การตอบสนองของเซลล์ปาล์มน้ำมันในซัสเพนชันต่อความเค็มโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ในหลอดทดลอง

In Vitro Response of Oil Palm Cell in Suspension to Salinity by Sodium Chloride

นายธีรศักดิ์ สุขดี

Thirasak Sukdee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตอบสนองของเซลล์ปาล์มน้ำมันในซัสเพนชันต่อความเค็มโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ในหลอดทดลอง

In Vitro Response of Oil Palm Cell in Suspension to Salinity by Sodium Chloride

นายธีรศักดิ์ สุขดี
Thirasak Sukdee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตอบสนองของเซลล์ปาล์มน้ำมันในซัสเพนชันต่อความเค็มโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นายธีรศักดิ์ สุขดี

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ดร. สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาวดี รามสูตร)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ

(ดร. สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

.....กรรมการ

(ดร. ทัศนี ขาวเนียม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษา และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นายธีรศักดิ์ สุขดี)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อนและไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายธีรศักดิ์ สุขดี)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตอบสนองของเซลล์ปาล์มน้ำมันในซัสเพนชันต่อความเค็มโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ในหลอดทดลอง
ผู้เขียน นายธีรศักดิ์ สุขดี
สาขาวิชา พืชศาสตร์
ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ให้ผลผลิตน้ำมันสูงที่สุดและตลอดทั้งปี จึงต้องมีการใส่ปุ๋ยบ่อยครั้ง ส่งผลให้สภาพพื้นที่ปลูกมีความเค็มมากขึ้น ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้สนใจศึกษาผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ และพัฒนาการของเซลล์ในซัสเพนชันในขั้นต้นเป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมัน (oil palm culture medium; OPCM) เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ย 12.56 มิลลิเมตร ใหญ่กว่าสูตรอาหาร Eeuwen (Y_3) นอกจากนี้พบว่า แคลลัสที่ไม่ผ่านการสับให้อัตราการเจริญสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 147.5 มิลลิกรัม และการวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่เติม N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea (CPPU) ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าอาหารที่ไม่เติม CPPU ให้อัตราการเจริญสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 230 มิลลิกรัม หลังจากนั้นย้ายเลี้ยงแคลลัสลงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0 50 100 150 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์) ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ซัสเพนชันสูงสุด 749 มิลลิกรัม ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 1.58 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารโซเดียมคลอไรด์ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันลง 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 166.73 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ส่งเสริมให้เซลล์สร้างโพรลีนสูงสุด 64.93 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ความเข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าการนำไฟฟ้าสูงสุด 3.77 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร และค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์สูงสุด 82.22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายเซลล์ในซัสเพนชันไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น

200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เซลล์ในอาหารเหลวเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด 183.08 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 297.50 มิลลิกรัม สรุปได้ว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ กระตุ้นการเจริญเติบโตของแคลลัสมากกว่าชุดควบคุม และเซลล์ปาล์มน้ำมันไม่สามารถทนความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเกินกว่า 200 มิลลิโมลาร์ได้

Thesis Title	*In Vitro* Response of Oil Palm Cell in Suspension to Salinity by Sodium Chloride
Author	Mr. Thirasak Sukdee
Major Program	Plant Science
Academic Year	2019

Abstract

Oil palm is an oil crop that produces the highest oil yield throughout the year. Due to frequent application of fertilizer results in severe salinity of planting areas. Therefore, the objective of this research was to study the effect of different concentrations of sodium chloride (NaCl) on growth and development of cell in suspension culture. First of all, factors affecting callus proliferation of oil palm SUP-PSU 1 calli were investigated. The results showed that OPCM supplemented with 0.1 mg/l dicamba and 200 mg/l ascorbic acid gave average size of callus at 12.56 mm higher than Y_3 medium after culture for 4 weeks. Moreover, non-chopped callus gave the best results in terms of growth rate (100%) and fresh weight (147.5 mg). In case of plant growth regulators (PGRs), without N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea (CPPU) containing solidified OPCM gave the best results in growth rate (100%) and fresh weight (230 mg) of calli. After that, the calli were transferred to liquid OPCM supplemented with the same component and different concentrations of NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 300 and 400 mM). The results showed that 50 mM NaCl gave the best results in fresh weight of cell in suspension at 749 mg, packed cell volume (PCV) at 1.58 ml after culture for 12 weeks. At that period of culture the concentration of NaCl which inhibited growth of the calli at 50 % (IC_{50}) was 166.73 mM. NaCl at concentration of 200 mM induced cells in suspension culture to produce the highest proline content at 64.93 µg/g fresh weight while 400 mM NaCl gave the highest electrical conductivity (EC) at 3.77 mS/cm and electrolyte leakage (EL) at 82.22%. After transferring cells from NaCl containing liquid OPCM to NaCl-free solidified OPCM with 0.1 mg/l dicamba and 200 mg/l ascorbic acid, 50 mM NaCl containing OPCM gave the best results in callus growth rate at 183.08 % and callus fresh weight at 297.50 mg. In conclusion, 50 mM

NaCl could stimulate higher growth of callus than that of control (without NaCl). The results also suggested that cells of oil palm could not stand to NaCl at concentrations higher than 200 mM.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร. สุรีรัตน์ เย็นช้อน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมเป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในการดำเนินชีวิต คอยให้คำปรึกษาการทำวิจัย การปฏิบัติงานทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเก็บรวบรวมข้อมูล การตรวจสอบเนื้อหาและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาวดี รามสูตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. ทัศนี ขาวเนียม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอาใจใส่เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ นายสุเทพ สุขดี บิดา นางอารีรัตน์ สุขดี มารดา พี่ชายน้องชาย และญาติพี่น้องทุกคน ที่เป็นแรงพลักดัน และกำลังใจที่สำคัญที่สุด คอยให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน คอยอบรมสั่งสอน ตลอดจนช่วยเหลือในทุนการศึกษา และให้การสนับสนุนเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทั้งในวิชาเอกพืชศาสตร์ และภาควิชาอื่น ๆ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่ได้กรุณาอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ ทั้งทางด้านวิชาการ คุณธรรม และจริยธรรม ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของวิชาเอกพืชศาสตร์ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือทางด้านต่าง ๆ จนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา

วิทยานิพนธ์นี้ ได้รับการสนับสนุนจาก โครงการผลิตและพัฒนาบุคลากรด้วยความร่วมมือจากมูลนิธิชัยพัฒนาและมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ทุนสนับสนุนจากศูนย์วิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 3 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก วิชาเอกพืชศาสตร์ สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คอยตักเตือนเมื่อทำผิดพลาด และเป็นที่ปรึกษาทั้งด้านการทำวิจัยและดำเนินชีวิต จนข้าพเจ้าทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ธีรศักดิ์ สุขดี

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ		(5)
Abstract		(7)
กิตติกรรมประกาศ		(9)
สารบัญ		(10)
รายการตาราง		(11)
รายการภาพประกอบ		(13)
สัญลักษณ์ คำย่อ และตัวย่อ		(17)
หนังสือตอบรับตีพิมพ์		(18)
สรุปเนื้อหา		
บทที่ 1 บทนำต้นเรื่อง		1
	การตรวจเอกสาร	2
	วัตถุประสงค์	8
บทที่ 2 การทดลอง		
	การทดลองที่ 1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1	9
	การทดลองที่ 2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และระยะเวลาในการทรีตด้วยโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการตอบสนองของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงซัสเพนชัน	26
	การทดลองที่ 3 ผลของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลว 2-iP และซอร์บิทอลต่อการฟื้นตัวและการตอบสนองของเซลล์ในซัสเพนชันบนอาหารแข็งที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์	57
บทที่ 3 สรุป		82
เอกสารอ้างอิง		84
ภาคผนวก		90
ผลงานตีพิมพ์		92
ประวัติผู้เขียน		107

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ผลของสูตรอาหารที่ต่างกันต่อขนาดของแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	15
2.2	ผลของจำนวนครั้งในการสับต่อน้ำหนักสดและจำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอดของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	18
2.3	ผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ CPPU ต่อการตอบสนองของแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	21
2.4	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการตอบสนองของเซลล์ในซัสเพนชันในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	34
2.5	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการตอบสนองของเซลล์ในซัสเพนชันในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	35
2.6	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการตอบสนองของเซลล์ในซัสเพนชันในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	37
2.7	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลวต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	63

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
2.8	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลวต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	66
2.9	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชัน dicamba และ 2-iP ต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	73
2.10	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชัน dicamba และ 2-iP ต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	75
2.11	ผลของความเข้มข้นของซอร์บิทอลต่อการเจริญ (น้ำหนักสด และขนาด) ของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	78

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.1	ลักษณะเซลล์ของ *Nitraria tangutorum* ในซัสเพนชัน ที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับการเติม BA เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 วัน	7
2.1	ลักษณะของแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 ลูกผสมเทเนอรา (เบอร์ 25) ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	12
2.2	ผลของสูตรอาหารและระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงต่อขนาดของแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	16
2.3	ลักษณะแคลลัสของปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 (ก) และ OPCM (ข) เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	16
2.4	ลักษณะของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ผ่านการสับด้วยจำนวนครั้งต่างกัน วางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	19
2.5	ลักษณะของแคลลัสที่ผ่านการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม CPPU ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	22
2.6	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และระยะเวลาของการวางเลี้ยงต่อน้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชัน ในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	38

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
2.7	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และระยะเวลาของการวางเลี้ยงต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในซัสเพนชัน ในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	39
2.8	ลักษณะของกลุ่มเซลล์ในซัสเพนชันที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4, 8 และ 12 สัปดาห์	41
2.9	ลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชันที่ได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4, 8 และ 12 สัปดาห์	43
2.10	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเกิดโครงสร้างคล้ายรากของเซลล์ในซัสเพนชันที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	44
2.11	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโพรลีนของเซลล์ในซัสเพนชันที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	45
2.12	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโปรตีนรวมของเซลล์ในซัสเพนชันที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	46
2.13	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่า EC ของอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนเพาะเลี้ยง (EC_1) และหลังเพาะเลี้ยง (EC_2) เซลล์ซัสเพนชัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	47

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
2.14	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า EC ของอาหารก่อนเพาะเลี้ยงและหลังเพาะเลี้ยง และลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชัน ที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	48
2.15	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ของเซลล์ซัสเพนชันที่ได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	49
2.16	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า EC ของอาหารก่อนเพาะเลี้ยงและหลังเพาะเลี้ยง และค่า EL ของเซลล์ซัสเพนชันที่ได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	50
2.17	ลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชันในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	51
2.18	ลักษณะของแคลลัสที่พัฒนาจากการย้ายเซลล์ในซัสเพนชันที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	64
2.19	ผลของโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันต่ออัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	67

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
2.20	ผลของโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันต่อน้ำหนักสดของแคลลัสหลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	68
2.21	ผลของโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันต่อขนาดของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	69
2.22	ผลของโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันต่อจำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอดที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	70
2.23	ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการย้ายเซลล์ในซัสเพนชันที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับการเติม dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	71
2.24	ลักษณะของแคลลัสจากการย้ายเซลล์ในซัสเพนชันเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกัน ไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba และ 2-iP ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	77
2.25	ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติมซอร์บิทอลความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	79

สัญลักษณ์ คำย่อ และตัวย่อ

MS	=	Murashige and Skoog medium
OPCM	=	Oil palm culture medium
Y_3	=	Eeuwens medium
VW	=	Vacin and Went medium
NaCl	=	Sodium chloride
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
Dicamba	=	3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid
BA	=	6-benzyladenine
NAA	=	α-naphthaleneacetic acid
BAP	=	benzyl aminopurine
2-iP	=	N^6- (2-isopentenyl) adenine
CPPU	=	N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea
BSA	=	Bovine serum albumin
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan’s multiple range test
SE	=	Somatic embryo
MDA	=	Malondialdehyde
EC	=	Electrical conductivity
EL	=	Electrolyte leakage
IC_{50}	=	50% inhibition concentration
GI	=	Growth index

หนังสือตอบรับการตีพิมพ์

Pusat Pengajian
Sains Kajihayat
School of
Biological Sciences

11800 USM, Pulau Pinang, Malaysia
T : 604 653 3181
604 653 3529, 604 653 3906
F : 604 656 5125, 604 653 4060
E : dean_bio@usm.my
L : www.usm.my

24th October 2018

Dear Teerasak Sukdee,

We are pleased to inform you that your abstract has been accepted for the 11th IMT-GT UNINET Conference 2018, "Bioscience for A Sustainable Future", which will take place on 11-12 December 2018 in Penang, Malaysia.

Abstract title	: **Effect of sodium chloride on growth and proliferation of cell suspension culture of oil palm SUP-PSU**
Presentation type	: **Poster**

Please refer to https://imtgtuninet.wixsite.com/2018 for guidelines of the presentation.

Kindly ensure that you pay the registration fees **no later than 31st of October 2018** to enjoy the early-bird registration fee. Failure to do so will cause your registration fee to be replaced to the normal rate. Finally, upload the proof of payment at conference@USM portal. Please refer to our conference payment T&C in the website for further information.

*Please be informed that registration without payment will cause your abstract to be withdrawn.

Details of your presentation slot will be informed later. You are encouraged to submit an extended abstract, which will be published in the Conference e-Proceeding. The extended abstract submission deadline is on the 31st of October 2018. Please refer to the website for further information on submission.

Thank you for your interest in participating in the conference. We look forward to seeing you in Penang, Malaysia!

Sincerely,

Conference Secretariat
IMT-GT 2018

11th IMT-GT
UNINET
CONFERENCE
2018
11 - 12 Dec. 2018
HOTEL JEN, Penang
MALAYSIA
Bioscience
for a Sustainable
Future
CONFERENCE
PROCEEDING
USM
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA
APEX
SBS School of Biological Sciences
CEMACS

บทที่ 1

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้น อยู่ในวงศ์ Arecaceae สกุล *Elaeis* แบ่งเป็น 3 ชนิด (species) คือ *E. guineensis* *E. oleifera* และ *E. odora* โดยทั่วไปปาล์มน้ำมันที่เป็นพันธุ์ปลูก คือ *E. guineensis* แบ่งเป็น 3 แบบ อาศัยตามลักษณะของกะลา คือ ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา (ธีระ, 2554) ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ น้ำมันปาล์มเป็นน้ำมันจากพืชที่มีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำมันจากพืชชนิดอื่น โดยผลผลิตน้ำมันปาล์มต่อพื้นที่ปลูกสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น 6-10 เท่า (เชฐชุดา, 2561) ปัจจุบันปริมาณการผลิตน้ำมันจากปาล์มจัดอยู่ในอันดับที่ 1 ของโลกเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตน้ำมันจากพืชอื่น ๆ ทุกชนิด โดยประเทศอินโดนีเซียผลิตน้ำมันปาล์มได้มากที่สุด รองลงมาคือประเทศมาเลเซีย และไทยตามลำดับ (ณรงค์ฤทธิ์ และลัดดา, 2561) ปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในด้านการบริโภคและพลังงานชีวภาพ อีกทั้งยังสามารถทนทานต่อสภาวะแล้ง และผ่านการปรับปรุงพันธุ์ให้มีผลผลิตน้ำมันสูง (ธีระ, 2554) การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่นำมาใช้ในการขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณในหลอดทดลองแทนการใช้เมล็ด เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้าม

การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยการเพาะเมล็ด ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม แต่การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการทั่วไปนั้นไม่สามารถทำได้ เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีเพียงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเพียง 1 ชุด ไม่มีตาด้านข้างจึงไม่สามารถแยกหน่อ ปักชำ ตอนกิ่ง หรือติดตาได้ ปัจจุบันการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่นิยม เพราะสามารถขยายพันธุ์ได้ปริมาณมากในระยะเวลาที่รวดเร็วผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ร่างกาย ชักนำให้เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นเอ็มบริโอ เรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo; SE) นอกจากนี้ยังพบว่าพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่ของประเทศคิดเป็น 85 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในภาคใต้ซึ่งอยู่ในสภาพภูมิประเทศที่ติดชายฝั่ง ทั้งฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามัน (เชฐชุดา, 2561) ประกอบกับปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่สามารถให้ผลผลิตทะลายได้ตลอดทั้งปี โดยมีอายุเก็บเกี่ยวผลผลิตได้นานกว่า 25 ปี (ธีระ, 2554) จึงต้องมีการจัดการดูแล ใส่ปุ๋ยซ้ำ ๆ เป็นเวลานาน ส่งผลให้บริเวณ

พื้นที่ปลูกมีสภาพความเค็มมากขึ้น ซึ่งสภาวะดินเค็มเป็นปัจจัยจากสภาพแวดล้อมที่สำคัญปัจจัยหนึ่งที่จำกัดการเจริญเติบโตของพืช

สภาวะเครียดจากความเค็มของดินส่งผลกระทบต่อกระบวนการต่าง ๆ ที่สำคัญภายในเซลล์พืช เช่น กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง กระบวนการสังเคราะห์โปรตีน และกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ เป็นต้น ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยทั่วไปรวมทั้งปาล์มน้ำมัน เนื่องจากสภาวะเครียดเค็มก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ กรดนิวคลีอิก และโปรตีน (ทวิพร และนุชนาถ, 2557) สภาวะเครียดเค็มยังยับยั้งการขนถ่ายธาตุอาหารบางชนิด เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม เป็นต้น (Hanson *et al*., 1994) อย่างไรก็ตาม มีหลายการศึกษาแสดงให้เห็นถึงผลกระทบอื่น ๆ จากสภาวะเครียดเค็ม ทั้งผลในด้านบวก และด้านลบ เช่น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง ทั้งนี้ผลกระทบที่เกิดขึ้นแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และชนิดของพืช (Qados, 2011) อย่างไรก็ตาม ความทนทานต่อสภาวะเค็มของปาล์มน้ำมันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์ปาล์มน้ำมันในซัสเพนชันต่อความเค็มโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ในหลอดทดลองเพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ที่ทนทานหรือต้านทานเพื่อสร้างปาล์มน้ำมันพันธุ์ทนเค็มต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะพืช มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่ถูกทำให้อยู่ในสภาพที่ปลอดเชื้อ ภายใต้สภาพแวดล้อมที่สามารถควบคุมได้ ไม่ว่าจะเป็น ความชื้น แสง อุณหภูมิ และการถ่ายเทก๊าซหรือสภาพบรรยากาศ (สมปอง, 2539) เพื่อให้ชิ้นส่วนพืชดังกล่าว ได้รับปัจจัยที่เหมาะสม และส่งเสริมให้ชิ้นส่วนพืชดังกล่าวพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ซึ่งการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และมีความตรงตามพันธุ์ ปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้ามต้น ปกติมีการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการใช้เมล็ดพันธุ์ แต่การขยายพันธุ์ด้วยวิธีดังกล่าว ส่งผลให้พันธุกรรมของลูกผสมที่ได้ไม่สม่ำเสมอแม้ว่าการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเทเนอรานั้นมีการควบคุมการผสมพันธุ์ระหว่างต้น

ดูรากับพิสิเฟอราก็ตาม เนื่องจากพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ ไม่ได้มีความเป็นพันธุ์แท้ที่ชัดเจนมากเพียงพอที่จะทำให้ลูกผสมมีความสม่ำเสมอ และการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการทั่วไปเหมือนพืชชนิดอื่นนั้นไม่สามารถทำได้ เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีเพียงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเพียง 1 ชุด ไม่มีตาด้านข้างจึงไม่สามารถแยกหน่อ ปักชำ ตอนกิ่ง หรือติดตาได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองจึงเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศวิธีการเดียวที่ประสบความสำเร็จและนิยมปัจจุบันสามารถเพาะเลี้ยงส่วนของคัพภะ และใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน ซึ่งสามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้จำนวนมากและมีความตรงตามพันธุ์ โดยมีกระบวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านสองรูปแบบ นั้นคือ การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการออกาโนเจเนซิส คือ การวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารสังเคราะห์ และชักนำให้มีการพัฒนาไปเป็นยอดหรือราก จิระศักดิ์ และคณะ (2555) เพาะเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (VW) เติม benzyl aminopurine (BAP) เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.6 เป็นเวลา 200 วัน ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 1.5 ยอด อย่างไรก็ตามการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการออกาโนเจเนซิสนั้น ไม่เป็นที่นิยมมากนัก เนื่องจากมีหลายขั้นตอน และโดยส่วนใหญ่ปาล์มน้ำมันมีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส คือ การวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารสังเคราะห์ และชักนำให้มีการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการพัฒนาเอ็มบริโอระยะต่าง ๆ จากชิ้นส่วนพืชโดยตรงหรือผ่านการสร้างแคลลัส โดยส่วนใหญ่กระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสของปาล์มน้ำมันมีการพัฒนาจากแคลลัส สมปอง และคณะ (2530) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันจากต้นกล้าอายุ 195 วัน บนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นที่ให้ผลผลิตแล้วบนอาหารเติม 2,4-D และ α-naphthyl acetic acid (NAA) เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มที่จะชักนำแคลลัสได้ดี อาสลัน (2545) เพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นกล้าอายุ 1 ปี บนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 3, 6-dichloro-2-methoxybenzoic-acid (dicamba) เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 11.2 เปอร์เซ็นต์ และ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำเอ็มบริโอ

เจนิคแคลลัสได้สูงสุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ ชาคริยา และคณะ (2560) เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร Y_3 (Eeuwen, 1978) เติม N^6- (2-isopentenyl) adenine (2-iP) เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด ชีรวัลย์ (2560) เพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองของปาล์มน้ำมันได้สูงสุด Heedchim (2019) เพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองของปาล์มน้ำมันบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำการงอกและยืดยาว จากนั้นทำการชักนำรากโดยย้ายต้นอ่อนดังกล่าวไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้อัตราการเกิดรากสูงสุด หลังจากนั้นได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ และย้ายต้นกล้าอนุบาลปลูก

1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน

การนำแคลลัส หรือกลุ่มเซลล์มาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว วางเลี้ยงบนบนเครื่องเขย่าตลอดเวลาภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีการควบคุมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต กลุ่มเซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงมีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงระยะหนึ่งปริมาณเซลล์จะไม่เพิ่มขึ้นอีก จึงต้องทำการย้ายเลี้ยงเพื่อเปลี่ยนอาหารใหม่ การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันโดยใช้แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น กลุ่มเซลล์ในแคลลัสมีการเกาะกันสองรูปแบบ คือแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ และแคลลัสที่เกาะกันแน่น เมื่อนำแคลลัสที่เกาะกันแบบหลวม ๆ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า เซลล์จะแยกหลุดจากกันได้ง่ายกลายเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กที่แขวนลอยอยู่ในอาหารกลายเป็นเซลล์ซัสเพนชัน แต่เมื่อนำแคลลัสที่เกาะกันแน่นมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลววางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า แคลลัสจะแยกเป็นกลุ่มก้อนเรียกว่า คลัมพ์ (clump) ทรรศณีย์ และสมปอง (2555) นำแคลลัสปาล์มน้ำมันมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว สูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 หลังจากวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดที่ 2.41 มิลลิลิตร จากนั้นนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชันมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล 36.43 กรัมต่อลิตร dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 หลังจาก

วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุดที่ 5.6 เอ็มบริโอต่อตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร

2. สภาวะเครียดเค็มในพืช

สภาวะเค็มเป็นปัจจัยจากสภาพแวดล้อมที่สำคัญปัจจัยหนึ่งที่จำกัดการเจริญเติบโตของพืช และเป็นปัจจัยสำคัญที่จำกัดปริมาณ หรือคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งส่งผลเสียต่อการเกษตรที่เหมาะสมต่อปริมาณประชากรโลกที่เพิ่มมากขึ้น (Carillo *et al*., 2011) สภาวะเครียดเค็มส่งผลกระทบต่อกระบวนการต่าง ๆ ที่สำคัญภายในเซลล์พืช ทั้งในด้านของลักษณะทางสัณฐานสรีรวิทยา กายวิภาค และกิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์พืช ทวิพรและนุชนาถ (2557) ได้ทำการทดลองในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 และ 150 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน พบว่าที่ภาวะเกลือเข้มข้นสูงส่งผลให้น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ และปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม เมื่อพืชได้รับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำ พืชจะได้รับผลกระทบน้อย หรือแทบไม่ได้รับผลกระทบเลย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ พืชจะค่อย ๆ ได้รับผลกระทบ ตั้งแต่การงอก การเจริญเติบโต ไปจนถึงการให้ผลผลิตที่ลดลง ในพืชส่วนใหญ่ หรือแม้แต่พืชในพื้นที่น้ำกล่อยก็ตาม เมื่อได้รับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้นจนถึงระดับ 100-200 มิลลิโมลาร์ ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชอย่างรุนแรงหรือส่งผลให้พืชตาย (Carillo *et al*., 2011)

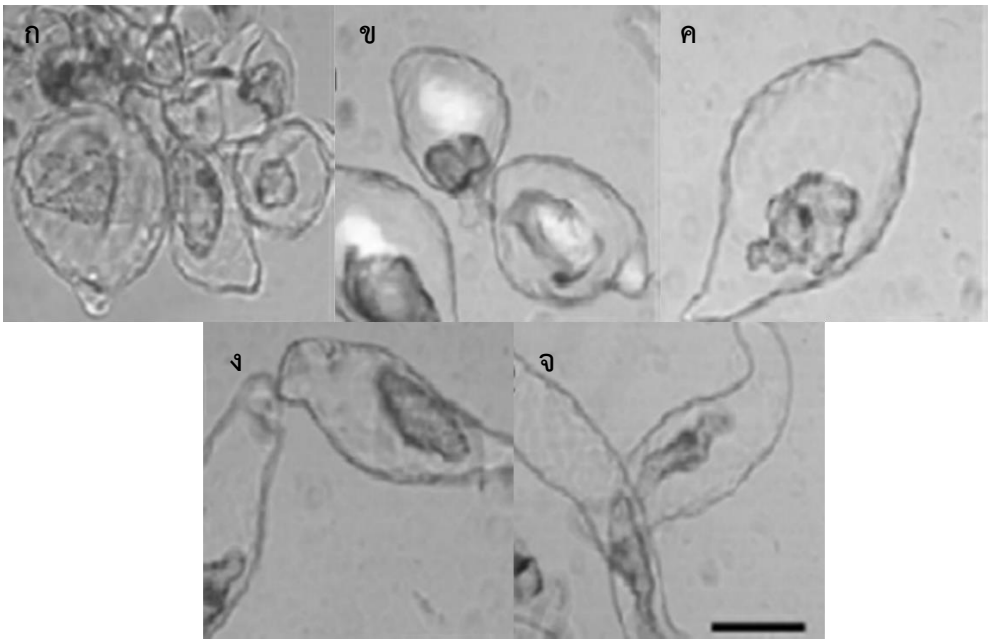
จากหลายรายงานการศึกษาแสดงให้เห็นถึงผลกระทบที่แตกต่างกันของพืชหลายชนิดที่ตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสภาวะเครียดเกลือ เช่น เมื่อถั่วปากอ้าได้รับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำ ไม่ได้ส่งผลกระทบมากนัก หรือแทบจะไม่ส่งผลกระทบต่อความสูง จำนวนใบ พื้นที่ใบ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง แรงดันออสโมติก ปริมาณคลอฟิลล์ หรือปริมาณโปรตีน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น ยิ่งส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึมข้างต้นในทิศทางที่ลดลง (Qados, 2010) เช่นเดียวกันกับถั่วอัลฟัลฟา 4 สายพันธุ์ ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 5 ระดับ ได้แก่ 0 50 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ในหลอดทดลอง พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดของโซเดียมคลอไรด์คือ 50 มิลลิโมลาร์ ไม่มีอิทธิพลต่ออัตราการรอดชีวิตของถั่วอัลฟัลฟา ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบมีอัตราการรอดชีวิตที่ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 100 150 และ 200 อัตราการรอดชีวิตลดลงในทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ (Campanelli *et al*., 2013) Ni และคณะ (2015) ศึกษาผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของโซเดียมคลอไรด์ ต่อการตอบสนองของเซลล์ *Nitraria*

tangutorum ในซัสเพนชัน พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้การเจริญเติบโต สัมพัทธ์ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์ซัสเพนชันลดลง Niknam และคณะ (2011) ศึกษาผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตอบสนองของแคลลัส *Acanthophyllum* โดยวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกันร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ kinetin (KN) เข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 40 วัน พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของแคลลัสลดลง ในขณะที่ปริมาณโปรตีน โพรลีนและ malondialdehyde (MDA) เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ

สภาวะเครียดเค็มที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชนั้น แท้จริงแล้วความเค็มชักนำให้พืชได้รับสภาวะเครียดหลายอย่าง ได้แก่ สภาวะเครียดจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก ความไม่สมดุลของไอออน และสภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระ เป็นต้น (นวรัตน์, 2558) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนั้น ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหาย Khalid และคณะ (2015) ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตอบสนองของ *Camelina sativa* cv. Calena โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดของ *Camelina sativa* บนอาหารสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ค่า electrical conductivity (EC) เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ Małkiewicz และ Fornal (2018) ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตอบสนองของพิทูเนียโดยเพาะเลี้ยงยอดของพิทูเนียบนอาหารสูตร MS ไม่เติมหรือเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ค่า EC เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Muchate และคณะ (2019) ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตอบสนองของปวยเหล็ง โดยเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกันร่วมกับการเติม 2-iP เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte leakage; EL) เพิ่มขึ้น

Daneshmand และคณะ (2010) ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตอบสนองของมันฝรั่ง 3 สายพันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ค่า EL เพิ่มขึ้นในทุกสายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีความเสียหายมากขึ้น นอกจากนี้ Ni และคณะ (2015) ศึกษาผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของโซเดียมคลอไรด์ ต่อการตอบสนองของเซลล์ *Nitraria tangutorum* ในซัสเพนชัน โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกันร่วมกับการเติม BA เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้เซลล์ในซัสเพนชันมีความผิดปกติมากขึ้น โซเดียมคลอไรด์

เข้มข้น 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้รูปร่างของเซลล์มีลักษณะยาวกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย เยื่อหุ้มเซลล์มีการหดตัว (ภาพที่ 1.1ก-ค) โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้รูปร่างของเซลล์มีลักษณะยาวและเยื่อหุ้มเซลล์มีการหดตัว (ภาพที่ 1.1ง) โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้รูปร่างของเซลล์มีลักษณะยาวและเยื่อหุ้มเซลล์มีการหดตัวมากขึ้น บางเซลล์เยื่อหุ้มเซลล์แตก (ภาพที่ 1.1จ)



ภาพที่ 1.1 ลักษณะเซลล์ของ *Nitraria tangutorum* ในซัสเพนชัน ที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับการเติม BA เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 วัน

ก. 0 มิลลิโมลาร์ ข. 100 มิลลิโมลาร์ ค. 150 มิลลิโมลาร์

ง. 200 มิลลิโมลาร์ จ. 250 มิลลิโมลาร์

ที่มา: Ni และคณะ (2015)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1
2. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการตอบสนองของเซลล์ปาล์มน้ำมันในซัสเพนชัน
3. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโปรตีนรวม โพรลีน ค่าการนำไฟฟ้า และค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ของเซลล์ปาล์มน้ำมันในซัสเพนชัน
4. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลวต่อการฟื้นตัวของเซลล์ในซัสเพนชันหลังย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิม
5. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ผ่านการทรีตด้วยสารโซเดียมคลอไรด์

บทที่ 2

การทดลองที่ 1
ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1
Factors Affecting Callus Proliferation of Oil Palm SUP-PSU 1

บทนำ

การเพิ่มปริมาณแคลลัสเป็นขั้นตอนหลังจากที่สามารถชักนำแคลลัสได้ แล้วนำแคลลัสดังกล่าววางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ ชาคริยา และคณะ (2560) ศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ลูกผสมเทเนอรา โดยทำการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ จำนวน 6 สูตร เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันส่งผลให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการตอบสนองแตกต่างกัน อาหารสูตร MS ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคืออาหารสูตร OPCM Y_3 ½Y_3 และ ½MS นอกจากนี้ ปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง ระยะเวลาที่พืชได้รับแสง มีความสำคัญเช่นเดียวกัน การสร้างบาดแผลเป็นหนึ่งในปัจจัยทางกายภาพที่กระตุ้นการเพิ่มปริมาณของแคลลัสได้ เนื่องจากการสร้างบาดแผลส่งเสริมการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของฮอร์โมนพืชมายังบริเวณที่เกิดบาดแผลเพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์มากขึ้น อีกทั้งการสร้างบาดแผลโดยการใช้ใบมีดสับแคลลัสแยกออกจากกันเป็นชิ้นเล็กส่งเสริมการดูดซับธาตุอาหารได้มากขึ้น (รังสฤษดิ์, 2540) นอกจากนี้การสร้างบาดแผลยังกระตุ้นการสร้างสารฟีนอลเพื่อส่งเสริมการสร้าง และพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ และเป็นช่องทางหนึ่งในการร่นระยะเวลาการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของปาล์มน้ำมันได้ (ชีรวัลย์ และคณะ, 2560) ในขณะเดียวกัน การสร้างบาดแผลที่มากเกินไปทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดความเสียหายได้มากกว่าที่จะกระตุ้นให้มีการเพิ่มปริมาณ หรือการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ ดังนั้นบาดแผลที่เนื้อเยื่อพืชได้รับต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม ทั้งนี้พืชแต่ละชนิด และระยะการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นนั้น สามารถทนทานต่อระดับการสร้างบาดแผลแตกต่างกัน สิ่งสำคัญของการสร้างบาดแผลคือจำนวนครั้งของบาดแผลที่เหมาะสมต่อชนิดของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น หรือระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น

กาญจนี (2553) ศึกษาผลของการสร้างบาดแผลต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสของปาล์มน้ำมัน โดยหั่นโนดูลาร์แคลลัสด้วยใบมีดจำนวน 15 ครั้งต่อหลอด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่สร้างบาดแผล วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า การสร้างบาดแผลให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงกว่าชุดควบคุม อภิชญา (2560) รายงานว่าการสับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. จำนวน 50 ครั้ง วางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 530 มิลลิกรัม ชีรวัลย์ และคณะ (2560) ศึกษาผลของการสร้าง

บาดแผลต่อการรเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. โดยสับโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (HE) ด้วยจำนวนครั้งแตกต่างกัน วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการสับ HE จำนวน 100 ครั้ง ให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 45 เปอร์เซ็นต์ จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 4.13 เอ็มบริโอ

สำหรับปัจจัยทางเคมีที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเฉพาะชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของชิ้นส่วนพืช และกระบวนการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชจนเกิดเป็นพืชต้นใหม่ ในแต่ละขั้นตอน เช่น การชักนำยอดโดยตรง การชักนำ และเพิ่มปริมาณแคลลัส การชักนำยอดจากแคลลัส การชักนำ และเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอ หรือการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นต้น โดยปกติแล้วสารควบคุมการเจริญเติบที่ถูกใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ ออกซิน เช่น Indole-3-acetic acid (IAA), 2,4-D, indole butyric acid (IBA) และ dicamba และสารควบคุมการเจริญเติบในกลุ่มไซโตไคนิน เช่น benzyladenine (BA), KN, 2-iP และ CPPU เป็นต้น สารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดมีบทบาทหน้าที่แตกต่างกันออกไป CPPU เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytokinin oxidase (CKOx) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ยับยั้งการสร้างและการแพร่กระจายฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืช (Carra *et al*., 2006) นอกจากนี้ CPPU ยังสามารถกระตุ้นการเพิ่มปริมาณ และการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอในหลอดทดลองได้

Fiore และคณะ (2002) รายงานว่า CPPU เข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ให้การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของส้มมากที่สุด Heedchim (2019) รายงานว่า CPPU เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เปอร์เซ็นต์การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยของปาล์มน้ำมันสูงสุด

ดังนั้นทุกปัจจัยที่พืชได้รับต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม ไม่มากหรือน้อยจนเกินไป เพื่อให้การเพิ่มปริมาณแคลลัสมีประสิทธิภาพสูงสุด การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหาร จำนวนครั้งในการสับ และความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ CPPU ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

ใช้แคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์ ทรัพย์ มอ. 1 ลูกผสมเบอร์ 25 (ภาพที่ 2.1) ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน อายุ 4 สัปดาห์หลังการย้ายเลี้ยงมาสับด้วยความถี่ต่าง ๆ (0 50 100 150 และ 200 ครั้ง) วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH 5.7 และผงวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวันภายใต้ความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ภาพที่ 2.1 ลักษณะของแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 ลูกผสมเทเนอรา (เบอร์ 25) ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์= 0.5 เซนติเมตร)

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมัน

นำแคลลัสปาล์มน้ำมันอายุ 4 สัปดาห์หลังการย้ายเลี้ยง มาชั่งน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ขนาด 6.53 มิลลิเมตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y_3 หรือ OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH 5.7 และผงวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกขนาดของแคลลัสทุก 3 วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี T-test แต่ละทรีตเมนท์ทำ 40 ซ้ำ

2. การศึกษาจำนวนครั้งในการสับต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมัน

นำแคลลัสอายุ 12 วัน ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มาชั่งน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ทำการสับแคลลัสที่จำนวนครั้งแตกต่างกัน (0 30 50 60 90 100 และ 150 ครั้ง) วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH 5.7 เติมผงวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัส น้ำหนักสดของแคลลัส จำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอด และลักษณะที่ปรากฏของแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละจำนวนครั้งของการสับ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละทรีตเมนท์ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 หลอด ในส่วนของอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัส} = \frac{\text{น้ำหนักสดของแคลลัสจากแต่ละจำนวนครั้งของการสับ}}{\text{น้ำหนักสดของแคลลัสจากชุดควบคุม (ไม่สับ)}} \times 100$$

3. การศึกษาความเข้มข้นของ CPPU ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมัน

นำแคลลัสอายุ 12 วัน ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มาย้ายเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม CPPU ที่ความเข้มข้นต่างกัน (0 0.1 0.2 0.3 0.4 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH 5.7 เติมผงวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักสด ขนาดของแคลลัส และจำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอด เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ CPPU โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

ผล

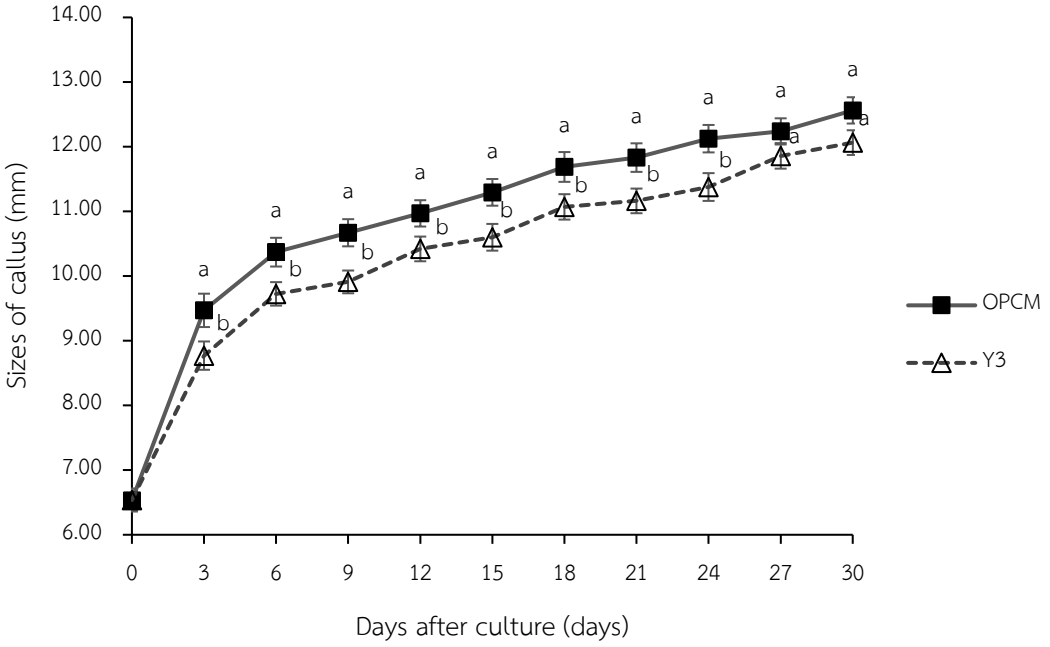
1. ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมัน

จากการทดลองวางเลี้ยงแคลลัสปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร Y_3 หรือ OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงสูตร OPCM ให้ขนาดแคลลัส 12.56 มิลลิเมตร ใหญ่กว่าสูตรอาหาร Y_3 ซึ่งให้ขนาดแคลลัส 12.06 มิลลิเมตร แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2.1) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาขนาดของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นทุก 3 วัน ระหว่างอาหารสูตร OPCM และ Y_3 พบว่า อาหารสูตร OPCM ให้ขนาดของแคลลัสใหญ่กว่า Y_3 เล็กน้อยในทุก ๆ ช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง โดยวันที่ 3 จนถึงวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง อาหารสูตร OPCM ให้ขนาดของแคลลัสเพิ่มขึ้นมากกว่าอาหารสูตร Y_3 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่วันที่ 27 และ 30 ของการเพาะเลี้ยงอาหารสูตร OPCM ยังคงให้ขนาดของแคลลัสใหญ่กว่าอาหารสูตร Y_3 แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ขนาดของแคลลัสแสดงให้เห็นถึงอัตราการเจริญเติบโตที่สูงมากตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 ถึง 30 ของการวางเลี้ยง ในอัตราเร่งที่น้อยกว่าวันที่ 0 ถึง 3 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการย้ายเลี้ยงคือวันที่ 3 (ภาพที่ 2.2) และเมื่อพิจารณาลักษณะของแคลลัส พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 สูตรให้แคลลัสที่มีโครงสร้างเกาะกันอย่างหลวม ๆ และมีสีครีมเหมือนกัน (ภาพที่ 2.3)

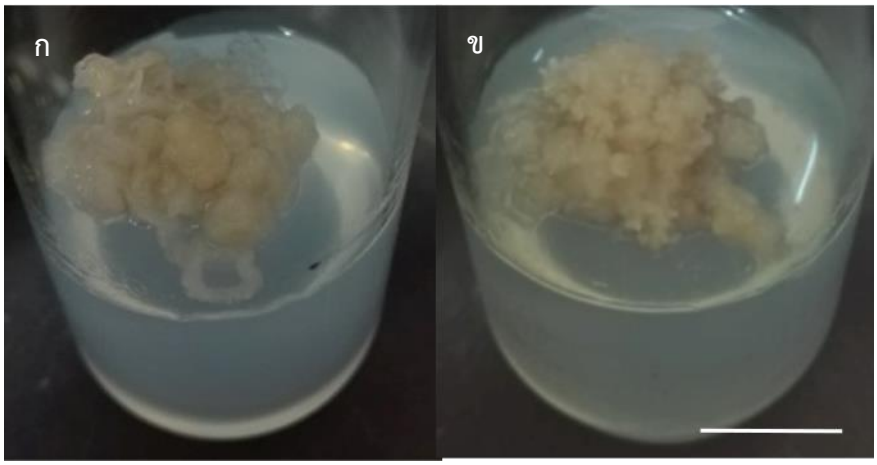
ตารางที่ 2.1 ผลของสูตรอาหารที่ต่างกันต่อขนาดของแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ขนาดของแคลลัสเฉลี่ย (มิลลิเมตร) (± SD)
Y_3	12.06±0.19
OPCM	12.56±0.20
T-test	ns
C.V. (%)	9.89

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 2.2 ผลของสูตรอาหารและระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงต่อขนาดของแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 2.3 ลักษณะแคลลัสของปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 (ก) และ OPCM (ข) เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์=1 เซนติเมตร)

2. ผลของจำนวนครั้งในการสับต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมัน

จากการทดลองสับแคลลัสจำนวนครั้งแตกต่างกัน (0 30 50 60 90 100 และ 150 ครั้ง) วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเพิ่มจำนวนครั้งในการสับ ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสลดลง แคลลัสที่ไม่ผ่านการสับหรือชุดควบคุมให้อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักสดสูงสุด 147.5 มิลลิกรัม ในขณะที่แคลลัสที่ผ่านการสับ 100 ครั้ง ให้อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสต่ำสุด 77.12 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักสดแคลลัสต่ำสุด 113.75 มิลลิกรัม อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทุกจำนวนครั้งในการสับ เมื่อพิจารณาจำนวนโนดูลเฉลี่ย พบว่า แคลลัสที่ผ่านการสับ 30 ครั้ง ให้ผลดีสุด 17.33 โนดูลต่อหลอด ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนแคลลัสที่ผ่านการสับ 100 ครั้ง ให้จำนวนโนดูลเฉลี่ยต่ำสุด 2.75 โนดูลต่อหลอด อย่างไรก็ตามจำนวนโนดูลที่ได้จากการสับ 50 60 90 และ 150 ครั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ผลของจำนวนครั้งในการสับต่อน้ำหนักสดและจำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอดของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความถี่ในการสับ (ครั้ง)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม) (± SD)	จำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอด (± SD)
0	147.50±13.15 (100.00)	15.75±1.60a
30	130.00±5.77 (88.14)	17.33±2.33a
50	133.75±6.88 (90.68)	8.25±0.85b
60	128.33±6.01 (87.00)	9.00±1.00b
90	116.67±14.81 (79.10)	4.33±2.60b
100	113.75±10.28 (77.12)	2.75±1.31b
150	115.00±9.79 (77.97)	3.00±0.82b
F-test	ns	**
C.V. (%)	15.35	33.93

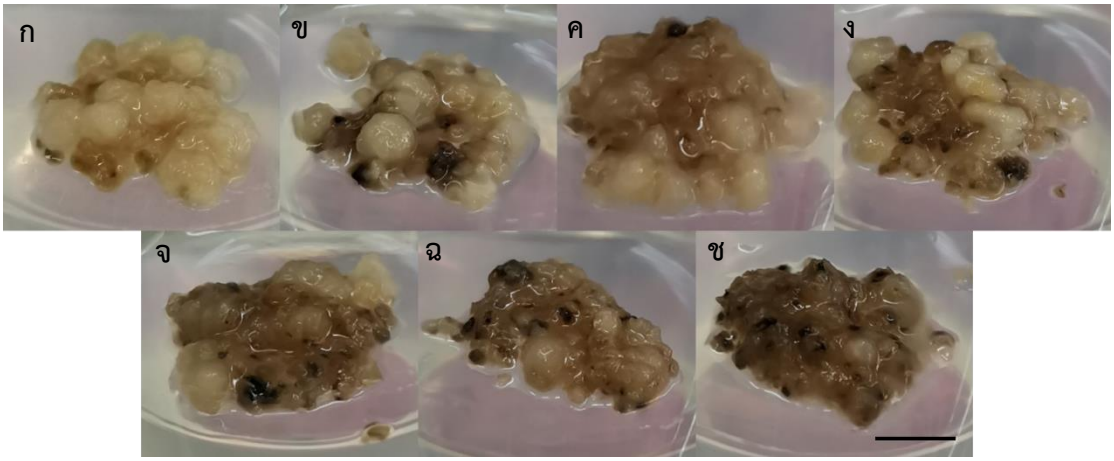
ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01)

ค่าในวงเล็บแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

เมื่อพิจารณาลักษณะของแคลลัส พบว่า แคลลัสที่ไม่ผ่านการสับมีสีครีม และมีการสร้างโนดูลกระจายทั่วแคลลัสเดิม (ภาพที่ 2.4ก) แคลลัสที่ผ่านการสับ 30 และ 50 ครั้ง มีสีดำเกิดขึ้นเล็กน้อยในบางจุดและมีการสร้างโนดูลจากบางส่วนของแคลลัสเดิมที่ไม่เป็นสีดำ (ภาพที่ 2.4 ข-ค) การสับ 60 90 และ 100 ครั้ง ให้แคลลัสสีน้ำตาลมากขึ้นและมีการสร้างโนดูลน้อยลง (ภาพที่ 2.4ง-ฉ) และการสับ 150 ครั้ง ให้แคลลัสสีน้ำตาลทั้งหมดและไม่มีการสร้างโนดูล (ภาพที่ 2.4ช)



ภาพที่ 2.4 ลักษณะของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ผ่านการสับด้วยจำนวนครั้งต่างกัน วางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์= 0.5 เซนติเมตร)
ก. 0 ครั้ง ข. 30 ครั้ง ค. 50 ครั้ง ง. 60 ครั้ง
จ. 90 ครั้ง ฉ. 100 ครั้ง ช. 150 ครั้ง

3. ผลของ CPPU ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมัน

จากการทดลองผลของ CPPU ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมัน พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ CPPU ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสลดลง แคลลัสที่ผ่านการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ให้น้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 230 มิลลิกรัม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเติม CPPU เข้มข้น 0.1 ถึง 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเติม CPPU เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสต่ำสุด 69.29 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสด

ของแคลลัสต่ำสุด 159.37 มิลลิกรัม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเติม CPPU เข้มข้น 0.1 ถึง 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2.3)

เมื่อพิจารณาขนาดที่เพิ่มขึ้นของแคลลัส พบว่า แคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นสูงสุด 70.78 ตารางมิลลิเมตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเติม CPPU เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การเติม CPPU เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นต่ำสุด 57.04 ตารางมิลลิเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับการเติม CPPU ความเข้มข้นอื่น ๆ (ตารางที่ 2.3)

เมื่อพิจารณาจำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอด พบว่า แคลลัสที่ผ่านการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้จำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอดสูงสุด 31.37 โนดูล ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเติม CPPU เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การเติม CPPU เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอดต่ำสุด 11.87 โนดูล แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับการเติม CPPU ความเข้มข้นอื่น ๆ (ตารางที่ 2.3)

นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อวางเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ การเติม CPPU ทุกความเข้มข้น ส่งผลให้แคลลัสบางส่วนมีสีคล้ำหรือสีดำ แสดงให้เห็นถึงการตายของแคลลัส เมื่อพิจารณาจำนวนโนดูลสีดำเฉลี่ยต่อหลอด พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ CPPU ส่งผลให้เกิดโนดูลสีดำเพิ่มขึ้น โดยการเติม CPPU เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้มีจำนวนโนดูลสีดำเฉลี่ยต่อหลอดสูงสุด 11.75 โนดูล แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับการเติม CPPU ความเข้มข้นอื่น ๆ ในขณะที่ชุดควบคุมไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้จำนวนโนดูลสีดำเฉลี่ยต่อหลอดต่ำสุด 2.87 โนดูล แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับการเติม CPPU ที่ความเข้มข้นอื่น ๆ (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 ผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ CPPU ต่อการตอบสนองของแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

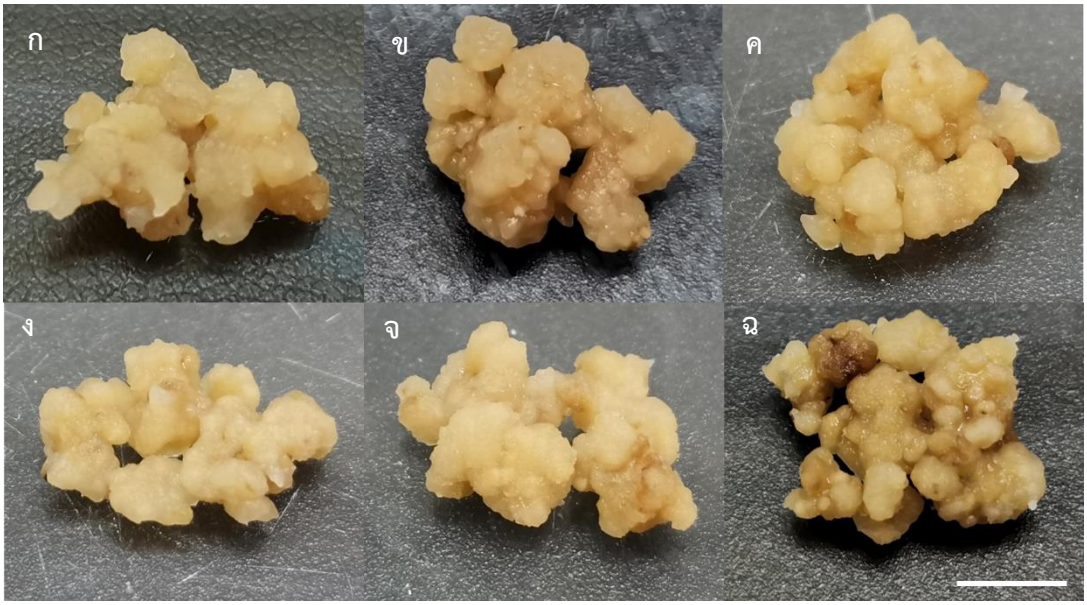
CPPU (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม) (± SD)	ขนาดที่เพิ่มขึ้นของแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) (± SD)	จำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอด (± SD)	จำนวนโนดูลสีดำเฉลี่ยต่อหลอด (± SD)
0	230.00±13.53a (100.00)	70.78±3.99a	31.37±4.56a	2.87±0.95c
0.1	188.75±14.69ab (82.07)	70.53±4.71a	28.62±4.47a	6.50±1.49bc
0.2	185.71±12.92ab (80.75)	69.76±4.73ab	16.93±2.86ab	9.50±0.64ab
0.3	191.43±14.09ab (83.23)	58.50±4.06ab	20.39±3.64ab	9.33±2.20ab
0.4	188.75±16.14ab (82.07)	66.35±3.63ab	18.87±3.24ab	8.00±1.46ab
0.5	159.37±10.71b (69.29)	57.04±3.84b	11.87±3.26b	11.75±2.21a
F-test	*	*	*	*
C.V. (%)	20.10	27.18	33.96	38.99

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในวงเล็บแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

เมื่อพิจารณาลักษณะของแคลลัส พบว่า การเติม CPPU ทุกความเข้มข้น ส่งผลให้แคลลัสเสียหาย มีโนดูลสีน้ำตาลเกิดขึ้นหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยเกิดขึ้นบริเวณผิวของแคลลัสที่มีการสัมผัสกับอาหารเพาะเลี้ยง การเติม CPPU เข้มข้น 0.1-0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสมีลักษณะที่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่พบว่ามีโนดูลสีน้ำตาลเข้มเกิดขึ้นเล็กน้อย (ภาพที่ 2.5ก-จ) ในขณะที่การเติม CPPU เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้แคลลัสเกิดความเสียหายสูงสุดโดยมีโนดูลสีน้ำตาลเข้มจำนวนมาก (ภาพที่ 2.5ฉ)



ภาพที่ 2.5 ลักษณะของแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม CPPU ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก. 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ข. 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ง. 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉ. 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิจารณ์ผลการทดลอง

สูตรอาหารเพาะเลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโต และปัจจัยทางกายภาพ เช่น การสร้างบาดแผลโดยการสับหรือการปั่น มีความสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แต่ทุกปัจจัยต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม และจำเพาะเจาะจงกับแต่ละชนิดพืช ระยะการเจริญเติบโต และวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงจะสามารถทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีประสิทธิภาพสูงสุด จากการศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 ลูกผสมเบอร์ 25 บนอาหารแข็งที่เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตร OPCM ให้ขนาดของแคลลัสเฉลี่ย 1.27 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าอาหารสูตร Y_3 แตกต่างจากรายงานการศึกษาของ ชาคริยา และคณะ (2560) ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ลูกผสมเทเนอราดังกล่าว พบว่าอาหารสูตร MS ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคืออาหารสูตร OPCM#1 OPCM#2 Y_3 ½ Y_3 และ ½ MS อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างสูตรอาหาร OPCM และ Y_3 พบว่า สูตรอาหาร OPCM ให้การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมากกว่าอาหารสูตร Y_3 เป็นไปในทำนองเดียวกันกับการศึกษานี้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ธิดารัตน์ และคณะ (2558) ในปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา พบว่า อาหารสูตร OPCM วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด จากการศึกษานี้ที่พบว่าอาหารสูตร OPCM ให้การเพิ่มปริมาณแคลลัสสูงกว่าสูตร Y_3 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบของแต่ละสูตรอาหารแตกต่างกัน เช่น OPCM มีปริมาณแอมโมเนียมมากกว่าสูตรอาหาร Y_3 ชาคริยา และคณะ (2560) รายงานว่าการเพิ่มไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของแอมโมเนียมมีความจำเป็นในระยะแรกของการแบ่งเซลล์ ส่งให้เซลล์มีการแบ่งตัวมากขึ้น จึงทำให้แคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM การเพิ่มปริมาณแคลลัสสูงกว่าสูตร Y_3

การสร้างบาดแผลเป็นปัจจัยทางกายภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่คาดว่าสามารถกระตุ้นกระบวนการพัฒนาหรือเพิ่มปริมาณของแคลลัสปาล์มน้ำมันได้ การสับแคลลัสทำให้โนดูลาร์แคลลัสแยกออกจากกันเป็นชิ้นเล็ก ๆ ช่วยเพิ่มพื้นที่สัมผัสกับอาหารเพาะเลี้ยง และเพิ่มการดูดซับธาตุอาหารได้มากขึ้น บาดแผลที่เกิดจากการสับด้วยใบมีดส่งเสริมการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของฮอร์โมนพืชมายังบริเวณที่เกิดบาดแผลเพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์มากขึ้น (รังสฤษดิ์, 2540) อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ พบว่าการเพิ่มจำนวนครั้งในการสับ ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสและน้ำหนักสดแคลลัสลดลง ชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการสับให้อัตราการเจริญเติบโต และน้ำหนักสด

แคลลัสสูงสุด แตกต่างจากการทดลองของ กาญจนี (2553) ในปาล์มน้ำมัน พบว่าการสับโนดูลาร์แคลลัสด้วยใบมีดจำนวน 15 ครั้งให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสใหญ่กว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการสับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนครั้งในการสับน้อย ส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายน้อย และมีพื้นที่ในการสัมผัสอาหารมากขึ้น จึงทำให้การสร้างบาดแผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของโนดูลาร์แคลลัส อย่างไรก็ตาม จากรายงานการศึกษาของ นูรมา (2561) ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. พบว่า การสับ 100 ครั้ง ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและเปอร์เซ็นต์การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ ชีรวัลย์ และคณะ (2560) ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. พบว่า การสับจำนวน 100 ครั้ง ให้การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดสูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวัสดุพืชเริ่มต้นคือเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ มีความแข็งแรงและทนต่อการสร้างบาดแผลได้มากกว่าเซลล์ของแคลลัส จึงทำให้การสับ 100 ครั้ง สร้างความความเสียหายกับเซลล์น้อยกว่าและสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้มากกว่าการใช้แคลลัสเป็นวัสดุพืชเริ่มต้น ในขณะที่การทดลองนี้ใช้แคลลัสเป็นวัสดุพืชเริ่มต้น และทนต่อการสร้างบาดแผลได้น้อยกว่า จึงทำให้แคลลัสมี่ผ่านการสับในการทดลองนี้มีอัตราการเจริญเติบโต และน้ำหนักสดลดลง

สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยศึกษาผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ CPPU ต่อการตอบสนองของแคลลัส พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ CPPU ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักสด ขนาดที่เพิ่มขึ้นของแคลลัส และจำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอดลดลง แตกต่างจาก Fiore และคณะ (2002) ที่รายงานว่า CPPU เข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ให้การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของส้มมากที่สุด นอกจากนี้พบว่า CPPU เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เปอร์เซ็นต์การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยของปาล์มน้ำมันสูงสุด (Heedchim, 2019) ทั้งนี้ความแตกต่างของผลการทดลองอาจเนื่องมาจาก CPPU มีบทบาทในการกระตุ้นการสะสมฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน แต่โดยส่วนใหญ่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวต้องการฮอร์โมนในกลุ่มออกซินในการชักนำ และเพิ่มปริมาณแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ (Heedchim, 2019 และ Joshi and Kumar, 2013) จึงทำให้การเติม CPPU เพียงอย่างเดียวเพิ่มปริมาณแคลลัสได้น้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่า วัสดุพืชเริ่มต้นจากการรายงานของ Heedchim (2019) คือเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เคยให้โซมาติกเอ็มบริโอแล้วและมีจีโนไทป์ต่างจากแคลลัสที่การทดลองนี้ใช้เป็นวัสดุพืชเริ่มต้น อีกทั้งมีการเติม dicamba ร่วมด้วย ซึ่งแตกต่างจากการทดลองในครั้งนี้ ที่ใช้แคลลัสที่ยังไม่พัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ ดังนั้น ระยะการเจริญเติบโตของวัสดุพืชเริ่มต้นอาจให้การตอบสนองต่อ CPPU ที่แตกต่างกัน และการเติมสารควบคุม

การเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินร่วมด้วยอาจส่งเสริมการชักนำ และเพิ่มปริมาณแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอได้ดียิ่งขึ้น

การทดลองที่ 2

ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และระยะเวลาในการทรีตด้วยโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการตอบสนองของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงซัสเพนชัน

Effects of Different Concentrations of NaCl and Exposure Times on Growth and Responses of Cell in Suspension Culture

บทนำ

สภาวะเครียดเค็มเป็นปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมหรือสิ่งไม่มีชีวิตที่สำคัญ เกิดขึ้นจากเกลือชนิดต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นสูงละลายอยู่ในวัสดุปลูกหรือพื้นที่ปลูกโดยเฉพาะโซเดียมคลอไรด์ มีผลยับยั้งหรือจำกัดการเจริญเติบโตของพืชได้ พืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดเค็มที่แตกต่างกันทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ภายใต้สภาวะเครียดเค็มพืชได้รับผลกระทบที่รุนแรงเนื่องจากค่าศักย์ออสโมซิสของวัสดุปลูกที่ลดลงทำให้พืชดูดน้ำได้น้อยลง และได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษของไอออน โดยเฉพาะโซเดียมไอออน (สุมาลี, 2555) จากรายงานของ Lokhande และคณะ (2010) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองทางด้านสรีรวิทยา และสารชีวเคมีของ *Sesuvium portulacastrum* L. โดยวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 15 วัน พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของแคลลัสลดลง มีการสะสมโพรลีน glycine betaine และ total soluble sugar นอกจากนี้ยังส่งผลต่อความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้น และจากรายงานการศึกษาของ Niknam และคณะ (2011) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เติมในอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ KN เข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ต่อการตอบสนองของแคลลัส *Acanthophyllum* สองสายพันธุ์ เป็นเวลา 40 วัน พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของแคลลัสทั้งสองสายพันธุ์ลดลง ในขณะที่ปริมาณโปรตีน โพรลีน และ MDA เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีด้วยกันหลายรูปแบบ การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันเป็นเทคนิคหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์พืชในอาหารเหลวในสภาพเขย่าเลี้ยงตลอดเวลาบนเครื่องเขย่า สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์พืชได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากเซลล์มีการสัมผัสกับอาหารหรือปัจจัยทางเคมีต่าง ๆ วิธีการนี้ให้ผลดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง จึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันมาปรับใช้ในการทดลองนี้ จากรายงานของ Al-khayri (2002) ศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตอบสนองของแคลลัสอินทผาลัมในซัสเพนชัน โดยวางเลี้ยงแคลลัสอินทผาลัมลงในอาหารเหลวสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับ 2-iP เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงบนเครื่อง

เขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโต และน้ำหนักสดของแคลลัสอินทผาลัมลดลงตามลำดับ Ni และคณะ (2015) ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ ต่อการตอบสนองของเซลล์ *Nitraria tangutorum* ในซัสเพนชัน โดยวางเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกันร่วมกับ BA เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์ซัสเพนชันลดลง

อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของปาล์มน้ำมันต่อสภาวะเครียดเค็มมีน้อย และไม่เป็นที่ทราบ อีกทั้งผลของสภาวะเครียดเค็มต่อการตอบสนองของเซลล์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ ทรัพย์ มอ. 1 โคลนที่ 25 ยังไม่มีการศึกษา ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตอบสนองของเซลล์ปาล์มน้ำมันในซัสเพนชัน และความเข้มข้นของสารโซเดียมคลอไรด์ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ มอ. 1 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันทนเค็มต่อไปในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

ใช้แคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์ ทรัพย์ มอ. 1 ลูกผสมเบอร์ 25 ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH 5.7 และเติมผงวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก วิชาเอกพืชศาสตร์ สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา แคลลัสดังกล่าวย้ายเลี้ยงทุก ๆ 4 สัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และย้ายเลี้ยงอีกครั้งหลังเพาะเลี้ยง 12 วัน เพื่อเตรียมแคลลัสในการทดลอง

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาการทรีตโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของเซลล์

นำแคลลัสปาล์มน้ำมันหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 12 วัน มาชั่งน้ำหนัก 250 มิลลิกรัม ย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 50 100 150 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH 5.7 วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 10 ชั่วโมงต่อวัน ย้ายเลี้ยงลงในอาหารใหม่สูตรเดิมเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นดังกล่าวทุก 4 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง รวมเวลาเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ บันทึกน้ำหนักสด ปริมาตรตะกอนเซลล์ จำนวนกลุ่มเซลล์ ลักษณะของเซลล์ซัสเพนชัน และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันทุก 4 สัปดาห์ โดยใช้สมการ

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต} = \frac{\text{น้ำหนักสดของเซลล์จากแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์}}{\text{น้ำหนักสดของเซลล์จากชุดควบคุม (ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์)}} \times 100$$

วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และระยะเวลาในการทรีต ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์ ตรวจสอบความเข้มข้นของสารโซเดียมคลอไรด์ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในซัสเพนชันลง 50 เปอร์เซ็นต์ (50% inhibition concentration; IC_{50})

2. การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโพรลีน

นำเซลล์ซัสเพนชันจากการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มาชั่งน้ำหนัก 500 มิลลิกรัม บดตัวอย่างร่วมกับไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งและสากจนตัวอย่างเป็นผง ตักส่วนของผงที่บดได้ใส่ลงในขวดขนาด 4 ออนซ์ เติม sulfosalicylic acid เข้มขัน 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที กรองตัวอย่างโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ดูดสารละลายที่ได้จากการกรองปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ninhydrin 4 มิลลิลิตร คนสารละลายโดยใช้เครื่อง vortex จนสารละลายเข้ากันดี นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการต้มมาแช่ลงในน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายตัวอย่างมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อปรับอุณหภูมิให้ใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย Toluene ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง คนสารละลายโดยใช้เครื่อง vortex จนสารละลายเข้ากันดี วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที สารละลายตัวอย่างจะแยกเป็น 2 ชั้น ดูดสารละลายชั้นบนใส่ลงในหลอดใหม่ นำสารละลายดังกล่าวมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ตรวจสอบปริมาณโพรลีน เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์

3. การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโปรตีนรวม

นำเซลล์ซัสเพนชันที่ได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับการเติม dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ มาชั่งน้ำหนัก 150 มิลลิกรัม แล้วทำการบดร่วมกับไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งและสาก บดจนเป็นผงละเอียด วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ผงตัวอย่างอุ่นขึ้น เติม extraction buffer (KH_2PO_4 เข้มข้น 1 โมลาร์ K_2HPO_4 เข้มข้น 1 โมลาร์ EDTA เข้มข้น 1 โมลาร์ และ polyvinylpyrrolidone; PVP 1 เปอร์เซ็นต์) pH 7 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสตอนบนปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในคิวเวต เติมสารละลาย bradford buffer (ประกอบด้วย Coomassic brilliant blue เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลเข้มข้น 4.7 เปอร์เซ็นต์ และ H_3PO_4 เข้มข้น 8.5 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 980 ไมโครลิตร ในคิวเวตดังกล่าว เขย่าเล็กน้อยเพื่อให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นนำมาวัดปริมาณโปรตีนรวม โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer คำนวณปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) บันทึกค่าโปรตีนทั้งหมด เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์

4. การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยง

หลังจากวางเลี้ยงเซลล์ซันเพนชันในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 50 100 150 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดค่า electrical conductivity (EC) ของอาหารดังกล่าวแล้วย้ายเลี้ยงเซลล์ลงในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นข้างต้นเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นกรองเอากลุ่มเซลล์ซัสเพนชันออกจากอาหารเพาะเลี้ยง และวัดค่า EC ของอาหารเพาะเลี้ยง คำนวณค่าการเปลี่ยนแปลงค่า EC ก่อน และหลังเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์โดยใช้แผนการทดลอง CRD วิเคราะห์ความ

แปรปรวนโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์

5. การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte leakage; EL)

เก็บตัวอย่างเซลล์ในซัสเพนชันหนัก 200 มิลลิกรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนวางที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที แล้ววัดค่า EC ครั้งที่ 1 (EC_1) หลังจากนั้น นำเซลล์ดังกล่าวไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 0.15 เมกกะปาสคาล นาน 30 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้อุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการวัดค่า EC ครั้งที่ 2 (EC_2) นำค่า EC ทั้งสองครั้งมาคำนวณค่า EL โดยใช้สมการ

$$EL\ (\%) = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$$

เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ วางแผนการทดลอง CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์

ผล

1. ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาการทรีตโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของเซลล์

จากผลการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นที่แตกต่างกันของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลวสูตร OPCM ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ทำให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันลดลงเป็นลำดับ โดยชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันสูงสุด 444.11 มิลลิกรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันต่ำสุด 234 มิลลิกรัม และให้อัตราการเจริญของเซลล์ต่ำสุด 52.69 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 2.4)

เมื่อพิจารณาปริมาตรตะกอนเซลล์ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ลดลง โดยชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 0.73 มิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ต่ำสุด 0.38 มิลลิลิตร ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 2.4)

สำหรับจำนวนกลุ่มเซลล์ พบว่า การเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ให้จำนวนกลุ่มเซลล์สูงสุด 13 กลุ่มเซลล์ต่อฟลาสก์ ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการตอบสนองของเซลล์ในซัสเพนชันในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

โซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม) (±SD)	ปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร) (±SD)	จำนวนกลุ่มเซลล์ (±SD)	สีของเซลล์ซัสเพนชัน
0	444.11±8.50a (100)	0.73±0.03a	11.78±0.76	เหลือง
50	395.78±23.05b (89.12)	0.65±0.03b	13.00±1.91	เหลือง
100	384.67±4.36b (86.61)	0.63±0.03b	12.33±0.44	เหลืองซีด
150	316.89±12.48c (71.35)	0.52±0.01c	11.56±0.60	เหลือง
200	281.44±24.28cd (63.37)	0.46±0.01d	12.89±0.59	เหลืองซีด
300	253.00±4.16d (56.97)	0.41±0.01d	11.38±0.82	เหลืองซีด
400	234.00±2.08d (52.69)	0.38±0.01d	11.00±0.69	เหลืองคล้ำ
F-test	**	**	ns	
C.V. (%)	9.84	11.04	23.27	

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01)

ค่าในวงเล็บแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

การเจริญและการตอบสนองของเซลล์ในซัสเพนชันหลังวางเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้น้ำหนักสดเซลล์ซัสเพนชันลดลงเป็นลำดับ โดยชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันสูงที่สุด 741.67 มิลลิกรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันน้อยสุด 226.67 มิลลิกรัม และอัตราการเจริญเติบโตต่ำสุด 31.08 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 2.5)

สำหรับปริมาตรตะกอนเซลล์ พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ลดลงเป็นลำดับ โดยชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ให้ปริมาตรตะกอน

เซลล์สูงสุด 1.74 มิลลิลิตร ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตาม โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์น้อยสุด 0.37 มิลลิลิตร ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้น 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 2.5)

เมื่อพิจารณาจำนวนกลุ่มเซลล์ พบว่า การเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้จำนวนกลุ่มเซลล์สูงสุด 14.67 กลุ่มเซลล์ต่อฟลาสก์ อย่างไรก็ตามไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการตอบสนองของเซลล์ในซัสเพนชันในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

โซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม) (±SD)	ปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร) (±SD)	จำนวนกลุ่มเซลล์ (±SD)	สีของเซลล์ซัสเพนชัน
0	741.67±51.33a (100)	1.74±0.12a	13.25±1.06	เหลือง
50	634.17±24.10ab (85.13)	1.49±0.06a	14.67±1.08	เหลือง
100	593.33±24.96b (79.73)	1.40±0.06a	13.00±1.53	เหลือง
150	425.83±37.93c (58.11)	0.82±0.14b	13.44±1.29	เหลืองซีด
200	259.17±5.23d (35.14)	0.42±0.01c	14.22±0.81	เหลืองซีด
300	236.67±1.67d (32.43)	0.39±0.01c	13.57±1.31	เหลืองคล้ำ
400	226.67±3.33d (31.08)	0.37±0.01c	12.75±0.84	เหลืองคล้ำ
F-test	**	**	ns	
C.V. (%)	15.04	19.59	22.18	

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01)

ค่าในวงเล็บแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

การเจริญเติบโตและการตอบสนองของเซลล์ในซัสเพนชันหลังวางเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันลดลงเป็นลำดับ โดยชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันสูงสุด 980 มิลลิกรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น ในขณะโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันน้อยสุด 211.67 มิลลิกรัม และอัตราการเจริญเติบโตต่ำสุด 21.43 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 2.6)

ในส่วนของปริมาตรตะกอนเซลล์นั้น พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ลดลงเป็นลำดับ โดยชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.18 มิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์น้อยสุด 0.37 มิลลิลิตร แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 2.6)

สำหรับจำนวนกลุ่มเซลล์ พบว่า ชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ให้จำนวนกลุ่มเซลล์สูงสุด 23.25 กลุ่มเซลล์ต่อฟลาสก์ ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ให้จำนวนกลุ่มเซลล์น้อยสุด 10.25 กลุ่มเซลล์ต่อฟลาสก์ ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 2.6)

ตารางที่ 2.6 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการตอบสนองของเซลล์ในซัสเพนชันในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์

โซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม) (±SD)	ปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร) (±SD)	จำนวนกลุ่มเซลล์ (±SD)	สีของเซลล์
0	980.00±61.20a (100)	2.18±0.20a	23.25±1.06a	ครีม
50	749.00±25.86b (76.53)	1.58±0.11b	18.80±1.08ab	เหลืองครีม
100	483.33±30.87c (48.98)	1.10±0.06bc	11.50±1.53bc	ครีม
150	440.00±37.36cd (44.90)	1.00±0.11cd	10.25±1.29c	เหลืองซีด
200	276.67±9.28de (28.57)	0.53±0.03de	12.00±0.81bc	เหลืองซีด
300	228.33±15.90e (23.47)	0.37±0.03e	14.00±1.31bc	เหลืองคล้ำ
400	211.67±33.46e (21.43)	0.37±0.03e	14.67±0.84bc	เหลืองคล้ำ
F-test	**	**	**	
C.V. (%)	14.14	20.13	17.37	

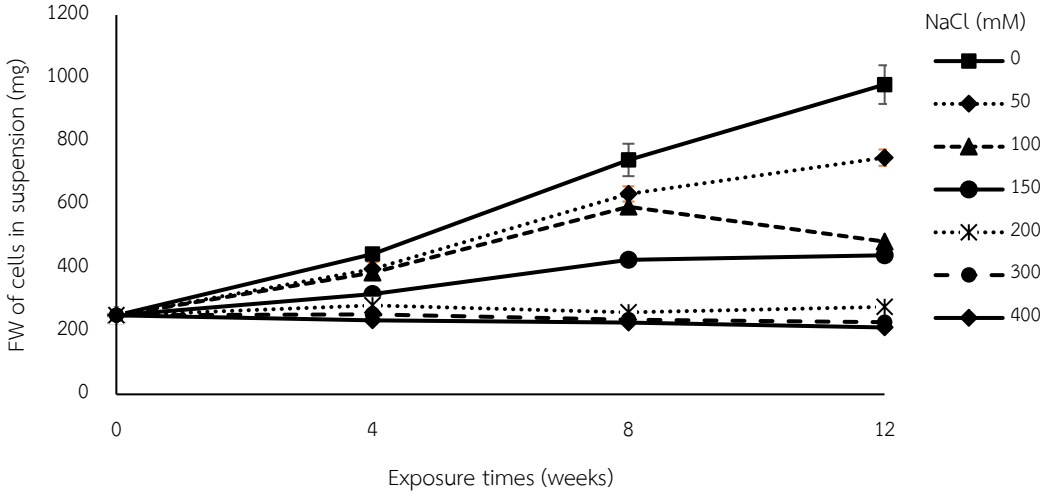
** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01)

ค่าในวงเล็บแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และระยะเวลาในการวางเลี้ยงต่อน้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชัน พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ทำให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันลดลงทุกระยะเวลาของการวางเลี้ยง โดยชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันสูงสุด 980 มิลลิกรัมหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้นและทุกระยะเวลาของการวางเลี้ยง เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการวางเลี้ยง พบว่าชุดควบคุมและการเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันเพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันเพิ่มขึ้นหลังจากวางเลี้ยงนาน

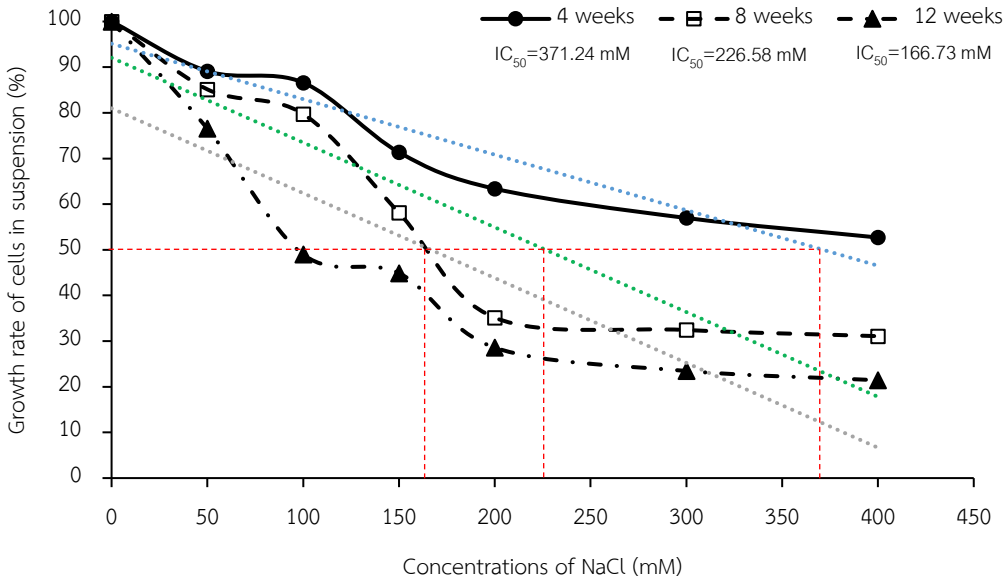
8 สัปดาห์ และลดลงหลังจากวางเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการวางเลี้ยง และการวางเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันในอาหารเหลวที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันต่ำกว่าน้ำหนักสดก่อนวางเลี้ยง (ภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และระยะเวลาของการวางเลี้ยงต่อน้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชัน ในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์= ±SD)

เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และระยะเวลาในการวางเลี้ยงต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในซัสเพนชัน พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในซัสเพนชันลดลงเป็นลำดับในทุกระยะเวลาของการวางเลี้ยง และการเพิ่มระยะเวลาในการวางเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้นส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงเป็นลำดับเช่นเดียวกัน โดยการวางเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันต่ำสุดในทุกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และระยะเวลาในการวางเลี้ยง พบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ นาน 12 สัปดาห์ ให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในซัสเพนชันต่ำสุด 21.43 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2.7)

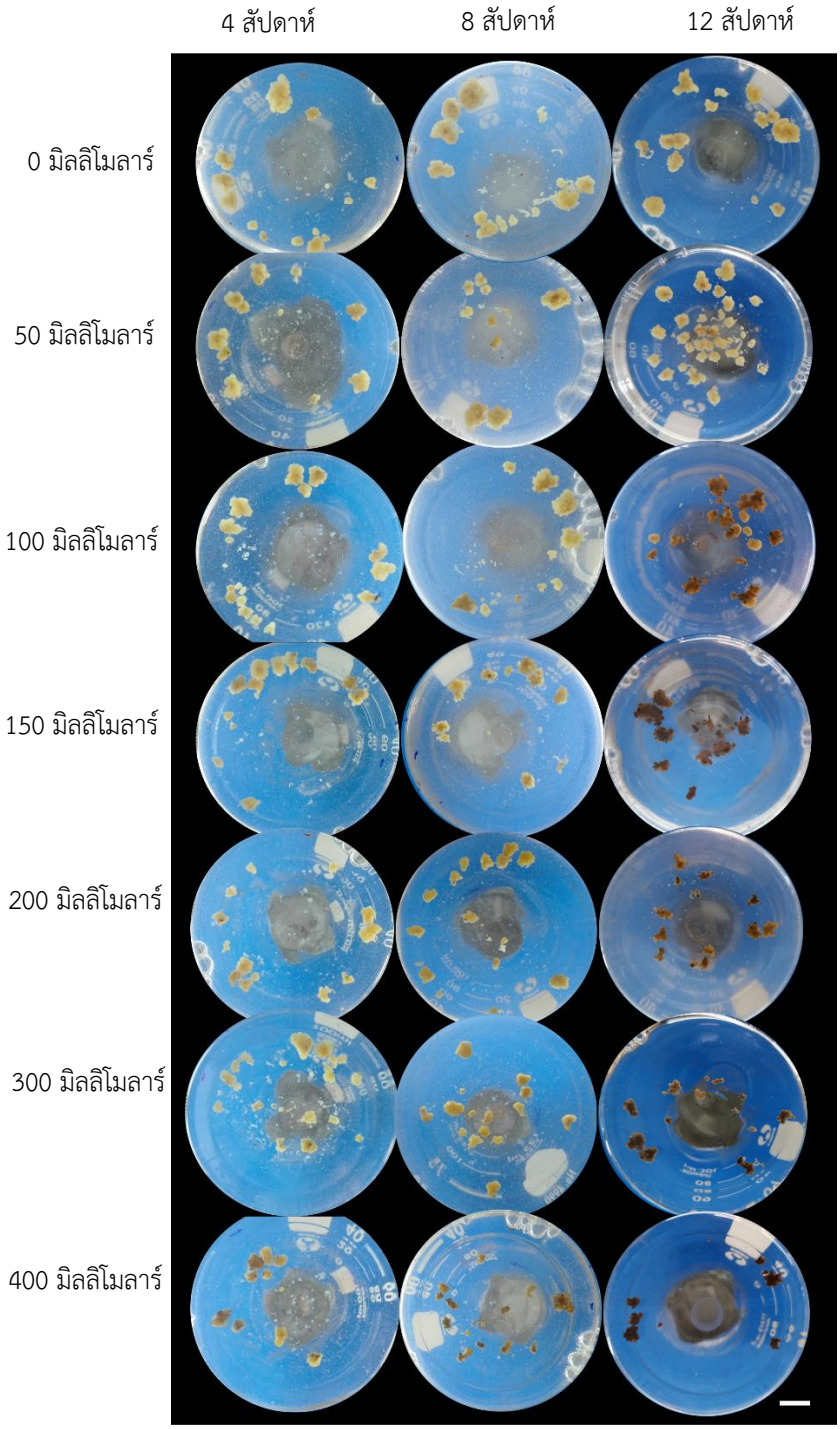
เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} พบว่า ความเข้มข้น และระยะเวลาการจุ่มแช่ในโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในซัสเพนชันลดลง ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์นั้นหากใช้โซเดียมความเข้มข้นสูงระยะเวลาการจุ่มแช่สั้น หากใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำก็ต้องเพิ่มเวลาการจุ่มแช่นานขึ้น จากการศึกษานี้พบว่า หากต้องการทรีตเป็นเวลาสั้นเพียง 4 สัปดาห์ เพื่อยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตได้ 50 เปอร์เซ็นต์ต้องใช้โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 371.24 มิลลิโมลาร์ หากทรีตเป็นเวลานานขึ้น 8 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์ ต้องใช้โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 226.58 และ 166.73 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับจึงสามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2.7)



ภาพที่ 2.7 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และระยะเวลาของการวางเลี้ยงต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในซัสเพนชัน ในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์

เมื่อพิจารณาลักษณะของเซลล์ซัสเพนชันที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ให้ตะกอนเซลล์ขนาดเล็กลงและมีสีคล้ำมากขึ้นเป็นลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อพิจารณาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 และ 8 สัปดาห์ ส่งผลให้ลักษณะและสีของเซลล์ในซัสเพนชันไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามทั้งลักษณะ และสีของเซลล์ในซัสเพนชันมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดหลังจากวางเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ (ภาพที่ 2.8)

นอกจากนี้ยังพบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ให้กลุ่มเซลล์สีคล้ำและสีดำบางจุดของกลุ่มเซลล์ และมีโครงสร้างคล้ายรากเกิดขึ้นรอบ ๆ กลุ่มเซลล์ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ให้กลุ่มเซลล์มีขนาดเล็กที่สุด และกลุ่มเซลล์ดังกล่าวมีสีดำ (ภาพที่ 2.8)

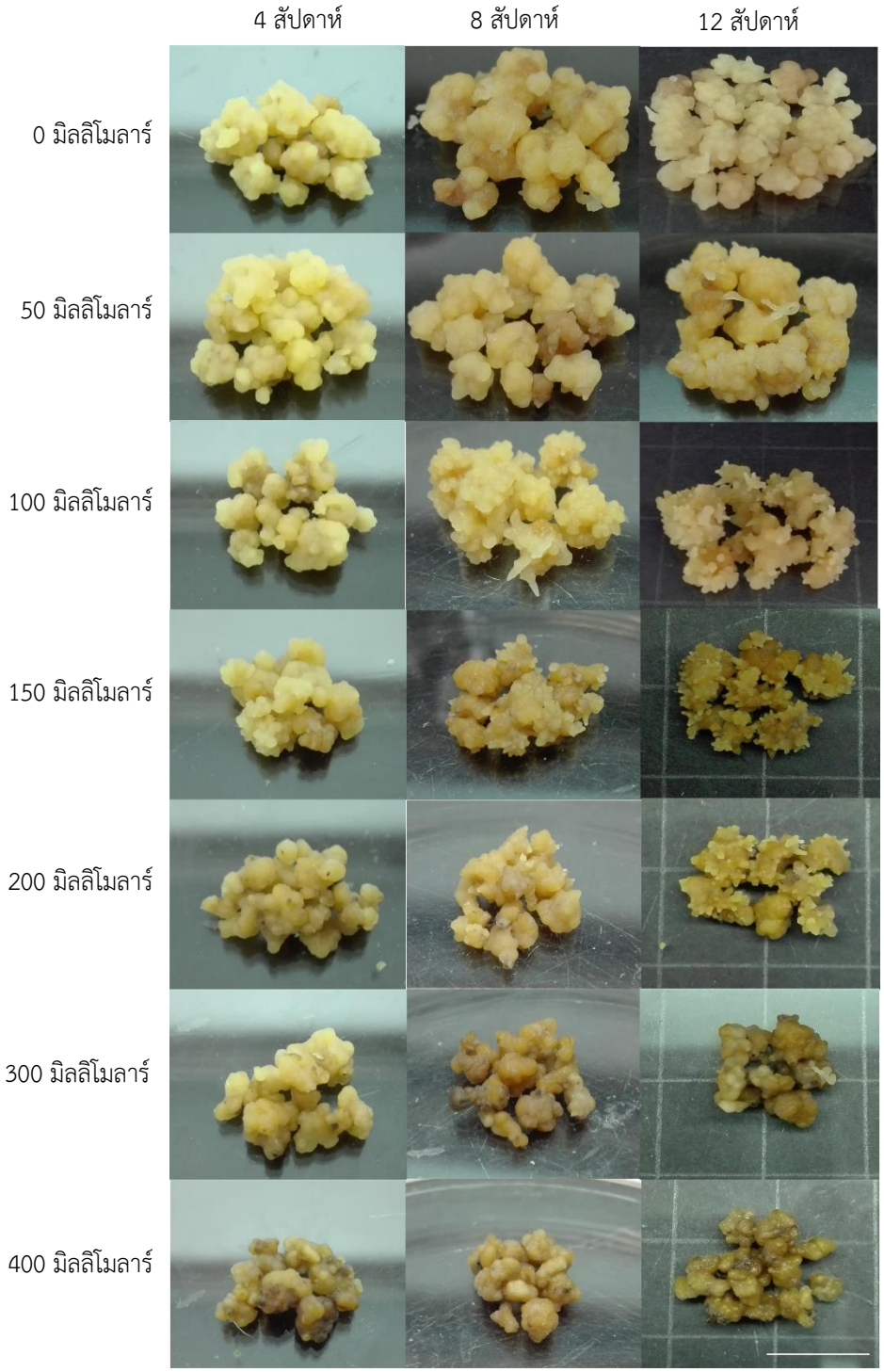


ภาพที่ 2.8 ลักษณะของกลุ่มเซลล์ในซัสเพนชันที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ (บาร์=1 เซนติเมตร)

เมื่อสังเกตลักษณะโดยรวมของเซลล์ซัสเพนชันหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่า การเติมโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้นให้เซลล์ซัสเพนชันที่มีโครงสร้างเกาะกันอย่างหลวม ๆ แต่การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้เซลล์ซัสเพนชันมีสีเทาและสีดำมากขึ้น ในทุก ๆ ช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง โดยชุดควบคุมและโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้เซลล์ซัสเพนชันสีเหลืองนวล แต่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ให้เซลล์ซัสเพนชันสีเหลืองเทา มีการสร้างเซลล์ใหม่รอบเซลล์เดิม ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ ให้เซลล์ซัสเพนชันสีเหลืองเทามากขึ้น ไม่มีการสร้างเซลล์ใหม่ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เซลล์ซัสเพนชันสีน้ำตาลถึงดำ ไม่พบเซลล์เกิดใหม่ (ภาพที่ 2.9)

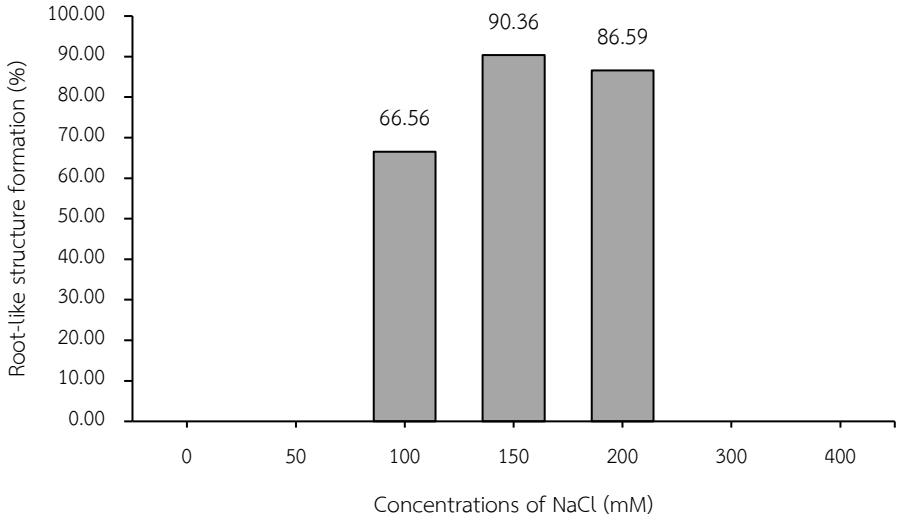
จากลักษณะของเซลล์ซัสเพนชันหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ พบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ยังคงให้เซลล์ซัสเพนชันมีสีเหลืองใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เซลล์ผิวรอบนอกสร้างโนดูลขนาดเล็กรอบ ๆ เซลล์เดิม โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ ให้เซลล์ซัสเพนชันมีสีเหลืองเทาและดำมากกว่าที่ 4 สัปดาห์ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เซลล์ซัสเพนชันมีสีเทาดำ (ภาพที่ 2.9)

ลักษณะของเซลล์ซัสเพนชันหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ พบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ให้เซลล์ในซัสเพนชันสีเหลืองใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ ให้เซลล์ในซัสเพนชันสีเหลืองเทามากกว่าที่ 8 สัปดาห์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ให้เซลล์ในซัสเพนชันสีดำทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ ทำให้กลุ่มเซลล์ซัสเพนชันมีการเจริญที่ผิดปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยมีการสร้างเซลล์ที่มีโครงสร้างคล้ายรากรอบ ๆ กลุ่มเซลล์เดิม และเซลล์มีลักษณะแห้งกว่าเซลล์ที่ผ่านการวางเลี้ยงในซัสเพนชันเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น ๆ อย่างไรก็ตามโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้เซลล์ที่มีลักษณะเปียกหรือฉ่ำน้ำ (ภาพที่ 2.9)



ภาพที่ 2.9 ลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชันที่ได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4, 8 และ 12 สัปดาห์ (บาร์=1 เซนติเมตร)

เมื่อพิจารณาการเกิดโครงสร้างคล้ายรากรอบ ๆ กลุ่มเซลล์เดิม พบว่า เซลล์ที่ผ่านการวางเลี้ยงในอาหารเหลวเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีการเจริญผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีการสร้างโครงสร้างคล้ายรากรอบกลุ่มเซลล์เดิม ซึ่งโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ให้กลุ่มเซลล์ที่มีโครงสร้างคล้ายรากมากที่สุด 90.36 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ไม่พบเซลล์ผิดปกติดังกล่าวจากการวางเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันในชุดควบคุมและโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 2.10)

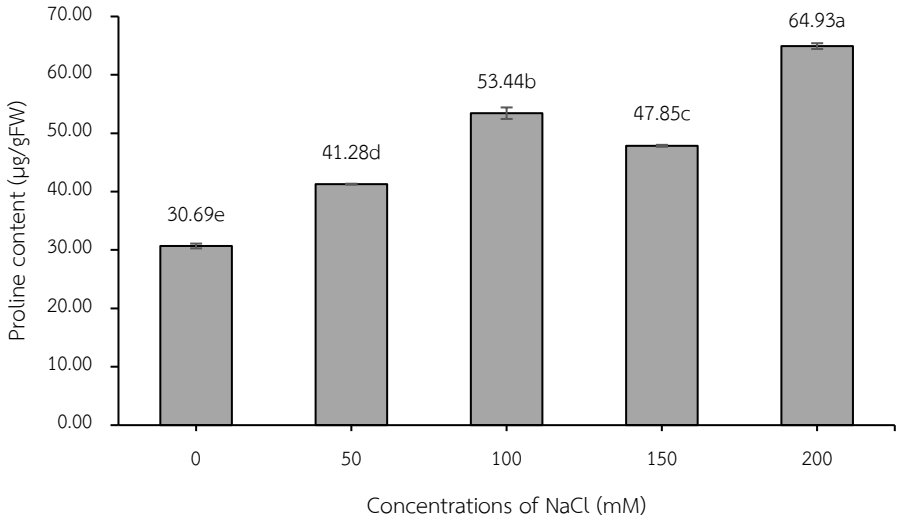


ภาพที่ 2.10 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเกิดโครงสร้างคล้ายรากของเซลล์ในซัสเพนชันที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์

2. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโพรลีน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโพรลีนพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ให้ปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้น โดยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโพรลีนสูงสุด 64.93 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น ๆ ในขณะที่ชุดควบคุม ให้ปริมาณโพรลีนน้อยสุด 30.69 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด อย่างไรก็ตาม โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโพรลีน 47.85 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด น้อยกว่าปริมาณโพรลีนจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียม

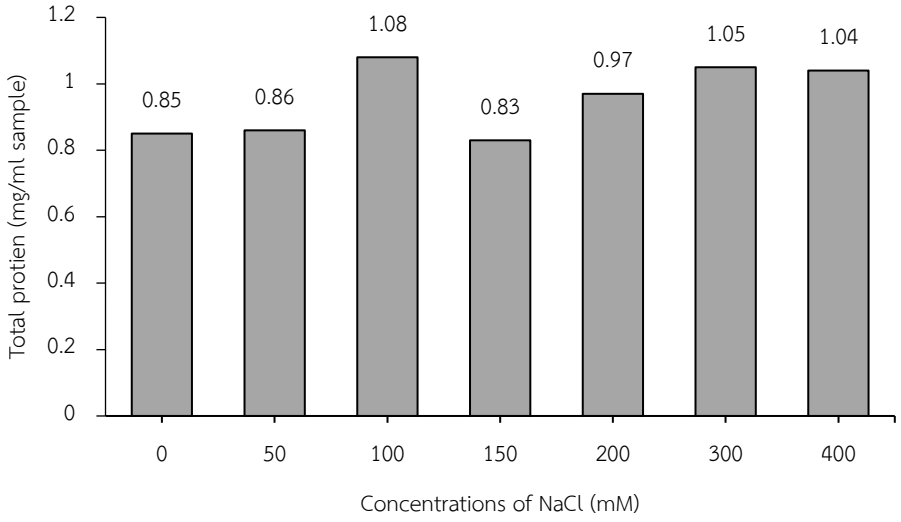
คลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (53.44 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) (ภาพที่ 2.11)



ภาพที่ 2.11 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโพรลีนของเซลล์ในซัสเพนชันที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์= ± SD)
แท่งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

3. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโปรตีนรวม

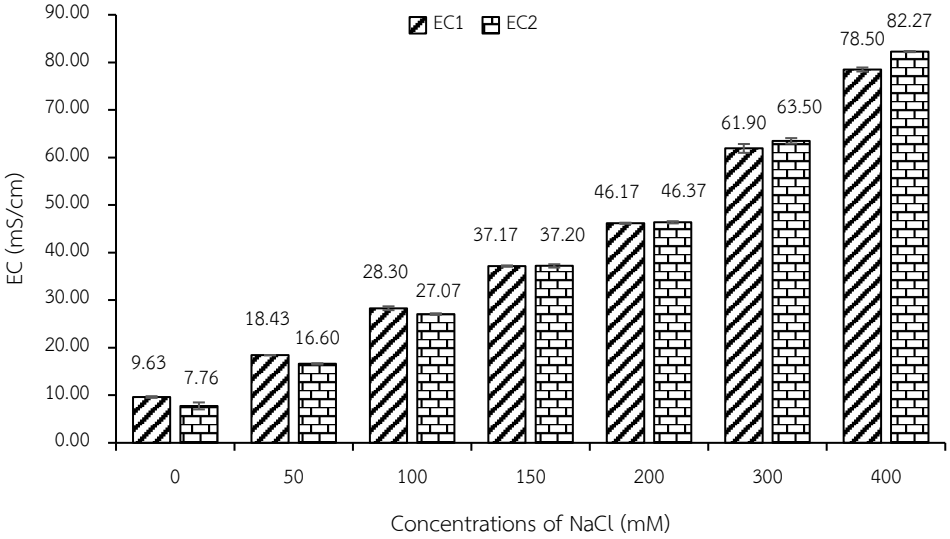
เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนรวมจากการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นที่แตกต่างกันของโซเดียมคลอไรด์ ในอาหารเหลวสูตร OPCM ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนรวมเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าชุดควบคุม อย่างไรก็ตาม โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโปรตีนรวมสูงที่สุด 1.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโปรตีน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ขึ้นไปไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนรวมของเซลล์ในซัสเพนชัน (ภาพที่ 2.12)



ภาพที่ 2.12 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโปรตีนรวมของเซลล์ในซัสเพนชันที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์

4. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าการนำไฟฟ้าอาหารเพาะเลี้ยง

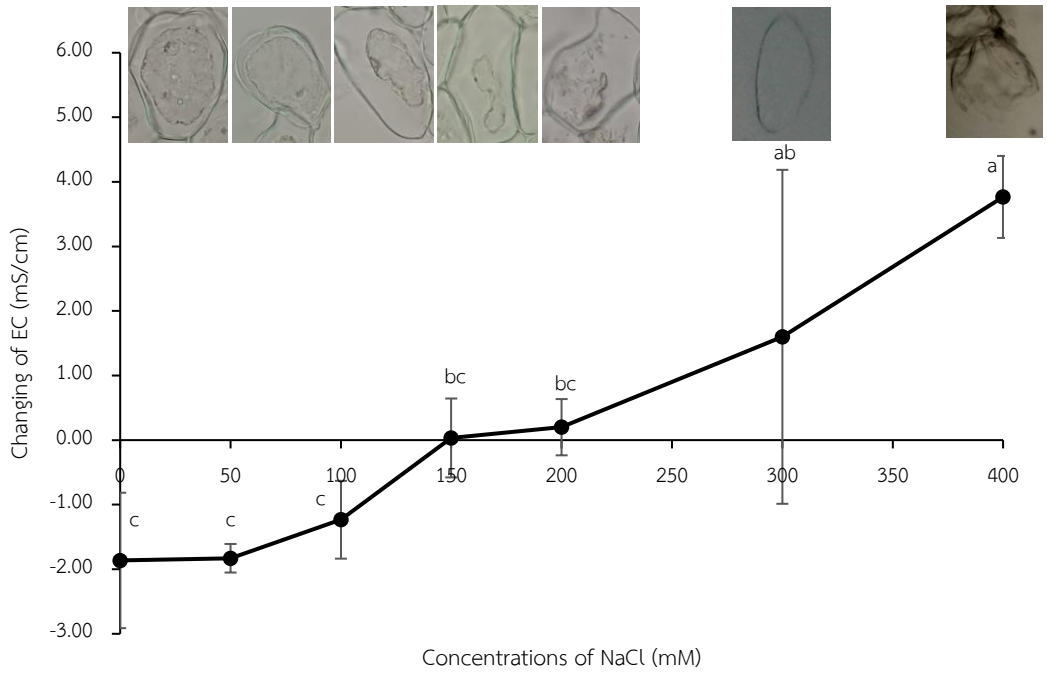
เมื่อพิจารณาค่า EC ของอาหารก่อนวางเลี้ยงเซลล์ในซัสเพนชัน พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ทุก ๆ 50 มิลลิโมลาร์จนถึงความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้ค่า EC ของอาหารที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันเพิ่มขึ้นประมาณ 1 เท่าเป็นลำดับ ความเข้มข้นสูงกว่า 200 มิลลิโมลาร์ให้ค่า EC เพิ่มขึ้น 1.5 เท่า แต่เมื่อพิจารณาค่า EC ของอาหารหลังวางเลี้ยงเซลล์ในซัสเพนชันนาน 4 สัปดาห์ พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ทุก ๆ 50 มิลลิโมลาร์จนถึง 100 มิลลิโมลาร์ ให้ค่า EC ของอาหารต่ำกว่าช่วงก่อนการเพาะเลี้ยงเซลล์เล็กน้อย อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 100 มิลลิโมลาร์ (150-400 มิลลิโมลาร์) ค่า EC ของอาหารสูงกว่าช่วงก่อนการเพาะเลี้ยงเซลล์มาก (ภาพที่ 2.13)



ภาพที่ 2.13 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่า EC ของอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนเพาะเลี้ยง (EC_1) และหลังเพาะเลี้ยง (EC_2) เซลล์ซัสเพนชัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์= ± SD)

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่า EC ของอาหารก่อนและหลังเพาะเลี้ยง พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงของค่า EC ของอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ให้การเปลี่ยนแปลงของค่า EC ของอาหารเพาะเลี้ยงเป็นลบ แสดงให้เห็นว่า เซลล์ในซัสเพนชันมีการดูดซับไอออนเข้าสู่เซลล์ และเมื่อพิจารณาลักษณะของเซลล์พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์มีขอบเขตชัดเจนและใหญ่ที่สุดจนเกือบเต็มเซลล์ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ให้การเปลี่ยนแปลงของค่า EC ของอาหารเพาะเลี้ยงเป็นบวกใกล้เคียงศูนย์ (0.03 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร) แสดงให้เห็นว่า เซลล์ดูดซับไอออนในปริมาณที่เท่ากับไอออนที่รั่วไหลออกมาจากเซลล์ และเมื่อพิจารณาลักษณะของเซลล์พบว่า เยื่อหุ้มเซลล์มีการหดตัว จึงคาดว่าเซลล์ซัสเพนชันของปาล์มน้ำมันสามารถทนทานต่อความเครียดเค็มของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงสุด 150 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตาม โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ทำให้การเปลี่ยนแปลงของค่า EC ของอาหารเพาะเลี้ยงมีค่าเป็นบวกและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่า เซลล์ในซัสเพนชันไม่มีการดูดซับไอออนเข้าสู่เซลล์แต่มีการรั่วไหลของไอออนจากภายในเซลล์ออกมาภายนอกเซลล์ โดยที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้การเปลี่ยนแปลงของค่า EC ของอาหารเพาะเลี้ยงสูงสุด 3.77

มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น ๆ (ภาพที่ 2.14)

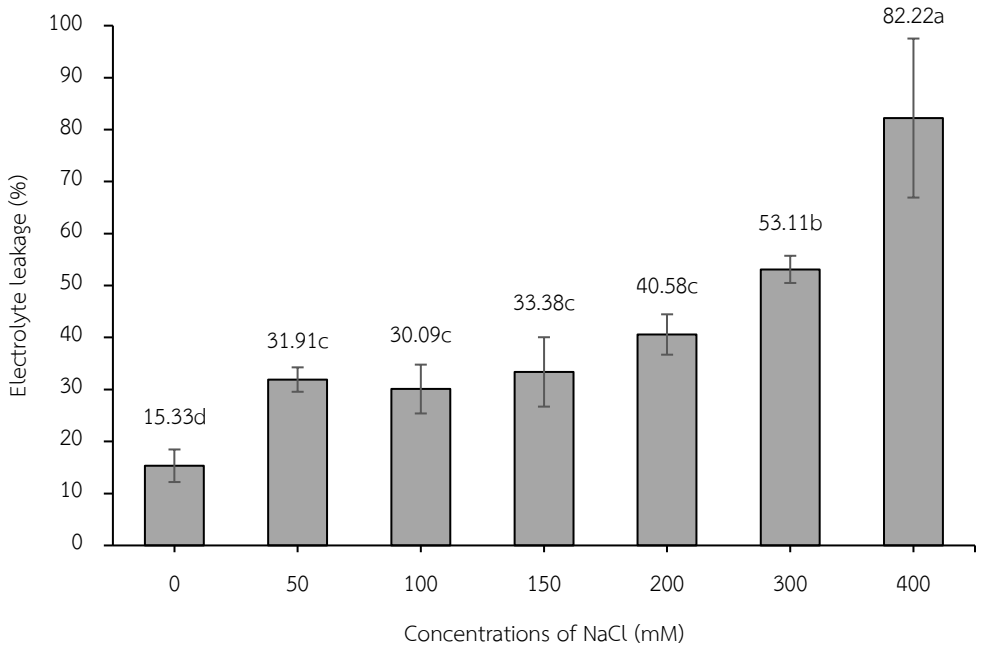


ภาพที่ 2.14 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า EC ของอาหารก่อนเพาะเลี้ยงและหลังเพาะเลี้ยง และลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชัน ที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์= ± SD)

ตัวอักษรที่ต่างกันบนเส้นกราฟมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

5. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte leakage; EL)

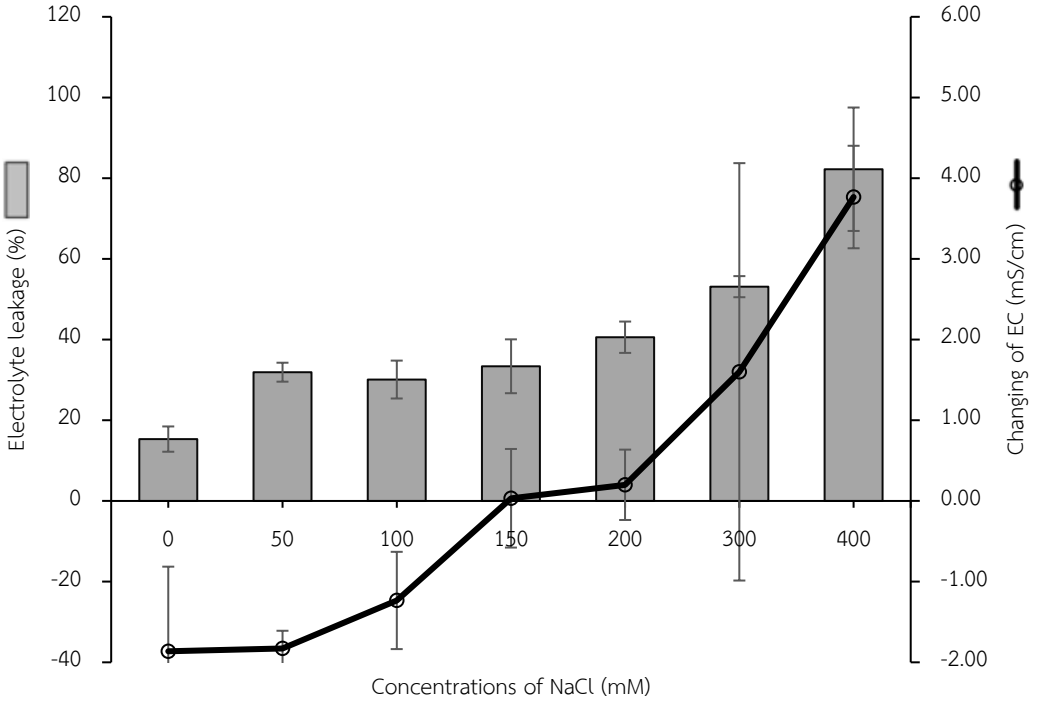
เมื่อพิจารณาค่า EL ของเซลล์ในซัสเพนชัน พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้ค่า EL สูงขึ้นเป็นลำดับ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้ค่า EL สูงสุด 82.22 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น ในขณะที่ชุดควบคุมไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ให้ค่า EL ของเซลล์ในซัสเพนชันต่ำสุด 15.33 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น (ภาพที่ 2.15)



ภาพที่ 2.15 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ของเซลล์ซัสเพนชันที่ได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์= ± SD)

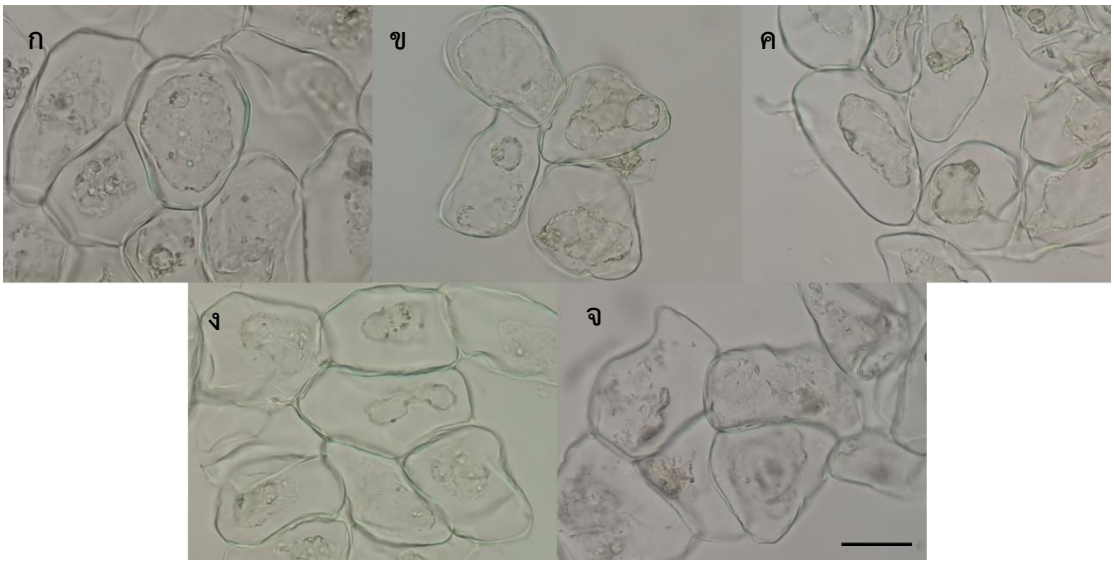
แท่งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

เมื่อพิจารณาค่า EL ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงค่า EC ของอาหารก่อนและหลังเพาะเลี้ยง พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ทำให้ค่า EL และการเปลี่ยนแปลงค่า EC ของอาหารเพิ่มขึ้น โดยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้ค่า EL สูงสุด 82.22 เปอร์เซ็นต์ และการเปลี่ยนแปลงค่า EC ของอาหารสูงสุด 3.77 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น การเพิ่มขึ้นของค่า EL แสดงให้เห็นถึงความเสียหายของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงค่า EC ของอาหารก่อนและหลังเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2.16)



ภาพที่ 2.16 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า EC ของอาหารก่อนเพาะเลี้ยงและหลังเพาะเลี้ยง และค่า EL ของเซลล์ซัสเพนชันที่ได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์= ± SD)

เมื่อตรวจสอบลักษณะของเซลล์ซัสเพนชันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า อาหารที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ มีเยื่อหุ้มเซลล์มีขอบเขตชัดเจนและใหญ่ที่สุดจนเกือบเต็มเซลล์และมีลักษณะเหมือนกันทุกเซลล์ อาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะใกล้เคียงกับชุดควบคุม (ภาพที่ 2.17ก-ข) อย่างไรก็ตาม โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีการหดตัวมากที่สุด (ภาพที่ 2.17ค-ง) โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ทำให้ไม่พบขอบเขตที่ชัดเจนของเยื่อหุ้มเซลล์ ออร์แกเนลกระจายอยู่ทั่วเซลล์ บางเซลล์ไม่พบออร์แกเนลอยู่ภายใน แต่พบโครงสร้างรูปกลมที่มีขอบเขตชัดเจน คล้ายผลึกหรือฟองอากาศอยู่ภายในเซลล์ บางเซลล์มีผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์หรือเซลล์แตก (ภาพที่ 2.17จ)



ภาพที่ 2.17 ลักษณะของเซลล์ในซัสเพนชันในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (บาร์=0.05 มิลลิเมตร)

ก. 0 มิลลิโมลาร์ ข. 50 มิลลิโมลาร์ ค. 100 มิลลิโมลาร์

ง. 150 มิลลิโมลาร์ จ. 200 มิลลิโมลาร์

วิจารณ์

สภาวะเครียดเค็มเป็นปัจจัยสำคัญจากสิ่งแวดล้อมที่จำกัดการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะความเครียดที่เกิดจากสารโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำ อาจกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของปาล์มน้ำมันร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสารโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ซัสเพนชันปาล์มน้ำมัน โดยให้อัตราการเจริญเติบโตในรูปของน้ำหนักสด และปริมาตรตะกอนเซลล์ในซัสเพนชันลดลงเป็นลำดับ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ซัสเพนชันต่ำสุด และยังพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้เซลล์มีสีน้ำตาลมากขึ้นเป็นลำดับ ผลดังกล่าวเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการเพิ่มเวลาย้ายเลี้ยงเซลล์ในซัสเพนชันที่เติมโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์ สอดคล้องกับ Al-khayri (2002) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตอบสนองของเซลล์อินทผาลัมในซัสเพนชัน พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้อัตราการเจริญและน้ำหนักสดของเซลล์ซัสเพนชันอินทผาลัมลดลงเป็นลำดับ เช่นเดียวกันกับ Ni และคณะ (2015) ศึกษาผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตอบสนองของเซลล์ *Nitraria tangutorum* ในซัสเพนชัน พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์ในซัสเพนชันลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโซเดียมคลอไรด์ก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ กรดนิวคลีอิก และโปรตีนเกิดความเสียหาย (ทวิพร และนุชนาถ, 2557) อีกทั้งยังยับยั้งการขนถ่ายธาตุอาหารบางชนิด เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม (Hanson *et al*., 1994) ยิ่งไปกว่านั้นเซลล์พืชที่อยู่ในสภาวะเครียดเค็มจะลดการขยายขนาด และการแบ่งเซลล์ (ฝนทิพย์, 2557) จึงทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ในซัสเพนชันมากกว่าที่จะกระตุ้นการเจริญเติบโต

สำหรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันได้ 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 371.24 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันปาล์มน้ำมัน 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มเวลาย้ายเลี้ยงเซลล์ในซัสเพนชันที่เติมโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์ ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในซัสเพนชันลดลงเป็นลำดับ และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของ

เซลล์ซัสเพนชันได้ 50 เปอร์เซ็นต์ต่ำลง โดยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ยับยั้งอัตราการเจริญของเซลล์ซัสเพนชันได้ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์มีค่า 226.58 และ 166.73 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่ Al-khayri (2002) ศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตอบสนองของเซลล์อินทผาลัมในซัสเพนชันพบว่า การทรีตโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 197.50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ยับยั้งอัตราการเจริญของเซลล์อินทผาลัมในซัสเพนชันได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชนิดของพืชที่ต่างกันมีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกัน ส่งผลให้พืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และระยะเวลาที่ได้รับสารโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณากราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์กับอัตราการเจริญของเซลล์ในซัสเพนชันหลังจากวางเลี้ยงนาน 4 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่าเส้นกราฟของแต่ละสัปดาห์มีลักษณะคล้ายตัวอักษร Z (Z shape) คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้เซลล์มีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดที่เพิ่มขึ้นโดยอัตราการเจริญลดลงคล้ายตัวอักษร Z จากการรายงานของ Carillo และคณะ (2011) และ อธิภัทร (2556) รายงานการตอบสนองของพืชต่อสภาวะเครียดเค็มและระยะเวลาที่พืชได้รับความเครียดเค็ม สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ คือ การตอบสนองต่อการขาดน้ำ (osmotic effect) และการตอบสนองต่อเกลืออย่างเฉพาะเจาะจงหรือการมีไอออนมากเกินไป (salt-specific effect) ซึ่งจากการทดลองนี้ คาดว่าเซลล์ซัสเพนชันมีการตอบสนองต่อโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ 2 ระยะ โดยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 ถึง 200 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เซลล์ในซัสเพนชันตอบสนองต่อการขาดน้ำ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 ถึง 400 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เซลล์ในซัสเพนชันตอบสนองต่อการมีไอออนมากเกินไป จึงทำให้กราฟมีลักษณะคล้ายตัวอักษร Z อย่างไรก็ตาม หลังจากวางเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในซัสเพนชันลดลงมากเมื่อเปรียบเทียบกับ 4 และ 8 สัปดาห์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ได้รับผลกระทบจากการขาดน้ำสะสมเป็นเวลานาน ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่านอกจากความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แล้ว ระยะเวลาที่พืชได้รับโซเดียมคลอไรด์นานขึ้นก็เป็นปัจจัยสำคัญที่เพิ่มความเสียหายของเซลล์จากการขาดน้ำและความเป็นพิษของไอออน และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในซัสเพนชัน

จากการศึกษาของนวรัตน์ (2558) ถึงการปรับตัวทางกายวิภาคของพืชภายใต้สภาวะเค็ม พบว่า พืชมีการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของราก โดยเพิ่มสัดส่วนของรากแขนง เพื่อตอบสนองต่อการขาดน้ำ ซึ่งจากการศึกษานี้ พบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 ถึง 200 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้

แคลลัสมีโครงสร้างคล้ายรากเกิดขึ้น โดยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ให้อัตราการเกิดโครงสร้างคล้ายรากสูงสุด แสดงให้เห็นถึงการปรับตัวของเซลล์ซัสเพนชัน เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ทำให้ไอออนในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นและเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความดันออสโมซิสในอาหารที่เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ ส่งผลให้เซลล์ดูดน้ำและธาตุอาหารได้น้อยลง (สุมาลี, 2555) เซลล์จึงมีการปรับตัวโดยมีการพัฒนาโครงสร้างคล้ายรากออกมารอบเซลล์เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารและเพิ่มการดูดน้ำและธาตุอาหาร อย่างไรก็ตามโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 ถึง 400 มิลลิโมลาร์ ไม่พบโครงสร้างคล้ายราก แต่พบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เซลล์ซัสเพนชันมีลักษณะเปียกหรือฉ่ำน้ำ สุมาลี (2555) รายงานว่าความเข้มข้นของโซเดียมที่มากเกินไป ส่งผลให้ไอออนในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น พืชมีการสะสมโซเดียมไอออนในไซโทพลาสซึมมากขึ้น เกิดความเป็นพิษและเป็นอัตรายต่อเซลล์พืช ทำให้เซลล์แตกและตาย

เมื่อพืชได้รับสภาวะเครียดเค็มจากการสะสมโซเดียมไอออนในระดับสูงซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้ความสามารถในการใช้แสงในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของรงควัตถุลดลง นำไปสู่การเกิดเป็นอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์เนื้อเยื่อ (นวรัตน์, 2558) พืชมีการตอบสนองโดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ โปรตีน หรือเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโปรตีนรวมของเซลล์ในซัสเพนชันในการศึกษานี้ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนรวมเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าชุดควบคุม ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโปรตีนรวมสูงที่สุด แสดงให้เห็นว่า ความเครียดในระดับต่ำ กระตุ้นการสร้างโปรตีนมากกว่าความเครียดในระดับสูง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Niknam และคณะ (2011) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโปรตีนของ *Acanthophyllum* สองสายพันธุ์ พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ให้ปริมาณโปรตีนของ *Acanthophyllum sordidum* เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ อย่างไรก็ตามเซลล์ในซัสเพนชันที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ในการศึกษานี้ ให้ปริมาณโปรตีนต่ำกว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายมากกว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ จึงทำให้ปริมาณโปรตีนรวมต่ำกว่า นวรัตน์ (2558) รายงานว่า การสะสมโซเดียมในระดับสูง ทำให้เกิดความเป็นพิษในระดับสูงต่อเซลล์ นำไปสู่การเกิดสารอนุมูลอิสระในปริมาณมาก ทำให้เกิด lipid peroxidation ในเยื่อหุ้มเซลล์ มีการทำลายดีเอ็นเอ ทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพ และทำให้เอนไซม์ทำงานผิดปกติ นอกจากนี้ โซเดียมไอออนและโพแทสเซียมไอออนมีคุณสมบัติคล้ายกัน การสะสมโซเดียมไอออนมากขึ้นทำให้มีการแย่งกันจับกับ binding site ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ

เช่น การสร้างโปรตีน เป็นต้น ด้วยเหตุนี้อาจส่งผลให้ปริมาณโปรตีนรวมของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีค่าต่ำเมื่อเลี้ยงร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง

จากผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณโพรลีนของเซลล์ในซัสเพนชัน พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้ปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้น โดยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโพรลีนสูงสุด ในขณะที่ชุดควบคุม ให้ปริมาณโพรลีนน้อยสุด สอดคล้องกับรายงานการศึกษาใน *Bacopa monnieri* L. (Ahire *et al.,* 2013), *Catharanthus roseus* (Elkahoui *et al*., 2005) และ *Populus euphratica* (Zhang *et al*., 2004) พบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการสะสมโพรลีน glycine betaine และ total soluble sugar และการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้ปริมาณโพรลีน glycine betaine และ total soluble sugar เพิ่มขึ้น โดยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโพรลีน glycine betaine และ total soluble sugar สูงสุด อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโพรลีนต่ำกว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ อาจเนื่องมาจาก โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ให้การเกิดโครงสร้างคล้ายรากสูงสุด และโครงสร้างคล้ายรากมีส่วนช่วยในการปรับสมดุลของน้ำในกระบวนการ osmotic adjustment ในขณะที่โพรลีนเป็นสาร osmolyte มีผลช่วยในการปรับค่า water potential ของน้ำในพืชให้ต่ำลงในกระบวนการเดียวกัน (พรศักดิ์, 2543) จึงทำให้การสะสมของโพรลีนต่ำลง สอดคล้องกับการศึกษาใน *Carthamus tinctorius* L. (Golkar and Taghizadeh, 2018) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้น โดยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโพรลีนสูงสุด ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโพรลีนต่ำกว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เช่นเดียวกับการศึกษาใน *Sesuvium portulacastrum* L. (Lokhande *et al*., 2011) พบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 600 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโพรลีนและ glycine betaine สูงสุด ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโพรลีนและ glycine betaine ต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ สอดคล้องกับการศึกษาใน *Clerodendrum inerme* L. และ *Phyla nodiflora* L. (Xiong *et al*., 2019) พบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโพรลีนสูงสุด ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณโพรลีนต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ทั้งนี้จะพบว่าการสะสมโพรลีนที่มากขึ้นในพืชภายใต้สภาวะเครียดเค็มมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับการเจริญเติบโต จึงเป็นไปได้ว่าปริมาณโพรลีนที่เพิ่มขึ้นเป็นเพียงลักษณะอาการของพืชภายใต้สภาวะเครียดไม่ใช่การแสดงว่าพืชทนทานต่อสภาวะเครียด (พรศักดิ์, 2543) อย่างไรก็ตามพืชมีการสะสมโพรลีนเพื่อตอบสนองต่อระดับ

ความเข้มข้นของสารโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน เนื่องมาจากชนิดพืชที่แตกต่างกัน มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกัน พืชบางชนิดอาจมีลักษณะทางพันธุกรรมที่สามารถปรับสมดุลของน้ำในกระบวนการ osmotic adjustment ได้ดี ส่งผลให้เซลล์ของพืชชนิดดังกล่าวได้รับความเครียดจากการขาดน้ำน้อย จึงมีการสะสมโพรลีนน้อย ในทางตรงกันข้ามพืชบางชนิดอาจมีลักษณะทางพันธุกรรมที่สามารถปรับสมดุลของน้ำในกระบวนการ osmotic adjustment ได้ไม่ดี ส่งผลให้เซลล์ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำมากกว่า จึงมีการสะสมโพรลีนในปริมาณมาก

เมื่อพิจารณาค่า EC ของอาหารก่อนและหลังเพาะเลี้ยงเซลล์ในซัสเพนชัน พบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 ถึง 100 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้ค่า EC ของอาหารก่อนเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันมีค่าสูงกว่าหลังเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าเซลล์ในซัสเพนชันมีไอออนรั่วไหลออกมาสู่อาหารน้อย โดยที่อาหารไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ มีค่า EC ของอาหารหลังเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันต่ำที่สุด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้ค่า EC ของอาหารหลังเพาะเลี้ยงเซลล์มีค่าสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่า เซลล์ซัสเพนชันมีไอออนรั่วไหลออกมาสู่อาหารมาก โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้ค่า EC ของอาหารมีค่าสูงสุด สอดคล้องกับการศึกษาใน *Camelina sativa* cv. Calena (Khalid *et al*., 2015) และ *Petunia* (Małkiewicz and Fornal, 2018) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ค่า EC เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ เมื่อพิจารณาค่า EL พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสารโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้เซลล์ในซัสเพนชันมีค่า EL เพิ่มขึ้น โดยที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 ให้ค่า EL สูงสุด สอดคล้องกับลักษณะของเซลล์ที่ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้เกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ มีเซลล์แตก และตายมากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาในปวยเหล็ง (Muchate *et al*., 2019) และมันฝรั่ง (Daneshmand *et al*., 2010) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ค่า EL เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ

การทดลองที่ 3

ผลของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลว 2-iP และซอร์บิทอลต่อการฟื้นตัวและการตอบสนองของเซลล์ในซัสเพนชันบนอาหารแข็งที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์

Effects of NaCl in Liquid Media, 2-iP and Sorbitol on Recovery and Responses of Cell in Suspension on Solidified Media without NaCl

บทนำ

พืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อระดับของความเครียดเค็มแตกต่างกัน ในสภาวะเครียดเค็มระดับกลางถึงระดับต่ำทำให้พืชบางชนิดไม่สามารถอยู่รอดได้ ในขณะที่พืชบางชนิดถูกกระตุ้นการเจริญเติบโตมากขึ้น Zhang และคณะ (2004) ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตอบสนองของแคลลัส *Populus euphratica* โดยวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับการเติม BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 วัน พบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด Lokhande และคณะ (2011) ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองของ *Sesuvium portulacastrum* โดยวางเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับการเติม BA เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 วัน พบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้ง จำนวนยอด จำนวนใบต่อชิ้นส่วน ความยาวยอดและความยาวใบสูงสุด นอกจากนี้การเจริญเติบโตของพืชบางชนิดหลังจากได้รับสภาวะเครียดเป็นระยะเวลาหนึ่ง แล้วไม่มีการให้สภาวะเครียดต่อนั้นสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ จากรายงานการศึกษาของ Javed และคณะ (2017) นำต้นกล้า *Brasica napus* อายุ 21 วัน มาทรีตด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 15 วันหลังจากนั้นไม่ให้โซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 21 วัน พบว่า ความสูงต้น เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น พื้นที่ใบ อัตราการสังเคราะห์แสง และการเปิดปิดปากใบเพิ่มขึ้น Guo และคณะ (2015) ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการฟื้นตัวของต้นกล้าฝ้าย (*Gossypium hirsutum*) โดยนำต้นกล้าอายุ 15 วัน มาปลูกในกระถางขนาด 40x40 เซนติเมตร ที่มีดิน และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน หลังจากนั้นไม่ให้โซเดียมคลอไรด์ และวางเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของยอดและรากเพิ่มขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) เพิ่มขึ้น ส่วนการสะสมของ MDA กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ peroxidase (POD) ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ปัจจุบันมีการนำสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมนั้นมาใช้ในงานวิจัยต่าง ๆ เพื่อกระตุ้นการสะสมสารชีวเคมีที่สำคัญ หรือกระตุ้นกระบวนการพัฒนาของพืช จากรายงานการศึกษาของ Unnikrishnan และคณะ (1991) พบว่า โซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของ *Sapindus trifoliatus* การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS เติม

โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับการเติม BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 วัน พบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดของโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด Kiyosue และคณะ (1989) ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของแครอท โดยวางเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมไม่เติมโซเดียมคลอไรด์เพาะเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด

ปาล์มน้ำมันจัดอยู่ในกลุ่มของพืชที่สามารถทนเค็มได้ในระดับปานกลาง สามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตในสภาวะเครียดเค็มที่ไม่สูงมากนัก แต่ยังไม่มีการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ปาล์มน้ำมันหลังจากได้รับสภาวะเครียดเค็มจากสารโซเดียมคลอไรด์ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลวสูตร OPCM ต่อการฟื้นตัวเซลล์ในซัสเพนชันบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

ใช้เซลล์ซัสเพนชันของปาล์มน้ำมันพันธุ์ ทรัพย์ มอ. 1 ลูกผสมเบอร์ 25 ที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 50 100 150 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH 5.7 วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมงต่อวัน โดยย้ายเลี้ยงลงในอาหารใหม่สูตรเดิมเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นดังกล่าวทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก วิชาเอกพืชศาสตร์ สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลวต่อการฟื้นตัวของเซลล์ในซัสเพนชันบนอาหารแข็งที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์

นำเซลล์ในซัสเพนชันขนาด 30-40 ตารางมิลลิเมตร ที่ผ่านการวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และย้ายเลี้ยงลงในอาหารใหม่สูตรเดิม (เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นเดิม) ทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH 5.7 เติมผงวุ้นความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักสด ขนาดแคลลัส และจำนวนโนดูล ทุก 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

2. การศึกษาผลของ dicamba และ 2-iP ในอาหารแข็งต่อการเจริญของแคลลัสที่ผ่านการทรีตด้วยโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชัน

นำเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการทรีตด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ หนัก 100 มิลลิกรัม ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติมหรือไม่เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมหรือไม่เติม 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ผงวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบค่าดัชนีการเจริญเติบโต (growth index; GI) น้ำหนักสด ขนาดของแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์ในซัสเพนชัน และจำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอด เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และสูตรอาหาร วางแผนการทดลองแบบ 5x3 factorial design in CRD มี 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ มี 5 ระดับ และ การเติม dicamba และ 2-iP มี 3 สูตร วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 หลอด สำหรับค่าดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสนั้น คำนวณโดยใช้สมการ

$$GI = \frac{\text{น้ำหนักแคลลัสหลังวางเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์} - \text{น้ำหนักแคลลัสก่อนวางเลี้ยง}}{\text{น้ำหนักแคลลัสก่อนวางเลี้ยง}}$$

3. การศึกษาความเข้มข้นของซอร์บิทอลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

ย้ายแคลลัส (ผ่านการทรีตด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2) อายุ 4 สัปดาห์หลังการย้ายเลี้ยง หนัก 100 มิลลิกรัม วางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 โมลาร์ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ผงวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักสด และขนาดของแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของซอร์บิทอล โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

ผล

1. ผลของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลวต่อการฟื้นตัวของเซลล์ในซัสเพนชันบนอาหารแข็งที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์

เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ เมื่อนำมาย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้น้ำหนักสดสูงกว่าชุดควบคุม โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดสูงสุด 297.50 มิลลิกรัม และอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด 183.08 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น อย่างไรก็ตามเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดน้อยกว่าชุดควบคุม โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดน้อยสุด 102.50 มิลลิกรัม และอัตราการเจริญเติบโตต่ำสุด 63.08 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น (ตารางที่ 2.7)

เมื่อพิจารณาขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ให้ขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดควบคุม โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้นสูงสุด 53.50 ตารางมิลลิเมตร ในขณะที่เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ให้ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้นน้อยกว่าชุดควบคุม อย่างไรก็ตามเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ไม่มีการเพิ่มขนาด (ตารางที่ 2.7)

ในส่วนของจำนวนโนดูลเฉลี่ย พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้ผลดีที่สุด 44 โนดูลต่อหลอด เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 150 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ให้จำนวนโนดูลเฉลี่ยน้อยกว่าชุดควบคุม และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ทำให้จำนวน

โนดูลเฉลี่ยลดลงเป็นลำดับ อย่างไรก็ตามเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ไม่มีการสร้างโนดูล (ตารางที่ 2.7)

ตารางที่ 2.7 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลวต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

โซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม) (± SD)	ขนาดของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น (ตารางมิลลิเมตร) (± SD)	จำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอด (± SD)
0	162.50± 10.61bc (100.00)	26.90±4.38ab	33.00±0.00b
50	297.50±17.68a (183.08)	53.50±8.20a	44.00±0.00a
100	222.50±67.17ab (136.92)	50.00±5.66a	32.75±1.06b
150	177.50±17.68bc (109.23)	35.50±9.19ab	24.00±0.00c
200	140.00±28.28bc (86.15)	19.75±1.06bc	5.50±0.71d
300	120.00±0.00bc (73.85)	9.00±12.73bc	2.00±1.41e
400	102.50±10.61c (63.08)	0.00±0.00d	0.00±0.00f
F-test	**	**	**
C.V. (%)	16.99	26.01	3.57

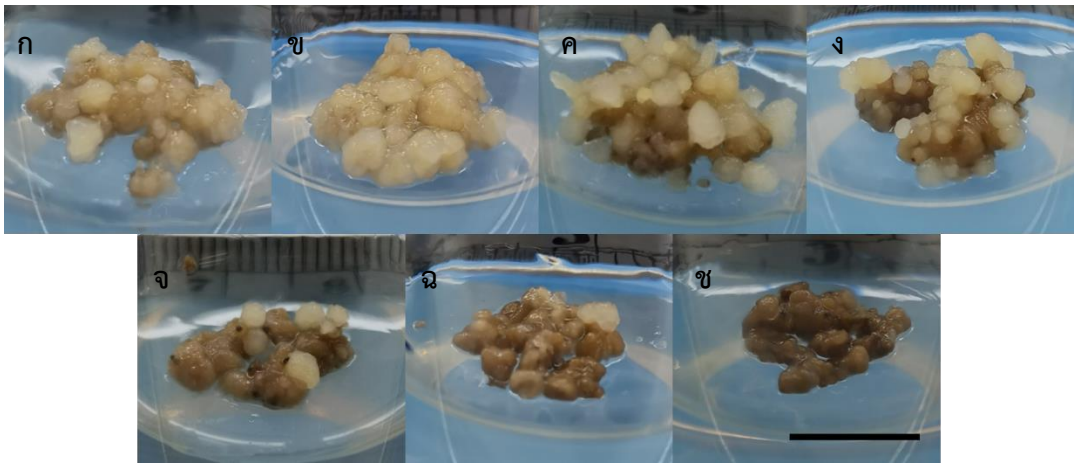
** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

ค่าในวงเล็บแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

จากลักษณะของแคลลัสหลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่เติมโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น ให้แคลลัสที่มีโครงสร้างเกาะกันอย่างหลวม ๆ โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสสีครีมเหมือนกับชุดควบคุม (ภาพที่ 2.18ก-ข) เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 150 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ ให้การสร้างโน

ดูลสีครีมจากแคลลัสสีน้ำตาล (ภาพที่ 2.18ค-ฉ) แสดงให้เห็นว่าแคลลัสมีการฟื้นตัวหรือสามารถเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตามเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสสีดำทั้งหมดและไม่มีการสร้างโนดูล (ภาพที่ 2.18ช)



ภาพที่ 2.18 ลักษณะของแคลลัสที่พัฒนาจากการย้ายเซลล์ในซัสเพนชันที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์=1 เซนติเมตร)

ก. 0 มิลลิโมลาร์ ข. 50 มิลลิโมลาร์
ค. 100 มิลลิโมลาร์ ง. 150 มิลลิโมลาร์
จ. 200 มิลลิโมลาร์ ฉ. 300 มิลลิโมลาร์
ช. 400 มิลลิโมลาร์

เมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์ (รวมเวลาเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์) พบว่าเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดแคลลัสสูงกว่าชุดควบคุม โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 416.50 มิลลิกรัม และอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด 181.09 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดแคลลัสน้อยกว่าชุดควบคุม โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยง

ในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดแคลลัสต่ำสุด 102.5 มิลลิกรัม อัตราการเจริญเติบโตต่ำสุด 44.57 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.8)

ในส่วนของขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ให้ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดควบคุม โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้นสูงสุด 249.50 ตารางมิลลิเมตร ในขณะที่เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ให้ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้นต่ำกว่าชุดควบคุม เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ไม่มีการเพิ่มขนาด (ตารางที่ 2.8)

เมื่อพิจารณาจำนวนโนดูลเฉลี่ย พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ให้จำนวนโนดูลเฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุมแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้จำนวนสูงสุด 84.00 โนดูลต่อหลอด ในขณะที่เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ให้จำนวนโนดูลเฉลี่ยต่ำกว่าชุดควบคุม โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ไม่มีการสร้างโนดูล (ตารางที่ 2.8)

ตารางที่ 2.8 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลวต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

โซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม) (± SD)	ขนาดของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น (ตารางมิลลิเมตร) (± SD)	จำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอด (± SD)
0	230.00±28.28b (100.00)	79.70±21.64ab	38.50±10.61ab
50	416.50±40.31a (181.09)	127.67±54.24ab	51.50±14.85ab
100	399.00±12.73a (173.48)	249.50±187.38a	84.00±41.01a
150	347.50±10.61a (151.09)	223.00±53.74a	77.00±4.24a
200	160.00±14.14bc (69.57)	69.38±3.39ab	12.00±2.83b
300	120.00±3.00c (52.17)	0.00±0.00c	2.00±0.71b
400	102.50±10.61c (44.57)	0.00±0.00c	0.00±0.00c
F-test	**	*	**
C.V. (%)	8.18	71.87	45.20

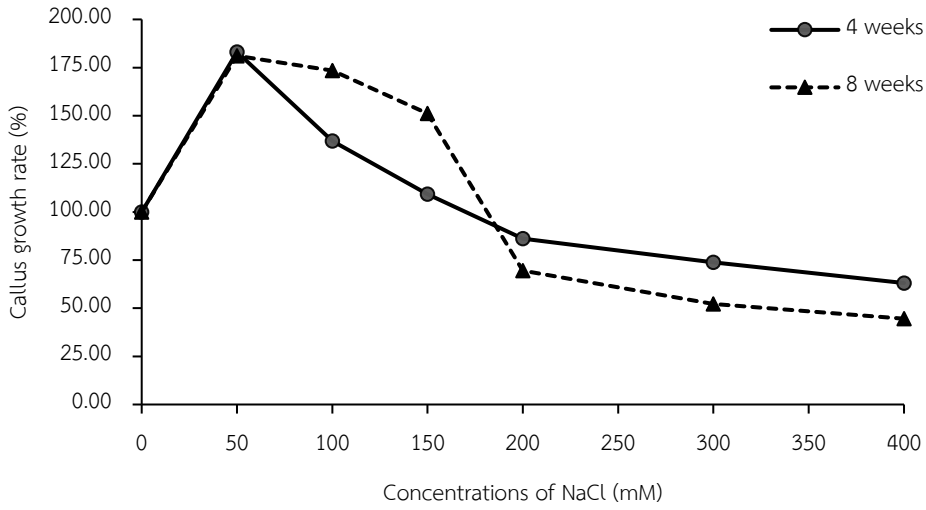
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.05$)

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

ค่าในวงเล็บแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

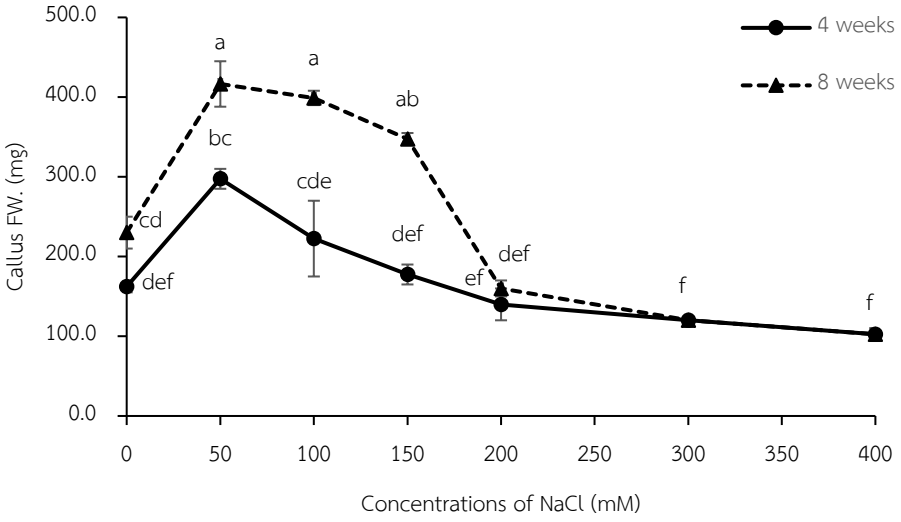
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ วางเลี้ยงบนอาหารแข็งไม่เติมโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้อัตราการเจริญเติบโตสูงกว่า 4 สัปดาห์ที่ 173.48 และ 151.09 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ วางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงกว่าที่ 8 สัปดาห์ ที่ 52.17 และ 44.57 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 2.19)



ภาพที่ 2.19 ผลของโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันต่ออัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

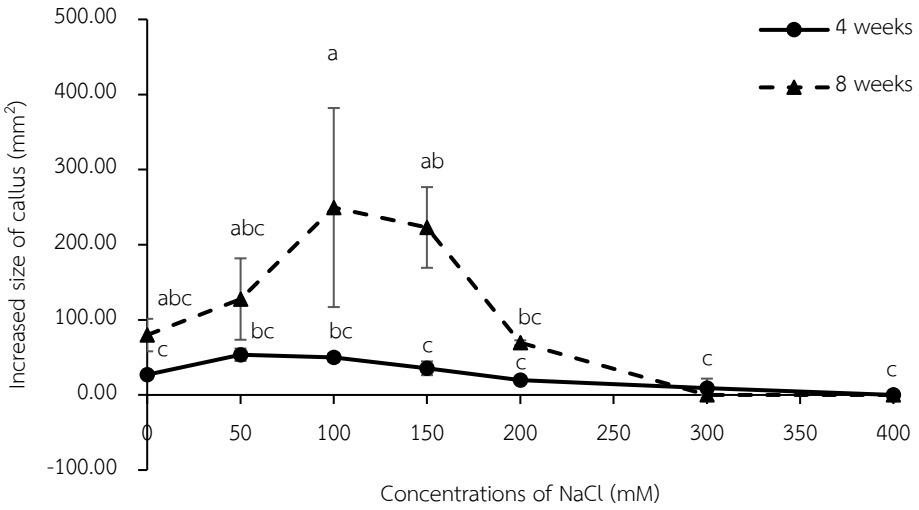
นอกจากนี้พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ วางเลี้ยงบนอาหารแข็งไม่เติมโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้น้ำหนักสดแคลลัสมากกว่าที่ 4 สัปดาห์ อย่างชัดเจน โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 416.5 มิลลิกรัม ในขณะที่เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ไม่มีการเพิ่มน้ำหนักสด (ภาพที่ 2.20)



ภาพที่ 2.20 ผลของโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันต่อน้ำหนักสดของแคลลัส หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์= ± SD)

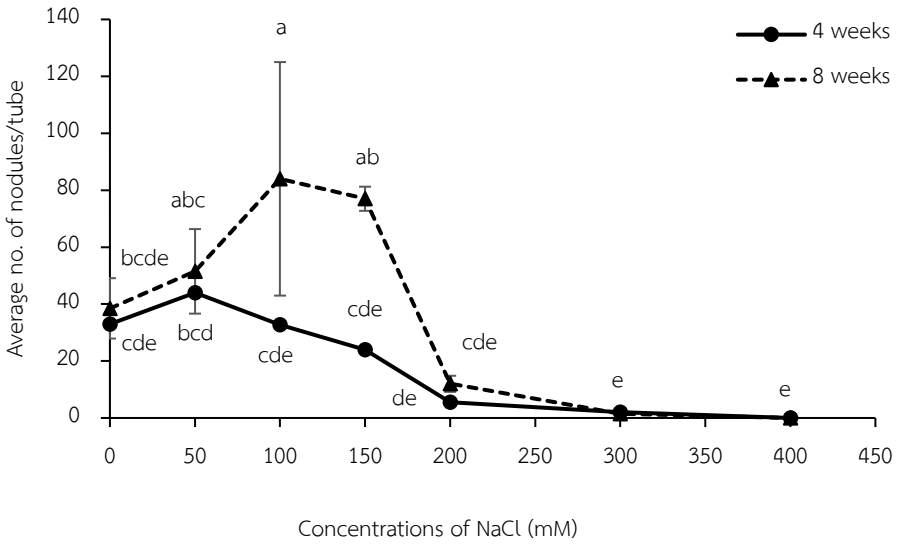
ตัวอักษรที่ต่างกันบนเส้นกราฟมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

สำหรับขนาดแคลลัส พบว่าเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ วางเลี้ยงบนอาหารแข็งไม่เติมโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้ขนาดที่เพิ่มขึ้นของแคลลัสสูงกว่า 4 สัปดาห์ อย่างเห็นได้ชัด โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้นสูงสุด 249.50 ตารางมิลลิเมตร อย่างไรก็ตามเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ไม่มีการเพิ่มขนาด (ภาพที่ 2.21)



ภาพที่ 2.21 ผลของโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันต่อขนาดของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นหลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์= ± SD)
ตัวอักษรที่ต่างกันบนเส้นกราฟมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

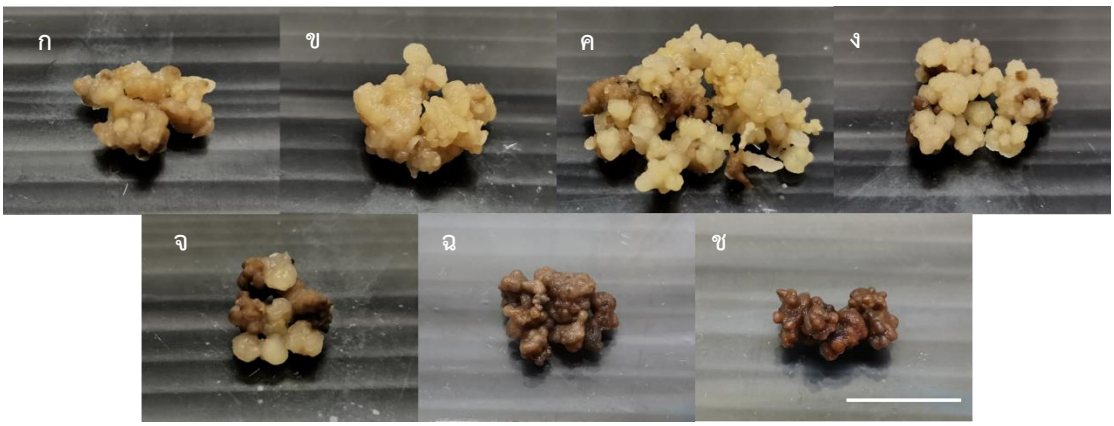
เมื่อพิจารณาจำนวนโนดูลเฉลี่ย พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ วางเลี้ยงบนอาหารแข็งไม่เติมโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้จำนวนโนดูลเฉลี่ยเพิ่มขึ้นสูงกว่าที่ 4 สัปดาห์ โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้จำนวนสูงสุด 84 โนดูลต่อหลอด อย่างไรก็ตามเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ไม่มีการสร้างโนดูล (ภาพที่ 2.22)



ภาพที่ 2.22 ผลของโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันต่อจำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอดที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์= ± SD)

ตัวอักษรที่ต่างกันบนเส้นกราฟมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

เมื่อพิจารณาลักษณะของแคลลัสหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น วางเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ ให้แคลลัสที่มีโครงสร้างเกาะกันอย่างหลวม ๆ โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสสีครีมใกล้เคียงกับชุดควบคุม (ภาพที่ 2.23ก-ข) เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้การสร้างโนดูลสีครีมมากที่สุด (ภาพที่ 2.23ค) ในขณะที่เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ให้การสร้างโนดูลสีครีมน้อยที่สุด (ภาพที่ 2.23จ) อย่างไรก็ตาม เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสมีสีน้ำตาล และตายทั้งหมด ไม่มีการสร้างโนดูล จึงไม่มีการย้ายเลี้ยงต่อไป (ภาพที่ 2.23ฉ-ช)



ภาพที่ 2.23 ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการย้ายเซลล์ในซัสเพนชันที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์= 1 เซนติเมตร)

ก. 0 มิลลิโมลาร์ ข. 50 มิลลิโมลาร์
ค. 100 มิลลิโมลาร์ ง. 150 มิลลิโมลาร์
จ. 200 มิลลิโมลาร์ ฉ. 300 มิลลิโมลาร์
ช. 400 มิลลิโมลาร์

2. ผลของ dicamba และ 2-iP ในอาหารแข็งต่อการเจริญของแคลลัสที่ผ่านการทรีตด้วยโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชัน

เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตสูงสุด 1.32 ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ที่ให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโต 1.03 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น ๆ ในขณะที่เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตต่ำสุด 0.24 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น ในส่วนของการเติม dicamba และ 2-iP นั้นพบว่า dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตสูงสุด 1.09 ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเติม 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว ในขณะที่การเติม

dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2-iP 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ดัชนีการเจริญเติบโตต่ำสุด 0.80 อย่างไรก็ตาม โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในซัสเพนชัน ร่วมกับ dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวหรือ ร่วมกับ 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตรบนอาหารแข็ง ให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตสูงสุด 1.46 นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชันกับการเติม dicamba และ 2-iP ในอาหารแข็งนั้น มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน (ตารางที่ 2.9)

ในส่วนของน้ำหนักสดแคลลัสพบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 231.58 มิลลิกรัม ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น ในขณะที่เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดแคลลัสต่ำสุด 123.75 มิลลิกรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น เมื่อพิจารณาผลของการเติม dicamba และ 2-iP นั้นพบว่า dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวให้น้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 208.71 มิลลิกรัม ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเติม 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวอย่างไรก็ตาม พบว่า เซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 246.25 มิลลิกรัม เมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชันกับ dicamba และ 2-iP (ตารางที่ 2.9)

ตารางที่ 2.9 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชัน dicamba และ 2-iP ต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

PGRs (mg/l) / NaCl (mM)	ดัชนีการเจริญเติบโต (± SD)			
	0.1 di	0.1 di + 0.3 2-iP	0.3 2-iP	ค่าเฉลี่ย (NaCl)
0	0.86±0.08ab	0.72±0.17bcd	0.78±0.10abc	0.79±0.04B
50	1.46±0.12a	1.02±0.20ab	1.46±0.263a	1.32±0.08A
100	0.86±0.36ab	0.76±0.19bc	1.24±0.62ab	0.95±0.13B
150	1.29±0.20ab	0.87±0.06ab	0.94±0.23ab	1.03±0.07AB
200	0.60±0.10bcd	0.15±0.00d	0.10±0.14d	0.24±0.13C
ค่าเฉลี่ย (PGRs)	1.09±0.08A	0.80±0.06B	0.99±0.12AB	
F (NaCl)		**		
F (PGRs)		**		
F (NaCl x PGRs)		**		
C.V. (%)		26.81		
PGRs (mg/l) / NaCl (mM)	น้ำหนักสดของแคลลัส (มิลลิกรัม) (± SD)			
	0.1 di	0.1 di + 0.3 2-iP	0.3 2-iP	ค่าเฉลี่ย (NaCl)
0	185.75±8.26ab	172.50±17.08bcd	178.25±9.44abc	178.83±3.60B
50	246.25±12.11a	202.50±19.90ab	246.00±26.41a	231.58±8.14A
100	186.25±35.67ab	176.25±19.31abc	223.75±62.23ab	195.42±12.78B
150	228.75±20.15ab	187.00±6.25ab	194.50±22.39ab	203.42±7.19AB
200	160.00±0.00bcd	115.00±0.00d	110.00±14.14d	123.75±12.81C
ค่าเฉลี่ย (PGRs)	208.71±8.45A	180.47±6.07B	199.44±12.07AB	
F (NaCl)		**		
F (PGRs)		**		
F (NaCl x PGRs)		**		
C.V. (%)		13.15		

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษร (พิมพ์เล็ก) แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษร (พิมพ์ใหญ่) แตกต่างกันในแถวหรือสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

เมื่อพิจารณาขนาดของแคลลัส พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ให้ขนาดของแคลลัสสูงสุดที่ 134.38 ตารางมิลลิเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ให้ขนาดของแคลลัสต่ำสุด 87.83 ตารางมิลลิเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น สำหรับ dicamba และ 2-iP นั้น พบว่า dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว ให้ขนาดของแคลลัสสูงสุด 130.11 ตารางมิลลิเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับการเติม dicamba และ 2-iP ความเข้มข้นอื่น อย่างไรก็ตาม พบว่าเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว ให้ขนาดของแคลลัสสูงสุด 137.25 ตารางมิลลิเมตร นอกจากนี้ พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชันกับ dicamba และ 2-iP (ตารางที่ 2.10)

ในส่วนของจำนวนโนดูลเฉลี่ยนั้น พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้ผลสูงสุด 41.86 โนดูลต่อหลอด ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ให้จำนวนต่ำสุด 8.5 โนดูลต่อหลอด ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น เมื่อพิจารณาผลของการเติม dicamba และ 2-iP นั้นพบว่า dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว ให้จำนวนโนดูลเฉลี่ยสูงสุด 36.54 โนดูลต่อหลอด ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเติม 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในซัสเพนชัน ร่วมกับ dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารแข็ง ให้จำนวนโนดูลเฉลี่ยสูงสุด 51.04 โนดูลต่อหลอด นอกจากนี้ พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชันกับ dicamba และ 2-iP (ตารางที่ 2.10)

ตารางที่ 2.10 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชัน dicamba และ 2-iP ต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

PGRs (mg/l) / NaCl (mM)	ขนาดของแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) (± SD)			
	0.1 di	0.1 di + 0.3 2-iP	0.3 2-iP	ค่าเฉลี่ย (NaCl)
0	95.63±13.61bc	109.00±15.53bc	101.33±7.84bc	101.98±3.72BC
50	137.25±30.51ab	115.08±17.43bc	134.45±8.15ab	128.93±6.20A
100	120.20±9.80bc	112.25±12.92bc	125.25±15.94bc	119.23±3.79AB
150	176.50±25.32a	119.53±12.86bc	107.13±26.34bc	134.38±10.82A
200	93.50±0.00bc	80.80±0.00c	88.50±23.33bc	87.83±7.23C
ค่าเฉลี่ย (PGRs)	130.11±8.76A	112.01±3.79B	113.87±5.14B	
F (NaCl)		**		
F (PGRs)		*		
F (NaCl x PGRs)		**		
C.V. (%)		15.17		
PGRs (mg/l) / NaCl (mM)	จำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อหลอด (± SD)			
	0.1 di	0.1 di + 0.3 2-iP	0.3 2-iP	ค่าเฉลี่ย (NaCl)
0	18.62±4.30cde	17.75±4.57cde	26.12±4.51bcd	20.83±1.63BC
50	51.04±4.89a	33.17±9.41abc	41.37±7.37ab	41.86±2.94A
100	30.00±6.78bc	27.50±14.73bcd	40.75±22.67ab	32.75±4.55AB
150	50.62±14.91a	31.87±8.04abc	31.37±3.94abc	37.96±3.76A
200	20.00±0.00cde	9.00±0.00de	2.50±2.12e	8.50±4.17C
ค่าเฉลี่ย (PGRs)	36.54±3.97A	26.48±2.77B	31.31±3.77AB	
F (NaCl)		**		
F (PGRs)		*		
F (NaCl x PGRs)		*		
C.V. (%)		32.76		

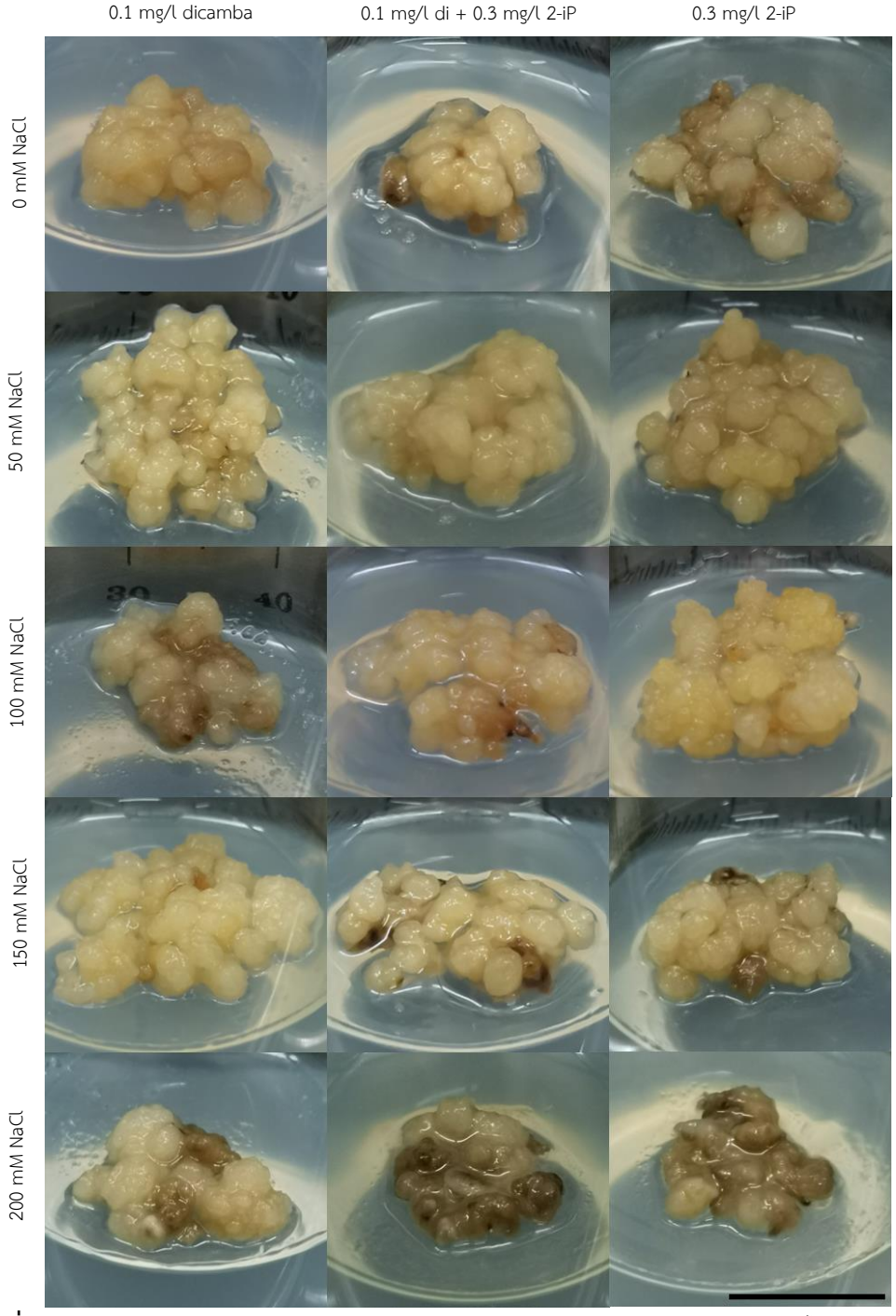
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.05$)

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษร (พิมพ์เล็ก) แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษร (พิมพ์ใหญ่) แตกต่างกันในแถวหรือสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ลักษณะของแคลลัส พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น ให้แคลลัสมีสีเหลืองน้อยลงและเกิดแคลลัสสีน้ำตาลมากขึ้น โดยเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสมีสีครีมและสมบูรณ์ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น แต่เมื่อพิจารณาผลของโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชันร่วมกับการเติม dicamba และ 2-iP ในอาหารแข็งนั้น พบว่าเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่เติม 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสที่มีสีครีม (ภาพที่ 2.24)



ภาพที่ 2.24 ลักษณะของแคลลัสจากการย้ายเซลล์ในซัสเพนชันเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกัน ไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba และ 2-iP ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์=1 เซนติเมตร)

3. ผลของซอร์บิทอลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

การเพิ่มความเข้มข้นของซอร์บิทอลส่งผลให้น้ำหนักสด และขนาดของแคลลัสลดลงเป็นลำดับ โดยชุดควบคุมที่ไม่เติมซอร์บิทอลให้น้ำหนักสดสูงสุด 211 มิลลิกรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมซอร์บิทอลทุกความเข้มข้น ทำนองเดียวกับขนาดของแคลลัสชุดควบคุมให้ผลสูงสุด 110.20 ตารางมิลลิเมตร แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.1 และ 0.2 โมลาร์ ในขณะที่ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ให้น้ำหนักสดน้อยสุด 118 มิลลิกรัม (อัตราการเจริญ 55.92 เปอร์เซ็นต์) และขนาดของแคลลัสต่ำสุด 71.00 ตารางมิลลิเมตร (ตารางที่ 2.11)

ตารางที่ 2.11 ผลของความเข้มข้นของซอร์บิทอลต่อการเจริญ (น้ำหนักสด และขนาด) ของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

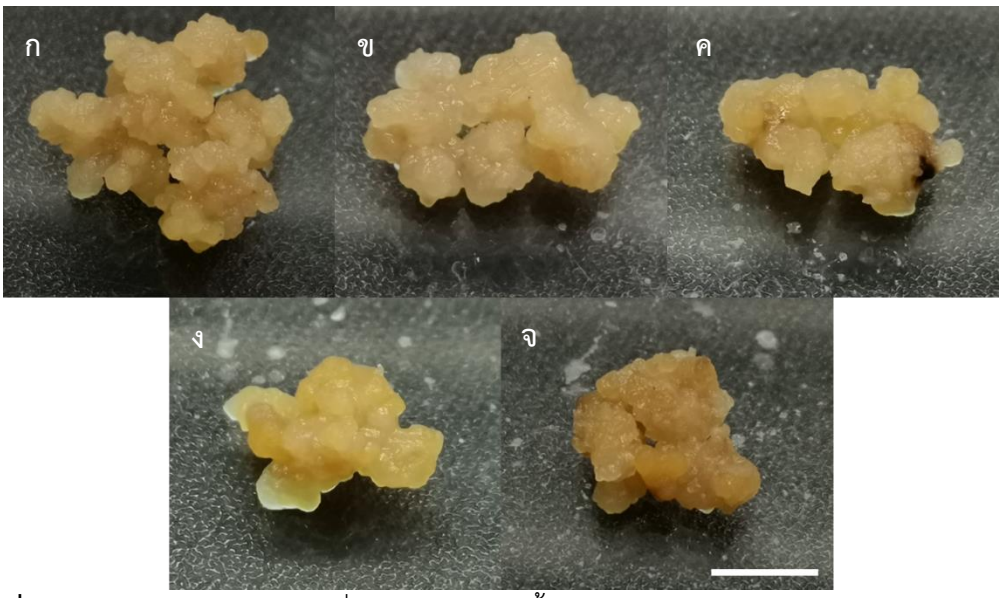
ซอร์บิทอล (โมลาร์)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม) (± SD)	ขนาดของแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) (± SD)
0	211.00±23.82a (100)	110.00±12.76a
0.1	181.00±11.40b (85.78)	100.25±15.07ab
0.2	154.00±20.43bc (72.99)	105.70±12.70ab
0.3	139.00±10.84cd (65.88)	82.80±8.04bc
0.4	118.00±11.51d (55.92)	70.80±13.39c
F-test	**	**
C.V. (%)	10.29	13.40

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01)

ค่าในวงเล็บแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

เมื่อพิจารณาลักษณะของแคลลัสพบว่า การเติมซอร์บิทอลทุกความเข้มข้นให้แคลลัสมีโครงสร้างแบบเกาะกันอย่างหลวม ๆ มีลักษณะและสีที่คล้ายกันไม่สามารถแบ่งสีชัดเจนได้ โดยซอร์บิทอลความเข้มข้น 0 ถึง 0.3 โมลาร์ ให้แคลลัสสีเหลืองครีม (ภาพที่ 2.25ก-ง) ส่วนซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ให้แคลลัสสีน้ำตาล (ภาพที่ 2.25จ)



ภาพที่ 2.25 ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติมซอร์บิทอลความเข้มข้นต่างกัน ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก. 0 โมลาร์ ข. 0.1 โมลาร์

ค. 0.2 โมลาร์ ง. 0.3 โมลาร์

จ. 0.4 โมลาร์

วิจารณ์

พืชบางชนิดที่สามารถทนความเค็มในระดับต่ำถึงปานกลางได้ เมื่อได้รับสภาวะเครียดเค็มในระดับต่ำหรือระดับกลาง อาจถูกกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโตที่มากกว่าปกติ ซึ่งจากการวางเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการทรีตด้วยโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชัน บนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในการศึกษานี้พบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้อัตราการเจริญเติบโตทั้งน้ำหนักสดและขนาดของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น และจำนวนโนดูลเฉลี่ยสูงสุด ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้ผลต่ำสุด นอกจากนี้การเพิ่มระยะเวลาการวางเลี้ยงนานขึ้นส่งผลให้อัตราการเจริญและจำนวนโนดูลเฉลี่ยเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Zhang และคณะ (2004) ใน *Populus euphratica* พบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้อัตราการเจริญของแคลลัสสูงสุด จากการทดลองนี้และรายงานการศึกษาต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าโซเดียมคลอไรด์ระดับต่ำกระตุ้นการเจริญเติบโตมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการทรีตด้วยโซเดียมคลอไรด์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะเครียดในระดับต่ำกระตุ้นให้พืชมีการสร้างกรดอะมิโน และคาร์โบไฮเดรตมากขึ้น (อภิชญา, 2560) ส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตมากขึ้น

การศึกษาผลของ dicamba และ 2-iP ในอาหารแข็งต่อการเจริญของแคลลัสที่ผ่านการทรีตด้วยโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชัน พบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในซัสเพนชันกับการเติม dicamba และ 2-iP ในอาหารแข็งนั้น มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน การย้ายเซลล์ในซัสเพนชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว ให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโต น้ำหนักสด ขนาดของแคลลัส และจำนวนโนดูลเฉลี่ยสูงสุด ต่างจากรายงานการศึกษาของ ชาคริยา และคณะ (2560) ที่ศึกษาผลของ 2-iP ต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน พบว่า 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดสูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะการพัฒนาของวัสดุพืชเริ่มต้นและสายพันธุ์ของปาล์มน้ำมันที่ใช้แตกต่างกันจึงส่งผลให้มีการตอบสนองต่อสารควบคุมทั้งสองแตกต่างกัน นอกจากนี้การศึกษาของชาคริยา และคณะ (2560) ไม่ได้ทรีตเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ดังนั้นสภาพของเซลล์ที่นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมทั้ง dicamba และ 2-iP ก็แตกต่างกัน ทั้งนี้ การให้เซลล์เจอสภาพเครียดก่อนอาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางสรีรวิทยา และชีวเคมี จนส่งผลให้การตอบสนองแตกต่างไปจากเดิม

การศึกษาผลของความเข้มข้นของซอร์บิทอลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของซอร์บิทอลส่งผลให้น้ำหนักสด และขนาดของแคลลัสลดลงเป็นลำดับ โดยชุดควบคุมที่ไม่เติมซอร์บิทอลให้น้ำหนักสด และขนาดของแคลลัสสูงสุด สอดคล้องกับรายงานการศึกษา

ของ ธิดารัตน์ และคณะ (2559) ซึ่งศึกษาผลของน้ำตาลซูโครส และซอร์บิทอลต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลแคลลัส พบว่า น้ำตาลซอร์บิทอลส่งผลให้น้ำหนักสดของแคลลัสลดลง อย่างไรก็ตามซอร์บิทอลสามารถส่งผลให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดจากการขาดน้ำ และเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนภายในเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สอง ชีรวัลย์ (2560) รายงานว่าซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองของปาล์มน้ำมันได้สูงสุด อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ซอร์บิทอลไม่สามารถกระตุ้นการพัฒนาของแคลลัสได้ อีกทั้งยังส่งผลให้เซลล์ได้รับสภาวะเครียดจากการขาดน้ำ จึงทำให้น้ำหนักสด และขนาดของแคลลัสลดลง ดังนั้นการเพิ่มปริมาณแคลลัสไม่มีความจำเป็นต้องใช้น้ำตาลซอร์บิทอล แต่หากต้องการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองจากชุดแรก การใช้ซอร์บิทอลร่วมด้วยจึงมีความจำเป็น

บทที่ 3

สรุป

สรุป

อาหารสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่มีการสับแคลลัส เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้เปรียบเทียบระหว่างอาหารเพียงสองสูตร คือ OPCM และ Y_3 จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหาร OPCM มีความเหมาะสม

การเพิ่มความเข้มข้น และระยะเวลาการทรีตโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้น้ำหนักสด ปริมาตรตะกอนเซลล์ จำนวนกลุ่มเซลล์ และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในซัสเพนชันของปาล์มน้ำมันลดลง ในขณะที่ตะกอนเซลล์มีสีคล้ำมากขึ้น ปริมาณโปรตีนรวม โพรลีน การเปลี่ยนแปลงค่า EC และค่า EL เพิ่มขึ้น อาหารเหลวที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันสูงสุด การทรีตโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำ (50 ถึง 100 มิลลิโมลาร์) ไม่ส่งผลต่อความเสียหายของเซลล์ เซลล์ดังกล่าวยังคงเจริญได้อย่างต่อเนื่องแม้ว่าเลี้ยงไปในอาหารที่มีเกลือดังกล่าวเป็นเวลานาน 12 สัปดาห์

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ในซัสเพนชันได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และเวลาที่ได้รับเกลือดังกล่าว ความเข้มข้นเกลือสูงใช้เวลาการเพาะเลี้ยงสั้น หากความเข้มข้นเกลือที่ใช้ต่ำก็เพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นจึงยับยั้งการเจริญได้ 50 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการฟื้นตัวของเซลล์ในซัสเพนชันบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์) พบว่า เซลล์ในซัสเพนชันที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้การเจริญของแคลลัสทั้งอัตราการเจริญ (183.08 เปอร์เซ็นต์) น้ำหนักสด (297.50 มิลลิกรัม) ขนาดแคลลัส (53.50 ตารางมิลลิเมตร) และจำนวนโนดูลเฉลี่ย (51.5) สูงกว่าชุดควบคุม

เอกสารอ้างอิง

กาญจนี ทองเทพ. 2553. ปัจจัยทางกายภาพและเคมีต่อการเจริญ และพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์, ศิริชัย อุ่นศรีส่ง, ประสาทพร กออวยชัย และปณิดา กันถาด. 2555. รายงานผลการวิจัย เรื่องการศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซีสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ. ชุมพร: มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร.

ชาคริยา นิหะ, สุรีรัตน์ เย็นช้อน และสมปอง เตชะโต. 2560. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน พันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 4: 25-30.

ชีรวัลย์ สิทธิศักดิ์, ทัศนี ขาวเนียม และ สมปอง เตชะโต. 2560. ผลของการสับและสภาพวางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 4: 41-46.

ชีรวัลย์ สิทธิศักดิ์. 2560. ผลของการสับ สภาพวางเลี้ยง และสารแอนติออกซิแดนท์ต่อการเพิ่มปริมาณและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เชฐชุดา เชื้อสุวรรณ. 2561. แนวโน้มธุรกิจ/อุตสาหกรรม ปี 2561-63: อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม. วิจัยกรุงศรี. เข้าถึงได้จาก: https://www.krungsri.com/bank/getmedia/ac57ec39-c8ab-4546-8c48-5dfde9e45328/IO_Oil_Palm_2018_TH.aspx [เข้าถึงเมื่อ 20 ธันวาคม 2561].

ณรงค์ฤทธิ์ อดุลย์ฐานานุศักดิ์ และลัดดา ธรรมวิทยสกุล. 2561. อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันไทย : ในบริบทใหม่ที่ท้าทาย. เข้าถึงได้จาก: https://www.bot.or.th/Thai/MonetaryPolicy/Southern/DocLib/palm_minisym.pdf [เข้าถึงเมื่อ 20 ธันวาคม 2561].

ทรรศณีย์ นิยะกิจ และสมปอง เตชะโต. 2555. การชักนำและเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราและการตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. วารสารเกษตร 28: 273-283.

ทวิพร แก้วเนรมิตร และนุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล. 2557. ผลของภาวะเค็มต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงในข้าวทรานสเจนิกพันธุ์ขาว ดอกมะลิ 105 ที่มีการแสดงออกของยีน *OsCaM1-1* เกินปกติ. Veridian E-Journal Science and Technology Silpakorn University 1: 11-18.

ธิดารัตน์ ทองแผ่, ทัศนี ขาวเนียม และสมปอง เตชะโต. 2558. ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา (*Elaeis guineensis* Jacq. Var. Pisifera). วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2: 41-45.

ธิดารัตน์ ทองแผ่, สมปอง เตชะโต และทัศนี ขาวเนียม. 2559. ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera). วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 3: 2-6.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2554. การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นวรัตน์ อุดมประเสริฐ. 2558. สรีรวิทยาของพืชภายใต้สภาวะเครียด. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นูรมา มาสากี. 2561. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ที่ให้ผลผลิตสูงด้วยการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นกล้า. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ฝนทิพย์ หนูทอง. 2557. ผลของสภาวะเครียดจากความเค็มต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ต้านออกซิเดชันในประชากรข้าว CSSL. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรศักดิ์ ภักดีวราภรณ์. 2543. ผลของโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการสะสมโพรลีนโซเดียมไอออนและคลอไรด์ไอออนในถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merrill. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมปอง เตชะโต, พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, จรัสศรี นวลศรี และ วันทนา เอ้งย่อง. 2530. การชักนำแคลลัส ปฐมภูมิในปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบอ่อน. วารสารสงขลานครินทร์ 8: 1-6.

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

สุมาลี ชูกำแพง. 2555. พืชในสภาวะเครียดเกลือ. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 4: 15-24.

อธิภัทร เงินหมื่น. 2556. ผลของความเค็มต่อลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของพืชทนเค็มบางชนิดที่พบภายในพื้นที่นากุ้งทิ้งร้าง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อภิชญา นุกูลรัตน์. 2560. ผลของสูตรอาหาร กรดแอสคอร์บิค และแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Ahire, M. L., Walunj, P. R., Kishor, P. B. K. and Nikam, T. D. 2013. Effect of sodium chloride-induced stress on growth, proline, glycine betaine accumulation, antioxidative defence and bacoside A content in *in vitro* regenerated shoots of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. Acta Physiologiae Plantarum 35: 1943–1953.

Al-khayri, J. M. 2002. Growth, proline accumulation, and ion content in sodium chloride-stressed callus of date palm. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 38: 79–82.

Campanelli, A., Ruta, C., Morone-Fortunato, I. and Mastro, G. D. 2013. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) clones tolerant to salt stress: *in vitro* selection. Central European Journal of Biology 8: 765-776.

Carillo, P., Annunziata, M. G., Pontecorvo, G., Fuggi, A. and Woodrow, P. 2011. Salinity stress and salt tolerance. *In* Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations. (ed. A. Shanker) pp. 21-38. Rijeka: InTech.

Carra, A., Pasquale, F. D., Ricci, A. and Carimi, F. 2006. Diphenylurea derivatives induce somatic embryogenesis in citrus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 87: 41–48.

Daneshmand, F., Arvin, M. J. and Kalantari, K. M. 2010. Physiological responses to NaCl stress in three wild species of potato *in vitro*. Acta Physiologiae Plantarum 32: 91–101.

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

Elkahoui, S., Carvajal, M., Ghrir, R. and Limam, F. 2005. Study of the involvement of osmotic adjustment and H^+-ATPase activity in the resistance of *Catharanthus roseus* suspension cells to salt stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 287–294.

Fiore, S., Pasquale, F. D., Carimi, F. and Sajeva, M. 2002. Effect of 2,4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of citrus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68: 57–63.

Golkar, P. and Taghizadeh, M. 2018. *In vitro* evaluation of phenolic and osmolite compounds, ionic content, and antioxidant activity in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under salinity stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 134: 357–368

Guo, W.Q., Zhang, P.T., Li, C.H., Yin, J.M. and Han, X.Y. 2015. Recovery of root growth and physiological characters in cotton after salt stress relief. Chilean Journal of Agricultural Research 75: 85-91.

Hanson, A. D., Rathinasabapathi, B., Rivoal, J., Burnet, M., Dillon, M. O. and Gage, D. A. 1994. Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: A natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. Proceedings of the National Academy of Sciences 91: 306-310.

Heedchim, W. 2019. Propagation of oil palm SUP-PSU1 by culturing zygotic embryos using different culture systems and assessment of somaclonal variation by SSR Marker. Ph.D. Dissertation. Prince of Songkla University.

Javed, Q., Wu, Y., Xing, D., Azeem, A., Ullah, I. and Zaman, M. 2017. Re-watering: An effective measure to recover growth and photosynthetic characteristics in salt-stressed *Brassica napus* L. Chilean Journal of Agricultural Research 77: 78-86.

Joshi, R. and Kumar, P. 2013. Regulation of somatic embryogenesis in crops: A review. Agricultural Reviews 34: 1-20.

Khalid, H., Kumari, M., Grover, A. and Nasim, M. 2015. Salinity stress tolerance of camelina investigated *in vitro.* Scientia Agriculturae Bohemica 46: 137–144.

Kiyosue, T., Kamada, H. and Har, H. 1989. Induction of somatic embryogenesis by salt stress in carrot. Plant Tissue Culture Letters 6: 162-164.

Lokhande, V. H., Nikam, T. D. and Penna, S. 2010. Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 102: 17-25.

Lokhande, V. H., Nikam, T. D., Patade, V. Y. and Ahire, M. L. 2011. Effects of optimal and supra-optimal salinity stress on antioxidative defence, osmolytes and *in vitro* growth responses in *Sesuvium portulacastrum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 104: 41–49.

Malkiewicz, M. K. and Fornal, N. 2018. Application of chitosan *in vitro* to minimize the adverse effects of salinity in *Petunia × atkinsiana* D. don. Journal of Ecological Engineering 19: 143–149.

Muchate, N. S., Rajurkar, N. S., Suprasanna, P. and Nikam, T. D. 2019. NaCl induced salt adaptive changes and enhanced accumulation of 20-hydroxyecdysone in the *in vitro* shoot cultures of *Spinacia oleracea* L. Scientific Reports 9: 1-10.

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

Ni, J., Yang, X., Zhu, J., Liu, Z., Ni, Y., Wu, H., Zhang, H. and Liu, T. 2015. Salinity-induced metabolic profile changes in *Nitraria tangutorum* Bobr. suspension cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 122: 239–248.

Niknam, V., Meratan, A. A. and Ghaffari, S. M. 2011. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidative enzymes in callus of two *Acanthophyllum* species. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 47: 297–308.

Qados, A. M. S. A. 2010. Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 10: 7-15.

Qados, A. M. S. A. 2011. Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 10: 7–15.

Unnikrishnan, S. K., Prakash, L., Josekutty, P. C., Bhatt, P. N. and Mehta, A. R. 1991. Effect of NaCl salinity on somatic embryo development in *Sapindus trifoliatus* L. Journal of Experimental Botany 42: 401-406.

Xiong, Y., Liang, H., Yan, H., Guo, B., Niu, M., Chen, S., Jian, S., Ren, H., Zhang, X., Li, Y., Zeng, S., Wu, K., Zheng, F., Silva, J. A. T. and Ma, G. 2019. NaCl-induced stress: physiological responses of six halophyte species in *in vitro* and *in vivo* culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 139: 531–546.

Zhang, F., Yang, Y. L., He, W. L., Zhao, X. and Zhang, L. X. 2004. Effects of salinity on growth and compatible solutes of callus induced from *Populus euphratica*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 40: 491–494.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหารสังเคราะห์

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	OPCM	Y_3
NH_4NO_3	1,025.00	-
NH_4Cl	-	535.00
KNO_3	950.00	2020.00
KCl	-	1492.00
$NaH_2PO_41H_2O$	-	312.00
$CaCl_2{\cdot}2H_2O$	268.00	294.00
$Ca(NO_3)_2{\cdot}4H_2O$	278.00	-
$MgSO_4{\cdot}7H_2O$	185.00	247.00
K_2SO_4	495.00	-
KH_2PO_4	170.00	-
H_3BO_3	6.20	3.10
$MnSO_4{\cdot}H_2O$	16.90	11.20
$ZnSO_4{\cdot}7H_2O$	9.60	7.20
KI	0.415	8.30
$Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$	0.25	0.24
$CuSO_4{\cdot}5H_2O$	3.138	0.16
$CoCl_2{\cdot}6H_2O$	0.013	0.24
Na_2EDTA	37.30	37.30
$FeSO_4{\cdot}7H_2O$	27.80	27.80
$NiCl_26H_2O$	-	0.024
Myoinositol	100.00	100.00
Glycine	2.00	-
Nicotinic acid	0.50	0.05
Pyridoxine·HCl	0.50	0.05
Thiamine·HCl	0.55	0.50
Ca-pantothenate	-	0.05
Biotin	-	0.05
pH	5.7	5.7

ผลงานตีพิมพ์

The 11th IMT-GT UNINET Conference 2018 – *Bioscience for A Sustainable Future*
Penang, Malaysia, December 11-12, 2018

Agriculture & Agro-Industry **AAI-15**

Effect of Sodium Chloride on Growth and Proliferation of Cell Suspension Culture of Oil Palm SUP-PSU

Te-chato, S.[1,2]*, Sukdee, T.[1,2] and Yenchon, S.[1,2]

[1] *Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, 90112*
[2]*Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, Thailand, 10900*

**Corresponding author: stechato@yahoo.com*

ABSTRACT

To study effect of sodium chloride (NaCl) on growth and proliferation of cell suspension culture of oil palm SUP-PSU, young leaf-derived callus of oil palm was chopped and cultured on oil palm culture medium (OPCM) or Eeuwen's Y_3 (Y_3) supplemented with 0.1 mg/L dicamba for 4 weeks. The results showed that OPCM gave the better results than Y_3 medium in term of callus proliferation at 100% and sizes of callus at 1.31 cm. For cell suspension culture, callus at 12 days of culture was transferred to liquidified OPCM supplemented with 0.1 mg/L dicamba and different concentrations of NaCl (0, 50, 100, 150 and 200 mM). The results showed that 150 mM NaCl containing OPCM gave the highest results in pack cell volume at 36 cell clumps. However, 200 mM NaCl gave the largest cell clump at 0.405 cm after 4 weeks of culture. Thus, callus cultured in OPCM with 0.1 mg/L dicamba and 150 mM NaCl was suit for growth and proliferation of cell suspension culture of oil palm SUP-PSU.

Keywords: Oil palm, NaCl, growth, proliferation, cell suspension

1.0 INTRODUCTION

Salt stress is a factor that limits plant growth from major environmental factors. Salt stress affect important processes in plant cell such as growth, photosynthesis, protein synthesis and metabolisms of the cell because salt stress causes oxidative damage to membrane lipid, nucleic acids, and proteins (Kaewneramit and Wutipraditkul, 2014). It also inhibits transportation of potassium, calcium, phosphorus, and magnesium (Hanson *et al*., 1994). However, many studies showed that salt stress played either negative or positive result to fresh and dry weights depend on salinity concentrations, types of salt presence and plant species (Qados, 2011).

Oil palm SUP-PSU is an economically importance for consumption and biofuel. It is can be tolerated to drought condition and elite genotype improved for increasing oil yield. Propagation and proliferation can be carried out by suspension

culture instead of using seed because it provides high multiplication rate within a short period and true to type more than seed. Oil palm has been grown in southern part of Thailand both east and west coastal areas. However, salinity tolerance of oil palm was unknown. Thus, the objective of this study was to describe the response of cell suspension culture of oil palm SUP-PSU to sodium chloride (NaCl).

2.0 MATERIALS AND METHODS

Plant material

Callus was obtained from young leaf culture of oil palm SUP-PSU at Crop Biotechnology Laboratory, Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. It was chopped and cultured on oil palm culture medium (OPCM) supplemented with 0.1 mg/L dicamba and 200 mg/L ascorbic acid. It was used as plant material for callus proliferation. The culture was maintained at 26±2 °C under 10 h photoperiod (15 µmol/m^2/s) for 4 weeks.

Effect of culture media on callus proliferation

Callus was transferred to OPCM or Y3 supplemented with 0.1 mg/L dicamba and 200 mg/L ascorbic acid, 3% sucrose and adjusted to pH 5.7 prior to autoclaving at 1.05 kg/cm^2, 121°C for 15 min. The cultures were placed at 26±2 °C under 10 h photoperiod provided by cool-white fluorescent lamps. After 4 weeks of culture, callus proliferation, and size of callus were recorded.

Effect of sodium chloride on growth and proliferation of cell suspension culture

Callus cultured on OPCM with 0.1 mg/L dicamba for 12 days of culture was transferred to liquidified OPCM supplemented with 0.1 mg/L dicamba and different concentrations of NaCl (0, 50, 100, 150 and 200 mM), 3% sucrose and adjusted to pH 5.7. Media were autoclaved at 1.05 kg/cm^2, 121°C for 15 min. The cultures were placed at 26±2 °C under 14 h photoperiod provided by cool-white fluorescent lamps. After 4 weeks of culture, pack cell volume and size of cell clumps were recorded.

3.0 RESULTS AND DISCUSSION

Effect of culture media on callus proliferation

The results showed that OPCM gave the better results than Y_3 medium in term of callus proliferation. Proliferation rate of callus on OPCM medium supplemented with 0.1 mg/L dicamba was obtained at 100% and sizes of callus at 1.31 cm after 4 weeks of culture (Table 1). Thongpae *et al.* (2015) reported that OPCM with 0.1 mg/L dicamba gave the best results in proliferation of nodular callus. Similar result was also obtained from Kerdsuwan and Te-chato (2013) who

reported that OPCM with 0.1 mg/L dicamba gave increment in fresh weight and prolong of culture period.

Table 1 Effect of culture media on callus proliferation of oil palm cultured on medium with 0.1 mg/L dicamba for 4 weeks

Culture media	Callus proliferation (%)	Sizes of callus (cm)
OPCM	100	1.312
Y3	100	1.225
F-test		ns
C.V. (%)		11.61

ns= not significantly different

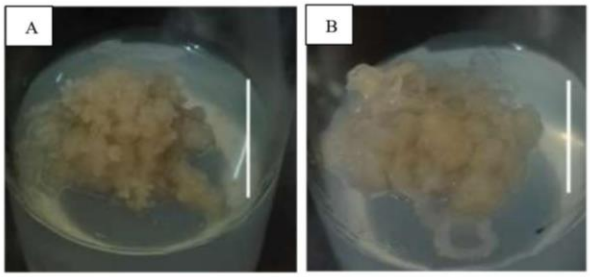


Fig.1 Characteristic of callus of oil palm SUP-PSU cultured on different culture media with 0.1 mg/L dicamba for 4 weeks (bar=1 cm)
A. Y_3 medium
B. OPCM

Effect of sodium chloride on growth and proliferation of cell suspension culture

The results showed that 150 mM NaCl containing OPCM gave the highest results in number of cell clumps or aggregates at 36 clumps (Table 2). However, 200 mM NaCl gave the largest size of clump at diameter of 0.405 cm after 4 weeks of culture as shown in Table 2 and Fig. 2.

Normally, salt stress is harmful to plant because it decreases availability of high-quality irrigation water (Lee and Iersel, 2008), toxic effects of salt ions and nutritional imbalance (Beltagi *et al.*, 2006; Keokene and Pattanagul, 2006). Some studies showed a negative relationship between growth and level of salt. The decrease in plant growth was found when concentration of sodium chloride increase (Qados, 2011). Some studies showed that the fresh and dry weight of the shoot affected, either negatively or positively by changes in salinity concentrations, types of salt presence or plant species. Some species, especially halophytes and some plants with the CAM or C4-photosynthetic pathway, grow better in the presence of Na^+ (Lee and Iersel, 2008). Therefore, callus of oil palm SUP-PSU may tolerance to all salt stress levels treated in a short period of time. Thus, further observation on

growth of cell in suspension culture must be carried out to elucidate the long term effect of NaCl on their growth inhibition.

Table 2 Effect of sodium chloride on growth and proliferation of cell suspension culture on OPCM with 0.1 mg/L dicamba for 4 weeks

Concentrations of sodium chloride (mM)	Number of cell clumps (cell/flask)	Size of cell (cm)
0	26.6^{b}	0.3578
50	26.0^{b}	0.3685
100	32.4^{ab}	0.2695
150	36.0^{a}	0.3143
200	25.8^{b}	0.4052
F-test	*	ns
C.V. (%)	21.42	17.19

ns= not significantly different
* significantly different (p<0.05)
Mean values followed by the same letter within column are not significantly different according to duncan multiple range test (DMRT).

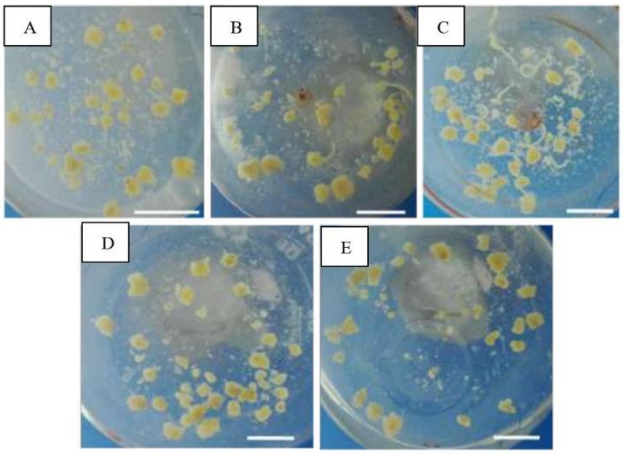


Fig.2 Characteristic of cell clump of oil palm SUP-PSU cultured in liquidified OPCM with 0.1 mg/l dicamba and different concentrations of NaCl for 4 weeks. (bar=1 cm)
A. Without NaCl B. 50 mM NaCl C. 100 mM NaCl
D. 150 mM NaCl E. 200 mM NaCl

CONCLUSIONS

The results could be concluded that callus proliferation at 100% and sizes of callus at 1.31 cm were successfully obtained on OPCM medium with 0.1 mg/L dicamba after 4 weeks of culture. Upon transferring12-day-old callus to liquidified OPCM with 0.1 mg/L dicamba and 150 mM NaCl, the highest number of cell clumps at 36 clumps was obtained after 4 weeks of culture.

ACKNOWLEDGEMENT

This research is partially supported by the Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office, Office of Higher Education Commission, Ministry of Education (AG-BIO/PERDO-CHE), the Centre of Excellence for Agricultural and Natural Resources Biotechnology Phase 2, Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources and Graduate School, Prince of Songkla University.

REFERENCES

Beltagi M S, Ismail M A and Mohamed F H. (2006). Induced salt tolerance in common bean (*Phaseolas vulgaris* L.) by gamma irradiation. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 9(6): 1143-1148.

Hanson A D, Rathinasabapathi B, Rivoal J, Burnet M, Dillon M O, and Gage D A. (1994). Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: A natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 306-310

Kaewneramit T and Wutipraditkul N. (2014). Effect of salinity stress on growth and photosynthetic pigments in transgenic 'KDML 105' rice overexpressing OsCaM1-1 gene. *Veridian E-Journal Science and Technology Silpakorn University* 1(5): 11-18.

Keokene T and Pattanagul W. (2006). Effects of drought-induced and salinity- induced water deficition on some physiological characteristics and carbohydrate metabolism in rice seedling (*Oryza sativa L.*). *Khon Kaen University Research Journal* 11(4): 260-268.

Kerdsuwan S and Te-chato S. (2014). Effect of dicamba on induction of somatic embryo and plant regeneration of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Songklanakarin Journal of Plant Science* 1(1): 2-9.

Lee M K and Iersel M W V. (2008). Sodium chloride effects on growth, morphology, and physiology of chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium*). *HortScience* 43(6):1888–1891.

Qados A M S A. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Viciafaba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 10: 7-15.

Thongpae T, Te-chato S and Khawniam T. (2016).Factors affecting nodular callus proliferation of oil palm, pisifera type (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera). *Songklanakarin Journal of Plant Science* 3(1): 2-6.

ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการตอบสนองทางสัณฐานวิทยาของแคลลัสปาล์มน้ำมัน ลูกผสมพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1

Effect of Sodium Chloride on Growth and Morphological Responses of Callus of Oil Palm SUP-PSU 1

ธีรศักดิ์ สุขดี[1,2], สมปอง เตชะโต[1,2]* และสุรีรัตน์ เย็นช้อน[1,2]

Thirasak Sukdee[1,2], Sompong Te-chato[1,2*] and Sureerat Yenchon[1,2]

บทคัดย่อ: ปาล์มน้ำมันคือพืชที่ให้ผลผลิตน้ำมันสูงที่สุดและตลอดทั้งปี จึงต้องมีการใส่ปุ๋ยบ่อยครั้ง ส่งผลให้สภาพพื้นที่ปลูกมีความเค็มมากขึ้น ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ และพัฒนาการของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0 50 100 150 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์) ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่า ที่เวลา 8 สัปดาห์โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มีการพัฒนาโครงสร้างคล้ายราก (Root-like structure; RLS) บริเวณผิวแคลลัส เมื่อให้เซลล์ได้รับโซเดียมคลอไรด์นานขึ้นเป็น 12 สัปดาห์ ทุกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ให้แคลลัสที่มีโครงสร้างดังกล่าวเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการเจริญของแคลลัสลดลงเป็นลำดับโดยเฉพาะความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูงกว่า 200 มิลลิโมลาร์เป็นต้นไป สรุปได้ว่าเซลล์ของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองไม่สามารถทนความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเกินกว่า 200 มิลลิโมลาร์ได้

คำสำคัญ: ปาล์มน้ำมัน ทรัพย์ ม.อ. 1 โซเดียมคลอไรด์ แคลลัส โครงสร้างคล้ายราก

Abstract: Oil palm is an oil crop that produces the highest oil yield throughout the year. Due to frequent application of fertilizer results in severe salinity of planting areas. Therefore, the objective of this research was to study the effect of different concentrations of sodium chloride (NaCl) on growth and development of callus from treating cell in liquid OPCM supplemented with different concentrations of NaCl (0 50 100 150 200 300 and 400 mM.) for 4, 8 and 12 weeks. The results showed that treating cells for 8 weeks in 100 mM NaCl started

[1] สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

[1] Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900

[2] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, 10900, Thailand

* *Corresponding author:* stechato@yahoo.com

to induce root-like structure (RLS) on the surface of calli. All concentrations of NaCl promoted those structures on calli when treated for 12 weeks. A number of RLS increased when concentration of NaCl increased. However, growth of the calli decreased when concentrations of NaCl increased, especially at concentrations higher than 200 mM. This result suggests that cells of oil palm *in vitro* could not stand to NaCl at concentration higher than 200 mM.

Keywords: Oil palm, SUP-PSU 1, NaCl, callus, root-like structure

บทนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ น้ำมันที่ได้จากปาล์มมีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำมันจากพืชชนิดอื่น โดยผลผลิตน้ำมันปาล์มต่อพื้นที่ปลูกสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น 6-10 เท่า (เชฐชุดา, 2561) ปัจจุบันปริมาณการผลิตน้ำมันจากปาล์มจัดอยู่ในอันดับที่ 1 ของโลกเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตน้ำมันจากพืชอื่น ๆ ทุกชนิด โดยประเทศอินโดนีเซียผลิตน้ำมันปาล์มได้มากที่สุด รองลงมาคือประเทศมาเลเซีย และไทยตามลำดับ (ณรงค์ฤทธิ์ และลัดดา, 2561) ปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในด้านการบริโภคและพลังงานชีวภาพ อีกทั้งยังสามารถทนทานต่อสภาวะแล้ง และผ่านการปรับปรุงพันธุ์ให้มีผลผลิตน้ำมันสูง

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันสามารถทำได้หลายวิธี แต่การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยการเพาะเมล็ด ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมเนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้าม นอกจากนี้การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการทั่วไปไม่สามรถทำได้ เช่น แยกหน่อ ปักชำ ตอนกิ่ง หรือติดตา เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีเพียงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเพียง 1 ชุด ไม่มีตาด้านข้าง (อภิชญา, 2560) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณในหลอดทดลองแทนการใช้เมล็ด เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีด้วยกันหลายรูปแบบ การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันเป็นเทคนิคหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์พืชในอาหารเหลวในสภาพเขย่าเลี้ยงตลอดเวลาบนเครื่องเขย่า สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์พืชได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากเซลล์มีการสัมผัสกับอาหารหรือปัจจัยทางเคมีต่าง ๆ วิธีการนี้ให้ผลดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง นอกจากนี้พื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่ของประเทศคิดเป็น 85 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในภาคใต้ซึ่งอยู่ในสภาพภูมิประเทศที่ติดชายฝั่ง ทั้งฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามัน (เชฐชุดา, 2561) ประกอบกับปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่สามารถให้ผลผลิตทะลายได้ตลอดทั้งปี โดยมีอายุเก็บเกี่ยวผลผลิตได้นานกว่า 25 ปี (ธีระ, 2554) จึงต้องมีการจัดการดูแล ใส่ปุ๋ยซ้ำ ๆ เป็นเวลานาน ส่งผลให้บริเวณพื้นที่ปลูกมีสภาพความเค็มมากขึ้น ซึ่งสภาวะดินเค็มเป็นปัจจัยจากสภาพแวดล้อมที่สำคัญปัจจัยหนึ่งที่จำกัดการเจริญเติบโตของพืช

สภาวะเครียดจากความเค็มของดินส่งผลกระทบต่อกระบวนการต่าง ๆ ที่สำคัญภายในเซลล์พืช เช่น กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง กระบวนการสังเคราะห์โปรตีน และกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ เป็นต้น ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยทั่วไปรวมทั้งปาล์มน้ำมัน เนื่องจากสภาวะเครียดเค็มก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ กรดนิวคลีอิก และโปรตีน (ทวิพร และนุชนาถ, 2557) สภาวะเครียดเค็มยังยับยั้งการขนถ่ายธาตุอาหารบางชนิด เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม เป็นต้น (Hanson *et al*., 1994) อีกทั้งการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ทำให้ไอออนในวัสดุปลูกเพิ่มขึ้นและเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความดันออสโมซิส ส่งผมให้พืชได้รับสภาวะเครียดจากการขาดน้ำ (สุมาลี, 2555) อย่างไรก็ตาม มีหลายการศึกษาแสดงให้เห็นถึง

ผลกระทบอื่น ๆ จากสภาวะเครียดเค็ม ทั้งผลในด้านบวก และด้านลบ เช่น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง ทั้งนี้ผลกระทบที่เกิดขึ้นแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และชนิดของพืช (Qados, 2011) อย่างไรก็ตาม ความทนทานต่อสภาวะเค็มของปาล์มน้ำมันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาการตอบสนองทางด้านสัณฐานวิทยาของแคลลัสปาล์มน้ำมันในชัสเพนชันต่อความเค็มโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ในหลอดทดลองเพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ที่ทนทานหรือต้านทานเพื่อสร้างปาล์มน้ำมันพันธุ์ทนเค็มต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

นำใบอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 เบอร์ที่ 25 ที่แยกออกมาจากต้นกล้า/โตอายุ 1 ปี ล้างด้วยน้ำยาทีโพล แล้วจุ่มแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 20% ร่วมกับ ทวีน-20 150 ไมโครลิตรต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร นาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจากนั้นวางเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็น กรด-ด่าง เป็น 5.7 และเติมผงวุ้น 6.0 กรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงนาน 28 สัปดาห์ (ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์) ใบอ่อนมีการสร้างแคลลัสที่มีโครงสร้างเกาะกันแบบหลวมๆ สีเหลือง จากนั้นย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน (oil palm culture medium; OPCM) เติมไดแคมบา 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 28 สัปดาห์ (ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์) วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 10 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสสำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

วิธีการศึกษา

นำแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพิ่มปริมาณข้างต้นอายุ 12 วันหลังการวางเลี้ยง มาชั่งน้ำหนัก 250 มิลลิกรัม ย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 50 100 150 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH 5.7 วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 10 ชั่วโมงต่อวัน ย้ายเลี้ยงลงในอาหารใหม่สูตรเดิม เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นดังกล่าวทุก 4 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง รวมเวลาเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของแคลลัส ลักษณะสี โครงสร้างทางสัณฐานโดยรวมของแคลลัส และบันทึกอัตราการเกิดโครงสร้างคล้ายราก เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ในแต่ละระยะเวลาหรือครั้งที่ได้รับการทรีตด้วยโซเดียมคลอไรด์โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์

ผลและวิจารณ์

การเจริญของแคลลัส

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และระยะเวลาในการวางเลี้ยงต่อน้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชัน พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ทำให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันลดลงทุกระยะเวลาของการวางเลี้ยง โดยชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น และทุกระยะเวลาของการวางเลี้ยง เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการวางเลี้ยง พบว่า ชุดควบคุม และการเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันเพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันเพิ่มขึ้นหลังจากวางเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ และลดลงหลังจากวางเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ในซัสเพนชันลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการวางเลี้ยง และการวางเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันในอาหารเหลวที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ให้น้ำหนักสดของเซลล์ซัสเพนชันต่ำกว่าน้ำหนักสดก่อนวางเลี้ยง (Figure 1)

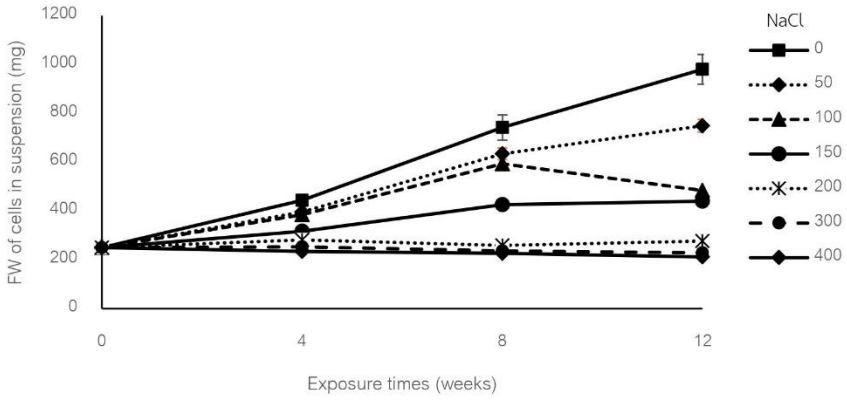


Figure 1 Effect of concentrations of NaCl and exposure times on fresh weight (mg) of callus in suspension culture. The culture medium was OPCM with 0.1 mg/l dicamba, 200 mg/l ascorbic acid.

ลักษณะสีของแคลลัส

เมื่อสังเกตลักษณะโดยรวมของแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่า การเติมโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้นให้แคลลัสที่มีโครงสร้างเกาะกันอย่างหลวม ๆ แต่การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้แคลลัสมีสีเทาและสีดำมากขึ้น ในทุก ๆ ช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง โดยชุดควบคุมและโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสสีเหลืองนวล แต่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสสีเหลืองเทา มีการสร้างเซลล์ใหม่รอบเซลล์เดิม ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสสีเหลืองเทามาก

ขึ้น ไม่มีการสร้างเซลล์ใหม่ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้แคลลัสสีน้ำตาลถึงดำ ไม่พบเซลล์เกิดใหม่ (Figure 2)

จากลักษณะของแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ พบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ยังคงให้แคลลัสมีสีเหลืองใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เซลล์ผิวรอบนอกสร้างโนดูลขนาดเล็กรอบ ๆ เซลล์เดิม และยังพบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มีโครงสร้างคล้ายรากเกิดขึ้น นอกจากนี้ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสมีสีเหลืองเทาและน้ำตาลมากกว่าที่ 4 สัปดาห์ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้แคลลัสมีสีเทา-น้ำตาล (Figure 2)

ลักษณะของแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ พบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสสีเหลืองใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสสีเหลืองเทามากกว่าที่ 8 สัปดาห์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสสีดำทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ ทำให้กลุ่มแคลลัสมีการเจริญที่ผิดปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยมีการสร้างเซลล์ที่มีโครงสร้างคล้ายรากรอบ ๆ กลุ่มเซลล์เดิม และเซลล์มีลักษณะแห้งกว่าเซลล์ที่ผ่านการวางเลี้ยงในอาหารเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น ๆ อย่างไรก็ตามโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสที่มีลักษณะเปียกหรือฉ่ำน้ำ (Figure 2) การเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาการทรีตด้วยสารโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้แคลลัสมีสีเทาและสีน้ำตาลมากขึ้น ซึ่งการสะสมโซเดียมในระดับสูง ทำให้เกิดความเป็นพิษในระดับสูงต่อเซลล์ นำไปสู่การเกิดสารอนุมูลอิสระในปริมาณมาก ทำให้เกิด lipid peroxidation ในเยื่อหุ้มเซลล์ (นวรัตน์, 2558)

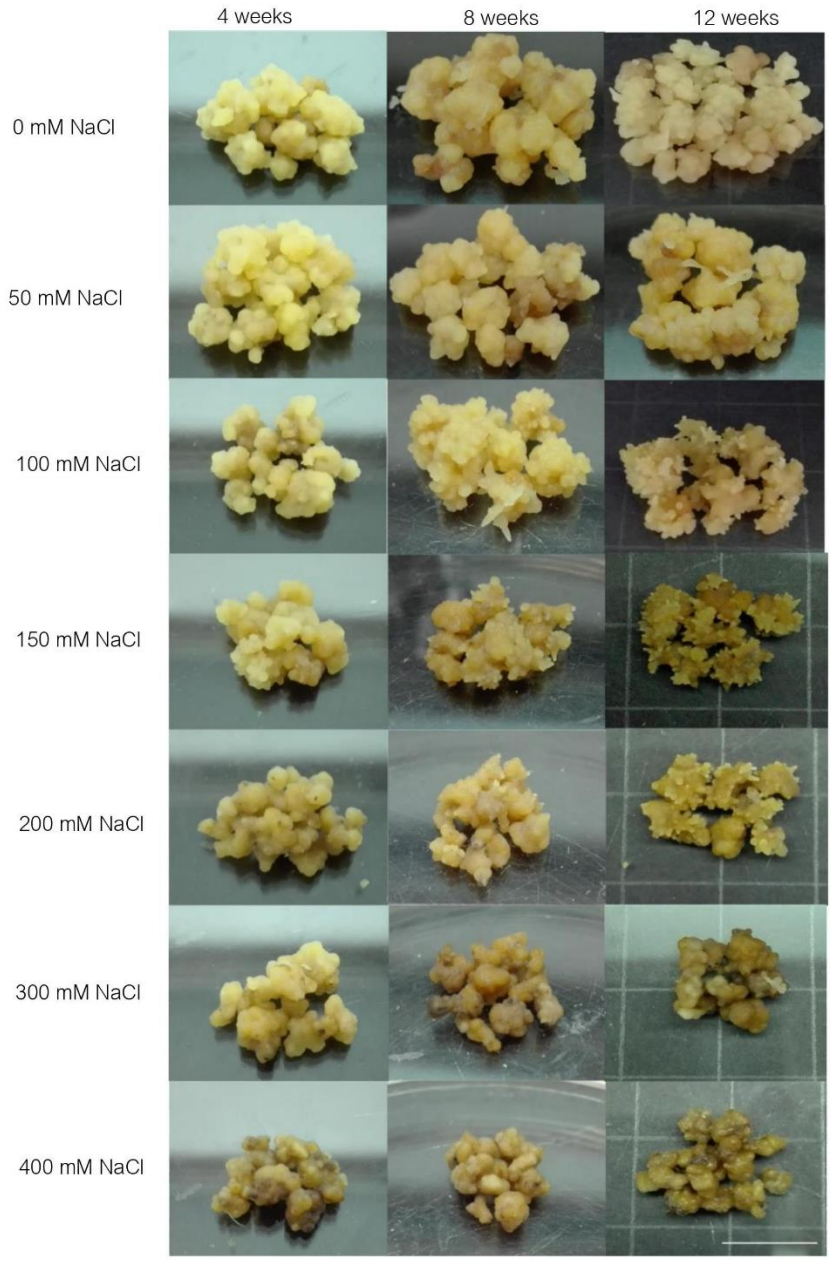


Figure 2 Characteristics of callus in suspension from liquidified OPCM with different concentrations of NaCl, 0.1 mg/l dicamba and 200 mg/l ascorbic acid for 4, 8 and 12 weeks (bar=1 cm)

โครงสร้างทางสัณฐานของแคลลัส

เมื่อพิจารณาการเกิดโครงสร้างคล้ายรากหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่ผ่านการวางเลี้ยงในอาหารเหลวเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ มีการเจริญผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีการสร้างโครงสร้างคล้ายรากรอบแคลลัสเดิม ซึ่งโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ให้แคลลัสที่มีโครงสร้างคล้ายรากมากที่สุด 90.36 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ไม่พบแคลลัสผิดปกติดังกล่าวจากการวางเลี้ยงแคลลัสในชุดควบคุมและโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากแคลลัสไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ (Figure 3) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของนวรัตน์ (2558) ถึงการปรับตัวทางกายวิภาคของพืชภายใต้สภาวะเค็ม พบว่า พืชมีการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของราก โดยเพิ่มสัดส่วนของรากแขนง เพื่อตอบสนองต่อการขาดน้ำ เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ทำให้ไอออนในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นและเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความดันออสโมซิสในอาหารที่เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ ส่งผลให้เซลล์ดูดน้ำและธาตุอาหารได้น้อยลง (สุมาลี, 2555) เซลล์จึงมีการปรับตัวโดยมีการพัฒนาโครงสร้างคล้ายรากออกมารอบเซลล์เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารและเพิ่มการดูดน้ำและธาตุอาหาร อย่างไรก็ตามโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 300 ถึง 400 มิลลิโมลาร์ ไม่พบโครงสร้างคล้ายราก แต่พบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้แคลลัสมีลักษณะเปียกหรือฉ่ำน้ำ สุมาลี (2555) รายงานว่าความเข้มข้นของโซเดียมที่มากเกินไปส่งผลให้ไอออนในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น พืชมีการสะสมโซเดียมไอออนในไซโทพลาสซึมมากขึ้น เกิดความเป็นพิษและเป็นอัตรายต่อเซลล์พืช ทำให้เซลล์แตกและตาย

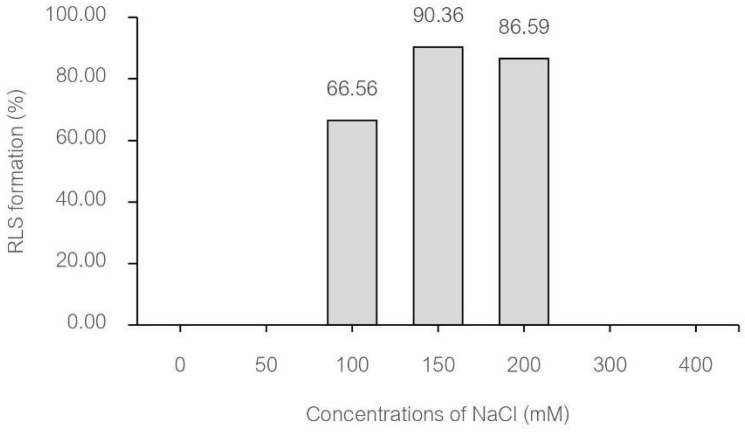


Figure 3 Formation of RLS from callus after culturing for 3 passages (4 weeks for each passage) in various concentrations of NaCl containing liquidified OPCM with 0.1 mg/l dicamba and 200 mg/l ascorbic acid.

สรุป

การเพิ่มความเข้มข้น และระยะเวลาการทรีตโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้แคลลัสได้รับความเสียหายและมีสีคล้ำมากขึ้น โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้แคลลัสมีโครงสร้างคล้ายรากเกิดขึ้นบริเวณผิวของแคลลัส เมื่อให้เซลล์ได้รับโซเดียมคลอไรด์นานขึ้นเป็น 12 สัปดาห์ เซลล์ที่ผ่านการวางเลี้ยงในอาหารเหลวเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ มีโครงสร้างคล้ายรากเกิดขึ้น โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ให้กลุ่มเซลล์ที่มีโครงสร้างคล้ายรากมากที่สุด 90.36 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการเจริญของแคลลัสลดลงเป็นลำดับโดยเฉพาะความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูงกว่า 200 มิลลิโมลาร์เป็นต้นไป ซึ่งเซลล์ของปาล์มน้ำมันไม่สามารถทนความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเกินกว่า 200 มิลลิโมลาร์ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการผลิตและพัฒนาบุคลากรด้วยความร่วมมือจากมูลนิธิชัยพัฒนา และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 3 ภาควิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

เชฐชุดา เชื้อสุวรรณ. 2561. แนวโน้มธุรกิจ/อุตสาหกรรม ปี 2561-63: อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม. วิจัยกรุงศรี. เข้าถึงได้จาก: https://www.krungsri.com/bank/getmedia/ac57ec39-c8ab-4546-8c485dfde9e45328/IO_Oil_Palm_2018_ TH.aspx [เข้าถึงเมื่อ 20 ธันวาคม 2561].

ณรงค์ฤทธิ์ อดุลย์ฐานานุศักดิ์ และลัดดา ธรรมวิทยสกุล. 2561. อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันไทย : ในบริบทใหม่ที่ท้าทาย. เข้าถึงได้จาก: https://www.bot.or.th/Thai/MonetaryPolicy/Southern/DocLib/ palm_minisym.pdf [เข้าถึงเมื่อ 20 ธันวาคม 2561].

ทวิพร แก้วเนรมิตร และนุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล. 2557. ผลของภาวะเค็มต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงในข้าวทรานสเจนิกพันธุ์ขาว ดอกมะลิ 105 ที่มีการแสดงออกของยีน OsCaM1-1 เกินปกติ. Veridian E-Journal Science and Technology Silpakorn University 1: 11-18.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2554. การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นวรัตน์ อุดมประเสริฐ. 2558. สรีรวิทยาของพืชภายใต้สภาวะเครียด. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุมาลี ชูกำแพง. 2555. พืชในสภาวะเครียดเกลือ. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 4: 15-24.

อภิชญา นุกูลรัตน์. 2560. ผลของสูตรอาหาร กรดแอสคอร์บิค และแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Hanson, A. D., Rathinasabapathi, B., Rivoal, J., Burnet, M., Dillon, M. O. and Gage, D. A. 1994. Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: A natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. Proceedings of the National Academy of Sciences 91: 306-310.

Qados, A. M. S. A. 2011. Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 10: 7–15.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายธรศักดิ์ สุขดี

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6110620040

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับสอง	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2560

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนสนับสนุนจากโครงการผลิตและพัฒนาบุคลากรด้วยความร่วมมือจากมูลนิธิชัยพัฒนา และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม
3. ทุนสนับสนุนจากศูนย์วิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 3

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

1. Sukdee, T., Te-chato, S. and Yenchon, S. 2018. Effect of Sodium Chloride on Growth and Proliferation of Cell Suspension Culture of Oil Palm SUP-PSU. The 11th IMT-GT UNINET Conference, Penang, Malaysia, 11-12 December 2018, pp. 125-129.
2. ธีรศักดิ์ สุขดี, สมปอง เตชะโต และสุรีรัตน์ เย็นช้อน. ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการตอบสนองทางสัณฐานวิทยาของแคลลัสปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1. วารสารแก่นเกษตร (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)