ปัจจัยทางกายภาพ และเคมีต่อการเจริญ และพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน

Physical and Chemical Factors Affecting Growth and Development of Embryogenic Callus of Oil Palm

กาญจนี ทองเทพ

Kanjanee Tongtape

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
2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ปัจจัยทางกายภาพ และเคมีต่อการเจริญ และพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นางสาวกาญจนี ทองเทพ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

…….ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)

…….....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

……กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ วงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ปัจจัยทางกายภาพ และเคมีต่อการเจริญ และพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน
ผู้เขียน นางสาวกาญจนี ทองเทพ
สาขาวิชา พืชศาสตร์
ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

จากการศึกษาปัจจัยทางเคมี คือ ระดับความเข้มข้นของ dicamba ชนิดและความเข้มข้นของ สารเคมีออสโมติคั ม และปัจจัยทางกายภาพ คือ การสร้างบาดแผล ต่อการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน พบว่า dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิต ร ที่เติมใน อาหารแข็งสูตร MS ให้การเจริญของ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด เฉลี่ย 28.2 มิลลิเมตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน ซึ่งเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดังกล่าวมีลักษณะเกาะกันแน่น และมีลักษณะคล้ายราก ส่วน dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะของเอ็มบริโ อเจนิคแคลลัสเกาะกันอย่างหลวม เมื่อศึกษา สารเคมีออสโมติคั ม พบว่า ซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้การเจริญ และพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส มีขนาดเฉลี่ย 12.1 มิลลิเมตร การสร้างบาดบาดโดยใช้ใบมีด ร่วมกับการใช้คลื่นเสียง (sonication) เป็นเวลา 30 นาที วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสขนาด 16.9 มิลลิเมตร การใช้ปัจจัยในการเพาะเลี้ยง 3 ปัจจัย (สร้างบาดแผลโดยใช้ใบมีดร่วมกับ sonication เป็นเวลา 30 นาที วางเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์) ให้การเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส มีขนาดเฉลี่ย 34.3 มิลลิเมตร เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ให้ปัจจัยทางกายภาพและเคมีข้างต้นด้วยวิธีการ Flow cytometry พบว่า ในทุกชุดการทดลองมีระดับพลอยดีปกติไม่มีการเปลี่ยนแปลง

Thesis Title	Physical and Chemical Factors Affecting Growth and Development of Embryogenic Callus of Oil Palm
Author	Miss Kanjanee Tongtape
Major Program	Plant Science
Academic Year	2010

ABSTRACT

Factors affecting growth and development of embryogenic callus of oil palm, including physical and chemical factors were investigated. Growth and development of embryogenic callus of oil palm were influenced by a number of factors such as concentrations of dicamba, kinds and concentrations of alcohol sugar and wounding treatments. Dicamba at concentration 0.1 mg/l containing MS medium gave the highest size average of embryogenic callus at 28.2 mm after 21 days of culture. The characteristics of embryogenic callus was compact, root-like callus and light yellow while the calli obtained from 1.0 mg/l was friable and yellow. As regards the concentrations of alcohol sugar, 0.2 M sorbitol provided the highest average size of embryogenic callus at 12.1 mm. With regard to the wounding treatment, chopping embryogenic callus together with sonication for 30 minutes followed by culturing on MS medium supplemented with 1.0 mg/l dicamba gave the best result in average size of embryogenic callus at 16.9 mm. The combination of those three factors (1 mg/l dicamba, wound treatment by chopping and sonicate for 30 minutes and 0.2 M sorbitol) gave the highest average size of embryogenic callus at 34.3 mm. There was no evidence of any alteration in ploidy level after evaluating the embryogenic callus.

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(10)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	15
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	16
วัสดุ อุปกรณ์	16
วิธีการวิจัย	19
3 ผล	23
4 วิจารณ์	35
5 สรุป	40
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	48
ประวัติผู้เขียน	49

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของการสร้างบาดแผลโดยใช้ใบมีดต่อขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส	27

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : ช่วงเวลาและอัตราความสำเร็จ	5
2	รูปแบบกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิ สทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยต้นอ่อนที่พัฒนาจากเซลล์เดียวมีการสร้างเซลล์คล้ายซัสเพนเซอร์เชื่อมกัน ในขณะที่ต้นอ่อนที่พัฒนาจากหลายเซลล์เกิดจากการรวมกันของเซลล์เดิม	12
3	โนดูลาร์แคลลัส ที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงไซโกติกเอ็มบริโอ บนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์	16
4	เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ระดับพลอยดีของเซลล์พืชเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์	18
5	ผลของความเข้มข้นของ dicamba ต่อการเจริญ (ขนาด) ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	24
6	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีลักษณะ คล้ายราก จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน (บาร์: 2.25 มิลลิเมตร)	24
7	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารแข็งสูตร MS เติมความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 7.5 มิลลิเมตร)	25

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	ผลของชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาล โดยวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม ซอร์บิทอล แมนนิทอล และ PEG ความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 โมลาร์ ต่อการเจริญ (ขนาด) ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	26
9	ลักษณะของเอ็ มบริโอเจนิคแคลลัสหลังจากสร้างบา ดแผลโดยใช้ใบมีดโกน แล้วเพาะ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลา 21 วัน (บาร์ 7.5 มิลลิเมตร)	28
10	ผลของการสร้างบาดแผลด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา ต่าง ๆ ต่อการเจริญเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์	29
11	ผลของการสร้างบาดแผลด้วยวิธีการต่าง ๆ ต่อเอ็มบ ริโอเจนิคแคลลัส ในอาหารแข็ง สูตร MS เติม dicanba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่ อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์	30
12	การเจริญของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่วางเลี้ย งบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรั มต่อลิตร เติม ซอร์บิทอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้การสร้างบาดแผลโดยวิธีการใช้ใบมีด และโซนิเคเตอร์	32
13	ระดับพลอยดีของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพิ่มปริมาณหลังจากได้รับปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางกายภาพ	34

สัญลักษณ์ คำย่อและตัวย่อ

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2iP	=	N^6-(2-isopentenyl) adenine
BA	=	6-benzyladenine
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan's multiple range test
dicamba	=	3,6-Dichloro-2-methoxybenzoic acid
EC	=	Embryogenic callus
HE	=	Haustorium embryo
LSD	=	Least significant difference
MS	=	Murashige and Skoog medium
NAA	=	α-naphthaleneacetic acid
piclolam	=	Amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid
PVP	=	Polyvinylpyrrolidone
Y_3	=	Eeuwens medium
TDZ	=	Thidiazuron

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในระดับโลก ทั้งนี้เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันชนิดเดียวที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่มากกว่าพืชน้ำมันอื่นๆ ทุกชนิด ซึ่งให้ผลผลิตน้ำมันดิบเฉลี่ย 4-5 ตัน/เฮกตาร์ และอาจเพิ่มขึ้นสูงถึง 7-8 ตัน/เฮกตาร์ (Biofuel, 2007) ปัจจุบันแหล่งผลิตปาล์มน้ำมันหลักของโลกคือ ประเทศมาเลเซีย คิดเป็นประมาณ 48% ของการผลิตทั่วโลก ผลผลิตปาล์มน้ำมันเฉลี่ยอยู่ที่ 3.7 ตัน/เฮกตาร์/ปี ซึ่งมากกว่าพืชตระกูล ถั่วเหลือง 2.5 เท่า และมากกว่ากะหล่ำ 7 เท่า ดังนั้น การเพาะปลูกปา ล์มน้ำมันสามารถเพิ่มความต้องการผลผลิตที่สูงขึ้นได้ในพื้นที่ทำการเกษตรที่มีอย่างจำกัด (Malaysia's Sustainable Palm Oil, 2007) การผลิต ปาล์มน้ำมัน ของประเทศไทยนับว่ามีน้อย ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ได้รับการส่งเสริมให้ปลูกเป็นการค้าเฉพาะในภาคใต้ จากพื้นที่ปาล์มน้ำมันที่สามารถให้ผลผลิตแล้ว 833,000 ไร่ ในปี พ.ศ. 2536 เพิ่มขึ้นเป็น 1.6 ล้านไร่ ในปี พ.ศ. 2545 มีมูลค่าที่เกษตรกรขายได้ 9,202 ล้านบาท และมีปริมาณการส่งออกที่สูงขึ้นถึง 177,417 ตัน คิดเป็นมูลค่ า 4,202 ล้านบาท ในปี พ .ศ.2547 (พรชัย, 2549) รัฐบาลได้ประกาศขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 10 ล้านไร่ ภายใน 25 ปี (พ.ศ. 2547-พ.ศ.2572) (ธีระ และคณะ, 2548) นอกจากนี้ยังกำหนดยุท ธศาสตร์พลังงานทดแทนโดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นวาระแห่งชาติไปแล้ว ซึ่งรัฐบาลโดยกระทรวงพลังงานมีเป้าหมายให้ใช้ ไบโอดีเซล 3% ของการใช้น้ำมันดีเซลทั้งหมดในปี พ.ศ. 2554 (พรชัย, 2549) ดังนั้นจึงมีการขยายพื้นที่การปลูกของเกษตรกรรายย่อยอย่างจริงจัง

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชยืนต้นผสมข้ามประเภทที่มีช่อดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน แต่ช่วงเวลาการออกดอกไม่พร้อมกัน เป็นพืชดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=32 พืชชนิดนี้จัดอยู่ในสกุล *Elaeis* ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ *Elaeis guineensis E. oleifera* และ *E. odora* โดยปาล์มน้ำมันชนิด *E. guineensis* เป็นชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน สายพันธุ์ของปาล์มน้ำมันชนิดนี้สามารถจำแนกได้ 3 แบบ (types) คือ แบบดูรา (Dura) ผลมีกะลาหนาควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ แบบพิสิเฟอรา (Pisifera) ผลที่ไม่มีกะลาหรือมีแต่บางมากควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ และแบบเทเนอรา (Tenera) ผลที่มีกะลาบาง ควบคุมด้วยยีนพันธุ์ทาง 1 คู่ เกิดจากการผสมระหว่างดูรากั บพิสิเฟอรา มีเปลือกสำหรับอัดน้ำมันมาก และให้

เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง (บุษบา, 2548) อย่างไรก็ตาม การถ่ายทอดลักษณะของพันธุ์ดูรา และพิสิเฟอรา เป็นลักษณะข่มไม่ส มบูรณ์ ทำให้เมล็ดจากโคนต้นปาล์ม มีความแปรปรวนสูงมาก โดยเฉพาะลักษณะของผลปาล์ม ซึ่งมีการกระจายตัวของลูกผสมในชั่วที่ 2 จากการผสมตัวเองในต้นพันธุ์เทเนอราได้พันธุ์ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา ในอัตราส่วน 1:2:1 ตามลำดับ จึงไม่สามารถนำมาขยายพันธุ์ได้ จำเป็นต้องผลิตเมล็ดพันธุ์เทเนอราอยู่ตลอดเวลา ต้นพันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ต้องผ่านกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ที่สามารถยืนยันได้ว่าให้ผลผลิตน้ำ มัน/หน่วยพื้นที่ /หน่วยระยะเวลาสูง และสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในแหล่งปลูกได้ดี รวมทั้งมีลักษณะทางการเกษตรอื่นๆ ที่เหมาะสม เช่น มีการเจริญเติบโตด้านความสูงช้า ความยาวทางใบไม่สั้นหรือยาวเกิ น ไป ลำต้นอวบสมบูรณ์ เป็นต้น ซึ่งในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากการเพาะเมล็ดมีวิธีการต่างๆ ของการทำลายการพักตัวของเมล็ดที่ค่อนข้าง ยุ่งยากและใช้เวลา นาน (ธีระ และคณะ , 2548) จากปัจจัยทั้งทางกายภาพ และเคมีที่ไม่เหมาะสมต่อการรงอกของเมล็ด นอกจากนี้แล้ว ปาล์มน้ำมัน เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีการเจริญเติบโตของเ นื้อเยื่อเจริญปลายยอดเท่านั้น ไม่มีการแตกหน่อ ทำให้ได้จำนวนต้นที่จำกัด (Rajesh *et al*., 2003) ดังนั้น การนำเอาเทคนิคทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้จนถึงปัจจุบัน มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ชิ้นส่วนราก (Wooi, 1995) ใบอ่อน (สมปอง และคณะ, 2547) ดอก (Teixeira *et al*., 1994) และคัพภะ (Te-chato, 1998a ; Kanchanapoom and Domyoas, 1999) การเพาะเลี้ยงรากและดอกไม่ค่อยประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากการเพาะเลี้ยงรากมักประสบปัญหาการปนเปื้อนของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง ส่วนการเพาะเลี้ยงดอกวิธีการแยกชิ้นส่ วนออกมาเพาะเลี้ยงทำได้ยาก ชิ้นส่วน ได้รับความเสียหาย และเกิดสีน้ำตาลหรือออกซิเดชันจำนวนมาก ขณะเดียวกันการเพาะเลี้ยงใบอ่อนทำให้ต้นแม่ได้รับความเสี ยหายและยุ่งยาก ดังนั้นการเพาะเลี้ยงคัพภะจึงเป็นวิธีที่สะดวกในการเก็บตัวอย่างมากกว่าชิ้นส่วนอื่น และน่าจะมีการตอบสนองได้เร็วกว่าเนื่องจากเป็นต้นอ่อนอยู่แล้ว สามารถร่นระยะเวล าในการงอก ช่วยชีวิตลูกผสม และ เพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากอย่างต่อเนื่องผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซีสจนพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

โดยทั่วไปการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันไปสู่ระยะโซมาติกเอ็มบริโอนั้น ใช้ระยะเวลามากกว่า 1 ปี (Khoo *et al.,*1999) Te-chato และ Hilae (2007) ได้ทำโดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ใช้ระยะเวลา 4 เดือน นับเป็นการช่วยย่นระยะเวลาในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ดังนั้นพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่เป็นไปได้เร็วขึ้น ส่งผลให้ การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นที่ได้ ทำให้ได้ต้นที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์สูง การใช้วิธีการเตรียมแคลลัสเริ่มแรกด้วยวิธีการต่าง ๆ เพื่อเป็นการ

เพิ่มความเครียดแล้วกระตุ้นการพัฒนาของแคลลัสดังกล่าวไปเป็น นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอได้เร็วนับว่าเป็นอีกทางหนึ่งที่ช่วยให้การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนการนี้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

การตรวจเอกสาร

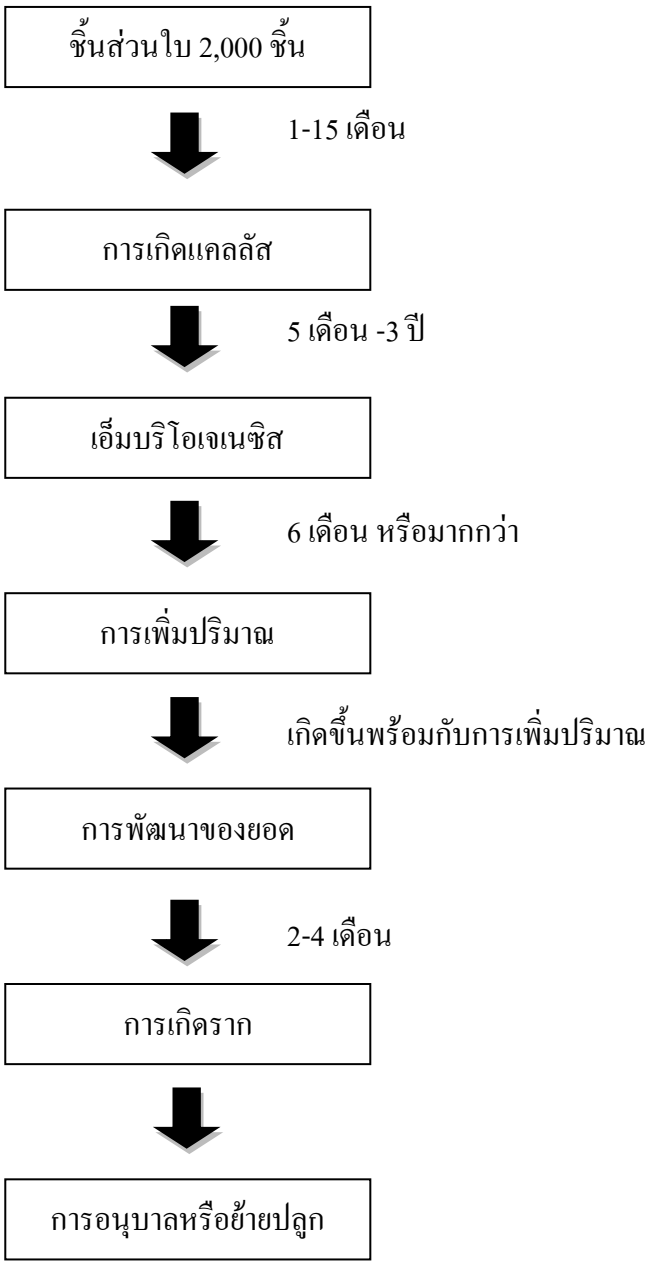
การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันสามารถขยายทำได้ 2 วิธี คือ การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดพันธุ์ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (นภาพร, 2548) เนื่องจากปาล์มน้ำมันมีการเจริญเติบโตจากเนื้อเยื่อปลายยอด และไม่มีการแตกหน่อ หรือกิ่งแขนง จึงไม่สามารถขยายพันธุ์โดยวิธีไม่อาศัยเพศทั่วไป เช่น การปักชำ ตอนกิ่ง และการติดตา

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญของพืช เช่น ใบ ลำต้น ดอก ราก หรือ เซลล์ และโปรโตพลาสต์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้ วยธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ภายใต้ สภาวะที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยควบคุมการให้แสง และอุณหภูมิ เพื่อส่งเสริมให้ชิ้นส่วนดังกล่าวพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป (สมปอง, 2550)

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีการเจริญทางด้านส่วนยอดเท่านั้น และไม่สามารถขยายพันธุ์โดยเทคนิคทั่วไป เช่น การแยกหน่อ การตอนกิ่งหรือทาบกิ่ง อย่างไรตาม มีความเป็นไปได้ที่จะผลิตหรือขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นการนำชิ้นส่วนพืชขนาดเล็กจากต้นที่ให้ผลผลิตดีมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ส่งเสริมการเจริญของของเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส และพัฒนาต่อให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จนกระทั่งพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน พบว่า กระบวนการเริ่ม แรกตั้งแต่ชักนำแคลลัสจนพัฒนาเป็ นยอดและสามารถนำมาชักนำรากจนได้ต้นที่สมบู รณ์พร้อมที่จะนำไปปลูกในโรงเรือน ช้ามาก จึงเป็นปัญหาและอุปสรรคในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น หลังจากนั้นมีการดูแลจัดการเช่นเดียวกับต้นอ่อนที่ปลูกโดยวิธีปกติ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันมีเทคนิคที่ค่อนข้างยาก และใช้แรงงานจำนวนมาก และในบางขั้นตอนยังไม่เข้าใจในสภาพที่เหมาะสม ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง ดังนั้นการค้นหาวิธีการที่ประสบ ความสำเร็จทำได้ค่อนข้างช้า (Corley and Tinker, 2003) การขยายพันธุ์ ปาล์มน้ำมัน โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เริ่มต้น ในปี ค.ศ.

1960 และประสบความสำเร็จในปี ค.ศ. 1970 โดยปาล์มน้ำมันโคลนแรกที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อปลูกในประเทศมาเลเซียในปี ค .ศ. 1977 จนกระทั่งมีการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว ในปี ค.ศ. 1980 ต่อมาพบลักษณะดอกที่ผิดปกติและเสื่อมถดถอยอย่างรุนแรง ส่งผลให้การขยายกิจการต้องหยุด ชะงักและเพิ่มความระมัดระวังในการขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำหรับกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันมีขั้ นตอน และระยะเวลาในแต่ละขั้นตอนโดยทั่วไปแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กระบวนการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : ช่วงเวลาและอัตราความสำเร็จ

ที่มา : Wong และคณะ (1999), Duval และคณะ (1995), Rival และคณะ (1997) และ Rival (2000) อ้างโดย Corley และ Tinker (2003)

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องใช้เวลามากกว่า 2 ปีขึ้นไป ซึ่งสามารถใช้แหล่งของชิ้นส่วนต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงได้แก่ ใบอ่อน คัพภะ และราก (Duval *et al.,* 1995) การเพาะเลี้ยงรากแม้ทำได้แต่พบว่า ชิ้นส่วนมีการปนเปื้อนสูง (Avril *et al.,* 1986) นอกจากนี้มีรายงานการกลายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนดังกล่าวของบริษัทยูนิลิเวอร์ เมื่อนำมาปลูกที่อำเภอปลายพระยาจังหวัดกระบี่ พบว่า มีลักษณะการกลายพันธุ์สูงหรือเกือบทั้งหมด ลักษณะผิดปกติที่พบ ได้แก่ การแตกกอ การพัฒนาของดอกที่ยอด การผลิตเฉพาะดอกตัวผู้ การผลิตดอกกระเทย และลักษณะผลแบบแมนเทิ้ล (James, 1984; Jone, 1883 อ้างโดยสมปอง , 2544) Khnow และ Ng (1999) อ้างโดย สมปอง (2544) รายงานว่าต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนในประเทศมาเลเซียมีการกลายพันธุ์ในลักษณะผลแบบแมนเทิ้ลเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าต้นพันธุ์ดังกล่าวให้ผลผลิตสูงกว่าต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดอย่างน้อย 30 เปอร์เซ็นต์ ประเทศไทยมีรายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเยื่อปาล์มน้ำมันจากแหล่งของชิ้นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ คัพภะ และใบอ่อน เจริญ และคณะ (2532) ตัดแยกคัพภะปาล์มน้ำมันมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำการงอกของคัพภะได้ 98.5 เปอร์เซ็นต์ Kanchanapoom และ Damyoas (1999) ตัดแยกคัพภะของเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนรามาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 (Eeuwens, 1976; 1978) เติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนดังกล่าวสามารถสร้างแคลลัสภายใน 8 สัปดาห์ หลังจากเพาะเลี้ยง และสามารถชักนำเอ็มบริออยด์โดยนำแคลลัสที่ชักนำได้ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุของ คัพภะที่แตกต่างกันส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัสได้แตกต่างกัน ทั้งนี้พบว่าการเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันอายุ 193 วัน หลังการผสมเกสร ส่งผลต่อการสร้างแคลลัสสูงสุด 93 เปอร์เซ็นต์ (Teixeira *et al.,* 1993)

การเพาะเลี้ยงคัพภะ คือ การนำเอาคัพภะหรือต้นอ่อนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากการปฏิสนธิของละอองเกสรและไข่อ่อน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เพื่อส่งเสริมการงอกเป็นต้นกล้าโดยตรงหรือให้เกิดเป็นแคลลัส ซึ่งมีประโยชน์ในการแก้ไขปัญหาอัตราการงอกของเมล็ดที่ต่ำในพืชบางชนิด หรือในเมล็ดของพืชที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุล ที่ยากต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาในสภาพตามธรรมชาติ รวมทั้งแก้ไขปัญหาการพักตัวที่ยาวนานของเมล็ดพืชบางชนิด (สารานุกรมไทยสำหรับเยาชนฯ เล่มที่ 28, 2547) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงคัพภะยังช่วยขยายพันธุ์โดยการชักนำให้คัพภะสร้างยอดจำนวนมาก หรือชักนำแคลลัสเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ได้ มีรายงานการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงคัพภะที่ประสบความสำเร็จโดย Teixeira และคณะ (1993) ซึ่งศึกษาการตอบสนองของชิ้นส่วนคัพภะอายุต่าง ๆ หลังการผสมพันธุ์ เมื่อวางเลี้ยง

บนอาหารดัดแปลงสูตร Y_3 และพบว่า คัพภะที่มีอายุ 100 วันหลังการผสมให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงบ นอาหารชักนำแคลลัสเป็นเวลา 9 เดือน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสพัฒนาให้พืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานกว่า 1 ปี Te-chato (1998a) เพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันระยะสุกแก่บนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุม การเจริญเติบโต ชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า แคลลัสเริ่มต้นสามารถสร้างโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากเพาะเลี้ยง 6 เดือน เมื่อลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตลง ส่งเสริมการสุกแก่ของโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อย้ายกลุ่มโซมาติกเอ็มบริโอไปเลี้ยงในอาหารเหลวสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่สมบูรณ์ซึ่งมีทั้งยอดแล ะราก หลังจากอนุบาลลงดินปลูกให้อัตรารอดชีวิตสูง ส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่พัฒนาให้ยอดแต่ยังไม่มีราก

Kanchanapoom และ Domyoas (1999) ศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาการเกิดแคลลัส และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS แคลลัสเกิดขึ้นบริเวณถัดจากเนื้อเยื่อชั้นนอกเข้าไป (subepidermis) หลังจากเพาะเลี้ยง 1 เดือน โดยเซลล์มีขนาดเล็ก ไซโทพลาสซึมหนาแน่น และนิวเคลียสติดสีเข้ม พบกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงหลังจากเพาะเลี้ยง 2 เดือน การแบ่งเซลล์ครั้งแรกมีทิศทางที่ไม่แน่นอน และค่อย ๆ เพิ่มปริมาณจาก 2 เซลล์เป็น 4 เซลล์ ต่อมาสร้างเป็นกลุ่มของเซลล์ proembryo ประกอบด้วย 8-10 เซลล์ เริ่มมีการยืดยาวและเปลี่ยนแปลงเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากเพาะเลี้ยง 3 เดือน จากนั้นแบ่งเซลล์เป็นต้นอ่อนระยะรูปกลม ระยะรูปหัวใจ และระยะทอร์ปิโด ลักษณะต้นอ่อนที่เกิ ดขึ้นจากกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสเหมือนกับต้นอ่อนที่เกิดจาก ไซโกติกเอ็มบริโอทุกประการ

Rajesh และคณะ (2003) ชักนำพืชต้นใหม่ในปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะระยะสุกแก่ โดยใช้อาหารสูตรดัดแปลง MS เติม 2,4-D เข้มข้น 113.12 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2iP เข้มข้น 14.76 ไมโครโมลาร์ คัพภะสร้างแคลลัสได้หลัง จากเพาะเลี้ยง 4-5 สัปดาห์ เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตร Blaydes (1966) เติม 2,4-D เข้มข้น 0.045 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ (thidiazuron) เข้มข้น 4.54 ไมโครโม ลาร์ หรือ ซี อะตินไรโบไซด์เข้มข้น 2.85 ไมโครโมลาร์ หรือพิวเทรสซีนเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือส เปอร์มีนเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เกิดเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสชนิดเกาะกันอย่างหลวม ๆ สีเหลือง ที่มีการเจริญและเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว สร้างเป็นโครงสร้างรูปกลมบริเวณผิวของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงต่อมาอีกเป็นเวลา 1 เดือนต่อมา โครงสร้างดังกล่าว เพิ่มขนาด และพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ จากนั้นโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองพัฒนาขึ้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่ให้สภาวะเครียดโดยการเติมโพลีเอมีน และยังพบการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอโดยการสร้างจุดกำเนิดของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และรากจนสามารถพัฒนาเป็นต้นปาล์มน้ำมันที่สมบูรณ์ ขณะเดียวกันส่วนที่ไม่เป็น

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส มีลักษณะทึบแสงสีขาวขุ่นและไม่สามารถพัฒนาหรืองอกเป็นต้นได้ นอกจากนี้ ยังมีรายงานการเพาะเลี้ยงคัพภะในพืชตระกูลปาล์มอื่น ๆ ด้วย เช่น ปาล์มอเมริกันแคระ (saw palmetto) ซึ่ง Gallo-Meagher และ Green (2000) ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสและพืชต้นใหม่จากคัพภะในระยะอ่อน พบว่า กลุ่มของโซมาติกเอ็มบริโอพัฒนาบนอาหารสูตร MS เติมผงถ่าน 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 452 ไมโครโมลาร์ และ 2iP เข้มข้น 17.4 ไมโครโมลาร์ หลังจากเพาะ เลี้ยง 1 เดือน ย้ายโซมาติกเอ็มบริโอเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกัน แต่ลดความเข้มข้น 2,4-D ลงเหลือ 90.4 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอได้ถึง 200 โซมาติกเอ็มบริโอจากหนึ่งไซโกติกเอ็มบริโอเริ่มต้นภายในเวลา 9 เดือน เมื่อย้ายโซมาติกเอ็มบริโอไปเลี้ยงในอาหารเติม TDZ เข้มข้น 0.9 ไมโครโมลาร์ สามารถงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ 12 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่โซมาติกเอ็มบริโอที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ส่งเสริมการสร้างยอด 35 เปอร์เซ็นต์ และยอดสร้างรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเติม NAA (α-naphthaleneacetic acid) เข้มข้น 22.2 ไมโครโมลาร์ Wang และคณะ (2003) เพาะเลี้ยงคัพภะ ในระยะสุกแก่ ของหมากบนอาหารสูตร MS เติม dicamba (3,6-Dichloro-2-methoxybenzoic acid) ความเข้มข้นต่าง ๆ พบการสร้างแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยง 2 เดือน เมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหาร สูตรเดิมทุก 2 เดือน เป็นเวลานาน ส่งเสริมการพัฒนาของแคลลัสแบบปุ่มปมไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ และโซมาติกเอ็มบริโองอกเป็นต้นสมบูรณ์ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตหลังจากเพาะเลี้ยง 2-3 เดือน จากนั้นจึงย้ายปลูกอนุบาลในโรงเรือน พบอัตราการรอดชีวิต 24%

การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันนั้นมีรายงานการเพาะเลี้ยง โดยสมปอง และคณะ (2530) ทำการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอราจากต้นกล้าอายุ 195 วัน โดยตัดใบอ่อนสีขาวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 พบว่า สามารถชักนำแคลลัสที่เจริญเติบโตช้า (slow growing callus) บริเวณรอยตัดขอบใบ 40 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน Karun และ Sajini (1996) ชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเน อราและดูราอายุ 18 และ 6 เดือน ตามลำดับ บนอาหารสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม 2,4-D เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ระยะเวลา และเปอร์เซ็นต์แคลลัสแตกต่างกัน โดยมีการสร้างแคลลัส 7 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยง 100-120 วัน ในพันธุ์ดูรา สำหรับการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีในประเทศไทยแม้ ว่ามีการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตต้นพันธุ์ดีตั้งแต่ปี 2526 โดยไพบูลย์ และคณะ (ไม่มีตีพิมพ์) ก็ตาม แต่คงเป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัส ยังไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และพัฒนาให้พืชต้นใหม่ได้สำเร็จ Wooi (1990) อ้างโดย Duval และคณะ

(1995) สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ โดยนำแคลลัสเริ่มแรกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีออกซิน ความเข้มข้นต่ำกว่าการชักนำแคลลัสร่วมกับการเติม ไซโตไคนินความเข้มข้นต่ำเช่นกัน Sogeke (1996) ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ โดยนำแคลลัสเริ่มแรกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง Y_3 เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนตินเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Te-chato (1998b) ชักนำเอ็มบริโอเจนิคจากแคลลัสเริ่มแรกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นกล้า 195 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอส คอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสดังกล่าวพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแ คลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 -8 เดือน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้ตามต้องการในอาหารสูตรเดียวกับสูตรชักนำเอ็มบริโ อเจนิคแคลลัส หลังจากนั้นสามารถชักนำการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ โดยนำโซมาติกเอ็มบริโอมาเพ าะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA (N^6-Benzyladenine) เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร (Te-chato, 1998b) หรือเพาะเลี้ยงบนอาหาร 2 ชั้น โดยชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร MS เติมผงถ่าน 0.25 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกันแต่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติม NAA และ BA ความเข้มข้นเช่นเดียวกันกับอาหารเหลวข้างต้น สามารถชักนำรากปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตรเดียวกันนี้ 73 เปอร์เซ็นต์ (Te-chato and Muangkaewgam, 1992)

ปัญหาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน คือ ปัญหาการกลายพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องมาจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตโดยเฉพาะ 2,4-D ความเข้มข้นสูงในการชักนำแคลลัส ซึ่งพบว่าอาจสูงถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Teixeira *et al.,* 1995) ด้วยเหตุผลข้างต้นจึงพบลักษณะผิดปกติจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ผลแบบแมนเทิ้ล การผลิตเฉพาะดอกตัวผู้ การพัฒนาของผลแบบ พาธิโนคาปิค (Corley *et al.,* 1986) การแตกกอ การพัฒนาของดอกที่ยอดการผลิตดอกกะเทย (สมปอง, 2544) อย่างไรก็ตามก็ไม่มีรายงานการผลิตปาล์มน้ำมันผิดปกติจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนโดย (Te-chato,1998b) ตั้งแต่ปี พ .ศ. 2533/34 จนขณ ะนี้ไม่พบลักษณะความผิดปกติใด ๆ ทั้งนี้อา จเนื่องมาจาก ในช่วงของการชักนำแคลลัสใช้ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำเพียง 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร และช่วงการชักนำการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอใช้ NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

ขั้นตอนในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสมีดังนี้ คือ

1. การชักนำแคลลัส และการเพิ่มปริมาณ

แคลลัส คือ เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่เปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะของพืช ในปาล์มน้ำมันได้จากชิ้นส่วนต่าง 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) การชักนำแคลลัสทำได้โดยวางเลี้ยงบนชิ้นส่วนบนอาหารที่เติม NAA หรือ 2,4-D หรือทั้ง 2 ชนิด หรือ piclolam (amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid) หรือ dicamba (Te-chato, 1998a) Duval (1995) รายงานลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสามารถแบ่งได้ เป็น 2 ชนิด คือ แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแบบห ลวมๆ (friable callus) และแคลลัสที่เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มก้อน (nodular compact callus) นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณแคลลัสสามารถทำได้โดยย้ายแคลลัสที่ชักนำได้ ไปเลี้ยงในอาหารแข็งใหม่สูตรเดิมที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นเดียวกันหรือลดลง Teixeira และคณะ (1995) สามารถเพิ่มจำนวนแคลลัสปาล์มน้ำมันชนิด friable embryogenic tissue ได้สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารแข็งสูตร Y_3 หรือ MS 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) สามารถเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำมาจากคัพภะได้มากกว่า 10 เท่า หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน

2. การเจริญ และพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

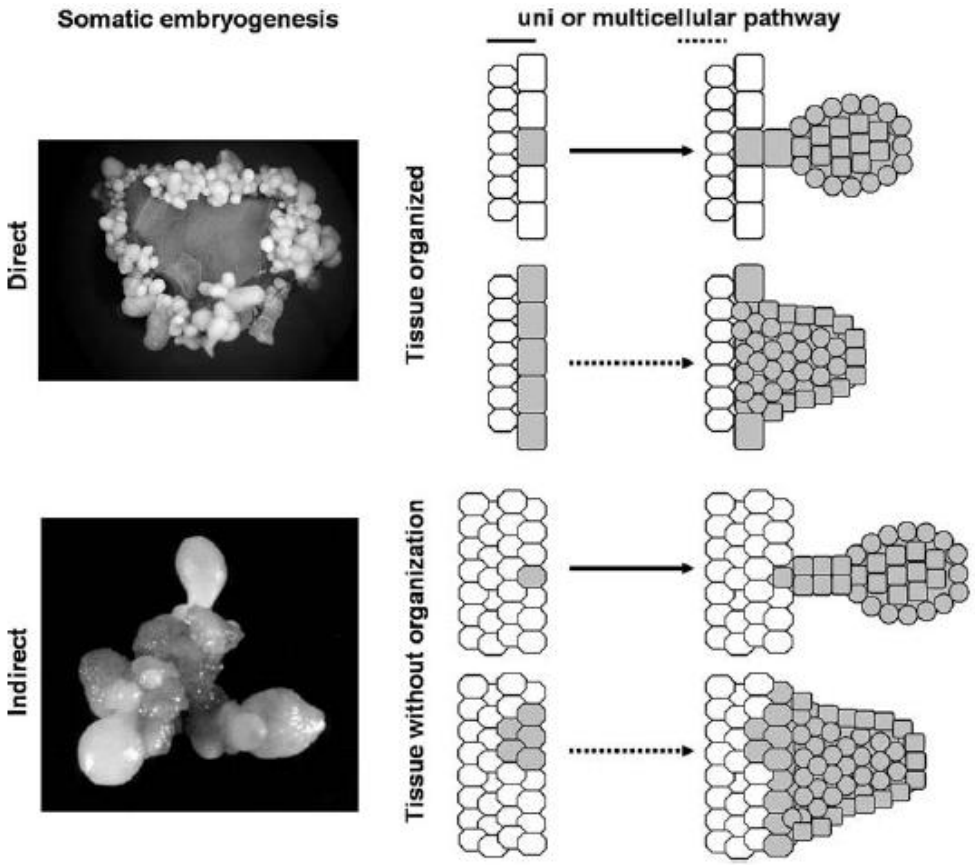
พัฒนาการของเนื้อเยื่อโดยกระบวนการเ อ็มบริโอเจนิซิสมีการเหนี่ยวนำให้เซลล์ หรือเนื้อเยื่อพัฒนาการไปเป็นเซลล์ต้นอ่อนเริ่มต้น จากนั้นพัฒนาเข้าสู่ต้นอ่อนระยะต่าง ๆ ในลักษณะเดียวกับการพัฒนาของคัพภะที่เกิดจากการผสมพันธุ์ ดังนั้นจึงเรียกกระบวนการนี้ว่า โซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส โดยเซลล์เริ่มต้นที่พัฒนาให้ต้นอ่อนเรียกว่าเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ มีจุด

กำเนิดของยอด และรากเชื่อมกันเรียกว่า bipolar ซึ่งวิถีการพัฒนาของเอ็มบริโอแบ่งออกเป็น 2 วิถี (ภาพที่ 2) คือ

1. วิถีตรง ในกรณีนี้เกิดขึ้นโดยตรงจากเซลล์เดี่ยวๆ หรือกลุ่มเซลล์จากชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงโดยไม่ผ่านขั้นตอนการเกิดแคลลัส เซลล์ที่ให้การเจริญเป็น SE (somatic embryo) เกิดขึ้น เรียกว่า pro-embryonic determined cells (PEDC) เซลล์ดังกล่าวมีพันธุกรรมกำหนดทิศทางการแบ่งเซลล์ และเป็นเซลล์ที่ลักษณะเป็นเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อื่นๆ

2. วิถีอ้อม การเกิดแบบนี้ต้องผ่านกระบวนการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงเสียก่อน เนื่องจากในชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้นไม่มีพันธุกรรมกำหนดทิศทางการแบ่งเซลล์เอาไว้ เมื่อชักนำแคลลัสได้แล้วจำเป็นต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อเหนี่ยวนำหรือส่งเสริมการสร้างเซลล์เอ็มบริโอเริ่มต้นจนได้เป็น EC นอกจากนี้อาจมีปัจจัยอื่นๆ เช่น แสง อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ตลอดจนอิทธิพลร่วมกันของปัจจัยดังกล่าว เรียกเซลล์ที่เกิด แบบนี้ว่า induced embryonic determined cells (IEDC)

ไม่ว่ากระบวนการเอ็มบริโอเจนีซิสเกิดขึ้นจากวิถีตรง และวิถีอ้อมจากชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยง เรียกชื่อเอ็มบริโอที่พัฒนาเหมือนกันคือ somatic embryo (SE) หรือ embyoid ที่เรียกเช่น นี้เพื่อแยกความแตกต่าง และบอกถึงแหล่งที่มาของอวัยวะดังกล่าวด้วย โดย Quiroz-Figueroa และคณะ (2006) รายงานว่า โซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส ประกอบด้วยส่วนสำคัญของเซลล์ที่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะในพืช โดยกระบวนการนี้ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างเซลล์ สรีรวิทยา ชีวโมเลกุล และชีวเคมีที่เกิดขึ้นในระหว่างการเริ่มต้นและการพัฒนาของเอ็มบริโอเจเนซิส เพื่อใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การผลิตเมล็ดเทียม การขยายพันธุ์จากชิ้นส่วนขนาดเล็กโดยไม่อาศัยเพศ และการถ่ายยีนเข้าสู่พืช



ภาพที่ 2 รูปแบบกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยต้นอ่อนที่พัฒนาจากเซลล์เดียวมีการสร้างเซลล์คล้ายซัสเพนเซอร์เชื่อมกัน ในขณะที่ต้นอ่อนที่พัฒนาจากหลายเซลล์เกิดจากการรวมกันของเซลล์เดิม

ที่มา : Quiroz-Figueeroa และคณะ (2006)

การพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมันสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะ ดังนี้ ระยะรูปกลม ระยะทอร์ปิโด และระยะสร้างจาว จากนั้นพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (นภาพร , 2548) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือเกิดจากการชักนำด้วยปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ คือ ปัจจัยทางเคมี เช่น ชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน องค์ประกอบของธาตุอาหาร ประเภทของอาหารที่ใช้ในการวางเลี้ยง หรือชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นต้น ปัจจัยทางกายภาพ เช่น การสร้างบาดแผลด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การสร้างบาดแผลด้วยใบมีด หรือการสร้างบาดแผลโดยใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นต้น Hilae และ Techato (2005) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการงอกของโซมาติกเอ็ม บริโอระยะสร้างจาวในปาล์มน้ำมั น พบว่า อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอบิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำการงอกไ ด้ 40 เปอร์เซ็นต์

Krajnakova และคณะ (2008) ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร่วมกับการเติมผงถ่านต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอใน *Abies cephalonica* พบว่า อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโค รสเข้มข้น 87.6 มิลลิโมลาร์ ส่งเส ริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ 66.8 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การลดองค์ประกอบของธาตุอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอในพืชได้หลายชนิด เช่น *Panax quinquefolius* L. ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (Freeney and Punja, 2003) ปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (Teixeira *et al.,* 1995) เป็นต้น Guerra และ Handro (1998) อ้างโดย นภาพร (2548) รายงานว่าโ ซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการชักนำแคลลัสใบอ่อนปาล์มน้ำมันในอาหารสูตร ½ MS เติม NaH_2PO_4 เข้มข้น 170 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ในระยะ 1-3 เดือน

ปัจจัยที่ควบคุมการเกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมัน

1. ปัจจัยทางเคมี

ชนิดของออกซิน และระดับความเข้มข้นมีผลต่อการชักนำ โซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน Te-chato (1998) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซิน และระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการใช้ NAA ความเข้มข้นตั้งแต่ 15 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้นตั้งแต่ 1 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้เร็ว ทั้งในการเพาะเลี้ยงคัพภะและใบอ่อน เมื่อย้ายโซมาติกเอ็มบริโอไปเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมเคซีน ไฮโดรไลเสท และกรดแอสคอบิค พบว่า ส่งเสริมการสุกแก่ของโซมาติกเอ็มบริโอหรือเอ็มบริโอระยะสร้างจาว อาหารที่เติม dicamba ให้ผลตอบสนองต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอสูงกว่าอาหารที่เติม 2,4-D

Hilae และ Te-chato (2005) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการงอกของเอ็มบริโอระยะสร้างจาวในปาล์มน้ำมัน พบว่า อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำการงอกได้ 40 เปอร์เซ็นต์ Krajnakova และคณะ (2008) ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโ ครสร่วมกับการเติมผงถ่านต่อ การพัฒนาของโ ซมาติกเอ็มบริโอใน *Abies cephalonica* พบว่า อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 87.6 มิลลิโมลาร์ ส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ 66.8 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการเพาะเลี้ยงคัพภะในพืชตระกูลปาล์มอื่น ๆ ด้วย เช่น ปาล์มอเมริกันแคระ (saw palmetto) ซึ่ง Gallo-Meagher และ Green (2000) ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสและพืชต้นใหม่จากคัพภะระยะอ่อน พบว่า กลุ่มของโซมาติกเอ็มบริโอพัฒนาบนอาหารสูตร MS เติมผงถ่าน 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 452 ไมโครโมลาร์ และ 2iP เข้มข้น 17.4 ไมโคร โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยง 1 เดือน ย้ายโซมาติกเอ็มบริโอเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกัน แต่ลดความเข้มข้น 2,4-D ลงเหลือ 90.4 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอได้ถึง 200 โซมาติกเอ็มบริโอ จากหนึ่งไซโกติกเอ็มบริโอเริ่มต้นภายใน 9 เดือน เมื่อย้ายโซมาติกเอ็มบริโอไปเลี้ยงในอาหารเติม TDZ เข้มข้น 0.9 ไมโครโมลาร์ สามารถงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ 12 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ โซมาติกเอ็มบริโอที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตส่งเสริมการสร้างยอด 35 เปอร์เซ็นต์ และยอดสร้างรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเติม NAA เข้มข้น 22.2 ไมโครโมลาร์ Wang และคณะ (2003) เพาะเลี้ยงคัพภะของหมากจากผลระยะสุกแก่บนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้นต่าง ๆ แคลลัสสร้างขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยง 2 เดือน เมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหารเดิมทุก 2 เดือน แคลลัสแบบปุ่มปมสร้างโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากเพาะเลี้ยง 2-4 เดือน และโซมาติกเอ็มบริโองอกเป็นต้นสมบูรณ์ ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตหลังจากเพาะเลี้ยง 2-3 เดือน จากนั้นจึงย้ายปลูกอนุบาลในโรงเรือน พบอัตราการรอดชีวิต 24 เปอร์เซ็นต์

Rajesh และคณะ (2003) ชักนำพืชต้นใหม่ในปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะระยะสุกแก่ โดยใช้อาหารสูตรดัดแปลง MS เติม 2,4-D เข้มข้น 113.12 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2iP เข้มข้น 14.76 ไมโครโมลาร์ คัพภะสร้างแคลลัสได้หลัง จากเพาะเลี้ยง 4-5 สัปดาห์ เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตร Blaydes (1966) เติม 2,4-D เข้มข้น 0.045 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ หรือ ซีเอตินไรโบไซด์เข้มข้น 2.85 ไมโครโมลาร์ หรือ พิวเทรสซีนเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือสเปอร์มีนเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เกิดเป็นเอ็ม บริโอเจนิคแคลลัสชนิดเกาะกันอย่างหลวม ๆ สีเหลือง ที่มีการเจริญและเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว สร้างเป็นโครงสร้างรูปกลมบริเวณผิวของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสภายใน 1 เดือนต่อมา ซึ่งเพิ่มขนาดและพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ จากนั้น โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองพัฒนาขึ้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่ให้สภาวะเครียดโดยการเติมโพลีเอมีน และยังพบการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอโดยการสร้างจุดกำเนิดของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและรากจนสามารถพัฒนาเป็นต้นปาล์มน้ำมันที่สมบูรณ์ ขณะเดียวกันส่วนที่ไม่เป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส มีลักษณะทึบแสงสีขาวขุ่นและไม่สามารถพัฒนาหรืองอกเป็นต้นได้

2.ปัจจัยทางกายภาพ

Fki และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของการสร้างบาดแผลแคลลัสเริ่มต้นของอินทผลัมด้วยใบมีด และวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณ ดเอ็มบริโอเจนิค แคลลัส ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ Othmani และคณะ (2009) ได้ทำการสร้างบาดแผล แคลลัสของอินทผลัมด้วยใบมีดโกน แล้ววางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 55 วัน สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ และเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมผงถ่าน 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน โซมาติกเอ็มบริโอสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปัจจัยทางกายภาพ และเคมี ที่มีผลต่อกา รเพิ่มปริมาณ และพัฒนาการ ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส
2. เพื่อศึกษาการผลของปัจจัยทางกายภาพ และเคมีต่อการเปลี่ยนแปลง ชุดโครโมโซม ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ใช้โนดูลาร์แคลลัสที่ได้จากการชักนำจาก การเพาะเลี้ยง ไซโกติกเอ็มบริโอ เพาะเลี้ยงโนดูลาร์แคลลัสดังกล่าวบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และย้ายเลี้ยงทุก 1 เดือน (ภาพที่ 3) เป็นเวลา 3 เดือน

ภาพที่ 3 โนดูลาร์แคลลัสชักนำจากการเพาะเลี้ยงไซโกติกเอ็มบริโอ วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS
- สารเคมีที่ใช้ในการทำความสะอาดเครื่องแก้ว ประกอบด้วย แอลกอฮอล์ 70% ทีโพล
- น้ำตาลซูโครส ซอร์บิทอล แมนนิทอล polyethyleneglycol (PEG) และกรดแอสคอร์บิค
- สารควบคุมการเจริญเติบโต ประกอบด้วย dicamba

2. อุปกรณ์ในการทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องแก้ว ประกอบด้วยขวดแก้วสำหรับใส่ stock อาหาร กระบอกตวง ปิเปต บีกเกอร์ จานเพาะเลี้ยง ขวดปรับปริมาตร ขวดเพาะเลี้ยง ขวดรูปชมพู่ และหลอดทดลอง
- อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วยเครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัด pH เครื่องคนสารละลาย แท่งแม่เหล็ก ตู้อบแห้ง ตู้อบฆ่าเชื้อ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้อบไมโครเวฟ และตู้เย็น
- อุปกรณ์ในการสร้างบาดแผล ประกอบด้วย ใบมีด และเครื่องโซนิเคเตอร์
- อุปกรณ์ในการวางเลี้ยง ชั้นวางเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิและแสง
- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง
- กล้องถ่ายรูปดิจิตอล

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยง

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ชุดเครื่องมือย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วย ปากคีบ และมีดผ่าตัด
- ไฟร์บอย

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้สร้างบาดแผล

- ใบมีดโกน
- เครื่องโซนิเคเตอร์ ความถี่ 50/60 Hz

2.4 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์จำนวนชุดโครโมโซม

- เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4 เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ระดับพลอยดีของเซลล์พืชเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

วิธีการ

1. ศึกษาผลของสารเคมีต่อการเจริญ และการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

1.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ dicamba

นำโนดูลาร์แคลลัส อายุ 1 เดือน มีขนาด 5.0 มิลลิเมตร จากอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เติม dicamba เข้มข้น 0.1 0.3 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง ปรับ pH เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ หลอมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ไมโครเวฟ บรรจุในหลอดทดลองขนาด 25×150 มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกการเจริญของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง ในแต่ละความเข้มข้นของ dicamba เปรียบเทียบกันโดย ใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) แต่ละความเข้มข้นของ dicamba ที่ทดสอบทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอดทดลอง

1.2 ศึกษาผลของชนิด และความเข้มข้นของออสโมติคัม

นำโนดูลาร์แคลลัส อายุ 1 เดือน ขนาด 5.0 มิลลิเมตร จากอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิต ร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในอาหารสูตรเหมาะสมจากการทดลองที่ 1.1 เติม น้ำตาลแอลกอฮอล์ 3 ชนิด ซอร์บิทอล แมนนิทอล และ PEG แต่ละชนิดใช้ ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0.1 0.2 และ 0.3 โมลาร์ วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด และสภาพแวดล้อมเดียวกับการศึกษาที่ 1.1 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกการเจริญของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางในแต่ละความเข้มข้นของ dicamba เปรียบเทียบกันโดย ใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละชนิดและความเข้มข้นของออสโมติคัมที่ทดสอบ ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอดทดลอง

2. ศึกษาผลของวิธีการทางกายภาพต่อการเจริญและการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

2.1 ศึกษาผลการสร้างบาดแผล

นำโนดูลาร์แคลลัส ขนาด 5.0 มิลลิเมตร จากอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ อายุ 1 เดือน มาสร้างบาดแผลโดยใช้ใบมีดโกนหั่นเป็นชิ้นย่อย ๆ จนมีขนาดเล็ก หั่น 15 ครั้งต่อหลอด จากนั้นย้ายแคลลัสที่หั่นแล้วขนาด 5.0 มิลลิเมตร มาเลี้ยงในอาหารสูตรเหมาะสม จากการทดลองที่ 1.1 วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด และสภาพแวดล้อมเดียวกับการที่ศึกษาที่ 1.1 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเปรียบเทียบกันระหว่างการสร้าง และไม่สร้างบาดแผลโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี T-test แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอดทดลอง

2.2 ศึกษาผลของวิธีการสร้างบาดแผลโดยใช้คลื่นเสียง (sonicator)

นำโนดูลาร์แคลลัส ขนาด 5.0 มิลลิเมตร จากอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ อายุ 1 เดือน มาเลี้ยงในอาหารสูตรเหมาะสม จากการทดลองที่ 1.1 วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25×150 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารแข็งปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอ ด ทำการสร้างบาดแผล ให้กับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่เพาะเลี้ยง ด้วยคลื่นเสียง เป็นเวลา 15 30 และ 45 นาที จากนั้น วางเลี้ยง ในสภาพ แวดล้อมเดียวกับการศึกษาที่ 1.1 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเปรียบเทียบกันระยะเวลาการให้คลื่นเสียง โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละระยะเวลา ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอดทดลอง

2.3 ศึกษาผลของวิธีการสร้างบาดแผล

ในการศึกษานี้ใช้วิธีการสร้างบาดแผล 2 วิธี คือการใช้ใบมีดโกนที่คมหั่นฝอย และวิธีการให้คลื่นเสียงกับแคลลัสที่ผ่านการหั่นฝอยมาแล้วเป็นเวลาต่าง ๆ กัน 3 เวลาคือ 15 30 และ 45 นาที แคลลัสที่ใช้ในการศึกษาคือ โนดูลาร์แคลลัส ขนาด 5.0 มิลลิเมตร จากอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ อายุ 1 เดือน ในขั้นตอนแรกเป็นการสร้างบาดแผลโดยใช้ใบมีด ย้ายแคลลัสที่หั่นฝอยขนาด 5.0 มิลลิเมตร มาเลี้ยงในอาหารสูตรเหมาะสมจากการทดลองที่ 1.1 วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25×150 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารแข็งปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอ ด ในขั้นตอนที่ 2 นำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองไปจุ่มแช่ใน เครื่องโซนิ เคเตอร์ เป็นเวลา ต่าง ๆ ข้างต้น จากนั้นวางเลี้ยงที่สภาพแวดล้อมเดียวกับข้างต้น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เปรียบเทียบ กันระหว่างวิธีการสร้างบาดแผลข้างต้น โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอดทดลอง

3. ศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพ ร่วมกับปัจจัยทางเคมี

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส อายุ 1 เดือน ขนาด 5.0 มิลลิเมตร จากอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาสร้างบาดแผล ด้วยวิธีการที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเติมปัจจัยทางเคมี (สารควบคุมการเจริญเติบโต และน้ำตาลแอลกอฮอล์) ที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 จากนั้นวางเลี้ยงที่สภาพแวดล้อมข้างต้น (เช่นเดียวกับการศึกษาที่ 1 และ 2) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกการเจริญของ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในแต่ละปัจจัยที่ศึกษาเปรียบเทียบกับการไม่สร้างบาดแผล และการสร้างบาดแผลด้วยใบมีดโกนหั่นฝอย (ชุดควบคุม) โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอดทดลอง

4. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของชุดโครโมโซมในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการศึกษาที่ 1 และ 2 ขนาด 10.0 มิลลิเมตร มาวางบนจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร เติม polyvinylpyrrolidone (PVP) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใช้ใบมีดโกนสับจนละเอียด กรองด้วยผ้าไนลอนขนาด 42 ไมโครเมตร เติม propidium iodide (PI) ปริมาตร 50.0 ไมโครลิตร นำจานเพาะเลี้ยงไปวางบนน้ำแข็งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จึงดูดสารละลายของเซลล์ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ มาป้อนเซลล์เข้าสู่เครื่องโฟลไซโตเตอร์ บันทึกฮิสโตแกรมแสดงขนาดของดีเอ็นเอ (ปิโครกรัม) เปรียบเทียบกันระหว่างแคลลัสที่ได้รับปัจจัยทั้งทางกายภาพ และชีวภาพ แต่ละการทดลองใช้ 4 ตัวอย่าง

บทที่ 3

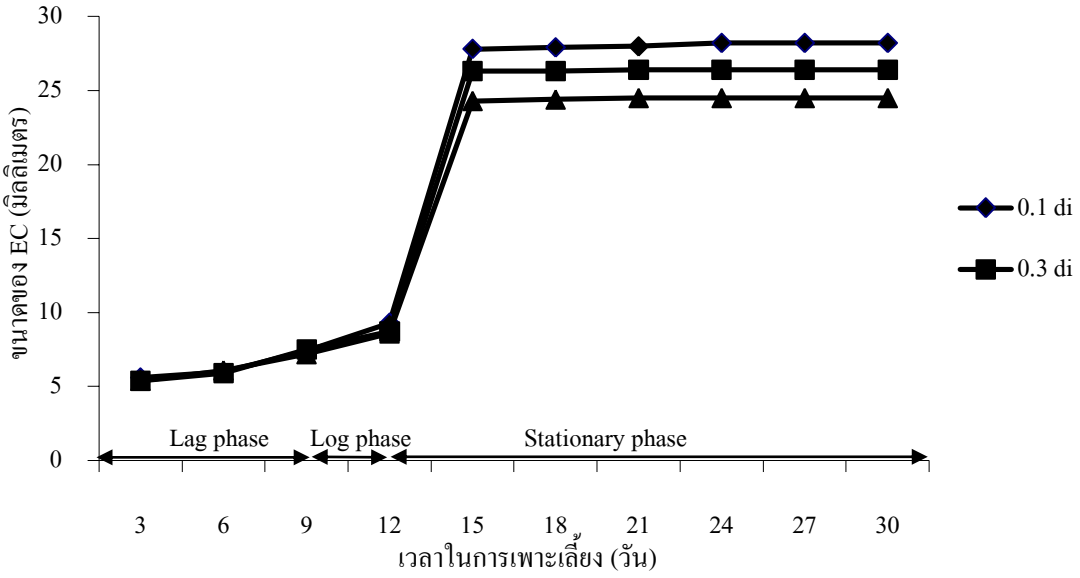
ผล

1. ผลของสารเคมีต่อการเจริญและการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

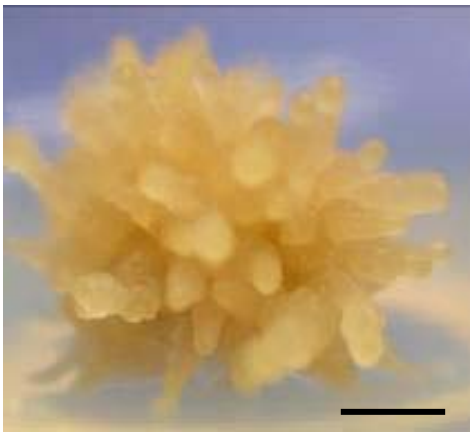
1.1 ผลของความเข้มข้นของ dicamba

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส บนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 0.3 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารแข็งสูตรที่เติม dicamba เข้มข้น 0.1 ให้ขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 28.2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 5) และพบว่า การเพาะเลี้ยงโนดูลาร์แคลลัสในอาหารสูตรดังกล่าวส่งเสริมให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสพัฒนามีโครงสร้างคล้ายราก (root-like callus) (ภาพที่ 6) บางส่วนมีลักษณะ compact callus หรือสีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 7ก) ส่วนสูตรอาหารเติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส รองลงมา 26.4 มิลลิเมตร (ภาพที่ 7ข) ในขณะที่ dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ต่ำสุด 24.5 มิลลิเมตร ซึ่งมีลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีสีเหลืองเข้ม (ภาพที่ 7ค) ดังนั้นจึงใช้สูตรอาหารที่เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเพิ่มปริมาณ และใช้ศึกษาต่อในการทดลองต่อไป

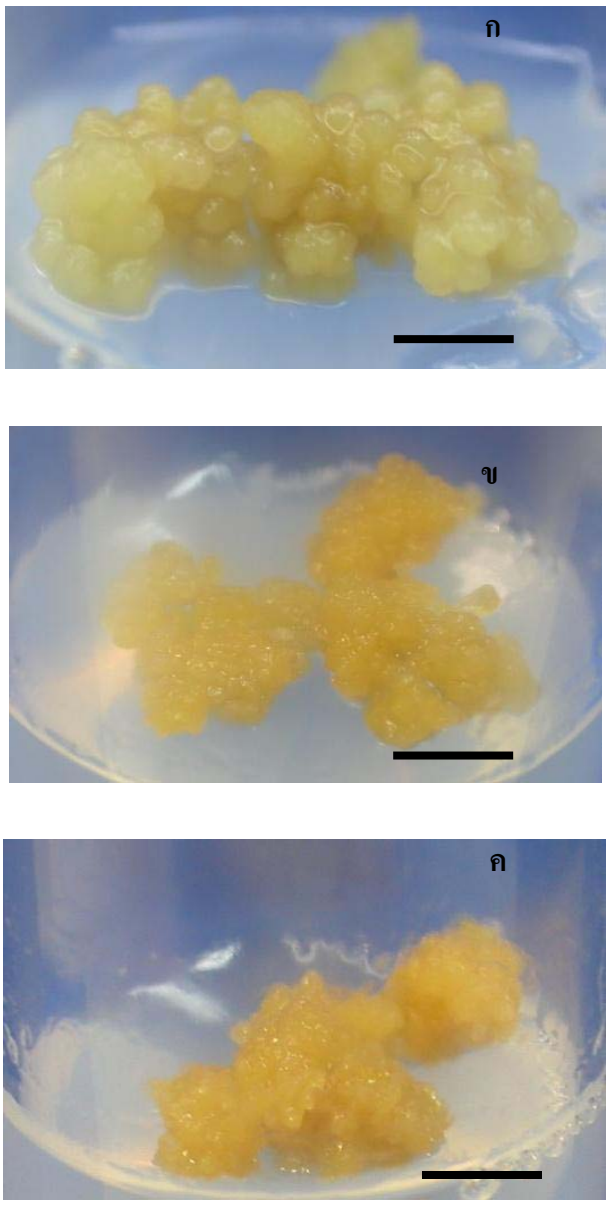
เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในสูตรอาหารที่เติม dicamba ทั้ง 3 ความเข้มข้นให้แบบการเจริญเป็นไปในทำนองเดียวกัน เป็นแบบ sigmoid curve (S-curve) โดยการเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในช่วง 3-12 วัน เป็นไปอย่างช้ามาก ระยะนี้เรียกว่า lag phase หลังจาก 12 วันไปจนถึง 15 วัน เซลล์เพิ่มขนาดอย่างรวดเร็วเป็นเส้นตรงเรียกระยะนี้ว่า log phase หลังจากวันที่ 15 ไม่มีการเพิ่มขนาดของแคลลัส การเจริญอยู่ในระยะคงที่เรียกระยะนี้ว่า stationary phase ดังนั้นควรย้ายเลี้ยงในช่วงระยะเวลา 12-15 วัน



ภาพที่ 5 ผลของความเข้มข้นของ dicamba ต่อการเจริญ (ขนาด) ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 6 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส บางแคลลัส ที่มีลักษณะ คล้ายราก จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน (บาร์= 2.25 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 7 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส บนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้นแตกต่างกัน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 7.5 มิลลิเมตร)

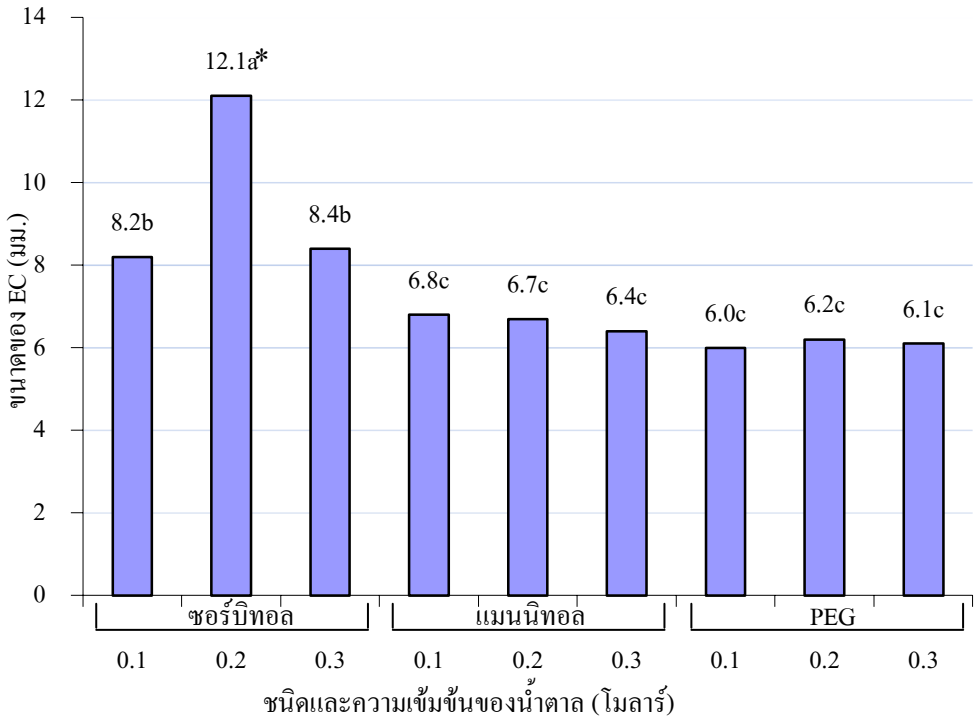
ก. dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของออสโมติคัม

จากการศึกษาผลของชนิด และความเข้มข้นของ ออสโมติคัม ในอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารที่เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้ขนาดของ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย 12.1 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เฉลี่ย 8.4 มิลลิเมตร ในขณะที่ PEG เข้มข้น 0.1โมลาร์ ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่ำสุด 6.0 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4) จึงใช้สูตรอาหารที่เติม ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ศึกษาต่อไป



ภาพที่ 8 ผลของชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติมในอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อขนาดของ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

*ค่าเฉลี่ยที่กำกับบนแท่งด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

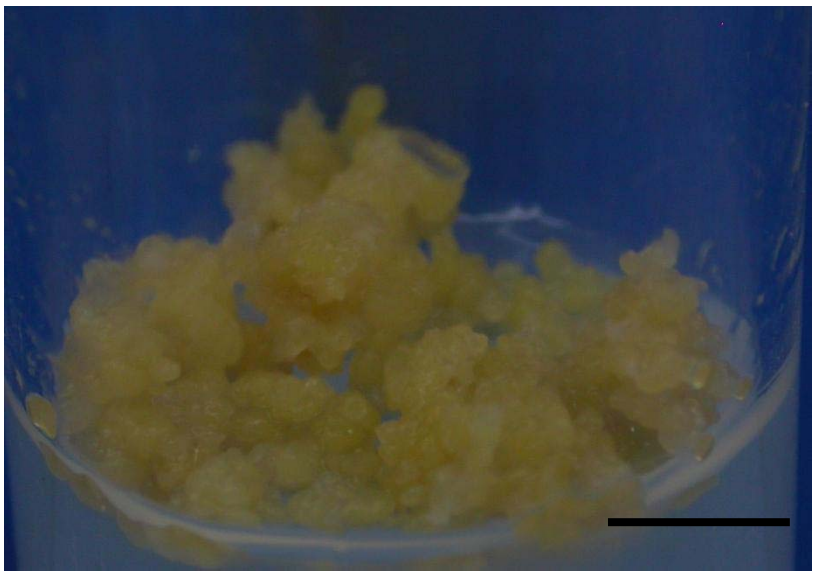
2. ผลของปัจจัยทางกายภาพต่อการเจริญ และพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

2.1 การสร้างบาดแผลโดยใช้ใบมีด

การสร้างบาดแผลโดยใช้ใบมีด ส่งผลให้ ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (32.2 มิลลิเมตร) สูงกว่าการไม่สร้างบาดแผลซึ่งให้ ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 24.57 มิลลิเมตร อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) ลักษณะของแคลลัสที่พัฒนาจากการสร้างแผลโดยใช้ใบมีด เป็นแบบ friable สีครีม ถึงสีเขียว ภายในแคลลัสมีโครงสร้างคล้ายปมสีเขียวอ่อนจำนวนมาก (ภาพที่ 9) โครงสร้างดังกล่าวมีการพัฒนาต่อไปให้ต้นอ่อนในระยะเริ่มต้น

ตารางที่ 1 ผลของการสร้างบาดแผลโดยใช้ใบมีดต่อขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

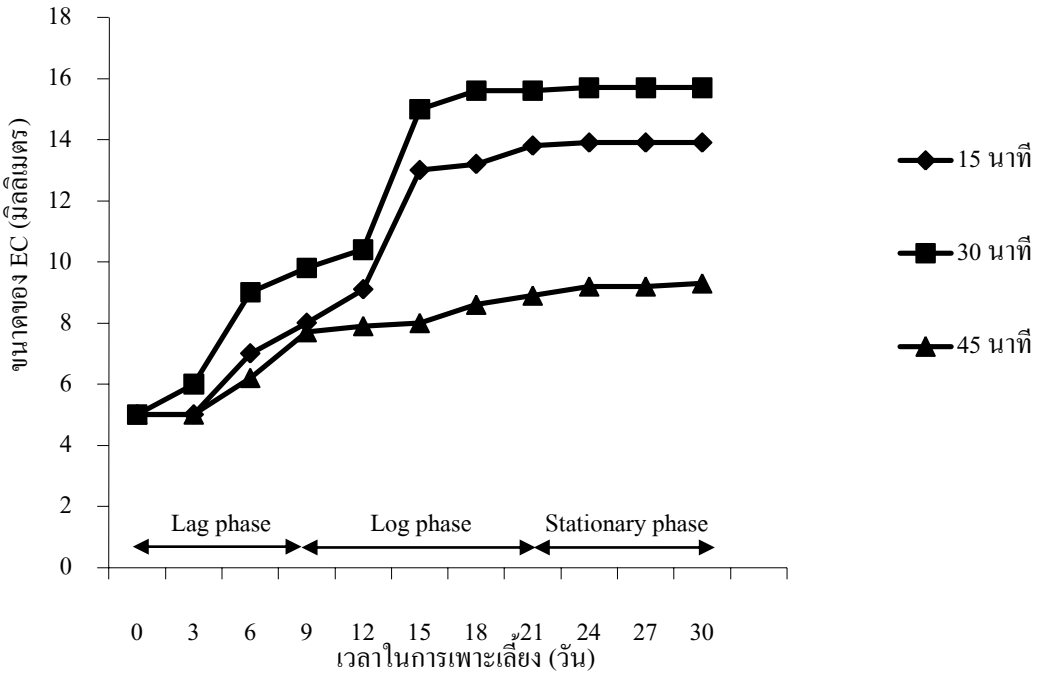
การสร้างบาดแผล	ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (มิลลิเมตร)
ไม่สร้างแผล	24.57
สร้างแผล	32.21
$LSD_{.05}$	3.23
C.V.(%)	40.98



ภาพที่ 9 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังจากสร้างบาดแผลโดยใช้ใบมีดโกน แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 21 วัน (บาร์ = 7.5 มิลลิเมตร)

2.2 ผลของการสร้างบาดแผลโดยใช้เครื่องโซนิเคเตอร์

จากการศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจ นิคแคลลัส โดยการสร้างบาดแผล ใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ สร้างบาดแผลเป็นเวลา 15 30 และ 45 นาที พบว่า การใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เฉลี่ย สูงสุด 15.6 มิลลิเมตร รองลงมา คือ การใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 15 นาที ให้ขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เฉลี่ย 13.9 มิลลิเมตร (ภาพที่ 10) การสร้างบาดแผลด้วยวิธีการนี้ส่งผลใ ห้ระยะ lag phase สั้นลง เหลือเพียง 3 วัน จากนั้นเซลล์มีการแบ่งตัวเร็วขึ้นเข้าสู่ระยะการแบ่งเซลล์แบบเส้นตรงหรือ log phase ส่วนรูปแบบการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสทั้ง 3 เวลาที่ให้คลื่นเสียงเหมือนกัน เป็นแบบ sigmoid curve ลักษณะกราฟเส้นเป็นรูปตัว S โดยอัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในระยะ lag phase อยู่ในช่วง 0-3 วัน ระยะ log phase อยู่ในช่วง 4-15 วัน และระยะ stationary phase อยู่ในช่วงหลังจากวันที่ 15 เป็นต้นไป (ภาพที่ 10)



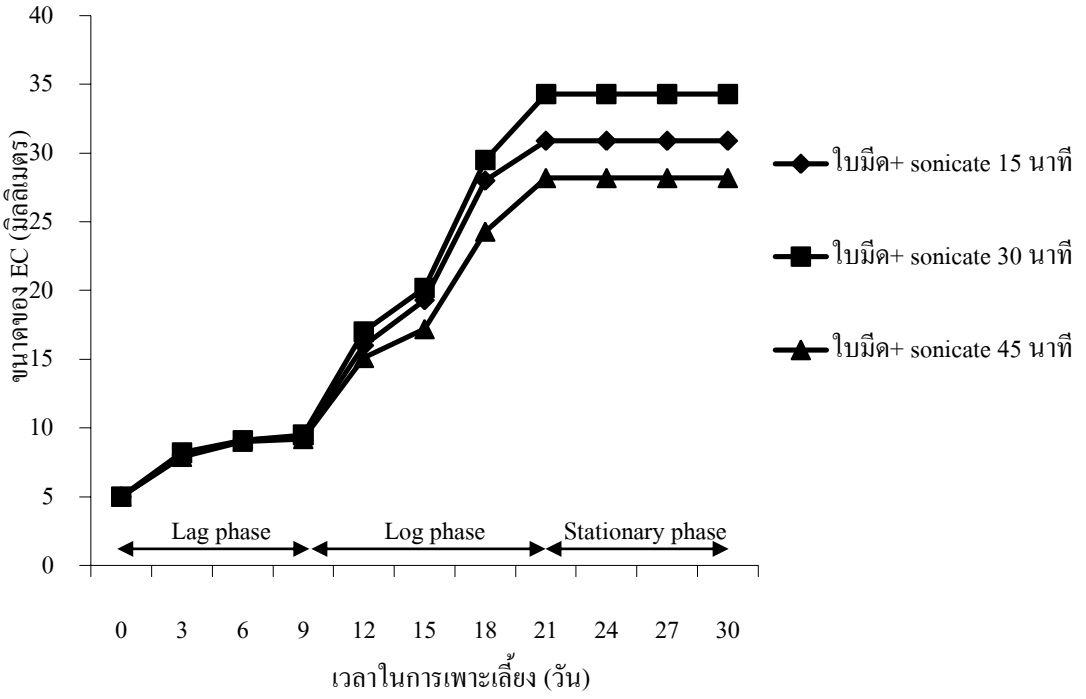
ภาพที่ 10 ผลของการสร้างบาดแผลด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลาต่าง ๆ ต่อการเจริญเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

2.3 ผลของวิธีการสร้างบาดแผล

การสร้างแผลโดยใช้ใบมีดร่วมกับเครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด เฉลี่ย 34.3 มิลลิเมตร รองลงมาคือ การสร้างบาดแผล โดยใช้ใบมีดร่วมกับเครื่องโซนิเคเตอร์ เป็ นเวลา 15 นาที ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เฉลี่ย 31.8 มิลลิเมตร ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย 19.5 มิลลิเมตร ในขณะที่การสร้างบาดแผล โดยการใช้ใบมีดร่วมกับเครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 45 นาที ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ต่ำสุด 28.2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 11) ดังนั้นจึงใช้วิธีการสร้างบาดแผลโดยใช้ใบมีดร่วมกับเครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที มาใช้ศึกษาในการทดลองต่อไป

เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการสร้างบาดแผลทั้ง 3 วิธีข้างต้น เป็นแบบ sigmoid curve ลักษณะกราฟเส้นเป็นรูปตัว S โดยมีระยะ lag

phase อยู่ในช่วง 3-9 วัน ระยะ log phase อยู่ในช่วง 9-21 วัน และระยะ stationary phase อยู่ในช่วง 21 วันเป็นต้นไป การสร้างแผลทั้งสองวิธีร่วมกันส่งผลให้การแบ่งเซลล์ในระยะ log phase นานขึ้นจากเดิม 15 วัน เป็น 21 วัน (ภาพที่ 11)

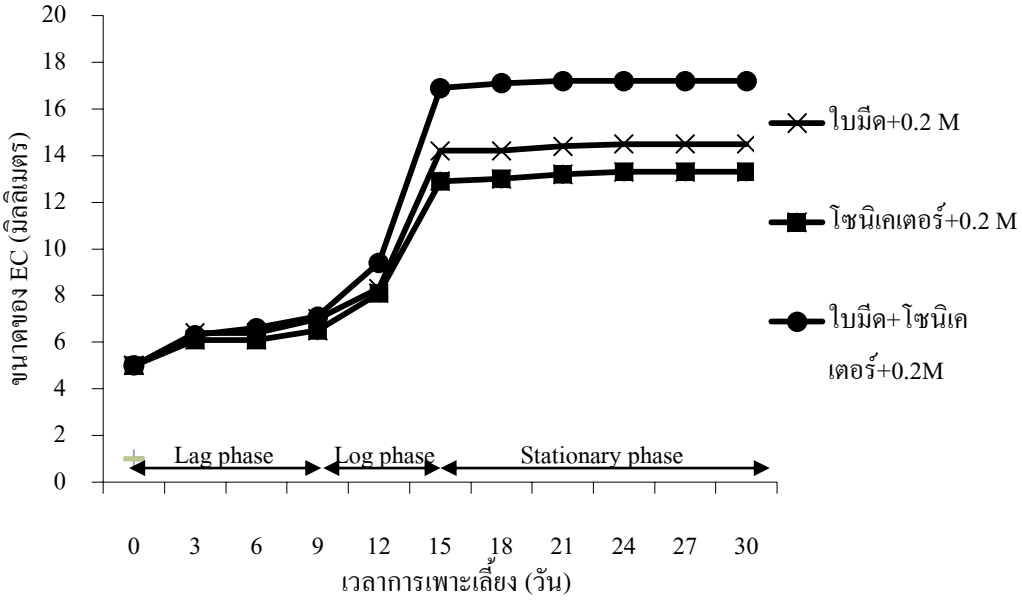


ภาพที่ 11 ผลของการสร้างบาดแผลด้วยวิธีการต่าง ๆ ต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร MS เติม dicanba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

3. ผลของปัจจัยทางกายภาพ ร่วมกับปัจจัยทางเคมีต่อการเจริญ และการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ศึกษาผลของปัจจัยทางเคมีร่วมกับปัจจัยทางกายภาพต่อการ เจริญของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส นั้น พบว่า การสร้างบาดแผลโดยใช้ใบมีดร่วมกับเครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที วางเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เ เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิค แคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 16.9 มิลลิเมตร รองลงมาคือ การสร้างบาดแผ ล โดยใช้ใบมีด ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เฉลี่ย 14.5 มิลลิเมตร ในขณะ ที่การ ใช้ใบมีด และวางเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เ ติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยต่ำสุด 5.1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 12) สำหรับแมนนิทอลทุกความเข้มข้นที่ใช้ไม่ส่งผลต่อการเจริญ และพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม PEG ทุกความเข้มข้น เป็นเวลา 30 วัน ชิ้นส่วนดังกล่าวมีสีน้ำตาล และตายในที่สุด

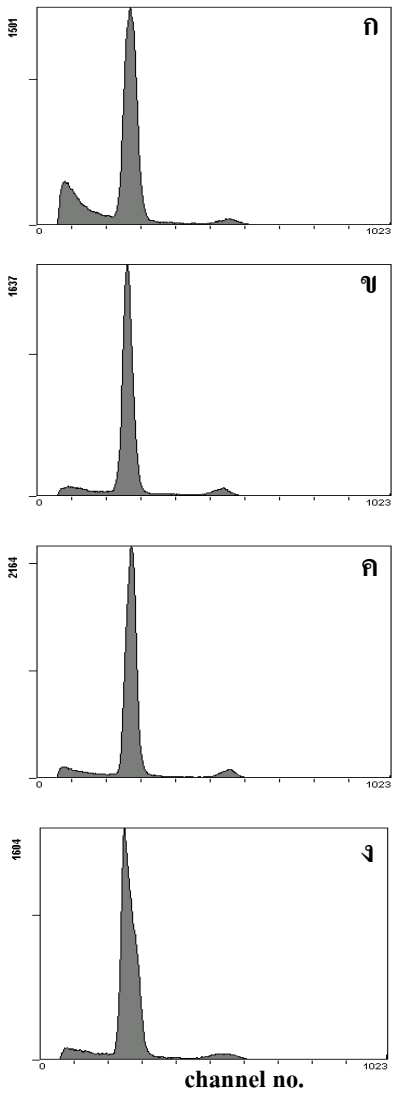
เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการสร้างบาดแผลทั้ง 3 วิธีข้างต้น เป็นแบบ sigmoid curve ลักษณะกราฟเส้นเป็นรูปตัว S โดยมีระยะ lag phase อยู่ในช่วง 3-9 วัน ระยะ log phase อยู่ในช่วง 9-21 วัน และระยะ stationary phase อยู่ในช่วง 21 วัน เป็นต้นไป การสร้างแผลทั้งสองวิธีร่วมกันส่งผลให้การแบ่งเซลล์ในระยะ log phase นานขึ้นจากเดิม 15 วัน เป็น 21 วัน (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ผลของปัจจัยทางกายภาพ และเคมีต่อการเจริญ (ขนาด) ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

4. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในระดับพลอยดี

เมื่อตรวจสอบระดับพลอยดีของแคลลัสที่ได้รับ ปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางกายภาพต่างๆ พบว่า ไม่มีความแตกต่างของ ทุกวิธีการให้ระดับดีเอ็นเอไม่แตกต่าง (ภาพที่ 13) คือยังมีชุดโครโมโซม เป็น 2n แม้ว่าลักษณะ และโครงสร้างของเอ็มบริโอเ จนิคแคลลัสแตกต่างกันก็ตาม



ภาพที่ 13 ระดับพลอยด์ดี ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่เพิ่มปริมาณหลังจากได้รับ ปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางกายภาพ

ก. dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. ใบมีดโกน และเครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที

ค. sorbitol เข้มข้น 0.2 โมลาร์

ง. ใบมีดโกน และเครื่องโซนิเคเตอร์ 30 นาที ซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์

บทที่ 4

วิจารณ์

การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดขึ้นจาก 2 กระบวนการ คือ ออร์กาโนเจเนซีส ซึ่งเป็นกระบวนการสร้างอวัยวะต่าง ๆ เช่น รากหรือยอดจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยง และเอ็มบริโอเจเนซีส ซึ่งเป็นกระบวนการกำเนิดและพัฒนาเป็นต้นอ่อน และเนื่องจากการเพาะเลี้ยงส่วนที่มีองค์ประกอบของเซลล์หรือเนื้อเยื่อของเซลล์ร่างกาย ดังนั้นจึงเรียกกระบวนการนี้ว่าโ ซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิ ส (นิจวรรณ , 2545) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ปาล์มน้ำมัน พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอเป็นแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ ซึ่งมีความสำคัญในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชที่การขยายพันธุ์โดยวิธีปกติทำได้ยาก (Stasolla and Yeung, 2003) พืชหลายชนิดต้องการปัจจัยที่เหมาะสมในการชั กนำเป็นพืชต้นใหม่ที่แตกต่ างกัน โดยมีปัจจัยที่สำคัญดังนี้คือ ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ น้ำตาล (Lou and Kako, 1995; Mamiya and Sakamoto, 2000; David and Wayne, 2001; Nakagawa *et al.,* 2001 Paiva and Otoni, 2003) และสารควบคุมการเจริญเติบโต (Teixeria *et al.,* 1995; Aberlence-Bertossi *et al.,* 1999; Ng, 1999; Te-chato, 1998) ส่วนปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ การสร้างบาดแผล (Fki *et al.,* 2003; Othmani *et al.,* 2009)

พัฒนา การ เป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันโดยผ่ าน กระบวนการพัฒนาในแต่ละระยะ เริ่มต้นจากการวางเลี้ยงเลี้ยงชิ้นส่วน เช่น ช่อดอก (Teixeira *et al.,* 1994) ต้นอ่อนภายในเมล็ด (Kanchanapoom and Tinnongjig, 2001) ใบอ่อนจากต้นกล้า (Te-chato, 1998b) และใบอ่อนจากต้นโตที่ให้ผลผลิตแล้ว (de Touchet *et al.,* 1991) ชักนำให้เกิดแคลลัส สามารถเจริญ และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยแต่ละกระบวนการพัฒนาต้องใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะ ระยะ เวลาในการชักนำให้แคลลัสเริ่มแรกพัฒนาเป็น เอ็มบริโอ เจนิคแคลลัส ใช้ระยะเวลามากกว่า 1 ปี (Khoo *et al.,* 1999) หากสามารถร่นระยะเวลาดังกล่าวให้สั้นลงได้ช่วยให้การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยให้การกลายพันธุ์ลดลงด้วย

สารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba มีผลต่อการเจริญ และการ พัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส อาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเจริญของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสขนาดเฉลี่ยสูงสุด 28.2 มิลลิเมตร ลักษณะของของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

เป็นสีเหลืองอ่อน และมีโครงสร้างคล้ายราก ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ อาสลัน (2545) และซูไฮมิน (2551) ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะสีเหลืองเข้ม ความแตกต่างของความเข้มข้นอาจส่งผลต่อการสร้างเม็ดแป้ง ที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ dicamba ความเข้มข้นสูง (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งเสริมการสร้างเม็ดแป้งจำนวนมากทำให้เม็ดแป้งมีความหนาแน่นสูง และอาจเป็นไปได้ว่ามีการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวกับกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซีสเพิ่มขึ้น (อาสลัน และสมปอง , 2545) มีรายงานว่า dicamba เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพในการชักนำ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้จากการเพาะเลี้ยง ขิงแดง (Kacker *et al.,* 1993) American ginseng (Tirajoh *et al.,* 1998) ลิลลี่ (Tribulato *et al.,* 1997) กล้วย (Novak *et al.,* 1989) เป็นต้น ในทำนองเดียวกับการศึกษานี้พบว่า dicamba เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพในการชักนำและเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน อาสลัน (2545) ปรับปรุงกระบวนการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมันโดยใช้ dicamba เข้มข้น 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำแคลลัส หลังจากนั้นย้ายเลี้ยงแคลลัสลงไปในอาหารสูตรเดิมที่ลดความเข้มข้นของ dicamba เข้มข้น 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นอ่อนที่เกิดขึ้นบนอาหารที่เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การพัฒนาเข้าสู่ระยะสุกแก่ได้เร็ว (Te-chato, 1998b) เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก การลดความเข้มข้นส่งผลต่อพัฒนาการของ โซมาติกเอ็มบริโอแทนที่จะเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

การลดความเข้มข้นของ dicamba ส่งเสริมการเกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเน-ซิสจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อน ของ peach palm (Steinmacher *et al*., 2007) ทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Areca catechu* ในอาหารที่ลดความเข้มข้นของ dicamba ลง ส่งเสริมอัตราการเพิ่มของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และยังส่งเสริมการสร้างต้นอ่อนจำนวนมาก ด้วย (Wang *et al*., 2006) dicamba ส่งเสริมกิจกรรมการแบ่งเซลล์ ในชั้น epidermis และ subepidermis ได้ดี และการเติมกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมในอาหาร ด้วยเป็นการช่วย ลดการสร้างสารประกอบ ฟีนอล และเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดี กรดแอสคอร์บิค นอกจากเป็นสารแอนติออกซิแดนท์แล้วยังช่วยส่งเสริมการสร้างต้นอ่อนชุดแรกอีกด้วย (Te-chato, 1998a)

น้ำตาลแอลกอฮอล์ ในรูปของ ซอร์บิทอล ในการศึกษานี้ส่งเสริม การเจริญ และพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน Hilae และ Te-chato (2005) รายงานผลของซอร์บิทอลที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง สูตร MS ว่าสามารถชักนำ ต้นอ่อนชุดที่สองจาก โซมาติกเอ็มบริโอระยะ สร้างจาว (haustorium embryo (HE)) ขนาด 0.5 เซนติเมตร ของปาล์มน้ำมันได้ 40

เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากน้ำตาลซอร์บิทอล ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าน้ำตาลซอร์บิทอลส่งผลต่อ การเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนภายในเซลล์ อันเนื่องมาจาก เซลล์พืชเกิดสภาวะเครียดน้ำ จึงช่วยเร่งกระบวนการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในการเพาะเลี้ยงแคลลัสปาล์มน้ำมัน (de Touchet *et al.,* 1991) นอกจากนี้ยังพบว่า ซอร์บิทอลมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการหายใจ และการสร้างอาหารสะสม ในการเพาะเลี้ยงแอปเปิ้ล และพืชวงศ์กุหลาบ นอกจากนี้พืชชนิดดังกล่าวอาจมีเอนไซม์บางชนิด เช่น ซอร์บิทอลดีไฮโดรจีเนส และซอร์บิทอล ออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนซอร์บิทอลเป็นกลูโคส และฟรุคโตส ทำให้การแบ่งเซลล์ของพืชรวดเร็วขึ้น อาจส่งผลให้มีการเจริญเติบโตที่ดี (Ahmad *et al.,* 2007) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษา นี้ พบว่า แมนนิทอล และ PEG เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ส่งผลต่อการเจริญพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส น้อยมาก โดยเมื่อวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชลงในอาหารที่เติมน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถส่งเสริมการพัฒนาและการเพิ่มปริมาณได้ อีกทั้งยังทำให้ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงนั้นมีสีน้ำตาลและตายในที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปาล์มน้ำมันไม่มีเอ็นไซม์ที่เปลี่ยนแมนนิทอล และPEG ไปเป็นกลูโคส และฟรุคโตสเหมือนที่ได้กล่าวมาข้างต้น Mark และคณะ (2005) รายงานการใช้น้ำตาล แอลกอฮอล์เพื่อชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของ white spruce พบว่า ซอร์บิทอลมีประสิทธิภาพในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของ white spruce มากกว่าแมนนิทอล สอดคล้องกับการศึกษานี้ที่พบว่าแมนนิทอลเป็นน้ำตาลที่ไม่เหมาะต่อการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เนื่องจากไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนหลังจากเพาะเลี้ยงแต่อย่างใด เหตุผลที่ซอร์บิทอลมีคุณภาพดีกว่าแมนนิทอลนั้นไม่ทราบ ชัดเจน แต่ตามรายงานของ David and Wayne (2001) ซึ่งชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง พบว่า การใช้ซอร์บิทอลส่งเสริมให้โซมาติกเอ็มบริโอมีการสะสมของสาร triglyceride ในขณะที่การใช้แมนนิทอลไม่มีการสะสมของสารดังกล่าว อย่างไรก็ตามการเติมน้ำตาลลงในอาหาร เพื่อส่งเสริม การเจริญ และพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมติกโพเทนเชียลของอาหาร การเติมน้ำตาลความเข้มข้นยิ่งสูงส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของแรงดันออสโมติกสูงขึ้น Mamiya และ Sakamoto (2000) รายงานว่าแรงดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นส่งผลยับยั้งการเจริญของยอดแต่ไม่มีผลต่อการเจริญของราก หน่อไม้ฝรั่ง ดังนั้นการเติมน้ำตาลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นยิ่งสูงขึ้นอาจทำให้เกิดความเป็นพิษ ซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญ และพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส นอกจากนี้น้ำตาล แอลกอฮอล์ ยังจัดเป็นสาร plasmolyzing osmoticum ซึ่งมีความแตกต่างจากสาร non-plasmolyszing osmoticum โดยทั่วไป เช่น PEG จัดเป็น plamolyzing osmoticum สามารถผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์และส่งผลให้เกิด plasmolysis แบบชั่วคราว ซึ่ง

โดยทั่วไปการเติมน้ำตาลในอาหารชักนำการสุกแก่เพื่อกระตุ้นการเกิดสภาวะขาดน้ำ ส่งเสริมเจริญและพัฒนาต่อไป

ผลของปัจจัยทางกายภาพต่อการ เจริญของเอ็มบริโอเจนิคแคลลั ส โดยการใช้ใบมีด สร้างแผลนั้น พบว่า ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย 32.2 มิลลิเมตร การใช้เครื่องโซนิเคเตอร์เป็นเวลา 30 นาที ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลั สเฉลี่ย 15.6 มิลลิเมตร และเมื่อสร้างบาดแผลโดยใช้ใบมีดร่วมกับเครื่องโซนิเคเตอร์ 30 นาที ให้ขนาดข องเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เฉลี่ยสูงสุด 34.3 มิลลิเมตร การสร้างบาดแผลโดยใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้อยกว่าการใช้ใบมีด เนื่องจากเครื่องมือดังกล่าว สร้างบาดแผลด้วยคลื่นเสียง ซึ่งให้ลักษณะของบาดแผลเพียงเล็กน้อยเฉพาะบริเวณเซลล์ผิว เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ใบมีดให้การสร้างบาดแผลขนาดใหญ่ จึงทำให้มีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอล ออกมาในปริมาณที่พอเหมาะที่จะส่งเสริมการแบ่งเซลล์ Wen และคณะ (2009) รายงานว่า การสร้างบาดแผลในชิ้นส่วนพืชนั้นทำให้มีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Othmani และคณะ (2009) ยังรายงานการ สร้างบาดแผลกับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของอินทผลัม โดยใช้ใบมีด ว่าสามารถ ส่งเสริมการพัฒนาของโครงสร้างต้นอ่อนเริ่มต้น เข้าสู่ระยะโซมาติกเอ็มบริโอ และเจริญ พัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้ ในการศึกษานี้พบว่า การสร้างบาดแผลด้วยใบมีดร่วมกับเครื่องโซนิเคเตอร์นั้น เป็นการเพิ่มบาดแผลกับชิ้นส่วนมากกว่าการใช้ใบมีดเพียงอย่างเดียว เนื่องจากทำให้มีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลมากขึ้น สารประกอบฟีนอลในปริมาณที่เหมาะช่วยส่งการแบ่งเซลล์ และการ พัฒนา ของเซลล์ อย่างไรก็ตาม Firoozeh (2010) รายงานว่า สารประกอบฟีนอลในปริมาณเล็กน้อยช่วยส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเนื้อ เยื่อของฝ้าย และสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นต้น

การสร้างบาดแผลโดยใช้ใบมีดร่วมกับเครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 16.9 มิลลิเมตร รองลงมาคือ การสร้างบาดแผล นั้นสามารถช่วยในการเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส แต่เมื่อให้สองปัจจัยร่วมกัน กล่าวคือเมื่อให้ปัจจัยกายภาพ (การสร้างแผลด้วยวิธีการต่าง ๆ) แล้วย้ายแคลลัสไปวางเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ ส่งผลให้ ขนาดของเอ็มบริ โอเจนิคแคลลัสลดลงเป็นอย่างมาก ที่เป็นเช่นนี้เพราะซอร์บิทอลทำให้มีออสโมติกโพเทนเชียล ของอาหารสูงขึ้น ทำให้ แคลลัส ดูดธาตุอาหาร หรือฮอร์โมนได้ยาก และสารประกอบฟีนอลที่ สร้างจากบาดแผลยังช่วย เร่งการสุกแก่ของเซลล์ทำให้การแบ่งเซลล์ลดลง (Fki *et al.,* 2003)

ผลของปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางกายภาพ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง ในระดับพลอยดีของเอ็มบริ โอเจนิคแคลลัส แม้ว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในแต่ละการศึกษามีลักษณะ โครงสร้าง

และสี ตลอดจนขนาดที่แตกต่างกัน ในทำนองเดียวกันนี้ Othmani และคณะ (2009) รายงานว่าการสร้างบาดแผลในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของอินทผลัมนั้น สามารถเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ และมีลักษณะเหมือนกับต้นแม่เดิม สอดคล้องกับการศึกษานี้ ซึ่งพบว่าการสร้างบาดแผลด้วยวิธีการต่าง ๆ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับพลอยดี ในขณะที่ Wen และคณะ (2009) รายงานว่า การสร้างบาดแผลในกล้วยไม้ *Phalaenopsis* โดยการเฉือน PLB ไปเพาะ เลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมส่งเสริมให้ มีการเปลี่ยนแปลงในระดับพลอย ดี กล้วยไม้ต้นใหม่ที่พัฒนามีโครโมโซม 4 ชุด เป็นเตตระพลอย สำหรับสารเคมีนั้น Teixeira และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซิน คือ 2,4-D ที่ความเข้มข้นสูง พบว่า มีผลทำให้เกิดความแปรปรวนในการเพาะเลี้ยงเนื่องเยื่อในปาล์มน้ำมัน สำหรับการศึกษานี้ไม่พบความแปรปรวนในระดับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสแต่อย่างใด อาจเป็นไปได้ว่า ออกซินที่ใช้เป็น dicamba ความเข้มข้นที่ใช้ต่ำมาก 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ Teixeira และคณะ (1995) ชักนำแคลลัสเริ่มแรกในอาหารเติม 2,4-D ความเข้มข้นสูงถึง 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

บทที่ 5

สรุป

อาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดเอ็มบริโอเจนิค แคลลัสเฉลี่ย สูงสุด 28.2 มิลลิเมตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

อาหารแข็งสูตร MS เติม เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย สูงสุด 12.1 มิลลิเมตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

การสร้างบาดแผล โดยใช้ใบมีด ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เฉลี่ย สูงสุด 32.2 มิลลิเมตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน

การสร้างบาดแผล โดยการใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ 30 นาที ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย สูงสุด 15.6 มิลลิเมตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน

การสร้างบาดแผล โดยการ ใช้ใบมีดร่วมกับเครื่องโซนิเคเตอร์ 30 นาที ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย สูงสุด 34.38 มิลลิเมตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน

การสร้างบาดแผล โดยการใช้ใบมีดร่วมกับเครื่องโซนิเคเตอร์ 30 นาที เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้ขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย สูงสุด 16.9 มิลลิเมตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน

ผลของปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางกายภาพ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ ในระดับพลอยดีของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

เอกสารอ้างอิง

เจริญ สิงห์ลอ , สมปอง เตชะโต , อารี กังแฮ และสาลี ดนัยสร . 2532. การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมันเพื่อทวีจำนวนต้นและย่นระยะเวลาการงอก. การสัมมนาทางวิชาการปาล์มน้ำมัน ระหว่างวันที่ 16-17 พฤษภาคม 2532 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

ซูไฮมิน เจ๊ะมะลี . 2551. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราโดยการเพาะเลี้ยงคัพภะ วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ , ชัยรัตน์ นิลนนท์ , ธีระพงศ์ จันทรนิยม , ประกิจ ทองคำ และสมเกียรติ สีสนอง. 2548. เส้นทางสู่ความสำเร็จการผลิตปาล์มน้ำมัน. สงขลา: คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

นภาพร นาคอุดม. 2548. การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิจวรรณ สนิทงาม. 2545. การชักนำพืชต้นใหม่ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสะเดาช้าง (*Azadirachta excels* (Jack) Jacob). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บุษบา ล้อประเสริฐ . 2548 . คู่มือการปลูกปาล์มน้ำมัน . กรุงเทพฯ: ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตร.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. คัมภีร์ปาล์มน้ำมันพืชเศรษฐกิจเพื่อบริโภคและอุปโภค . กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มติชน.

สมปอง เตชะโต , พรชัย เหลืองอาภาพงศ์ , จรัสศรี นวลศรี และวันทนา เอ้งย่อง . 2530. การชักนำแคลลัสปฐมภูมิในปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบอ่อน . วารสารสงขลานครินทร์ 8: 1-6.

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

สมปอง เตชะโต อาสลัน หิเล และอิบรอเฮม ยีดำ. 2547. การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและพืชต้นใหม่จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี. วารสารสงขลานครินทร์ 26: 617-628.

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

สารานุกรมไทยสำหรับเยาชนฯ เล่มที่ 28. 2547. เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร [ออนไลน์]. สืบค้นได้จาก : http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK28/chapter5/t28-5-l2.htm#sect1 (เข้าถึงเมื่อวันที่ 3 มิถุนายน 2552)

อาสลัน หิเล และสมปอง เตชะโต . 2545. การปรับปรุงวิธีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการ โซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน. การประชุมเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษาของประเทศไทย ครั้งที่ 3 วันที่ 18-19 กรกฎาคม 2545 ณ มหาวิทยาลัย เทคโนยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา.

อาสลัน หิเล . 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันทีให้ผลผลิตดีเพื่อการขย ายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

Ahmad, T., Abbasi, N. A., Hafiz, I. A. and Ali, A. 2007. Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677. Pakistan Journal of Botany 39: 1269-1275.

Avril, L. B., Richard, L. B. and Jennet, B. 1986. Regeneration in palm. *In* Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants (ed. I.K. Vasil) Vol. 3, pp. 207-222, London: Academic Press.

Biofuel. 2007. Journey to forever-how to make your own clean burning biofuel, biodisel from cooking oil, fuel alcohol, renewable energy, glycine, soap making [Online]. Available: http://journeytoforever.org/biofuel.html. (Access on June 12, 2009.)

Blaydes, D. F. 1966. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean callus. Physiologia Plantarum 19: 748-753.

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.

Corley, R. H. V., Lee, C. H., Law, I. H. and Wong, C. Y. 1986. Abnormal flower development in oil palm clones. Planter, Kuala Lumpur 62: 233-240.

Corley, R. H. V. and Tinker, P. B. 2003. Vegetative propagation and biotechnology. *In* The Oil Palm (ed. R.H.V. Corley). Vol. 4, pp. 201-215. Great Britain: The Bath Press.

David, R. W. and Wayne, A. P. 2001. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybeen somatic embryos germination and conversion. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 55-62.

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

Duval, Y., Engelmann, F. and Durand-Gasselin, T. 1995. Somatic embryogenesis in oil (*Elaeis guineensis* Jacq.). *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry (ed. Y.P.S. Bajaj) Vol. 30, pp. 335-352, Heidelberg: Springer-Verlag.

Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus inhibition of tissue explants excised from mature coconut palms *(Cocos nucifera* L.) and culture *in vitro*. Physiologia Plantarum 36: 23-28.

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

Firoozeh, C. 2010. The relationship between plant growth regulators for organogenesis and phenolic compound in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Asian Journal Developmental Biology 2: 16-22.

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.

Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N. and Rival, A. 2003. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. Plant Cell Reports 21:517–524.

Gallo-Meagher, M. and Green, J. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68: 253-256.

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.

Kacker, A., Bhat, S. R., Chandel, K. P. S. and Malik, S. K. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32:289-292.

Kanchanapoom, K. and Domyoas, P. 1999. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis quineensis* Jacq.) embryo culture. Science Asia 25: 195-202.

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

Karun, A. and Sajini, K. K. 1996. Plantlet regeneration from leaf explants of oil palm seedlings. Current Science 71: 922-926.

Khoo, E. M., Simon S. and Philip, L. C. 1999. An update of yield performances of clonal oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) planting in BBP oil palm Bhd-sabar. Presented at the Special Meeting on "Potential of the Oil Palm Industry and Clonal Tissue Cultured Oil Palm Development in Southern Thailand"; 6th November 1999, Hotel Meritime, Krabi, Thailand, pp. 1-10.

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. Physiologia Plantarum 15: 473-479.

Lou, H. and Kako, S. 1995. Role of high sugar concentration in inducing somatic emryogenesis from cucumber cotyledons. Scientia Horticulturae 64: 11-20.

Malaysia's Sustainable Palm Oil. 2007. Palm oil facts [Online]. Available: http://www.soyatech.com/Palm_Oil_Facts.htm (Access on August 19, 2009)

Mamiya, K. and Sakamoto, Y. 2000. Effect of sugar concentration and strength of basal medium on conversion of somatic embryos in *Asparagus officinalis* L. Scientia Horticulturae 84: 15-26.

Mark, F. B., Julie, M., Edward, C. Y. and Cladio, S. 2005. The effect of osmoticum on ascorbate and glutathione metabolism during white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development. Plant Physiology and Biochemistry 43: 337-346.

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

Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S. and Ito, A. 2001. Effect of sugar and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. Scientia Horticulturae 90: 85-92.

Ng, S. E. 1999. Challenges for the oil palm plantation industry in the 21st century. Presented at the Special Meeting on "Potential of the Oil Palm Industry and Clonal Tissue Cultured Oil Palm Development in South Thailand"; 6th November 1999, Hotel Meritime, Krabi, Thailand, pp. 1-10.

Novak, F. J., Afza, R., Duren-M. V., Perea-Dallos, M. and Tang, X.L. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) banana (*Musa* spp.). Bio Technology 7: 154-159.

Othmani, A., Bayoudh, C., Drira, N., Marrakchi, M. and Trifi, M. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 97:71-79.

Paiva, N. V. B. and Otoni, W. C. 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture : does it matter?. Scientia Horticulturae 97: 193-202.

Quiroz-Figueroa, F., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M. and Loyola-Vargas, V. M. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 86: 285-301.

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

Sogeke, A. K. 1996. Rapid callus proliferation, somatic embryogenesis and organogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Elaeis 8: 92-103.

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

Steinmacher, D. A., Clement, C. R. and Guerra, M. P. 2007. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 89: 15–22.

Te-chato, S. 1992. Tissue culture of oil palm: Root induction efficiency from young leaf-derived shoot. Songklanakarin Journal of Science and Technology 14: 223-229.

Te-chato, S. and Muangkaewngam, A. 1992. Tissue culture of oil palm: Enhanced root induction efficiency from young leaf-derived shoots. Songklanakarin Journal of Science and Technology 14: 223-229.

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. and Kirby, E. G. 1993. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34: 227-233.

Teixeira, J. B., Sondahl, M. R. and Kirby, E. G. 1994. Somatic embryogenesis from immature inflorescences oil palm. Plant Cell Reports 13: 247-250.

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

Tirajoh, A., Kyung, T. S. and Punja, Z. K. 1998. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in American ginseng (*Panax quinquefolium* L.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology Plant 34: 203-211.

Tribulato, A., Remotti, P. C., Loffer, H. J. M., Lilien-Kipnis, H. Borochov, A. and Halevy, A. H. 1997. Lily regenerative callus and cell culture for transformation. Acta Horticulturae 430: 299-306.

Wang, H. C., Chen, J. T. and Chang, W. C. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. Biologia Plantarum 50: 279-282.

Wang, H. C., Chen, J. T., Wu, S. P., Lin, M. C. and Chang, W. C. 2003. Plant regeneration through somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived callus of *Areca catechu* L. (Arecaceae). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology Plant 39: 34–36.

Wen, H. C., Ching, Y. T., Yu , L. K. 2009. Ploidy doubling by in vitro culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 98: 229-238.

Wooi, K. C. 1995. Vegetative propagation and biotechnology. *In* The Oil Palm (eds. R. H. V. Corley and P. B. Tinker) Vol. 4, pp. 201-215. Great Britain: The Bath Press.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
KH_2PO_4	170
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
ธาตุเหล็ก	
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10
Glycine	2.00
Sucrose 3%, Agar 0.75 %, pH 7.5	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวกาญจนี ทองเทพ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110620004

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Tongtape, K. and Te-chato, S. 2010. Physical and chemical factors affecting growth and development of embryogenic callus of oil palm. Proceeding of the 7th IMT-GT UNINET and the 3rd Joint International PSU-UNS Conferences on BioScience for the Future 2010, October 7-8 (being published).