บทที่ 3

ผลการทดลอง

การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว

การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยคลอรอกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วฟอกซ้ำอีกครั้งที่ระดับความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความปลอดเชื้อของเนื้อเยื่อและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความสม่ำเสมอ แม้จะใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิววิธีการเดียวกัน ขึ้นอยู่กับเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่นำมาทดลองในแต่ละครั้ง (ตารางที่1)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ความปลอดเชื้อของเนื้อเยื่อและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันที่นำมาทดลองในแต่ละครั้ง (ชุดการทดลอง) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Table 1 Percentage of sterility and survival of oil palm embryos in each experiment after culturing for 4 weeks

Experiment	Sterility (%)	Survival (%)
1	90.55	96.53
2	90.86	86.47
3	48.30	29.89
4	24.84	39.28
5	53.63	97.01

การทดลอง

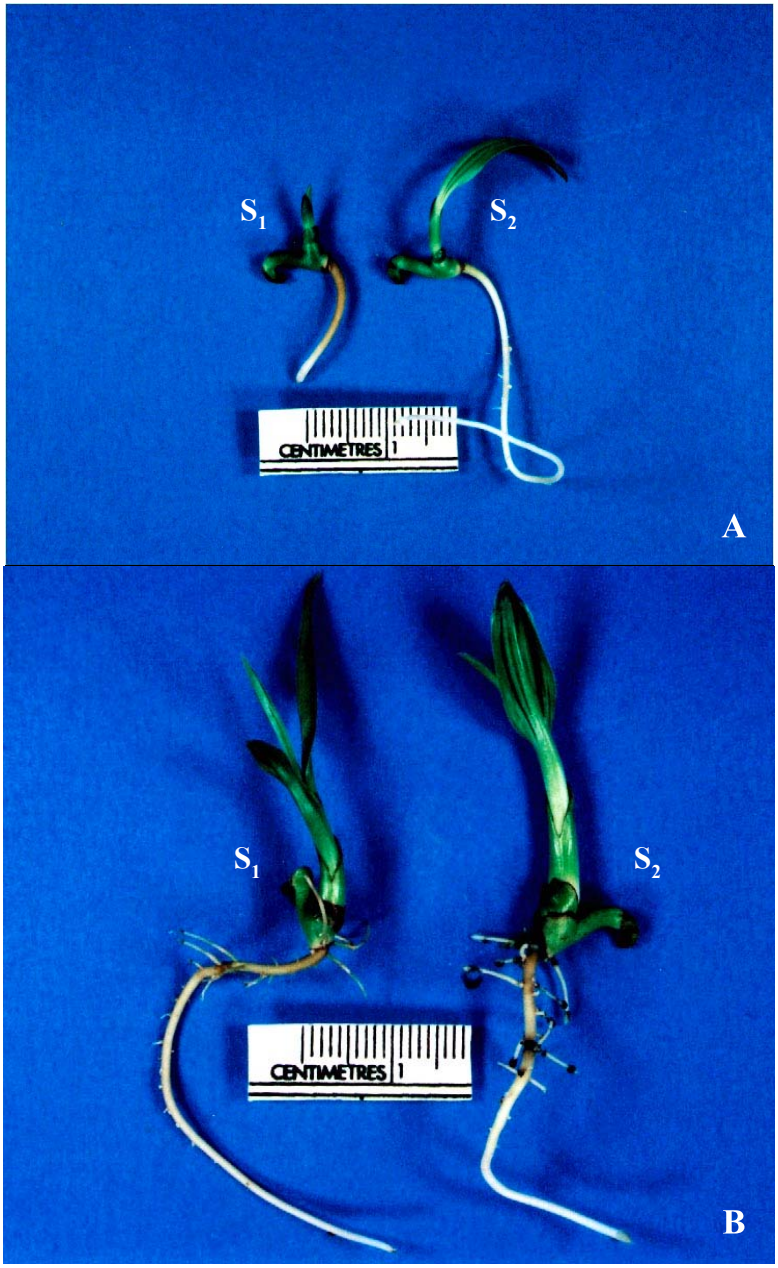
1. การชักนำต้นจากไซโกติกเอ็มบริโอ

จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตรชักนำต้น พบว่าการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มี BA ร่วมกับผงถ่าน (Y_3 + BA 4.44 μM + AC 0.05%) มีการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ดีกว่าสูตรอาหารที่ไม่มี BA และผงถ่าน (Y_3 NGR) ทั้งในส่วนของการเจริญของต้นและการพัฒนาของราก ไม่ว่าจะเลี้ยงบนอาหารแข็งหรือในอาหารเหลว (ภาพที่ 14) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว พบว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวจะให้การเจริญ เติบโตเป็นต้นที่แข็งแรง สมบูรณ์กว่าบนอาหารแข็งอย่างเห็นได้ชัด ทั้งในส่วนของต้นและราก สังเกตได้จากขนาดและความสูงของต้น และความยาวของราก ซึ่งให้ผลเหมือนกันในอาหารทั้ง 2 สูตร (ภาพที่ 14)

2. การชักนำให้เกิดแคลลัสจากไซโกติกเอ็มบริโอ

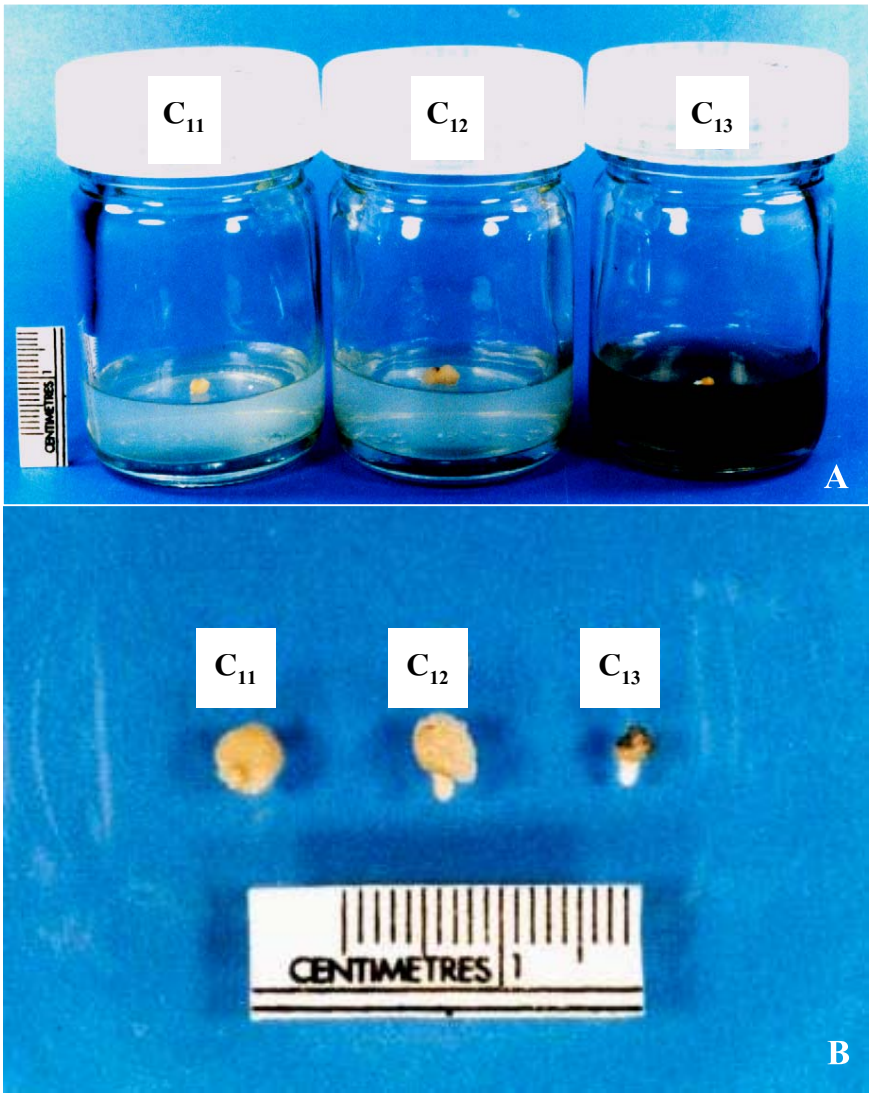
อาหารชุดที่ 1

จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตรชักนำแคลลัส (C_{11}- C_{13}) พบว่าเอ็มบริโอสามารถเกิดแคลลัสได้ในอาหารทุกสูตร โดยแคลลัสที่ได้มีลักษณะแข็ง สีเหลืองและมีการเจริญเติบโตช้า เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการชักนำแคลลัสของอาหารแต่ละสูตรโดยการชั่งน้ำหนักสดแคลลัสที่ได้จากอาหารแต่ละสูตร พบว่าอาหารสูตร C_{11} (Y_3 + 2,4-D 12.5 μM) และ C_{12} (Y_3 + 2,4-D 10 μM + 2iP 2.5 μM) แคลลัสมีขนาดและมีน้ำหนักสดแคลลัสมากกว่าสูตร C_{13} (Y_3 + 2,4-D 500 μM + AC 0.05%) ทั้งแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว (ภาพที่ 15, ตารางที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยใช้อาหารสูตรเดียวกัน พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวมีขนาดและมีน้ำหนักสดแคลลัสมากกว่าแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็ง (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 14 ต้นอ่อนปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไซโกติกเอ็มบริโอในอาหารสูตร S_1 (Y_3 NGR) และอาหารสูตร S_2 (Y_3 + BA 4.44 μM + AC 0.05%) อายุ 4 สัปดาห์ บนอาหารแข็ง (A) และในอาหารเหลว (B)

Figure 14 Palm seedling after cultured zygotic embryos on medium S_1 (Y_3 NGR) and medium S_2 (Y_3 + BA 4.44 μM + AC 0.05% for 4 weeks on solid medium (A) and in liquid medium (B)



ภาพที่ 15 การเจริญของแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไซโกติกเอ็มบริโอในอาหารสูตร C_{11} (Y_3 + 2,4-D12.5 μM), C_{12} (Y_3 + 2,4-D 10 μM + 2iP 2.5 μM) และ C_{13} (Y_3 + 2,4-D 500 μM + AC 0.05%) อายุ 4 สัปดาห์ บนอาหารแข็ง (A) และในอาหารเหลว (B)

Figure 15 Growth of oil palm callus after cultured zygotic embryo on C_{11} (Y_3 + 2,4-D 12.5 μM), C_{12} (Y_3 + 2,4-D 10 μM + 2iP 2.5 μM) และ C_{13} (Y_3 + 2,4-D 500 μM + AC 0.05%) for 4 weeks on solid medium (A) and in liquid medium (B)

ตารางที่ 2 น้ำหนักแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันบนอาหารชักนำแคลลัสสูตร C_{11}- C_{13} เป็นเวลา 10 สัปดาห์

Table 2 Callus weight of oil palm embryos cultured on C_{11}- C_{13} media for 10 weeks

Media	Callus weight (g) Mean ± SE
Solid media	
C_{11} = Y_3 + 2,4-D 12.5 μM	0.112 ± 0.015^{ab}
C_{12} = Y_3 + 2,4-D 10 μM + 2iP 2.5 μM	0.120 ± 0.013^{ab}
C_{13} = Y_3 + 2,4-D 500 μM + AC 0.05%	0.053 ± 0.007^{b}
Liquid media	
C_{11} = Y_3 + 2,4-D 12.5 μM	0.143 ± 0.020^{ab}
C_{12} = Y_3 + 2,4-D 10 μM + 2iP 2.5 μM	0.159 ± 0.020^{a}
C_{13} = Y_3 + 2,4-D 500 μM + AC 0.05%	0.127 ± 0.040^{ab}

อาหารชุดที่ 2

จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัส (C_{21}- C_{24}) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอได้บนอาหารสูตร C_{21} (Y_3 + 2,4-D 12.5 μM) C_{22} (Y_3 + 2,4-D 10 μM + 2iP 2.5 μ M) และ C_{24} (Y_3 + dicamba 12.5 μM)โดยแคลลัสที่ได้มีลักษณะแข็ง สีเหลือง และมีการเจริญเติบโตช้า ส่วนบนอาหารสูตร C_{23} (Y_3 + 2,4-D 500 μM + AC 0.3%) ไม่เกิดเป็นแคลลัส แต่จะมีการเจริญเป็นต้นแทน (ภาพที่16) เมื่อเปรียบเทียบความ สามารถในการชักนำแคลลัสของอาหารแต่ละสูตรโดยการชั่งน้ำหนักสดแคลลัสที่ได้ พบว่าอาหารสูตร C_{24} ให้น้ำหนักสดแคลลัสมากที่สุด รองลงมาคือ อาหารสูตร C_{21} และ C_{22} ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ภาพที่ 16 แคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตร C_{21}- C_{24} อายุ สัปดาห์

Figure 16 Oil palm embryo-derived callus cultured on Y_3 solid media C_{21}- C_{24} for 8 weeks

ตารางที่ 3 น้ำหนักแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันบนอาหารชักนำแคลลัสสูตร C_{21}- C_{24} เป็นเวลา 10 สัปดาห์

Table 3 Callus weight of oil palm embryos cultured on C_{21}-C_{24} media for 10 weeks

Media	Callus weight (g) Mean ± SE
C_{21} = Y_3 + 2,4-D 12.5 μM	0.131 ± 0.010 [b]
C_{22} = Y_3 + 2,4-D 10 μM + 2iP 2.5 μM	0.103 ± 0.014 [b]
C_{23} = Y_3 + 2,4-D 500 μM + 0.3% AC	-
C_{24} = Y_3 + dicamba 12.5 μM	0.211 ± 0.015 [a]

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดยวิธีของ Scheffe ($p \leq 0.01$)

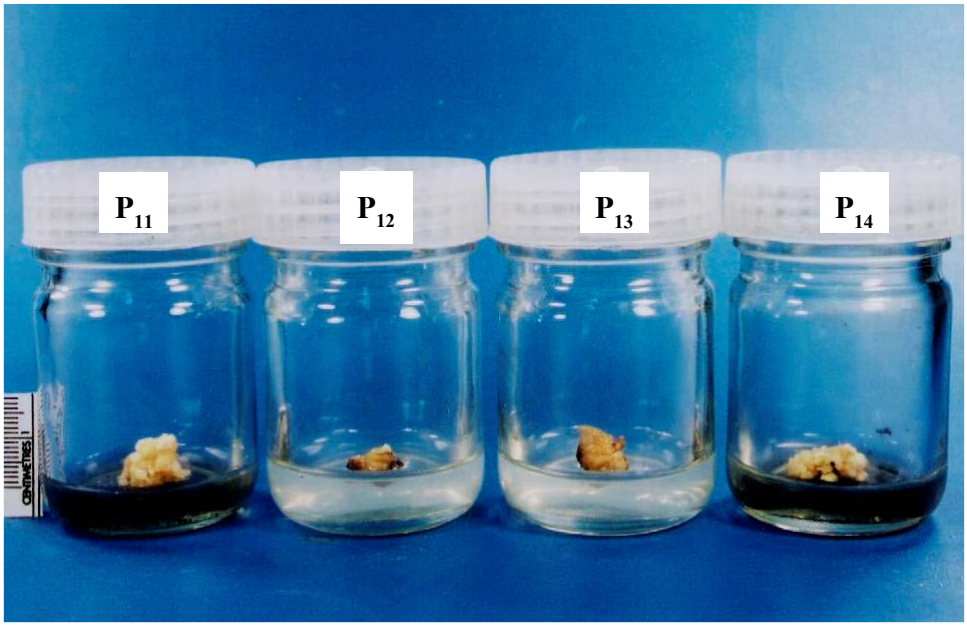
** Highly significant different at the 99 % confidence level

Means followed by different letters in column are significantly different by Scheffe test ($p < 0.01$)

3. การเพิ่มปริมาณแคลลัส

อาหารชุดที่ 1

เมื่อทำการย้ายแคลลัสเริ่มต้นที่ชักนำได้จากอาหารสูตร C_{11}-C_{13} ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัส (P_{11}-P_{14}) พบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าแคลลัสเริ่มต้น โดยแคลลัสจะมีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ ไม่อัดกันแน่น เมื่อเปรียบเทียบอาหารสูตรต่าง ๆ ในการเพิ่มปริมาณแคลลัสโดยการคำนวณค่าจากน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้นต่อน้ำหนักแคลลัสเริ่มต้น พบว่าสูตรอาหารที่มีผงถ่าน (P_{11} และ P_{14}) ดีกว่าสูตรที่ไม่มีผงถ่านในแง่ของการเพิ่มปริมาณแคลลัส เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะในสูตรอาหารที่มีผงถ่าน พบว่าถึงแม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D (จาก 10 μM เป็น 22.62 μM) ก็ไม่ได้มีผลในการช่วยเพิ่มปริมาณแคลลัส ในอาหารสูตร P_{13} (Y_3 + 2,4-D 2.26 μM + kinetin 0.83 μM + ABA 2 μM) พบว่าบางขวดจะเกิดการปล่อยสารสีน้ำตาลออกมา ทำให้แคลลัสบางส่วนเป็นสีน้ำตาล และมีการเจริญเติบโตช้า แต่เมื่อทำการหาค่าทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในอาหารทั้ง 4 สูตร (ภาพที่ 17, ตารางที่ 4)



ภาพที่ 17 แคลลัสปาล์มน้ำมันจากอาหารแข็งสูตร C_{11} หลังจากย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร P_{11}- P_{14} เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Figure 17 Oil palm calli from C_{11} solid medium after transfer to media P_{11}- P_{14} for 4 weeks

ตารางที่ 4 น้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้นต่อน้ำหนักแคลลัสเริ่มต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสปาล์มน้ำมันบนอาหารเพิ่มปริมาณแคลลัสสูตร P_{11}-P_{14} เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Table 4 Increasing callus weight per initial callus weight of oil palm cultured on P_{11}-P_{14} media for 4 weeks

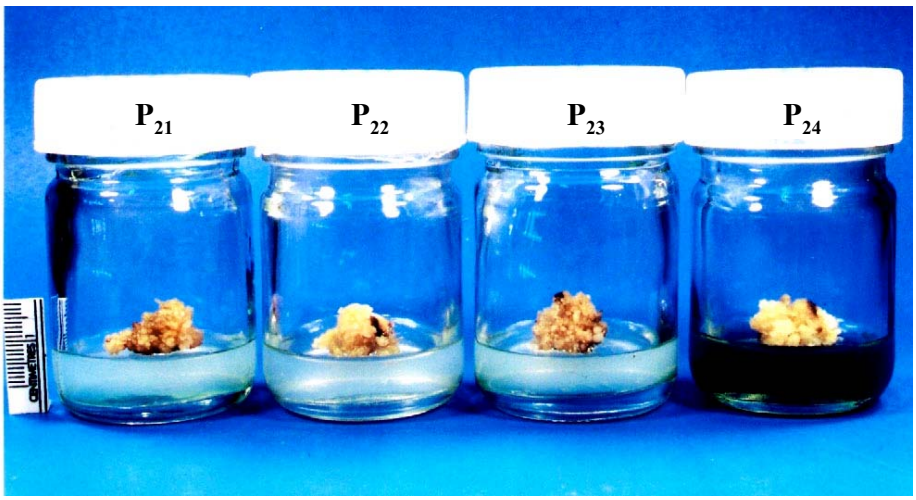
Callus proliferation media	Increasing callus weight / initial callus weight (g) Mean ± SE
P_{11} = Y3 + 2,4-D 10 μM + AC 0.05%	1.394 ± 0.300^{NS}
P_{12} = Y_3 + 2,4-D 10 μM + ascorbic acid 250 mg/l	1.093 ± 0.652^{NS}
P_{13} = Y_3 + 2,4-D 2.26 μM + kinetin 0.83 μM + ABA 2 μM	0.395 ± 0.141^{NS}
P_{14} = Y_3 + 2,4-D 22.62 μM + 0.05% AC	1.206 ± 0.363^{NS}

^{NS} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{NS} Means not significantly different at the 95 % confidence level.

อาหารชุดที่ 2

เมื่อทำการย้ายแคลลัสเริ่มต้นที่ชักนำได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัส (P_{21}- P_{24}) พบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าแคลลัสเริ่มต้น โดยแคลลัสจะมีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆไม่อัดกันแน่น เมื่อเปรียบเทียบอาหารสูตรต่าง ๆ ในการเพิ่มปริมาณแคลลัสโดยการคำนวณค่าจากน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้นต่อน้ำหนักแคลลัสเริ่มต้น พบว่าอาหารสูตรที่มีผงถ่าน (P_{24}) มีการเพิ่มปริมาณแคลลัสดีกว่าอาหารสูตรที่มี ascorbic acid ในทุกสูตรอาหาร (P_{21}- P_{23}) เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะในสูตรอาหารที่มี ascorbic acid พบว่าสูตรอาหารที่มี NAA (P_{23}) มีการเพิ่มปริมาณแคลลัสดีกว่าสูตรอาหารที่มี dicamba (P_{22}) และ 2,4-D (P_{21}) ตามลำดับ โดยเมื่อทำการหาค่าทางสถิติพบว่าอาหารสูตร P_{24} (Y3 + 2,4-D 10 μM + AC 0.05%) และ P_{23} (Y_3 + NAA 10 μM + ascorbic acid 250 มก/ล) ดีกว่าอาหารสูตร P_{22} (Y_3 + dicamba 10 μM + ascorbic acid 250 มก/ล) และ P_{21} (Y_3 + 2,4-D +10 μM + ascorbic acid 250 มก/ล) (ภาพที่ 18, ตารางที่ 5)



ภาพที่ 18 แคลลัสปาล์มน้ำมันจากอาหารแข็งสูตร C_{21} หลังจากย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตร P_{21}- P_{24} เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Figure 18 Oil palm calli from C_{21} solid medium and transfer to media P_{21}-P_{24} for 4 weeks

ตารางที่ 5 น้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้นต่อน้ำหนักแคลลัสเริ่มต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสปาล์มน้ำมันบนอาหารเพิ่มปริมาณแคลลัสสูตร P_{21}-P_{24} เป็นเวลา 4 สัปดาห์

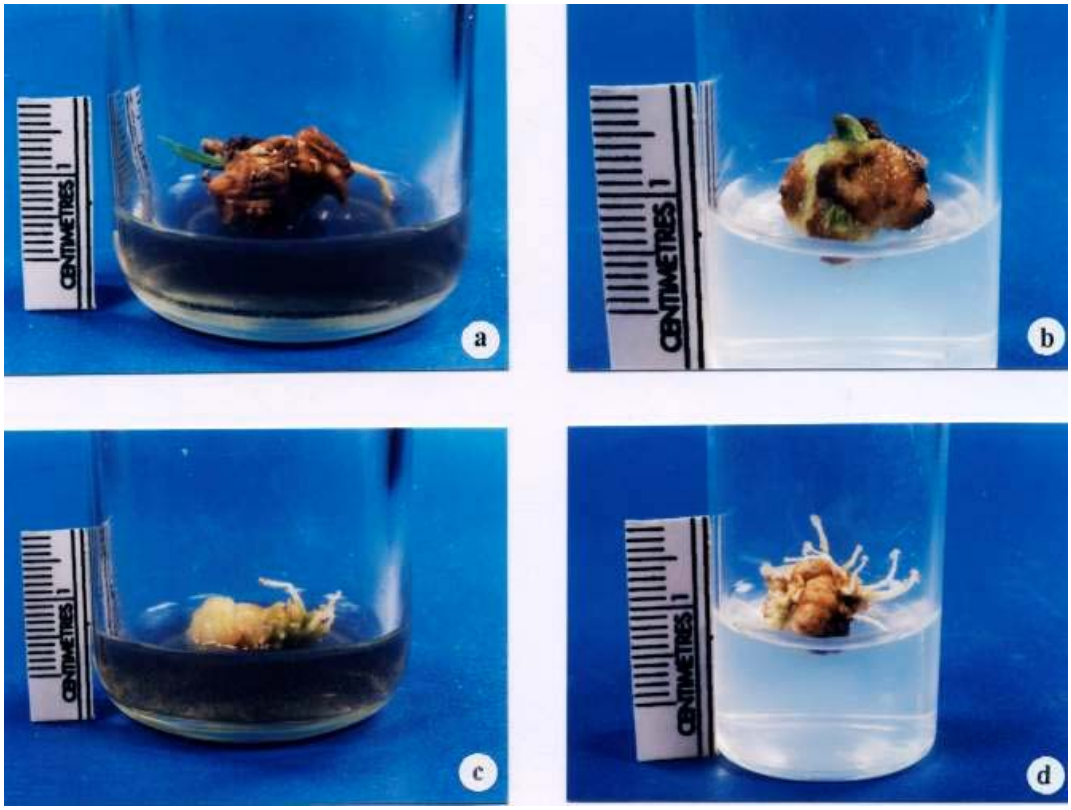
Table 5 Increasing callus weight per initial callus weight of oil palm cultured on P_{21}-P_{24} media for 4 weeks

Callus proliferation media	Increasing callus weight / initial callus weight (g) Mean ± SE
P_{21} = Y_3 + 2,4-D 10 μM + ascorbic acid 250 mg/l	1.034 ± 0.111 [b]
P_{22} = Y_3 + dicamba 10 μM + ascorbic acid 250 mg/l	1.186 ± 0.131 [b]
P_{23} = Y_3 + NAA 10 μM + ascorbic acid 250 mg/l	2.060 ± 0.251 [a]
P_{24} = Y3 + 2,4-D 10 μM + AC 0.05%	2.600 ± 0.425 [a]

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดยวิธีของ Scheffe ($p \leq 0.05$)

* Significant different at the 95 % confidence level.
Means followed by different letters in column are significantly different by Scheffe test ($p < 0.05$)

แต่ถ้าหากเลี้ยงแคลลัสดังกล่าวในอาหารสูตรที่มีผงถ่านเป็นเวลานาน ๆ (12 สัปดาห์) พบว่าเกิดการสร้างยอดหรือรากขึ้นในบางขวด (ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์) (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 ยอดที่เกิดขึ้นในอาหารบางขวด สูตร P_{11} และ P_{14} เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (a, b)
รากที่เกิดขึ้นในอาหารบางขวด สูตร P_{11} และ P_{14} เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (c, d)

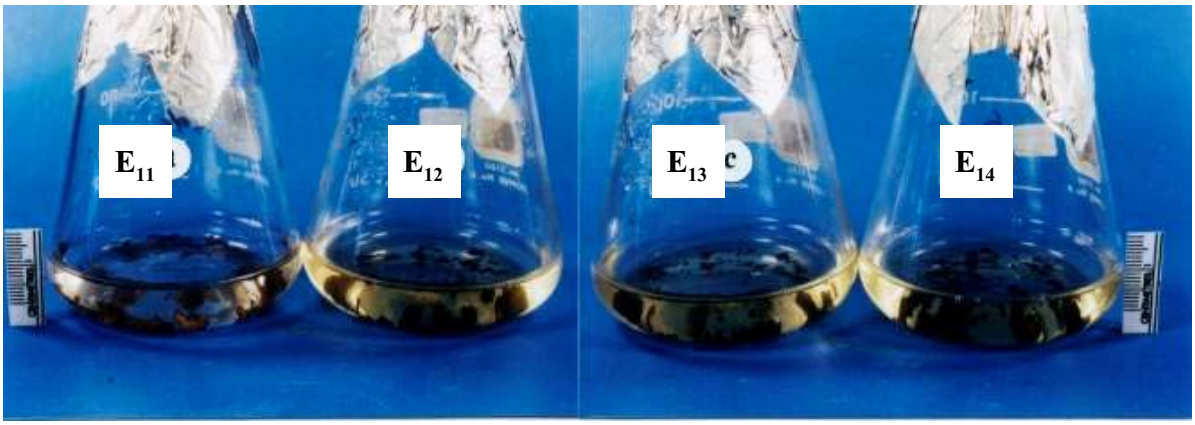
Figure 19 Shoot formation after cultured on media P_{11} and P_{14} for 12 weeks (a, b)
Root formation after cultured on media P_{11} and P_{14} for 12 weeks (c, d)

4. การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

อาหารชุดที่ 1

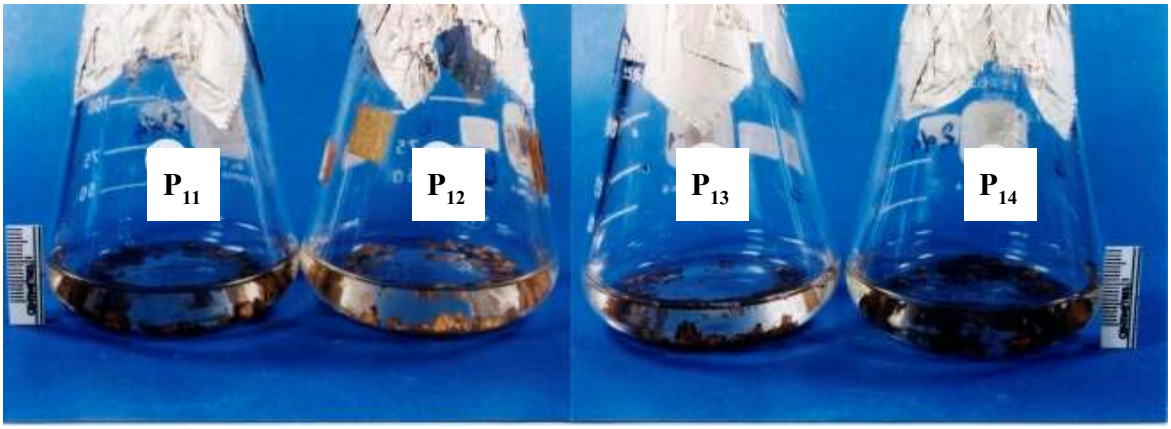
เมื่อทำการย้ายแคลลัสที่ได้จากสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ (E_{11}- E_{14}) ที่มี ABA ร่วมกับออกซิน คือ 2,4-D NAA หรือไซโทไคนิน คือ 2iP kinetin เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ที่ใช้ NAA (E_{11}) ให้ลักษณะเซลล์แขวนลอยดีกว่าสูตรที่ใช้ 2,4-D (E_{12}) 2iP (E_{13}) และ kinetin (E_{14}) กล่าวคือ แคลลัสยังคงมีสีเหลืองน้ำตาลและอาหารยังคงใส ในขณะที่สูตรอื่น ๆ แคลลัสเป็นสีน้ำ

ตาลดำและอาหารเปลี่ยน เป็นสีเหลือง (ภาพที่ 20, ตารางที่ 6) เมื่อเปรียบเทียบในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์สูตรเดียวกัน คือสูตรที่มี NAA (E_{11}) แต่ใช้แคลลัสที่ได้มาจากอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสสูตรต่าง ๆ กัน พบว่าแคลลัสที่ได้มาจากอาหารสูตร Y_3 + 2,4-D 10 μM + ascorbic acid 250 มก/ล (P_{12}) ให้แคลลัสที่มีลักษณะดีกว่าสูตรอื่น ๆ คือ แคลลัสยังคงมีสีเหลือง ในขณะที่สูตรอื่นๆ แคลลัสกลายเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 21, ตารางที่ 6)



ภาพที่ 20 ลักษณะเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส ที่ชักนำจากอาหารแข็งสูตร C_{11} ที่ย้ายลงอาหารแข็งสูตร P_{11} แล้วเลี้ยง ในอาหารเหลว E_{11}-E_{14} เป็นเวลา 12 สัปดาห์

Figure 20 Cell suspension from calli initiated on C_{11} solid medium and transferred to P_{11} solid medium and culture in E_{11}-E_{14} liquid media for 12 weeks



ภาพที่ 21 ลักษณะเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส ที่ได้จากอาหารแข็งสูตร C_{11} ที่ย้ายลงอาหารแข็งสูตร P_{11}-P_{14} แล้วเลี้ยงในอาหารเหลว E_{11} เป็นเวลา 12 สัปดาห์

Figure 21 Cell suspension from calli initiated on C_{11} solid medium and transferred to P_{11}-P_{14} solid media and cultured in E_{11} liquid medium for 12 weeks

ตารางที่ 6 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่ได้จากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร $E_{11} - E_{14}$ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

Table 6 Characteristic of cell suspension from calli cultured in liquid Y_3 medium $E_{11} - E_{14}$ for 12 weeks

Callus induction media	Proliferation media	Cell suspension media (initiation)	Cell suspension media (subculture)	Cell suspension characteristic			
				2 weeks	4 weeks	8 weeks	12 weeks
C_{11}	P_{11}	E_{11}	E_{11}	yellow callus clear solution	yellow and brown callus, clear solution	brown callus clear solution	brown callus clear solution
			Y_3NGR	yellow callus clear solution	yellow and brown callus, clear solution	brown callus and some with rooted clear solution	brown callus and some with rooted clear solution
	P_{12}	E_{11}	E_{11}	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution
			Y_3NGR	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	light yellow callus large callus appear clear solution	light yellow callus large callus appear clear solution
	P_{13}	E_{11}	E_{11}	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	brown callus clear solution	brown callus clear solution
	P_{14}	E_{11}	E_{11}	yellow callus clear solution	yellow and brown callus, yellow solution	brown callus clear solution	brown callus clear solution

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Table 6 (continue)

Callus induction media	Proliferation media	Cell suspension media (initiation)	Cell suspension media (subculture)	Cell suspension characteristic			
				2 weeks	4 weeks	8 weeks	12 weeks
	P_{11}	E_{12}	E_{12}	yellow and brown callus, yellow solution	brown callus yellow solution	dark brown callus yellow solution	dark brown callus yellow solution
		E_{13}	E_{13}	yellow and brown callus, yellow solution	brown callus yellow solution	dark brown callus yellow solution	dark brown callus yellow solution
		E_{14}	E_{14}	yellow and brown callus, yellow solution	brown callus yellow solution	dark brown callus yellow solution	dark brown callus yellow solution
C_{12}	P_{11}	E_{11}	E_{11}	yellow and brown callus, yellow solution	brown callus yellow solution	dark brown callus yellow solution	dark brown callus yellow solution

ตารางที่ 7 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่ได้จากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร $E_{21} - E_{25}$ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

Table 7 Characteristic of cell suspension from calli cultured in liquid Y_3 medium $E_{21} - E_{25}$ for 12 weeks.

Callus from	Cell suspension media				
	E_{21}	E_{22}	E_{23}	E_{24}	E_{25}
$C_{21}P_{21}$	light brown callus light brown solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	dark brown callus brown solution
$C_{21}P_{22}$	light brown callus clear solution	Light yellow callus swelled turbid solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	dark brown callus brown solution
$C_{21}P_{23}$	light brown callus turbid solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	dark brown callus brown solution
$C_{21}P_{24}$	brown callus yellow solution	yellow callus turbid solution	yellow callus little turbid solution	yellow callus little turbid solution	dark brown callus brown solution
$C_{22}P_{21}$	light brown callus light brown solution	yellow callus swelled turbid solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	dark brown callus brown solution
$C_{22}P_{22}$	light brown callus turbid solution	yellow callus turbid solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	dark brown callus brown solution
$C_{22}P_{23}$	light brown callus light brown solution	yellow callus little turbid solution	yellow callus clear solution	light brown callus clear solution	dark brown callus brown solution
$C_{22}P_{24}$	brown callus brown solution	light brown callus yellow solution	yellow callus clear solution	light brown callus yellow solution	dark brown callus brown solution

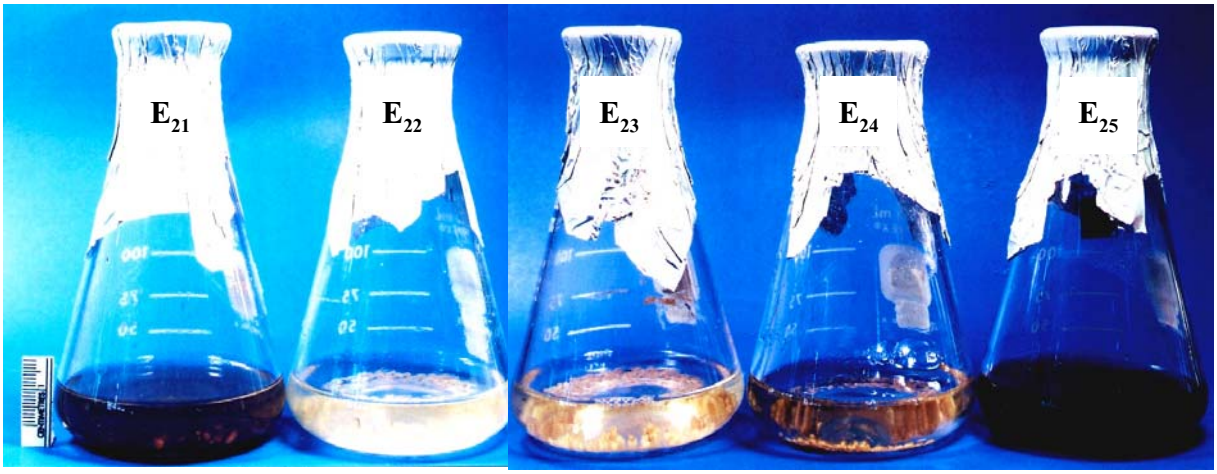
ตารางที่ 7 (ต่อ)

Table 7 (continue)

Callus from	Cell suspension media				
	E_{21}	E_{22}	E_{23}	E_{24}	E_{25}
$C_{24}P_{21}$	light brown callus brown solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	dark brown callus brown solution
$C_{24}P_{22}$	light brown callus clear solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	yellow callus clear solution	dark brown callus brown solution
$C_{24}P_{23}$	light brown callus brown solution	light brown callus clear solution	light brown callus clear solution	light brown callus clear solution	light brown callus brown solution
$C_{24}P_{24}$	brown callus brown solution	light brown callus clear solution	light brown callus clear solution	light brown callus clear solution	dark brown callus brown solution

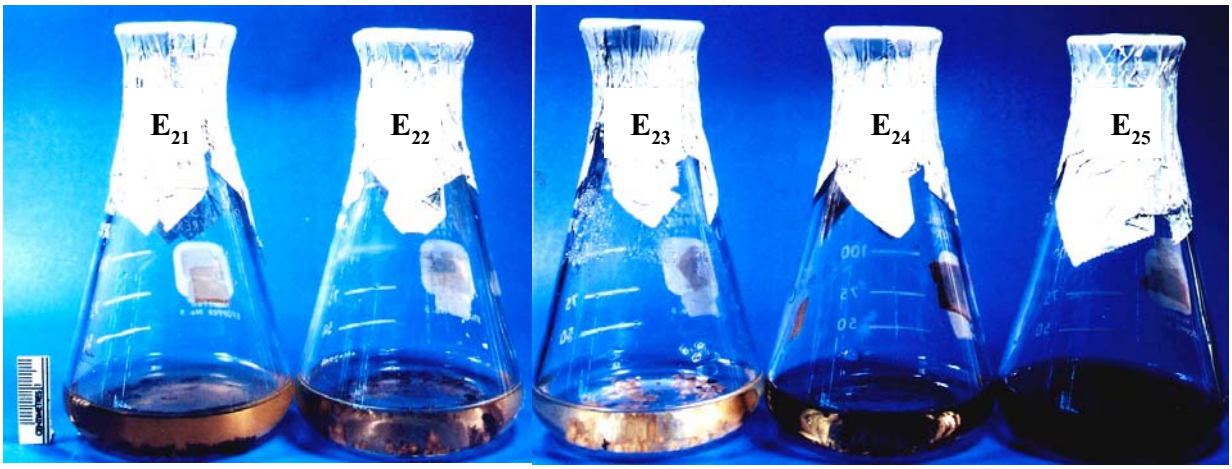
อาหารชุดที่ 2

เมื่อทำการย้ายแคลลัสที่ได้จากสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ (E_{21}- E_{25}) ที่มี ABA ร่วมกับการมีหรือไม่มีออกซิน คือ 2,4-D, dicamba, NAA หรือ ไซโทไคนิน คือ BA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าในสูตรอาหารที่มี NAA (E_{22}) dicamba (E_{23}) และ 2,4-D (E_{24}) ให้ลักษณะเซลล์แขวนลอยดีกว่าสูตรที่เติม BA (E_{25}) และไม่เติมฮอร์โมน (E_{21}) กล่าวคือ แคลลัสมีสีเหลืองหรือน้ำตาลอ่อน และอาหารยังคงใส ในขณะที่สูตรที่ไม่เติมฮอร์โมน แคลลัสเป็นสีน้ำตาลและสารละลายเป็นสีเหลืองน้ำตาล ส่วนในสูตรที่เติม BA แคลลัสและสารละลายเป็นสีน้ำตาลดำ (ภาพที่ 22-23, ตารางที่ 7)



ภาพที่ 22 ลักษณะเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากอาหารแข็งสูตร C_{22} ที่ย้ายลงอาหารแข็งสูตร P_{21} แล้วเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E_{21}- E_{25}เป็นเวลา 12 สัปดาห์

Figure 22 Cell suspension from calli initiated on C_{22} solid medium and transferred to P_{21} solid medium and cultured in E_{21}- E_{25}media for 12 weeks



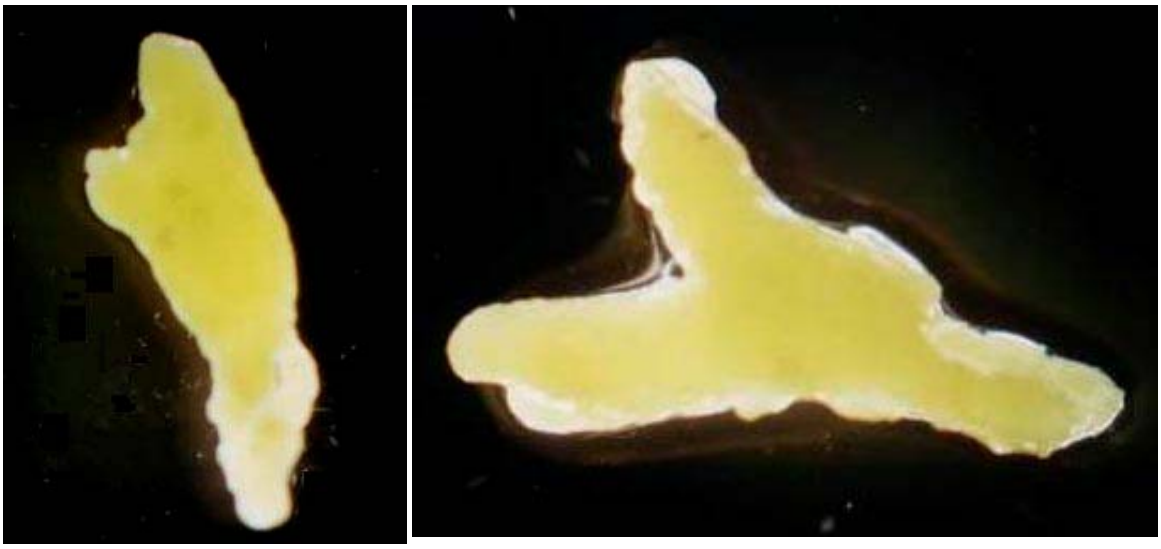
ภาพที่ 23 ลักษณะเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส จากสูตร C_{22} ที่ย้ายลงสูตร P_{23}แล้วเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E_{21}- E_{25} เป็นเวลา 12 สัปดาห์

Figure 23 Cell suspension from calli initiated on C_{22} and transferred to P_{23} medium and culture in E_{21}- E_{25} for 12 weeks

5. ลักษณะโครงสร้างเอ็มบริออยด์ที่พบในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

อาหารชุดที่ 1

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์เป็นเวลา 12 สัปดาห์ สังเกตพบลักษณะคล้ายเอ็มบริออยด์เกิดขึ้นในอาหารสูตร Y_3 + NAA 15 μM + ABA 2 μM (E_{11}) ที่มาจากสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารสูตร Y_3 + 2,4-D 10 μM + ascorbic acid 250 มก/ล (P_{12}) (ภาพที่ 24)

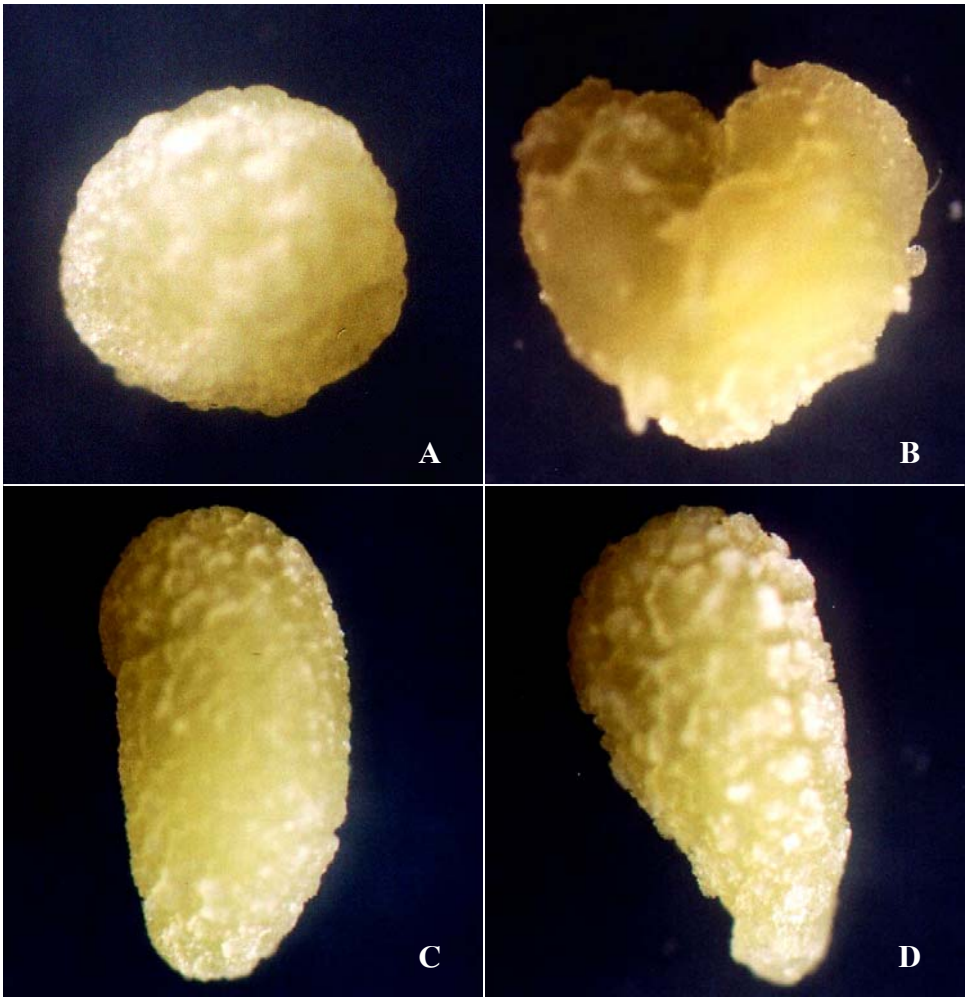


ภาพที่ 24 เอ็มบริออยด์ที่เกิดขึ้นในอาหารสูตร E_{11} (Y_3 + NAA 15 μM + ABA 2 μM) ที่มาจากสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารสูตร P_{12} (Y_3 + 2,4-D 10 μM + ascorbic acid 250 มก/ล)

Figure 24 Embryoid occurred from liquid Y_3 medium E_{11} (Y_3 + NAA 15 μM + ABA 2 μM) derived from callus on solid Y_3 medium P_{12} (Y_3 + 2,4-D 10 μM + ascorbic acid 250 mg/l)

อาหารชุดที่ 2

เมื่อทำการเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์เป็นเวลา 12 สัปดาห์ สังเกตพบลักษณะคล้ายเอ็มบริออยด์เกิดขึ้นในอาหารสูตร Y_3 + NAA 15 μM + ABA 2 μM (E_{22}) ที่มาจากสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารสูตร Y_3 + 2,4-D 10 μM + ascorbic acid 250 มก/ล (P_{21}) และ Y_3 + dicamba 10 μM + ascorbic acid 250 มก/ล (P_{22}) (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 เอ็มบริออยด์ที่เกิดขึ้นในอาหารเหลวสูตร E_{22} (Y_3+ NAA 15 μM + ABA 2 μM) ที่มาจากสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารสูตร P_{22} (Y_3 + dicamba 10 μM + ascorbic acid 250 มก/ล) หลังเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ระยะรูปกลม (A) รูปหัวใจ (B) และ รูปทอร์ปิโด (C และ D)

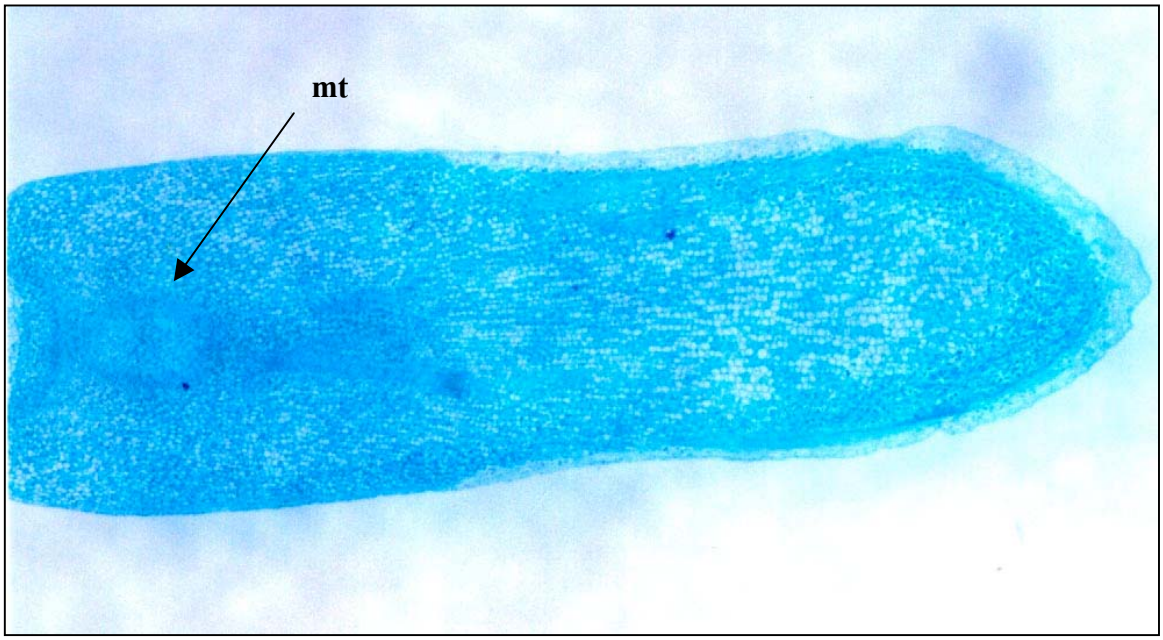
Figure 25 Embryoid occurred from liquid Y_3 medium E_{22} (Y_3+ NAA 15 μM + ABA 2 μM) derived from callus on solid Y_3 medium P_{22} (Y_3 + dicamba 10 μM + ascorbic acid 250 mg/l) after cultured for 12 weeks. Globular (A) heart (B) and torpedo stage (C, D)

6. ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นจากเอ็มบริออยด์

ไม่พบการพัฒนาเป็นต้นจากเอ็มบริออยด์ที่ได้มาจากการชักนำในอาหารเหลว ในทุกสูตรอาหาร (T_1- T_6) ที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้น แต่จะพบว่าเอ็มบริออยด์มีการเจริญกลับเป็นแคลลัสหรือมีการสร้างเป็นรากขึ้นมาแทน

7. การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของโซมาติกเอ็มบริโอและเอ็มบริออยด์

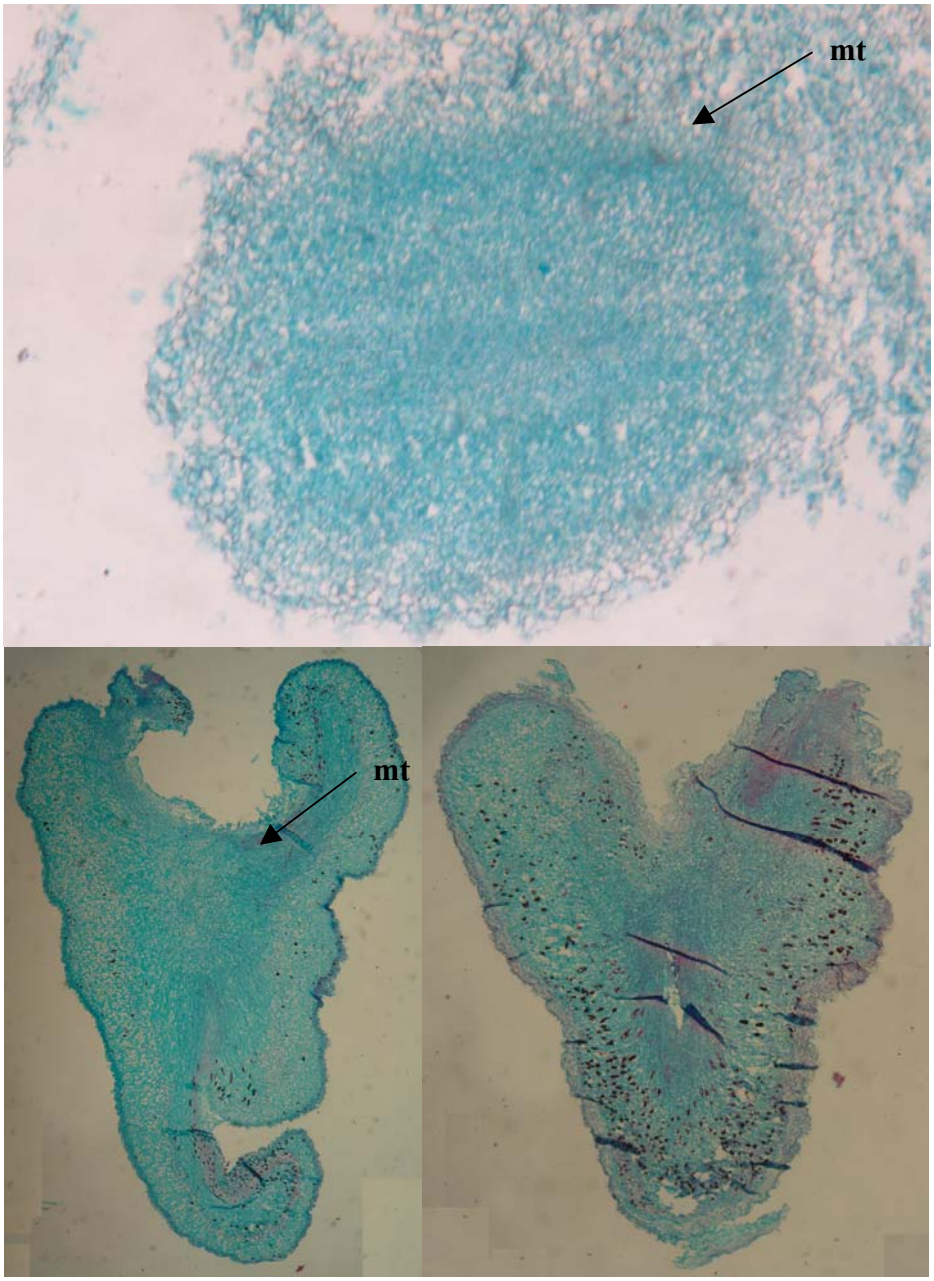
นำเอ็มบริโอเริ่มต้นและเอ็มบริออยด์ของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการทดลองไปศึกษาลักษณะทางกายวิภาค ด้วยการตัดเยื้อเยื่อตามวิธีการของ Johansen (1968) ผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันเริ่มต้น สังเกตพบจุดเริ่มต้นที่จะเจริญไปเป็นส่วนยอด (shoot pole) และส่วนราก (root pole) โดยสังเกตเห็นเป็นกลุ่มเซลล์ ขนาดเล็ก อัดตัวกันแน่นอยู่บริเวณปลายด้านหนึ่งของเอ็มบริโอ ซึ่งเป็นลักษณะของเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 25 เนื้อเยื่อวิทยาของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน

Figure 25 Histological study of oil palm zygotic embryo

และเมื่อนำเอ็มบริออยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยมาผ่านกระบวนการตัดเนื้อเยื่อ สังเกตพบลักษณะกลุ่มเซลล์ขนาดใกล้เคียงกัน อัดตัวกันแน่นอย่างเป็นระเบียบอยู่ในโครงสร้างที่ค่อนข้างกลม ซึ่งเป็นลักษณะของเอ็มบริออยด์ในระยะรูปกลม (globular stage) (ภาพที่ 27 A) รวมทั้งเอ็มบริออยด์ในระยะรูปหัวใจ (ภาพที่ 27 B-C) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายรูปหัวใจที่สังเกตเห็นเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก อัดตัวกันแน่นอยู่บริเวณตรงกลางของปลายด้านหนึ่งของเอ็มบริออยด์ ซึ่งคาดว่าเป็นจุดที่จะมีการเจริญพัฒนาไปเป็นส่วนยอด (shoot pole) และส่วนราก (root pole) ในเวลาต่อมา



ภาพที่ 27 การตัดทางเนื้อเยื่อวิทยาของเอ็มบริออยด์ปาล์มน้ำมัน **ระยะรูปกลม (A) และระยะรูปหัวใจ (B-C) mt = เนื้อเยื่อเจริญ**

Figure 27 Histological section of oil palm embryoid. Globular stage (A) And heart stage (B-C) **mt = meristematic tissues**