



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การศึกษากระบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

The Study on Organogenesis Process in Oil palm (*Elaeis guineensis*)

Through *In Vitro* Culture

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2554

จำนวน 40,500 บาท

หัวหน้าโครงการ

นายจิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์

ผู้ร่วมโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย อุ่นศรีสง

นายประสาทพร กออวยชัย

นางสาวปณิดา กันถาด

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

วันที่ 30 ธันวาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษากระบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ
(The Study on Organogenesis Process in Oil palm (*Elaeis guineensis*) Through *In Vitro* Culture)
ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2554

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำเนียร ขสราข อธิการบดีมหาวิทยาลัย
แม่โจ้ และอาจารย์สมพร มีแสงแก้ว ผู้อำนวยการมหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา
และชี้แนะแนวทางที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ โครงการจัดตั้งห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่สนับสนุนอุปกรณ์ในการ
ศึกษาวิจัย ขอขอบคุณ ฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร และบริษัท อาร์แอนคัลติเกศร-
พัฒนา จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเพื่อการวิจัย ขอขอบคุณ
นักวิทยาศาสตร์ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุกท่านที่มีได้เอื้อนาม ซึ่งมีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	(๗)
สารบัญภาพ	(๓)
บทคัดย่อ	1
Abstract	1
คำนำ	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	7
ผลการวิจัย	9
วิจารณ์ผลการวิจัย	15
สรุปผลการวิจัย	16
เอกสารอ้างอิง	17

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ความกว้างและความยาวของเอ็มบริโอ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 และ 4 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน	10
ตารางที่ 2 จำนวนยอด ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางส่วนปลายยอดอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางของเอ็มบริโอทั้งชิ้น จำนวนใบย่อย ความยาวใบ เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 200 วัน	11

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 สภาพเนื้อเยื่อเอ็มบริโอหลังเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน และลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนและพัฒนาการเกิดยอดใหม่ เมื่อเลี้ยงเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ระดับ 0.2 และ 4 มก./ล. นาน 200 วัน	12
ภาพที่ 2 ลักษณะภายในของเซลล์เนื้อเยื่อเอ็มบริโอ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน	13
ภาพที่ 3 ขบวนการชักนำให้เกิด organogenesis ของเอ็มบริโอ ภายใต้ระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้านอาหารเหลวที่เติม BAP ร่วมกับการเขย่า (shake)	14

การศึกษากระบวนการออ์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

The Study on Organogenesis Process in Oil palm

(*Elaeis guineensis*) Through *In Vitro* Culture

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์¹ ศิริชัย อุ่นศรีสง² ประสาทพร กอวยชัย¹ และ ปณิดา กันถาด¹

Jirasak Wichasawadi¹ Sirichai Unsrisong² Prasatporn Koauychai¹ and

Panida Kuntud¹

1. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ - ชุมพร จ.ชุมพร 86170

1. Maejo University at Chumphon, Chumphon 86170

2. ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

2. Department of Agronomy, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290

บทคัดย่อ

การศึกษากระบวนการออ์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่ คือ อาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP 4 มก./ล. ซูโครส 2.0 % ทำให้มีจำนวนยอดสูงสุด เฉลี่ย 1.5 ยอด/ชิ้นส่วนเริ่มต้น เมื่อเลี้ยงนาน 200 วัน ข้อมูลจากการวิจัยเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในอนาคต

คำสำคัญ: ปาล์มน้ำมัน, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ออ์แกโนเจเนซิส

Abstract

The study on organogenesis process in oil palm (*Elaeis guineensis*) 'tenera' through *in vitro* culture, the successful medium for the best of shoots induction were the VW (pH 5.6) liquid medium with 4 mg/l BAP, 2.0 % sucrose and gave the highest success of shoot multiplication average 1.5 shoots/ explant for 200 days. This research output can be applied for the use of further study in oil palm micropropagation.

Key words: Oil palm (*Elaeis guineensis*), Tissue culture, Organogenesis

คำนำ

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีอายุหลายปี สืบพันธุ์แบบผสมข้าม(allogamous) มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ คือ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย ปาล์มน้ำมันให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่มากกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ (Gorret *et al.*, 2004)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์(Chukwuemeka *et al.*, 2005) ใน ค.ศ. 1991 มีการศึกษาชักนำให้เอ็มบริโอเอนิคลีสที่ได้จากใบอ่อนเกิดเป็นต้นโดยเลี้ยงในสภาพอาหารเหลว (de Touchet *et al.*, 1991) ในปี ค.ศ. 1999 Aberlenc-Bertossi ได้พัฒนาวิธีการเพื่อปรับปรุงคุณภาพในการชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มปริมาณยอด (Gorret *et al.*, 2004) ในปี ค.ศ. 2002 Te-chato และคณะ รายงานว่า การชักนำให้เกิดโซมาติคเอ็มบริโอจากใบอ่อน (young leaf culture) เป็นวิธีหนึ่งในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ส่วนใหญ่ใช้สารไดแคมบา (dicamba) เป็นปัจจัยสำคัญในการส่งเสริมขบวนการโซมาติคแอก์ประสบปัญหาอัตราการพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอเป็นต้นใหม่มีอัตราต่ำ (Hilae and Te-chato, 2005) ในปี ค.ศ. 1985 Cui และคณะ สามารถชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่ตัดแยกออกจากเมล็ดบนอาหารที่เติม 2,4-D และ NAA ได้ (สมปอง, 2539)

ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันมากขึ้นโดยใช้หลักการ “true-to-type” เพื่อให้ได้ต้นที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์ เช่น ผลผลิตสูง ต้านทานโรค ทนต่อสภาพแห้งแล้ง (Mutert, 1999) นอกจากนี้ สมชาติ (2550) กล่าวว่า ข้อดีของต้นกล้าปาล์มที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ มีการแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อยมาก มีลักษณะเด่นเหมือนต้นพ่อแม่ทุกประการ การเจริญเติบโตให้ผลผลิตเร็วกว่าปาล์มที่มาจากการเพาะเมล็ด มีความต้านทานโรคสูง และให้ผลผลิตสูง

แนวทางใหม่ที่มีประสิทธิภาพลดปัญหาการกลายพันธุ์จากการผลิตต้นกล้าโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ วิธีการชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิสโดยใช้เทคนิคเมอริสเต็มคัลเจอร์หรือการปั่นตายยอด ซึ่งขบวนการนี้ไม่ต้องผ่านการเกิดแคลลัสทำให้ลดโอกาสเกิดการกลายพันธุ์จากแคลลัสได้

งานวิจัยนี้ มุ่งศึกษาการชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) โดยไม่ต้องผ่านการชักนำแคลลัสเพื่อลดปัญหาความผิดปกติของต้นกล้าโดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอดของเอ็มบริโอในการเริ่มต้นเพาะเลี้ยง องค์ความรู้ประยุกต์ที่ได้รับใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันเชิงการค้าในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษากระบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ช่วยพัฒนาองค์ความรู้ด้านการวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน และนักวิจัยสามารถนำความรู้ที่ได้ไปปรับใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ และการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันในอนาคต
2. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปลอดโรค ตรงตามสายพันธุ์ และให้ผลผลิตต่อไร่สูง รวมทั้งเป็นการสนับสนุนการผลิตต้นกล้าลูกผสมชั่วที่หนึ่งในระยะเวลาอันรวดเร็วสำหรับสายพันธุ์ดีเด่น และเป็นแนวทางการสร้างลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ๆ ในอนาคต
3. สร้างประโยชน์ต่อกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกปาล์มน้ำมัน และสถาบันวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง สามารถนำความรู้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป รวมถึงโครงการความร่วมมือสหกิจศึกษาทางวิชาการเกษตร ระหว่างมหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร กับภาคเอกชน
4. เสริมสร้างความเข้มแข็งให้กับประเทศในสภาวะการแข่งขันแบบเสรีทางการค้า ลดการนำเข้าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต่างประเทศ

การตรวจเอกสาร

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชน้ำมันที่ให้น้ำมันในปริมาณสูง (Abdullah *et al.*, 2005) จัดเป็นพืชที่มีศักยภาพในการแข่งขันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นทั้งในด้านการผลิตและการตลาด ในประเทศไทยส่วนแบ่งการผลิตน้ำมันปาล์มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว คาดว่าในช่วงปี 2559-2563 จะเพิ่มเป็นร้อยละ 31 ประเทศผู้ผลิตที่สำคัญ คือ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย (กรมวิชาการเกษตร, 2548) น้ำมันปาล์มสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล จังหวัดที่ปลูกปาล์มน้ำมันมาก ได้แก่ กระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง ตามลำดับ (ชาย และสุรศักดิ์, 2548 ; ธีระ และคณะ, 2548) สายพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า ได้แก่ ลูกผสมเทเนอร่า (ดูรา X ฟิลิเฟอร์รา) (ชาย และสุรศักดิ์, 2548) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปปาล์มน้ำมัน คือ ครีมเทียม มาการีน (เนยเทียม) เนยขาว วานาस्पาดิ ไขมัน และน้ำมันทอด ผลิตภัณฑ์วิตามินอี อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (วิชัย, 2548)

การพัฒนางานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่สำคัญ

Gorret *et al.* (2004) รายงานว่า ได้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันโดยใช้วิธีเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในระบบไบโอรีแอคเตอร์ (bioreactor) ศึกษาธาตุอาหาร (nutrients) และขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolites) ระหว่างภายในเซลล์ ค่าพารามิเตอร์ไคเนติก (kinetic parameters) และธาตุอาหารกับผลผลิตชีวมวล พบว่า ไนโตรเจนมีผลต่อการเพิ่มปริมาณต้นในขวดทดลอง กลูตามีน (glutamine) ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณขึ้นส่วนและความหนาแน่น (density) แอมโมเนียทำให้มีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive) และมีปฏิริยาแบบเสริมกัน (synergistic effects) ทำให้ผลิตเนื้อเยื่อได้ต้นจำนวนมาก

ในปี ค.ศ.1993 Corley และคณะ ได้ปลูกปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแปลงปลูก พบว่า ปาล์มน้ำมันนั้นให้ผลผลิตสูง (Abdullah *et al.*, 2005)

ได้มีผู้ศึกษาการใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ NAA ซึ่งเป็นสารกลุ่มออกซิน ในการชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction) โดยใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมันที่ตัดห่างจากส่วน เนื้อเยื่อส่วนปลาย (apical meristem) ประมาณ 15 ซม. เลี้ยงภายใต้สภาพมืด อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่า เกิดแคลลัสชนิดแน่น (compact callus) ได้ภายใน 1 เดือน เกิดลักษณะ nodular callus และเส้นผ่านศูนย์กลางก้อนแคลลัส ประมาณ 1 ซม. ซึ่งมีการเติบโตอย่างรวดเร็ว (Wong *et al.*, 1997) สำหรับการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) หรือการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส (callus differentiation) นั้น เกิดหลังจากเปลี่ยนย้ายอาหาร 6 ครั้ง พบเอ็มบริโอหรือโซมาติกเอ็มบริโอครั้งแรก เมื่อเลี้ยงขึ้นส่วน 5 เดือน และจะเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสภายหลังเลี้ยงนานกว่า 18 เดือน (มีการเปลี่ยนย้ายอาหารทุก 2 เดือน) (Wong *et al.*, 1997)

Kamnoon and Preamrudee (1999) รายงานว่า ลักษณะแคลลัสหลังเลี้ยงเอ็มบริโอ นาน 4 สัปดาห์ เกิดเซลล์ 3 - 4 เซลล์ ในชั้นเอพิเดอร์มิส (epidermis) เซลล์มีขนาดเล็ก มีไซโทพลาสซึมที่เข้มข้น (dense cytoplasm) และมีนิวเคลียสสมบูรณ์ (well-stained nucleus) แคลลัสประกอบด้วยเซลล์เมอร์ริสเต็มอยู่ภายใน แคลลัสมีการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่อง ภายหลังเลี้ยง 8 สัปดาห์ พบแคลลัสลักษณะก้อนกลม (nodular callus) เซลล์ที่อยู่ส่วนกลางแคลลัสมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่อยู่โดยรอบ เซลล์แคลลัสที่อยู่โดยรอบศูนย์กลางเมอร์ริสเต็ม (meristematic centers) พบว่า มีขนาดใหญ่และแวกไวโอลมาก แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหรือเอ็มบริอยด์ โดยพบการแบ่งเซลล์ในระยะต่างๆ คือ ระยะก้อนกลม (globular stage) และรูปหัวใจ (heart shape)

ในปี ค.ศ. 2002 Te-chato และคณะ รายงานว่า การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอใช้วิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อน (young leaf culture) โดยส่วนใหญ่ใช้สารไดแคมบา (dicamba) ส่งเสริมขบวนการนี้ อัตราการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอเป็นพืชต้นใหม่นั้นยังต่ำอยู่ (Hilae and Te-chato, 2005)

Hilae and Te-chato (2005) ได้รายงานว่าการเติมแมนนิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในอาหารสูตร MS ช่วยส่งเสริมการเจริญรากของโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 40 % การเติมน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้นสูงและการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารช่วยส่งเสริมการสร้างรากของปลั้ม

Abdullah *et al.* (2005) ได้เลี้ยงเอ็มบริโออ่อน (immature embryo) ของปลั้มน้ำมัน และสามารถเกิดแคลลัสด้วยอาหารสูตร N_6 2.5 หรือสูตร Chu 1975 ที่เติม 2,4-D 2.5 มก./ล. และสูตร Chu โดยเกิดแคลลัสภายหลังเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเอ็มบริโอเจนิกแคลลัส (embryogenic callus) พัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) ภายหลังเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ และพบโซมาติกเอ็มบริโอในระยะทอร์ปิโด (torpedo-shaped) และ ระยะต้นอ่อน (plantlet) ในอาหารสูตร Chu และคณะ, 1975 ที่ไม่เติม 2,4-D

ในปี ค.ศ. 2005 Park รายงานว่า การเลี้ยงเนื้อเยื่ออาหารสูตร 1/3 strength MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ซูโครส 60 ก./ล. ส่งเสริมการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ (Hilae and Te-chato, 2005)

Abdullah *et al.* (2005) รายงานว่า การเลี้ยงเอ็มบริโอเหมาะสมต่องานปรับปรุงพันธุ์ (breeding programs) โดยได้ศึกษากระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) เอ็มบริโอมีการตอบสนองได้ดีกว่าชิ้นส่วนใบและเนื้อเยื่อราก เอ็มบริโอเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสได้และมีประสิทธิภาพดีในการเจริญเป็นต้นกล้า ใช้เวลาเพาะเลี้ยงน้อยและจำนวนต้นผิดปกติน้อย เทคนิคนี้สามารถใช้ร่วมกับการนำอินเข้าสู่เซลล์หรือแคลลัสของปลั้มน้ำมันเพื่อพัฒนาพันธุ์ปลั้มให้มีลักษณะที่ต้องการ

จิระศักดิ์ และคณะ (2550) ได้เลี้ยงชิ้นส่วนเอ็มบริโออ่อนของปลาล์มน้ำมัน ด้วยอาหารแข็ง สูตร VW ที่เติม BAP เข้มข้น 4 มก/ล. IAA เข้มข้น 1 มก/ล. น้ำมะพร้าว 22.5 % นาน 355 วัน ทำให้เกิดแคลลัสแล้วพัฒนาเป็นยอดพิเศษได้โดยผ่านกระบวนการออร์แกโนเจเนซิส(organogenesis) สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนติกแคลลัสชนิดหลวมและแน่นได้คือ อาหารแข็ง สูตร VW ที่เติม BAP 4 มก/ล. IAA 1 มก/ล. น้ำมะพร้าว 22.5 % เอ็มบริโอเจเนติกแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นโครงสร้างที่คล้ายกระจุยยอดได้ เมื่อเลี้ยงนาน 150 วัน

จิระศักดิ์ และคณะ (2553) ได้ศึกษาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของปลาล์มน้ำมันพันธุ์ tenera โดยเฉพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนโดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอดเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPM (ดัดแปลงจากสูตร MS และ VW ที่เติม BAP ร่วมกับ IAA น้ำมะพร้าว 15% ซูโครส 2%) เลี้ยงในระบบเขย่า เป็นเวลา 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW เลี้ยงภายใต้สภาพเขย่า เป็นเวลา 147 วัน พบว่า มีการเพิ่มปริมาณยอดเฉลี่ย 18 ยอดต่อชิ้นส่วน

Yusnita (2011) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction) และโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส (somatic embryogenesis) ของปลาล์มน้ำมันโดยใช้ชิ้นส่วนใบ เริ่มจากการใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนจากต้นที่สมบูรณ์ เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ระดับต่างกัน ร่วมกับการเติม/ไม่เติมผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) ที่เติม 2,4-D และ picloram พบว่า เมื่อใช้ 2,4-D ระดับ 450 μM และ BAP ระดับ 4.4 μM ร่วมกับผงถ่าน สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิสได้ สำหรับการเติม 2,4-D ระดับ 15 μM ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด ในการทดลองยังพบว่า primary callus (27 ใน 250 clumps) สามารถเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสได้ภายหลังเปลี่ยนย้ายอาหาร 2 - 3 ครั้ง สำหรับเอ็มบริโอเจเนติกแคลลัสพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม casein hydrolysate ร่วมกับ BAP ระดับ 1 μM หรือการไม่เติมฮอร์โมนร่วมกับการใช้ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการเตรียมอาหารย้ายเนื้อเยื่อ และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. สารเคมี ได้แก่
 - 2.1 สารที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Vacin and Went (1949) หรือ VW
 - 2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ 6 - benzylaminopurine (BAP)
 - 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร
3. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พร้อมชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ติดหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (white-fluorescent) มีความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ (Lux)
4. เครื่องเขย่า (shaker)
5. อุปกรณ์บันทึกภาพและข้อมูล
6. เมล็ด และผลอ่อน (immature fruit) ของปาล์มน้ำมันพันธุ์ tenera ต้นที่ให้ผลผลิต 3 - 5 ตัน/ไร่
จากฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร

วิธีการวิจัย

เริ่มดำเนินการวิจัย เมื่อเดือน มิถุนายน 2552 สิ้นสุดเดือน มกราคม 2556 รวมระยะเวลา 3 ปี 8 เดือน ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และ ฟาร์มมหาวิทยาลัยฯ โดยทำการสุ่มตัวอย่าง และ ทำรหัสต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตสูงจากฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร

การเตรียมชิ้นส่วนและการพอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเอมบริโอ

คัดเลือกต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์เทนเอร์รา ที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งมีอายุประมาณ 5 ปี แล้วทำสัญลักษณ์กำหนดหมายเลขไว้จากนั้นปลิดผลอ่อน ขนาดผล 2.5 X 3.7 เซนติเมตร ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 9.5 กรัมต่อผล นำเมล็ดพันธุ์มาล้างด้วยน้ำยาซันไลต์ 3 ครั้ง และน้ำสะอาด 3 ครั้ง ฉีดพ่นด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % 5 นาที แล้วปล่อยให้แห้ง ใช้มีดผ่าแบ่งผลบริเวณใกล้กับเอมบริโอ ปอกเปลือกหุ้มผล จากนั้นนำเอมบริโอที่ติดอยู่กับเนื้อผลมาพอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรีกซ์ 10 % ที่เติมทวิน-20 (tween20) เขย่าเป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ใช้ปากคีบ คีบเอมบริโอมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ตามแผนการทดลองต่อไป

การศึกษาขบวนการออร์แกโนเจนีซิสในสภาพปลอดเชื้อ

เพาะเลี้ยงเอมบริโออ่อนในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (มก./ล.) น้ำตาลซูโครส 2.0 เปอร์เซ็นต์ (%) นึ่งอาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 1.4 กก./ตร.ซม. เป็นเวลา 20 นาที เลี้ยงเอมบริโอในสภาพที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน (ชม./วัน) ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ วางบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 200 วัน อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยง 25 ± 2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 3 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 9 ซ้ำ ๆ ละ 1 ชิ้นส่วนต่อขวด ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 อาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 0 มก./ล.

สิ่งทดลองที่ 2 อาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 มก./ล.

สิ่งทดลองที่ 3 อาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 4 มก./ล.

บันทึกการเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏ ลักษณะการเจริญเติบโต เช่น จำนวนยอด ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางยอดอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางทั้งชิ้นส่วนเอมบริโอ จำนวนใบย่อย ความยาวใบ สีใบ เป็นต้น พร้อมบันทึกภาพ

ผลการวิจัย

การศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อนำเอมบริโออ่อน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (มก./ล.) ซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ (%) เลี้ยงภายใต้สภาพแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ระบบเขย่า เป็นเวลา 200 วัน ปรากฏผลดังนี้

1. จำนวนยอด

เมื่อเลี้ยงเอมบริโอด้วยอาหารที่เติม BAP 4 มก./ล. ทำให้มีจำนวนยอดสูงสุดเฉลี่ย 1.5 ยอด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BAP ระดับอื่นๆ (ตารางที่ 2)

2. ความยาวยอด

เมื่อเลี้ยงด้วย BAP ที่เติม 2 มก./ล. และไม่เติม BAP ทำให้ยอดมีความยาวเฉลี่ย 5.3 และ 4.2 ซม. ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่การเติม BAP 4 มก./ล. ทำให้ยอดมีความยาวน้อยที่สุด 3.0 ซม. แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเติม BA ระดับอื่นๆ (ตารางที่ 2)

3. เส้นผ่านศูนย์กลางส่วนปลายยอดอ่อน และเส้นผ่านศูนย์กลางเอมบริโอทั้งชิ้นส่วน

การเลี้ยงด้วยอาหารทุกสูตรอาหาร ไม่ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางปลายยอดอ่อน มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

เมื่อเลี้ยงเอมบริโอด้วยอาหารที่เติม BAP 0 และ 2 มก./ล. ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางเอมบริโอทั้งชิ้นส่วน เฉลี่ย 3 และ 2.8 ซม. ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

การเติม BAP ความเข้มข้น 4 มก./ล. ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางเอมบริโอทั้งชิ้น มีค่าน้อยที่สุด เฉลี่ย 1.3 ซม. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 2)

4. จำนวนใบย่อย

เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม BAP 4 มก./ล. ทำให้มีจำนวนใบย่อยมากที่สุด เฉลี่ย 17.4 ใบ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเมื่อเลี้ยงเอมบริโอในสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 2)

5. ความยาวใบ

เมื่อเลี้ยงเอมบริโอด้วยอาหารสูตรที่เติม BAP 2 มก./ล. และไม่เติม BAP ทำให้มีความยาวใบ เฉลี่ย 5.7 และ 4.7 ซม. ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกัน

เมื่อเติม BAP 4 มก./ล. ทำให้มีความยาวใบน้อยที่สุด เฉลี่ย 1.2 ซม. ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ความกว้างและความยาวของเอ็มบริโอ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 และ 4 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน

สิ่งทดลอง	ลักษณะที่ปรากฏ ^{ก/}	
	ความกว้าง (มม.)	ความยาว (มม.)
BAP 0 มก./ล.	4.0±1.2 a	7.2±3.30 a
BAP 2 มก./ล.	3.4±1.5 a	6.9±3.84 a
BAP 4 มก./ล.	3.5±0.7 a	6.0±1.33 a
F - test	ns	ns
% CV	32.18	45.1

หมายเหตุ

- 1/ ตัวเลขในแนวตั้งที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ก/ ข้อมูลนี้ ได้จากผลการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 สิ่งทดลองๆ ละ 10 ซ้ำๆ ละ 1 ซีนส่วน รวม 30 ซีนส่วน สำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ปนเปื้อน (contaminated) ได้คัดทิ้ง และไม่ได้นำมาใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2 จำนวนยอด ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางส่วนปลายยอดอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางของ
 เอ็มบริโอทั้งชิ้น จำนวนใบย่อย ความยาวใบ เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนเอ็มบริโอในอาหารเหลว
 สูตร VW ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 200 วัน

อาหารเหลว สูตร VW ร่วมกับ BAP ระดับต่างๆ	ลักษณะที่ปรากฏ					
	จำนวนยอด (ยอด)	ความยาว ยอด(ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง กลางปลายยอด อ่อน (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง ทั้งชิ้นส่วน (ซม.)	จำนวนใบ ย่อย (ใบ)	ความยาว ใบ (ซม.)
BAP 0 มก./ล	1.0 b ¹	4.2 ab	0.5 a	3.0 a	5.6 b	4.7 a
BAP 2 มก./ล	1.0 b	5.3 a	0.5 a	2.8 a	3.2 b	5.7 a
BAP 4 มก./ล	1.5 a	3.0 b	0.5 a	1.3 b	17.4 a	1.2 b
F-test; F-value	5.3	3.5	0.1	9.9	4.7	9.9
Sig.	*	*	ns	**	*	**
%CV.	35.4%	44.3%	40.0%	38.2%	121.2%	58.6%

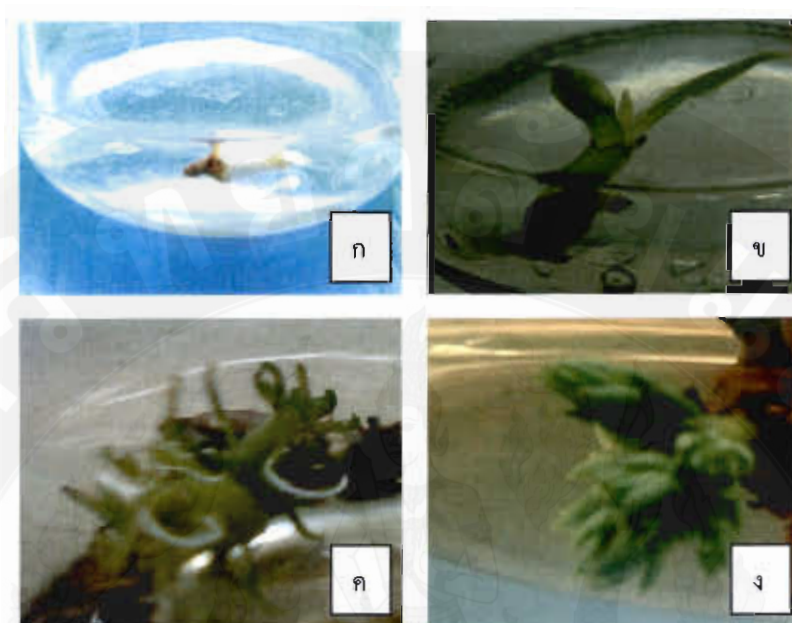
หมายเหตุ

- 1/ ตัวเลขในแนวดิ่งที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่า "ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's
 multiple range test (DMRT)

* = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

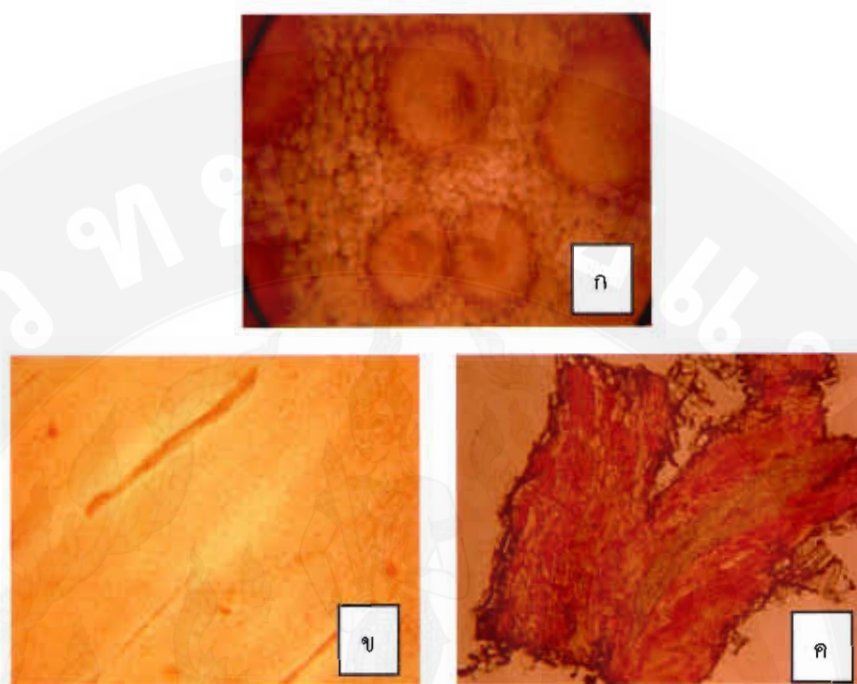


ภาพที่ 1 สภาพเนื้อเยื่อเอมบริโอหลังเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน (ก) และลักษณะการเจริญของ
 ซันตัวและพัฒนากการเกิดยอคใหม่ เมื่อเลี้ยงเอมบริโอในอาหารเหลวสูตร VW
 (pH 5.6) ที่เติม BAP ระดับ 0.2 และ 4 มก./ล. นาน 200 วัน (ข – ง)

ข) BAP 0 มก./ล.

ค) BAP 2 มก./ล.

ง) BAP 4 มก./ล.

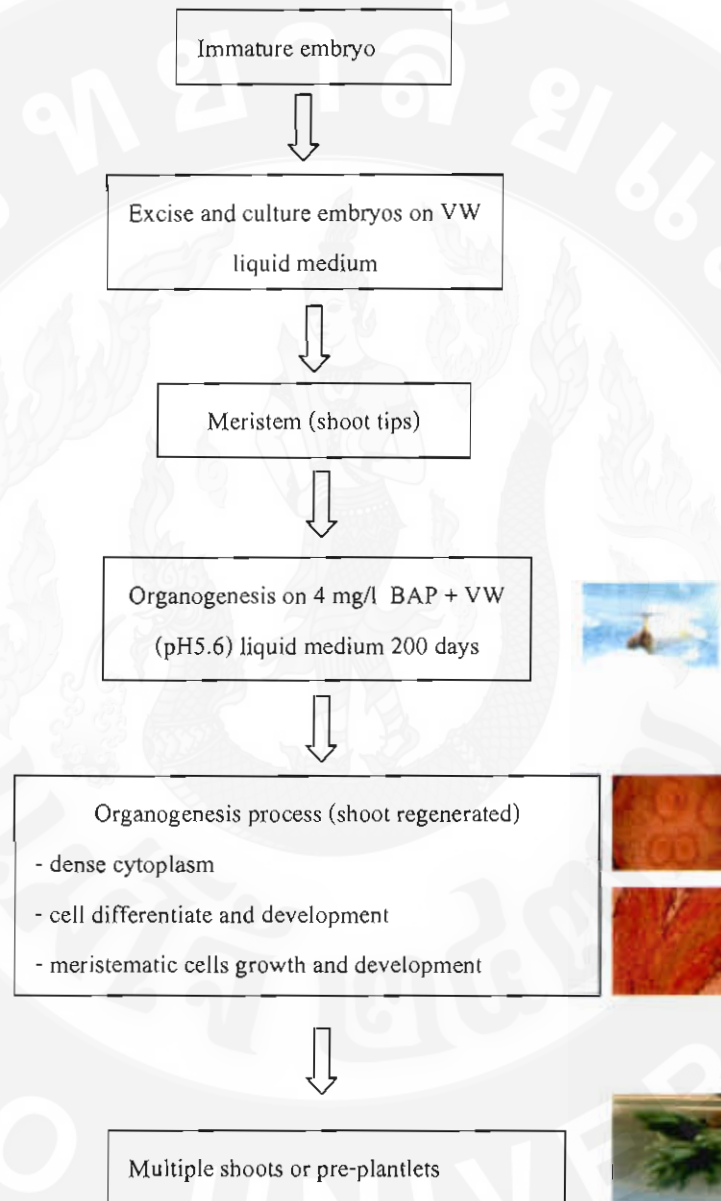


ภาพที่ 2 ลักษณะภายในของเซลล์เนื้อเยื่อเอ็มบริโอ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ก) เอ็มบริโออ่อนในระยะแรกๆ มองเห็นท่อไขกระดูกชัดเจน แวกิวโอลมีขนาดใหญ่ (ภาพตัดขวางด้านบน)

ข) ระยะแรกๆ ภายในเซลล์ ไขกระดูกมีการจัดเรียงตัวของเซลล์ค่อนข้างเป็นระเบียบ เซลล์ยังไม่มีแบ่งตัว ส่วนแวกิวโอลมีขนาดใหญ่ (ภาพตัดตามยาวของเนื้อเยื่อ)

ค) เมื่อเลี้ยงไปนานมากขึ้น กลุ่มเซลล์พาราไคมะที่อยู่ใกล้เคียงกันมีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ ทำให้ไซโทพลาสซึมเข้มข้นขึ้น ส่วนแวกิวโอลเดิมมีขนาดใหญ่ก็เล็กลง จึงมองดูเหมือนเซลล์จัดเรียงแบบไร้ระเบียบ คาดว่าเซลล์น่าจะมีการแบ่งตัวในอัตราที่สูงขึ้น (ภาพตัดตามยาวของเนื้อเยื่อ)



ภาพที่ 3 ขบวนการชักนำให้เกิด organogenesis ของเอ็มบริโอ ภายใต้ระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยอาหารเหลวที่เติม BAP ร่วมกับการเขย่า (shake)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

การศึกษานี้ เน้นการชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันโดยไม่ต้องผ่านการชักนำให้เกิดแคลลัสก่อน จากการทดลองนี้ได้เลี้ยงเอ็มบริโออ่อนในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ระดับ 4 มก./ล. และซูโครส 2.0 % เป็นเวลา 200 วัน พบว่า ทำให้มีจำนวนยอดมากที่สุด เฉลี่ย 1.5 ยอด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตรอื่นๆ ส่วนการไม่เติม BAP ทำให้ไม่เกิดยอดใหม่ หรือกล่าวได้ว่า ไม่เกิดออร์แกโนเจเนซิส แต่การเติม BAP ทำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสได้จึงช่วยเพิ่มปริมาณยอดให้มากขึ้น สอดคล้องกับ จิระศักดิ์ และคณะ (2550) รายงานว่า สามารถชักนำยอดพิเศษของปาล์มน้ำมันได้ในอาหารสูตรที่เติม BAP และ IAA สามารถกระตุ้นให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิสได้และ การเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารเหลวที่เติม BAP ร่วมกับ IAA และน้ำมะพร้าว ทำให้มีการพัฒนาเป็นยอดพิเศษจำนวนมากได้ (จิระศักดิ์ และคณะ, 2553) ซึ่งเกิดจากอินโดเรคิออร์แกโนเจเนซิส (indirect - organogenesis) การเติม BAP ทำให้ไซมาติกเอ็มบริโอมีการพัฒนาที่ดี (Kamnoon and Preamrudee, 1999) การวิจัยนี้จึงเป็นทำซ้ำเพื่อยืนยัน และสนับสนุน ข้อมูลวิจัยดังกล่าวได้

มีผู้รายงานว่า การเพิ่มปริมาณยอดของเนื้อเยื่อเป็นผลจากการได้รับไซโทไคนินอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานในระหว่างการพัฒนาของเอ็มบริโอ แต่หากชิ้นส่วนเอ็มบริโอได้รับสารฮอร์โมน BAP ในระยะเวลาสั้นๆ ทำให้ได้ยอดเดี่ยว (single shoot) (Aberlenc-Bertossi *et al.*, 1999) Zaerr and Mapes (1982) รายงานว่า BAP เป็นสารในกลุ่มไซโทไคนินที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกระตุ้นการเกิดยอด การที่ BAP ทำหน้าที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และกระตุ้นการสร้างยอด (Brock and Kaufman, 1991) เนื่องจาก BAP เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีน กระตุ้นการแบ่งเซลล์ จึงส่งผลให้เกิดการสร้างยอดได้ดี (McGrew, 1987)

ในการทดลองนี้ พบว่า การเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาพเขย่า ทำให้มีอัตราการเกิดยอดได้มากขึ้น เนื่องจากการเขย่าอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาที่เพาะเลี้ยงช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนหรืออากาศ (aeration) ให้กับเนื้อเยื่อโดยตรงทำให้เนื้อเยื่อเติบโตอย่างรวดเร็ว (Shakti *et al.*, 2007 ;Othmani *et al.*, 2009) สำหรับการเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารเหลวช่วยทำให้เนื้อเยื่อที่เลี้ยงได้รับธาตุอาหารหรือฮอร์โมนอย่างทั่วถึง และในปริมาณที่มากขึ้น (Shakti *et al.*, 2007; Othmani *et al.*, 2009) การเขย่าขวดเนื้อเยื่ออย่างต่อเนื่องทำให้ชิ้นส่วนปลายยอดของพืชที่เลี้ยงมีการแตกตาข้าง (axillary bud) (Shakti *et al.*, 2007)

สำหรับในการทดลองนี้ ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดโดยเทคนิคการชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิสเพื่อเพิ่มปริมาณยอดในอาหารเหลว สอดคล้องกับมีรายงานทดลองเลี้ยงส่วนปลายยอดในมะพร้าวและอินทผลัมได้สำเร็จ (Verdel *et al.*, 1992; Hadrami *et al.*,

1995) ซึ่งขบวนการ organogenesis เป็นขบวนการเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ โดยการรวมตัวของ กลุ่มเซลล์พาเร็นไคมาที่อยู่ใกล้เคียงกัน ซึ่งกลุ่มเซลล์พาเร็นไคมาเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงภายใน เซลล์ ทำให้ไซโทพลาสซึมเข้มข้นขึ้น ส่วนของแควิวโอลซึ่งแต่เดิมมีขนาดใหญ่ก็จะเล็กลง เซลล์มีการ เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์เจริญ (meristematic cell) ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในอัตราสูง เซลล์เหล่านี้ยังมีขนาด เล็ก กลุ่มเซลล์เหล่านี้บางทีอาจจะเรียกว่า “Meristemoids” ซึ่งจะเจริญไปเป็นจุดกำเนิดยอด หรือราก (shoot or root primordia) คอไป การเกิดยอดหรือรากจะเป็นอิสระต่อกันขึ้นอยู่กับว่าเนื้อเยื่อส่วนนั้น จะได้รับสิ่งกระตุ้นในการเจริญไปเป็นอวัยวะ(ชลิต, 2532) โดยในการทดลองนี้ได้้นำเนื้อเยื่อส่ง ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์และปรากฏลักษณะเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงต่างๆ สอดคล้องกับข้อมูลดังกล่าว

สรุปผลการวิจัย

1. การเลี้ยงเอ็มบริโออ่อน (immature embryo) ในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ระดับ 4 มก./ล. และซูโครส 2.0 % เป็นเวลา 200 วัน พบว่า ทำให้มีจำนวนยอดมากที่สุด เฉลี่ย 1.5 ยอด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตรอื่นๆ จากการทดลอง พบแนวโน้มว่า การเติม BAP ระดับที่มากขึ้น ทำให้ยอดมีความยาวนานน้อยกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่เติม BAP หรือเติม 2 มก./ล. แต่การเติม BAP ระดับ 4 มก./ล. ทำให้มีจำนวนใบย่อยมากขึ้น และมีความยาวใบสั้นกว่าการเติม BAP ระดับ 2 มก./ล. และไม่เติมฮอร์โมน BAP

2. การเลี้ยงเอ็มบริโอ ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BAP ระดับ 4 มก./ล. และซูโครส 2.0 % สามารถชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิสได้โดยไม่ต้องผ่านการชักนำแคลลัสก่อน จึงช่วยให้ เพิ่มปริมาณยอดได้โดยตรง (direct multiple shoots)

ข้อมูลเหล่านี้ น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน โดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการ ปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2548. ปาล์มน้ำมัน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ.

188 น.

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์, ศิริชัย อุ๋นศรีส่ง, สมพร มีแสงแก้ว, ประสาทพร กอวยชัย และ ณิชยา แก้วชญา. 2550. อิทธิพลของ Benzyl aminopurine และ Indole acetic acid ต่อการเกิด แคลลัสของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ. รายงานผลการวิจัย. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ - ชุมพร: ชุมพร.

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์, ศิริชัย อุ๋นศรีส่ง, สมพร มีแสงแก้ว, ประสาทพร กอวยชัย และปณิศา กันถาด. 2553. การเกิดโสมมาติคเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์การค้าในสภาพปลอดเชื้อ. รายงานผลการวิจัย. มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร: ชุมพร.

ชลิต พงศ์สุกสมิทธิ์. 2532. เทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน, คณะผลิตกรรมการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้: เชียงใหม่. 146 น.

ชาย โฆรวิส และสุรกิตติ ศรีกุล. 2548. ประวัติและความสำคัญ. ใน: กรมวิชาการเกษตร (บรรณาธิการ) ปาล์มน้ำมัน. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ. น. 1 - 6.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรมนิม, ประกิจ ทองคำ และ สมเกียรติ สีสนอง. 2548. เส้นทางสู่ความสำเร็จการผลิตปาล์มน้ำมัน. พิมพ์ครั้งที่ 2. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตปาล์มน้ำมัน, คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่: สงขลา. 117 น.

วิชัย ออมทรัพย์สิน. 2548. การแปรรูปปาล์มน้ำมัน. ใน: กรมวิชาการเกษตร (บรรณาธิการ) ปาล์มน้ำมัน. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ. น. 151 - 171.

สมชาติ สิงหะพล. 2550. โครงการความร่วมมือสหกิจศึกษาทางวิชาการเกษตร. ใน: ชมรมสื่อมวลชนเกษตรแห่งประเทศไทย (บรรณาธิการ) เอกสารสัมมนาทิศทางการพัฒนาปาล์มน้ำมันเพื่อความมั่นคงของเกษตรกร. กรุงเทพฯ.

สมปอง เตชะโต. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่: สงขลา. 135 น.

- Abdullah, R., Z. Alizah , Y. H. Wee , C .L. Leaw , C. B. Yeap , M. P. Lee , A. S. Salwa, Y. S. P. Winnie, L. J. Juanita, A. J. Siti, M. M. Rashdan, and L. H. Yeun . 2005. Immature embryo : A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. **Plant Biotechnology**. 1 (8).
- Aberlenc-Bertossi, F., M. Noirot, and Y. Duval. 1999. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**. 56 (1): 53 - 57.
- Brock, T. G. and P. B. Kaufmann. 1991. Growth regulators: an account of hormones and growth regulation. *In*: Steward, F.G. (ed.) **Plant physiology: A Treatise**. Academic Press Inc: London. pp. 27 - 34.
- Chukwuemeka, R.E., A. Peter, and A. Omofe. 2005. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. **African Journal of Biotechnology**. 4(3): 244 - 246.
- de Touchet, B., Y. Duval, and C. Pannetier. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Rep.** 10: 529 - 532.
- Gorret, N., S.K. bin Rosli, S.F. Oppenheim, L.B. Willis, P.A. Lessard, C. Rha, and A.J. Sinskey. 2004. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. **J. Biotechnol.** 108(3): 253 - 263.
- Hadrami, I., R. Cheikh, and M. Baaziz. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot-tip explants in *Phoenix dactylifera* L. **Biologia plantarum**. 37 (2): 205 - 211.
- Hilae, A. and S. Te - chato. 2005. Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 27 (suppl.3): 629 - 635.
- Kamnoon K. and D. Preamrudee. 1999. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. **Science Asia**. 25: 195 - 202 .

- McGraw, B.A. 1987. Cytokinin biosynthesis and metabolism. *In*: Davies, P. J. (ed.) **Plant hormones and there role in plant development**. Martinus Nihoff Publishers: Dordrect. pp. 76 - 93.
- Mutert, E. and T.H. Fairhurst . 1999. Oil Palm Clones: Productivity enhancement for the future. **Better Crops International**. 1(3): 45 - 47.
- Othmani, A., C.Bayoudh, N. Drira, and M.Trifi. 2009. *In vitro* cloning of date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Degletbey by using embryogenic suspension and temporary immersion bioreactor (TIB). **Biotechnol. and Biotechnol. EQ**. 1181 - 1188.
- Shakti, M., K.G. Manoj, K.K. Arun, and N.M. Bhatendu. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress to wards commercialization. **African Journal of Biotechnology**. 6(13): 1484 - 1492.
- Vacin, E.F. and F. Went .1949. Some pH changes in nutrient solutions. **Bot. Gaz**. 110: 605 - 613.
- Verdel, J.L., C. Huet, F. Grosdemanges, A. Rival, and J. Buffard – Morel. 1992. Embryogenese Somaticque du cocotier (*Cocos nucifera* L.): Obten de plusieurs clones de vitroplants. **Oleagineux**. 47: 465 - 469.
- Wong, G., C.C.Tan, and A.C. Soh. 1997. Large scale propagation of oil palm clones - experiences to date. **Hort. Biotech. In Vitro Cult. and Breeding**. 649 - 658.
- Yusnita, D.H. 2011. *In Vitro* Callus Induction and Embryogenesis of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from Leaf Explants. **Journal of Biosciences**. 18 (2). 61 - 65.
- Zaerr, J. B. and M. O. Mapes. 1982. Action of growth regulation. *In*: Bonga, J. M. and D. J. Durzan, (eds.) **Tissue culture in Forestry**. Martinus Nijhoff Dr. W. Junk Publishers. pp. 231 - 255.