ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน

Effect of Culture Media and Plant Growth Regulators on Establishment of Embryogenic Cell Suspension and Proliferation of Somatic Embryos of Oil Palm

เพ็ญติมาส กระมุท

Pentimas Kramut

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

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นางสาวเพ็ญติมาส กระมุท

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

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

…….....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

…….....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

…..……..…….
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นางสาวเพ็ญติมาส กระมุท

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (Embryogenic Callus: EC) สามารถชักนำได้ 100% จากเนื้อเยื่อเจริญที่เกาะกันแบบหลวม ๆ (Friable embryogenic tissue: FET) บนอาหารแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) เติม 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (Somatic embryo: SE) สูงสุด 16.88 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน FET ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น โดยให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ (Packed cell volume: PCV) เป็น 2 เท่า และมีจำนวนกลุ่มเซลล์ที่มีเซลล์มากกว่า 10 เซลล์ 121.68 กลุ่มต่อมิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ในส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้น พบว่า 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.25 มิลลิลิตร และมีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 2-4 มิลลิเมตร จำนวน 20 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ นอกจากนี้อาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนกลุ่มเซลล์ที่มีเซลล์มากกว่า 10 เซลล์ 106.6 กลุ่มต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาแหล่งของคาร์บอนร่วมกับการเติม และไม่เติมผงถ่านในอาหารเหลวสูตร MS พบว่า น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ที่ไม่เติมผงถ่านให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตรเฉลี่ยสูงสุด 19 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน และในส่วนของการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 2-4 มิลลิเมตร บนอาหารแข็ง พบว่า อาหารแข็งสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (Haustorium embryo: HE) สูงสุด 32 เปอร์เซ็นต์ วิธีการการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น นี้มีประโยชน์ในการช่วยเพิ่มปริมาณ SE ปาล์มน้ำมัน และสามารถใช้เป็นเครื่องมือทางเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อปรับปรุงพันธุกรรมปาล์มน้ำมันต่อไป

Thesis Title	Effect of Culture Media and Plant Growth Regulators on Establishment of Embryogenic Cell Suspension Culture and Somatic Embryos Proliferation of Oil Palm
Author	Miss Pentimas Kramut
Major Program	Plant Science
Academic Year	2008

ABSTRACT

Embryogenic calli (EC) were induced from friable embryogenic tissue (FET) on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.3 mg/l 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) at 100%. The numbers of somatic embryos (SE) obtained in this medium was 16.88 embryo/culture tube after 1 month of culture. Embryogenic cell suspensions were successfully established using FET on same culture medium and culture conditions. Growth of the cell suspension determined as packed cell volume (PCV) in the cultures increased 2 folds after 15 days of culture and the numbers of cell aggregates (more than 10 cells/aggregate) was 121.68 aggregates/ml. Among auxin tested, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at concentration of 0.4 mg/l containing MS medium gave the best response in PCV (2.25 ml) and average number of somatic embryos at size of 2-4 mm (20 embryos/flask). Moreover, the number of cell aggregates (more than 10 cells/aggregate) at 106.6 aggregates/ml was obtained in MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D. In case of carbon source in combination with or without activated charcoal in MS liquid medium, 0.17 M sucrose without activated charcoal gave the best response in average number of somatic embryos at size of bigger than 2 mm (19 embryos/flask) after 15 days of culture. Moreover, somatic embryos at size of 2-4 mm were developed to haustorium embryo (HE) at 32% on ½ MS solid medium supplemented with 0.2 M sorbitol. This protocol was very benefit to help mass propagation of oil palm plants through cell suspension culture. It would be a key tool for biotechnology in genetic improvement of oil palm in the future as well.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(10)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	6
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	7
วัสดุ อุปกรณ์	7
วิธีการวิจัย	9
3 ผล	13
4 วิจารณ์	28
5 สรุป	33
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	38
ประวัติผู้เขียน	40

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มจำนวนกลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ ในอาหารสูตร MS หรือ Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	17
2	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลว สูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน	22
3	ผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอจากโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 1-2 มิลลิเมตร ของปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ ¼ MS ½ MS และ MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	24
4	ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร่วมกับการเติมและไม่เติมผงถ่านต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวและแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	27

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	FET ชักนำจากใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีซึ่งวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	7
2	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	14
3	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสระยะรูปกลม และระยะสร้างจาวในอาหารแข็งสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	15
4	ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร)ในอาหารเหลวสูตร MS และ Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	16
5	กลุ่มเซลล์ในอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน	17
6	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	19
7	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 2-4 มิลลิเมตรเฉลี่ยในอาหารเหลวสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน	20
8	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดออกซินในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ต่อการสร้างกลุ่มเซลล์ที่มีจำนวนเซลล์ 5-10 เซลล์ และมากกว่า 10 เซลล์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน	21

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	ขนาดของเซลล์ในกลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน	21
10	โซมาติกเอ็มบริโอโครงสร้างกลมและมีสีเหลืองในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน	23
11	โซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	25
12	ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร่วมกับการเติมและไม่เติมผงถ่าน (0.01 เปอร์เซ็นต์) ต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร) ในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	26
13	โซมาติกเอ็มบริโอลักษณะกลมเหลืองขนาดต่าง ๆ ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ไม่เติมผงถ่าน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน	27

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) จัดเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากให้ผลผลิตน้ำมันดิบต่อหน่วยพื้นที่มากกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น (ธีระ และคณะ, 2548) ผลผลิตจากปาล์มน้ำมันสามารถนำมาแปรรูปเป็นเครื่องอุปโภคและบริโภคได้หลายชนิด เช่น เนยเทียม เนยขาว สบู่ ผงซักฟอก เป็นต้น (สมปอง, 2544) ในอนาคตปาล์มน้ำมันจะมีบทบาทที่สำคัญอีกบทบาทหนึ่ง คือการผลิตไบโอดีเซล (เปรมปรี, 2549) ทำให้อุตสาหกรรมการแปรรูปปาล์มน้ำมันขยายตัวอย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่เกษตรกรปลูกในปัจจุบันเป็นพันธุ์ลูกผสม ซึ่งเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ไปขยายต่อจะเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ส่งผลให้ผลผลิตต่อต้นไม่สม่ำเสมอ (ธีระ และคณะ, 2543) ทำให้เกษตรกรไม่สามารถเก็บเมล็ดใต้ต้นไปปลูกต่อได้ ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการขยายพันธุ์ หรือเพิ่มปริมาณต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีให้ได้จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น ก็คือการนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยเพื่อลดปัญหาดังกล่าว ซึ่งปัจจุบันมีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันประสบความสำเร็จแล้วในหลายงานวิจัย เช่น การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีในประเทศไทยพบว่าสามารถชักนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาว (haustorium) ได้สำเร็จ (อาสลัน, 2545) แม้จะสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้เป็นจำนวนมากก็ตาม แต่เปอร์เซ็นต์การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอยังคงต่ำอยู่ นอกจากนี้ระยะพัฒนาของแคลลัสในอาหารแข็งไม่อยู่ในระยะเดียวกัน เนื่องจากชิ้นส่วนพืชไม่สามารถสัมผัสอาหารได้อย่างทั่วถึงเมื่อเทียบกับอาหารเหลว (นภาพร, 2548) ดังนั้นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเข้ามาใช้ จะช่วยลดปัญหาดังกล่าว Kanchanapoom และ Tinnongjig (2001) สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันได้ เช่นเดียวกับรายงานของ de Touchet และคณะ (1991) สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ที่มาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นให้พัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ อย่างไรก็ตามจากรายงานของ Aberlence-Bertossi และคณะ (1999) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น และเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 80 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่สูง ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ของ

ต้นกล้า Te-chato (1998) พบว่า การเพาะปลูกต้นปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน ซึ่งปลูกทดสอบตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533/34 จนถึงขณะนี้ไม่พบความผิดปกติใด ๆ ผลผลิตที่ได้มีแนวโน้มสูงกว่าต้นที่ปลูกจากเมล็ด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในช่วงของการชักนำแคลลัสจนกระทั่งได้พืชต้นใหม่มีการใช้ 2,4-D N^6-Benzyladenine (BA) และ ∝-Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้นต่ำ การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันโดยใช้ dicamba ความเข้มข้นต่ำ (0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถร่นระยะเวลาการเพาะเลี้ยงลงเหลือ 6-9 เดือน ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงทำการศึกษาการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับต่ำที่ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้ได้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค

การตรวจเอกสาร

ปาล์มน้ำมัน แบ่งออกเป็น 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ดูรา เป็นพันธุ์แท้ที่มีลักษณะเด่น คือ กะลาหนา และไม่มีวงเส้นใยรอบเมล็ด พันธุ์พิสิเฟอราเป็นพันธุ์แท้ที่มีลักษณะด้อย คือ ไม่มีกะลา แต่มีวงเส้นใยรอบเมล็ด และพันธุ์เทเนอรา ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง พันธุ์ดูราและพันธุ์พิสิเฟอรา มีลักษณะเด่น คือ กะลาบางและมีวงเส้นใยรอบเมล็ด ผลใหญ่ สามารถให้ผลผลิตน้ำมันในชั้นของเปลือก และน้ำมันจากเมล็ดในของผลสูงกว่า 2 พันธุ์ข้างต้น จึงเป็นพันธุ์ที่นิยมใช้ปลูกเพื่อการค้า (นภาพร, 2548)

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันสามารถขยายพันธุ์ได้ 2 วิธี คือ

1. แบบอาศัยเพศ (sexual propagation) ได้แก่ การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด

2. แบบไม่อาศัยเพศ (asexual หรือ vegetative propagation) เนื่องจากปาล์มน้ำมันมีการเจริญเติบโตจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และไม่มีการแตกหน่อ หรือกิ่งแขนง จึงไม่สามารถขยายพันธุ์โดยวิธีไม่อาศัยเพศทั่วไป เช่น การปักชำ ตอนกิ่ง และการติดตา ดังนั้นการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน โดยวิธีไม่อาศัยเพศวิธีเดียวที่สามารถทำได้ คือ การขยายพันธุ์โดยใช้วิธีการทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (นภาพร 2548)

การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือการนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญของพืช เช่น ใบ ลำต้น ดอก ราก หรือ เซลล์ และโปรโตพลาสต์ วางเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโต ภายใต้สภาวะที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยควบคุมการให้แสง และอุณหภูมิ (สมปอง, 2550)

1. การชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส คือเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะของพืช ในปาล์มน้ำมันสามารถชักนำแคลลัสได้จากชิ้นส่วนต่าง ๆ เช่น ช่อดอก (Teixeira *et al*., 2004) ต้นอ่อนภายในเมล็ด (Kanchanapoom and Tinnongjig, 2001) ใบอ่อนจากต้นกล้า (Te-chato, 1998b) และใบอ่อนจากต้นโตที่ให้ผลผลิตแล้ว (de Touchet *et al*., 1991) ซึ่งแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนใบให้อัตราการเพิ่มปริมาณได้มากกว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนช่อดอก (Rajanaidu *et al*., 1997) การชักนำแคลลัสทำได้โดยวางเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่เติม NAA หรือ 2,4-D หรือทั้ง 2 ชนิด หรือ Amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid (picloram) หรือ dicamba (Te-chato, 1998a) Duval (1995) อ้างโดย Rohani (2001) รายงานลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแบบหลวม ๆ (friable callus) และแคลลัสที่เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มก้อน (nodular compact callus) นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนแคลลัสสามารถทำได้โดยย้ายเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำได้ ลงสู่อาหารแข็งที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Teixeira และคณะ (1995) สามารถเพิ่มจำนวนแคลลัสปาล์มน้ำมันชนิด Friable embryogenic tissue (FET) ได้สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารแข็งสูตร Y_3 (Eeuwens, 1976; 1978) หรือ MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม 2,4-D เข้มข้น 100-110 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ picloram เข้มข้น 55 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 เดือน Chemalee และ Te-chato (2008) สามารถเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำมาจากเอ็มบริโอได้มากกว่า 10 เท่า หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน

2. การชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น

การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยว หรือกลุ่มเซลล์ในอาหารที่เขย่าตลอดเวลา ทำได้โดยนำชิ้นส่วนพืช หรือแคลลัสที่มีลักษณะโครงสร้างเซลล์เกาะกันแบบหลวม ๆ วางเลี้ยงในอาหารเหลว แรงเขย่าจากเครื่องเขย่าทำให้เซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่เป็นอิสระจากชิ้นส่วนพืชหรือแคลลัสเริ่มต้น ซึ่งการเริ่มต้นชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นนั้น มักเริ่มจากแคลลัสน้ำหนัก 0.1-0.3 กรัมต่ออาหาร 25 มิลลิลิตร (คำนูณ, 2540) การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นสามารถเพิ่มปริมาณได้ในช่วงระยะเวลาที่แน่นอน ภายใต้สภาพแวดล้อมการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม การเจริญของเซลล์ซัสเพนชั่นเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งจึงทำให้สามารถเพิ่มปริมาณพืชต้นใหม่ได้อย่างรวดเร็ว (George and Sherrington, 1984) de Touchet และคณะ (1991) นำ แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแบบหลวม ๆ ที่มีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร ซึ่งชักนำได้จากชิ้นส่วนใบอ่อนจากต้นโตที่ให้ผลผลิตแล้ว มาใช้ในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นเป็น 4 เท่าหลังจากวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 1 เดือน เช่นเดียวกับ Teixeira และคณะ (1995) นำ FET ซึ่งชักนำจากเอ็มบริโอที่สุกแก่ วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Y_3 เติม 2,4-D เข้มข้น 2.2 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นเป็น 5 เท่าหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

3. การเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น

พัฒนาการของเซลล์พืชในแต่ละระยะการเพาะเลี้ยงจะมีความต้องการธาตุอาหารและสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงแตกต่างกันออกไป ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อพัฒนาการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประกอบด้วย ชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม โดยพื้นฐานแล้วอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน กรดอะมิโน สารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาลและน้ำ ทั้งธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองมีความสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ อาหารสูตร MS ได้ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์ซัสเพนชั่นอย่างแพร่หลาย ยกตัวอย่างเช่น de Touchet และคณะ (1991) ชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นโดยใช้ แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแบบหลวม ๆ ที่ชักนำได้จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลง เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ adenine sulfate เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณ

เซลล์ซัสเพนชั่นมากที่สุด และเมื่อย้ายเซลล์ซัสเพนชั่นจากอาหารเหลวสูตรเดิม วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า เอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นยอด 18.1 เปอร์เซ็นต์ Aberlence-Bertossi และคณะ (1999) สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน ในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร casein hydrolysate เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร และเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ 70% บนอาหารแข็งสูตรเดิม นอกจากนี้ยังมีการนำอาหารสูตร Y_3 มาใช้ในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น ดังรายงานของ Teixeira และคณะ (1995) นำแคลลัสของปาล์มน้ำมัน 2 ลักษณะ คือ primary globular callus (PGC) และ FET มาเปรียบเทียบความสามารถในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นและเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น ในอาหารเหลวสูตร Y_3 ดัดแปลง โดยการเติม 2,4-D เข้มข้น 2.2 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสชนิด FET สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นได้ภายใน 2 เดือน ในขณะที่แคลลัสชนิด PGC ใช้เวลา 3-5 เดือน และเมื่อย้ายเซลล์ซัสเพนชั่นที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารพัฒนาเอ็มบริโอสูตร Y_3 เติม NAA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ พบว่า FET เท่านั้นที่สามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอได้ภายใน 4-6 สัปดาห์ Kanchanapoom และ Tinnongjig (2001) เพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร Y_3 เติม ไกลซีนเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร Y_3 ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตได้สำเร็จ

4. **การเจริญและพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ**

การพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมันสามารถแบ่งเป็น 3 ระยะ ดังนี้ ระยะรูปกลม ระยะทอร์ปิโด และระยะเจริญพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (นภาพร, 2548) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือเกิดจากการชักนำด้วยปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้คือ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน องค์ประกอบของธาตุอาหาร หรือประเภทของอาหารที่ใช้ในการวางเลี้ยง Hilae และ Te-chato (2005) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการงอกของเอ็มบริโอระยะสร้างจาวในปาล์มน้ำมันพบว่าอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำการงอกได้ 40 เปอร์เซ็นต์ Krajnakova และคณะ (2008) ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร่วมกับการเติมผงถ่านต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอใน *Abies cephalonica* พบว่า อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 87.6 มิลลิโมลาร์ ส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ 66.8 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การลดองค์ประกอบของธาตุอาหารที่ใช้

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอในพืชได้หลายชนิด เช่น *Panax quinquefolius* L. ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (Feeney and Punja, 2003) ปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (Teixeira *et al*., 1995) เป็นต้น Guerra และ Handro (1998) อ้างโดย นภาพร (2548) พบว่า สามารถชักนำให้โซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ในอาหารแข็งสูตร ½ MS ทานตะวัน (2531) อ้างโดย นภาพร (2548) รายงานว่าโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการชักนำแคลลัสใบอ่อนปาล์มน้ำมันในอาหารสูตร ½ MS เติม NaH_2PO_4 เข้มข้น 170 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ในระยะเวลา 1-3 เดือน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน
2. เพื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 พืช

ใช้ FET ชักนำจากใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีอายุ 10 ปี จากสถานีวิจัยและฝึกภาคสนามเทพา คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพาะเลี้ยงและดูแลแคลลัสดังกล่าวบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ย้ายเลี้ยงทุก 1 เดือน เป็นเวลา 5 ปี (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 FET ชักนำจากใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีซึ่งวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)

1.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS และ Y_3

สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ จุลินทรีย์ ประกอบด้วย แอลกอฮอล์ 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์

- น้ำตาลซูโครส ซอร์บิทอล และกรดแอสคอร์บิค
- สารควบคุมการเจริญเติบโตประกอบด้วย NAA 2,4-D และ dicamba

2. อุปกรณ์การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องคนสารละลายพร้อมแท่งแม่เหล็ก
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- หม้อนึ่งความดันไอ
- ตู้อบไมโครเวฟ
- เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง เช่น จานเพาะเชื้อ ฟลาสก์ บีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร
- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยง

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- เครื่องเขย่าเลี้ยง
- ชุดเครื่องมือย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วย ปากคีบ และมีดผ่าตัด
- ปิเปตปลายตัดขนาด 5 มิลลิลิตร
- หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 5 มิลลิลิตร
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- กล้องถ่ายรูป

วิธีการวิจัย

1. ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำ FET น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม จากอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ อายุ 1 เดือน วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25×150 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารแข็งปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลอง โดยอาหารแข็งเป็นสูตร MS เติม 2,4-D หรือ dicamba เข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ปรับ pH เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 หลอดทดลอง วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกน้ำหนักสด จำนวน FET ที่สร้าง EC เฉลี่ยและ HE เฉลี่ยต่อหลอดทดลอง ในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely ramdomized design) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test)

2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำและการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

นำ FET น้ำหนัก 250 มิลลิกรัม จากอาหารแข็งสูตรที่ดีที่สุดของการทดลองที่ 1 คือ อาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ อายุ 1 เดือน วางเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ โดยใช้อาหารเหลว 2 สูตร คือ MS หรือ Y_3 แต่ละสูตรเติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ปรับ pH เป็น 5.7 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ฟลาสก์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์ (Packed cell volume : PCV) ทุก 3 วัน และเปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

3. ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญและพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

นำ FET ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร จากอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ อายุ 15 วัน วางเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์โดยอาหารเหลวเป็นสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA, 2,4-D หรือ dicamba แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ปรับ pH เป็น 5.7 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ฟลาสก์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์ทุก 3 วัน และเปรียบเทียบจำนวนกลุ่มเซลล์และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอของแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

4. ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

นำ FET ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร จากอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ อายุ 15 วัน วางเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ โดยอาหารเหลวเป็นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หรือน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ฟลาสก์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์ทุก 3 วัน และเปรียบเทียบจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อฟลาสก์ จากน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

5. ผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอจากเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นบนอาหารแข็ง

นำโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ผ่านการกรองแยกขนาด 1-2 มิลลิเมตร และดูดโซมาติกเอ็มบริโอขนาดดังกล่าวด้วยปิเปตปลายตัดขนาด 5 มิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ อายุ 15 วัน วางเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร บรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ ¼ MS ½ MS และ MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หรือ น้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปรับ pH เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 จานเพาะเลี้ยง วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกเปอร์เซ็นต์ของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

6. ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร่วมกับการเติมและไม่เติมผงถ่านต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันในอาหารเหลว และอาหารแข็ง

นำโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ผ่านการกรองแยกขนาด 1-2 มิลลิเมตร และดูดโซมาติกเอ็มบริโอขนาดดังกล่าวด้วยปิเปตปลายตัดขนาด 5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ อายุ 15 วัน วางเลี้ยงในอาหารเหลว หรืออาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.085 โมลาร์ หรือ 0.17 โมลาร์ ร่วมกับการเติมและไม่เติมผงถ่าน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (สำหรับอาหารแข็ง) นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีของอาหารเหลววางเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ฟลาสก์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที ในกรณีของอาหารแข็งวางเลี้ยงในขวดขนาด 8 ออนซ์ บรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อขวด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ขวดวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์ของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว หรือ

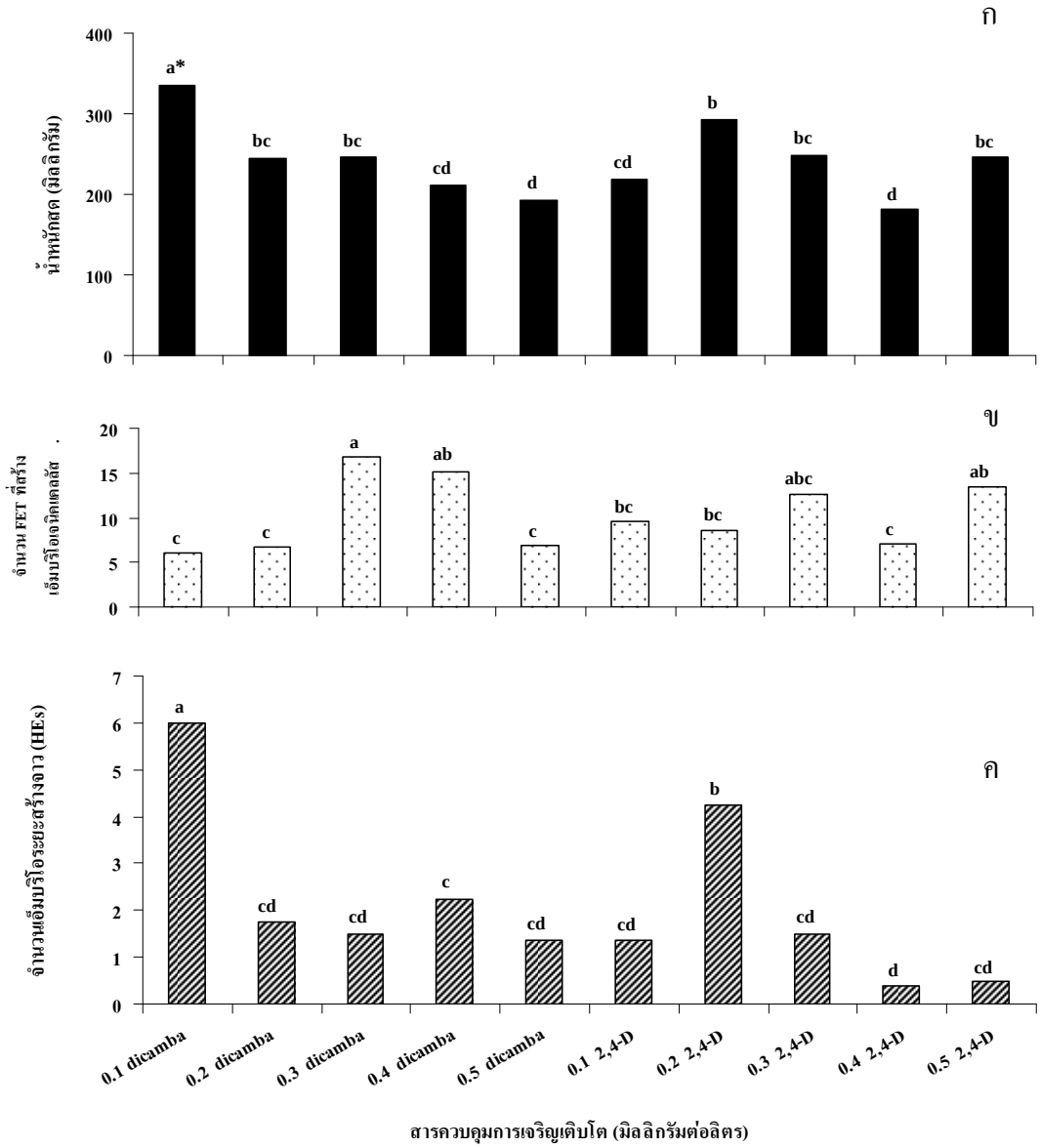
จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตร ต่อภาชนะวางเลี้ยง เปรียบเทียบกัน โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

บทที่ 3

ผล

1. ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

จากการเปรียบเทียบชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารแข็งสูตร MS ต่อการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของ FET พบว่า dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 336 มิลลิกรัม รองลงมาคือ 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัส 292 มิลลิกรัม ในขณะที่ 2,4-D เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสต่ำสุด 182 มิลลิกรัม แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 2ก) ในส่วนของจำนวน FET ที่สร้าง EC เฉลี่ย พบว่า dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวน EC เฉลี่ยสูงสุด 16.88 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง รองลงมาคือ dicamba เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวน EC เฉลี่ย 15.12 และ 13.50 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม ให้จำนวน EC เฉลี่ยต่ำสุดเพียง 6 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 2ข) ลักษณะของ EC ที่เกิดขึ้นมีโครงสร้างกลมขนาดเล็กและมีสีเหลือง (ภาพที่ 3ก) แต่ในสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2,4-D แคลลัสลักษณะกลม (NC) มีสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 3ข) และเมื่อพิจารณาถึงจำนวนของ HE ที่เกิดขึ้น พบว่า dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนของ HE เฉลี่ยสูงสุด 6 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง รองลงมาคือ 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนของ HE เฉลี่ย 4.25 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง ในขณะที่ 2,4-D เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนของ HE เฉลี่ยต่ำสุด 1.5 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง (ภาพที่ 2ค) ลักษณะของ HE ที่เกิดขึ้นมีโครงสร้างไม่แน่นอนและมีสีเขียว (ภาพที่ 3ค)



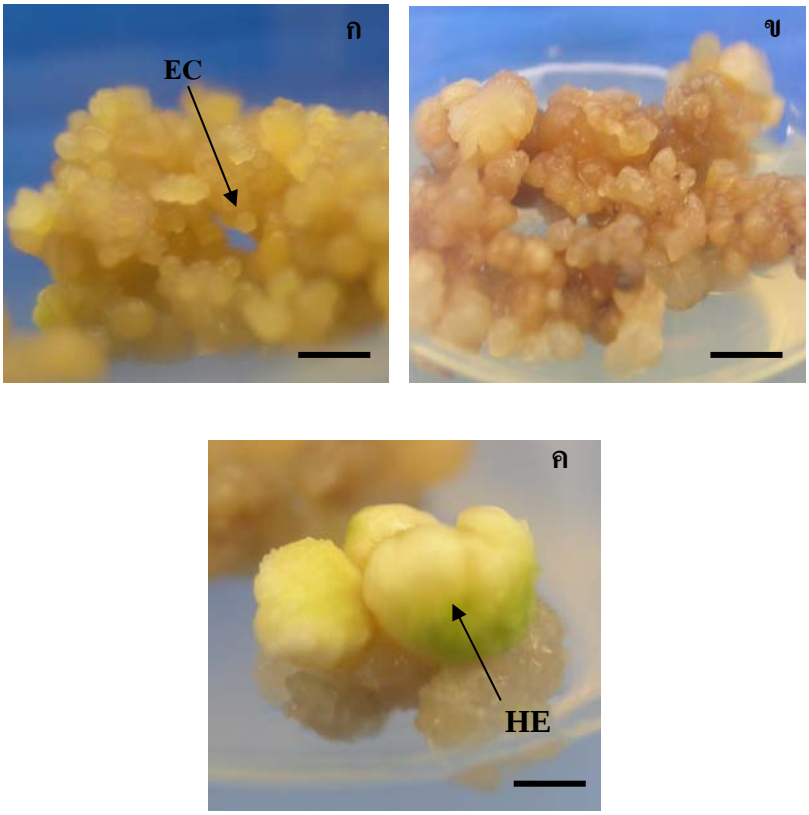
ภาพที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ก. น้ำหนักสดของแคลลัส (มิลลิกรัม)

ข. จำนวน FET ที่สร้าง EC (เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง)

ค. จำนวน HE เฉลี่ย (เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง)

*ค่าเฉลี่ยที่กำกับบนแท่งด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT



ภาพที่ 3 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสระยะรูปกลม และระยะสร้างจาวในอาหารแข็งสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

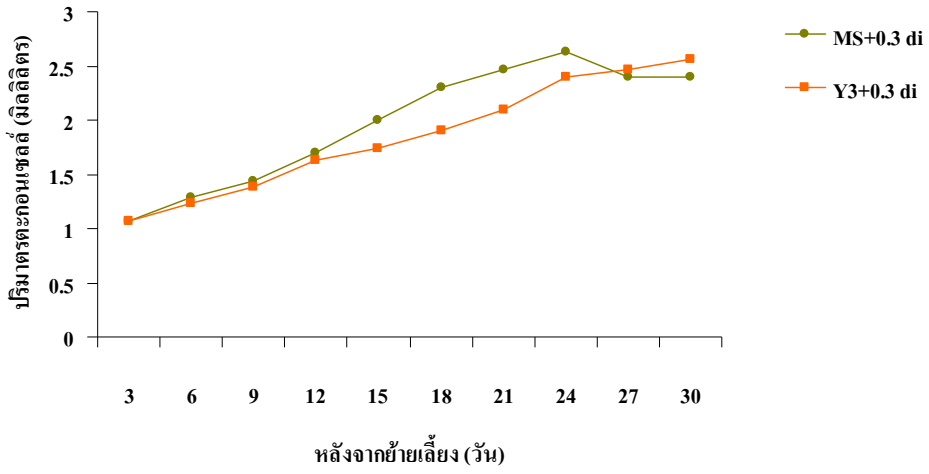
ก. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (EC) ในอาหารเติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ 3 มิลลิเมตร)

ข. แคลลัสลักษณะกลม (NC)ในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ 1 มิลลิเมตร)

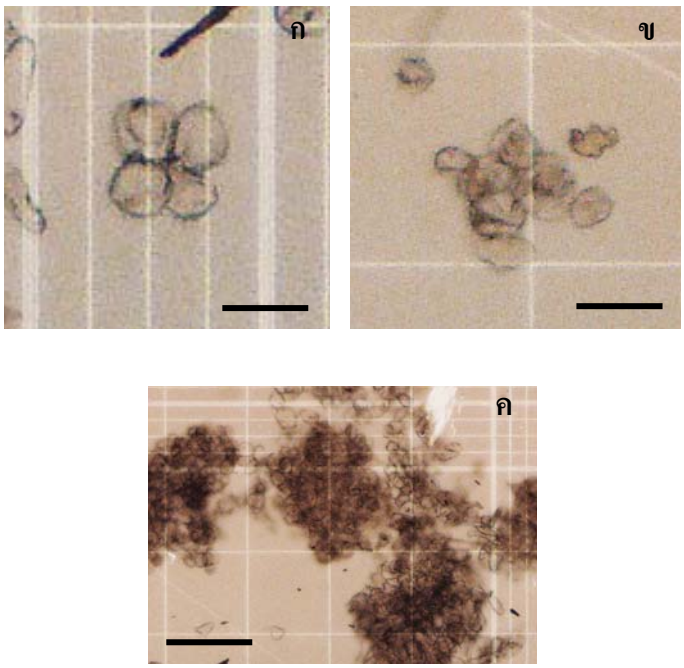
ค. เอ็มบริโอระยะสร้างจาว (HE)ในอาหารเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ 3 มิลลิเมตร)

2. ผลของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำและการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

จากการเปรียบเทียบอาหารเหลว 2 สูตร คือ MS และ Y_3 โดยแต่ละสูตรเติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 0.17 โมลาร์ ต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ของ FET หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารเหลวสูตร MS มีแนวโน้มเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้ดีกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 ในช่วงวันที่ 12-24 โดยปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.5 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 24 วัน (ภาพที่ 4) นอกจากนี้ตะกอนเซลล์จะปรากฏสีน้ำตาล หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 และ 21 วัน ในอาหารเหลวสูตร MS และ Y_3 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลล์ในกลุ่มเซลล์ สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้ คือ กลุ่มเซลล์ขนาดเล็กประกอบด้วยกลุ่มเซลล์จำนวนน้อยกว่า 5 เซลล์ (ภาพที่ 5ก) กลุ่มเซลล์ขนาดกลางประกอบด้วยกลุ่มเซลล์จำนวน 5-10 เซลล์ (ภาพที่ 5ข) และกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์จำนวนมากกว่า 10 เซลล์ (ภาพที่ 5ค) อาหารทั้ง 2 สูตร ให้กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีจำนวนเซลล์มากกว่า 10 เซลล์สูงที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหาร พบว่าอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่สูงสุด 121.68 กลุ่มเซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อาหารเหลวสูตร Y_3 ให้จำนวนกลุ่มเซลล์ดังกล่าวเพียง 50 กลุ่มเซลล์ต่อมิลลิลิตร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 4 ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร) ในอาหารเหลวสูตร MS และ Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 5 กลุ่มเซลล์ในอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

ก. กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (<5 เซลล์) (บาร์ 30 ไมโครเมตร)

ข. กลุ่มเซลล์ขนาดกลาง (5-10 เซลล์) (บาร์ 30 ไมโครเมตร)

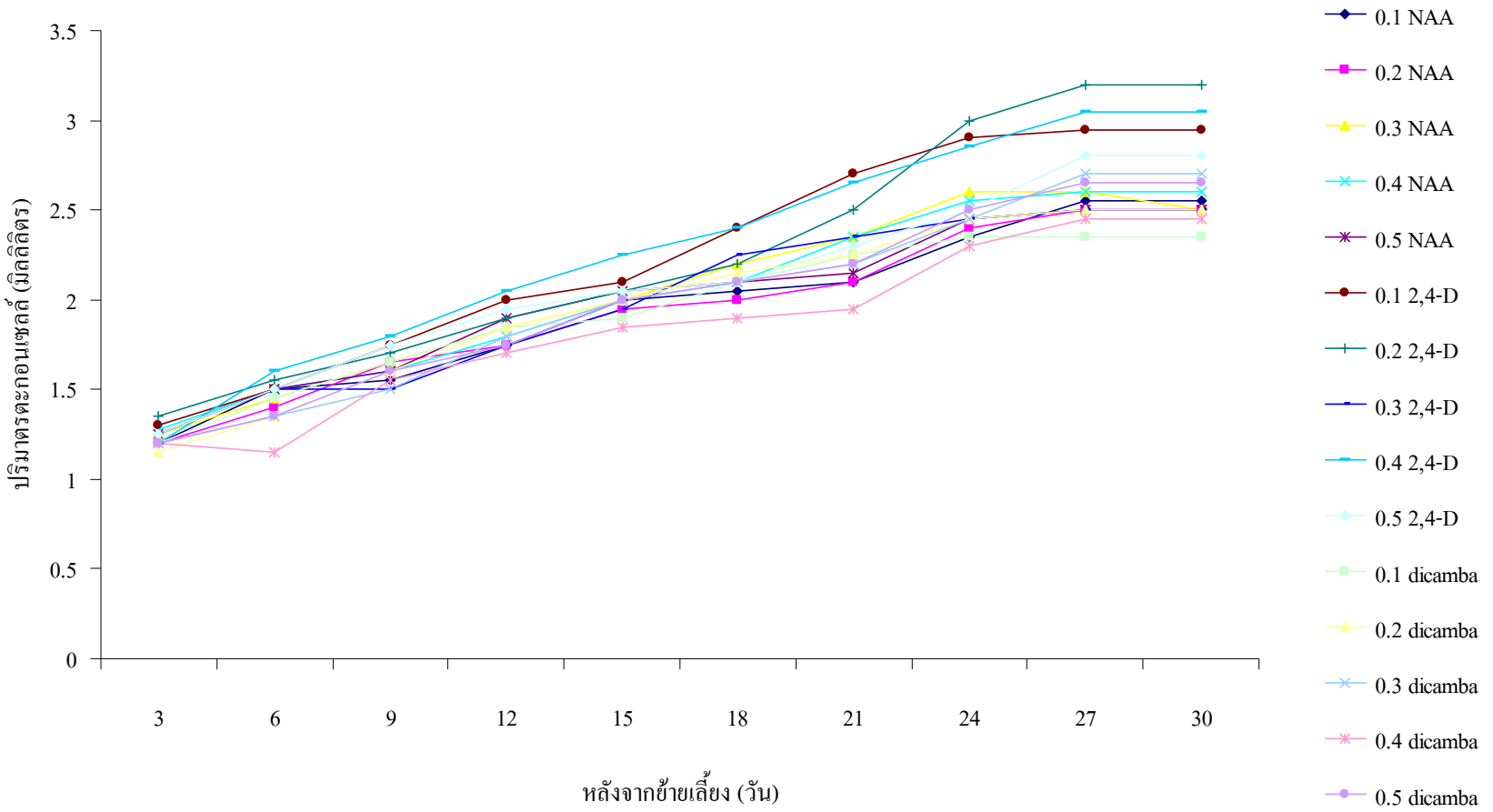
ค. กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ (>10 เซลล์) (บาร์ 100 ไมโครเมตร)

ตารางที่ 1 ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มจำนวนกลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ ในอาหารสูตร MS หรือ Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

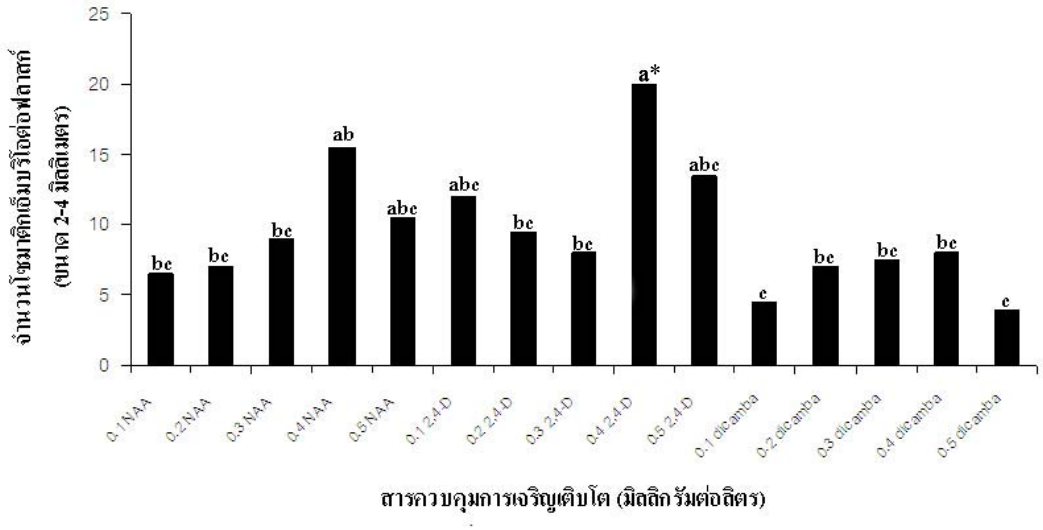
สูตรอาหาร	จำนวนกลุ่มเซลล์ต่อมิลลิลิตร		
	กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (< 5 เซลล์)	กลุ่มเซลล์ขนาดกลาง (5-10 เซลล์)	กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ (> 10 เซลล์)
MS	1.675	55.000	121.680
Y_3	0	45.000	50.000
$LSD_{.05}$	2.500	1.730	3.130
C.V.(%)	244.950	38.080	40.220

3. ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ของ FET หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน พบว่า 2,4-D เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงสุด 2.25 มิลลิลิตร รองลงมาคือ 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 2.10 มิลลิลิตร ในขณะที่ dicamba เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ต่ำสุดเพียง 1.85 มิลลิลิตร (ภาพที่ 6) ในส่วนของจำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยที่มีขนาด 2-4 มิลลิเมตร พบว่า 2,4-D เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด 20 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ รองลงมาคือ NAA เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 15.7 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 7) เมื่อพิจารณาจำนวนกลุ่มขนาดกลาง หรือกลุ่มเซลล์ที่มีเซลล์ 5-10 เซลล์ พบว่า ทุกชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ อย่างไรก็ตาม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่สูงสุด 106.6 กลุ่มเซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ 2,4-D เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนกลุ่มเซลล์ดังกล่าว 75 กลุ่มเซลล์ต่อมิลลิลิตร ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม ให้จำนวนกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ต่ำสุดเพียง 20 กลุ่มเซลล์ต่อมิลลิลิตร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 8) โดยขนาดของเซลล์ภายในกลุ่มเซลล์ที่มีจำนวนเซลล์ 5-10 เซลล์ใหญ่กว่าขนาดของเซลล์ในกลุ่มที่มีจำนวนเซลล์มากกว่า 10 เซลล์ (ภาพที่ 9ก และ ข)

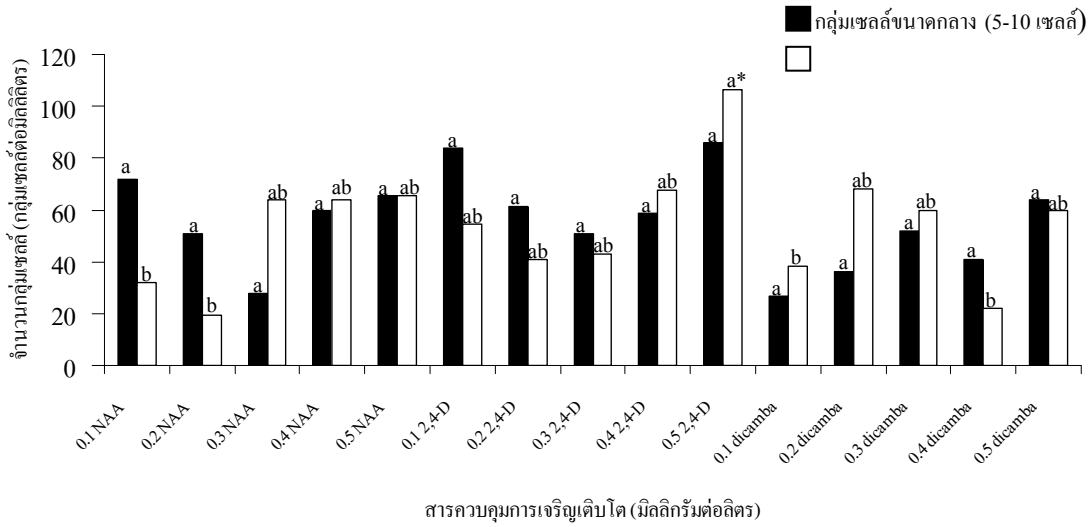


ภาพที่ 6 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



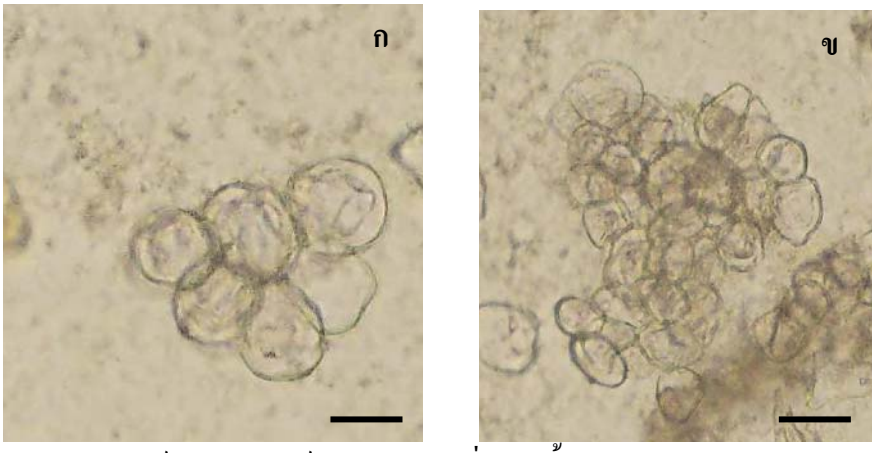
ภาพที่ 7 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 2-4 มิลลิเมตรเฉลี่ย ในอาหารเหลวสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

*ค่าเฉลี่ยที่กำกับแท่งด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT



ภาพที่ 8 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดออกซินในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ต่อการสร้างกลุ่มเซลล์ที่มีจำนวนเซลล์ 5-10 เซลล์ (■) และกลุ่มเซลล์ที่มีจำนวนเซลล์มากกว่า 10 เซลล์ (□) หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

*อักษรต่างกันที่กำกับบนแท่งภายในสีเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT



ภาพที่ 9 ขนาดของเซลล์ในกลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน (บาร์ 50 ไมโครเมตร)

ก. กลุ่มเซลล์ขนาดกลาง (5-10 เซลล์)

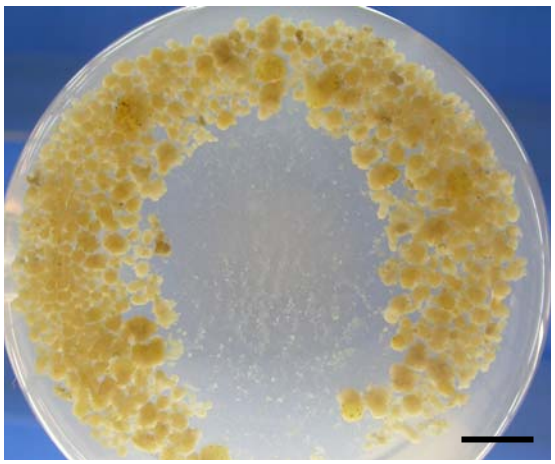
ข. กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ (>10เซลล์)

4. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

จากการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน 2 แหล่ง คือน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ และน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยที่มีขนาด 2 มิลลิเมตร จากการเพาะเลี้ยง FET เป็นเวลา 15 วัน พบว่า น้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยที่มีขนาด 2 มิลลิเมตรสูงกว่าน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ 4 เท่า (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร พบว่า น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด 3.33 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ ส่วนน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 1.67 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2) โซมาติกเอ็มบริโอทั้ง 2 ขนาดมีโครงสร้างกลมและมีสีเหลือง (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 2 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

แหล่งของคาร์บอน	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่มีขนาด (มิลลิเมตร)	
	2	3
ซูโครส	2.670	3.330
ซอร์บิทอล	11.330	1.670
$LSD_{.05}$	6.340	4.720
C.V. (%)	39.980	83.270



ภาพที่ 10 โซมาติกเอ็มบริโอมีโครงสร้างกลมและมีสีเหลืองในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน (บาร์ 6 มิลลิเมตร)

5. ผลของแหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอจากเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นบนอาหารแข็ง

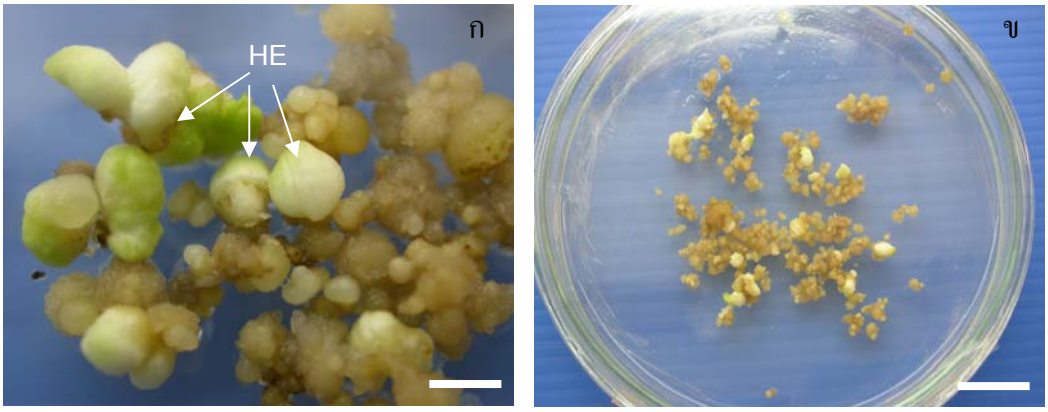
จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ผ่านการกรองแยกขนาด 1-2 มิลลิเมตร และดูดโซมาติกเอ็มบริโอขนาดดังกล่าวด้วยปิเปตปลายตัดขนาด 5 มิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ อายุ 15 วัน วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ ¼ MS ½ MS และ MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หรือ น้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารแข็งสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวได้สูงสุด 32 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) โดยโซมาติกเอ็มบริโอในระยะนี้มีลักษณะสีเขียว (ภาพที่ 11ก) รองลงมาคืออาหารสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวได้ 12.71 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 1-2 มิลลิเมตรที่มีลักษณะสีน้ำตาล (ภาพที่ 11ข) พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การสร้างสูงในทุกระดับความเข้มข้นของสูตรอาหาร แต่น้อยที่สุดบนอาหารสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอจากโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 1-2 มิลลิเมตรของปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ ¼ MS ½ MS และ MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ความเข้มข้นของสูตรอาหาร	แหล่งของคาร์บอน (โมลาร์)	เปอร์เซ็นต์ของโซมาติกเอ็มบริโอ (มิลลิเมตร)	
		1-2	HE
¼ MS	น้ำตาลซูโครส 0.170	94.150ab	1.270bc
	น้ำตาลซอร์บิทอล 0.200	95.000ab	0
½ MS	น้ำตาลซูโครส 0.170	83.890ab	12.710bc
	น้ำตาลซอร์บิทอล 0.200	65.500b	32.000a
MS	น้ำตาลซูโครส 0.170	94.620ab	4.020bc
	น้ำตาลซอร์บิทอล 0.200	98.160a	0.500c
	F-test	*	*
	C.V. (%)	11.460	138.680

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 11 โซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

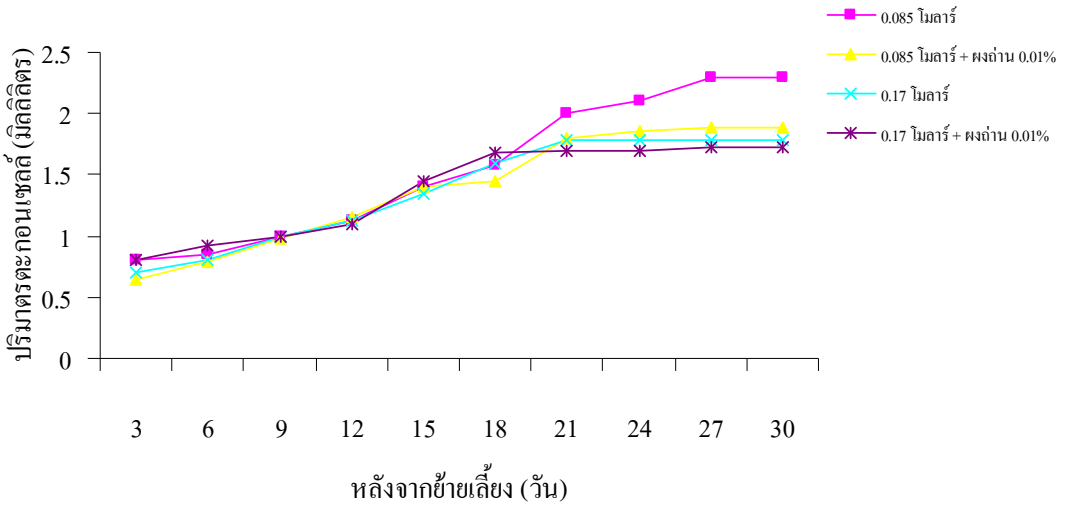
ก. โซมาติกเอ็มบริโอระยะ HE (บาร์ 4 มิลลิเมตร)

ข. โซมาติกเอ็มบริโอขนาด 1-2 มิลลิเมตร (บาร์ 6 มิลลิเมตร)

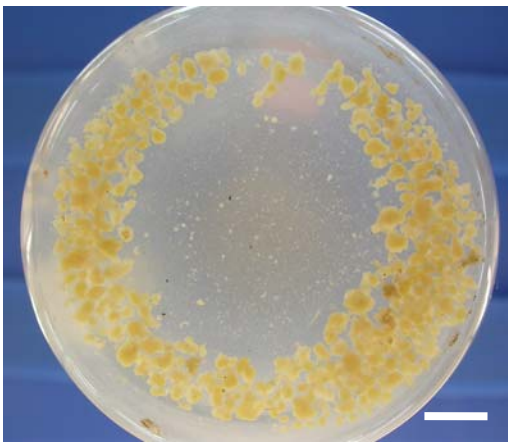
6. ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร่วมกับการเติมและไม่เติมผงถ่านต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลวและแข็ง

จากการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 2 ระดับ คือ 0.085 และ 0.17 โมลาร์ ร่วมกับการเติมและไม่เติมผงถ่าน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน พบว่า น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.085 โมลาร์ ที่ไม่เติมผงถ่าน สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงสุด 2 มิลลิลิตร ขณะที่น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.085 โมลาร์ เติมผงถ่าน 0.01 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ที่ไม่เติมผงถ่าน และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ เติมผงถ่าน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1.80 1.78 1.70 ตามลำดับ (ภาพที่ 12) เมื่อพิจารณาจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตร พบว่าน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ไม่เติมผงถ่าน และเติมผงถ่าน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 19 และ 18.25 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ ตามลำดับ ขณะที่น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.085 เติมผงถ่าน 0.01 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติมผงถ่าน ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 12.75 และ 10 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ (ตารางที่ 4) โดยโซมาติกเอ็มบริโอขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตร มีลักษณะกลมสีเหลือง (ภาพที่ 13)

เมื่อเปรียบเทียบอาหารแข็ง และเหลวสูตร MS ร่วมกับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ต่อการเพิ่มจำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตร พบว่า อาหารเหลว ทุกทรีตเมนท์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงกว่าอาหารแข็ง ซึ่งอาหารเหลวเติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ไม่เติมผงถ่าน และเติมผงถ่าน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 19 และ 18.25 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ ตามลำดับ ในขณะที่อาหารแข็งเติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.085 และ 0.17 โมลาร์ ร่วมกับผงถ่าน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยเพียง 4.5 และ 3 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 12 ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร่วมกับการเติมและไม่เติมผงถ่าน (0.01 เปอร์เซ็นต์) ต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร) ในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 13 โซมาติกเอ็มบริโอลักษณะกลมเหลืองขนาดต่าง ๆ ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ไม่เติมผงถ่าน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน (บาร์ 6 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 4 ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร่วมกับการเติมและไม่เติมผงถ่านต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวและแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

สภาพของอาหารสูตร MS	น้ำตาลซูโครส (โมลาร์)	ผงถ่าน (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตร (เอ็มบริโอต่อฟลาสก์)
อาหารเหลว	0.085	0	12.750b
	0.085	0.010	10.000b
	0.170	0	19.000a
	0.170	0.010	18.250a
อาหารแข็ง	0.085	0.010	4.500c
	0.170	0.010	3.000c
	F-test		*
	C.V. (%)		22.130

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

บทที่ 4

วิจารณ์

จากการเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมัน พบว่า dicamba มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสสูงกว่า 2,4-D โดยสังเกตได้จากอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัส (336 มิลลิกรัม) และจำนวน HE (6 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง) ได้สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Te-chato (1998) ที่สามารถชักนำการพัฒนาของ EC เข้าสู่ระยะ HE ของปาล์มน้ำมัน บนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจาก dicamba ส่งเสริมกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงในชั้น epidermis และชั้น subepidermis ในขณะที่ 2,4-D ส่งเสริมการแบ่งเซลล์เฉพาะในชั้น epidermis เช่นเดียวกับการทดลองของ Chehmalee และ Te-chato (2008) นอกจากนี้อาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิด EC ได้สูงสุด ในขณะที่ Chehmalee และ Te-chato (2008) รายงานว่าสามารถเพิ่มปริมาณ EC ได้สูง บนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำ FET ที่แตกต่างกันโดยการทดลองข้างต้นใช้ชิ้นส่วนเอ็มบริโอ ในขณะที่การศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D พบว่า แคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีสีน้ำตาลเข้ม อาจเนื่องจาก 2,4-D ส่งเสริมให้แคลลัสดังกล่าวสร้างสารประกอบฟีนอล เช่นเดียวกับรายงานของ de Touchet และคณะ (1991) ที่เปรียบเทียบ 2,4-D จำนวน 4 ระดับความเข้มข้น คือ 80 100 150 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลง พบว่า 2,4-D เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นได้สูงสุด 4 เท่าหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ในขณะที่ 2,4-D เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นได้เพียง 2 เท่า และเซลล์พืชรวมทั้งอาหารเหลวปรากฏสีน้ำตาล เนื่องจากเซลล์พืชเกิดความเครียดจาก 2,4-D ความเข้มข้นสูงจึงสร้างสารประกอบฟีนอล

จากการเปรียบเทียบอาหารเหลว 2 สูตรคือ MS และ Y_3 ต่อการชักนำและการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน โดยแต่ละสูตรเติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน พบว่า อาหารเหลวสูตร MS สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ รวมทั้งให้จำนวนกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีเซลล์มากกว่า 10 เซลล์ได้สูงกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 เนื่องจากอาหารเหลวสูตร MS มีองค์ประกอบของไนโตรเจนสูง ซึ่งส่งเสริมการพัฒนาของเซลล์พืชเช่นเดียวกับ Thiruvengadam และคณะ (2006) ที่รายงานอิทธิพลระดับไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ ว่ามีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ โดยอาหารเหลวสูตร MS มีระดับไนโตรเจนสูงกว่า Y_3 จึงส่งผลให้อาหารเหลวสูตร MS สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 อย่างไรก็ตาม Teixeira และคณะ (1995) รายงานว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 ให้ผลตอบสนองที่ดีต่อกระบวนการพัฒนาของเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ต่าง ๆ จากรายงานข้างต้นอาจเป็นผลจากแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามอาหารเหลวสูตร MS ส่งเสริมการสร้างสารประกอบฟีนอลในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเร็วกว่า อาหารเหลวสูตร Y_3 เนื่องจากอาหารเหลวสูตร MS มีส่วนประกอบของกรดอะมิโนสูงกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 ซึ่งกรดอะมิโนมีผลต่อการผลิตสารประกอบฟีนอลภายในเซลล์พืช สอดคล้องกับรายงานของ Zaid (1987) ซึ่งพบว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ความสมดุลขององค์ประกอบของธาตุอาหารรวมทั้งความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ ปัจจัยหลักในการส่งเสริมให้เซลล์พืชผลิตสารประกอบฟีนอล ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออินทผลัม

จากการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ในอาหารเหลวสูตร MS ต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ พบว่า 2,4-D เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงสุด 2.25 มิลลิลิตร และมีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยที่มีขนาด 2-4 มิลลิเมตรได้สูงสุด 20 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ สอดคล้องกับรายงานของ Thiruvengadam และคณะ (2006) ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นและชักนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะกลมของ *Momordica charantia* L ได้ในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Yu และคณะ (2007) สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะกลมจากเซลล์ซัสเพนชั่นของ *Populus tremuloides* × *P.*ได้ในอาหารเหลวสูตร MS แต่ต้องใช้ 2,4-D ความเข้มข้นสูงถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจาก 2,4-D คือสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์ภายในเนื้อเยื่อพืช จึงส่งเสริมกระบวนการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ (Jimenez and Thomas, 2005) ในการศึกษานี้ยังพบว่า 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ (ที่มีเซลล์มากกว่า 10 เซลล์) 67.5 กลุ่มเซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็น

เวลา 15 วัน สอดคล้องกับรายงานของ de Touchet และคณะ (1991) ที่สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ หรือกลุ่มเซลล์ที่มีกิจกรรมสูงของปาล์มน้ำมัน ในอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม 2,4-D ความเข้มข้นสูง ส่งเสริมให้เซลล์พืชสร้างสารประกอบฟีนอล (Zaid, 1987; de Touchet *et al*., 1991) และอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่นเดียวกับรายงานของ Teixeira และคณะ (1995) ที่ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อการเจริญพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมัน พบว่า 2,4-D ระดับความเข้มข้นสูง ให้ต้นที่มีลักษณะผิดปกติ เมื่อพิจารณาสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ dicamba พบว่า ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์และจำนวนกลุ่มเซลล์ที่มีจำนวนเซลล์มากกว่า 10 เซลล์ค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ ซูไฮมิน (2551) ซึ่งทำการศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของออกซินต่อการชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน พบว่า อาหารแข็งสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตรให้แคลลัส 60 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องจาก NAA มีผลต่อกิจกรรมการแบ่งเซลล์ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่าระดับที่ทำการศึกษา

จากการเปรียบเทียบแหล่งของคาร์บอน 2 แหล่งคือ น้ำตาลซูโครส และ น้ำตาลซอร์บิทอล ต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ ในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน พบว่า น้ำตาลซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 2 มิลลิเมตร ได้สูงกว่าน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ สอดคล้องกับรายงาน Hilae และ Te-chato (2005) สามารถชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอระยะ HE ขนาด 0.5 เซนติเมตรของปาล์มน้ำมันได้ 40 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เนื่องจากน้ำตาลซอร์บิทอล เป็นสาเหตุหลักของการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนภายในเซลล์ส่งผลให้เซลล์พืชเกิดสภาวะเครียดน้ำ จึงช่วยเร่งกระบวนการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในการเพาะเลี้ยงแคลลัสปาล์มน้ำมัน (de Touchet *et al*., 1991) นอกจากนี้ น้ำตาลซอร์บิทอลสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 จาก HE ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันได้ (Chehmalee and Te-chato, 2008) Te-chato และ Hilae (2007) รายงานว่าซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ส่งเสริมการพัฒนาของเอ็มบริโอสู่ระยะ HE อย่างไรก็ตามจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 3 มิลลิเมตร ที่พัฒนาในอาหารที่เติมคาร์บอนจากทั้ง 2 แหล่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สอดคล้องกับรายงานของ Hilae และ Te-chato (2005) ที่ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 ในการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอระยะ HE พบว่า น้ำตาลกลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส และ ซอร์บิทอล ให้การพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 โดยจำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอในแต่ละชนิดของแหล่งคาร์บอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การลดองค์ประกอบของธาตุอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถกระตุ้นให้เซลล์พืชเกิดความเครียด ส่งผลให้ภายในเซลล์พืชมีการสะสมคาร์โบไฮเดรต และโปรตีน จึงทำให้กระบวนการพัฒนาของเซลล์พืชเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยจากการศึกษาครั้งนี้ ศึกษาการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ ภายในอาหารที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารร่วมกับการเปรียบเทียบแหล่งของคาร์บอน 2 แหล่ง คือ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ และน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พบว่าอาหารแข็งสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอระยะ HE สูงสุด เหตุที่อาหารที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างจาวสูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ อาจเนื่องจากเซลล์พืชเกิดความเครียดจากการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารจึงส่งเสริมกระบวนการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ ซึ่งสอดคล้องกับ Teixeira และคณะ (1995) สามารถชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันได้ 18.1 เปอร์เซ็นต์บนอาหารแข็งสูตร ½ MS อย่างไรก็ตาม อาสลัน (2545) รายงานว่าการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตให้ผลดีกว่าอาหารแข็งสูตร ½ MS ความแตกต่างนี้อาจเนื่องจากแหล่งที่มาของโซมาติกเอ็มบริโอที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบแหล่งของคาร์บอนในอาหารสูตร ½ MS พบว่า น้ำตาลซอร์บิทอลให้เปอร์เซ็นต์การพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวได้ดีกว่าน้ำตาลซูโครส เนื่องจากน้ำตาลซอร์บิทอลมีคุณสมบัติเพิ่มค่าออสโมติกโพเทนเชียลในอาหาร ซึ่งส่งเสริมให้เซลล์พืชมีการสะสมกรดอะมิโน และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น ทำให้โซมาติกเอ็มบริโอสามารถเจริญและพัฒนาเข้าสู่ระยะสุกแก่ได้สูง (Heng *et al*., 1999) ดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้นเช่นเดียวกับ Hilae และ Te-chato (2005) ที่สามารถชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวของปาล์มน้ำมันได้ 40 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์

การพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ เกิดขึ้นจากหลายปัจจัย เช่น แหล่งของคาร์บอน ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส การเติมหรือไม่เติมผงถ่าน รวมทั้งประเภทของอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จากการทดลองที่ 5 พบว่าแหล่งของคาร์บอนที่สามารถให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 3 มิลลิเมตรเฉลี่ยสูงสุด คือ น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ในอาหารเหลวสูตร MS ดังนั้นการทดลองจึงทำการลดความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสลงครึ่งหนึ่งร่วมกับการเติมและไม่เติมผงถ่าน ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.085 โมลาร์ ที่ไม่เติมผงถ่าน สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงสุด เช่นเดียวกับ Krajnakova และคณะ (2009) ที่ลดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนลง สามารถชักนำการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของ *Abie cephalonica* ได้ 66.8 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ไม่เติมผงถ่าน ให้จำนวนโซมาติก

เอ็มบริโอเฉลี่ยที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตรสูงสุด สอดคล้องกับรายงานของ Hilae และ Te-chato (2005) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมัน ซึ่งพบว่าน้ำตาลซูโครส กลูโคส และซอร์บิทอล สามารถส่งเสริมกระบวนการพัฒนาของโซมาติกได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้การเติมหรือไม่เติมผงถ่าน ไม่มีผลทางสถิติต่อการชักนำการพัฒนาของเอ็มบริโอ ทั้งนี้อาจเนื่องจากระดับความเข้มข้นของผงถ่านที่ต่ำเกินไป โดยทั่วไปการเติมผงถ่านลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อชักนำการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ จะเติมผงถ่านที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (นภาพร, 2548) Feeney และ Punja (2003) สามารถเพิ่มอัตราการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอใน *Panax quinquefolius* L. บนอาหารเหลวสูตร ½ MS เติมผงถ่าน 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผงถ่านมีคุณสมบัติในการดูดสารพิษที่ถูกผลิตขึ้นมาระหว่างกระบวนการแมทาบอลิซึมของเซลล์พืช และส่งเสริมการทำงานของสารควบคุมการเจริญเติบโต (สมปอง, 2539) ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของผงถ่านเพื่อช่วยในการดูดซับสารกลุ่มฟีนอลที่พืชสร้างขึ้น เพื่อส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบประเภทของอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน พบว่าอาหารเหลวสามารถเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตรได้สูงกว่าอาหารแข็ง เนื่องจากโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารแข็งมีโอกาสสัมผัสกับอาหารเพาะเลี้ยงได้น้อยกว่าอาหารเหลว ความสามารถในการดูดซึมธาตุอาหารจึงต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลว (นภาพร, 2548)

บทที่ 5

สรุป

อาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัส (336 มิลลิกรัม) และจำนวน HE (6 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง) ได้สูงสุด และอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้าง EC ได้สูงสุด 16.88 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

อาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์รวมทั้งให้จำนวนกลุ่มเซลล์ที่มีเซลล์มากกว่า 10 เซลล์ได้สูงกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

อาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงสุด 2.25 มิลลิลิตร และมีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยที่มีขนาด 2-4 มิลลิเมตรได้สูงสุด 20 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

อาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ ส่งเสริมการสร้างกลุ่มเซลล์ที่มีเซลล์มากกว่า 10 เซลล์ 67.5 กลุ่มเซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 2 มิลลิเมตรได้สูงสุด 11.33 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.085 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติมผงถ่าน สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงสุด 2 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน

อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติมผงถ่าน ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตรเฉลี่ยสูงสุด 19 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

อาหารแข็งสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอระยะ HE สูงสุด 32 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและอวัยวะพืช. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ซูไฮมิน เจ๊ะมะลี. 2551. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราโดยการเพาะเลี้ยงคัพภะ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

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

นภาพร นาคอุดม. 2548. การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2549. ผู้ยิ่งใหญ่แห่งปาล์มน้ำมัน. ว. เคหะการเกษตร 30: 76-98.

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

สมปอง เตชะโต. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันใช้เพื่อการขยายพันธุ์ได้จริงหรือ: กรณีการวิจัยที่ผ่านมา. ว. สงขลานครินทร์ (ฉบับพิเศษ) : ปาล์มน้ำมัน 23: 753-761.

สมปอง เตชะโต. 2550. บทปฏิบัติการรายวิชาเทคโนโลยีเซลล์พืช. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

Chehmalee, S. and Te-chato, S. 2008. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of Oil palm. Journal of Agricultural Technology 4: 137-146.

Davies, M. E. 1972. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. Planta 104: 50-65.

de Touchet, B., Duval, Y. and Pannetier, C. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Plant Cell Reports 10: 529-532.

Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconus palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum 36: 8-23.

Eeuwens, C. J. 1978. Effects of organic nutrient and hormones on growth and development of tissue explants from coconus (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *invitro*. Physiologia Plantarum 15: 97-473.

Feeney, M. and Punja, Z. K. 2003. Production of somatic embryos of American Ginseng in suspension culture and regeneration of plantlets. Acta Horticulturae 625: 225-231.

George, E. F. and Sherrington, P. D. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. UK: Eversley, Exegetics Ltd.

Heng, L. W., Ping, D. L., Li, F. L. and Jong, C. S. 1999. Effect of sorbitol induce osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension culture. Botanical Studies An International Journal 40: 219-225.

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

Jimenez, V. M. and Thomas, C. 2005. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. Plant Cell Monogram 10: 103-118.

Kanchanapoom, K. and Tinnongjig, S. 2001. Histology of embryoid development in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cell suspension culture. Songklanakarin Journal of Science and Technology 23: 643-648.

Krajnakova, J., Hely, H. and Dusan, G. 2009. Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 96: 251-262.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-479.

Rajanaidu, N., Rohani, O. and Jalani, S. 1997. Oil palm clone: current status and prospects for commercial production. The Planter 73: 163-184.

Rohani, O., Sharifah, S. A., Mohd, R. Y., Ong, M., Tarmizi, A. H. and Zamzuri, I. 2001. Tissue culture of oil palm. *In* Advances in Oil Palm Research. (eds. B. Yusof, B. S. Jalani and K. W. Chan) Vol. I, pp. 238-283. Perpustakaan Negara : SMART Print & Stationer Sdn. Bhd.

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

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

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

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

Teixeira, J. B., Sondahl, M. R. and Kirby, E. G. 2004. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 13: 247-250.

Thiruvengadam, M., Mohamed, V. S., Yang, V. H. and Jayabalan, N. 2006. Development of an embryogenic suspension culture of bitter melon (*Momordica charantia* L.). Scientia Horticulturae 109: 123-129.

Yu, Z. S. Zhang, Z. Y., Lun, J. M., Hu, C. F., Cheng, Z. and Wang, Z. L. 2005. Somatic embryogenesis from cell Suspension cultures of aspen clone. Forestry Studies in China 7:3.

Zaid, A. 1987. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures. Acta Horticulturae 212: 561-566.

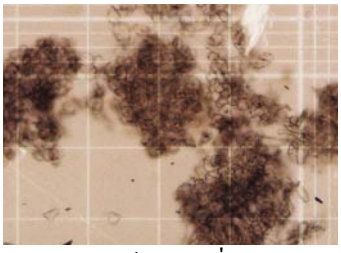
ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) และ Y_3

องค์ประกอบ	ปริมาณสารที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร.)	
	MS	Y_3
NH_4NO_3	1,650.000	-
KNO_3	1,900.000	2,020.000
H_3BO_3	6.200	3.100
KI	0.830	8.300
NH_4Cl	-	535.000
$MnSO_4 1H_2O$	16.900	11.200
KH_2PO_4	170.000	-
KCl	-	1,492.000
$NaH_2PO_4H_2O$	-	312.000
$ZnSO_4 7H_2O$	10.600	7.200
$CuSO_4 5H_2O$*	0.0250	0.160
$NaMoO_4 2H_2O$*	0.250	0.240
$CoCl_2 6H_2O$*	0.0250	0.240
$CaCl_2 2H_2O$	440.000	294.000
$MgSO_4 7H_2O$	370.000	247.000
$FeSO_4 7H_2O$	27.800	27.800
Na_2EDTA	37.300	37.300
Myo-inositol	100.000	-
Nicotinic acid	0.500	-
PyridoxineHCl(B6)	0.500	-
ThiamineHCl(B1)	0.100	-
Glycine	2.000	-
Sucrose 3%, Agar 0.6-0.7% (0.75%), pH 5.7-5.8		

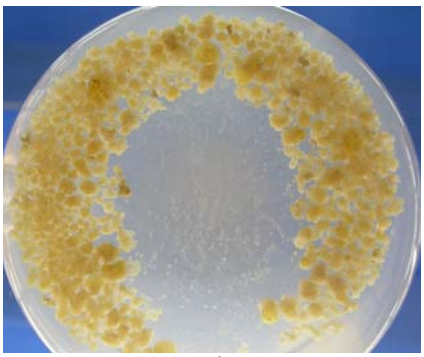
FET เริ่มต้นจาก MS+dicamba 0.3 มก/ล

MS+dicamba 0.3 มก/ล ⬇ 1 เดือน



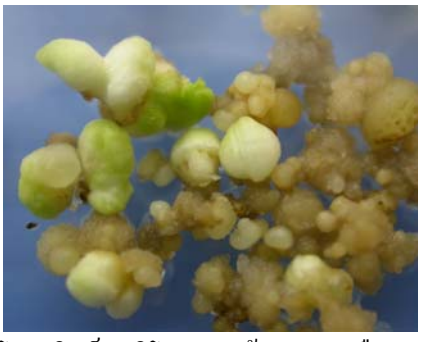
เซลล์ซัสเพนชั่น

MS + น้ำตาลซูโครส 0.17 โมลาร์ ⬇ 15 วัน



โซมาติกเอ็มบริโอ

½ MS+น้ำตาลซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ + วุ้น 0.75% ⬇ 15 วัน



โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (1 เดือน)

ภาพภาคผนวกที่ 1 ขั้นตอนการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นและพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวของปาล์มน้ำมัน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวเพ็ญติมาส กระมุท

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010620020

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2548

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์ สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์