ผลของสูตรอาหาร กรดแอสคอร์บิค และแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

Effects of Culture Media, Ascorbic Acid and Carbon Sources on Somatic Embryo Induction and Development of Oil Palm SUP-PSU

อภิชญา นุกูลรัตน์

Apitchaya Nukoolrat

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
2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสูตรอาหาร กรดแอสคอร์บิค และแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

ผู้เขียน นางสาวอภิชญา นุกูลรัตน์

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี รามสูตร)

.....กรรมการ

(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ

(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวอภิชญา นุกูลรัตน์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวอภิชญา นุกูลรัตน์)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสูตรอาหาร กรดแอสคอร์บิค และแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

ผู้เขียน นางสาวอภิชญา นุกูลรัตน์

สาขา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

ปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. เป็นปาล์มน้ำมันแบบเทเนอราที่ให้ผลผลิตสูง และทนแล้ง การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิสช่วยให้ได้ต้นกล้าที่มีความสม่ำเสมอจำนวนมาก งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของการสับต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ สำหรับการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโดยวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 0.1 กรัม ที่ผ่านการสับ 50 ครั้ง ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 0.53 กรัม หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ส่วนปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เช่น สูตรอาหาร กรดแอสคอร์บิค ออกซิน และน้ำตาล โดยวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 0.1 กรัม บนอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่า หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน อาหารสูตร Y_3 (Eeuwens, 1978) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมน้ำตาลแล็คโตสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดต้นอ่อนรูปกลม (globular embryo; GE) 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน GE 52.68 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (haustorium embryo; HE) 84.21 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนการเกิด HE 14.01 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (secondary somatic embryo; SSE) 52.63 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนการเกิด SSE 6.67 เอ็มบริโอต่อหลอด ดังนั้นอาหารสูตรนี้จึงเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ในหลอดทดลองต่อไป สำหรับการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว พบว่า อาหาร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ อัตราการสร้างยอดและราก 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 2.5 ยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอดเฉลี่ย 0.58 เซนติเมตร จำนวนรากเฉลี่ย 1.30 รากต่อชิ้นส่วน และความยาวรากเฉลี่ย 1.61 เซนติเมตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน SSE ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการงอก 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดรวม 2.33 ยอดต่อชิ้น และความยาวยอด 1.42 เซนติเมตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

สำหรับอาหารเหลว หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน พบว่าอาหารเหลวสูตร OPCM#1 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 13.5 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์

Thesis Title Effects of Culture Media, Ascorbic Acid and Carbon Sources on Somatic Embryo Induction and Development of Oil Palm SUP-PSU

Author Miss Apitchaya Nukoolrat

Major Program Plant Science

Academic Year 2016

Abstract

SUP-PSU oil palm is one of tenera type. The advantages of this hybrid were high yield and drought tolerance. It needs to propagate by tissue culture technique for uniformity of seedlings. Tissue culture via somatic embryogenesis is an alternative method for propagation of oil palm because it is suitable to mass propagation. Thus, the aim of this research was to study chopping on embryogenic callus proliferation and some factors affecting induction of somatic embryo. For chopping, embryogenic callus chopped at 50 times gave the embryogenic callus fresh weight (0.53 g) higher than that of non-chopped one after 20 days of culture. Embryogenic callus at 0.1 g cultured Y_3 medium with 0.1M lactose, 3% sucrose and 200 mg/L ascorbic acid gave the highest globular embryo (GE) induction at 100%, number of GEs at 52.68 embryos/tube, haustorium embryo (HE) induction at 84.21%, number of HEs at 14.01 embryos/tube, secondary somatic embryo (SSE) induction at 52.63% and number of SSEs at 6.67 embryos/tube after 60 days of culture. Therefore, this medium was suitable for somatic embryo induction and this protocol will be used for effective *in vitro* propagation of oil palm SUP-PSU in the future. For HE germination, the highest survival rate at 90%, shoot and root formation at 10%, average number of shoots per explant at 2.50 shoots, average shoot length at 0.58 cm, average number of roots per explant at 1.30 roots and average root length at 1.61 cm were obtained on PGR-free ½MS medium with 0.2% activated charcoal and 2% sucrose after 60 days of culture. In case of SSE germination, PGR-free MS medium with 200 mg/L ascorbic acid and 3% sucrose gave germination rate at 40%, number of shoots per explant at 2.33 shoots and shoot length at 1.42 cm after 60 days of

culture. In case of liquid medium, PGR-free OPCM#1 medium with 200 mg/L ascorbic acid and 3% sucrose gave the highest SE induction at 100% and number of SEs at 13.5 embryos/flask after 60 days of culture.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร. สุรีรัตน์ เย็นช้อน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมเป็นอย่างสูง ที่คอยอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ ความเข้าใจและสอนทักษะในด้านต่าง ๆ ทั้งการเรียน และการใช้ชีวิตในสังคม ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยตรวจทานแก้ไขเนื้อหา และส่วนต่าง ๆ ภายในวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาวดี รามสูตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. ทัศนี ขาวเนียม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง และให้คำแนะนำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่คอยอบรมสั่งสอน ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และเลี้ยงดูตลอดจนให้ทุนการศึกษา และให้กำลังใจจนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 และสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ ทุนอุดหนุนเพื่อการทำวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัย

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาพืชศาสตร์ และคณาจารย์ทุก ๆ ท่าน ที่ให้การอบรมสั่งสอน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือจนสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ สมาชิกห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติทุกท่าน ที่เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ทั้งให้ความรัก และความจริงใจต่อกันจนสำเร็จการศึกษาด้วยดี

อภิชญา นุกูลรัตน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(12)
สัญลักษณ์ คำย่อ และตัวย่อ	(14)
หนังสือตอบรับตีพิมพ์	(15)
สรุปเนื้อหา	
บทที่ 1 บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	9
บทที่ 2 การทดลอง	
การทดลองที่ 1 ผลของสูตรอาหาร กรดแอสคอร์บิค ออกซิน และแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.	10
การทดลองที่ 2 ผลของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส และ การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอในเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน	37
บทที่ 3 สรุป	49
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	58
ผลงานตีพิมพ์	59
ประวัติผู้เขียน	67

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ผลของการสร้างบาดแผลของชิ้นส่วนต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน	16
2.2	ผลของชนิดของสูตรอาหารต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน	18
2.3	ผลของความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน	20
2.4	ผลของชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ของออกซินต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร Y_3 เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน	23
2.5	ผลของชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน	27
2.6	ผลของผงถ่านต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวบนอาหารสูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน	31
2.7	ผลของชนิดของสูตรอาหารต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	43
2.8	ผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน	46

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
2.1	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันจากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)	12
2.2	การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)	17
2.3	ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน (บาร์ = 0.2 เซนติเมตร)	19
2.4	ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)	21
2.5	ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 เติม dicamba ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)	24
2.6	ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)	25
2.7	ผลของชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่อการชักนำและการงอกของ HE บนอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน	28
2.8	ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลแล็คโตสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (บาร์ = 0.2 เซนติเมตร)	29

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
2.9	ลักษณะการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	32
2.10	การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	32
2.11	ผลของชนิดของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาตรของเซลล์ซัสเพนชั่น ที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน	42
2.12	ลักษณะเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยง 15 วัน (กำลังขยาย 10 เท่า)	42
2.13	ลักษณะเซลล์ซัสเพนชั่นที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	44
2.14	ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (บาร์ = 0.2 เซนติเมตร)	45
2.15	ลักษณะเซลล์ในซัสเพนชั่นที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM#1 ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	47
2.16	ลักษณะเซลล์ในซัสเพนชั่นที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM#1 ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	47

สัญลักษณ์ คำย่อ และตัวย่อ

Y_3	=	Eeuwens medium
MS	=	Murashige and Skoog medium
WPM	=	Woody Plant medium
OPCM	=	Oil palm culture medium
Dicamba	=	3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid
2,4-D	=	2,4-Dichorophenoxyacetic acid
2-iP	=	N^6- (2-isopentenyl) adenine
BA	=	6-benzylaminopurine
NAA	=	α-Naphthaleneacetic acid
PCV	=	Packed cell volume
CRD	=	Completely randomized design
LSD	=	Least significant difference
DMRT	=	Duncan's multiple range test
SE	=	Somatic embryo
PSE	=	Primary somatic embryo
SSE	=	Secondary somatic embryo
GE	=	Goblular embryo
HE	=	Haustorium embryo
EHE	=	Early haustorium embryo
EG	=	Early germination from HE
RE	=	Root emerging from HE
PGR	=	Plant growth regulator

หนังสือตอบรับตีพิมพ์

หนังสือตอบรับตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

วันที่ 1 ธันวาคม 2559

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาตีพิมพ์บทความวิจัย
เรียน ผู้แต่ง (อภิชญา นุกูลรัตน์, สุรีรัตน์ เย็นช้อน และสมปอง เตชะโต)

ตามที่ท่านได้ส่งบทความวิจัยเพื่อนำเสนอในงานประชุมวิชาการพืชสวนครั้งที่ 15 เมื่อวันที่ 9-12 พฤศจิกายน 2559 ในหัวข้อเรื่อง **ผลของกรดแอสคอร์บิค ออกซิน และน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.** ทั้งนี้บทความวิจัยดังกล่าวได้ผ่านการตรวจสอบความมีมาตรฐานทางวิชาการจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิแล้วนั้น จึงตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 3 ฉบับที่ 4 (ตุลาคม-ธันวาคม 2559) ทั้งนี้กองบรรณาธิการฯ จะเผยแพร่ผลงานในรูปแบบ e-journal ซึ่งท่านสามารถดาวน์โหลดบทความต้นฉบับได้จากเว็บไซต์ของวารสารฯ หรือกด http://natres.psu.ac.th/Department/PlantScience/sjps/

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)
บรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

กองบรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์
ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
โทร. 074-286138-39

วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

Songklanakarin Journal of Plant Science

ปีที่ 3 ฉบับที่ 4
ตุลาคม-ธันวาคม 2559
Volume 3 No. 4
October-December 2016

ISSN 2351-0846

SJPS

ภาควิชาพืชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทที่ 1

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้น ใบเลี้ยงเดี่ยว มีการผสมข้ามต้น จัดอยู่ในวงศ์ Palmae หรือ Arecaceae และในสกุล *Elaeis* พันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ คือ *E. guineensis* เนื่องจากเป็นพันธุ์ปลูกที่นิยมปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาบริเวณตอนกลางและตะวันตกของทวีป สายพันธุ์ของปาล์มน้ำมันชนิดนี้จำแนกออกได้ 3 แบบ คือ ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา แบบที่มีการปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน คือ แบบเทเนอรา (ธีระ และคณะ, 2543) ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันชนิดเดียวของโลกที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับพืชน้ำมันอื่นทุกชนิด ประเทศไทยเริ่มปลูกปาล์มน้ำมันเพื่อการค้าครั้งแรกในปี พ.ศ. 2511 ปัจจุบันประเทศที่มีปริมาณการผลิตน้ำมันปาล์มจัดอยู่ในอันดับ 1 ของโลก คือ ประเทศอินโดนีเซีย รองลงมาคือประเทศมาเลเซีย และประเทศไทยตามลำดับ (ธีระ, 2554) ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันที่ใช้ประโยชน์ทั้งด้านการบริโภคและอุปโภค เช่น ใช้น้ำมันโอเลอีนทำอาหารในครัวเรือน หรือใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ ที่ต้องมีการทอด เนยเทียม ไอศครีม ขนมขบเคี้ยว และลูกกวาด ครีมเทียมประเภทต่าง ๆ สบู่ และผงซักฟอก รวมถึงการผลิตเชื้อเพลิงเพื่อใช้กับเครื่องยนต์ เป็นต้น (ธีระ และคณะ, 2546) ปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. เป็นปาล์มน้ำมันแบบเทเนอราได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดย ศาสตราจารย์ ดร. ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ จากภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้ปรับปรุงพันธุ์ขึ้นเพื่อให้มีลักษณะพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ทนแล้ง และสามารถปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้าม ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดทำให้พันธุกรรมของชั่วรุ่นลูกที่ได้ไม่มีความสม่ำเสมอ และทำให้ศักยภาพในการให้ผลผลิตของต้นปาล์มน้ำมันแต่ละต้นแตกต่างกัน ดังนั้นการพัฒนาโคลนของปาล์มน้ำมันจึงต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งใช้ชิ้นส่วนที่ไม่เกี่ยวกับเพศมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ลักษณะพันธุ์ที่เหมือนเดิม ชิ้นส่วนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมันที่ประสบความสำเร็จ เช่น การเพาะเลี้ยงคัพภะ (Te-chato, 1998) ช่อดอก (Teixeira *et al*., 1994) ชิ้นส่วนใบอ่อนจากต้นกล้าและใบอ่อนจากต้นที่ให้ผลผลิตแล้ว (สมปอง และคณะ, 2547) และราก (Wooi, 1995) เป็นต้น ซึ่งจะพัฒนาผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิสเป็นโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 (Primary somatic embryo ; PSE) โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (Secondary somatic embryo ; SSE) และงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอ ได้แก่ องค์ประกอบของธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต สารแอนติออกซิแดนท์ และแหล่งคาร์บอนในรูปของน้ำตาล เป็นต้น ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของสูตรอาหาร กรดแอสคอร์บิค สาร

ควบคุมการเจริญเติบโต และน้ำตาล ต่อการพัฒนา และการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ แล้วชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ในปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. เพื่อให้ได้ต้นที่สมบรูณ์ ไม่เป็นโรค มีลักษณะพันธุ์เหมือนเดิม และเป็นการเพิ่มปริมาณพันธุ์ของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. เชิงการค้าต่อไป

การตรวจเอกสาร

พันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ คือพันธุ์ *E. guineensis* และที่นิยมปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันเป็นพันธุ์ลูกผสมแบบเทเนอราซึ่งได้รับการผสมข้ามระหว่าง แม่พันธุ์ดูรา และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา

ปาล์มน้ำมันโดยทั่วไปจะแยกความแตกต่างตามลักษณะผลแบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ

1. ลักษณะแบบดูรา จะมีกะลาหนา และไม่มีวงเส้นประสีดำอยู่รอบกะลา มีเปลือกชั้นนอกบาง 35-60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผล และมียีนควบคุมลักษณะผลเป็นยีนเด่น Sh+Sh+

2. ลักษณะแบบพิสิเฟอรา มียีนควบคุมลักษณะผลเป็นยีนด้อย Sh-Sh- ลักษณะผลมีกะลาบางหรือไม่มีกะลา มีข้อเสียคือช่อดอกตัวเมียมักจะเป็นหมันทำให้ผลลีบฝ่อ ทะลายเล็ก เนื่องจากผลไม่พัฒนา ให้ผลผลิตต่ำ ไม่ใช้ปลูกเป็นทางการค้า

3. ลักษณะแบบเทเนอรา มีกะลาบาง มีวงเส้นประสีดำอยู่รอบกะลา มีชั้นเปลือกนอกมาก 60-90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผล เทเนอรามียีนควบคุมแบบ Sh+Sh- เป็น heterozygous

ปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. เป็นปาล์มน้ำมันแบบเทเนอราได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดย ศาสตราจารย์ ดร. ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ จากภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้ปรับปรุงพันธุ์ขึ้นเพื่อให้มีลักษณะพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ทนแล้ง และสามารถปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันสามารถขยายพันธุ์ได้ 2 วิธี คือ การขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (นภาพร, 2548) เนื่องจากปาล์มน้ำมันมีการเจริญเติบโตจากเนื้อเยื่อปลายยอดเพียงอย่างเดียว จึงทำให้ไม่มีการแตกหน่อ หรือกิ่งแขนง จึงไม่สามารถขยายพันธุ์โดยวิธีไม่อาศัยเพศทั่วไปได้ เช่น การตอนกิ่ง ปักชำ และการติดตา ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายถึงการนำชิ้นส่วนพืชมาทำให้สะอาดปราศจากเชื้อโรค แล้วนำมาวางเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ในสภาพปลอดเชื้อ วางเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (สมปอง, 2539) ในพืชผสมข้ามพวกปาล์มน้ำมันซึ่งปกติมีการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดพันธุ์ลูกผสม อย่างไรก็ตามพันธุกรรมของลูกผสมที่ได้ไม่สม่ำเสมอ และทำให้ศักยภาพในการให้ผลผลิตของต้นปาล์มน้ำมันจากเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแต่ละชุดแตกต่างกัน แม้ว่าในปาล์มน้ำมันจะมีการผลิตพันธุ์เมล็ดลูกผสมเทเนอรา โดยใช้วิธีการควบคุมการผสมพันธุ์ระหว่างต้นแม่ดูรากับต้นพ่อพิสิเฟอราก็ตาม แต่เนื่องจากต้นพ่อแม่พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการผสมพันธุ์ไม่ได้เป็นสายพันธุ์แท้มากเพียงพอที่จะทำให้ได้พันธุ์ลูกผสมที่มีความสม่ำเสมอเช่นเดียวกับพืชอื่นบางชนิด เช่น ข้าวโพด สาเหตุสำคัญ คือ 1. การพัฒนาสายพันธุ์แท้ในปาล์มน้ำมันต้องใช้เวลานาน 2. มีความรุนแรงในการเกิดลักษณะเสื่อมถดถอยสูง 3. ต้นพ่อพันธุ์พิสิเฟอราที่ใช้ในการผลิตลูกผสมมักมีลักษณะการเป็นหมันของช่อดอกเพศเมียทำให้ไม่มีโอกาสในการพัฒนาเป็นสายพันธุ์แท้ได้ ดังนั้นการพัฒนาโคลนของปาล์มน้ำมันจึงต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ธีระ, 2554) การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ได้โดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (Te-chato, 1998) ช่อดอก (Teixeira *et al*., 1994) ชิ้นส่วนใบอ่อนจากต้นกล้าและใบอ่อนจากต้นที่ให้ผลผลิตแล้ว (สมปอง และคณะ, 2547) และราก (Wooi, 1995) เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิส

โซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิส (Somatic embryogenesis) คือ การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อร่างกายซึ่งจะมีการพัฒนาเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้คือ เปลี่ยนจากเอ็มบริโอรูปกลมเป็นรูปหัวใจ รูปตอร์ปิโด และต้นกล้า ตามลำดับ (คำนูณ, 2542) การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากกระบวนการ Somatic embryogenesis จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชนับว่ามีประโยชน์มากต่อการขยายพันธุ์ เพราะสามารถที่จะผลิตต้นอ่อนเป็นจำนวนมาก มีพันธุกรรมเหมือนต้นแม่เดิมทุกประการ เพราะชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงเป็นชิ้นส่วนที่ไม่เกี่ยวกับเพศ หรือแม้จะเป็นชิ้นส่วนที่เกี่ยวกับเพศ แต่หากต้นอ่อนพัฒนามาจากเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์เพศ ต้นที่ได้ยังคงเหมือนต้นแม่เดิม มีรายงานการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในพืชหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน (Hilae and Te-chato, 2005) มะพร้าว (Perera *et al*., 2008) และอินทผลัม (Eke *et al*., 2005) เป็นต้น การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันจะมีการพัฒนาผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิสเป็นโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 1 (Primary somatic embryo; PSE) โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (Secondary somatic

embryo; SSE) และงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ ซึ่งมีหลายปัจจัยด้วยกันที่ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เช่น องค์ประกอบของธาตุอาหาร สารแอนติออกซิแดนท์ สารควบคุมการเจริญเติบโต และแหล่งคาร์บอนในรูปของน้ำตาล เป็นต้น ขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิสโดยผ่านแคลลัสมีด้วยกัน 3 ขั้นตอนหลัก คือ การชักนำแคลลัส การชักนำและเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

การชักนำ และเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

แคลลัสเกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ คัพภะ เนื่องจากชิ้นส่วนเหล่านี้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น อิพิเดอร์มิส คอร์เทกซ์ เนื้อเยื่อลำเลียง ซึ่งแต่ละชั้นจะประกอบไปด้วยเซลล์ต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน ทำให้การเจริญแต่ละชั้นแตกต่างกัน แคลลัสเป็นเซลล์พาเรนไคมาที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะ หรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ ในปาล์มน้ำมันมีการชักนำแคลลัสได้จากหลายชิ้นส่วน เช่น คัพภะ (ซูไฮมิน, 2551; Thawaro and Te-chato, 2009) ช่อดอก (Jayanthi *et al*., 2015) และใบอ่อน (Constantin *et al*., 2015) เป็นต้น

การเพิ่มปริมาณแคลลัสเป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญในการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลองโดยผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิสจนพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัส เช่น การสับด้วยใบมีดผ่าตัดเพื่อเป็นการสร้างบาดแผลให้กับแคลลัส Othmani และคณะ (2009) รายงานว่าการสับแคลลัสของอินทผลัม ก่อนนำไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม 2,4-Dichorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด 3 เท่า กาญจนี (2553) รายงานการสร้างบาดแผลให้กับโนดูลาแคลลัสของปาล์มน้ำมันโดยใช้ใบมีด พบว่า การสร้างบาดแผลสามารถชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้มากกว่าชิ้นส่วนที่ไม่มีการสร้างบาดแผล จากรายงานข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการสร้างบาดแผลให้กับชิ้นส่วนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิสให้ประสบความสำเร็จนั้นต้องอาศัยปัจจัยหลาย ๆ ปัจจัยด้วยกันในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอตลอดจนสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้

1. องค์ประกอบของธาตุอาหาร

พืชแต่ละชนิด หรือแต่ละอวัยวะต้องการธาตุอาหารที่แตกต่างกันทั้งชนิด และปริมาณ ฉะนั้นสูตรอาหารที่เลือกใช้เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การศึกษาในแต่ละระยะของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประสบความสำเร็จในการเกิดเป็นพืชต้นใหม่ (สมปอง, 2538) ปริมาณธาตุอาหารที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เช่น การลดปริมาณไนโตรเจน และเพิ่มปริมาณโพแทสเซียมจะช่วยส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจนิซิส นอกจากนี้ความเข้มข้นของเกลือก็ช่วยส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจนิซิสด้วย สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของปาล์มน้ำมันมีหลายสูตรด้วยกัน เช่น อาหารสูตร MS อาหารสูตร Y_3 (Eeuwens, 1978) และอาหารสูตร WPM (Lloyd and McCown, 1980) เป็นต้น อาหารแต่ละสูตรมีองค์ประกอบของธาตุอาหารที่แตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การใช้งาน และชิ้นส่วนของพืชที่เพาะเลี้ยง (สมปอง, 2539) ซูไฮมิน (2551) รายงานการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (Haustorium embryo; HE) Kanchanapoom และ Damyaos (1999) วางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร Y_3 ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถส่งเสริมให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ Teixeira และคณะ (1993) ได้ใช้ชิ้นส่วนของคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันหลังการผสมเกสร 193 วัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 พบว่า ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 93 เปอร์เซ็นต์ Te-chato (1998) เพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ให้การสร้างแคลลัสดีที่สุด

2. สารแอนติออกซิแดนท์

สารแอนติออกซิแดนท์ เช่น กรดแอสคอร์บิค มีส่วนช่วยให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันประสบความสำเร็จ กรดแอสคอร์บิค หรือวิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยลดการสร้างสารประกอบฟินอล มีบทบาทในกระบวนการทางสรีรวิทยา เช่น การแบ่งเซลล์ และการเจริญเติบโตของพืช (Wolucka *et al.,* 2005) การเติมสารแอนติออกซิแดนท์ร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงมีส่วนช่วยให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประสบความสำเร็จ Te-chato (1998) รายงานว่า การใช้กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับอาหารพบว่า สามารถลดการสร้างสารประกอบฟินอล ลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนพืช เพื่อส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของแคลลัส และการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ Habibi และคณะ (2009) รายงานว่าการใช้กรดแอสคอร์บิคร่วมกับอาหารสามารถส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของ *Themeda quadrivalvis* ได้ดี

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตโดยเฉพาะกลุ่มของออกซินมีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ออกซินมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการแบ่งเซลล์ และการใช้ความเข้มข้นของออกซินสูงในระยะเริ่มแรกเพื่อชักนำแคลลัส และเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ในปริมาณมากอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นลดความเข้มข้นของออกซินให้ต่ำลง หรือไม่เติมเลยจะชักนำให้เกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิสได้

Kanchanapoom และ Tinnongjig (2001) วางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร Y_3 เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน เพื่อชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น จากนั้นย้ายเลี้ยงไปในอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 21 วัน สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สำเร็จ ศตปพร และสมปอง (2557) รายงานว่าการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM (Oil palm culture medium) เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 0.33 กรัม และให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด 30 เปอร์เซ็นต์ และ Eshraghi และคณะ (2005) รายงานว่าการใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของอินทผลัมสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในระยะรูปกลมโดยวางเลี้ยงในอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 453 ไมโครโมลาร์ N^6- (2-isopentenyl) adenine (2-iP) เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ และ 6-benzylaminopurine (BA) เข้มข้น 13 ไมโครโมลาร์ Chehmalee และ Te-chato (2008) รายงานว่าโซมาติกเอ็มบริโอในขั้นตอนสุดท้ายระยะสร้างจาวหรือใบเลี้ยงที่เรียกว่า Haustorium embryo (HE) ของปาล์มน้ำมันลูกผสม 865(D)×110(P) ให้อัตราการเกิด HE สูงสุด 14 เปอร์เซ็นต์ จากแคลลัสเริ่มแรกที่เลี้ยงในอาหาร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร Kramut และ Te-chato (2010) รายงานว่าสามารถชักนำแคลลัสของปาล์มน้ำได้สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร MS ที่เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเริ่มเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในระยะรูปกลมหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน Friable embryogenic tissue (FET) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น โดยให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ (Packed cell volume; PCV) เป็น 2 เท่า หลังจากเพาะเลี้ยง 15 วัน ในส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า 2,4-D เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหาร MS ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.25 มิลลิลิตร และมีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 2-4 มิลลิเมตร จำนวน 20 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์

4. แหล่งคาร์บอน

น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการสังเคราะห์แสง และยังสามารถควบคุมออสโมติกของอาหารเพาะเลี้ยงส่งเสริมให้พืชเกิดสภาวะเครียดน้ำ ในส่วนของการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ ซึ่งเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ บนอาหารแข็งพบว่า อาหารสูตร ½MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในระยะ HE สูงสุด 32 เปอร์เซ็นต์ Hilae และ Te-chato (2005) รายงานการใช้อาหารสูตร MS ร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำ SSE ในปาล์มน้ำมันได้ 40 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซอร์บิทอลที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำหน้าที่เป็นแหล่งของคาร์บอนและควบคุมออสโมติกของอาหารเพาะเลี้ยงทำให้ความเป็นประโยชน์ของน้ำลดลง หรือเกิดสภาวะเครียดน้ำซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาและการงอกของ SSE ไปเป็นยอด หรือการพัฒนาของราก และในอาหารที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอลส่งเสริมให้ HE สร้าง SSE จำนวนสูงที่สุด ชูไฮมิน (2551) รายงานว่าการนำ HE มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำ SSE ในปาล์มน้ำมันได้ 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 15.81 เอ็มบริโอต่อ HE Kochba และคณะ (1982) รายงานว่าการใช้น้ำตาลแล็คโตส 110 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับอาหารสามารถส่งเสริมการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอได้ดี Tomaz และคณะ (2001) พบว่า น้ำตาลแล็คโตสมีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากแคลลัสของส้มวาเลนเซีย ส้มหวาน และส้มแมนดาริน อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการใช้น้ำตาลแล็คโตสในปาล์มน้ำมัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของสูตรอาหารดัดแปลงต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน
2. เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการชักนำของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน
3. เพื่อประยุกต์วัตถุประสงค์ข้อ 1 และข้อ 2 ต่อการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. เชิงการค้าในอนาคต

บทที่ 2

การทดลองที่ 1

ผลของสูตรอาหาร กรดแอสคอร์บิค ออกซิน และแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

Effects of Culture Media, Ascorbic Acid, Auxins and Carbon Sources on Somatic Embryo Induction and Development of Oil Palm SUP-PSU

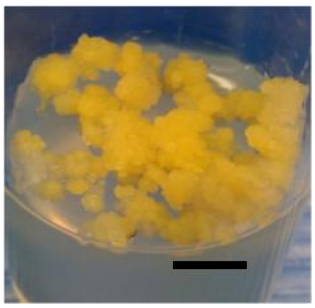
บทนำ

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีด้วยกัน 2 กระบวนการ คือ หลังจากวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชสามารถพัฒนาเป็นส่วนของยอด หรือราก เรียกว่า organogenesis ส่วนการเกิดพืชต้นใหม่โดยผ่านการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ เหมือนกับการสร้างเอ็มบริโอจากการผสมพันธุ์ (Embryogenesis) เรียกเอ็มบริโอที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่างกายว่าโซมาติกเอ็มบริโอ (Somatic embryo; SE) หรือ Embryoid ซึ่งเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ พืชทั่วไปมีระยะการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 4 ระยะ คือ เอ็มบริโอระยะรูปกลม รูปหัวใจ รูปตอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง (คำนูณ, 2542) สำหรับในปาล์มน้ำมันที่ขยายพันธุ์ด้วยกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิสนั้นเห็นพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอเพียง 2 ระยะที่ชัดเจน คือ ระยะรูปกลม (Globular embryo; GE) และระยะสร้างจาว (Haustorium embryo; HE) (อาสลัน, 2545) ต้นที่ได้ยังคงเหมือนต้นแม่เดิม มีรายงานการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในพืชหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน (Hilae and Te-chato, 2005) มะพร้าว (Perera *et al*., 2008) และอินทผลัม (Eke *et al*., 2005) เป็นต้น ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เช่น ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงต้องยังอ่อนอยู่ ส่วนประกอบของธาตุอาหารโดยการลดปริมาณธาตุไนโตรเจน และเพิ่มปริมาณธาตุโปแตสเซียม สารแอนติออกซิแดนท์ สารควบคุมการเจริญเติบโตโดยเฉพาะในกลุ่มของออกซิน ในระยะเริ่มแรกใช้ออกซินความเข้มข้นสูงเพื่อการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัส จากนั้นลดความเข้มข้นของออกซินให้ต่ำลง หรือไม่เติมออกซินเลย และแหล่งคาร์บอนในรูปของน้ำตาลสามารถควบคุมออสโมติกของอาหารเพาะเลี้ยงส่งเสริมให้พืชเกิดสภาวะเครียดน้ำทำให้พืชมีการสร้างกรดอะมิโน และคาร์โบไฮเดรตมากขึ้น ทำให้ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดี ดังนั้นจากปัจจัยดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน กรดแอสคอร์บิค น้ำตาลซอร์บิทอล และน้ำตาลแล็คโตสต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ลูกผสมเทเนอรา C3/77(25) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสดังกล่าวเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Oil palm culture medium 1 (OPCM#1) เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ทำการย้ายเลี้ยงทุก ๆ เดือน เป็นเวลา 3 เดือน (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันจากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

วิธีการศึกษา

1. การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

1.1 ศึกษาผลของการสร้างบาดแผลของชิ้นส่วนต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส น้ำหนัก 0.1 กรัม มาสร้างบาดแผลโดยการสับจำนวน 50 ครั้ง และวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM#1 ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน บันทึกน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเปรียบเทียบกันระหว่างการสับ และไม่สับแคลลัสโดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี T-test แต่ละชุดการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

2. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

2.1 ศึกษาผลของชนิดของสูตรอาหารต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส น้ำหนัก 0.1 กรัม วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS Y_3 WPM และ OPCM#1 (ตารางภาคผนวกที่ 1) ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน บันทึกน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดเปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least significant difference (LSD) แต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้ำหนัก 0.1 กรัม วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 0 50 100 150 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน บันทึกอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

2.3 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้ำหนัก 0.1 กรัม วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.2 ร่วมกับการเติม dicamba เข้มข้น 0 0.05 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเติม 2,4-D เข้มข้น 0 0.05 0.1 0.2 0.4 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน บันทึกอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิด และความเข้มข้นของออกซินโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

2.4 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้ำหนัก 0.1 กรัม วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.3 ร่วมกับการเติมน้ำตาลแล็คโตส หรือ ซอร์บิทอล เข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 โมลาร์ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน บันทึกอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาล โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

3. การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

3.1 ผลของผงถ่านต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว

นำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว จากการศึกษาที่ 2.4 มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับผงถ่าน 0 0.10 0.15 0.20 0.25 0.30 และ 0.35 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมล

ต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน บันทึกอัตราการรอดชีวิต อัตราการเกิดยอด จำนวนยอด อัตราการสร้างราก จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก และความยาวราก เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของผงถ่านโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละชุดการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

3.2 การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2

นำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 จากการศึกษาที่ 2.4 วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน บันทึกอัตราการงอก จำนวนยอดรวม และความยาวยอด

ผลการศึกษา

1. การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

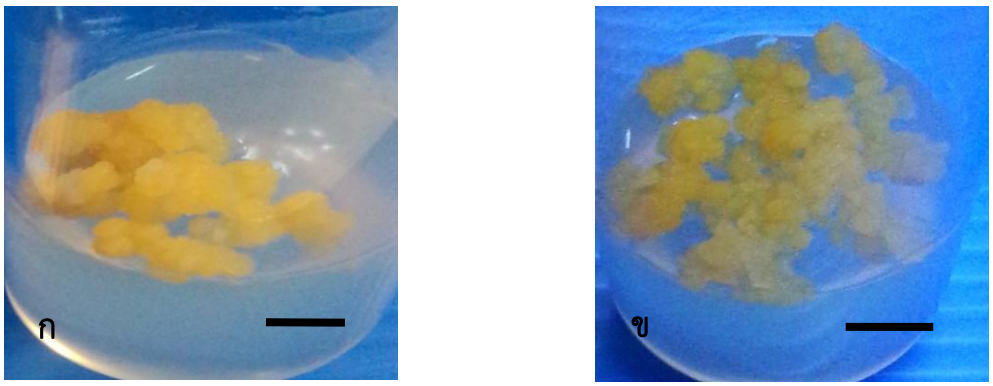
1.1 ศึกษาผลของการสร้างบาดแผลของชิ้นส่วนต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

จากการทดลองวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ผ่านการสับ 50 ครั้ง และไม่สับ บนอาหารสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 วัน พบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ผ่านการสับสามารถให้น้ำหนักสด 0.53 กรัม สูงกว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ไม่ผ่านการสับซึ่งให้น้ำหนักสดแคลลัส 0.40 กรัมต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเริ่มต้น 0.1 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 2.1, ภาพที่ 2.2) คิดเป็น 1.3 เท่าของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ไม่สับ ผลของการทดลองสับและไม่สับของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 2.1 ผลของการสร้างบาดแผลของชิ้นส่วนต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส บนอาหารสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน

การสับ (ครั้ง)	น้ำหนักสดแคลลัส (กรัม)
0	0.40
50	0.53
T-test	*
C.V. (%)	9.70

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดยวิธี T-test ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 2.2 การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก. ลักษณะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ไม่สับ
ข. ลักษณะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ผ่านการสับ

2. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

2.1 ศึกษาผลของชนิดของสูตรอาหารต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากผลการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหาร 4 สูตร คือ MS Y_3 WPM และ OPCM#1 อาหารทุกสูตรเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า อาหารสูตร MS ให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 0.41 กรัมต่อน้ำหนักเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเริ่มต้น 0.1 กรัม มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับสูตรอาหารอื่น ๆ รองลงมาคือ อาหารสูตร OPCM#1 Y_3 และ WPM ให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 0.40 0.39 และ 0.36 กรัมต่อน้ำหนักเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเริ่มต้น 0.1 กรัม ตามลำดับ ในส่วนของการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอพบว่าอาหารสูตร Y_3 สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 12 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 2 เอ็มบริโอต่อหลอด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับสูตรอาหารอื่น ๆ โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้มีลักษะทึบ มีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม (ตารางที่ 2.2, ภาพที่ 2.3)

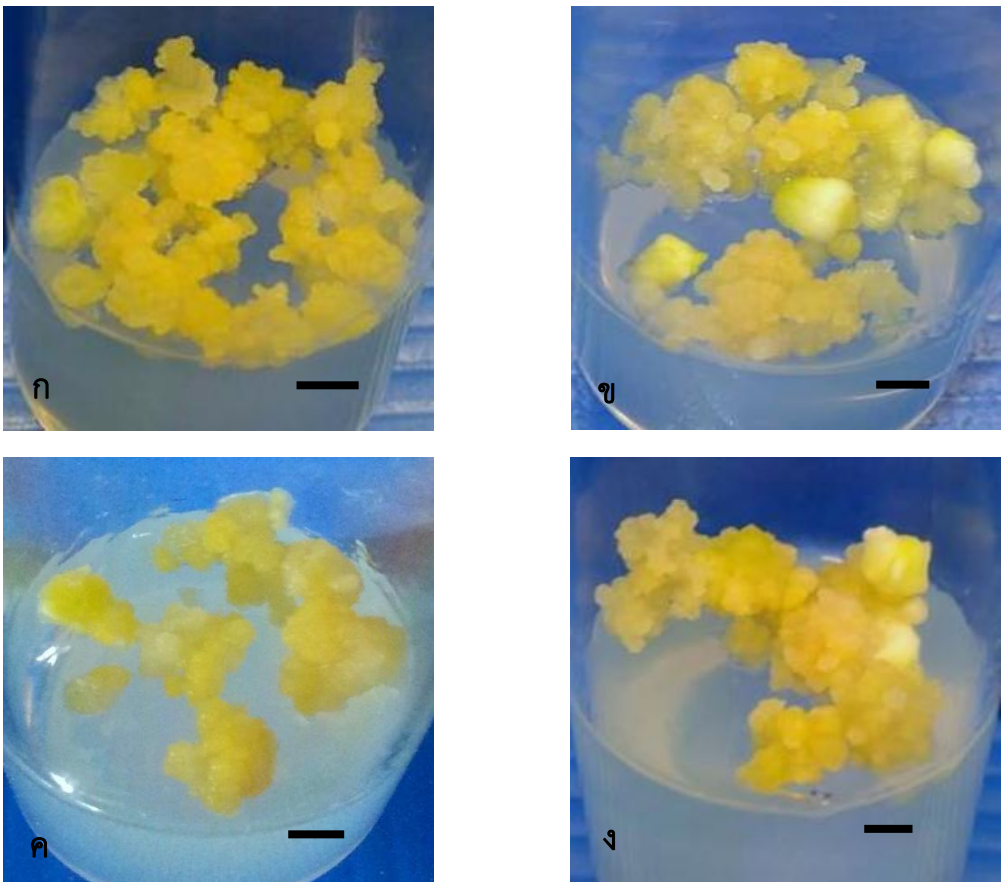
ตารางที่ 2.2 ผลของชนิดของสูตรอาหารต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสดแคลลัส (กรัม)	การเกิด SE (%)	จำนวน SE ต่อหลอด
MS	0.41a	9.10	1.00
Y_3	0.39b	12.00	2.00
WPM	0.36c	4.17	1.00
OPCM#1	0.40ab	10.00	1.00
F-test	*	ns	ns
C.V. (%)	9.63	71.01	42.16

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดยวิธี LSD



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน (บาร์ = 0.2 เซนติเมตร)

ก. อาหารสูตร MS
ข. อาหารสูตร Y_3
ค. อาหารสูตร WPM
ง. อาหารสูตร OPCM#1

2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอพบว่า อาหารสูตร Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 32 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 1.27 และ 1.75 เอ็มบริโอต่อหลอด ตามลำดับ (ตารางที่ 2.3) โซมาติก

เอ็มบริโอที่ชักนำได้มีลักษณะทึบสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 2.4) ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอไม่แตกต่างกันทางสถิติ อาหารที่เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด

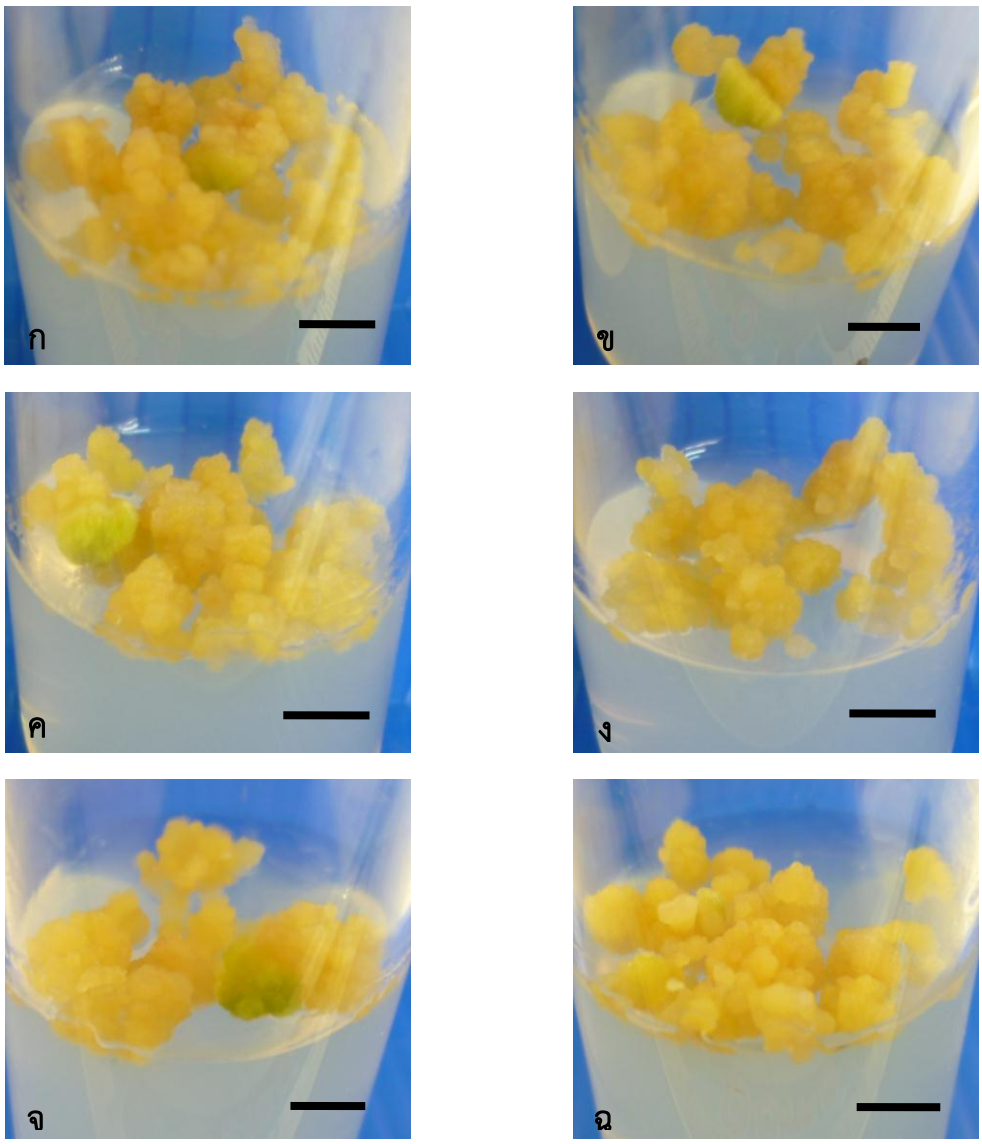
ตารางที่ 2.3 ผลของความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน

กรดแอสคอร์บิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การเกิด SE (%)	จำนวน SE ต่อหลอด
0	26.09ab	1.00
50	22.73abc	1.25
100	32.00a	1.27
150	8.70c	1.00
200	32.00a	1.75
250	12.00bc	1.67
F-test	*	ns
C.V. (%)	55.82	49.34

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.4 ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก. ไม่เติมกรดแอสคอร์บิค
ข. เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
ค. เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
ง. เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร
จ. เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
ฉ. เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นต่าง ๆ ของ dicamba และ 2,4-D ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร Y_3 เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า อาหารสูตร Y_3 ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยให้อัตราการเกิด GE สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) จำนวน GE 22.14 เอ็มบริโอต่อหลอด มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ให้อัตราการเกิด HE 81.82 เปอร์เซ็นต์ และจำนวน HE 2.28 เอ็มบริโอต่อหลอด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2.4) สำหรับ GE ที่ชักนำได้มีลักษะกลมและใส ส่วน HE ที่ได้มีลักษณะขุ่นทึบ มีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 2.5ก)

ตารางที่ 2.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ของออกซินต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร Y_3 เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน

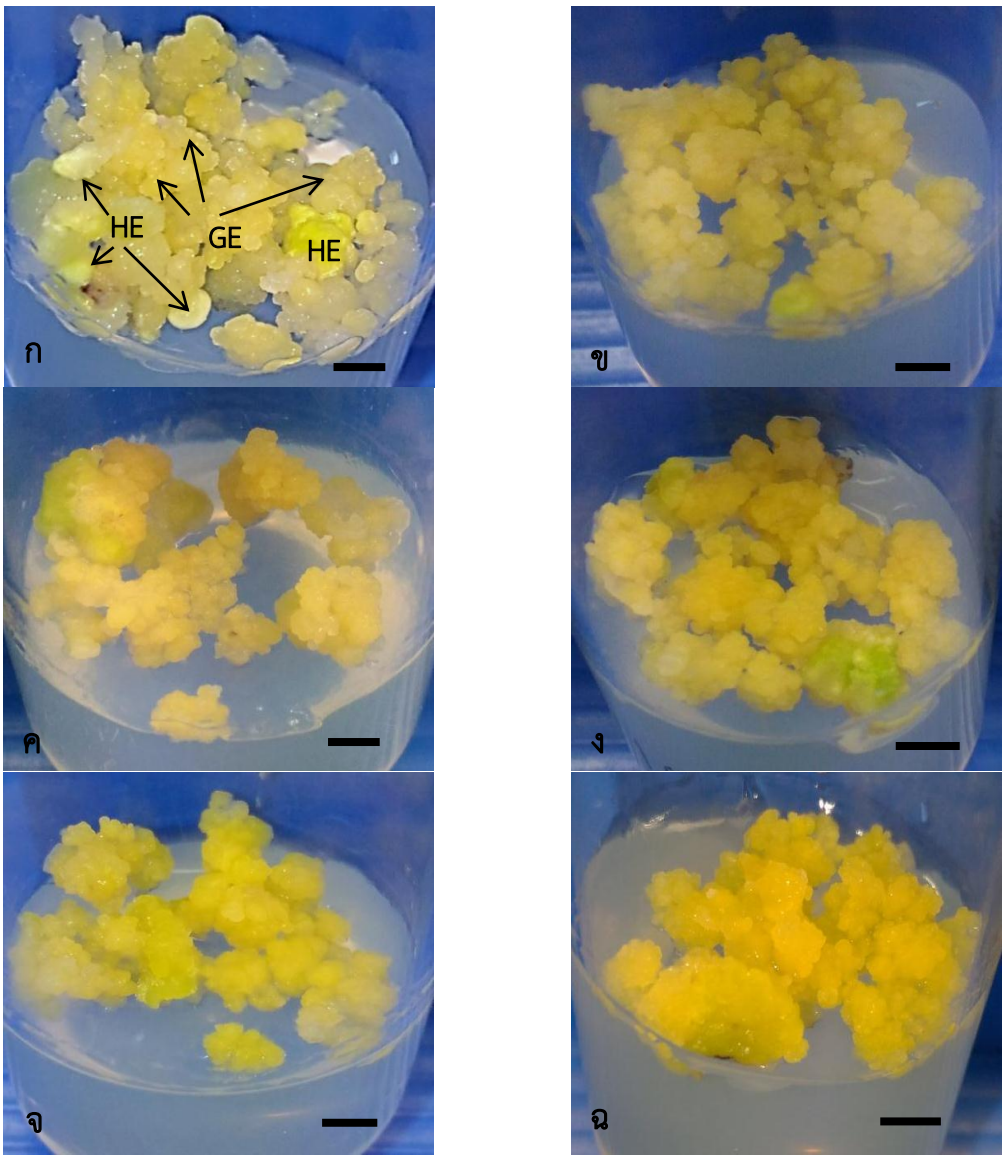
ชนิดของออกซิน		การเกิด GE	จำนวน GE	การเกิด HE	จำนวน HE
Dicamba (มิลลิกรัมต่อลิตร)	2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	(%)	ต่อหลอด	(%)	ต่อหลอด
0	0	100.00a	22.14a	81.82a	2.28
0.05	0	85.71ab	4.78bc	57.14ab	1.83
0.1	0	86.95a	3.80bc	47.82b	1.82
0.2	0	78.26ab	3.00c	52.17b	1.75
0.3	0	57.14ab	3.67bc	38.10b	1.50
0.4	0	65.00ab	2.08c	35.00b	1.43
0	0.05	89.47a	6.41b	47.37b	1.89
0	0.1	63.16ab	3.00c	63.16ab	1.58
0	0.2	84.21ab	3.25bc	47.37b	2.00
0	0.4	47.83b	2.36c	47.83b	1.54
0	0.8	47.83b	1.55c	47.83b	1.54
F-test		**	*	*	ns
C.V. (%)		28.67	67.78	34.91	50.42

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.5 ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 เติม dicamba ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก. ไม่เติม dicamba

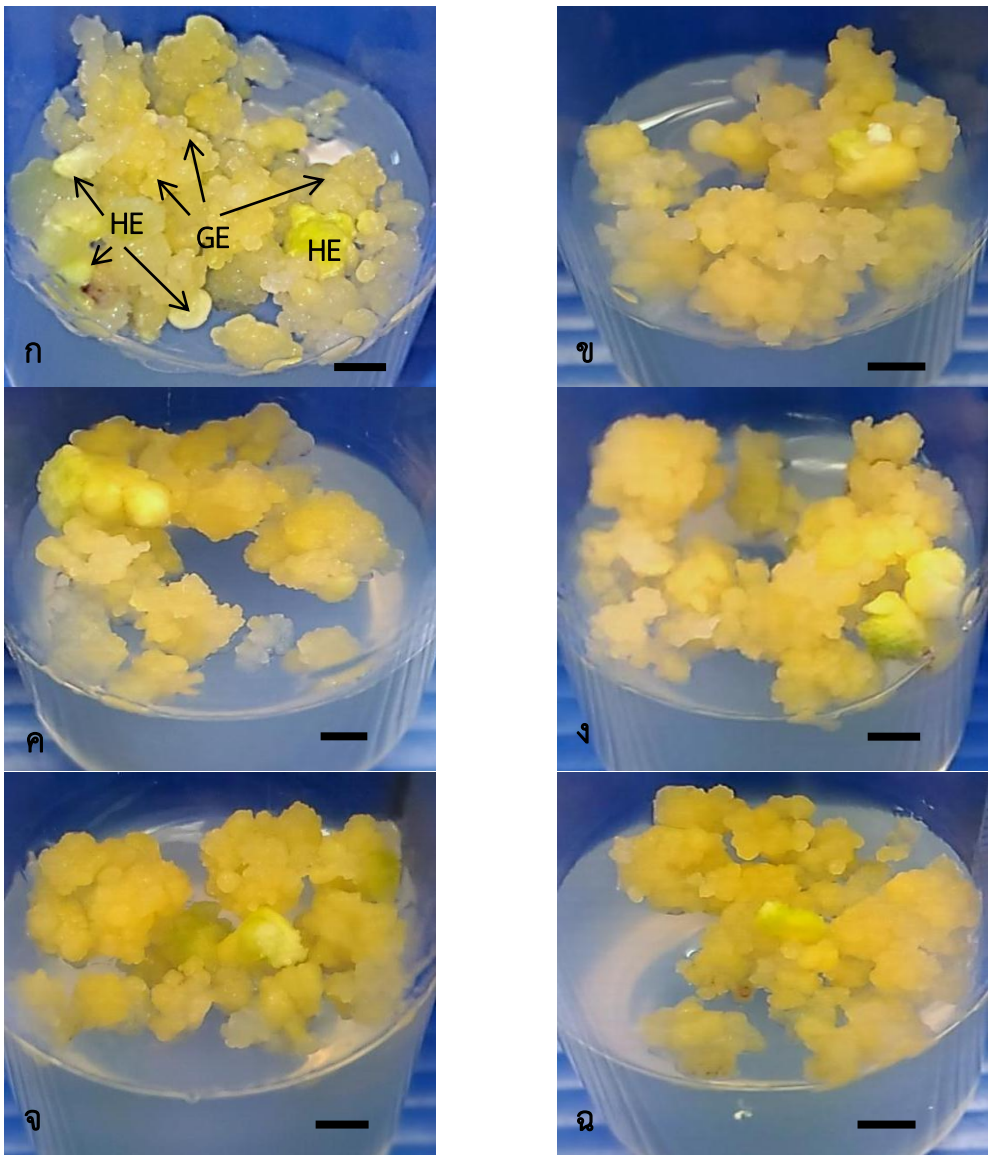
ข. เติม dicamba เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. เติม dicamba เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ. เติม dicamba เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 2.6 ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก. ไม่เติมออกซิน 2,4-D

ข. เติม 2,4-D เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. เติม 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. เติม 2,4-D เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ. เติม 2,4-D เข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลซอร์บิทอล และแล็คโตส บนอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 วัน พบว่า อาหาร Y_3 ที่ไม่เติม และเติมน้ำตาลในทุกความเข้มข้นสามารถชักนำ GE 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลแล็คโตสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้จำนวน SE ทุกระยะสูงสุด 67.4 เอ็มบริโอต่อหลอด จำนวน GE สูงสุด 52.68 เอ็มบริโอต่อหลอด มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 2.5) GE ที่ชักนำได้มีลักษณะกลมและใส (ภาพที่ 2.8ก) อัตราการเกิด HE สูงสุด 84.21 ปอร์เซ็นต์ จำนวน HE ในทุกระยะสูงสุด 14.02 เอ็มบริโอต่อหลอด จำนวนการเกิด HE ระยะแรก (Early haustorium embryo; EHE) สูงสุด 9.13 เอ็มบริโอต่อหลอด (ภาพที่ 2.7) EHE ที่ชักนำได้มีลักษณะกลมทึบมีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 2.8ข) จำนวนการงอกของ Early germination from HE (EG) 2.88 เอ็มบริโอต่อหลอด (ภาพที่ 2.7) EG ที่ชักนำได้มีลักษณะของการสร้างยอดแหลม ๆ มีสีเขียว และมีการสร้างรากเล็ก ๆ (ภาพที่ 2.8ค) จำนวนการงอกของ Root emerging from HE (RE) 2 เอ็มบริโอต่อหลอด (ภาพที่ 2.7) RE ที่ชักนำได้มีลักษณะการสร้างยอดสีเขียว และรากที่ยาวขึ้น(ภาพที่ 2.8ง) อัตราการเกิด SSE 52.63 เปอร์เซ็นต์ และจำนวน SSE สูงสุด 6.67 เอ็มบริโอต่อหลอด แต่อาหารที่เติมแล็คโตสเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้อัตราการเกิด SSE สูงสุด 72.22 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามอาหารที่เติมแล็คโตสเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ให้จำนวนการเกิด SSE สูงสุด 7.88 เอ็มบริโอต่อหลอด SSE สามารถชักนำได้จาก GE มีลักษณะเป็นกลุ่มแหลม ๆ สีขาว (ตารางที่ 2.5, ภาพที่ 2.8จ)

ตารางที่ 2.5 ผลของชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

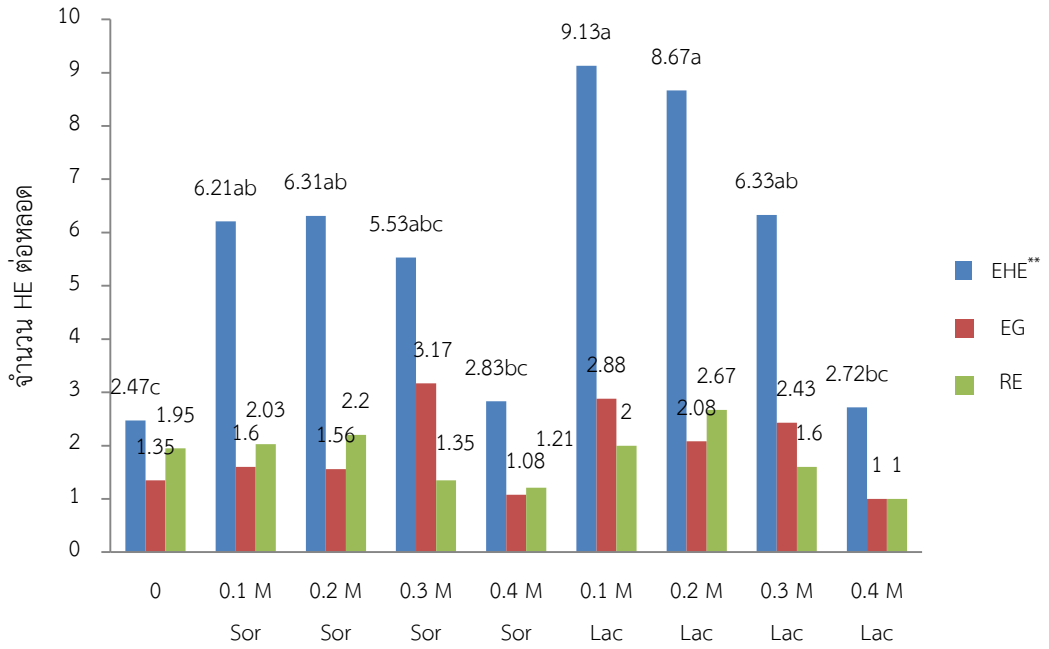
ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล		การเกิด GE	จำนวน GE ต่อ	การเกิด HE	จำนวน HE ต่อ	จำนวน SE เฉลี่ยต่อ	การเกิด SSE	จำนวน SSE ต่อ
ซอร์บิทอล (โมลาร์)	แล็คโตส (โมลาร์)	(%)	หลอด	(%)	หลอด	หลอด	(%)	หลอด
0	0	100	31.62b	75.00ab	5.77bc	35.93bc	8.33c	4.26ab
0.1	0	100	29.17b	77.77ab	9.84ab	38.37bc	33.33b	3.07b
0.2	0	100	32.62b	74.54ab	10.07ab	41.68b	33.33b	2.66b
0.3	0	100	31.91b	64.81bc	10.05ab	39.84bc	44.44b	3.13b
0.4	0	100	35.4b	57.89c	5.12c	39.52bc	36.84b	4.71ab
0	0.1	100	52.68a	84.21a	14.01a	67.40a	52.63b	6.67ab
0	0.2	100	45.67a	68.52bc	13.42a	58.65a	72.22a	5.33ab
0	0.3	100	34.58b	69.84abc	10.36a	44.67b	42.86b	7.88a
0	0.4	100	26.12b	38.60d	4.72c	29.08c	5.26c	4.26ab
F-test		ns	*	**	*	*	**	*
C.V. (%)		0.00	16.18	13.18	26.61	15.03	29.90	45.83

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.7 ผลของชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่อการชักนำและการงอกของ HE บนอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

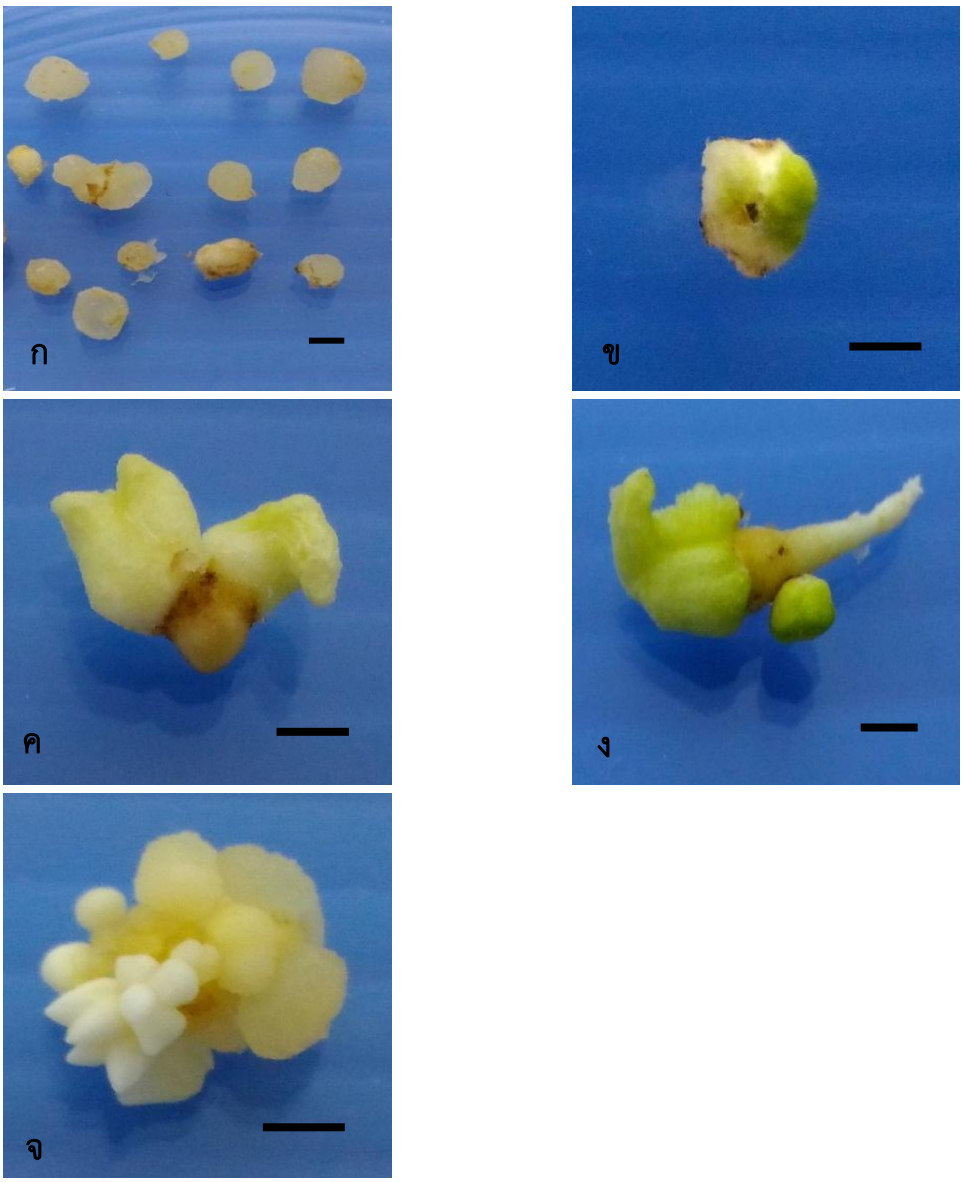
EHE: Haustorium embryo ระยะแรก (Early haustorium embryo)

EG: การงอกของ haustorium embryo ระยะแรก (Early germination from HE)

RE: การงอกของ haustorium embryo ระยะที่ 2 (Root emerging from HE)

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขบนกราฟแท่งเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.8 ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลแล็คโตสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (บาร์ = 0.2 เซนติเมตร)

ก. โซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม (Globular embryo; GE)

ข. Haustorium embryo ระยะแรก (Early haustorium embryo; EHE)

ค. การงอกของ haustorium embryo ระยะแรก (Early germination from HE; EG)

ง. การงอกของ haustorium embryo ระยะที่ 2 (Root emerging from HE; RE)

จ. โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (Secondary somatic embryo; SSE)

3. การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

3.1 ผลของผงถ่านต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว

นำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมผงถ่านความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน พบว่า อาหารที่เติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ให้ผลดีที่สุด โดยให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ อัตราการสร้างยอดและรากสูงสุด 10 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.5 ยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอดเฉลี่ย 0.58 เซนติเมตร จำนวนรากเฉลี่ย 1.30 รากต่อชิ้นส่วน และความยาวรากเฉลี่ย 1.61 เซนติเมตร (ตารางที่ 2.6, ภาพที่ 2.9) สำหรับอาหารที่เติมผงถ่าน 0.10 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการสร้างรากสูงสุด 63.16 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) และอาหารที่เติมผงถ่าน 0.35 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการสร้างยอดสูงสุด 11.11 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) และความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 1.77 เซนติเมตร สำหรับความยาวยอดเฉลี่ย พบว่า อาหารสูตรที่เติมผงถ่าน 0.3 เปอร์เซ็นต์ ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 0.83 เซนติเมตร (ตารางที่ 2.6) ซึ่งจำนวนยอด และความยาวยอดเฉลี่ย มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนจำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามยังมีการงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่ำอยู่

ตารางที่ 2.6 ผลของผงถ่านต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวบนอาหารสูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

ผงถ่าน (%)	การรอดชีวิต (%)	การสร้างยอด (%)	การสร้างราก (%)	การสร้างยอดและราก (%)	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน	ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)	จำนวนรากเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน	ความยาวรากเฉลี่ย (เซนติเมตร)
0	37.50c	0c	25.00c	0b	0c	0b	1.00	0.90
0.10	73.68ab	5.00b	63.16a	0b	1.00bc	0.60ab	1.33	1.52
0.15	64.71b	0c	41.18bc	0b	0c	0b	1.57	1.66
0.20	90.00a	0c	50.00ab	10.00a	2.50a	0.58ab	1.30	1.61
0.25	70.00b	10.00ab	40.00bc	5.00a	1.33b	0.68a	1.22	1.51
0.30	80.00ab	0c	45.00abc	10.00a	2.50a	0.83a	1.27	1.47
0.35	66.67b	11.11a	33.33bc	5.56a	1.00bc	0.77a	1.29	1.77
F-Test	**	**	**	**	*	*	ns	ns
C.V.(%)	14.08	70.60	27.62	62.18	64.39	80.57	47.75	67.81

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

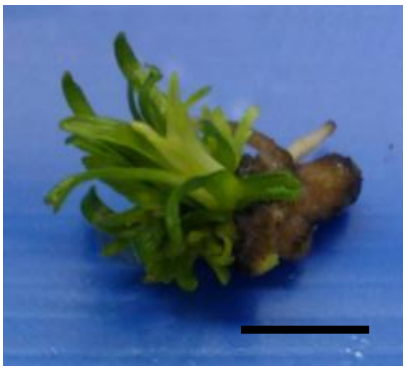
** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ภาพที่ 2.9 ลักษณะการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

3.2 การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (Secondary somatic embryo; SSE)

นำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 จากการศึกษาที่ 2.4 วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ให้อัตราการงอกของโซมาซิกเอ็มบริโอระยะที่ 2 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดรวม 2.33 ยอดต่อชิ้นส่วน และความยาวยอด 1.42 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.10)



ภาพที่ 2.10 การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

วิจารณ์ผลการทดลอง

การสร้างบาดแผลโดยการสับเป็นปัจจัยทางกายภาพอย่างหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ โดยการสร้างบาดแผลจะช่วยเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมธาตุอาหารได้มากขึ้น และส่งเสริมฮอร์โมนพืชในตำแหน่งอื่นเคลื่อนย้ายมาในตำแหน่งที่เกิดบาดแผล (รังสฤษดิ์, 2540) สอดคล้องกับการทดลองของ ธิดารัตน์ (2558) รายงานว่าการสับแคลลัสของปาล์มน้ำมัน 50 ครั้ง สารมารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัสได้ 0.36 กรัม หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือนบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นไปในทำนองเดียวกันกับ Fki และคณะ (2003) นำแคลลัสของอินทผลัมที่ผ่านการสับให้มีขนาดเล็กวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัสได้ 3 เท่า หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน Othmani และคณะ (2009) รายงานว่าการสับแคลลัสของอินทผลัม และวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีกว่าการที่ไม่สับ เนื่องจากการสับแคลลัสให้มีขนาดเล็กลงทำให้มีพื้นที่ในการสัมผัสกับอาหารมากกว่าแคลลัสขนาดใหญ่จึงทำให้มีการแบ่งเซลล์ และเพิ่มปริมาณได้มากกว่า

สูตรอาหารแต่ละสูตรมีองค์ประกอบของธาตุอาหารในปริมาณที่แตกต่างกัน ในการทดลองนี้พบว่า อาหารสูตร MS สามารถเพิ่มปริมาณของน้ำหนักสดได้สูงสุด สอดคล้องกับ เพ็ญติมาส (2552) วางเลี้ยง Friable callus บนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัส 0.336 กรัม เนื่องจากอาหารสูตร MS มีธาตุอาหารด้วยกันหลายชนิดทำให้สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสได้ดี ส่วนอาหารสูตร Y_3 สามารถส่งเสริมให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น ๆ สอดคล้องกับการทดลองของ Kanchanapoom และ Damyaos (1999) วางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร Y_3 ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถส่งเสริมให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ เช่นเดียวกับ Saenz และคณะ (2006) รายงานการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของมะพร้าวบนอาหารสูตร Y_3 ร่วมกับ 2,4-D และ BA ให้ผลดีที่สุด เนื่องจากอาหารสูตร Y_3 มีองค์ประกอบของคลอไรด์ไอออน (Cl^-) สูง (KCl และ NH_4Cl) ซึ่ง Cl^- มีบทบาทคล้ายกับออกซินในการส่งเสริมให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ การเกิดราก และการชักนำแคลลัสของปาล์มน้ำมันได้ (Muniran *et al*., 2008, Masani *et al*., 2013) อาหารสูตร Y_3 เป็นสูตรที่มีไนเตรท (NO_3^-) น้อยกว่าสูตร MS จึงทำให้อาหารสูตร MS สามารถเพิ่มปริมาณของแคลลัสได้ดีกว่าแต่มีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้น้อยกว่า เนื่องมาจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลัก และมีบทบาทหลักในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช แต่การลดความเข้มข้นของไนเตรทลง จะช่วยส่งเสริมการสร้างกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิสได้ดี (Rangaswamy, 1986)

กรดแอสคอร์บิคเป็นสารต้านอะนุมูลอิสระที่สามารถช่วยยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนพืชในอาหารเพาะเลี้ยงได้ซึ่งช่วยส่งเสริมให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสำเร็จมากขึ้น จากการศึกษาผลของกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ บนอาหารสูตร Y_3 พบว่า กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของ Te-chato (1998) ที่รายงานว่าการใช้กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถส่งเสริมให้เกิด SE ได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ เนื่องจากกรดแอสคอร์บิคเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ที่สามารถยับยั้งการสร้างสารประกอบฟินอล และยังช่วยส่งเสริมให้เกิดเป็นต้นอ่อนระยะเริ่มแรกอีกด้วย เช่นเดียวกับการทดลองของ Habibi และคณะ (2009) รายงานว่ากรดแอสคอร์บิคสามารถชักนำให้เกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอของ *Themeda quadrivalvis* ได้เพราะกรดแอสคอร์บิคมีบทบาทในการกระตุ้นกิจกรรมของเซลล์ และการแบ่งเซลล์ของพืช Wolucka และคณะ (2005) รายงานว่ากรดแอสคอร์บิคมีบทบาทในกระบวนการทางสรีรวิทยา เช่น การแบ่งเซลล์ และการเจริญเติบโตของพืช เป็นต้น

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน พบว่าอาหารสูตรที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด ให้อัตราการเกิด GE สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน GE 22.14 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิด HE 81.82 เปอร์เซ็นต์ และจำนวน HE 2.28 เอ็มบริโอต่อหลอด เนื่องจากการลดความเข้มข้น หรือการงดสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินลงสามารถส่งเสริมกระบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิสได้ (Steinmacher *et al*., 2007) ดังนั้นการไม่เติม หรือลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตลงสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้ดี สอดคล้องกับการทดลองของ Kanchanapoom และ Tinnongjig (2001) วางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร Y_3 เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วันเพื่อชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น จากนั้นย้ายเลี้ยงไปในอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 21 วัน สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สำเร็จ นอกจากนี้ Boufis และคณะ (2014) ยังรายงานในทำนองเดียวกันว่าอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถส่งเสริม และพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอจำนวนมากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอินทผลัม

ในส่วนของการศึกษาผลของน้ำตาลซอร์บิทอลและแล็คโตสต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า อาหารสูตรที่เติมน้ำตาลแล็คโตสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้จำนวน SE สูงสุด 67.4 เอ็มบริโอต่อหลอด สอดคล้องกับการทดลองของ Ricci และคณะ (2002) นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลแล็คโตสสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุดในพืชตระกูลส้ม เช่นเดียวกับ Kayim และ Kemal Koc (2006) รายงานว่าอาหารที่เติมน้ำตาลแล็คโตสมีผลต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่าน้ำตาลอื่น ๆ ในพืชตระกูลส้ม เช่นเดียวกับ Kochba และคณะ (1978)

รายงานว่าการใช้น้ำตาลแล็คโตสความเข้มข้นต่ำร่วมกับอาหารสามารถเกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิสได้ การเติมน้ำตาลแล็คโตสร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อควบคุมออสโมติกของอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลให้พืชเกิดสภาวะเครียดน้ำทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนภายในเซลล์ทำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ ได้ (de Touchet *et al*., 1991) น้ำตาลแล็คโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ประกอบด้วยกลูโคส และกาแล็คโตส Kochba และคณะ (1982) รายงานว่า กาแล็คโตสสามารถชักนำให้เกิดเอทิลีนได้ เมื่อมีความเข้มข้นของเอทิลีนสูงขึ้นจะส่งผลยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ออกซินทำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิสจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดี

การศึกษาผลของผงถ่านต่ออัตราการรอดชีวิต และการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว พบว่า อาหารที่เติมผงถ่าน 0.20 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด เนื่องจากผงถ่านเป็นสารประกอบคาร์บอนขนาดเล็ก มีลักษณะเป็นช่องว่างที่ละเอียดมาก พื้นที่ผิวในช่องว่างสูง ซึ่งทำให้มีความสามารถในการดูดซับสารบางตัวออกจากอาหารได้ เช่น สารประกอบฟินอล (phenol) ซึ่งสารฟินอลจะทำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดสีน้ำตาล (Thomas, 2008) การเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนพืชเป็นอุปสรรคต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอย่างยิ่ง Smiskova และคณะ (2005) รายงานว่าผงถ่านสามารถช่วยให้เกิดการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอได้ เนื่องจากมีบทบาทสำคัญในการสุกแก่ของ SE บนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต สอดคล้องกับการทดลองของ Andrade และ Merkle (2005) นำ SE ของ *Castanea dentata* วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมผงถ่าน 5 กรัมต่อลิตร ทำให้เกิดการงอกของ SE ได้ เช่นเดียวกับ Scherwinski-Pereira และคณะ (2010) นำ SE ของปาล์มน้ำมัน วางเลี้ยงบนอาหาร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร ให้การงอกเป็นพืชต้นใหม่หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ในทำนองเดียวกับ Scherwinski-Pereira และคณะ (2012) รายงานว่าการนำ SE ของ *Euterpe oleracea* วางเลี้ยงบนอาหาร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับผงถ่าน 2.5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ความยาวยอด 0.5-1 เซนติเมตร

สำหรับการงอกของ SSE บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ให้อัตราการงอกของ SSE 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดรวมต่อชิ้นส่วน 2.33 ยอด และความยาวยอด 1.42 เซนติเมตร สอดคล้องกับการทดลองของ ศตปพร และ สมปอง (2557) วางเลี้ยง SSE ของปาล์มน้ำมันเป็นเวลา 3 เดือน บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างยอดต่อชิ้นส่วน สูงสุด 10.4 ยอด จำนวนรากเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน สูงสุด 8.2 ราก และให้การพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อชิ้นส่วน สูงสุด 7.20 ต้น เช่นเดียวกับ ซูไฮมิน (2551) นำ SSE

วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 3 เดือน ให้การงอกเป็นพืชต้นใหม่ 3.7 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2

ผลของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส และการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอในเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน

Effects of Culture Media and Plant Growth Regulators on Callus Proliferation and Somatic Embryo Induction in Cell Suspension Culture of Oil Palm SUP-PSU

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยว หรือกลุ่มเซลล์ ในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดเวลา โดยส่วนใหญ่ใช้แคลลัสเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น หรืออาจจะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช เช่น ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงลงในอาหารเหลวโดยตรง แรงเขย่าจากเครื่องเขย่าทำให้เซลล์ที่เกิดใหม่กลายเป็นเซลล์แขวนลอย (คำนูณ, 2542) การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นจะเป็นอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งสามารถขยายพันธุ์ได้เร็วกว่าในการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง อย่างไรก็ตามยังไม่ค่อยมีการศึกษากันมากนักเนื่องจากมีข้อจำกัดในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ เพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าวในการศึกษานี้จึงได้ศึกษาผลของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่ำ ๆ ในอาหารเหลวต่อการเพิ่มปริมาตรแคลลัส สร้างโซมาติกเอ็มบริโอ และศึกษาระยะพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากอย่างต่อเนื่อง ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิส จนพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ต่อไปในอนาคต

การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ได้ โดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (Te-chato, 1998) ช่อดอก (Teixeira *et al*., 1994) ชิ้นส่วนใบอ่อนจากต้นกล้าและใบอ่อนจากต้นที่ให้ผลผลิตแล้ว (สมปอง และคณะ, 2547) และราก (Wooi, 1995) เป็นต้น ซึ่งชิ้นส่วนเหล่านี้สามารถชักนำแคลลัส และพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ ซึ่งนับว่าเป็นความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน สูตรอาหารที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิดทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิด พันธุ์ของพืชตลอดจนชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงอย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต อาจส่งเสริมความแปรปรวนให้มีมากยิ่งขึ้น (สมปอง, 2539) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในอาหารชักนำแคลลัสเริ่มต้นที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นสูง 100-150 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อให้เกิดลักษณะผิดปกติของต้นที่ชักนำได้ในลักษณะแมนเทิ้ลเฉลี่ย 5 เปอร์เซ็นต์ (Jaligot *et al.,* 2000) ซึ่งจะส่งผลเสียหายต่อธุรกิจการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงต้องมีการควบคุมการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตให้น้อยที่สุดที่จะไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา C3/77(25) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสดังกล่าววางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ทำการย้ายเลี้ยงทุก ๆ เดือน (ภาพที่ 2.1)

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาชนิดของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่น และการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้ำหนัก 0.2 กรัม มาวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS WPM Y_3 และ OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 นำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกขนาดตะกอนเซลล์ทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์

2. ศึกษาชนิด และความเข้มข้นของออกซิน ต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่น และการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

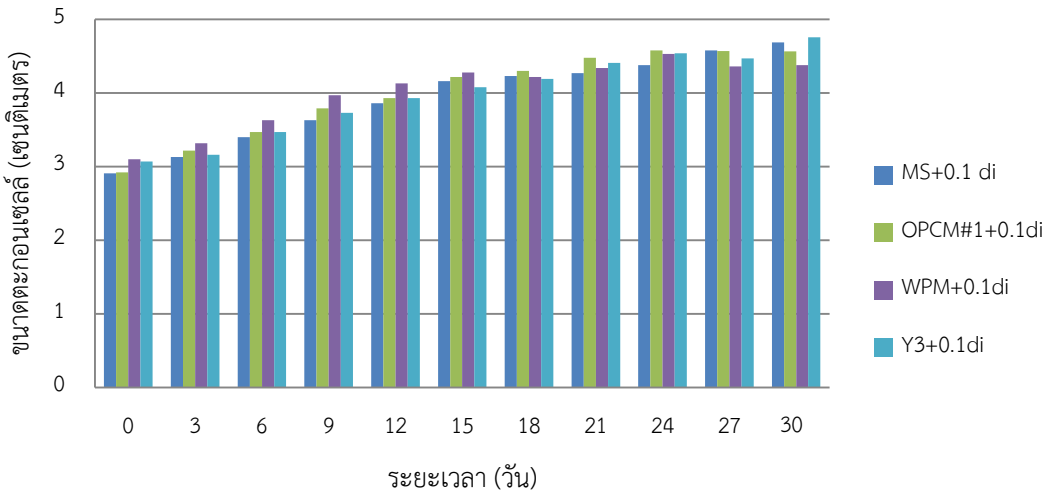
นำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมจากการศึกษาที่ 1 เติม dicamba และ 2,4-D เข้มข้น 0 0.05 0.1 0.2 0.4 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์

ปรับ pH เป็น 5.7 นำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 30 วัน เป็นเวลา 60 วัน บันทึกพัฒนาการ และอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์

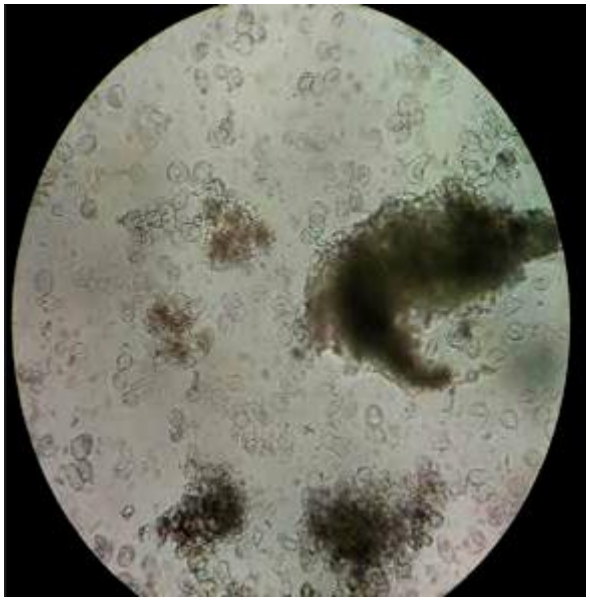
ผลการศึกษา

1. ศึกษาชนิดของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่น และการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเปรียบเทียบชนิดสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้ำหนัก 0.2 กรัม ในอาหารเหลวเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาตรของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในระยะเวลา 30 วัน พบว่า อาหารสูตร MS ให้การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ 1.61 เท่า ขนาดตะกอนเซลล์ 4.69 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.11) ลักษณะเซลล์ที่ 15 วันหลังการวางเลี้ยงในอาหารสูตร OPCM#1 เริ่มมีการแบ่งเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว (ภาพที่ 2.12) ลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารทุกสูตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน มีสีเหลือง เกาะกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ และบางส่วนเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก ๆ (ภาพที่ 2.13) จากการทดลองเปรียบเทียบชนิดสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารเหลวเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่า อาหารเหลวสูตร OPCM#1 ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 1.67 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ โดยอาหารแต่ละสูตรให้จำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอไม่แตกต่างกันทางสถิติ โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้มีลักษณะใสและมีสีเขียว (ตารางที่ 2.7, ภาพที่ 2.14)



ภาพที่ 2.11 ผลของชนิดของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาตรของเซลล์ซัสเพนชั่น ที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 2.12 ลักษณะเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยง 15 วัน (กำลังขยาย 10 เท่า)

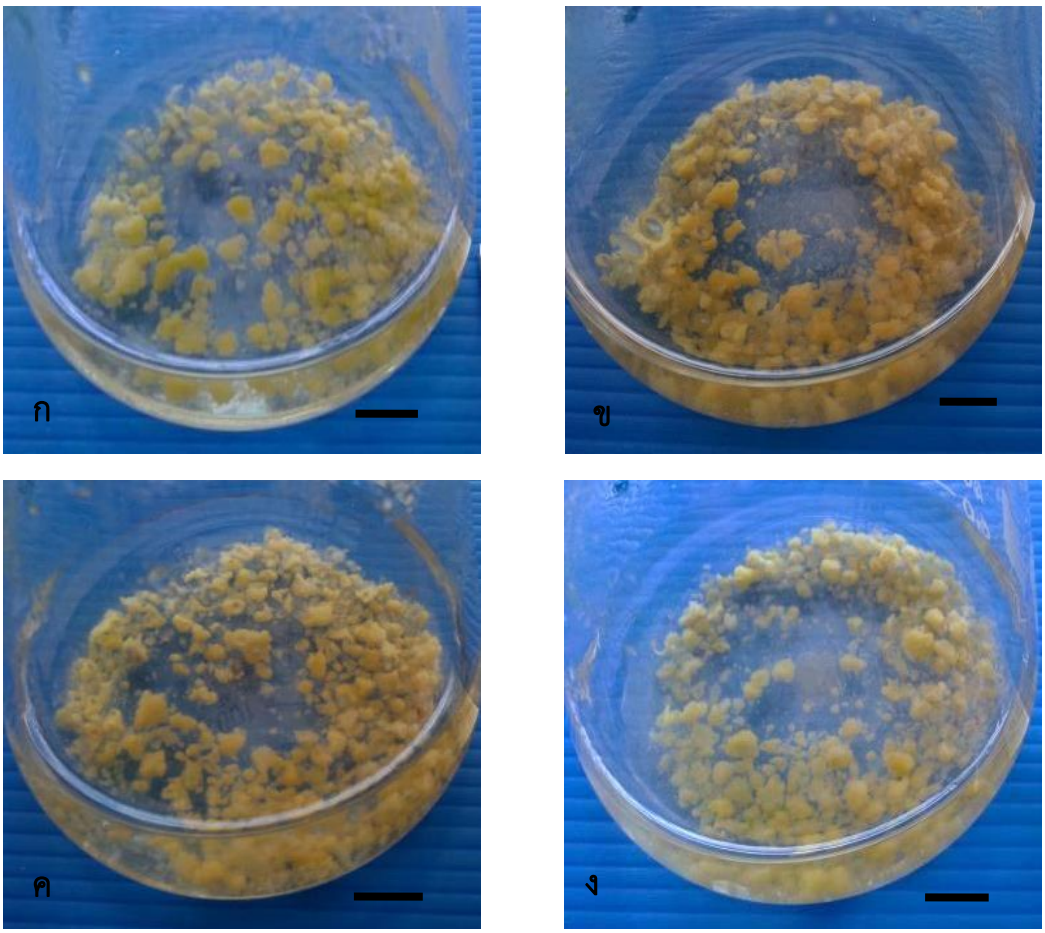
ตารางที่ 2.7 ผลของชนิดของสูตรอาหารต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

สูตรอาหาร	การเกิด SE (%)	จำนวน SE ต่อฟลาสก์
MS	25.00ab	1.00
Y_3	11.11bc	1.00
WPM	0.00c	0.00
OPCM#1	33.33a	1.67
F-test	**	ns
C.V. (%)	54.23	37.71

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดยวิธี LSD



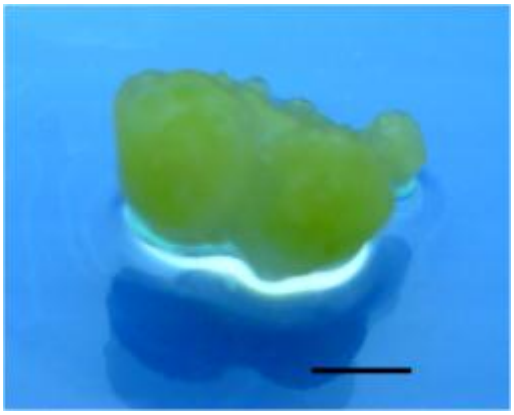
ภาพที่ 2.13 ลักษณะเซลล์ซัสเพนชั่นที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก. อาหารสูตร MS

ข. อาหารสูตร Y_3

ค. อาหารสูตร WPM

ง. อาหารสูตร OPCM#1



ภาพที่ 2.14 ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (บาร์ = 0.2 เซนติเมตร)

2. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่น และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินโดยวางเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร OPCM#1 เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่า สูตรอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงสุด 3.43 มิลลิลิตร (ภาพที่ 2.15ก) ในขณะที่ 2,4-D เข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ต่ำสุด 2.20 มิลลิลิตร เมื่อมีการเติมออกซินความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้ตะกอนเซลล์ปรากฏเป็นสีน้ำตาลหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (ภาพที่ 2.15ข) สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในเดือนแรกยังไม่มีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในทุก ๆ ทรีตเมนต์ แต่หลังจากการย้ายเลี้ยงในเดือนที่ 2 พบว่าสูตรอาหารที่เติม dicamba เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงสุด 4.21 มิลลิลิตร ลักษณะเซลล์มีสีเหลือง เกาะกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ และขนาดเล็ก ๆ ปะปนกัน (ภาพที่ 2.16ก) ในขณะที่สูตรอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถพัฒนาเซลล์ซัสเพนชั่นไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ โดยให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 13.5 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 2.8) โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้มีลักษณะของการสร้างราก (ภาพที่ 2.16ข)

ตารางที่ 2.8 ผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

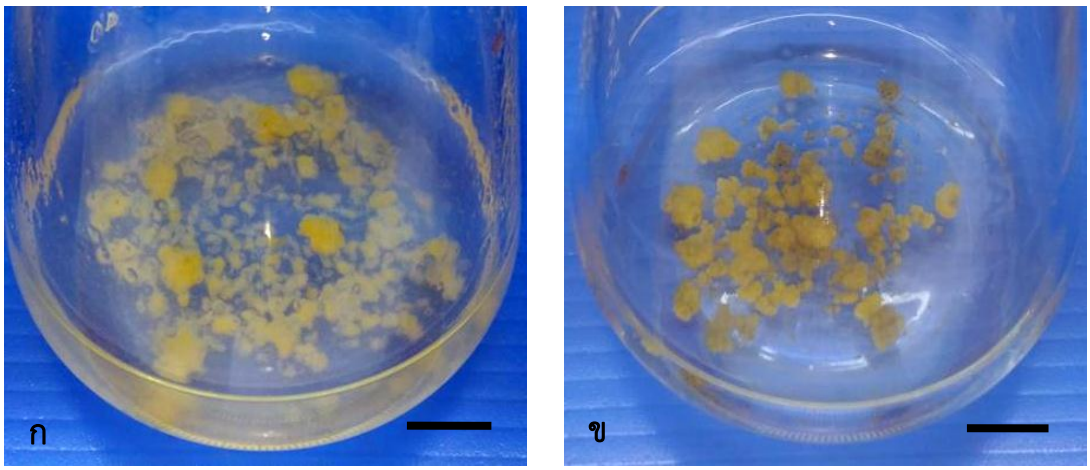
		เดือนที่ 1		เดือนที่ 2		
ออกซิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)		การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร)	การเกิด SE (%)	การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร)	การเกิด SE (%)	จำนวน SE ต่อฟลาสก์
dicamba	2,4-D					
0	0	3.43	0	ND	100a	13.50a
0.05	0	2.88	0	4.21a	0b	0b
0.1	0	2.74	0	3.44b	0b	0b
0.2	0	2.91	0	3.40b	0b	0b
0.4	0	2.32	0	2.93bc	0b	0b
0.8	0	2.79	0	3.49b	0b	0b
0	0.05	3.14	0	3.13b	0b	0b
0	0.1	2.91	0	3.06bc	0b	0b
0	0.2	2.69	0	2.98bc	0b	0b
0	0.4	2.50	0	2.12d	0b	0b
0	0.8	2.20	0	2.37cd	0b	0b
F-test		ns		**	**	**
C.V. (%)		15.16		10.35	0.00	92.74

ND เนื่องจากตะกอนเซลล์บางส่วนมีการตายและมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

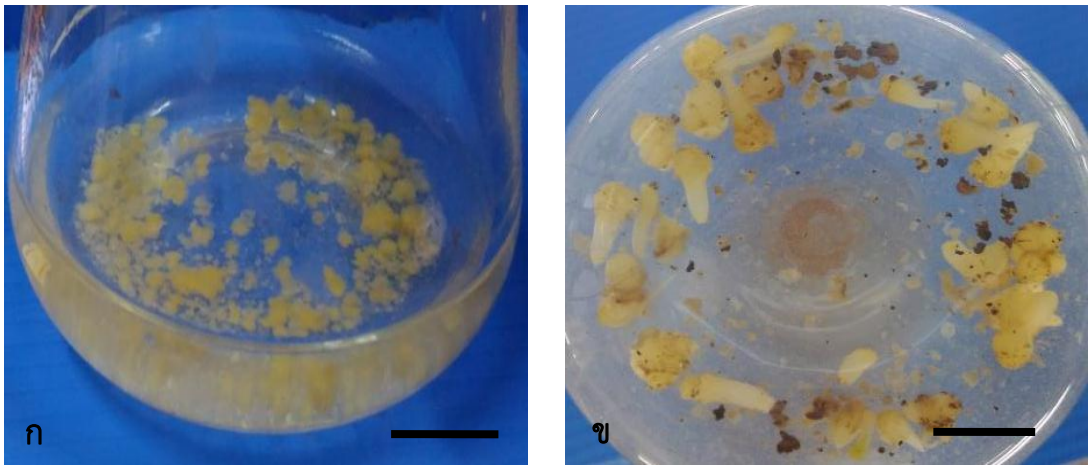
** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.15 ลักษณะเซลล์ในซัสเพนชั่นที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM#1 ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก. อาหารสูตร OPCM#1ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต
ข. อาหารสูตร OPCM#1 เติม 2,4-D เข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 2.16 ลักษณะเซลล์ในซัสเพนชั่นที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPCM#1 ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก. OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร
ข. OPCM#1 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

วิจารณ์ผลการทดลอง

สูตรอาหารมีความสำคัญต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยอาหารในแต่ละสูตรมีองค์ประกอบของธาตุอาหารที่แตกต่างกัน ดังนั้นต้องเลือกอาหารให้เหมาะสมกับชนิดของพืช สำหรับปริมาตรของตะกอนเซลล์ พบว่า อาหาร MS ให้ผลดีที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ เพ็ญติมาส (2552) รายงานว่า วางเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เป็น 2 เท่า หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน สำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันนั้น อาหารสูตร OPCM#1 ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ ศตปพร และ สมปอง (2557) สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันเทเนอราได้เป็น 3 เท่า และชักนำโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 30 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร OPCM#1 เนื่องจากอาหารสูตร OPCM#1 มีส่วนประกอบของไนโตรเจนลดลงเหมาะสมต่อการพัฒนาของเซลล์พืชเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ Wetherell และ Halperin (1963) รายงานว่าไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมไนเตรตที่ระดับความเข้มข้นต่ำเป็นองค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการชักนำการเกิดเอ็มบริโอ

จากการเปรียบเทียบชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินในอาหารสูตร OPCM#1 ต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ พบว่า อาหารเหลวสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงสุด 4.21 มิลลิลิตร หลังการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน สอดคล้องกับ Chehmalee และ Te-chato (2008) ที่รายงานว่าสามารถเพิ่มปริมาตรเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ในอาหารที่เติม dicamba เช่นเดียวกับ ทรรศณีย์ และ สมปอง (2555) วางเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว เป็นเวลา 30 วัน พบว่า อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นซึ่งได้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 2.41 มิลลิลิตร เนื่องจาก dicamba จะช่วยส่งเสริมกิจกรรมการแบ่งเซลล์ได้ดีในชั้นอิพิเดอร์มิส พาเรนไคมา ชั้นของเนื้อเยื่อเจริญ และชั้นของเนื้อเยื่อเจริญมัดของท่อน้ำท่ออาหาร (ธนวดี, 2551) ในส่วนของอาหารเหลวสูตร OPCM#1 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 13.5 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ สอดคล้องกับ Kanchanapoom และ Tinnongjig (2001) สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นและชักนำให้เกิดเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตได้สำเร็จ นอกจากนี้ Boufis และคณะ (2014) ยังรายงานในทำนองเดียวกันว่าอาหารเหลวที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถส่งเสริม และพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอจำนวนมากในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของอินทผลัม

บทที่ 3

สรุป

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสพบว่าการสับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสให้มีขนาดเล็กลงสามารถส่งเสริมการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีกว่าการไม่สับ ซึ่งให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 0.53 กรัมต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเริ่มต้น 0.1 กรัม

การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า อาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมน้ำตาลแล็คโตสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวน SE ทุกระยะสูงสุด 67.4 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิด GE 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน GE สูงสุด 52.68 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิด HE สูงสุด 84.21 เปอร์เซ็นต์ จำนวน HE ในทุกระยะสูงสุด 14.01 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิด SSE 52.63 เปอร์เซ็นต์ และจำนวน SSE สูงสุด 6.67 เอ็มบริโอต่อหลอด ซึ่งอาหารสูตรนี้เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเพื่อการขยายพันธุ์ต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองต่อไป

การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว พบว่า อาหารสูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ อัตราการสร้างราก 50 เปอร์เซ็นต์ อัตราการสร้างยอดและราก 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 2.5 ยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอดเฉลี่ย 0.58 เซนติเมตร จำนวนรากเฉลี่ย 1.30 รากต่อชิ้นส่วน และความยาวรากเฉลี่ย 1.61 เซนติเมตร

การงอกของ SSE บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ให้อัตราการงอกของ SSE 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดรวม 2.33 ยอดต่อชิ้นส่วน และความยาวยอด 1.42 เซนติเมตร

การศึกษาผลของอาหารเหลวต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน พบว่าอาหารเหลวสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงสุด 4.21 มิลลิลิตร และอาหารเหลวสูตร OPCM#1 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 13.5 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์

เอกสารอ้างอิง

กาญจนี ทองเทพ. 2553. ปัจจัยทางกายภาพ และเคมีต่อการเจริญ และพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ซูไฮมีน เจ๊ะมาลี. 2551. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ทรรศณีย์ นิยะกิจ และ สมปอง เตชะโต. 2555. การชักนำและเพิ่มปริมาตรเอ็มบริโอโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา และการตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. วารสารเกษตร 28: 273-283.

ธนวดี พรหมจันทร์. 2551. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต้นปาล์มน้ำมันที่พัฒนาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธิดารัตน์ ทองแผ่. 2558. การชักนำและเพิ่มจำนวนโนดูลาร์แคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา (*Elaeis guineensis* Jacq.) ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

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

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำ และวรรณา เลี้ยววาริณ. 2546. คู่มือปาล์มน้ำมันและการจัดการสวน. สงขลา: คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นภาพร นาคอุดม. 2548. การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซีสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เพ็ญติมาส กระมุท. 2552. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: ภาคพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศตปพร เกิดสุวรรณ และสมปอง เตชะโต. 2557. ผลของไดแคมบาต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นต้นของปาล์มน้ำมัน. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1: 2-9.

สมปอง เตชะโต. 2538. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจ หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2539. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้มปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Andrade, G.M. and Merkle, S.A. 2005. Enhancement of American chestnut somatic seedling production. Plant Cell Reports 24: 326–334.

Boufis, N., Khelifi-Slaouia, M., Djillalia, Z., Zaouia, D. Morslia, A., Bernardsc, M.A., Makhzumc, A. and Khelifia, L. 2014. Effects of growth regulators and types of culture media on somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Degla Beida). Scientia Horticulturae 172: 135-142.

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.

Constantin, M., Ajambang, W.N., Godswill, N.N., Wiendi, N.M.A., Wachjar, A. and Frank, N.E.G. 2015. Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. Journal of Applied Biology and Biotechnology 3: 4-10.

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

Eke, C.R., Akomeah, P. and Asemota, O. 2005. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. African Journal of Biotechnology 4: 244-246.

Eshraghi, P., Zarghami, R. and Mirabdulbaghi, M. 2005. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. African Journal of Biotechnology 4: 1309-1312.

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.

Habibi, N., Suthar, R.K. and Purohit, S.D. 2009. Role of PGRs and inhibitors in induction and control of somatic embryogenesis in *Themeda quadrivalvis*. Indian Journal of Experimental Biology 47: 198-203.

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 guineensis* Jacq.). Songklanakarin Journal of Science and Technology 27: 630-635.

Jaligot, E., Rival, A., Beule, T., Dussert, S. and Verdeil, J.L. 2000. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. Plant Cell Reports 19: 684-690.

Jayanthi, M., Susanthi, B., Mohan, N.M. and Mandal, P.K. 2015. *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). SpringerPlus 4: 1-7.

Kanchanapoom, K. and Domyoas, P. 1999. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. Science Asia 25: 193-200.

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

Kayim, M. and Kemal Koc, N. 2006. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. Scientia Horticulturae 109: 29-34.

Kramut, P. and Te-chato, S. 2010. Effect of culture media, plant growth regulators and carbon sources on establishment of somatic embryo in suspension culture of oil palm. Journal of Agricultural Technology 6: 159-170.

Kochba, J., Spiegel-Roy, P., Neumann, H. and Saad, S. 1982. Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of *Citrus* cultivars. Journal of Plant Physiology 105: 359-368.

Kochba, J., Spiegel-Roy, P., Saad, S. and Neumann, H. 1978. Stimulation of embryogenesis in *Citrus* tissue culture by galactose. The Science of Nature 65: 261-262.

Lloyd, G. and McCown, B.H. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society 30: 421-427.

Masani, M.Y., Noll, G., Parveez, G.K., Sambanthamurthi, R. and Prüfer, D. 2013. Regeneration of viable oil palm plants from protoplasts by optimizing media components, growth regulators and cultivation procedures. Plant Science 210: 118-127.

Muniran, F., Bhore, S.J. and Shah, F.H. 2008. Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq. 'Dura': Comparison of three basal media for efficient regeneration. Indian Journal of Experimental Biology 46: 79-82.

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

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 embryo callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 97: 71-79.

Perera, P.I.P., Yakandawala, D.M.D., Verdeil, J.L., Hocher, V. and Weerakoon, L.K. 2008. Somatic embryogenesis and plant regeneration from unfertilised ovary explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). Tropical Agricultural Research 20: 226-233.

Rangaswamy, N.S. 1986. Somatic embryogenesis in angiosperm cell tissue and organ cultures. Proceedings of the Indian Academy of Sciences Plant Science 96: 247-271.

Ricci, A.P., Mourão, Filho, F.D.A.A., Januzzi, B.M. and Stefano Piedade, S.M.D. 2002. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis, C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa.* Scientia Agricola 59: 41-46.

Sáenz, L., Azpeitia, A., Chuc-Armendariz, B., Chan, J.L., Verdeil, J.L., Hocher, V. and Oropeza, C. 2006. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 42: 19-25.

Scherwinski-Pereira, J.E., da Guedes R.S., Fermino, P.C.P., Silva, T.L. and Costa, F.H.S. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. In Vitro Cellular and Developmental Biology 46: 378-385.

Scherwinski-Pereira, J.E., da Silva Guedes, R., da Silva, R.A., Fermino, P.C.P., Luis, Z.G. and de Oliveira Freitas, E. 2012. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açaí palm (*Euterpe oleracea*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 109: 501-508.

Smiskova, A., Vlasinova, H. and Havel, L. 2005. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Schisandra chinensis*. Biologia Plantarum 49: 451–454.

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

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 of oil palm. Plant Cell Reports 13: 247-250.

Thawaro, S. and Te-chato, S. 2009. Effect of genotypes and auxins on callus formation from mature zygotic embryos of hybrid oil palms. Journal of Agricultural Technology 5: 167-177.

Thomas, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances 26: 618-631.

Tomaz, M.L., Mendes, B.M.J., Mourao Filho, F.A.A., Demetrio, C.G.B., Jansakul, N. and Rodriguez, P.M. 2001. Somatic embryogenesis in *Citrus* spp. Carbohydrate stimulation and histodifferentiation. In Vitro Cellular and Developmental Biology 37: 446-452.

Wolucka, B.A., Goossens, A. and Inze´, D. 2005. Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. Journal of Experimental Botany 56: 2527-2538.

Wetherell, D.F. and Halperin, W. 1963. Embryos derived from callus tissue cultures of the wild carrot. Nature 200: 1336-1337.

Wooi, K.C. 1995. Oil palm tissue culture–current practice and constraints. *In* Recent Developments in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology (eds. V. Rao, I. E. Henson and N. Rajanaidu). pp. 56-57. Bangi: Palm Oil Research Institute of Malaysia.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหารสังเคราะห์

องค์ประกอบ	**ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)**			
	MS	**Y_3**	**WPM**	**OPCM#1**
NH_4NO_3	1650.00	-	400.00	1025.00
NH_4Cl	-	535.00	-	-
KNO_3	1900.00	2020.00	-	950.00
KCl	-	1492.00	-	-
NaH_2PO_4 $1H_2O$	-	312.00	-	-
$CaCl_2.2H_2O$	440.00	294.00	96.00	268.00
$Ca(NO_3)4H_2O$	-	-	556.00	278.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00	247.00	-	185.00
K_2 SO_4	-	-	990.00	495.00
KH_2PO_4	170.00	-	170.00	170.00
H_3BO_3	6.20	3.10	6.20	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90	11.20	16.90	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60	7.20	8.60	9.60
KI	0.83	8.30	-	0.415
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.24	0.25	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.16	6.25	3.138
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.24	-	0.013
Na_2EDTA	37.30	37.30	37.30	37.30
$FeSO_4.7H_2O$	27.80	27.80	27.80	27.80
$NiCl_2$ $6H_2O$	-	0.024	-	-
Myoinositol	100.00	100.00	100.00	100.00
Glycine	2.00	-	2.00	2.00
Nicotinic acid	0.50	0.05	0.50	0.50
Pyridoxine.HCl	0.50	0.05	0.50	0.50
Thiamine.HCl	0.10	0.50	1.00	0.55
Ca-pantothenate	-	0.05	-	-
Biotin	-	0.05	-	-
pH	5.7	5.7	5.7	

ผลงานตีพิมพ์

ผลของกรดแอสคอร์บิค ออกซิน และน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

Effects of Ascorbic Acid, Auxins and Sugars on Somatic Embryo Induction of Oil Palm SUP-PSU

วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 3 ฉบับที่ 4 (ตุลาคม-ธันวาคม): 1-7, 2559
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 3, No. 4 (October-December): 1-7, 2016

Research article

ผลของกรดแอสคอร์บิค ออกซิน และน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

Effects of Ascorbic Acid, Auxins and Sugars on Somatic Embryo Induction of Oil Palm SUP-PSU

อภิชญา นุกูลรัตน์[1], สุรีรัตน์ เย็นช้อน[1*] และ สมปอง เตชะโต[1]
Nukoolrat, A.[1] Yenchon, S.[1*] and Te-chato, S.[1]

[1]ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
[1]Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112

** Corresponding author: sureerat.y@psu.ac.th*
Received 12 November 2016; Revised 24 November 2016; Accepted 1 December 2016

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของกรดแอสคอร์บิค ออกซินและน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. โดยวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 0.1 กรัม บนอาหารสูตร Y_3 (Eeuwens, 1978) เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 วัน พบว่าการเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 32 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 1.76 เอ็มบริโอต่อหลอด สำหรับผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซิน พบว่าอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลมสูงสุด (globular embryo; GE) 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน GE สูงสุด 22.14 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (haustorium embryo; HE) 81.82 เปอร์เซ็นต์ และจำนวน HE 2.28 เอ็มบริโอต่อหลอด หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ส่วนการศึกษาผลของน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่าน้ำตาลแล็คโตสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้อัตราการเกิด GE 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน GE 52.68 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิด HE 84.21 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนการเกิด HE 14.01 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอระยะที่ 2 (secondary somatic embryo; SSE) 52.63 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนการเกิด SSE 6.67 เอ็มบริโอต่อหลอดหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ดังนั้นอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมน้ำตาลแล็คโตสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ในหลอดทดลองต่อไป

คำสำคัญ: โซมาติกเอ็มบริโอ, กรดแอสคอร์บิค, ออกซิน, น้ำตาล

Abstract

The effects of ascorbic acid, auxins and sugars on somatic embryo induction of oil palm SUP-PSU were evaluated. Embryogenic callus was cultured on Y_3 (Eeuwens, 1978) medium supplemented with 0.1 mg/L dicamba, 3 % sucrose and various concentrations of ascorbic acid, auxins and sugars. After culturing for 20 days, Adding 200 mg/L ascorbic acid gave the highest somatic embryo (SE) induction at 32% and number of SEs at 1.76 embryos/tube. For auxin types and concentrations, medium without plant growth regulators gave the highest globular embryo (GE) induction at 100%, number of GEs at 22.14 embryos/tube, haustorium embryo (HE) induction at 81.82% and number of HEs at 2.28 embryos/tube after 20 days of culture. In case of sugar types, 0.1 M lactose gave the highest GE induction at 100%, number of GEs at 52.68 embryos/tube, HE induction at 84.21%, number of HEs at 14.01 embryos/tube, secondary somatic embryo (SSE) induction at 52.63% and number of SSEs at 6.67 embryos/tube after 60 days of culture. Therefore, PGR-free Y_3 medium with 0.1 M lactose 200 mg/L ascorbic acid and 3% sucrose was suitable for somatic embryo induction. This protocol will be used for effective in vitro propagation of oil palm SUP-PSU in the future.

Keywords: Somatic embryo, Ascorbic acid, Auxin, Sugar

Online open access e-journal : www. natres.psu.ac.th/department/plantScience/sjps/default.htm
Published by Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: nr-sjps@group.psu.ac.th.

บทนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้น ใบเลี้ยงเดี่ยว มีการผสมข้ามต้น จัดอยู่ในวงศ์ Palmae หรือ Arecaceae และในสกุล *Elaeis* พันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ คือ *E. guineensis* เนื่องจากเป็นพันธุ์ปลูกที่นิยมปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาบริเวณตอนกลางและตะวันตกของทวีป สายพันธุ์ของปาล์มน้ำมันชนิดนี้จำแนกออกได้ 3 แบบ คือ ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา แบบที่มีการปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน คือ แบบเทเนอรา (ธีระ และคณะ, 2543) ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันชนิดเดียวของโลกที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับพืชน้ำมันอื่นทุกชนิด ประเทศไทยเริ่มปลูกปาล์มน้ำมันเพื่อการค้าครั้งแรกในปี พ.ศ. 2511 ปัจจุบันประเทศที่มีปริมาณการผลิตน้ำมันปาล์มจัดอยู่ในอันดับ 1 ของโลก คือ ประเทศอินโดเนียเซีย รองลงมาคือประเทศมาเลเซีย และประเทศไทยตามลำดับ (ธีระ, 2554) ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันที่ใช้ประโยชน์ทั้งด้านการบริโภคและอุปโภค เช่น ใช้น้ำมันโอเลอีนทำอาหารในครัวเรือน หรือใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ ที่ต้องมีการทอด เนยเทียม ไอศครีม ขนมขบเคี้ยว และลูกกวาด ครีมเทียมประเภทต่าง ๆ สบู่ และผงซักฟอก รวมถึงการผลิตเชื้อเพลิงเพื่อใช้กับเครื่องยนต์ เป็นต้น (ธีระ และคณะ, 2546) ปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้ามขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดทำให้พันธุกรรมของชั่วรุ่นลูกที่ได้ไม่มีความสม่ำเสมอ และทำให้ศักยภาพในการให้ผลผลิตของต้นปาล์มน้ำมันแต่ละต้นแตกต่างกัน ดังนั้นการพัฒนาโคลนของปาล์มน้ำมันจึงต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งใช้ชิ้นส่วนที่ไม่เกี่ยวกับเพศมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ลักษณะพันธุ์ที่เหมือนเดิม ชิ้นส่วนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมันที่ประสบความสำเร็จ เช่น การเพาะเลี้ยงคัพภะ (Te-chato, 1998) ช่อดอก (Teixeira *et al*., 1994) ชิ้นส่วนใบอ่อนจากต้นกล้าและใบอ่อนจากต้นที่ให้ผลผลิตแล้ว (สมปอง และคณะ, 2547) และราก (Wooi, 1995) เป็นต้น ซึ่งจะพัฒนาผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอ และงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้ กระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเป็นการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ หรือเนื้อเยื่อร่างกายซึ่งมีการพัฒนาเป็นขั้นต่าง ๆ โดยเปลี่ยนจากเอ็มบริโอรูปกลมเป็นรูปหัวใจ รูปตอร์ปิโด และต้นกล้า (คำนูณ, 2542) มีรายงานการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอในพืชหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน (Hilae and Te-chato, 2005) มะพร้าว (Perera *et al*., 2008) และอินทผลัม (Eke *et al*., 2005) ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอได้แก่ สารแอนติออกซิแดนท์ สารควบคุมการเจริญเติบโต และคาร์บอนในรูปของน้ำตาล เป็นต้น การเติมสารแอนติออกซิแดนท์ร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยง มีส่วนช่วยให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประสบความสำเร็จ Te-chato (1998) รายงานว่า การใช้กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับอาหารสามารถลดการสร้างสารประกอบฟีนอลลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนพืช เพื่อส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของแคลลัส และการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเช่นเดียวกับ Habibi และคณะ (2009) รายงานว่าการใช้กรดแอสคอร์บิคร่วมกับอาหารสามารถส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของ *Themeda quadrivalvis* ได้ดี ในส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยเฉพาะในกลุ่มของออกซินมีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ศตปพร และ สมปอง (2557) รายงานว่า การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM (Oil palm culture medium) เติม 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (ไดแคมบา) และกรดแอสคอร์บิคสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ Kramut และ Te-chato (2010) รายงานว่า 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับอาหาร MS ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.25 มิลลิลิตร และมีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 2-4 มิลลิเมตร จำนวน 20 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ Kanchanapoom และ Domyoas (1999) รายงานว่าการลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินลงสามารถส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ โดยการวางเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร Y_3 เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นเลี้ยงแคลลัสบนอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ และน้ำตาลเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ Hilae และ Te-chato (2005) รายงานว่าการใช้น้ำตาลซอร์บิทอลซึ่งมีหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน และควบคุมออสโมติกของอาหารเพาะเลี้ยงทำให้สามารถชักนำ SSE ในปาล์มน้ำมันได้ Tomaz และคณะ (2001) รายงานว่าน้ำตาลแล็คโตสมีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากแคลลัสของวาเลนเซีย ส้มหวาน และแมนดารินแต่ยังไม่มีรายงานในปาล์มน้ำมัน ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของกรดแอสคอร์บิค สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน น้ำตาลซอร์บิทอล และน้ำตาลแล็คโตสต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพืช

ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ลูกผสมเทเนอร่า C3/77(25) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสดังกล่าวเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y_3 (Eeuwens, 1978) เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ทำการย้ายเลี้ยงทุก ๆ เดือน (Figure 1)

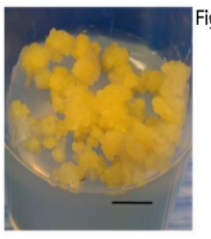


Figure 1 Embryogenic callus of oil palm tenera C3/77(25) SUP-PSU on Y_3 with 0.1 mg/L dicamba, 200 mg/L ascorbic acid and 3% sucrose after 20 days of culture. (bar = 0.5 cm)

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาผลของกรดแอสคอร์บิคต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้ำหนัก 0.1 กรัม วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y_3 เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 0 50 100 150 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 และ เติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากวางเลี้ยงนาน 20 วัน บันทึกอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดโดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

2. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้ำหนัก 0.1 กรัม วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y_3 ร่วมกับการเติมไดแคมบาเข้มข้น 0 0.05 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเติม 2,4-D เข้มข้น 0 0.05 0.1 0.2 0.4 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 และ เติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากวางเลี้ยงนาน 20 วัน บันทึกอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

3. ศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้ำหนัก 0.1 กรัม วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y_3 ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับการเติมแล็คโตสเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 โมลาร์หรือเติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 โมลาร์ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 และ เติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากวางเลี้ยงนาน 60 วัน บันทึกอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอด โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาผลของกรดแอสคอร์บิคต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอพบว่า อาหารสูตร Y_3 เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 32 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 1.27 และ 1.75 เอ็มบริโอต่อหลอด ตามลำดับ (Table1, Figure 2) รองลงมาคืออาหารที่ไม่เติมแอสคอร์บิคให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 26 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 1 เอ็มบริโอต่อหลอด กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 22.73 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 1.25 เอ็มบริโอต่อหลอด กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 12 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 1.67 เอ็มบริโอต่อหลอด และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 8.7 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 1 เอ็มบริโอต่อหลอด

Table 1 Effect of ascorbic acid on somatic embryo induction on Y_3 medium with 0.1 mg/L dicamba and 3% sucrose after 20 days of culture.

Ascorbic acid (mg/L)	SE induction (%)	No. of SE/tube
0	26.09	1.00
50	22.73	1.25
100	32.00	1.27
150	8.70	1.00
200	32.00	1.75
250	12.00	1.67
F-test		ns
C.V. (%)		49.34

ns = not significant difference

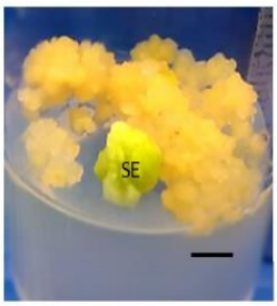


Figure 2 Somatic embryo (SE) induction on Y_3 medium with 200 mg/L ascorbic acid, 0.1 mg/L dicamba and 3% sucrose after 20 days of culture. (bar = 0.5 cm)

ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอไม่แตกต่างกันทางสถิติ อาหารที่เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของ Te-chato (1998) ที่รายงานว่าการใช้ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถส่งเสริมให้เกิด SE ได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ เนื่องจากกรดแอสคอร์บิค

เป็นสารแอนติออกซิแดนท์ที่สามารถยับยั้งการสร้างสารประกอบฟีนอล และยังช่วยส่งเสริมให้เกิดเป็นต้นอ่อนระยะเริ่มแรกอีกด้วย เช่นเดียวกับ Habibi และคณะ (2009) รายงานว่ากรดแอสคอร์บิคสามารถชักนำให้เกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอของ *Themeda quadrivalvis* ได้ เพราะกรดแอสคอร์บิคสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเซลล์ และการแบ่งเซลล์ของพืชได้ Wolucka และคณะ (2005) รายงานว่า กรดแอสคอร์บิคมีบทบาทในกระบวนการทางสรีรวิทยา เช่น การแบ่งเซลล์ และการเจริญเติบโตของพืช เป็นต้น

2. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของไดแคมบา และ 2,4-D ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร Y_3 พบว่า สูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตให้อัตราการเกิด GE สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน GE 22.14 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิด HE 81.82 เปอร์เซ็นต์ และจำนวน HE 2.28 เอ็มบริโอต่อหลอด HE ที่ชักนำได้มีลักษณะขุ่นทึบสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม (Table 2, Figure 3) เนื่องจากการลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถส่งเสริมกระบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิสได้ (Steinmacher *et al.*, 2007) ดังนั้นการไม่เติมหรือลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตลงสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Kanchanapoom และ Tinnongjig (2001) สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น และชักนำให้เกิดเอ็มบริโอในอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตได้สำเร็จเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ Boufis และคณะ (2014) ยังรายงานในทำนองเดียวกันว่าอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถส่งเสริม และพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอจำนวนมากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอินทผลัม

Table 2 Effects of types and concentrations of auxin on somatic embryo induction on Y_3 medium with 200 mg/L ascorbic acid and 3% sucrose after 20 days of culture.

Types of auxin		Globular induction (%)	No. of globular/tube	HE induction (%)	No. of HE/tube
Dicamba (mg/L)	2,4-D (mg/L)				
0	0	100.00	22.14a	81.82	2.28
0.05	0	85.71	4.78bc	57.14	1.83
0.1	0	86.95	3.80bc	47.82	1.82
0.2	0	78.26	3.00c	52.17	1.75
0.3	0	57.14	3.67bc	38.10	1.50
0.4	0	65.00	2.08c	35.00	1.43
0	0.05	89.47	6.41b	47.37	1.89
0	0.1	63.16	3.00c	63.16	1.58
0	0.2	84.21	3.25bc	47.37	2.00
0	0.4	47.83	2.36c	47.83	1.54
0	0.8	47.83	1.55c	47.83	1.54
F-test			*		ns
C.V. (%)			67.78		50.42

ns = not significant

* = significant difference at p≤ 0.05 level.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT

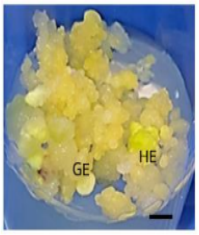


Figure 3 Haustorium embryo (HE) and globular embryo (GE) derived from embryogenic callus cultured on PGR-free Y_3 medium with 200 mg/L ascorbic acid and 3% sucrose after 20 days of culture. (bar = 0.5 cm)

3. ศึกษาผลของน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นความของน้ำตาลซอร์บิทอล และแล็คโตส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 60 วัน บนอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอาหาร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ไม่เติม และเติมน้ำตาลในทุกความเข้มข้นสามารถชักนำ GE 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลแล็คโตสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้จำนวน SE ทุกระยะสูงสุด 67.4 เอ็มบริโอต่อหลอด จำนวน GE สูงสุด 52.68 เอ็มบริโอต่อหลอด (Table 3, Figure 4a) อัตราการเกิด HE สูงสุด 84.21 เปอร์เซ็นต์ จำนวน HE ในทุกระยะสูงสุด 14.01 เอ็มบริโอต่อหลอด

จำนวน early haustorium embryo (EHE) สูงสุด 9.13 เอ็มบริโอต่อหลอด (Figure 4, Figure 5b) จำนวนการงอกของ haustorium embryo ระยะแรก (early germination of HE; EG) 2.88 เอ็มบริโอต่อหลอด (Figure 4, Figure 5c) จำนวนการงอกของ haustorium embryo ระยะที่ 2 (root emerging of HE; RE) 2 เอ็มบริโอต่อหลอด (Figure 4, Figure 5d) อัตราการเกิด SSE 52.63 เปอร์เซ็นต์ และจำนวน SSE สูงสุด 6.67 เอ็มบริโอต่อหลอด (Figure 4e) สอดคล้องกับการทดลองของ Ricci และคณะ (2002) นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลแล็คโตสสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุดในพืชตระกูลส้ม เช่นเดียวกับ Kayim และ Kemal Koc (2006) รายงานว่าอาหารที่เติมน้ำตาลแล็คโตสมีผลต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่าน้ำตาลอื่น ๆ ในพืชตระกูลส้ม แต่อาหารสูตรที่เติมน้ำตาลแล็คโตสเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้อัตราการเกิด SSE สูงสุด 72.22 เปอร์เซ็นต์ และจำนวน RE สูงสุด 2.67 เอ็มบริโอต่อหลอด และอาหารที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล 0.3 โมลาร์ ให้จำนวน EG สูงสุด 3.17 เอ็มบริโอต่อหลอด ความเข้มข้นและชนิดของน้ำตาลแต่ละทรีตเมนท์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ การเติมน้ำตาลแล็คโตสส่งผลให้พืชเกิดสภาวะเครียดน้ำ เนื่องจากน้ำตาลชนิดนี้จะไปควบคุมออสโมติกของอาหารเพาะเลี้ยงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนภายในเซลล์ส่งเสริมให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ ได้ (de Touchet *et al*., 1991)

Table 3 Effect of sugars on somatic embryo induction on PGR-free Y_3 medium with 200 mg/L ascorbic acid and 3% sucrose after 60 days of culture.

Types and concentrations of sugar		Globular induction (%)	No. of globular/tube	HE induction (%)	No. of HE/tube	Average no. of SE/tube	SSE induction (%)	No. of SSE/tube
Sor (M)	Lac (M)							
0	0	100	31.62b	75.00	5.77bc	35.93bc	8.33	4.26ab
0.1	0	100	29.17b	77.77	9.84ab	38.37bc	33.33	3.07b
0.2	0	100	32.62b	74.54	10.07ab	41.68b	33.33	2.66b
0.3	0	100	31.91b	64.81	10.05ab	39.84bc	44.44	3.13b
0.4	0	100	35.40b	57.89	5.12c	39.52bc	36.84	4.71ab
0	0.1	100	52.68a	84.21	14.01a	67.40a	52.63	6.67ab
0	0.2	100	45.67a	68.52	13.42a	58.65a	72.22	5.33ab
0	0.3	100	34.58b	69.84	10.36a	44.67b	42.86	7.88a
0	0.4	100	26.12b	38.60	4.72c	29.08c	5.26	4.26ab
F-test			*		*	*		*
C.V. (%)			16.18		26.61	15.03		45.83

ns = not significant difference

* = significant difference at p≤ 0.05 level.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT

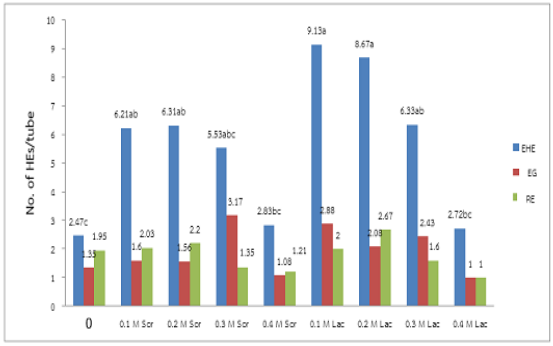


Figure 4 Effect of sugar types on haustorium embryo induction after 2 months of culture. Means followed by the same letter are not significantly different according to DMRT. Significant difference at p≤ 0.01 level.

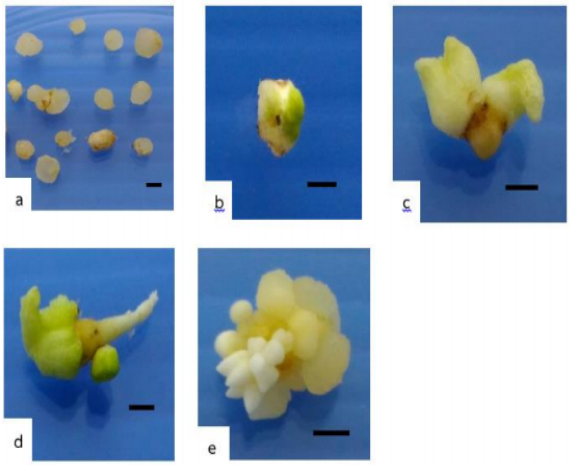


Figure 5 Somatic embryo obtained from Y_3 medium with 0.1 M lactose, 3% sucrose and 200 mg/L ascorbic acid after 60 days of culture. (bars = 0.2 cm) (a) Globular embryo (GE) stage (b) Early haustorium embryo (EHE) stage (c) Early germination of HE (EG) stage (d) Root emerging of HE (RE) stage (e) Secondary somatic embryo (SSE) stage

สรุปผล

จากการศึกษาผลของกรดแอสคอร์บิค สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน และน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าอาหารที่เติมน้ำตาลแล็คโตสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวน SE ทุกระยะสูงสุด 67.4 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิด GE 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน GE สูงสุด 52.68 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิด HE สูงสุด 84.21 เปอร์เซ็นต์ จำนวน HE ในทุกระยะสูงสุด 14.01 เอ็มบริโอต่อหลอด จำนวน EHE สูงสุด 9.13 เอ็มบริโอต่อหลอด จำนวน EG 2.88 เอ็มบริโอต่อหลอด จำนวน RE 2 เอ็มบริโอต่อหลอด อัตราการเกิด SSE 52.63 เปอร์เซ็นต์ และจำนวน SSE สูงสุด 6.67 เอ็มบริโอต่อหลอด ซึ่งเป็นสูตรที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเพื่อการขยายพันธุ์ต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนบัณฑิตศึกษาภายใต้โครงการวิจัย มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติระยะที่ 2 และสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมันระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่สนับสนุนทุนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำ และหะสัน กือมะ. 2543. เอกสารประกอบการฝึกอบรมการจัดการสวนปาล์มน้ำมัน. สงขลา: คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำ และวรรณา เลี้ยววาริณ. 2546. คู่มือปาล์มน้ำมันและการจัดการสวน. สงขลา: คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศตปพร เกิดสุวรรณ และสมปอง เตชะโต. 2557. ผลของไดแคมบาต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นต้นของปาล์มน้ำมัน. ว. พืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1: 2-9.

สมปอง เตชะโต, อาสลัน หิเล และอิบรอเฮม ยีดำ. 2547. การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและพืชต้นใหม่จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 26: 617-628.

Boufisa, N., Khelifi-Slaouia, M., Djillalia, Z., Zaouia, D. Morslia, A., Bernardsc, M.A., Makhzumc, A. and Khelifia, L. 2014. Effects of growth regulators and types of culture media on somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Degla Beida). Scientia Horticulturae 172: 135-142.

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

Eke, C.R., Akomeah, P. and Asemota, O. 2005. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. African Journal of Biotechnology 4: 244-246.

Habibi, N., Suthar, R.K. and Purohit, S.D. 2009. Role of PGRs and inhibitors in induction and control of somatic embryogenesis in *Themeda quadrivalvis*. Indian Journal of Experimental Biology 47: 198-203.

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 guineensis* Jacq.). Songklanakarin Journal of Science and Technology 27: 630-635.

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

Kayim, M. and Kemal Koc, N. 2006. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. Scientia Horticulturae 109: 29-34.

Kramut, P. and Te-chato, S. 2010. Effect of culture media, plant growth regulators and carbon sources on establishment of somatic embryo in suspension culture of oil palm. Journal of Agricultural Technology 6: 159-170.

Perera, P.I.P., Yakandawala, D.M.D., Verdeil, J.L., Hocher, V. and Weerakoon L.K. 2008. Somatic embryogenesis and plant regeneration from unfertilised ovary explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). Tropical Agricultural Research 20: 226-233.

Ricci, A.P., Mourão Filho, F.D.A.A., Januzzi, B.M. and Stefano Piedade, S.M.D. 2002. Somatic embryogenesis in Citrus sinensis, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. Scientia Agricola 59: 41-46.

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

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

Tomaz, M.L., Mendes, B.M.J., Mourao Filho, F.A.A., Demetrio, C.G.B., Jansakul, N. and Rodriguez, P.M. 2001. Somatic embryogenesis in Citrus spp. Carbohydrate stimulation and histodifferentiation. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 37: 446-452.

Wolucka, B.A., Goossens, A. and Inzé, D. 2005. Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. Journal of Experimental Botany 56: 2527-2538.

Wooi, K.C. 1995. Oil palm tissue culture–current practice and constraints. In Recent Developments in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology (eds. V. Rao, I. E. Henson and N. Rajanaidu). pp. 56-57. Bangi: Palm Oil Research Institute of Malaysia.

SJPS-I-M02-OT02016

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวอภิชญา นุกูลรัตน์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5710620025

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2556

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ทุนสนับสนุนสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2
3. ทุนสนับสนุนการผลิตบัณฑิต สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน ระยะที่2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
4. ทุนภายใต้ความร่วมมือ (MOU) ระหว่างคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กับมหาวิทยาลัยมิยาซากิ ประเทศญี่ปุ่น สนับสนุนเงินทุนจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

อภิชญา นุกูลรัตน์ สุรีรัตน์ เย็นช้อน และ สมปอง เตชะโต. 2559. ผลของกรดแอสคอร์บิค ออกซิน และน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วารสารพืช-ศาสตร์สงขลานครินทร์ 3(4): 1-7.