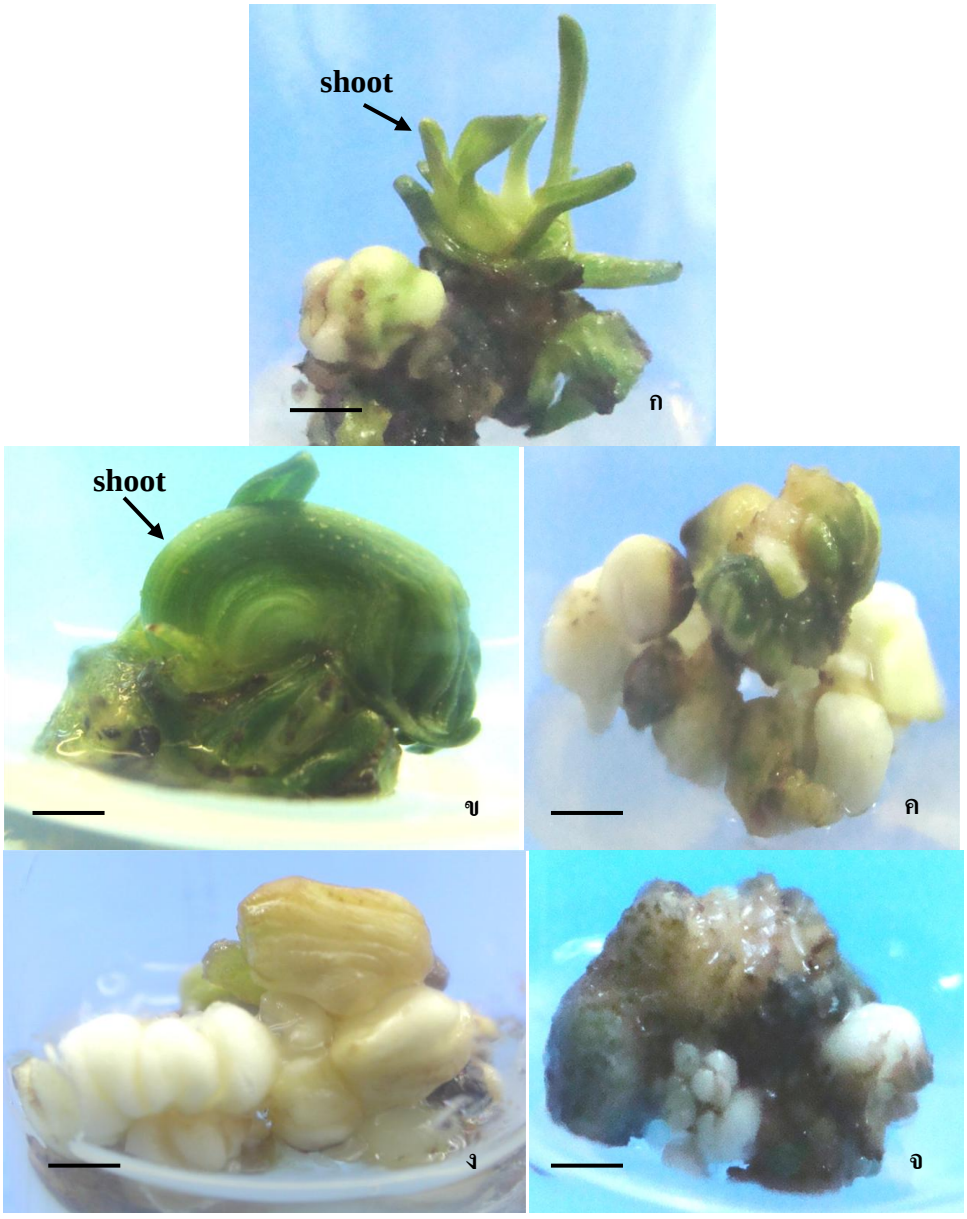
ก. เททับด้วยอาหารที่ไม่เติมออรีซาลิน (ชุดควบคุม)

ข. เททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์

ค. เททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.002 เปอร์เซ็นต์

ง. เททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.003 เปอร์เซ็นต์

จ. เททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 25 พัฒนาการของ SSE ที่รอดชีวิตจากการเททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ 4 มิลลิเมตร)

ก. เททับด้วยอาหารที่ไม่เติมออรีซาลิน (ชุดควบคุม)

ข. เททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์

ค. เททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.002 เปอร์เซ็นต์

ง. เททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.003 เปอร์เซ็นต์

จ. เททับด้วยอาหารเหลวเติมออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์

3. การศึกษาลักษณะพืชดิพลอยด์ และพอลิพลอยด์ในหลอดทดลอง

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.1.1 ใบ

จากการจุ่มแช่ SSE ในอาหารเหลวที่เติมสารโคลชิซิน และออรี-ซาลินที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยย้ายเลี้ยงบนอาหารเดิมทุกเดือน เป็นเวลา 12 เดือน จึงคัดเลือกต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่คาดว่ามีลักษณะทางสัณฐานต่างๆ คงที่ มาศึกษาลักษณะภายนอกของต้นกล้าเปรียบเทียบกับต้นควบคุม พบว่าต้นกล้าที่ผ่านการแช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นควบคุม (ภาพที่ 26) ใบมีสีเขียวเข้มกว่า โดยเฉพาะกลุ่มที่แช่สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีใบหนาขึ้น (ภาพที่ 27 ก, ข) ใบมีขนสีน้ำตาลซึ่งมองเห็นด้วยตาเปล่าไม่ชัดเจน แต่เมื่อส่องดูภายใต้กล้อง SEM จะเห็นโครงสร้างดังกล่าวได้ชัดเจน (ภาพที่ 28 ก, ข) ขนาดของใบสั้น มีสีเขียวเข้มมากที่สุด (ภาพที่ 28 ค) จากการเปรียบเทียบขนาดใบของต้นควบคุม และต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) คือ ต้นควบคุมให้ความกว้าง และความยาวของใบ 0.92 และ 9.27 เซนติเมตร ส่วนต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ความกว้าง และความยาวของใบ 1.52 และ 3.59 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามขนาดใบของต้นที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุม (ตารางที่ 9) สำหรับชิ้นส่วนที่ได้รับสารออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ SSE มีการพัฒนาคล้ายใบและยอด แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เมื่อนำชิ้นส่วนที่พัฒนาคล้ายใบอ่อนมาตรวจสอบระดับพลอยดีด้วยโฟลไซโทเมทรี พบว่าต้นกล้าดังกล่าวเป็นเททระพลอยด์ (ภาพที่ 29)

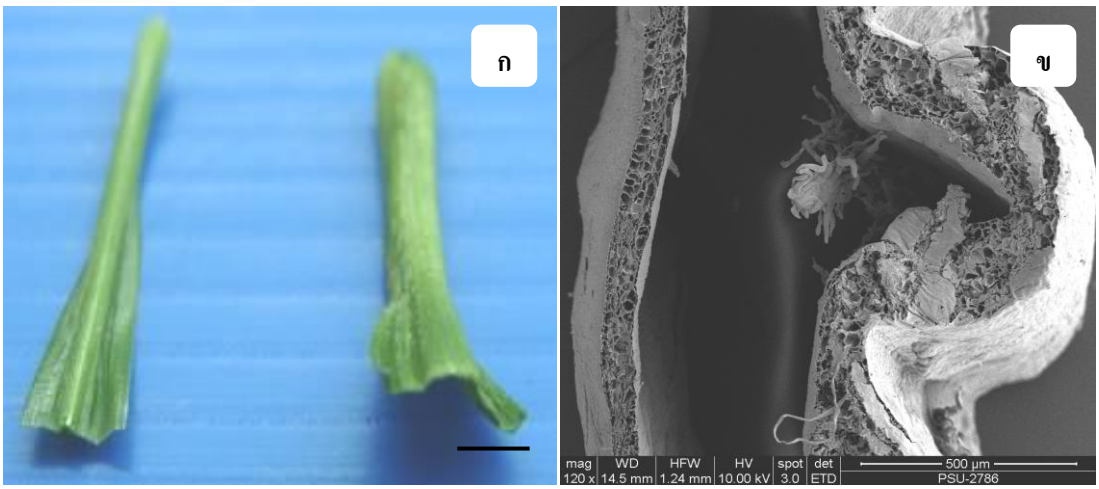
ตารางที่ 9 ความกว้าง ความยาวของใบ ของต้นควบคุม และต้นที่ผ่านการแช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 12 เดือน

โคลชิซิน	เวลา	ขนาดของใบ	
(%)	(ชม.)	ความกว้าง (ซม.) ± SE	ความยาว (ซม.) ± SE
0	0	0.92 ± 0.04b	9.27 ± 0.51a
0.10	12	0.86 ± 0.05b	8.36 ± 0.39a
0.20	24	1.52 ± 0.24a	3.59 ± 0.29b
F-test		**	**
C.V. (%)		11.53	18.25

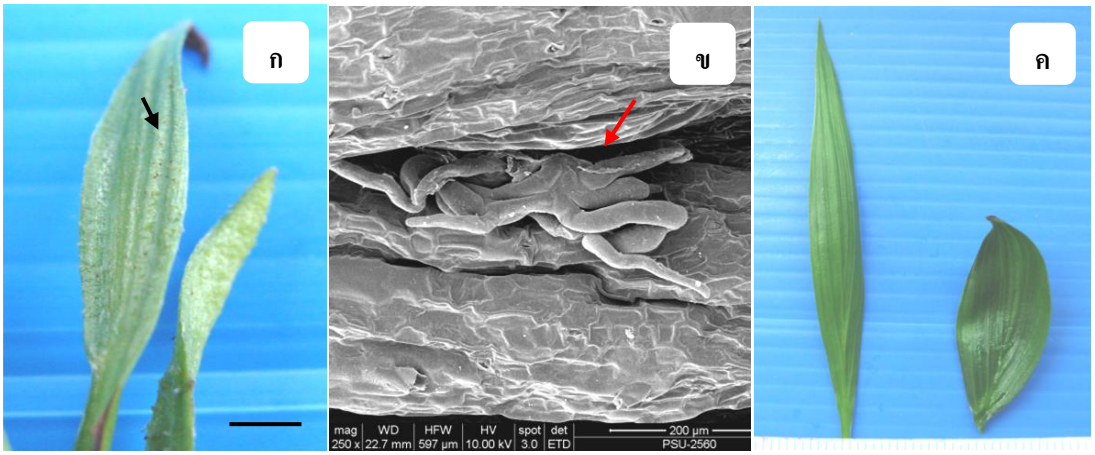
**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

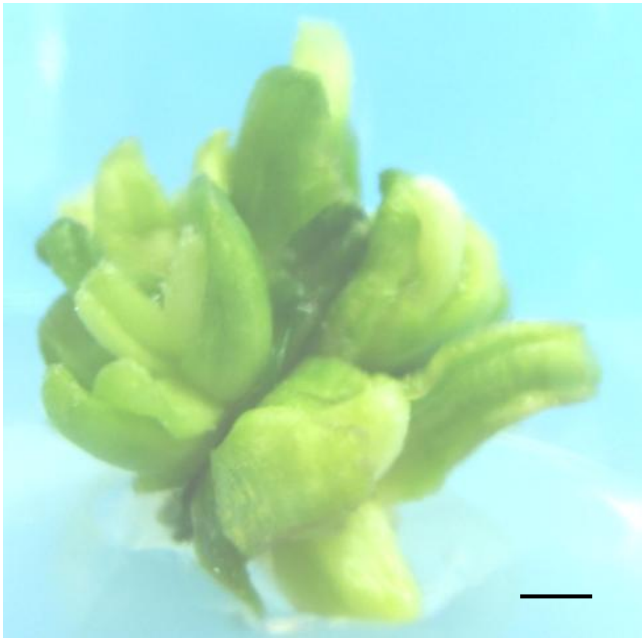
ภาพที่ 26 การเจริญเติบโตของต้นกล้าปาล์มน้ำมันต้นควบคุม (ซ้าย) ต้นที่ผ่านการแช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (กลาง) และความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ขวา) หลังจากย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)



ภาพที่ 27 ความหนาของใบจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันชุดควบคุม (ก ซ้าย) และกล้อง SEM (ข ซ้าย) และต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก ขวา และ ข ขวา) หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)

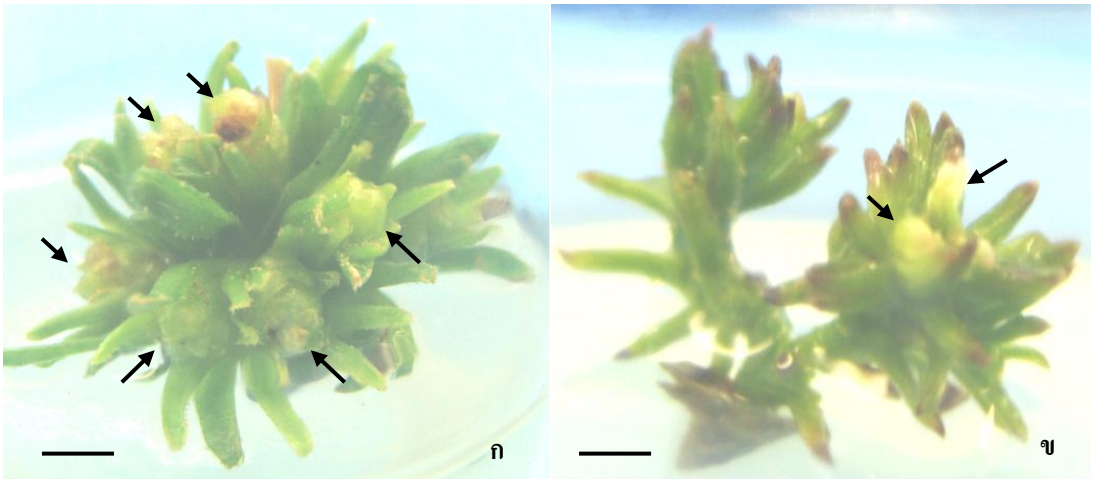


ภาพที่ 28 ใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีขนสีน้ำตาล (ศรชี้ ก และ ข) ใบสั้น และมีสีเขียวเข้ม (ค ขวา) เมื่อเปรียบเทียบกับใบของต้นควบคุม (ค ซ้าย) ต้นดังกล่าวเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)

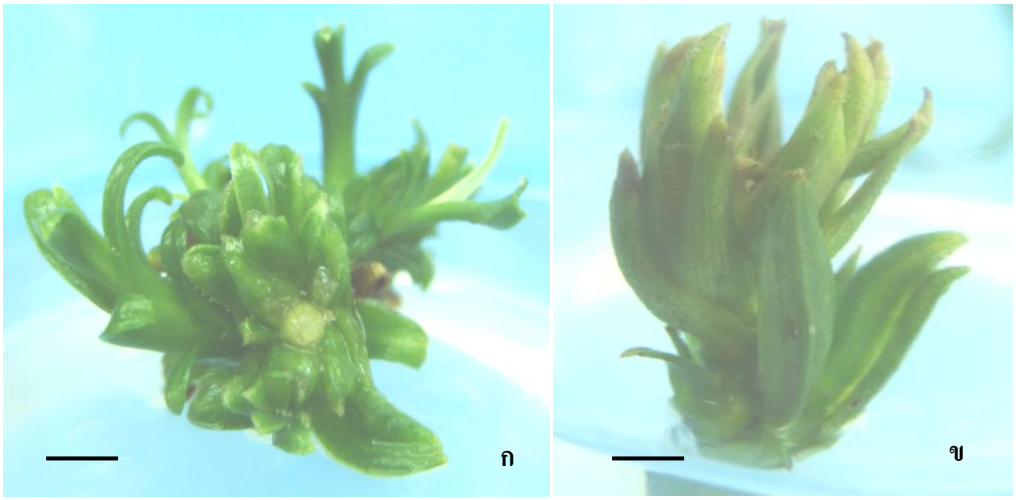


ภาพที่ 29 ลักษณะของ SSE ที่มีลักษณะคล้าย ใบ และยอด แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นกล้า หลังจากได้รับสารออรีซาลินความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)

สำหรับการเททับด้วยอาหารเหลวที่เติมสารโคลชิซิน และออรีซาลินที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ บน SSE จากนั้นย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมทุกเดือน เป็นเวลา 12 เดือน พบว่าต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ให้ใบเรียว สั้น ขนาดเล็กมาก มีการพัฒนาเนื้อเยื่อ ที่มีลักษณะคล้ายดอก (ภาพที่ 30 ก) เช่นเดียวกับต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 30 ข) อย่างไรก็ตามต้นกล้าชะงักการเจริญเติบโต และตายหลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน ต้นกล้าที่ได้รับออรีซาลินความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ให้ต้นกล้าขนาดเล็ก มีใบหนา ใบมีสีเขียวเข้ม แต่ต้นกล้าชะงักการเจริญเติบโต และตาย หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือน (ภาพที่ 31 ก) ส่วนต้นกล้าที่ได้รับออรีซาลินความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีลักษณะคล้ายช่อดอกเพศผู้ (ภาพที่ 31 ข) และต้นตายหลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน นอกจากนี้ชิ้นส่วนที่ได้รับสารโคลชิซิน และออรีซาลินความเข้มข้นอื่นๆ ชะงักการเจริญเติบโต และไม่พัฒนาเป็นต้นกล้า โดยชิ้นส่วนทั้งหมดตายหลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน



ภาพที่ 30 ต้นกล้าที่พัฒนาจาก SSE ซึ่งผ่านการเททับด้วยโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลาต่างๆ มีการพัฒนาคล้ายดอก (ศรชี้) หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)
ก. ได้รับโคลชิซิน เป็นเวลา 1 สัปดาห์
ข. ได้รับโคลชิซิน เป็นเวลา 2 สัปดาห์



ภาพที่ 31 ต้นกล้าที่พัฒนาจาก SSE ซึ่งผ่านการเททับด้วยออรีซาลิน ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลาต่างๆ
ก. ได้รับออรีซาลิน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)
ข. ได้รับออรีซาลิน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)

3.1.2 ราก

เมื่อย้ายต้นกล้าที่พัฒนาจาก SSE ที่ผ่านการจุ่มแช่โคลชิซิน ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ อายุ 12 เดือน ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำราก ซึ่งเป็นอาหารแข็งสูตร ARDA เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน คัดเลือกต้นที่มีรากจากแต่ละชุดการทดลองมาศึกษาลักษณะ และขนาดของราก พบว่ารากของต้นกล้าจากสิ่งทดลองที่ได้รับโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้รากสีขาวขุ่น ขนาดใหญ่ และสั้นกว่าต้นควบคุม (ภาพที่ 32 ก ขวา) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) กับต้นควบคุม ให้ความกว้าง และความยาว 0.12 x 1.30 เซนติเมตร รากต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ขนาด 0.24 x 0.64 เซนติเมตร (ตารางที่ 10) สำหรับรากของต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงนั้น ให้รากที่สั้นกว่า และใหญ่กว่าต้นควบคุมเล็กน้อย คือ 0.20 x 1.21 เซนติเมตร (ภาพที่ 32 ข) อย่างไรก็ตามขนาดของรากแตกต่างกับต้นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) นอกจากนี้พบรากที่มีลักษณะอวบ กลม สีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 32 ค) ในต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วย

ตารางที่ 10 ความกว้าง ความยาวของราก ของต้นควบคุม เปรียบเทียบกับต้นจากสิ่งทดลองที่ผ่านการแช่โคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ARDA เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำรากเป็นเวลา 1 เดือน

โคลชิซิน	เวลา	ขนาดของราก	
(%)	(ชม.)	ความกว้าง ± SE (ซม.)	ความยาว ± SE (ซม.)
0	0	0.12 ± 0.02c	1.30 ± 0.007a
0.10	12	0.20 ± 0.01b	1.21 ± 0.005b
0.20	24	0.24 ± 0.02a	0.64 ± 0.007c
F-test		**	**
C.V. (%)		4.53	5.21

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

ภาพที่ 32 รากของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 12 เดือน และย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ARDA ต่ออีกเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 0.2 เซนติเมตร)

ก. รากของต้นควบคุม (ซ้าย) และรากของต้นกล้าจากสิ่งทดลอง ที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ขวา)

ข. รากของต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ค. รากที่มีลักษณะอวบ กลม ของต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

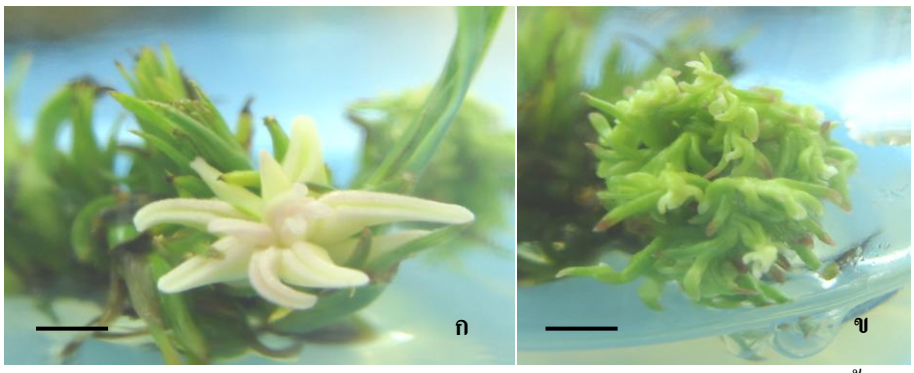
3.1.2 ดอก และผล

หลังจากย้ายเลี้ยงต้นกล้าบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 12 เดือน พบว่าต้นกล้าเกิดช่อดอกในหลอดทดลองจากโคลชิซิน 3 ความเข้มข้น คือ โคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และโคลชิซิน 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแยกเป็นต้นที่ให้ช่อดอกเพศผู้ และช่อดอกเพศเมีย จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์การออกดอกในหลอดทดลอง จากแต่ละสิ่งทดลองที่รอดชีวิต พบว่าโคลชิซิน 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เกิดช่อดอกมากที่สุด 20 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) รองลงมาเป็น โคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เกิดช่อดอก 6 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม โคลชิซิน 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เกิดช่อดอกในหลอดทดลองเพียง 1 ต้น แต่ให้เปอร์เซ็นต์การออกดอกสูงที่สุด เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำ จากการศึกษาลักษณะภายนอกของช่อดอกด้วยตาเปล่า และกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่าโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ให้ช่อดอกเพศเมียขนาดใหญ่ สีขาวอมชมพู (ภาพที่ 33 ก) และช่อดอกเพศผู้ สีเขียวอ่อน (ภาพที่ 33 ข) โคลชิซิน 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ช่อดอกเพศเมียสีขาว โดยเกิดช่อดอกจำนวนมาก (ภาพที่ 34) ส่วนโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ช่อดอกเพศเมียสีขาวขนาดใหญ่ (ภาพที่ 35 ก) และให้ช่อดอกเพศผู้สีเขียวเข้ม ปลายช่อดอกมีสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 35 ข)

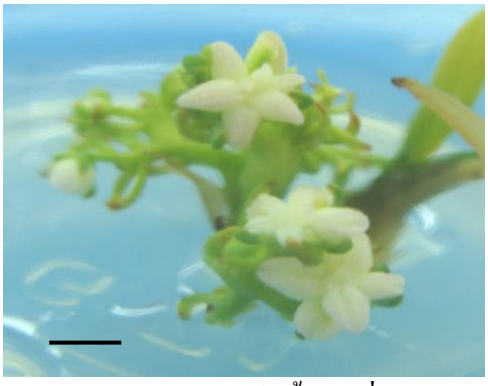
จากการศึกษาลักษณะช่อดอกด้วยกล้อง SEM พบว่าช่อดอกเพศเมียของสิ่งทดลองที่ได้รับโคลชิซินทั้ง 3 ความเข้มข้น (ภาพที่ 36 ก ข และ ค) มียอดเกสรเพศเมีย (stigma) จำนวนมากบริเวณปลายดอก โดย stigma รูปร่างค่อนข้างกลม (ภาพที่ 36 ง) นอกจากนี้ลักษณะของช่อดอกเพศผู้มีลักษณะคล้ายนิ้ว (ภาพที่ 36 จ) โดยมีเกสรเพศผู้ (stamen) รูปร่าง ยาวรี (ภาพที่ 36 ฉ) อย่างไรก็ตาม ต้นกล้าที่เกิดช่อดอกบริเวณปลายยอด จะตายหลังจากที่ดอกฝ่อเป็นเวลา 1 เดือน

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเกิดช่อดอกในหลอดทดลองของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ผ่านการจุ่มแช่สาร โคลชิซินความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน

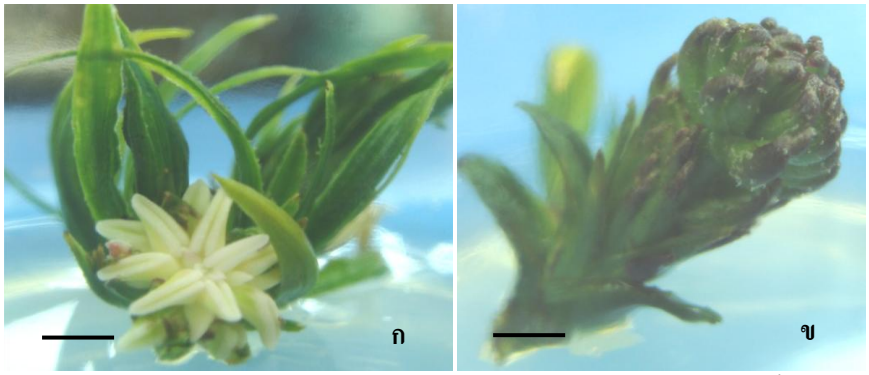
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลาจุ่มแช่ (ชม.)	จำนวนต้นที่ตรวจสอบ (ต้น)	จำนวนต้นกล้าที่เกิดช่อดอก (ต้น)		เปอร์เซ็นต์การเกิดช่อดอก (%)
			ช่อดอกเพศผู้	ช่อดอกเพศเมีย	
0	0	100	0	0	0
0.05	12	50	0	0	0
	24	30	0	0	0
	48	10	0	0	0
0.10	12	100	2	1	3
	24	30	0	0	0
	48	3	0	0	0
0.15	12	10	0	0	0
	24	10	0	0	0
	48	5	0	1	20
0.20	12	10	0	0	0
	24	100	2	4	6
	48	0	0	0	0



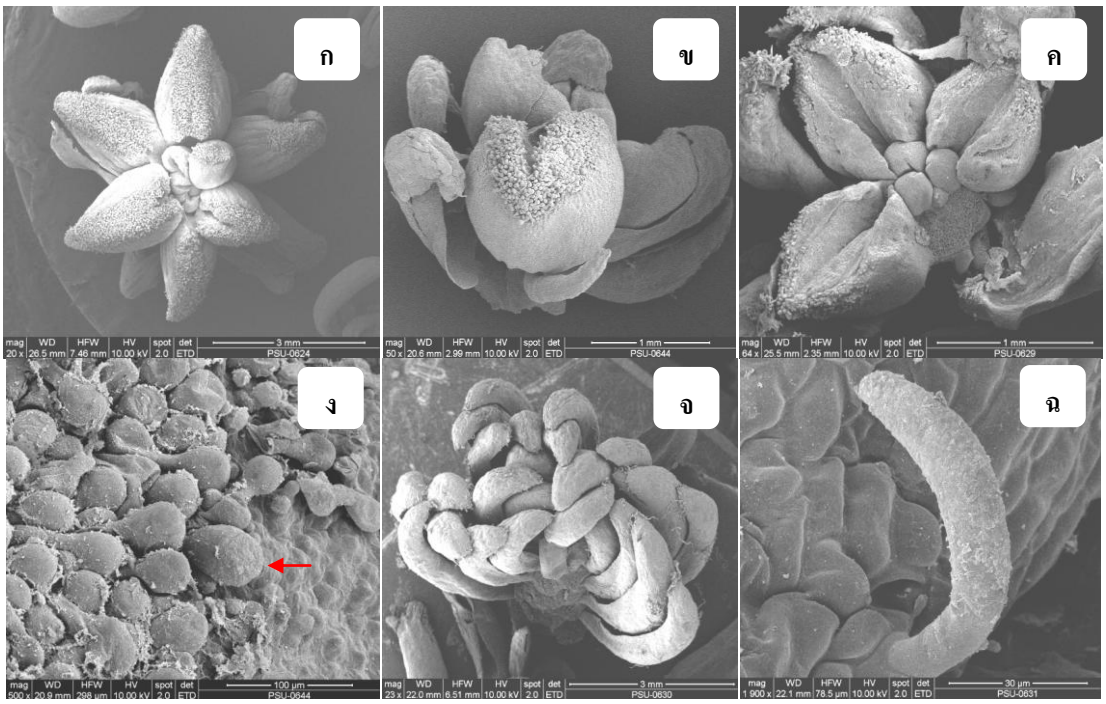
ภาพที่ 33 ลักษณะของช่อดอกเพศเมีย (ก) และช่อดอกเพศผู้ (ข) จากต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)



ภาพที่ 34 ลักษณะช่อดอกเพศเมีย ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.3 เซนติเมตร)



ภาพที่ 35 ลักษณะช่อดอกเพศเมีย (ก) และช่อดอกเพศผู้ (ข) ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)



ภาพที่ 36 ลักษณะของช่อดอกเพศเมีย และเพศผู้ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน (SEM) จากสิ่งทดลอง ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายไปเพาะ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน

ก. ช่อดอกเพศเมียของต้นกล้าจากสิ่งทดลอง ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ข. ช่อดอกเพศเมียของต้นกล้าจากสิ่งทดลอง ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

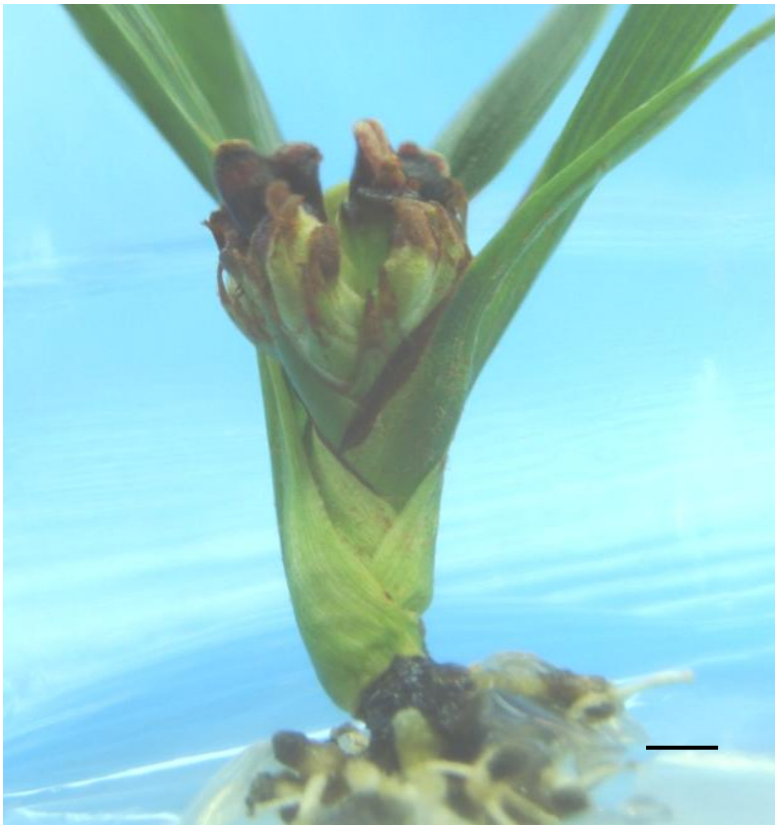
ค. ช่อดอกเพศเมียของต้นกล้าจากสิ่งทดลอง ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ง. ลักษณะของเกสรเพศเมีย (stigma) ของช่อดอกเพศเมียของต้นกล้าจากสิ่งทดลอง ที่ได้รับโคลชิซิน (ศรชี้)
ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

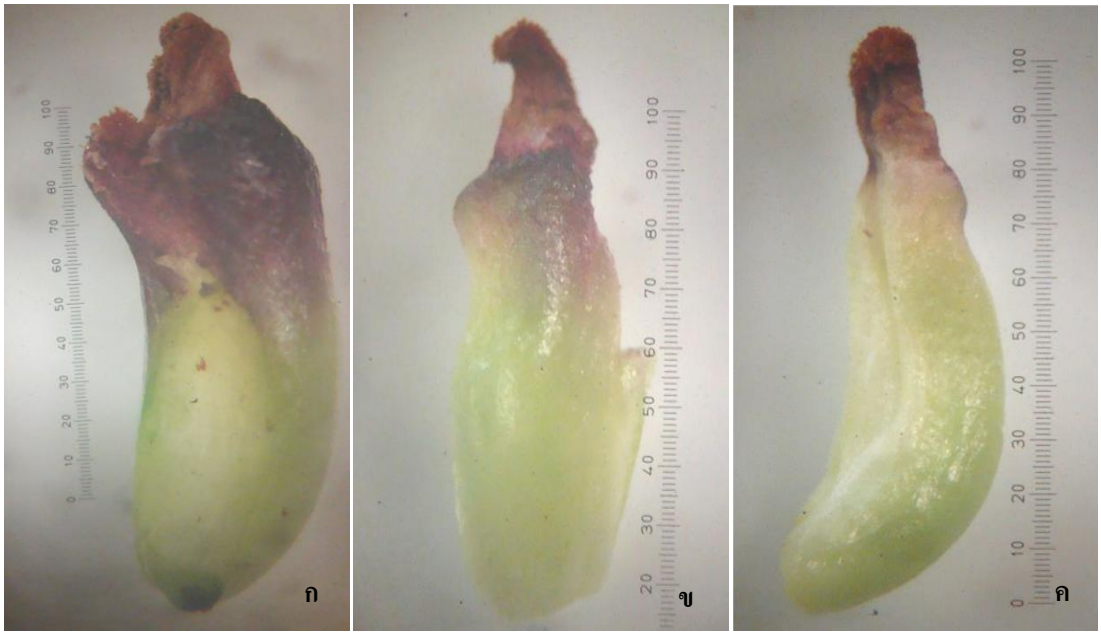
จ. ช่อดอกเพศผู้ของต้นกล้าจากสิ่งทดลอง ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ฉ. ลักษณะเกสรเพศผู้ (stamen) ของช่อดอกเพศผู้ของต้นกล้าจากสิ่งทดลอง ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

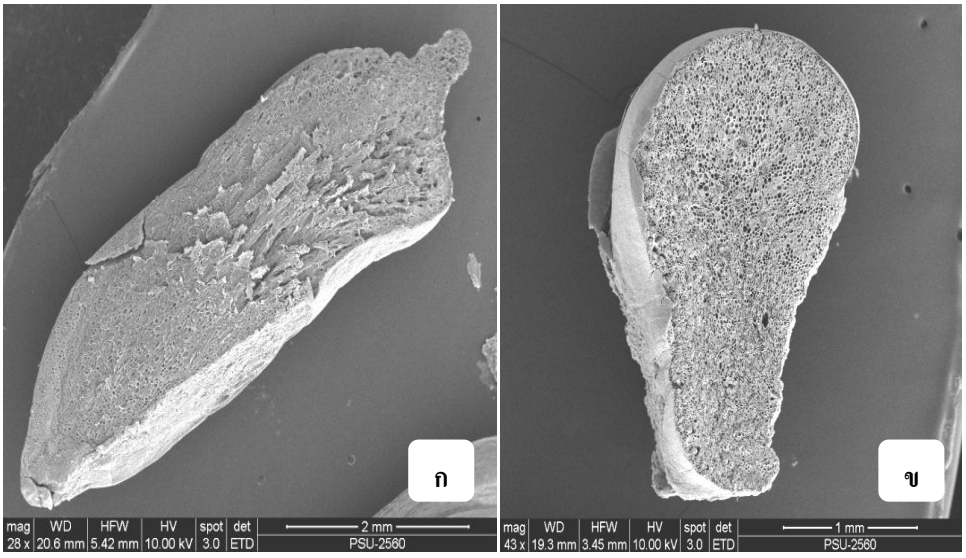
หลังจากย้ายเลี้ยงต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่มีอายุ 12 เดือน บนอาหารแข็งสูตร ARDA เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำราก เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเกิดราก และช่อดอก โดยเกิดช่อดอกเพศเมียบริเวณปลายยอด และพัฒนาเป็นผลในระยะเวลาต่อมา (ภาพที่ 37) จากการศึกษาการพัฒนาของผลปาล์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่าผลมีลักษณะยาวรี บางผลมีลักษณะลีบ (ภาพที่ 38 ก-ค) จากการตัดตามขวาง (ภาพที่ 39 ก) และตามยาว (ภาพที่ 39 ข) ภายใต้กล้อง SEM พบว่าเป็นผลที่ไม่มีเมล็ด โดยเป็นเนื้อเยื่อของ mesocarp ที่มีระบบเนื้อเยื่อท่อลำเลียง (vascular tissue system) ประกอบด้วยท่อลำเลียงน้ำ กับท่อลำเลียงอาหาร (ภาพที่ 40 ก และ 40 ข)



ภาพที่ 37 ผลปาล์มจากต้นปาล์มน้ำมันที่ออกดอกในหลอดทดลอง ที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บริเวณปลายยอด หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน และย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ARDA เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่ออีกเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)



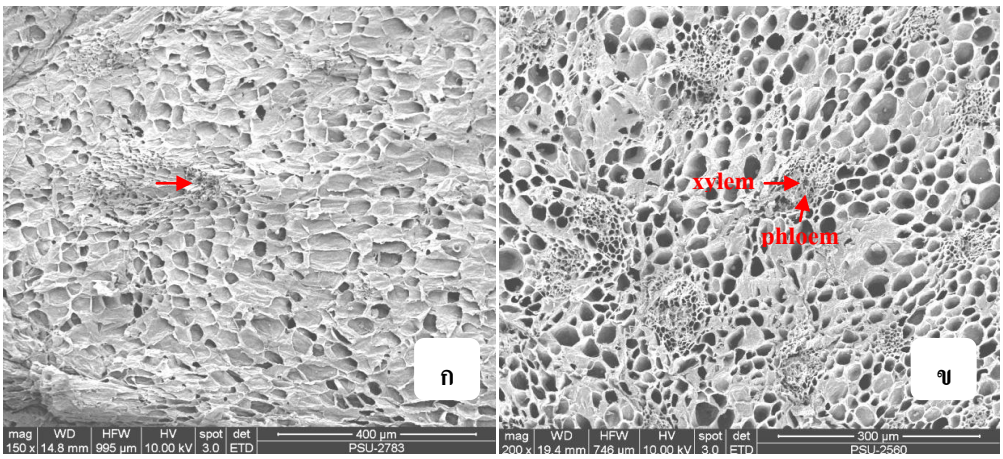
ภาพที่ 38 ลักษณะผลปาล์มจากต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีผลยาวรี (ก และ ข) และผลลีบ (ค)



ภาพที่ 39 ผลปาล์มที่พัฒนาจากต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 12 เดือน และย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ARDA เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่ออีกเป็นเวลา 1 เดือน

ก. ผลที่ตัดตามยาว

ข. ผลที่ตัดตามขวาง



ภาพที่ 40 เนื้อปาล์ม (mesocarp) ของผลปาล์มที่พัฒนาจากต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
ก. ระบบเนื้อเยื่อท่อลำเลียงของผลที่ตัดตามยาว (ศรชี้)
ข. ระบบเนื้อเยื่อท่อลำเลียงของผลที่ตัดตามขวาง คือ ท่อลำเลียงน้ำ (xylem) กับท่อลำเลียงอาหาร (phloem) (ศรชี้)

3.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา

3.2.1 รูปร่าง ขนาด และความหนาแน่นของเซลล์คุม

เมื่อ SSE ที่ผ่านการจุ่มแช่สารโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ พัฒนาเป็นต้นกล้าอายุ 12 เดือน คัดเลือกต้นที่คาดว่าเป็นเททระพลอยด์ โดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาในข้อ 3.1 มาศึกษาความหนาแน่น และขนาดของเซลล์คุมด้วยกล้อง SEM พบว่าชุดที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 41 ค) ให้ความกว้างของเซลล์คุม 19.11 ไมโครเมตร มากกว่าชุดควบคุม (ภาพที่ 41 ก) ซึ่งมีขนาด 9.75 ไมโครเมตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) อย่างไรก็ตามความยาวของเซลล์คุมทั้งชุดการทดลองที่ได้รับ และไม่ได้รับโคลชิซินให้ค่าใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 12) เมื่อพิจารณาความกว้างของเซลล์คุม พบว่าชุดที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 41 ข) ให้ความกว้างของเซลล์คุม 14.39 ไมโครเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) กับชุดควบคุม (ตารางที่ 12) สำหรับความหนาแน่นของเซลล์คุม พบว่าชุดที่ได้รับโคลชิซินทั้งสองความเข้มข้น ให้ความหนาแน่นที่น้อยกว่า

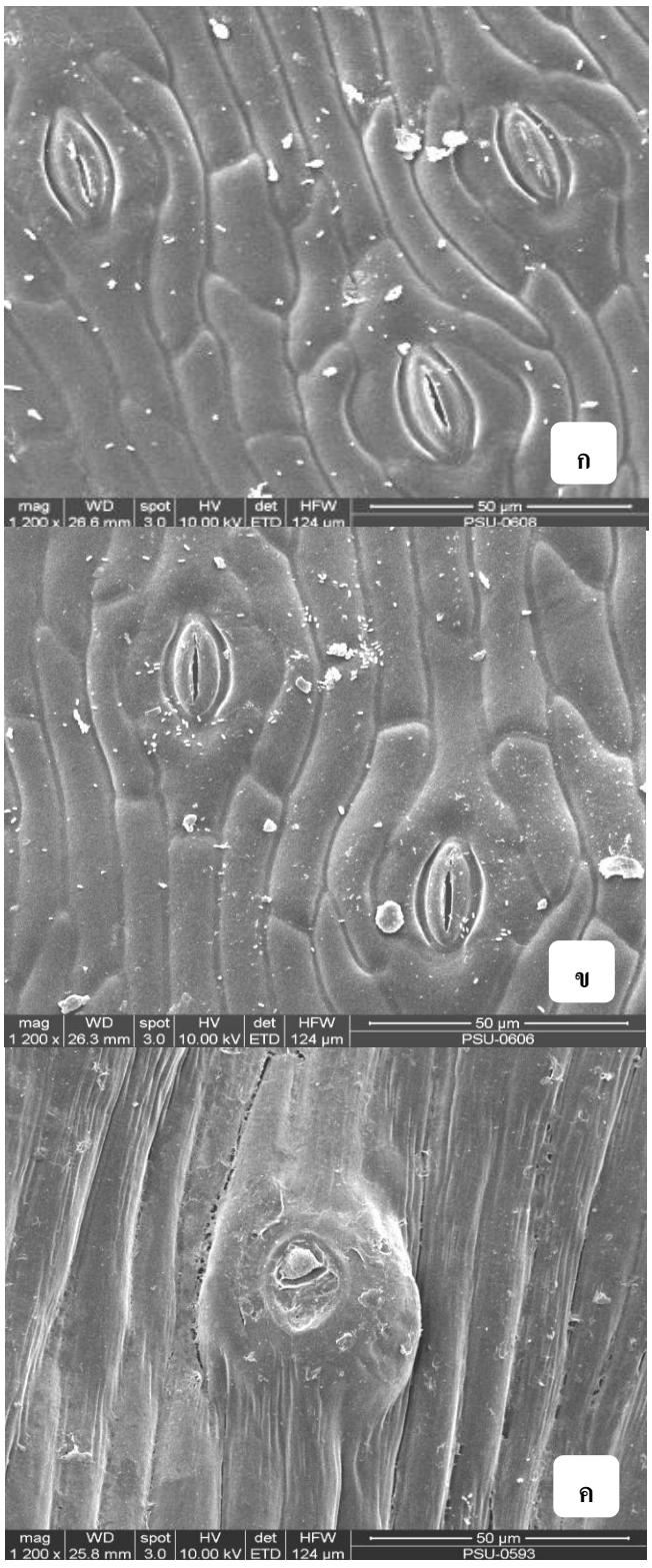
ชุดควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 12 และภาพที่ 42 ก-ค) โดยลักษณะเซลล์คุมของชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีลักษณะบิดเบี้ยว บวม เสียรูปร่าง และติดกันสองเซลล์ ส่วนปากใบเสียหาย ถูกทำลาย (ภาพที่ 43 ก-ฉ)

ตารางที่ 12 ความกว้าง ความยาว และความหนาแน่นของเซลล์คุมของต้นควบคุม และต้นกล้าที่ผ่านการแช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 12 เดือน

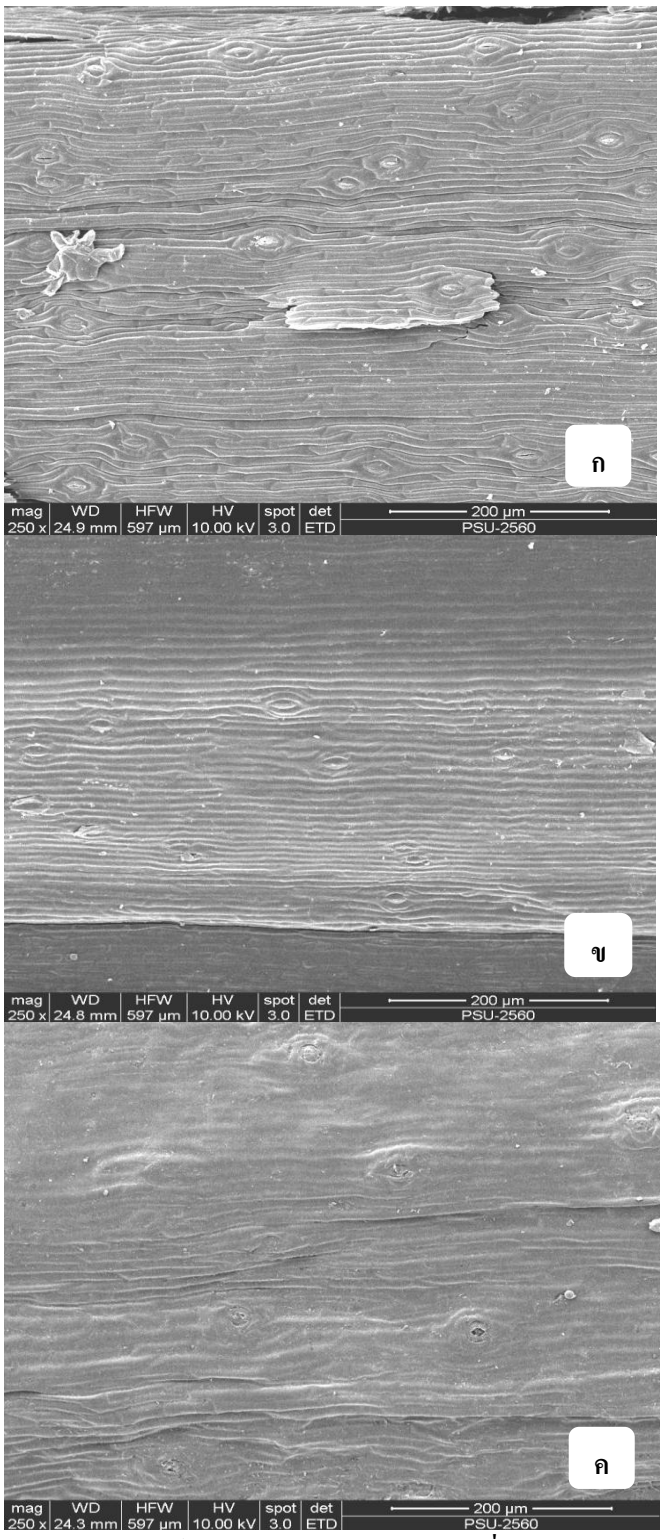
โคลชิซิน	เวลา	ขนาดของเซลล์คุม (ไมโครเมตร)		ความหนาแน่น ± SE
(%)	(ชม.)	ความกว้าง ± SE	ความยาว ± SE	(เซลล์คุม/25 มม.)
0	0	9.75 ± 0.04b	25.82 ± 0.51	16.00 ± 0.21a
0.10	12	14.39 ± 0.05b	26.61 ± 0.39	13.00 ± 0.15b
0.20	24	19.11± 0.04a	29.23 ± 0.29	7.00 ± 0.21c
F-test		**	ns	**
C.V. (%)		17.66	18.25	15.80

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) และ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

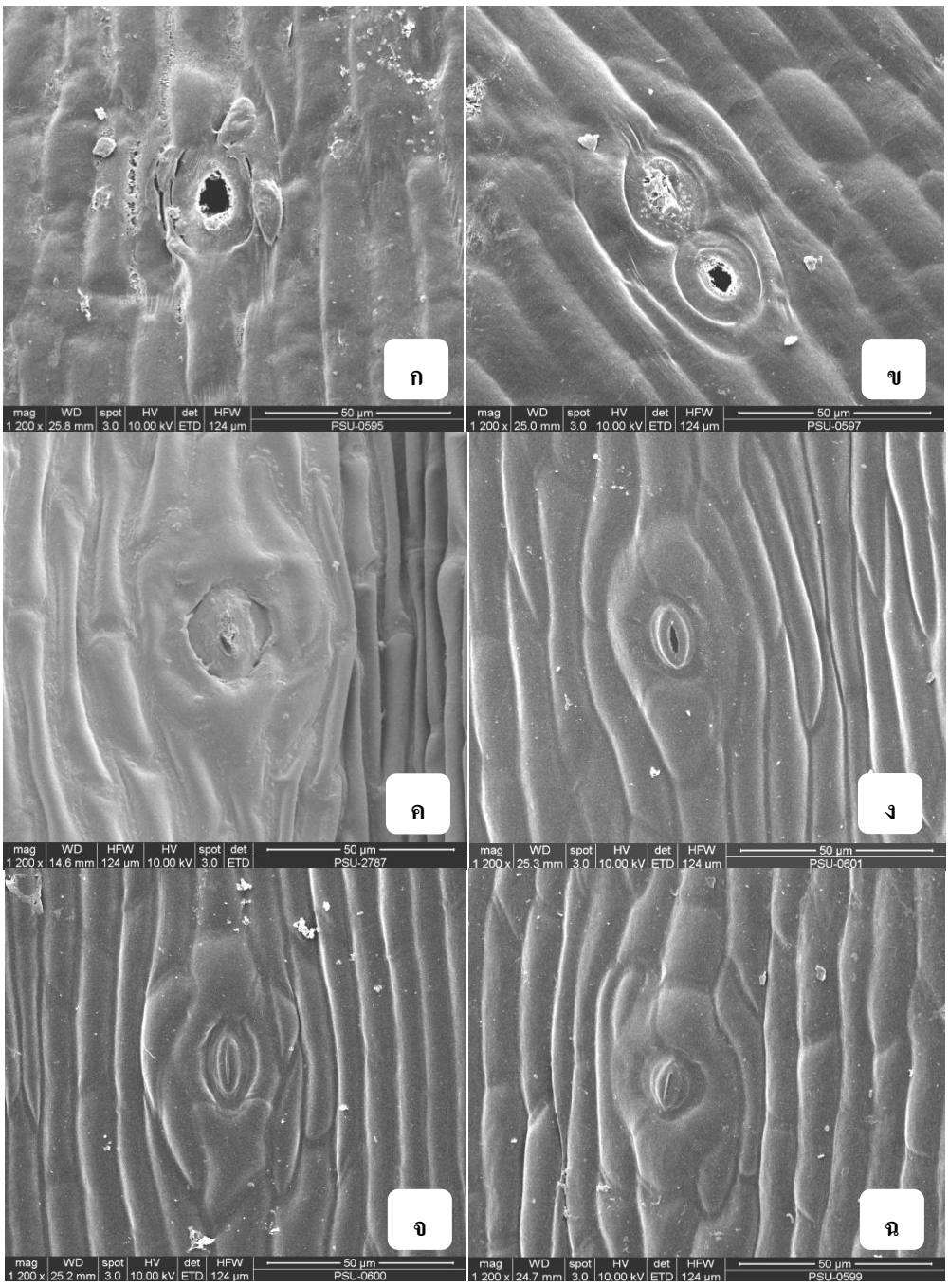
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 41 ขนาดของเซลล์คุม (ก) ชุดควบคุม (ข) ชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ค) ชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน



ภาพที่ 42 ความหนาแน่นของเซลล์คุม (ก) ชุดควบคุม (ข)ชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ค) ชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน



ภาพที่ 43 ลักษณะความผิดปกติแบบต่างๆของเซลล์คุม ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(ก) เซลล์คุมเสียหาย ทำให้ปากใบมีรูปร่างผิดปกติ

(ข) เซลล์คุมมีลักษณะติดกันสองเซลล์ และปากใบมีรูปร่างผิดปกติ

(ค) เซลล์คุมเสียหาย บวม เสียรูปร่าง และปากใบมีรูปร่างผิดปกติ

(ง) เซลล์คุมบวม เสียรูปร่าง

(จ-ฉ) เซลล์คุมบวม เสียรูปร่าง และปากใบปิดถาวร

3.2.2 จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม

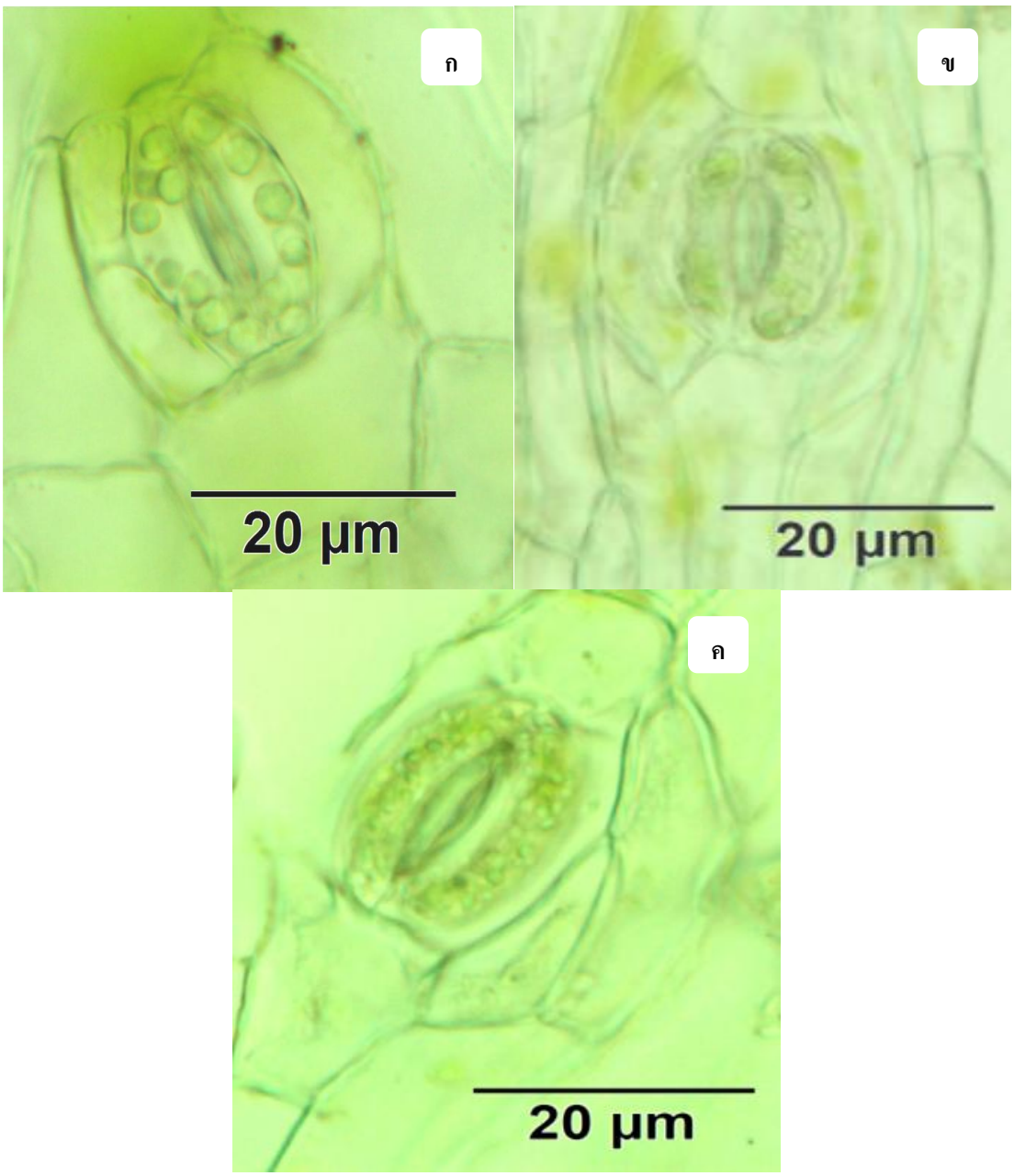
เมื่อ SSE ที่ผ่านการจุ่มแช่สารโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ พัฒนาเป็นต้นกล้าอายุ 12 เดือน จึงคัดเลือกต้นที่คาดว่าเป็นเททระพลอยด์จากการศึกษา 3.1 มาศึกษาจำนวน และขนาดของคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ พบว่าชุดที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยมีขนาดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมเฉลี่ย 2.00 ไมโครเมตร เล็กกว่าชุดควบคุม (4.00 ไมโครเมตร) สองเท่า (ตารางที่ 13 และภาพที่ 44 ก-ค) สำหรับจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุม พบว่าชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมสูงสุด คือ 28.00 เม็ด สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้รับโคลชิซิน (14 เม็ดต่อเซลล์คุม) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) นอกจากนี้ การให้สารโคลชิซิน ความเข้มข้น และระยะเวลาแตกต่างกัน ส่งผลให้ลักษณะของคลอโรพลาสต์ และเซลล์คุมที่แตกต่างกันด้วย ดังแสดงในภาพที่ 45

ตารางที่ 13 ขนาด และจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุมของต้นควบคุม และต้นกล้าที่ผ่านการแช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 12 เดือน

โคลชิซิน (%)	เวลา (ชม.)	ขนาดคลอโรพลาสต์ ± SE (ไมโครเมตร)	จำนวนคลอโรพลาสต์/เซลล์คุม ± SE (เม็ด)
0	0	4.00 ± 0.00a	14.40 ± 0.52b
0.10	12	2.00 ± 0.00b	13.50 ± 0.50b
0.20	24	2.00 ± 0.00b	28.00 ± 0.97a
F-test		**	**
C.V. (%)		0.00	14.18

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

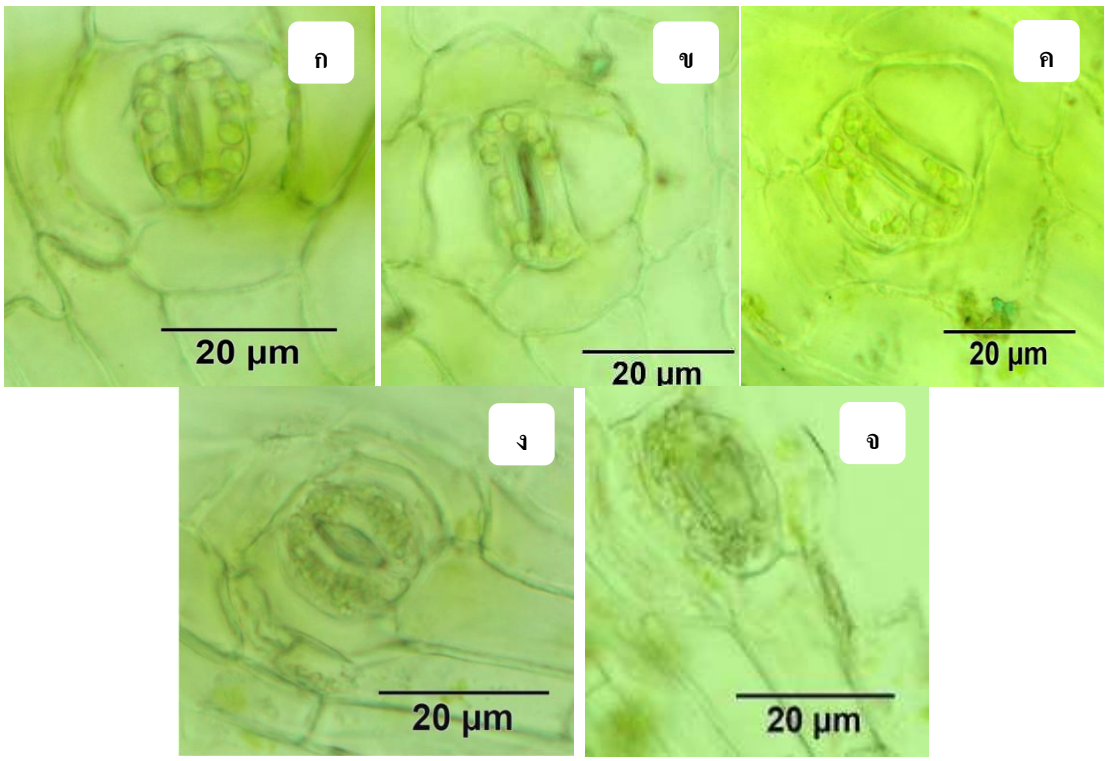


ภาพที่ 44 คลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 12 เดือน

ก. ชุดควบคุม

ข. ต้นที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ค. ต้นที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 45 คลอโรพลาสต์ และลักษณะเซลล์คุมของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน

ก. ต้นที่ได้รับโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เซลล์คุมบวม

ข. ต้นที่ได้รับโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมลดลง

ค. ต้นที่ได้รับโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ขนาดเซลล์คุมไม่เท่ากัน

ง. ต้นที่ได้รับโคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คลอโรพลาสต์ภายในเซลล์คุมมีขนาดเล็ก และมีจำนวนมาก

จ. ต้นที่ได้รับโคลชิซิน 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คลอโรพลาสต์ภายในเซลล์คุมมีขนาดเล็ก ส่วนใหญ่ใส ไม่มีสีเขียว

3.2.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์

เมื่อ SSE พัฒนาเป็นต้นกล้า เก็บรวบรวมใบต้นกล้าที่คาดว่าเป็นต้นเททระพลอยด์ มาสกัดคลอโรฟิลล์โดยบดด้วยสารละลายอะซีโตนเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นชุดควบคุมกับที่ได้รับโคลชิซิน มีความแตกต่างกันโดยต้นที่ได้รับโคลชิซินมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่าต้นควบคุมเล็กน้อย สำหรับคลอโรฟิลล์เอนั้นพบว่าโคลชิซินเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณ 3.06 และ 3.15 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมมีปริมาณ 2.77 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อพิจารณาปริมาณคลอโรฟิลล์บี พบว่าชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณคลอโรฟิลล์บี 13.29 และ 16.81 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ มากกว่าชุดควบคุมซึ่งมีปริมาณคลอโรฟิลล์บี 10.77 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สำหรับปริมาณคลอโรฟิลล์รวม พบว่าชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณคลอโรฟิลล์รวม 16.354 และ 19.976 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด มากกว่าชุดควบคุมซึ่งมีปริมาณคลอโรฟิลล์รวม 13.543 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 46)

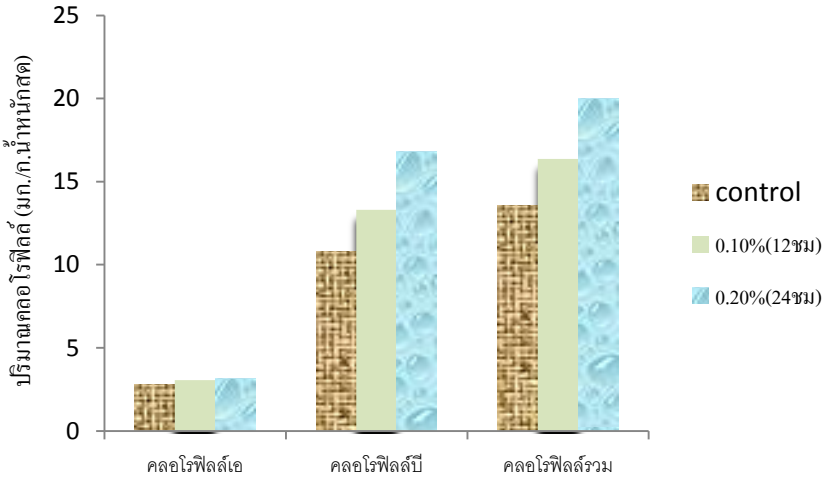
ตารางที่ 14 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ บี และคลอโรฟิลล์รวม จากใบของต้นกล้าชุดควบคุม และต้นกล้าที่คาดว่าเป็นต้นเททระพลอยด์ ที่ผ่านการแช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์-เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน

โคลชิซิน	เวลา	ปริมาณคลอโรฟิลล์ (มก./ก. น้ำหนักสด)		
(%)	(ชม.)	คลอโรฟิลล์เอ ± SE	คลอโรฟิลล์บี ± SE	คลอโรฟิลล์รวม ± SE
0	0	2.77 ± 0.44	10.77 ± 0.14c	13.543 ± 0.29b
0.10	12	3.06 ± 0.32	13.29 ± 0.11b	16.354 ± 0.43ab
0.20	24	3.15 ± 0.80	16.81 ± 0.02a	19.97 ± 0.83a
F-test		ns	*	**
C.V. (%)		4.94	5.80	5.02

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* , ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

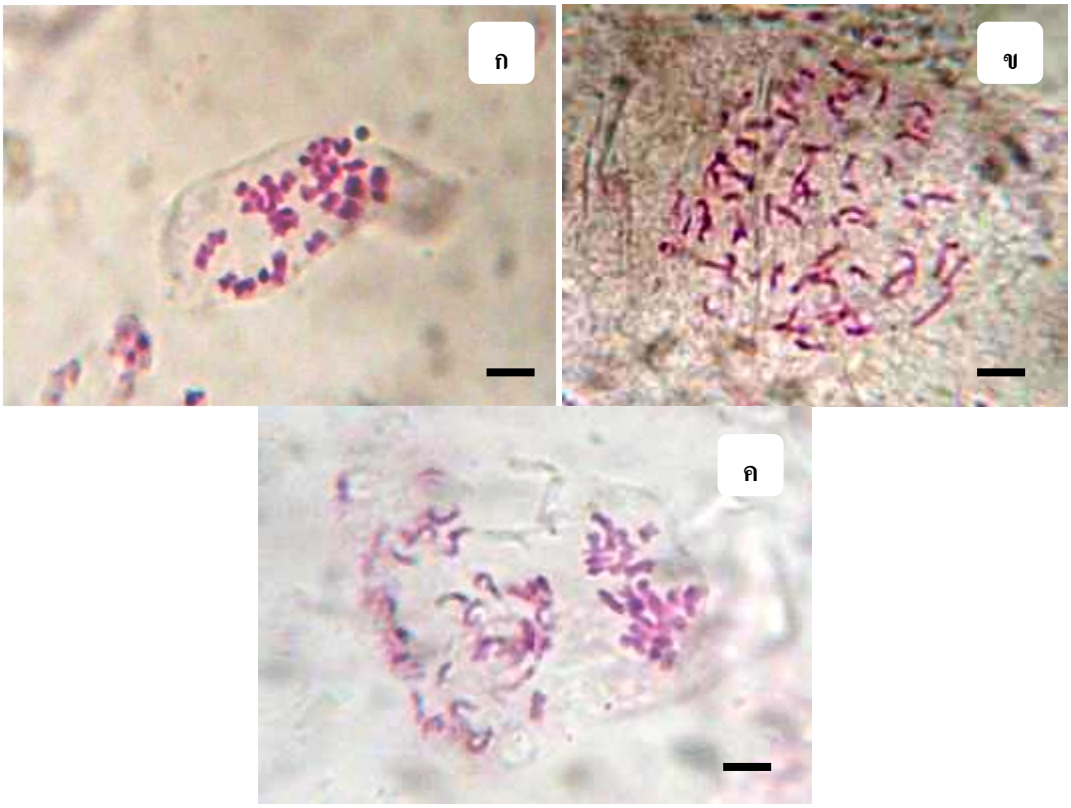


ภาพที่ 46 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันชุดควบคุมที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน

3.3 การตรวจสอบทางเซลล์วิทยา

3.3.1 ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

จากการศึกษาจำนวนของโครโมโซมด้วยวิธี Feulgen squash ของชุดควบคุมเปรียบเทียบกับชุดที่ได้รับโคลชิซิน พบว่าชุดควบคุมมีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=32 (ภาพที่ 47 ก) ส่วนจำนวนโครโมโซมของต้นที่คัดเลือกและคาดว่าเป็นเททระพลอยด์ ที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มเป็นสองเท่า (2n=4x=64) คือเป็นต้นเท-ทระพลอยด์ (ภาพที่ 47 ข และ ค) นอกจากนี้ยังพบต้นมิกโซพลอยด์ (2n=2x=32 และ 2n=4x=64) ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมผสมอยู่ระหว่างดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ ในต้นกล้าที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 47 จำนวนโครโมโซมจากปลายราก ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันหลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน (บาร์= 0.2 ไมโครเมตร)

ก. โครโมโซมปลายรากจากชุดควบคุม (ต้นดิพลอยด์ 2n=2x=32)

ข. โครโมโซมปลายรากจากชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ต้นเททระพลอยด์ 2n=4x=64)

ค. โครโมโซมปลายรากจากชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ต้นเททระพลอยด์ 2n=4x=64)

3.3.2 การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอโดยโฟลไซโทเมทรี

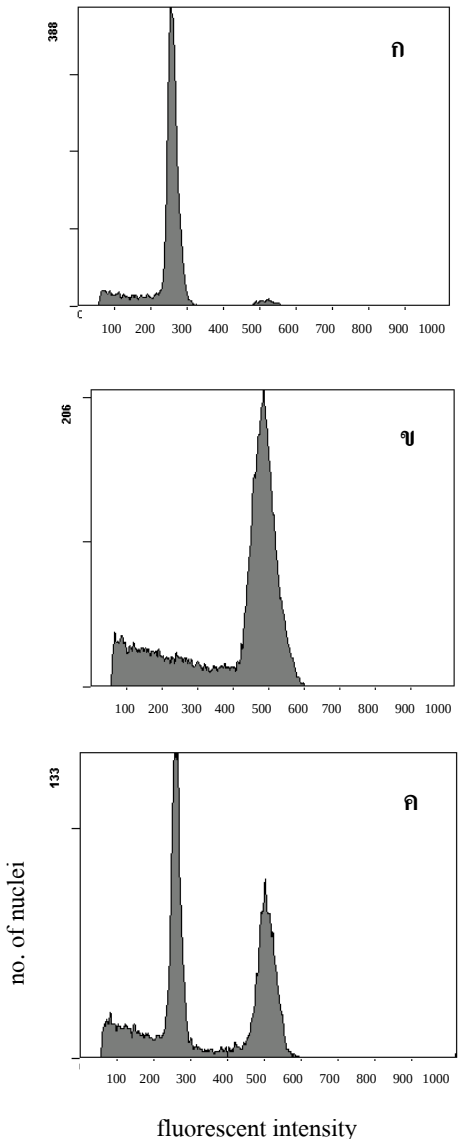
การศึกษาระดับพลอยดี ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันชุดควบคุมเปรียบเทียบกับชุดที่ได้รับโคลชิซิน พบว่าชุดควบคุมมีระดับพลอยดีเป็นดิพลอยด์ (2n = 2x) (ภาพที่ 48 ก) ส่วนชุดที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เกิดเป็นต้นเททระพลอยด์ โดยระดับพลอยดีเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า คือ 2n = 4x (ภาพที่ 48 ข) ทั้งนี้ชุดที่ได้รับโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เกิดเป็นต้นเททระพลอยด์ได้มากที่สุด 16.67เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15) นอกจากนี้ชุดที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ต้นกล้ามิกโซพลอยด์ คือ มีระดับพลอยดีผสมระหว่างดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ (ภาพที่ 48 ค) สอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาโครโมโซมปลายราก

จากการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ดีเอ็นเอของข้าวญี่ปุ่น ซึ่งมีข้อมูลระดับพลอยดีแน่นอนแล้วเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ยืนยันผลได้ว่าต้นปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจาก SSE ในชุดควบคุมมีระดับพลอยดีเป็นดิพลอยด์ มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 3.75 พิโคกรัม เมื่อเปรียบเทียบขนาดของคู่เบส คิดเป็น 1.81×10^9 bp ส่วนชุดที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยืนยันผลได้ว่าเป็นต้นเททระพลอยด์ มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มเป็นสองเท่า คือ 7.45 พิโคกรัม เมื่อเปรียบเทียบขนาดของคู่เบส คิดเป็น 3.59×10^9 bp (ตารางที่ 16 และภาพที่ 49)

ตารางที่ 15 ผลของสารละลายโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเททระพลอยด์ จากการศึกษาระดับพลอยดีด้วยโฟลไซโทเมทรี (n=30)

ระดับความเข้มข้น (%)	ระยะเวลา (ชม.)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%)	ระดับพลอยดี		เปอร์เซ็นต์การเกิดเททระพลอยด์ (%)*
			มิกโซพลอยด์ 2C-4C	เททระพลอยด์ 4C	
0	12	100	0	0	0
	24	100	0	0	0
	48	100	0	0	0
0.05	12	80	0	0	0
	24	70.11	0	0	0
	48	41	0	0	0
0.10	12	68.78	1	2	6.67
	24	57.33	0	0	0
	48	26.55	0	0	0
0.15	12	56.22	0	0	0
	24	48.66	0	0	0
	48	12.11	5	0	0
0.20	12	50.56	0	0	0
	24	42	0	5	16.67
	48	0	0	0	0

*เปอร์เซ็นต์การเกิดเททระพลอยด์ (เปอร์เซ็นต์) = $\frac{\text{จำนวนต้นกล้าที่เป็นเททระพลอยด์}}{\text{จำนวนต้นกล้าทั้งหมด (30 ต้น)}} \times 100$

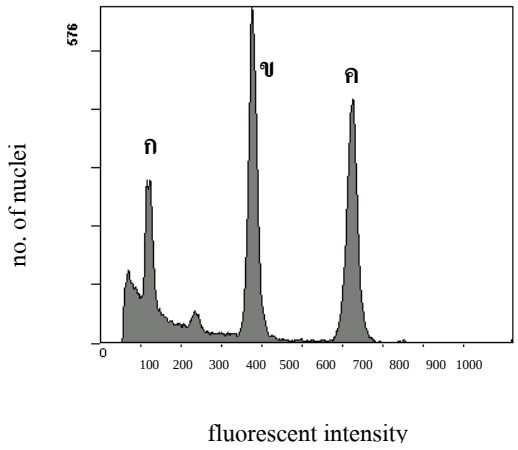


ภาพที่ 48 ฮีสโตแกรมแสดงระดับพลอยดี ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันชนิดต่างๆ

ก. ต้นควบคุม (ต้นดิพลอยด์ 2n=2x=32) (n=10)

ข. ต้นที่ได้รับโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ต้นเททระพลอยด์ 2n=4x=64) (n=5)

ค. ต้นที่ได้รับโคลชิซิน 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ต้นมิกโซพลอยด์ 2n=2x=32 และ 2n=4x=64) (n=5)



ภาพที่ 49 ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณดีเอ็นเอของ (ก) ต้นข้าวญี่ปุ่น ซึ่งเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (ข) ต้นกล้าปาล์มน้ำมันชุดควบคุม ที่เป็นดิพลอยด์ (2n=2x) และ (ค) ต้นเททระพลอยด์ของชุดที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (2n = 4x) หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน

ตารางที่ 16 ปริมาณดีเอ็นเอของต้นกล้าชุดควบคุม และต้นเททระพลอยด์ ที่ผ่านการแช่โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กับปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานของข้าวญี่ปุ่น หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 12 เดือน

พืช	จำนวนต้น	จำนวนโครโมโซม	ปริมาณดีเอ็นเอ (พิโคกรัม) ± SE	ขนาดคู่เบส ± SE
E. guineensis Jacq. cv. 'Tenera' (ชุดควบคุม)	3	32	3.75 ± 0.26b	1.81 ± 0.05b
E. guineensis Jacq. cv. 'Tenera' (ได้รับโคลชิซิน 0.20% เวลา 24 ชม)	3	64	7.45 ± 0.25a	3.59 ± 0.06a
Oryza sativa cv. 'Nipponbare' (ต้นเปรียบเทียบมาตรฐานภายนอก)	3	24	0.91	0.43
t-test			**	**

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

การศึกษาครั้งนี้ ใช้แคลลัสปาล์มน้ำมันที่ชักนำจากใบอ่อนเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลอง โดยใช้แคลลัสที่ได้จากการศึกษาของ สมปอง และคณะ (2547) จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก คณะทรัพยากรธรรมชาติ เพาะเลี้ยงแคลลัสดังกล่าวบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าส่งเสริมให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีลักษณะร่วนพัฒนาเป็น SE และ HE ได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Te-chato (2002) ที่ชักนำ SE โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าว ส่งเสริมแคลลัสเริ่มต้นให้พัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เจริญเร็ว

การเพาะเลี้ยง SE และ HE บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 3 เดือน ในการศึกษานี้ชักนำ SSE จำนวนมาก สอดคล้องกับการศึกษาของ Hilae และ Te-chato (2005) ซึ่งรายงานว่าการใช้น้ำตาลซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำ SSE ในปาล์มน้ำมันได้จำนวนมาก น้ำตาลซอร์บิทอลที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญต่อการพัฒนาการสุก-แก่ และการงอกของ SE จากการศึกษาผลของน้ำตาล ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำการงอกของ SE พบว่าน้ำตาลบางชนิด โดยเฉพาะน้ำตาลแอลกอฮอล์ส่งเสริมการเกิด SSE เมื่อย้าย SSE ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต 2-3 เดือนส่งเสริมการงอกเป็นต้นที่มีทั้งยอด และรากในเปอร์เซ็นต์สูง ดังนั้นการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของปาล์มน้ำมันผ่านการสร้าง SSE จึงมีประสิทธิภาพสูง แม่นยำ เนื่องจากสามารถชักนำการงอกของต้นอ่อนได้ปริมาณมาก (Te-chato and Hilae, 2007) ด้วยเหตุผลดังกล่าวในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ชิ้นส่วน SSE ในการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซม

2. การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์โดยสารโคลชิซิน และออรีซาลิน

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการใช้สารเคมีในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมนั้น พบว่าการจุ่มแช่ชิ้นส่วน SSE ในสารโคลชิซิน และออรีซาลินความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยของ SSE ลดลงตามความเข้มข้น และระยะเวลาการจุ่มแช่ที่นานขึ้น สำหรับการเททับสารเคมีดังกล่าวบนชิ้นส่วน SSE พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับการจุ่มแช่ชิ้นส่วนในสารโคลชิซิน และออรีซาลิน สอดคล้องกับการศึกษาของ Madon และคณะ (2005) ซึ่งรายงานว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเมล็ดงอกของปาล์มน้ำมันที่จุ่มแช่ด้วยสารโคลชิซิน และออรีซาลิน ลดลงตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น และระยะเวลาการจุ่มแช่สารที่นานขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ สิทธิพงษ์ และธีระ (2553) ซึ่งพบว่าเมล็ดงอกที่ผ่านการจุ่มแช่สารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นสูง และระยะเวลานาน ให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมัน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง นอกจากนี้ Ishigaki และคณะ (2009) ทดลองให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.0125 0.025 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 12 และ 48 ชั่วโมงกับหญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) พบว่า ความเข้มข้นต่ำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงกว่าความเข้มข้นสูง และการจุ่มแช่ชิ้นส่วนในสารโคล-ชิซินที่ระยะเวลาสั้นกว่าให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าการจุ่มแช่ที่ระยะเวลานาน ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารโคลชิซิน และออรีซาลินที่ความเข้มข้นสูง และให้สารเป็นเวลานาน เป็นพิษต่อเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของชิ้นส่วนพืช โดยสารดังกล่าวมีความสามารถในการแทรกซึมเข้าไปยังส่วนต่างๆ ภายในเซลล์ (Derman, 1940 อ้างโดย วิชุตา, 2537) และมีผลทำให้ความหนืด (viscosity) ของไซโตพลาสซึมเปลี่ยนแปลงไป การทำงานของเซลล์จึงผิดปกติ (Cook และ Loudon, 1952 อ้างโดย วิชุตา, 2537)

การใช้โคลชิซิน หรือออรีซาลิน ความเข้มข้นต่ำเกินไปจากการศึกษานี้ไม่สามารถชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมได้ อย่างไรก็ตามการใช้สารความเข้มข้นสูงอาจส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชตาย หรือเจริญผิดปกติได้ ดังนั้นระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสม เป็นปัจจัยสำคัญที่สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การชักนำต้นพอลิพลอยด์ได้ ค่าที่เป็นเกณฑ์ในการเลือกใช้สารเคมีข้างต้นคือความเข้มข้น และระยะเวลาการให้สาร ที่ทำให้ชิ้นส่วนพืชตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) (Sigurbjornsson, 1983) โดยค่าดังกล่าวแตกต่างกันขึ้นกับพันธุ์พืช ชิ้นส่วนพืช ชนิดของสารก่อกลายพันธุ์ และวิธีการให้สาร เมื่อพิจารณาถึงค่า LD_{50} ของวิธีการการจุ่มแช่สารละลายโคลชิซินในการศึกษานี้อยู่ในช่วง 0.075 ถึง 0.185 เปอร์เซ็นต์ และการจุ่มแช่สารออรีซาลินอยู่ในช่วง 0.0015 ถึง 0.0037 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวิธีการเททับด้วยสารละลายโคลชิซินอยู่ในช่วง 0.063 ถึง 0.075 เปอร์เซ็นต์ และออรีซาลินอยู่ในช่วง 0.0012 ถึง 0.0018 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ สิทธิพงษ์ และธีระ

(2553) รายงานว่าค่า LD_{50} ของการทดลองจุ่มแช่โคลชิซินกับเมล็ดงอกของปาล์มน้ำมันภายนอกหลอดทดลองมีค่าเท่ากับ 0.227 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าการศึกษานี้ที่ใช้ชิ้นส่วน SSE ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากเมล็ดงอกของปาล์มน้ำมันที่นำมาทดลองจุ่มแช่โคลชิซินนั้น ใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า และระยะเวลาการให้สารน้อยกว่าการศึกษานี้ จึงให้ค่าที่แตกต่างกัน นอกจากนี้เมล็ดงอกนั้นมีกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญน้อยกว่าชิ้นส่วน SSE ดังนั้นกระบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์ของ SSE จึงถูกทำลายได้มากกว่าเมล็ดงอก ค่า LD_{50} ของการศึกษานี้จึงให้ค่าที่ต่ำกว่า โดย Allum และคณะ (2007) รายงานว่าความสามารถในการลำเลียงสารก่อกลายพันธุ์เข้าสู่เนื้อเยื่อพืช และลักษณะพันธุกรรมของพืช (Stanys *et al*., 2006; Khosravi *et al*., 2008) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการเพิ่มชุดโครโมโซม

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การเกิดเททระพลอยด์ในการศึกษานี้ พบว่าวิธีการการจุ่มแช่สารโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ต้นเททระพลอยด์ได้ดีที่สุด โดย Kermani และคณะ (2003) รายงานว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชขึ้นกับชนิดของสารก่อกลายพันธุ์ โดยสารโคลชิซิน และสารออรีซาลินจัดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมเช่นเดียวกัน กลไกการทำงานของสารกลุ่มนี้จะเข้าจับกับอัลฟาทูบูลินไดเมอร์ (∞-tubulin dimer) หรือเบต้าทูบูลินไดเมอร์ (β-tubulin dimer) ที่ตำแหน่งแตกต่างกัน จึงไม่มีสปินเดิลไฟเบอร์ ดังนั้นไม่สามารถควบคุมการแยกของโครโมโซมไปที่ขั้วเซลล์ เป็นผลให้ไม่เกิดการแบ่งเซลล์ จึงหยุดที่ระยะเมตาเฟส เมื่อโครมาทิดแยกออกจากกันจึงไม่ถูกดึงไปที่ขั้ว ส่งผลให้มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มเป็น 2 เท่า ถ้ามีการแช่สารดังกล่าวนานขึ้น อาจส่งผลให้มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มเป็น 4 เท่า โดยออรีซาลินมีสมบัติยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ที่ความเข้มข้น 1/1000 ของความเข้มข้นโคลชิซินที่ใช้กัน ดังนั้นออรีซาลินจึงเป็นพิษมากกว่า ความเข้มข้นที่ใช้จึงต่ำกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Dhooghe และคณะ (2011) ซึ่งรายงานว่าออรีซาลินให้ประสิทธิผลในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ดีกว่าโคลชิซิน แต่จากการศึกษาโดยทั่วไปนักวิจัยจำนวนมากนิยมใช้โคลชิซินชักนำให้เกิดเททระพลอยด์ เนื่องจากให้ผลดีกว่าสารออรีซาลิน ดังเช่นการศึกษาของ Madon และคณะ (2005) ซึ่งจุ่มแช่เมล็ดปาล์มน้ำมันภายนอกสภาพหลอดทดลองในสารละลายโคลชิซิน และออรีซาลินความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าโคลชิซินเข้มข้น 12.5 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 6 ชั่วโมง เกิดเททระพลอยด์ได้ดีที่สุด ส่วนสารละลายออรีซาลินทุกความเข้มข้นไม่พบต้นพอลิพลอยด์ และมีการศึกษาจำนวนมากที่รายงานว่าการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยสารโคลชิซิน ให้ผลดีกว่าออรีซาลิน ดังเช่นในเสาวรสผลสีเหลือง (Rego *et al*., 2011) *Ranunculus asiaticus* (Dhooghe *et al*., 2009a) *Helleborus* (Dhooghe *et al*., 2009b) ในพืชสกุลมะเขือเทศ (Greplova *et al*., 2009) *Spathiphyllum* (Eeckhaut *et al.,* 2004) *Chaenomeles* (Stanys *et al.,*2006) และ

Rhododendron (Vainola, 2000) เป็นต้น นอกจากนี้ความเข้มข้น และระยะเวลาการให้สาร มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์เช่นเดียวกัน โดยทั่วไปความเข้มข้นของโคลชิซินที่เหมาะต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม อยู่ในช่วง 0.05 - 1.0 เปอร์เซ็นต์ ออรีซาลิน 0.0001 - 0.00157 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาการให้สาร อาจให้เป็นชั่วโมง วัน หรือสัปดาห์ (Allum *et al*., 2007) ดังเช่นการศึกษาของ Tang และคณะ (2010) รายงานการใช้สารโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่ำ แต่ใช้เวลาในการจุ่มแช่ชิ้นส่วนในสารละลายนานขึ้น สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นพอลิพลอยด์ในพืช *Paulownia tomentosa* ได้ นอกจากนี้ Allum และคณะ (2007) รายงานว่าการใช้สารที่มีความเข้มข้นสูง แต่ใช้เวลาในการจุ่มแช่ชิ้นส่วนสั้นลง สามารถชักนำต้นพอลิพลอยด์ได้เช่นเดียวกัน วิธีการให้สารจัดเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ ดังเช่นรายงานของ Kermani และคณะ (2003) ซึ่งแช่ชิ้นส่วนข้อกุหลาบ ในอาหารเหลวที่เติมออรีซาลินเป็นระยะเวลาสั้น แล้วย้ายบนอาหารแข็งเพื่อชักนำยอด พบว่าเกิดต้นพอลิพลอยด์ได้ดีกว่าการแช่ชิ้นส่วนในอาหารเหลวที่เติมออรีซาลินเป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ Adaniya และ Shirai (2001) พบว่าชิ้นส่วนปลายยอดของพืชสกุลขิงที่เททับด้วยโคลชิซินบนอาหารแข็งสูตร MS ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเททระพลอยด์มากกว่าการจุ่มแช่ในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน นอกจากนี้ในพืชชนิดเดียวกันแต่ชิ้นส่วนที่แตกต่างกันตอบสนองต่อสารเคมีเพิ่มชุดโครโมโซมต่างกัน บางชิ้นส่วนตอบสนองต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม เมื่อใช้โคลชิซินในขณะที่บางชิ้นส่วนตอบสนองต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมเมื่อใช้ออรีซาลิน ดังเช่นการศึกษาของ Stanys และคณะ (2006) ที่พบว่าเมื่อใช้ยอดรวมของ *Chaenomeles japonica* จุ่มแช่สารโคลชิซิน ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเททระพลอยด์ได้ดีกว่าสารออรีซาลิน อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ชิ้นส่วนของใบเลี้ยง พบว่าสารออรีซาลินให้ต้นเททระพลอยด์มากกว่าสารโคลชิซิน

ในการศึกษานี้การใช้โคลชิซินความเข้มข้นต่ำ ในระยะเวลาสั้น (ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง) ให้จำนวนต้นเททระพลอยด์น้อย การเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น (ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์) และระยะเวลานานขึ้น (24 ชั่วโมง) ส่งผลให้จำนวนต้นเททระ-พลอยด์เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 15) ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้น และระยะเวลาดังกล่าวสามารถยับยั้งการสร้างสายสปินเดิลไฟเบอร์ได้มากกว่า ส่งผลให้มีการเพิ่มชุดโครโมโซมมากกว่าด้วย ส่วนความเข้มข้นสูงกว่านี้ส่งผลเสียหายต่อเซลล์ เนื่องจากระยะเวลาการสร้างสายสปินเดิลมาดึงใช้เวลานาน เมื่อโครโมโซมเพิ่มเป็นจำนวนมากสุดท้ายไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้ เซลล์แตกตาย ดังเช่นเซลล์คุมที่สังเกตได้จากการศึกษานี้มีลักษณะบวม ไหม้ ปากใบปิด มีลักษณะที่เสียหายเหมือนเซลล์แตก ส่งผลให้การทำงานของเซลล์คุมไม่ปกติ ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้

เมื่อพิจารณาการพัฒนาของยอดรวมจากชิ้นส่วนที่ทรีตด้วยสารโคลชิซิน และออรีซาลิน พบว่าชนิดสารเคมีก่อกลายพันธุ์ วิธีการให้ และความเข้มข้นของสารดังกล่าว มีผลต่อการ

สร้างยอดรวม โดยยอดรวมเฉลี่ยของชุดทดลองที่จุ่มแช่ด้วยสารโคลชิซิน และออรีซาลินทุกความเข้มข้น ให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ยน้อยกว่าชุดควบคุม (ตารางที่ 5 และ 6) สอดคล้องกับการศึกษาของ Rego และคณะ (2011) ซึ่งพบว่าการพัฒนาเป็นยอดรวม จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเสาวรสผลสีเหลืองที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 25 250 และ 1,250 ไมโครโมลาร์ ลดลงตามความเข้มข้นของโคลชิซินที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามชุดทดลองที่เททับด้วยโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษานี้ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดรวมเฉลี่ยเพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดรวมเฉลี่ยลดลง ส่วนการเททับด้วยออรีซาลินความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดรวมเฉลี่ยมากกว่าชุดควบคุม และที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ยลดลง (ตารางที่ 7 และ 8)

เมื่อพิจารณาการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ของจากชิ้นส่วนที่ทรีตด้วยสารโคลชิซิน และออรีซาลิน พบว่าชนิดสารเคมีก่อกลายพันธุ์ วิธีการให้สาร และความเข้มข้นของสารดังกล่าว มีผลต่อการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ โดยชุดทดลองที่จุ่มแช่โคลชิซินส่งเสริมโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่เฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Petersen และคณะ (2003) ที่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และปลายยอดของ *Miscanthus sinensis* บนอาหารร่วมกับสารโคลชิซิน หรือออรีซาลิน พบว่าสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูงส่งเสริมการสร้างแคลลัส และให้เปอร์เซ็นต์การเกิดพืชเททระพลอยด์สูงกว่าออรีซาลิน ส่วนการจุ่มแช่ด้วยออรีซาลินในการศึกษานี้ พบว่าออรีซาลินความเข้มข้นต่ำไม่ส่งเสริมการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ โดยออรีซาลิน 0.003 เปอร์เซ็นต์ ชักนำให้โซมาติกเอ็มบริโอเริ่มเข้าสู่ระยะสุกแก่ อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ลดลงตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น (ตารางที่ 5 และ 6)

การเททับด้วยโคลชิซิน หรือออรีซาลินทุกความเข้มข้น และระยะเวลาในการศึกษานี้ไม่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ (ตารางที่ 7 และ 8) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการให้สารเป็นเวลานานเกินไป ทำให้เป็นพิษต่อเซลล์พืช และสารดังกล่าวอาจส่งผลต่อการยับยั้งการแบ่งเซลล์ เมื่อพิจารณาลักษณะของยอด และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสุกแก่ที่พัฒนาจาก SSE ที่จุ่มแช่ในโคลชิซิน และออรีซาลิน พบว่ามีลักษณะบวม ฉ่ำน้ำ นอกจากนี้วิธีการเททับด้วยอาหารเหลวที่เติมสารดังกล่าว ส่งผลให้ยอดมีลักษณะบวม ฉ่ำน้ำมาก ใบโปร่งแสง และไม่สามารถพัฒนาเป็นต้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Franck และคณะ (2004) ที่พบว่ายอดของ *Prunus avium* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเกิดอาการบวม ฉ่ำน้ำ (hyper hydricity) มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ซึ่ง Keiichiro และคณะ (1998) รายงานว่าอาจเป็นไปได้ว่าโคลชิซิน และออรีซาลินส่งผลให้เกิดลักษณะผิดปกติทางสรีรวิทยาในลักษณะฉ่ำน้ำ โดยเนื้อเยื่อดูดน้ำมากเกินไป เนื่องจากเซลล์เอพิเดอร์มิส

ขาดชั้นคิวติเคิล หรือไขที่เคลือบผิว (cuticular layer) ทำให้ไม่มีชั้นที่ป้องกันการเข้าออกของน้ำที่มากเกินไป อีกทั้งมีพื้นที่ในชั้น mesophyll เพิ่มขึ้น จึงสามารถบรรจุน้ำได้เพิ่มขึ้น จึงเกิดภาวะบวมฉ่ำน้ำ นอกจากนี้ Franck และคณะ (2004) ยังรายงานอีกว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจเกิดเนื่องจากสารโคลชิซิน และออรีซาลินทำลายเซลล์ปากใบ ส่งผลให้การทำงานของปากใบไม่ปกติ และจำนวนชั้น palisade cell ลดลง ส่งผลให้จำนวนคลอโรพลาสต์ที่อยู่ในชั้นนี้ลดลง และปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงด้วย จึงส่งผลให้กระบวนการพัฒนาเป็นต้นกล้าลดลง

3. ลักษณะพืชดิพลอยด์ และพอลิพลอยด์ในหลอดทดลอง

3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นเททระพลอยด์ปาล์มน้ำมัน พบว่ามีการเจริญเติบโตช้า ใบหนา สีเขียวเข้ม ใบใหญ่ขึ้น แต่ความยาวลดลง และมีรากขนาดใหญ่ (ตารางที่ 9 และ 10) สอดคล้องกับการศึกษาของ Madon และคณะ (2005) ซึ่งรายงานว่าต้นเททระพลอยด์ของปาล์มน้ำมันที่ชักนำจากการแช่เมล็ดงอกในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 12.5 ไมโครโม-ลาร์ นาน 6 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตช้า และมีใบหนา สีเขียวเข้มกว่าต้นควบคุม เช่นเดียวกับการศึกษาของ สิทธิพงษ์ และธีระ (2553) ซึ่งรายงานว่าต้นเททระพลอยด์ของปาล์มน้ำมันที่ชักนำจากการแช่เมล็ดงอกในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ นาน 48 ชั่วโมง ให้การเจริญเติบโตช้ากว่าต้นควบคุม นอกจากนี้มีหลายการศึกษาที่รายงานว่าการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมด้วยสารโคลชิซินส่งผลให้การพัฒนาเป็นยอด และการเจริญเติบโตช้าลง (Ganga and Chezhiyan, 2002; Kadota and Niimi, 2002; Stanys *et al*., 2006; Yang *et al*., 2006; Omran *et al*., 2008; Aleza *et al*., 2009; Sun *et al*., 2009) Swanson (1957) รายงานในทำนองเดียวกันว่าโคลชิซินส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของต้นเททระพลอยด์ลดลง โดยเฉพาะวงจรการแบ่งเซลล์ที่ช้าเนื่องมาจากจำนวนชุดโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น จึงมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นปกติ Rauf และคณะ (2006) รายงานว่าโคลชิซินความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากระยะเวลาการสร้างสายสปินเดิลมาดึงใช้เวลานานจึงไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้ อาจทำให้เซลล์แตกตาย และชะงักการเจริญเติบโต ในกรณีของใบสีเขียวเข้มนั้นเป็นผลมาจากปริมาณคลอโรฟิลล์ที่เพิ่มมากขึ้นที่เป็นเช่นนี้ Yan และคณะ (2008) รายงานว่าอาจเนื่องจากโคลชิซินส่งผลต่อการเพิ่ม BA (benzyladenine) ฮอร์โมนดังกล่าวมีความสัมพันธ์ในทางบวกกับการสร้างคลอโรฟิลล์ และการเปลี่ยนอีทิโอพลาสต์ไปเป็นคลอโรพลาสต์ ดังนั้นสีใบจึงมีสีเขียวเข้มขึ้น สังเคราะห์แสงได้มากขึ้น ใบจึงหนาขึ้น

ต้นเททระพลอยด์ที่ชักนำจากการศึกษานี้ เกิดดอกแยกเพศขนาดใหญ่ในหลอดทดลอง ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกัน และดอกเพศเมียสามารถพัฒนาเป็นผลที่ไม่มีเมล็ด สอดคล้องกับการศึกษาของ Allum และคณะ (2007) ที่รายงานว่าจากการใช้โคลชิซินเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกุหลาบนั้น เกิดต้นเททระพลอยด์ที่ให้ดอกที่มีขนาดใหญ่กว่าต้นควบคุม ซึ่งผลของการเพิ่มชุดโครโมโซมนั้น มีผลโดยตรงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช สาเหตุอาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ โดยอาจเกิดจากการเพิ่มของชุดของยีน แล้วส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดจากมีชิ้นส่วนบางส่วนของโครโมโซมเกินมาจากปกติ ซึ่งโดยทั่วไปจะมีความสามารถในการอยู่รอดมากกว่ากรณีที่มีชิ้นส่วนบางส่วนของโครโมโซมหายไป ผลของการเกิดการเพิ่มของยีน ทำให้ลักษณะทางฟีโนไทป์เปลี่ยนแปลงได้ (Otto, 2007) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของการควบคุมการแสดงออกของยีน (gene expression) เนื่องจากยีโนมพืชที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการแปรสภาพของเซลล์ (cell differentiation) ได้หลายชนิด โดยยีนบางยีนถูกยับยั้งไม่ให้แสดงออก และยีนบางยีนแสดงออกได้ต่างเวลากัน จึงอาจทำให้ลักษณะฟีโนไทป์เปลี่ยนแปลงได้ (Osborn *et al*., 2003) หรืออาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีนแบบ epigenetic คือความผิดปกติรูปแบบหนึ่งของยีน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส แต่มีการดัดแปลงเบสไซโตซีนที่อยู่ด้านปลาย 5' ของกัวนีน (CpG) โดยมีการเติมหมู่เมธิล (-CH3) ที่ตำแหน่ง 5' ของเบสไซโตซีนบริเวณโปรโมเตอร์ ทำให้การแสดงออกของยีนลดลง (Parisod *et al*., 2010)

การตรวจสอบต้นเททระพลอยด์จากลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยานั้นเป็นเพียงหลักการคัดเลือกเบื้องต้นเท่านั้น จำเป็นต้องยืนยันผลด้วยการตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยา และเซลล์วิทยา โดย Zhang และคณะ (2010b) รายงานว่า จากการยืนยันผลการเกิดเททระพลอยด์ของต้น *Lagerstoemia indica* ด้วยการศึกษาจำนวนโครโมโซม และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าต้นที่คาดว่าเป็นเททระพลอยด์ ที่มีลักษณะ ลำต้นหนา ใบขนาดใหญ่นั้นมีเพียง 50 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่เป็นต้นเททระพลอยด์ ส่วนต้นที่เหลือเป็นมิกโซพลอยด์

สำหรับปาล์มน้ำมันที่ได้จากการศึกษานี้คาดว่าต้นเททระพลอยด์ที่ได้มีการเจริญเติบโตช้า ทางใบสั้น ต้นเตี้ย และมีใบสั้นกว่าต้นควบคุม ในอนาคตหากย้ายลงดินปลูกทำให้สะดวกต่อการเก็บเกี่ยว และสามารถปลูกจำนวนต้นต่อพื้นที่ได้เพิ่มขึ้น จึงให้ผลผลิตต่อพื้นที่เพิ่มขึ้นด้วย และต้นเททระพลอยด์มีใบเขียวเข้มซึ่งให้ปริมาณคลอโรฟิลล์มากกว่าต้นปกติ จึงสามารถนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ที่มีธาตุอาหารสูง นอกจากนี้อาจจะให้ปริมาณน้ำมันจากผลปาล์มเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นดิพลอยด์ สามารถเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร และนำไปผลิตเป็นพลังงานทดแทนตามนโยบายของรัฐบาลต่อไป

3.2 ลักษณะทางสรีรวิทยา

จากการศึกษานี้ พบว่าต้นเททระพลอยด์มีขนาดของเซลล์คุมกว้างกว่าชุดควบคุม มีความหนาแน่นของเซลล์คุมน้อยกว่าชุดควบคุม มีจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุมมากกว่าชุดควบคุม แต่มีขนาดคลอโรพลาสต์เล็กกว่าชุดควบคุม (ตารางที่ 12 และ 13) สอดคล้องกับการศึกษาของ สิทธิพงษ์ และธีระ (2553) ซึ่งพบว่าต้นกล้าปาล์มเททระพลอยด์ มีขนาดเซลล์คุมใหญ่กว่า จำนวนคลอโรพลาสต์มากกว่า แต่มีความหนาแน่นเซลล์คุมต่ำกว่าต้นดิพลอยด์ซึ่งเป็นชุดควบคุม อย่างไรก็ตาม Madon และคณะ (2005) รายงานว่า ขนาดเซลล์คุมของต้นเททระพลอยด์ และต้นดิพลอยด์นั้นไม่แตกต่างกัน

มีหลายการศึกษาที่รายงานว่าขนาดของเซลล์ปากใบที่ใหญ่ สามารถประเมินการเกิดพอลิพลอยด์ได้ เช่น ในเสาวรสผลสีเหลือง (Rego *et al*., 2011) ยี่เข่ง (Ye *et al*., 2010) สาลี่ (Sun *et al*., 2009) หน่อไม้ฝรั่ง (Shiga *et al*., 2009) *Pennisetum* (Campos *et al*., 2009) *Chaemomeles japonica* (Stanys *et al*., 2006) และองุ่น (Yang *et al*., 2006) ความหนาแน่นของเซลล์คุมที่ลดลงสามารถบ่งชี้ถึงการเกิดพอลิพลอยด์ในพืชหลายชนิดเช่น เยอบีร่า (Gantait *et al*., 2011) โหระพา (Omidbaigi *et al*., 2010) เบญจมาศ (Liu and Gao., 2007) *Aegilops neglecta* (Aryavand *et al*., 2003) *Alocasia* (Thao *et al*., 2003) หม่อน (Chakraborti *et al*., 1998) *Zantedeschia* (Cohen and Yao, 1996) และกล้วย (Hamill *et al*., 1992) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบการเกิดเททระพลอยด์โดยการนับจำนวนคลอโรพลาสต์ ซึ่งมีการยืนยันผลว่าจำนวนคลอโรพลาสต์ในต้นเททระพลอยด์มีจำนวนมากกว่าในต้นดิพลอยด์สองเท่า ในหม่อน (Chakraborti *et al*., 1998) พุทรา (Gu *et al*., 2005) Poplar (Edward *et al*., 2009) *Lagerstoemia indica* (Zhang *et al*., 2010b) โหระพา (Omibaigi *et al*., 2010) และเสาวรสผลสีเหลือง (Rego *et al*., 2011) เป็นต้น ค่าความหนาแน่น และขนาดของเซลล์คุม รวมทั้งจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุมที่ได้จากการศึกษานี้ ใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดเททระพลอยด์ได้อย่างแม่นยำ Hodgson และคณะ (2010) รายงานว่าพอลิพลอยด์มีความสัมพันธ์กับขนาดของเซลล์คุม และขนาดของจีโนมในพืชดอก จากความสัมพันธ์ดังกล่าวทำให้การตรวจสอบการเกิดพอลิพลอยด์ โดยการศึกษาขนาดของเซลล์คุม ความหนาแน่นของเซลล์คุม และจำนวนคลอโรพลาสต์นั้น เป็นวิธีการตรวจสอบที่ให้ผลแม่นยำ ไม่ยุ่งยาก ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และใช้ระยะเวลาสั้น

เมื่อพิจารณาปริมาณคลอโรฟิลล์จากแผ่นใบในการศึกษานี้ พบว่าต้นเททระพลอยด์ให้ปริมาณคลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมมากกว่าต้นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 14) สอดคล้องกับการศึกษาของ Beck และคณะ (2003) ที่พบว่าระดับพลอยดี

ที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับปริมาณคลอโรฟิลล์ และคลอโรพลาสต์ที่เพิ่มขึ้นใน black wattle เช่นเดียวกับการศึกษาของ Shao และคณะ (2003) ที่พบว่าต้นเททระพลอยด์ของทับทิมมีปริมาณคลอโรฟิลล์มากกว่าต้นควบคุม ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากต้นเททระพลอยด์ให้คลอโรพลาสต์ต่อปากใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ จึงให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้าม Xu และคณะ (2010) พบว่าต้นเททระพลอยด์ในพืช *Juncus effuses* ให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมน้อยกว่าต้นควบคุม สาเหตุอาจเนื่องจากการไม่รวมกันของระบบ thylakoid membrane ในต้นเททระพลอยด์ อย่างไรก็ตาม Warner และ Edwards (1989) รายงานว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ในต้นเททระพลอยด์ *Atriplex confertifolia* ไม่แตกต่างกับต้นดิพลอยด์

3.3 การตรวจสอบทางเซลล์วิทยา

การตรวจสอบการเกิดพอลิพลอยด์ โดยศึกษาจำนวนโครโมโซมของปาล์มน้ำมันจากเซลล์ปลายรากในการศึกษานี้ พบว่าต้นควบคุมมีจำนวนโครโมโซม 32 แท่ง และต้นที่เพิ่มชุดโครโมโซม เกิดต้นเททระพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซม 64 แท่ง ส่วนต้นมิกโซพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซมผสมระหว่างดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ คือ 32 และ 64 แท่ง ทำนองเดียวกับการศึกษาของ Madon และคณะ (2005) และ สิทธิพงษ์ และธีระ (2553) ซึ่งรายงานว่าจำนวนโครโมโซมปาล์มน้ำมันต้นควบคุมที่เป็นพืชดิพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=32 ส่วนต้นเททระพลอยด์ที่ชักนำได้จากการทรีตด้วยสารโคลชิซิน มีจำนวนโครโมโซมมากกว่าดิพลอยด์สองเท่า (2n=4x=64) และต้นมิกโซพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซมผสมระหว่างดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ (2n=2x=32 และ 2n=4x=64)

โดยทั่วไปการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมนั้น พลอยดีมีการเปลี่ยนแปลงหลายระดับ เช่น ทริพลอยด์ เททระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์ เป็นต้น มีหลายการศึกษาที่ตรวจสอบระดับการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมหรือระดับพลอยดี โดยการนับจำนวนโครโมโซม เช่น ใน *Lagerstoemia indica* (Zhang *et al*., 2010b) *Ranunculus* (Dhooghe *et al*., 2009a) กุหลาบ (Khosravi *et al*., 2008; Allum *et al*., 2007) *Spathiphyllum wallisii* (Eeckhault *et al*., 2004) และ *Alocasia* (Thao *et al*., 2003) เป็นต้น ซึ่งการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมปลายรากนั้น เป็นวิธีที่สามารถบ่งชี้การเกิดพอลิพลอยด์ได้แม่นยำที่สุด (Dolezel *et al*., 2007) แต่มักถูกเลือกใช้เป็นวิธีสุดท้าย เนื่องจากต้องใช้เทคนิค และความชำนาญในการตรวจสอบ รวมทั้งต้องตรวจสอบเซลล์จำนวนมาก ใช้เวลานาน (Bohanec, 2003) การตรวจสอบการเกิดพอลิพลอยด์อีกวิธีที่นิยม ให้ผลรวดเร็ว และทำได้ปริมาณมากในระยะเวลาที่จำกัด คือการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอโดย

โฟลไซโทเมทรี เช่น การประเมินเททระพลอยด์ในยอดของเยอบีร่า (Gantait *et al*., 2011) ใบของต้น *Dioscorea zingiberensis* (Zhang *et al*., 2010a) ใบของ *Paulownia tomentosa* (Tang *et al*., 2010) และใบสาลี่ (Sun *et al*., 2009) เป็นต้น การศึกษานี้ใช้ดีเอ็นเอข้าวญี่ปุ่น เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าใบอ่อนของปาล์มน้ำมันดิพลอยด์ มีปริมาณดีเอ็นเอ 3.75 พิโคกรัม และใบอ่อนต้นเททระพลอยด์มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มเป็นสองเท่า คือ 7.45 พิโคกรัม สอดคล้องกับการศึกษาของ Madon และคณะ (2005) ที่รายงานว่าการตรวจสอบด้วยโฟลไซโทเมทรี ต้นเททระพลอยด์ให้ระดับพลอยดีเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของต้นดิพลอยด์

ปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน ขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์ ชิ้นส่วนพืช และดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบภายนอก ดังเช่นรายงานของ Rival และคณะ (1997) ที่ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันเทเนอรา พันธุ์ลูกผสม G6446 โดยใช้ *Petunia hybrida* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า ใบอ่อนมีปริมาณดีเอ็นเอ 3.786 พิโคกรัม และแคลลัส 3.212 พิโคกรัม นอกจากนี้ Srisawat และคณะ (2005) พบว่าการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของใบอ่อนปาล์มน้ำมันเทเนอรา (T38) โดยใช้ถั่วเหลือง มะเขือเทศ และข้าวโพด เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน มีค่า 4.18 3.97 และ 4.34 พิโคกรัม ตามลำดับ และการวัดปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนเอ็มบริโอ ปลายยอด และแคลลัสของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ถั่วเหลืองเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน มีค่า 4.16 4.15 และ 4.68 พิโคกรัม ตามลำดับ โดย Loureiro และคณะ (2007) รายงานว่า เนื่องจากใบของปาล์มน้ำมันมีสารทุติยภูมิ คือ สารประกอบฟีโนลิคปริมาณมากกว่าเอ็มบริโอ จึงส่งผลให้กรดแทนนินรบกวนการดูดกลืนแสงของเครื่องโฟลไซโทเมทรีมากกว่า จึงให้ค่าปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

แม้ว่าปัจจุบันวิธีการประเมินการเกิดเททระพลอยด์นั้น นิยมใช้โฟลไซโทเมทรี เนื่องจากสามารถศึกษาเนื้อเยื่อในปริมาณมาก ระยะเวลาสั้น (Dolezel *et al*., 2007) และสามารถตรวจสอบในชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะการประเมินการเกิดมิกโซพลอยด์ ซึ่งให้ผลชัดเจน รวดเร็วกว่าการตรวจสอบด้วยการศึกษาจำนวนโครโมโซม ซึ่งต้องอาศัยเวลา และความชำนาญเพื่อยืนยันการเกิดมิกโซพลอยด์ (Leus *et al*., 2009) อย่างไรก็ตามการประเมินด้วยวิธีนี้ มีค่าใช้จ่ายสูง และต้องใช้เอนไซม์และสีย้อมดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด ดังนั้น Vanstechelman และคณะ (2010) รายงานว่า วิธีที่เหมาะสมต่อการประเมินระดับพลอยดีที่ให้ผลแม่นยำที่สุด โดยเฉพาะมิกโซพลอยด์ คือการตรวจสอบร่วมกันระหว่างการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก และการใช้ใบตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยโฟลไซโทเมทรี อย่างไรก็ตาม ในกรณีปาล์มน้ำมันในการศึกษานี้ การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาก็เพียงพอสามารถประเมินต้นเททระพลอยด์ได้แม่นยำ เพราะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันระหว่างลักษณะทางสรีรวิทยา และลักษณะทางเซลล์วิทยา

บทที่ 5

สรุป

1. อาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้แคลลัสพัฒนาเป็น SE และ HE ได้ เมื่อนำ SE และ HE ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 3 เดือน ส่งเสริมการสร้าง SSE จำนวนมาก

2. การจุ่มแช่ SSE ในสารละลายออรีซาลิน เข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตใกล้เคียง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถชักนำเป็นต้นได้ จึงไม่แนะนำให้ใช้สารออรีซาลินในการชักนำให้เกิดเททระพลอยด์

3. การจุ่มแช่กลุ่ม SSE ที่พัฒนาจาก HE ในสารละลายคอลชิซีน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตใกล้เคียง 50 เปอร์เซ็นต์ และให้ต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งคาดว่าจะเป็นเททระพลอยด์

4. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นเททระพลอยด์ มีการเจริญเติบโตช้า ใบหนา สีเขียวเข้ม ใบใหญ่ขึ้น แต่ความยาวใบลดลง และให้รากขนาดใหญ่กว่าต้นควบคุม

5. ต้นที่คาดว่าจะเป็นเททระพลอยด์ มีขนาดของเซลล์คุมกว้าง ความหนาแน่นของเซลล์คุมน้อย จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุมมาก ขนาดเม็ดคลอโรพลาสต์เล็ก และปริมาณคลอโรฟิลล์รวม มากกว่าต้นควบคุม

6. การตรวจสอบลักษณะทางเซลล์วิทยาร่วมกันระหว่างการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก และการใช้ใบตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยโฟลไซโทเมทรี พบว่าต้นควบคุมมีจำนวนโครโมโซม 32 แท่ง (2n=2x=32) และต้นที่เพิ่มชุดโครโมโซม เกิดต้นเททระพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซม 64 แท่ง (2n=4x=64) ส่วนต้นมิกโซพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซมผสมระหว่างดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ คือ 32 และ 64 แท่ง (2n=2x=32 และ 2n=4x=64) และการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ โดยโฟลไซโทเมทรี พบว่าใบอ่อนของปาล์มน้ำมันดิพลอยด์ มีปริมาณดีเอ็นเอ 3.75 พิโคกรัม และใบอ่อนต้นเททระพลอยด์มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มเป็นสองเท่า คือ 7.45 พิโคกรัม

เอกสารอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2546. การปรับปรุงพันธุ์พืช : พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จรัสศรี นวลศรี. 2548. เอกสารคำสอน วิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชสวน. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธนวดี พรหมจันทร์. 2551. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สอง และการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต้นปาล์มน้ำมันที่พัฒนาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ ชัยรัตน์ นิลนนท์ ธีระพงศ์ จันทรนิยม ประกิจ ทองคำ และหะสัน กือมะ. 2543. เอกสารประกอบการฝึกอบรม การจัดการสวนปาล์มน้ำมัน. สงขลา: คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์ เรวัติ เลิศฤทัยโยธิน รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ และสนธิชัย จันทร์เปรม. 2546. พืชเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นภาพร นาคอุดม. 2548. การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2551. พันธุศาสตร์พืช. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เพ็ญติมาส กระมุท และสมปอง เตชะโต. 2552. ผลของแหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอจากเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็ง. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร 40(3)(พิเศษ): 448-451.

วิชชุตา รุ่งเรือง. 2537. ผลของโคลชิซีน และรังสีแกมมาที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ราตรี สุจารีย์. 2540. การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้โคลชิซีนในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สิทธิพงษ์ พรมมา และธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2553. การชักนำพอลีพลอยด์และลักษณะสัณฐานของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน. ว. เกษตรพระจอมเกล้า 28: 36-43.

สมปอง เตชะโต. 2537. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต อาสลัน หิเล และอิบรอเฮม ยีดำ. 2547. การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและพืชต้นใหม่จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 26:617-628.

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อาสลัน หิเล และสมปอง เตชะโต. 2545. การปรับปรุงวิธีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาของประเทศไทย ครั้งที่ 3 วันที่ 18-19 กรกฎาคม 2545 ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา.

Adaniya, S. and Shirai, D. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. Scientia Horticulturae 88: 277-287.

Aleza, P., Juarez, J., Ollitrault, P. and Navarro, L. 2009. Production of tetraploid plants of non apomictic *citrus* genotypes. Plant Cell Reports 28: 1837-1846.

Allum, J.F., Bringloe, D.H. and Roberts, A.V. 2007. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. Plant Cell Reports 26: 1977-1984.

Al-Khayri, J.M. and Al-Bahrany, A.M. 2001. Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulturae 89: 291-298.

Anderson, J.A., Moussetdeclas, C., Williams, E.G., Taylor, N.L. 1991. An *in vitro* chromosome doubling method for clovers (*Trifolium* spp.). Genome 34: 1-5.

Aryavand, A., Ehdaie, B., Tran, B. and Waines, J.G. 2003. Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. Genetic Resources and Crop Evolution 50: 175-182.

Barbara, T. and Elwira, S. 2002. Flow cytometric analysis of DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures. Plant Science 164: 129-134.

Beck, S.L., Fossey, A. and Mathura, S. 2003. Ploidy determination of black wattle (*Acacia mearnsii*) using stomatal chloroplast counts. Southern African Forestry Journal 192: 79-82.

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

Bohanec, B. 2003. Ploidy determination using flow cytometry. *In* Doubled Haploid Production in Crop Plants (eds. M. Maluszynski, K..J. Kasha, B.P. Forster and I. Szorejko), pp. 397-403. Dordrecht : Kluwer Press.

Campos, J.M.S., Davide, L.C., Salgado, C.C., Santos, F.C., Costa, P.N., Silva, P.S., Alves, C.C.S., Viccini, L.F. and Pereira, A.V. 2009. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. Plant Breeding 128: 101-104.

Chakraborti, S.P., Vijayan, K., Roy, B. and Qadri, S. 1998. *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Reports 17: 799-803.

Chan, J.L., Saenz, L., Talavera, C., Hornung, R., Robert, M. and Oropeza, C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 17: 515-521.

Chauvin, J.E., Label, A. and Kermarrec, M.P. 2005. *In vitro* chromosome doubling in tulip (*Tulipa gesneriana* L.). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 80: 693-698.

Cohen, D. and Yao, J.L. 1996. *In vitro* chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 43-49.

Constantin, M.J. 1975. Mutations for chlorophyll deficiency in barley. *In:* Proceedings 3th Barley genetics, (ed. H. Gaul), pp. 96-112. Munich : Verlag Karl Thiemig.

Corley, R.V. 2003. Oil palm. A major tropical crop. Biotrop Bulletin 19: 5-8.

Cousin, A., Heel, K., Cowling, W.A. and Nelson, A.N. 2009. An efficient high-troughput flow cytometric method for estimating DNA ploidy level in plants. Cytometry Part A 75: 1015-1019.

Daigny, G., Paul, H., Sangwan, R.S. and Sangwan-Norrell, B.S. 1996. Factors influencing secondary somatic embryogenesis in *Malus domestica* Borkh. (cv. 'Gloster 69'). Plant Cell Reports 16: 153-157.

de Carvalho, J.F.R.P., de Carvalho, C.R. and Otoni, W.C. 2005. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 69-75.

de Mello, S.M., Callegari, J. and Zanettini, B. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. Ciencia Rural 30: 105-111.

Derman, H. 1954. Colchiploidy in grapes. Heredity 45: 159-172.

Derman, H. 1965. Colchiploidy and histological imbalance in triploid apple and pear. The American Journal of Botany 52: 353-359.

Dewey, D.R. 1980. Some application and misapplication of induced polyploidy to plant breeding. *In* Polyploidy: biological relevance (ed. W.H. Lewis) Vol.13, pp. 445-470. NewYork: Plenum Press.

Dhooghe, E., Denis, S., Eeckhaut, T., Reheul, D. and Van Labeke, M.C. 2009a. *In vitro* induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. Euphytica 168: 33-40.

Dhooghe, E., Grunewald, W., Leus, L. and Van Labeke, M.C. 2009b. *In vitro* polyploidisation of *Helleborus* species. Euphytica 165: 89-95.

Dhooghe, E., Van L.K., Eeckhaut, T., Leus, L. and Van, H.J. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissue *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 104: 359-373.

Dolezel, J., Greilhuber, J. and Suda, J. 2007. Flow cytometry with plants: An overview. *In* Flow Cytometry with Plant Cells (eds. J. Dolezel, J. Greilhuber and J. Suda), pp. 41-65. Weinheim : Wiley Press.

Dubcovsky, J. and Dvorak, J. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. Science 316: 1862-1865.

Dutt, M., Vasconcellos, M., Song, K.J., Gmitter, F.G. and Grosser, J.W. 2010. *In vitro* production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. Euphytica 173: 235-242.

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

Eeckhaut, T., Leus, L. and Van, H. J. 2005. Exploitation of flow cytometry for plant breeding. Acta Physiologia Plantarum 27: 743-750.

Eeckhaut, T., Werbrouck, S., Leus, L., Van Bockstaele, E. and Debergh, P. 2004. Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 241-246.

Escandon, A.S., Miyajima, I., Alderete, M., Hagiwara, J.C., Facciuto, G., Mata, D. and Sato. S.M. 2005. Wild ornamental germplasm exploration and domestication based on biotechnological approaches. *In vitro* colchicine treatment to obtain a new cultivar of *Scoparia montevidensis*. Electronic Journal of Biotechnology 8: 204-211.

Franck, T., Kevers, C., Gaspar, T., Dommes, J., Deby, C., Greimers, R., Serteyn, D. and Deby-Dupont, G. 2004. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. Plant Physiology and Biochemistry 42: 519-527.

Gajdosova, A., Vookova, B., Kormutak, A., Libiakova, G. and Dolezel, J. 1995. Induction protein composition and DNA ploidy level of embryogenic calli of silver fir and its hybrids. Biologia Plantalum 37: 169-176.

Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.R., Ayres, N.M., Sharma, D.P. and Firoozabady, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissue. Science 220: 1049-1051.

Ganga, M. and Chezhiyan, N. 2002. Influence of the antimitotic agents colchicine and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 77: 572-575.

Gantait, S., Mandal, N., Somnath, B. and Prakash, K.D. 2011. Induction and identification of tetreaploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. Plant Cell, Tissue and Organ Culture doi: 10.1007/s 11240-011-9947-1.

Gao, S.L., Zhu, D.N., Cai, Z.H. and Xu ,D.R. 1996. Autotetraploid plants from colchicine treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 73-77.

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

Greplova, M., Polzerova, H. and Domkarova, J. 2009. Intra- and interspecific crosses of *Solanum* materials after mitotic polyploidization *in vitro*. Plant Breeding 128: 651-657.

Groll, J., Mycock, D.J., Gray, V.M. and Laminski, S. 2001. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. Plant Cell, Tissue and Organ culture 65: 201-210.

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

Hamill, S., Smith, M. and Dodd, W. 1992. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. Australian Journal of Botany 40: 887-896.

Heping, H., Shanlin, G., Lanlin, C. and Xiaoke, J. 2008. *In vitro* induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis*. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 44: 448-455.

Hilae, A. and Te-chato, S. 2005. Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Songklanakarin Journal Science Technology 27: 630-635.

Hodgson, J.G., Sharafi, M., Jalili, A., Dı´az, S., Montserrat-Martı´, G., Palmer, C., Cerabolini, B., Pierce, S., Hamzehee, B., Asri, Y., Jamzad, Z., Wilson, P., Raven, J.A., Band, S.R., Basconcelo, S., Bogard, A., Carter, G., Charles, M., Castro-Dı´ez, P., Cornelissen, J.H.C., Funes, G., Jones, G., Khoshnevis, M., Pe´rez-Harguindeguy, N., Pe´rez-Rontome´, M.C., Shirvany, F.A., Vendramini, F., Yazdani, S., Abbas-Azimi, R., Boustani, S., Dehghan, M., Guerrero-Campo, J., Hynd, A., Kowsary, E., Kazemi-Saeed, F., Siavash, B., Villar-Salvador, P., Craigie, R., Naqinezhad, A., Romo-Dı´ez, A., de Torres Espuny, L. and Simmons, E. 2010. Stomatal vs. genome size in angiosperms: the somatic tail wagging the genomic dog?. Annals of Botany 105: 573-584.

Ishigaki, G., Gondo, T., Suenaga, K. and Akashi, R. 2009. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. Japanese Society of Grassland Science 55: 164-170.

Jackson, B.P. and Rowson, J.M. 1953. Alkaloid biogenesis in tetraploid *Stramonium*. Journal of Pharmacy and Pharmacology 5: 778-793.

James, D.J., Mackenzie, K.A.D. and Malhotra, S.B. 1987. The induction of hexaploidy in *cherry rootstocks* using *in vitro* regeneration techniques. Theoretical and Applied Genetics 73: 589-594.

Jesus-Gonzalez, L.D. and Weathers, P.J. 2003. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Reports 21: 809-813.

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

Kanchanapoom, K. and Domyoas, P. 1999. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. ScienceAsia 25: 193-200.

Kei-ichiro, U., Susan, C. and Kalidas, S. 1998. Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. isolated from oregano. Process Biochemistry 33: 441-445.

Kermani, M.J., Sarasan, V., Roberts, A.V., Yokoya, K., Wentworth, J. and Sieber, V.K. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. Theoretical and Applied Genetics 107: 1195-1200.

Khalil, S.M., Cheah, K.T., Perez, E.A., Gaskill, D.A. and Hu, J.S. 2002. Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB CV. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 20: 1128-1134.

Khosravi, P., Kermani, M.J., Nematzadeh, G.A., Bihamta, M.R. and Yokoya, K. 2008. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. Euphytica 160: 267-275.

Koarapatchaikol, K., 2007. Polyploidy plant production via shoot bud-derived callus of diploid banana (*Musa* spp.) by oryzalin. Ph.D. Dissertation in Biology. Prince of Songkla University.

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

Leitch, A.R. and Leitch, I.J. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. Science 320: 481-483.

Leus, L., Van Laere, K., Dewitte, A. and van Huylenbroeck, J. 2009. Flow cytometry for plant breeding. Acta Horticulturae 836: 221-226.

Li, W.L., Berlyn, G.P. and Ashton, P.S. 1996. Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficient in *Betula papyrifera* (Betulaceae). American Journal of Botany 83: 15-20.

Li, W.D., Biswas, D.K., Xu, H., Xu, C.Q., Wang, X.Z., Liu, J.K. and Jiang, G.M. 2009. Photosyn thetic responses to chromosome doubling in relation to leaf anatomy in *Lonicera japonica* subjected to water stress. Functional Plant Biology 36: 783-792.

Lioret, C. 1981. Vegetative propagation of oil palm by somatic embryogenesis. *In* Oil Palm in the Eighties. (eds. E. Pushparajah and P.S. Chew) Vol. I, pp. 163-172. Kuala Lumpur: Incorporated Society of Planters.

Liu, Q.Z., Zhao, H.J., Liu, P., Mong, R.G. and Freddi, H. 2001. Regeneration of tetraploid plants of royal gala apple variety from *in vitro* leave treated with colchicine. Journal of Fruit Science 18: 7-10.

Liu, Z. and Gao, S. 2007. Micropropagation and induction of autotetraploid plants of *Chrysanthemum cinerarifolium* (Trev.) Vis. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 43: 404-408.

Liu, G., Li, Z. and Bao, M. 2007. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. Euphytica 157: 145-154.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Dolezel, J., and Santos, C. 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. Annals of Botany 100: 875-888.

Luckett, D. 1989. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. Euphytica 42: 177-182.

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

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

Maximova, S.N., Alemanno, L., Young, A., Ferriere, N., Traore, A. and Guiltinan, M.J. 2002. Efficiency, genotypic variability and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 38: 252-259.

Nguyen, T.T., Kenji, U., Ikuo, M., Yukio, O., and Hiroshi, O. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72: 19-25.

Nimura, M., Kato, J., Horaguchi, H., Mii, M. and Sakai, K. 2006. Induction of fertile amphi-diploids by artificial chromosome-doubling in interspecific hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus* Thunb. Breeding Science 56: 303-310.

Notsuka, K., Tsuru, T. and Shiraishi, M. 2000. Induced polyploidy grapes via *in vitro* chromosome doubling. Journal of The Japanese Society for Horticultural Science 69: 543-551.

Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M.E. and Moghadam, M.S. 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production 4: 87-98.

Omran, A., and Mohamad, B.N. 2008. Polyploidization effect in two diploid cotton (*Gossypium herbaceum* L. and *G. arboretum* L.) species by colchicines treatments. African Journal of Biotechnology 7: 102-108.

Omran, S.A., Guerra-Sanz, J.M. and Cardenas, J.A.G. 2008. Methodology of tetraploid induction and expression of microsatellite alleles in triploid watermelon. *In*: Proceedings 4th Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae, (ed. M. Pitrat), pp. 381-384. Avignon : INRA.

Osborn, T.C., Pires, J.C., Birchler, J.A., Auger, D.L., Chen, Z.J., Lee, H.S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R.W., Colot, V. and Martienssen, R.A. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends in Genetics 19: 141-147.

Otto, S.P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. Cell 131: 452-462.

Parisod, C., Holderegger, R. and Brochmann, C. 2010. Evolutionary consequences of autopoly ploidy. New Phytologist 186: 5-17.

Perry, J.L. and Lyrene, P.M. 1984. *In vitro* induction of tetraploidy in *Vaccinium darrowi*, *V. elliottii, V. darrowi* and *V. elliottii* with colchicine treatment. Journal of the American Society for Horticultural Science 109: 4-6.

Petersen, K.K., Hagberg, P. and Kristiansek, K. 2003. Colchicine and oryzalin mediated-chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 137-146.

Predieri, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 185-210.

Pustovoitova, T.N., Eremin, G.V., Rassvetaeva, E.G., Zhdanova, N.E. and Zholkevich, V.N. 1996. Drought resistance, recovery capacity, and phytohormone content in polyploid plum leaves. Russian Journal of Plant Physiology 43: 232-235.

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

Ram, J.S. 2000. Plant Cytogenetics. Illinois : CRC Press Inc.

Rauf, S., Khan, I.A. and Khan, F.A. 2006. Colchicine-induced tetraploidy and changes in allele frequencies in colchicine-treated populations of diploids assessed with RAPD markers in *Gossypium arboreum* L. Journal of Biology 30: 93-100.

Rego, M.M., Rigo, E.R., Bruckner, C.H., Finger, F.L. and Otoni, W.C. 2011. *In vitro* induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture doi: 10.1007/s11240-011-9995-6.

Riddle, N.C., Kato, A. and Birchler, J.A. 2006. Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays* L. Theoretical and Applied Genetics 114: 101-111.

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

Roberts, A.V. 2007. The use of bead beating to prepare suspensions of nuclei for flow cytometry from fresh leaves, herbarium leaves, petals and pollen. Cytometry Part A 71: 1039-1044.

Rowson, J.M. 1949. Increased alkaloid contents of induced polyploid of *Datura*. Nature 154: 81-82.

Rubuluza, T., Nikolova, R.V., Smith, M.T. and Hannweg, K. 2007. *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. South African Journal of Botany 73: 259-261.

Sariano, M., Cistué, L., Vallés, M.P. and Castillo, A.M. 2007. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bred wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 91: 225-234.

Sebastiampillai, A.R. and Jones, J.K. 1976. Improved techniques for the induction and isolation of polyploids in the genus *Fragaria*. Euphytica 25: 725-735.

Shao, J., Chen, C., and Deng, X. 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 241-246.

Sharma, A.K. and Sharma, A. 1980. Chromosome Technique-3rd. Butterworth: Inc. Fakenham Press Ltd.

Shiga, I., Uno, Y., Kanechi, M. and Inagaki, N. 2009. Identification of polyploidy of *in vitro* anther-derived shoots of *Asparagus officinalis* L. by flow cytometric analysis and measurement of stomatal length. Journal of The Japanese Society for Horticultural Science 78:103-108.

Sigurbjornsson, B. 1983. Induced mutations. *In* Crop Breeding. (ed. D.R. Wood), pp. 153-176. Wisconsin : American Society of Agronomy.

Srisawat, T., Kanchanapoom, K., Pattanapanyasat, K., Srikul, S. and Chuthammathat, W. 2005. Flow cytometric analysis of oil palm : a preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration Songklanakarin Journal Science Technology 27: 645-652.

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

Stanys, V., Stanine, G. and Siksnias, T. 2004. *In vitro* induction of polyploidy in *Ribes*. Acta Universitatis Latviensis, Biology 676: 235-237.

Stanys, V., Weckman, A., Staniene, G. and Duchovskis, P. 2006. *In vitro* induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomele japonica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 263-268.

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

Sun, Q.R., Sun, H.S., Li, L.G. and Bell, R.L. 2009. *In vitro* colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar 'Fertility'. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 84: 548-552.

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

Tal, M. 1980. Physiology of polyploids. *In* Polyploidy: Biological Relevance (ed. W.H. Lewis) Vol. 13, pp. 61-76. New York : Plenum Press.

Tang, Z.Q., Chen, D.L., Song, Z.J., He, Y.C. and Cai, D.T. 2010. *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 102: 213-220.

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

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

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.

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.

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.

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

Uozu, S., Ikehashi, H., Ohmido, N. and Ohtsubo, H. 1997. Repetitive sequences:cause for variation in genome size and chromosome morphology in the genus *Oryza*. Plant Molecular and Biology 35: 791-799.

Urwin, N.A.R. and Horsnell, J.M.T. 2007. Generation and characterization of colchicine induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. Euphytica 156: 257-266.

Vainola, A. 2000. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. Euphytica 112: 239-244.

van Duren, M., Morpugo, R., Dolezel, J. and Afza, R. 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminate*) by *in vitro* techniques. Euphytica 88: 25-34.

Vanstechelman, I., Eeckhaut, T., Van Huylenbroeck, J. and Van Labeke, M. 2010. Histogenic analysis of chemically induced mixoploids in *Spathiphyllum wallisii*. Euphytica 174: 61-72.

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.

Wan, Y., Duncan, D.R., Rayburn, A.L., Petolino, J.F. and Widholm, J.M. 1991. The use of anti-microtubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. Theoretical and Applied Genetics 81: 205-211.

Warner, D.A. and Edwards, G.E.1989. Effects of polyploidy on photosynthetic rates, photosynthetic enzymes, contents of DNA, chlorophyll and sizes and numbers of photosynthetic cells in the C4 dicot *Atriplex confertifolia*. Plant Physiology 91: 1143-1151.

Xiong, Y.C., Li, F.M. and Zhang, T. 2006. Performance of wheat crops with different chromosome ploidy: root-sourced signals, drought tolerance, and yield performance. Planta 224: 710-718.

Xu, L., Najeeb, U., Naeem, M.S., Daud, M.K., Cao, J.S., Gong, H.J., Shen, W.Q. and Zhou, W.J. 2010. Induction of tetraploidy in *Juncus effusus* by colchicine. Biologia Plantarum 54: 659-663.

Yan, O., Zubo, M.V., Yamburenko, S.Y., Selivankina, F.M., Shakirova, A.M., Avalbaev, N.V., Kudryakova, N.K., Zubkova, K.L., Olga, N.K., Victor, V.K. and Thomas, B. 2008. Cytokinin stimulates chloroplast transcription in detached barley leaves. Plant Physiology 148: 1084-1093.

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

Ye, Y.M., Tong, J., Shi, X.P., Yuan, W. and Li, G.R., 2010, Morphological and cytological studies of diploid and colchicine induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Scientia Horticulturae 124: 95-101.

Zeng, S.H., Chen, C.W., Liu, H., Liu, J.H. and Deng, X.X. 2006. *In vitro* induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 87: 85-93.

Zhang, J., Zhang, M. and Deng, X. 2007. Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis*. Plant Cell , Tissue and Organ Culture 89: 211-216.

Zhang, Z., Dai, H., Xiao, M. and Liu, X. 2008. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. Euphytica 159: 59-65.

Zhang, X.Y., Hu, C.G. and Yao, J.L. 2010a. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. Journal of Plant Physiology 167: 88-94.

Zhang, Q.Y., Luo, F.X., Liu, L. and Guo, F.C. 2010b. *In vitro* induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 101: 41-47.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมัน

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	สูตร MS	สูตร ARDA
ธาตุอาหารหลัก		
NH_4NO_3	1,650.000	1,025.000
KNO_3	1,900.000	800.000
KH_2PO_4	170.000	170.000
$CaCl_2.2H_2O$	440.000	
$MgSO_4.7H_2O$	370.000	
ธาตุอาหารรอง		
KI	0.830	0.415
K_2SO_4		495.000
H_3BO_3	6.200	6.2000
$MnSO_4.H_2O$	16.900	16.900
$ZnSO_4.7H_2O$	10.600	9.600
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	3.138
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250	0.250
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.0125
$FeSO_4.7H_2O$	27.800	27.800
Na_2EDTA	37.300	37.300
สารอินทรีย์		
Myo-inositol	100.000	100.000
Nicotinic acid	0.500	0.500
Pyridoxine HCl	0.500	0.500
Thaiamine HCl	0.100	0.550
Glycine	2.000	2.000
Sucrose (กรัม)	30.000	30.000
วุ้น(กรัม)	7.500	7.500
pH	5.700	5.700

ตารางภาคผนวกที่ 2 สารเคมีที่ใช้ศึกษาจำนวนโครโมโซม

สารเคมี	**ปริมาณสาร**
Paradichlorobenzene	50 มล.
acetic acid : alcohol	1 : 3
hydrochloric acid	1 นอร์มอล
Carbon fuchsin	2 %

ตารางภาคผนวกที่ 3 สารเคมีที่ใช้ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ โดยโฟลไซโทเมทรี

สารเคมี	**ปริมาณสาร**
สารละลายบัฟเฟอร์	
Tris-HCl	50.00 มก/ล.
Polyvinylpyrolidone (PVP)	0.05 %
Triton-X	0.01 %
Sodium sulphite	0.63 %
pH	7.50
สีย้อมดีเอ็นเอ	
Propidium iodide (PI)	0.10 %

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางไซนีย๊ะ สะมาลา

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210630017

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (พฤกษศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2543
วิทยาศาสตรบัณฑิต (การแพทย์แผนไทย)	มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช	2552
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์ สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์ สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ไซนีย๊ะ สะมาลา และสมปอง เตชะโต. 2553. ผลของคอลชิซีนต่อการเจริญและพัฒนาของ SSE ปาล์มน้ำมัน. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร. 41(2)(พิเศษ): 237-240.

ไซนีย๊ะ สะมาลา และสมปองเตชะโต. 2555. การเพิ่มชุดโครโมโซมของปาล์มน้ำมันโดยใช้โคลชิ-ซีนในหลอดทดลอง. วารสารเกษตร. (28)(1): 51-59.

Samala, S. and Te-chato, S. 2010. Effects of Colchicine Treatments on Physiological Characteristics of Secondary Somatic Embryos of Oil Palm *in vitro.* The 7th Regional IMT-GT Uninet and The 3nd Joint PSU-UNS International Conference on 7-8 October: Songkla.

Samala, S. and Te-chato, S. 2011. Morphological characters of putative tetraploid oil palm plantlets from *in vitro* colchicine treatment. The 37th Congress on Science and Technology of Thailand on 10-12 October: Bangkok.

Samala, S. and Te-chato, S. 2012. Ploidy induction through secondary somatic embryo (SSE) of oil palm by colchicine treatment. Journal of Agricultural Technology 8(1): 337-352.