ผลของการสับ สภาพวางเลี้ยง และสารแอนติออกซิแดนท์ต่อการเพิ่มปริมาณและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

Effects of Chopping, Culture Conditions and Antioxidants on Proliferation and Development of Somatic Embryo of Oil Palm SUP-PSU

ชีรวัลย์ สิทธิศักดิ์

Cherawan Sittisak

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 ผลของการสับ สภาพวางเลี้ยง และสารแอนติออกซิแดนท์ต่อการเพิ่มปริมาณและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

ผู้เขียน นางสาวชีรวัลย์ สิทธิศักดิ์

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….…....

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

คณะกรรมการสอบ

……...…ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี รามสูตร)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

…..……..…...กรรมการ

(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

.....กรรมการ

(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ……..……..
(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ……..
(นางสาวชีรวัลย์ สิทธิศักดิ์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ……...…..……..…….....
(นางสาวชีรวัลย์ สิทธิศักดิ์)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของการสับ สภาพวางเลี้ยง และสารแอนติออกซิแดนท์ต่อการเพิ่มปริมาณและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.
ผู้เขียน	นางสาวชีรวัลย์ สิทธิศักดิ์
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2559

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของการสับ สภาพการวางเลี้ยงและสารแอนติออกซิแดนท์ต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน โดยการใช้โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น สร้างบาดแผลโดยการใช้ใบมีดโกนสับเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กเป็นจำนวนครั้งที่แตกต่างกัน พบว่าโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสับด้วยความถี่ 100 ครั้ง ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 45 เปอร์เซ็นต์ จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 4.13 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง สำหรับสภาพการวางเลี้ยง พบว่า ทั้งในที่มืดและให้แสงส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้เท่ากัน 82 เปอร์เซ็นต์ การวางเลี้ยงในสภาพที่มีแสงให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 5.06 เอ็มบริโอต่อหลอดสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในที่มืด สำหรับการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสนั้น พบว่าการวางเลี้ยงในที่มืดให้อัตราการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 90 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในที่มีแสง นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงในที่มืดช่วยลดการเกิดสีน้ำตาลจากชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสร้างบาดแผล อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอ คือ 28±2 องศาเซลเซียสการเติมกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารแข็งสูตร Oil palm culture medium (OPCM) ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 9.15 เอ็มบริโอต่อหลอด อย่างไรก็ตามกรดซิตริก 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 278 มิลลิกรัม และมีจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดสีน้ำตาลน้อยที่สุด 4.95 ชิ้นต่อหลอดทดลอง และเมื่อวางเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอ บนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับการใช้กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนยอดสูงสุด คือ 7.11 ยอด/โซมาติกเอ็มบริโอ ซึ่งวิธีการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส การเพิ่มปริมาณและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอด้วยวิธีการนี้ สามารถนำไปสู่ความสำเร็จในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปในอนาคต

Thesis Title	Effects of Chopping, Culture Conditions and Antioxidants on Proliferation and Development of Somatic Embryo of Oil Palm SUP-PSU
Author	Miss Cherawan Sittisak
Major Program	Plant Science
Academic Year	2016

Abstract

Effects of chopping, culture conditions and antioxidants on proliferation of embryogenic callus and somatic embryo formation of oil palm were investigated. Haustorium embryos (HE) of oil palm were chopped into small pieces at different strokes. The results revealed that wounding by chopping HE at 100 strokes gave the best result in percentage of somatic embryo formation at 45 and the highest number of somatic embryos at 4.13 embryos/tube. For culture conditions. The culture in both dark and light gave the same percentage of somatic embryo formation at 82, but light condition gave the higher number of HE at 5.06 embryos/tube. Dark condition gave the higher callus induction at 90% but lower area of browning. The better temperature for somatic embryo proliferation was 28±2 °C. For antioxidants, chopped HE cultured on oil palm culture medium (OPCM) supplement with 200 mg/l ascorbic acid gave the highest number of somatic embryos at 9.15 embryos/tube. However, 200 mg/l citric acid containing OPCM medium gave the highest fresh weight of callus at 278 mg and lowest number of browning somatic embryos at 4.95 embryos/tube. Somatic embryo cultured on MS medium supplement with 0.2 M sorbitol and 200 mg/l ascorbic acid gave the highest shoot formation at 7.11 shoots/HE. This protocol will be very useful for propagation of oil palm clone in future.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต และ ดร. ทัศนี ขาวเนียม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ค่อยอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ ความเข้าใจ และแนวทางในการปฏิบัติการด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาวดี รามสูตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร. สุรีรัตน์ เย็นช้อน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำต่างๆ รวมถึงการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องภายในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อสมนึก และคุณแม่สมบูรณ์ สิทธิศักดิ์ ญาติพี่น้องทุกท่าน ที่คอยอบรมสั่งสอนและเลี้ยงดู ตลอดจนการให้ทุนการศึกษา และให้กำลังใจจนข้าพเจ้าได้เรียนจนถึงปริญญาโท

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุกท่าน ที่ได้กรุณาอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ ทั้งทางด้านวิชาการและคุณธรรม ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของ ภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ จนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากสถานความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติระยะที่ 2 สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมันระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีทางชีวภาพของพืชปลูกทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือซึ่งกันและกัน ให้กำลังใจในทุกครั้งที่เกิดปัญหาและท้อถอย คอยสนับสนุนให้ปฏิบัติตัวไปในทางที่ดี คอยตักเตือนเมื่อทำผิดพลาด และเป็นที่ปรึกษาในทุกเรื่อง ทั้งด้านการทำวิจัยและการดำเนินชีวิต จนข้าพเจ้าทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ชีรวัลย์ สิทธิศักดิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(11)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	11
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	12
วัสดุ อุปกรณ์	12
วิธีการวิจัย	14
3 ผล	18
4 วิจารณ์	33
5 สรุป	36
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	42
ประวัติผู้เขียน	44

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของการสร้างบาดแผลชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง ต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน หลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	18
2	ผลของสภาพการวางเลี้ยงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันที่ผ่านการสับ 100 ครั้ง หลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	21
3	ผลของสารแอนติออกซิแดนท์และอุณหภูมิในการวางเลี้ยงต่ออัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	23
4	ผลของสารแอนติออกซิแดนท์และอุณหภูมิในการวางเลี้ยงต่อการชักนำปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	24
5	ผลของสารแอนติออกซิแดนท์และอุณหภูมิในการวางเลี้ยงต่ออัตราการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	24

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
6	ผลของสารแอนติออกซิแดนท์และอุณหภูมิในการวางเลี้ยงต่อน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	25
7	ผลของสารแอนติออกซิแดนท์และอุณหภูมิในการวางเลี้ยงต่อชิ้นส่วนที่เกิดการเกิดสีน้ำตาล หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	26
8	ผลของความเข้มข้นขององค์ประกอบสูตรอาหาร และสารแอนติออกซิแดนท์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารก่อนการย้ายเลี้ยงต่ออัตราการเกิดยอด บนอาหารแข็งเติมกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	28
9	ผลของความเข้มข้นขององค์ประกอบสูตรอาหาร และสารแอนติออกซิแดนท์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารก่อนการย้ายเลี้ยงต่อจำนวนยอด บนอาหารแข็ง เติมกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	29
10	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	31

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนการพัฒนาในระยะต่างของกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสและกระบวนการไซโกติกเอ็มบริโอเจเนซีส	10
2	โซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันจากการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้นข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ย้ายเลี้ยงทุกเดือน เป็นเวลา 4 เดือน	12
3	ขนาดของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ	15
4	การเกิดสีน้ำตาลจากการสร้างบาดแผลด้วยจำนวนครั้งความถี่ที่แตกต่าง หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	19
5	ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านและไม่ผ่านการสร้างบาดแผลแล้วเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	20
6	ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอ ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสับด้วย ความถี่ 100 ครั้ง (0.1-0.2 ตร.ซม.) บนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	26
7	พัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสร้างบาดแผลด้วยความถี่ 100 ครั้ง วางเลี้ยงที่อุณหภูมิแตกต่างกันบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสารแอนติออกซิแดนท์ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	27

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ในความเข้มข้นขององค์ประกอบอาหารแตกต่างกัน เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	30
9	พัฒนาการของยอดจากโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน	32

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

AA	=	Ascorbic acid
CA	=	Citric acid
CRD	=	Completely randomized design
dicamba	=	3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid
DMRT	=	Duncan's multiple range test
EC	=	Embryogenic callus
HE	=	Haustorium embryo
MS	=	Murashige and Skoog
ns	=	Non significant different
OPCM	=	Oil palm culture medium
PVP	=	Polyvinylpyrrolidone
SE	=	Somatic embryo

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineesis* Jacq.) จัดเป็นพืชอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในระดับโลก และในระดับประเทศไทย (ธีระ และคณะ, 2548) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาแถบประเทศชายฝั่งตะวันตกและตอนกลาง จัดอยู่ในสกุล *Elaeis* สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ *E. guineensis* *E. oleifera* และ *E. odora* แต่ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ คือ *E. guineensis* ปาล์มน้ำมันชนิดนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ แบบดูรา แบบฟิสิเฟอรา และแบบเทเนอรา โดยแบบที่นิยมปลูกเป็นการค้า คือ แบบเทเนอรา (ธีระ และคณะ, 2543) ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างดูราพันธุ์แม่ กับพันธุ์พ่อฟิสิเฟอรา มีลักษณะเปลือกชั้นนอกหนาและให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันมาก 60-90% มีกะลาบาง (0.5-4 มิลลิเมตร) ซึ่งลักษณะความหนาของกะลาเป็นลักษณะที่สำคัญที่สุดต่อเศรษฐกิจ เพราะมีผลต่อปริมาณเปลือกนอกที่ให้น้ำมัน ทั้งนี้เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงกว่าพืชน้ำมันทุกชนิด เป็นพืชน้ำมันที่มีการผลิตน้ำมันและการบริโภคจัดอยู่ในอันดับสอง ของโลกรองมาจากถั่วเหลือง (ธีระ และคณะ, 2546) และปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชที่สามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้ทั้ง อุปโภคและบริโภค เช่น ใช้น้ำมันปาล์มโอเลอีน ทำอาหารในครัวเรือน และอุตสาหกรรมโอเลโอเคมีคอล (oleochemical) ซึ่งรวมถึงการผลิตเชื้อเพลิง (เมทานอล) เพื่อใช้กับเครื่องยนต์ เป็นต้น (ธีระ และคณะ, 2548) ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของ ภาคใต้ สำหรับประเทศไทยพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันของประเทศนั้น ได้มีการขยายตัวอย่างต่อเนื่องมาโดยตลอด จนปัจจุบันปาล์มน้ำมันกลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งโดยมีพื้นที่ปลูกทั้งประเทศ 4.52 ล้านไร่ ผลผลิต 11.68 ล้านตัน และผลผลิตต่อไร่ 2,576 กิโลกรัม (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) โดยมีแหล่งผลิตที่สำคัญ คือ ภาคใต้ ปลูกมากที่สุดในจังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง ซึ่งจากปัญหาวิกฤติราคาน้ำมันในช่วง 5 ปีที่ผ่านมารัฐบาลได้มีนโยบายส่งเสริมการใช้พลังงานทดแทนจากพืชกล่าวคือส่งเสริมการใช้แก๊สโซฮอลล์ซึ่งมีส่วนผสมของเอทานอลที่ผลิตจากอ้อยและมันสำปะหลังและการใช้น้ำมันดีเซลที่มีส่วนผสมของไบโอดีเซลที่ผลิตจากปาล์มน้ำมันร้อยละ3และร้อยละ 5 หรือที่เรียกกันว่า บี3 และ บี5 ในปัจจุบัน (กรกัญญา และวิรัชญา, 2555)

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อปลูกเชิงการค้าในปัจจุบันมีด้วยกัน 2 วิธี คือการขยายพันธุ์แบบดั้งเดิม และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์แบบดั้งเดิมเป็นการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดพันธุ์ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมและใช้ได้กับพืชส่วนใหญ่ เมล็ดพันธุ์ของปาล์มน้ำมันประกอบด้วย กะลา เนื้อผลชั้นใน หรืออาหารสะสมเลี้ยงต้นอ่อน และคัพภะ ที่ใช้สำหรับการขยายพันธุ์ กะลาเป็นส่วนที่แข็ง มีความหนาบางแตกต่างกันตามลักษณะประจำพันธุ์ โดยปกติเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันมีกลไกการพักตัวจาก 2 ส่วนคือ การพักตัวเนื่องจากกะลาที่แข็ง และการพักตัวจากเนื้อผลชั้นใน การแก้การพักตัวทำโดยการอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50-90 วัน แช่น้ำ 7 วัน เพาะเมล็ดในห้องเพาะอีก 30-45 วัน จากนั้นคัดเมล็ดพันธุ์ที่สมบูรณ์ลงแปลงเพาะชำ (ธีระ และคณะ, 2548) หากปล่อยให้งอกตามสภาพธรรมชาติ ต้องใช้เวลานาน 3-6 เดือน จึงจะมีอัตราการงอก 50 เปอร์เซ็นต์ ในการเพาะเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันอาจได้ต้น 1-3 ต้นต่อเมล็ด (ปกติได้เพียง 1 ต้น) อย่างไรก็ตามการที่จะได้มาซึ่งปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูง ต้องผ่านการปรับปรุงพันธุ์เป็นระยะเวลานาน 10 ปี อีกทั้งไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์จากโคนต้นมาปลูกได้ เนื่องจากมีลักษณะเป็นพันธุ์ทาง และมีความแปรปรวนสูง โดยเฉพาะลักษณะของผลปาล์ม ซึ่งมีการกระจายตัวในลูกรุ่นชั่วที่สอง (F2) จากการผสมตัวเอง (ได้พันธุ์ดูรา เทเนอรา และฟิสิเฟอรา ในอัตราส่วน 1:2:1) จึงไม่สามารถใช้เมล็ดขยายพันธุ์ได้ อีกทั้งเมล็ดที่ได้ยังไม่เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกรที่ต้องการปลูกปาล์มน้ำมันเพิ่มสูงขึ้นในปัจจุบัน นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์หรือต้นพันธุ์จากต่างประเทศไม่เหมาะกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทย และยังเสี่ยงต่อโรค และแมลงที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้า อีกทั้งยังมีราคาแพง (สุจินต์ และคณะ, 2530) ดังนั้นการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยจะทำให้สามารถขยายพันธุ์ และเพิ่มปริมาณต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีได้ทันกับความต้องการของเกษตรกร (สมปอง, 2555) อย่างไรก็ตามปาล์มน้ำมันที่ปลูกด้วยเมล็ดพันธุ์ในปัจจุบันให้ผลผลิตเฉลี่ยเพียง 2-2.5 ตันต่อไร่ และไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ใต้ต้นไปขยายพันธุ์ได้ เนื่องจากเป็นพันธุ์ทาง ส่วนเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าอาจเป็นเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ดี เนื่องจากความผิดพลาดในการผลิตเมล็ดพันธุ์หรือการปลอมปนโดยตั้งใจ แม้จะมีการคัดเลือกและปลูกด้วยเมล็ดพันธุ์ดีก็ตามผลผลิตก็ยังคงต่ำเฉลี่ยไม่เกิน 3 ตันต่อไร่ ปัจจุบันได้มีการคัดเลือกลูกผสม D (ดูรา) x P (ฟิสิเฟอรา) ที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูงมากกว่า 5 ตันต่อไร่ นับเป็นการเพิ่มผลผลิตปาล์มน้ำมันในสภาพพื้นที่เพาะปลูกที่จำกัด แม้ว่าจะมีบริษัทพยายามผลิตลูกผสมพันธุ์เทเนอราออกจำหน่ายให้กับเกษตรกร แต่ยังไม่มีการรับประกันว่าเป็นพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูง และยังคงเก็บเมล็ดใต้โคนต้นมาเพาะเพื่อจำหน่ายต้นพันธุ์ในราคาถูก (สมปอง, 2544) และที่สำคัญเมล็ดปาล์มน้ำมันเมื่อสุกแก่จะมีการพักตัว เมื่อนำมาเพาะต้องใช้เวลานานกว่าเมล็ดจะงอก ทำให้

ต้องผ่านกระบวนการเตรียมหลายขั้นตอน อีกทั้งคู่ผสมที่ดีมีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำเพียง 20-30 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีกะลาที่หนามาก จึงไม่สามารถที่จะผลิตทางการค้าได้ (สมปอง, 2555)

ปัจจุบันการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยไม่อาศัยเพศผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิธีซึ่งกำลังเป็นที่นิยมในการขยายพันธุ์พืชจากชิ้นส่วนของเซลล์ร่างกาย โดยมีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันตั้งแต่ปี 1970 ซึ่งเป็นการขยายพันธุ์โดยใช้เนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของปาล์มน้ำมัน ส่วนใหญ่เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์เทเนอราซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า โดยข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันคือ ได้ต้นกล้าจำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น ต้นกล้าที่ได้มีลักษณะเหมือนต้นแม่เดิมทุกประการ เช่น ผลผลิตต่อไร่ เปอร์เซ็นต์น้ำมัน เป็นต้น (สมปอง, 2539) มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันโดยใช้ชิ้นส่วนราก (Wooi, 1995) ใบอ่อน (สมปอง และคณะ, 2547) ช่อดอก (Teixeira *et al*., 1994) และคัพภะ (Te-chato,1998; Kanchanapoom and Domyoas, 1999) หลังจากได้ต้นขนาดเล็กแล้วนำไปอนุบาลในแปลงเพาะชำต่อไป กระบวนการสร้างพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันมี 2 กระบวนการ คือ เอ็มบริโอเจนีซีส และออกาโนเจนีซีส ซึ่งพืชต้นใหม่ที่เกิดขึ้นอาจเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง หรือเกิดจากแคลลัส อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการขยายพันธุ์จำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในปาล์มน้ำมันนั้นเกิดโดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสที่ผ่านการสร้างแคลลัสเท่านั้น

โดยทั่วไปการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันไปสู่ระยะโซมาติกเอ็มบริโอนั้นใช้เวลามากกว่า 1 ปี (Khoo *et al*., 1999) Te-chato และ Hilae (2007) พัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และชักนำโซมาติกเอ็มบริโอโดยใช้ระยะเวลา 4 เดือน นับเป็นการช่วยย่นระยะเวลาในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ดังนั้นพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ เป็นไปได้รวดเร็ว ส่งผลให้การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นที่ได้ ต้นที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์สูง (กาญจนี, 2553) การเพิ่มความเครียดแล้วกระตุ้นการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอได้เร็วนับว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ช่วยให้การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนการนี้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอ มีหลายปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ แสง ภาชนะเพาะเลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีผลร่วมกันต่อการสร้าง และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ และในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนได้พืชต้นใหม่ ดังนั้น การทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของการสับ สภาพวางเลี้ยงและสารแอนติออกซิแดนท์ต่อการเพิ่มปริมาณและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การตรวจเอกสาร

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปัจจุบันการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยไม่อาศัยเพศผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิธีการซึ่งกำลังเป็นที่นิยมในการขยายพันธุ์พืชจากชิ้นส่วนของเซลล์ร่างกาย โดยมีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของปาล์มน้ำมัน ส่วนใหญ่เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเทเนอราซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า โดยข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ ได้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ต้นกล้าที่ได้มีลักษณะเหมือนต้นแม่เดิมทุกประการ และมีความสม่ำเสมอในต้นพันธุ์ที่สูงมาก เช่น ผลผลิตต่อไร่ เปอร์เซ็นต์น้ำมัน เป็นต้น (สมปอง, 2539) มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันโดยใช้ชิ้นส่วนราก (Wooi, 1995) ใบอ่อน (สมปอง และคณะ, 2547) ช่อดอก (Teixeira *et al*., 1994) และคัพภะ (Te-chato, 1998; Kanchanapoom and Domyoas, 1999) กระบวนการสร้างพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 2 กระบวนการ คือ เอ็มบริโอเจนีซีสและออกาโนเจนีซีส ซึ่งพืชต้นใหม่ที่เกิดขึ้นอาจเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง หรือเกิดจากแคลลัส กระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสทำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่โดยมีการพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ เหมือนกับเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมพันธุ์ด้วยวิธีปกติ เรียกเอ็มบริโอที่มีพัฒนาการมาจากเซลล์ร่างกายว่า โซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo: SE) หรือเอ็มบริออยด์ (embryoid) การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถใช้ชิ้นส่วนต่างๆ ในการเพาะ เลี้ยงได้แก่ ใบอ่อน คัพภะ และราก (Duval *et al*., 1995) การเพาะเลี้ยงรากไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากการเพาะเลี้ยงรากมักประสบปัญหาการปนเปื้อนของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง ส่วนการเพาะเลี้ยงช่อดอกมีวิธีการแยกชิ้นส่วนออกมาเพาะเลี้ยงซึ่งทำได้ยาก ทำให้ได้รับความเสียหายและเกิดสีน้ำตาล หรือออกซิเดชั่นจำนวนมาก นอกจากนี้เซลล์ในช่อดอกมีทั้งเซลล์ร่างกายและเซลล์เพศ ดังนั้นต้นที่ได้อาจมีความแปรปรวน การเพาะเลี้ยงใบอ่อนอาจทำให้ต้นแม่ได้รับความเสียหายและยุ่งยาก ดังนั้นการเพาะเลี้ยงคัพภะจึงเป็นวิธีที่สะดวกในการเก็บตัวอย่างมากกว่าชิ้นส่วนอื่น และน่าจะมีการตอบสนองได้เร็วกว่าเนื่องจากเป็นต้นอ่อนอยู่แล้ว อีกทั้งยังสามารถร่นระยะเวลาในการงอก ช่วยชีวิตลูกผสมและยังเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากอย่างต่อเนื่องผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซีส นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงคัพภะยังช่วยขยายพันธุ์โดยการชักนำให้คัพภะสร้างยอดจำนวนมาก หรือชักนำแคลลัสเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ได้ มีรายงานการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงคัพภะ โดย Hussey (1958) รายงานการพักตัวของเมล็ดปาล์มน้ำมันอันเนื่องมาจากปัจจัยในเนื้อผล ดังนั้นการเพาะเมล็ดต้องผ่านกระบวนการ stratification ก่อนนำไปเพาะปลูก

Rabechault และ Martin (1976) ตัดแยกคัพภะปาล์มน้ำมันออกมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมออกซิน พบว่า สามารถส่งเสริมการงอกได้ อย่างไรก็ตามก่อนเพาะเลี้ยงคัพภะต้องผ่านการเตรียมด้วยวิธีการที่เหมาะสม เจริญ และคณะ (2532) เพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันเพื่อแก้การพักตัว ชักนำการสร้างต้นอ่อนมากกว่า 1 ต้น (polyembryony) และผลิตต้นกล้าเพื่อใช้ใบอ่อนเป็นแหล่งในการแยกโปรโตพลาสต์ Te-chato (1998) ผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำนวนมาก จากการเพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันจากต้นแม่เทเนอราผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส และพบว่าต้นที่ได้ไม่มีความผิดปกติของลักษณะทางสัณฐานแต่อย่างใด เมื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมพบว่าเหมือนต้นเดิมคือ 2n=2x=32 Kanchanapoom และ Domyoas (1999) ศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาการเกิดแคลลัส และการพัฒนาของ โซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS แคลลัสเกิดขึ้นบริเวณถัดจากเนื้อเยื่อชั้นนอกเข้าไป (subepidermis) หลังจากเพาะเลี้ยง 1 เดือน โดยเซลล์มีขนาดเล็ก ไซโทพลาสซึมหนาแน่น และนิวเคลียสติดสีเข้ม พบกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงหลังจากเพาะเลี้ยง 2 เดือน การแบ่งเซลล์ครั้งแรกมีทิศทางไม่แน่นอน และค่อย ๆ เพิ่มปริมาณจาก 2 เซลล์เป็น 4 เซลล์ต่อมาสร้างเป็นกลุ่มเซลล์ proembryo ประกอบด้วย 8-10 เซลล์เริ่มมีการยืดยาวและเปลี่ยนแปลงเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากเพาะเลี้ยง 3 เดือน จากนั้นแบ่งเซลล์เป็นต้นอ่อนระยะรูปกลม ระยะรูปหัวใจ และระยะทอร์ปิโด ลักษณะที่เกิดขึ้นจากกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสเหมือนต้นอ่อนที่เกิดจาก ไซโกติกเอ็มบริโอทุกประการ

ธิดารัตน์ (2558) ศึกษาผลของสูตรอาหารและสภาพการวางเลี้ยงต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันฟิสิเฟอรา ที่ได้จากการผสมเปิดอายุ 5 ปี มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็ง 3 สูตร คือ MS , OPCM และWPM อาหารทุกสูตรเติมไดแคมบา เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่สว่าง 14 ชั่วโมงต่อวัน จากการศึกษา พบว่า สูตรอาหาร MS ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 90 วันในที่มืด

สมปอง และคณะ (2530) ศึกษาการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันอายุ 195 วัน บนอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 พบว่า สามารถชักนำแคลลัสที่เจริญเติบโตช้า (slow growing callus) บริเวณรอยตัดขอบใบ 40 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

Karun และ Sajini (1996) ชักนำแคลลัสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันของต้นกล้าปาล์มน้ำมันเทเนอรา และดูราอายุ 6 และ 18 เดือน ตามลำดับ บนอาหารสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม 2,4-D เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ระยะเวลาและเปอร์เซ็นต์แคลลัสแตกต่างกัน โดยมีการสร้างแคลลัส 7 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยง 100-120 วัน นอกจากนี้

ยังพบว่าในต้นปาล์มน้ำมันที่มีอายุแตกต่างกันตอบสนองต่อความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงและชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันออกไป

Te-chato (1998) ผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันที่เก็บเกี่ยวจากต้นแม่เทเนอราผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซีส โดยต้นกล้าที่ใช้ในการศึกษาได้รับการชักนำและดูแลในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับต่ำ คือ ระยะชักนำแคลลัสเพาะเลี้ยงใบอ่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นย้ายลงอาหารสูตร MS ที่เติมเคซีนไฮโดรไลเซส เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D หรือ dicamba เข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสงความเข้มข้น 2500 ลักซ์เป็นเวลา 10 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 3-6 เดือน แคลลัสพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ

ปัจจัยที่ชักนำการเกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมัน

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอ มีหลายปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ แสง ภาชนะ สารควบคุมการเจริญเติบโต และการสร้างบาดแผล เป็นต้น ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีผลร่วมกันต่อการสร้างและพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอ

1.อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง อาสลัน (2545) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันจากต้นที่ให้ผลผลิตแล้ว 10 ปี บนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิด NAA dicamba และ 2,4-D ในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 26± 4 และ 28±0.5 องศาเซลเซียส ชิ้นส่วนเริ่มสร้างแคลลัสหลังจากการวางเลี้ยง 2-3 เดือน โดยแคลลัสมีลักษณะเป็นปมสีเหลืองอ่อนเกิดบริเวณรอยตัดและผิวของชิ้นส่วน การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนสูตรอาหาร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ทั้งสองอุณหภูมิ โดยมีการสร้างแคลลัส 5.55 และ 7.93 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างแคลลัสได้ 2.78 เปอร์เซ็นต์ เฉพาะที่อุณหภูมิ 28± 0.5 องศาเซลเซียสเท่านั้น สำหรับการเติม NAA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 26± 4 องศาเซลเซียสเท่านั้นที่สร้างแคลลัสได้ 1.67 เปอร์เซ็นต์

2. แสง

แสงมีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์แสงสร้างสารสังเคราะห์ ตลอดจนสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป Garcia และคณะ (2007) เพาะเลี้ยงปลายยอดของอ้อยลูกผสมบนอาหาร MS เติมกรดแอสคอร์บิก เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ซิสเตอีน เข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตรและซิลเวอร์ไนเตรต เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเติม NAA (เข้มข้น 5.4 27 54 81 108 และ 135 มิลลิโมลาร์) picloram (เข้มข้น 4 20 40 และ 80 มิลลิโมลาร์) หรือ 2,4-D (เข้มข้น 4.5 13.6 22.6 และ 31.7 มิลลิโมลาร์) เพียงชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกัน เป็นเวลา 30 วัน ในสภาพให้แสงหรือมืด หลังจากนั้นย้ายลงอาหารสูตรเดิมที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพาะเลี้ยงในสภาพให้แสง พบว่า picloram เข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ชักนำแคลลัสได้ โดยลักษณะของแคลลัสที่วางเลี้ยงในที่มืดมีการพัฒนาเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 มีลักษณะเป็นแคลลัสที่เกาะกันแน่นเป็นปม (compact nodular callus) มีสีเหลือง และชนิดที่ 2 มีลักษณะร่วน (friable callus) มีสีขาวหลังจากนั้นย้ายลงอาหารสูตรเดิมที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพาะเลี้ยงในสภาพให้แสงเป็นเวลา 15 วัน พัฒนาเป็นเอ็มบริโอรูปกลมได้ 13.2± 2.6 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในการวางเลี้ยงในที่มีแสงในระยะเริ่มแรก อาหารที่เติม picloram ทุกความเข้มข้น เกิดเป็น compact callus มีสีเขียว ซึ่ง picloram เข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ส่งเสริมแคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดได้ 26.9 ± 2.8 ยอดต่อแคลลัส

3. การสร้างบาดแผล

การสร้างบาดแผลให้กับชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยทั่วไปมีประโยชน์ในการเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซับธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตได้มากขึ้น ส่งเสริมการเกิดอวัยวะของพืช เนื่องจากเมื่อเกิดบาดพืชสามารถตอบสนองด้วยกลไกต่าง ๆ กัน เช่น การกระตุ้นให้กระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลเพิ่มมากขึ้น การสมานแผลและการงอกเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ อัตราในการสมานแผลนี้เร็วหรือช้าแตกต่างกันตามชนิดของพืช ชนิดของเนื้อเยื่อ อายุ ตลอดจนปัจจัยแวดล้อมภายนอก Fki และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของการสร้างบาดแผลแคลลัสเริ่มต้นของอินทผาลัมด้วยใบมีด และวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 3 เท่า Othmani และคณะ (2009) ได้ทำการสร้างบาดแผลแคลลัสของอินทผาลัมด้วยใบมีดโกน แล้ววางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 55 วัน สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ เมื่อ

วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมผงถ่าน 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน โซมาติกเอ็มบริโอสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ กาญจนี (2553) ได้ศึกษาผลของการสร้างบาดแผลแคลลัสของปาล์มน้ำมันโดยใช้ใบมีด ร่วมกับการใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้ขนาดของเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด 16.9 มิลลิเมตร หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน Tonon และคณะ (2001) พบว่า การสร้างบาดแผลให้กับชิ้นส่วนพืชมีความสำคัญต่อกระบวนการออกาโนเจนีซีส ในเมล็ดของ *Fraxinus angostifolia* เพ็ญจันทร์ (2546) รายงานว่า การสร้างบาดแผลของเมล็ดมังคุด โดยการตัดแบ่งเมล็ดเป็น 3 ชิ้นส่วน และทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมวุ้นชนิดต่างๆ พบว่า ชิ้นส่วนที่มีการสร้างบาดแผลส่วนใหญ่ให้การสร้างแคลลัสแต่ส่งเสริมการสร้างยอดน้อย

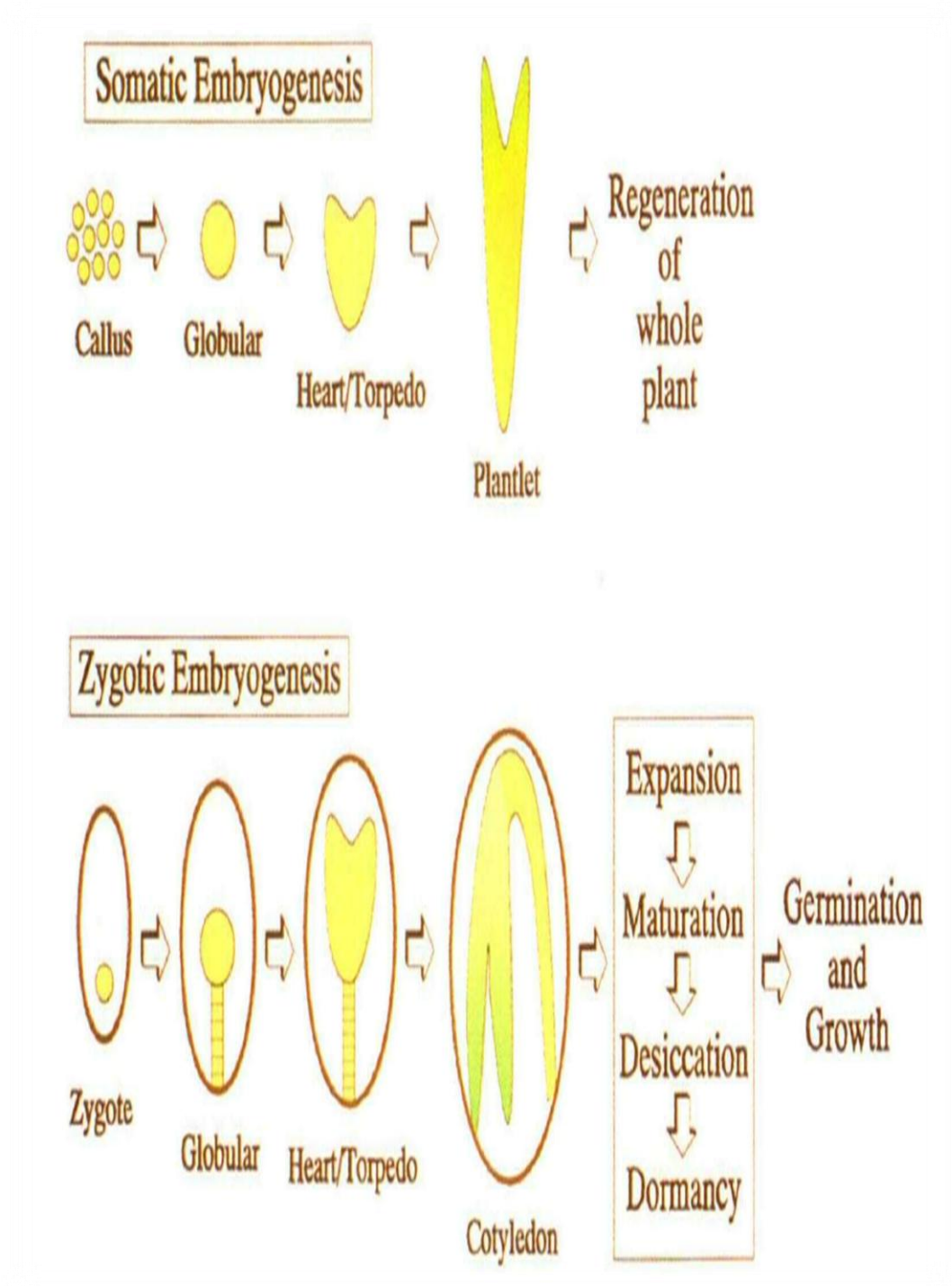
การเกิดสีน้ำตาล (Browning) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเกิดสีน้ำตาลในการขยายพันธุ์โดยกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักจะเกิดกับชิ้นส่วนพืชที่เกิดบาดแผล เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารประกอบฟีนอล (phenol) ให้เปลี่ยนไปเป็นคิวโนน (quinone) จากนั้นคิวโนนจะเกิดการรวมกันเป็นโมเลกุลใหญ่กลายเป็นสีน้ำตาล (จริงแท้, 2553) และการเกิดสีน้ำตาลมากจนเกินไปจะทำให้เนื้อเยื่อพืชตายได้ (Morfeine, 2013) อาสลัน (2545) รายงาน การเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันบนอาหารเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนเริ่มพองตัวประมาณ 2-3 เท่า และเริ่มมีการสร้างสารฟีนอลออกมาในอาหารส่งผลให้ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเกิดขึ้น Roberto และTrevor (1987) ศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอดของ Pejibaye palm โดยใช้ picloram พบว่า picloram ทำให้ชิ้นส่วนใบอ่อนพองตัวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ แต่ไม่สามารถสร้างแคลลัสหรือรากเลย มีรายงาน การใช้สารแอนติออกซิแดนท์ชนิดต่าง ๆ เพื่อลดสารประกอบฟีนอลอันจะส่งผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น Polyvinylpyrrolidone (PVP) ในการเพาะเลี้ยงมังคุด (สมปอง, 2541 ; ลัดดาวัลย์, 2544) กรดแอสคอร์บิกในการเพาะเลี้ยงอินทผาลัม (Jameel and Abdullaziz, 2001) ผงถ่านในการเพาะเลี้ยง Bottle palm (Sarasan *et al*., 2002) เป็นต้น ในบางกรณีการเก็บไว้ในที่มืดอาจช่วยได้เนื่องจากแสงเป็นปัจจัยหนึ่งที่กระตุ้นกระบวนการออกซิเดชั่น (รังสฤษดิ์, 2541)

การเจริญและพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

โซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส คือ การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อร่างกายที่เพาะเลี้ยงส่วนไซโกติกเอ็มบริโอเจเนซีส เป็นกระบวนการที่ได้จากการปฏิสนธิของเซลล์ไข่กับสเปิร์มและระยะต่างๆของการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส เริ่มจากเซลล์ที่แบ่งเพิ่มปริมาณมากขึ้นจนเป็นกลุ่มเซลล์กลมใหญ่รูปลูกบอลซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นของต้นอ่อน ต่อมาเปลี่ยนเป็นรูปหัวใจและรูปตอร์ปิโด ระยะนี้ต้นอ่อนประกอบด้วยใบเลี้ยง แกนต้นอ่อนและจดกำเนิดราก พร้อมที่จะงอกเป็นต้นกล้าเมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่ 1)

การพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมัน สามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะ ดังนี้ ระยะรูปกลม ระยะทอร์ปิโด และระยะเจริญพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (นภาพร, 2548) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือเกิดจากชักนำด้วยปัจจัยต่างๆ ดังนี้ คือ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน องค์ประกอบของสูตรอาหาร หรือ ประเภทของอาหารที่ใช้ในการวางเลี้ยง Hilae และTechato (2005) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการงอกของเอ็มบริโอระยะสร้างจาวในปาล์มน้ำมัน พบว่า อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำการงอกได้ 40 เปอร์เซ็นต์ สกุลรัตน์ (2553) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สอง และการงอกของต้นอ่อน โดยนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยง (haustorium embryos : HE) ของคู่ผสมที่7 และ 16 ขนาด 9 มิลลิเมตร มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า คู่ผสมที่ 7 .ให้การสร้าง SSE สูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนคู่ผสมที่ 16 .ให้จำนวน SSE สูงสุด 16.8 SSE/HE เพ็ญติมาส (2551) ศึกษา การพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน โดยนำโซมาติกเอ็มบริโอ ขนาด 2-4 มิลลิเมตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ สามารถส่งเสริมกาพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว สูงสุด 32 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการพัฒนาในระยะต่างของกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสและกระบวนการไซโกติกเอ็มบริโอเจเนซีส

ที่มา : Zimmerman, (1993)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการสร้างบาดแผลโดยการสับโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาว ต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน
2. เพื่อศึกษาสภาพการวางเลี้ยง และสารแอนติออกซิแดนท์ต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนาพืชต้นใหม่ของปาล์มน้ำมัน

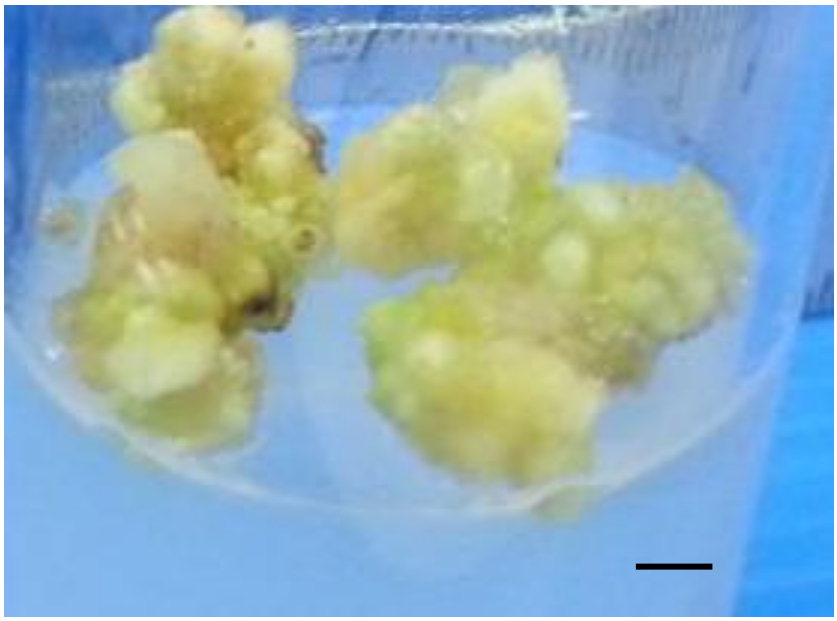
บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ และอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่ของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ลูกผสมเทเนอราเบอร์ 77 ที่เกิดจากการผสมระหว่างดูรา (366) กับฟิสิเฟอรา (172) จากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ย้ายเลี้ยงทุกเดือนบนอาหารแข็งสูตร oil palm culture medium (OPCM) เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 โซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันจากการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้นข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ย้ายเลี้ยงทุกเดือน เป็นเวลา 4 เดือน (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)

1.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS และ OPCM (รายละเอียดในตารางภาคผนวก)
- น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลซอร์บิทอล
- กรดแอสคอร์บิค กรดซิตริก และ PVP
- สารควบคุมการเจริญเติบโต คือ dicamba
- แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- วุ้น

2. อุปกรณ์

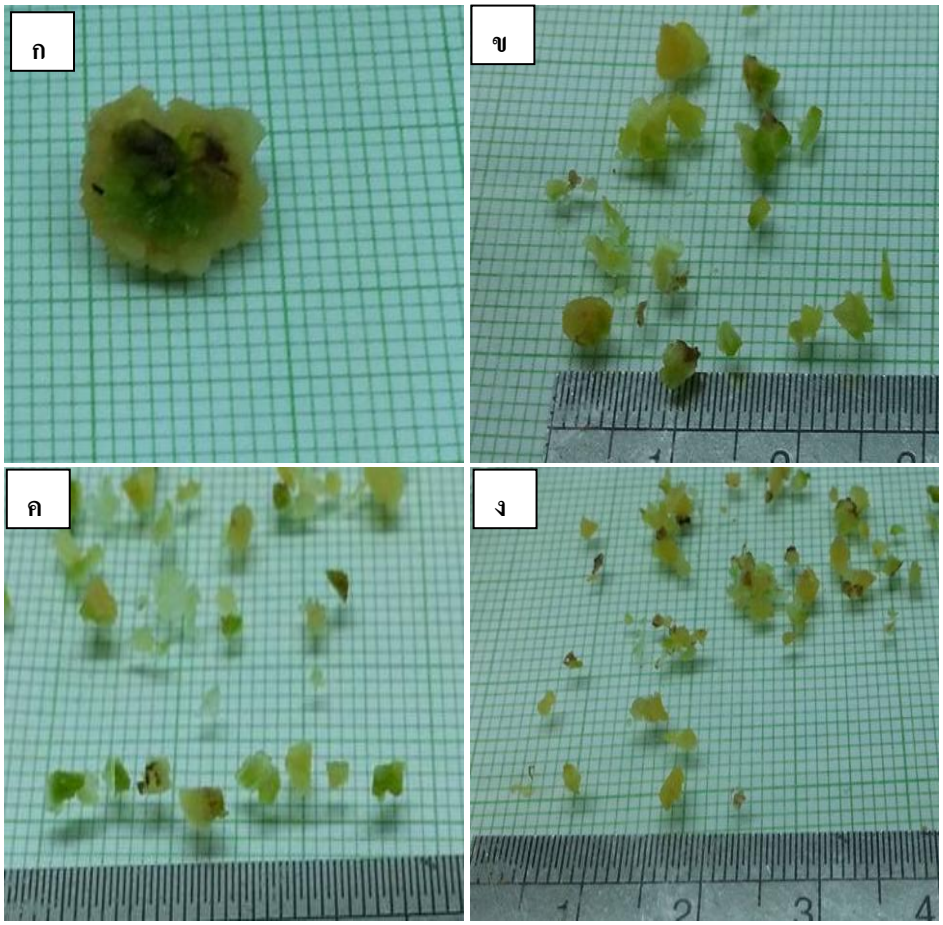
อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารและย้ายเลี้ยง

เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4ตำแหน่ง
เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง
หม้อนึ่งความดันไอ
ตู้อบแห้งและอบฆ่าเชื้อ
ตู้เย็น
กระดาษทิชชู
เครื่องแก้วประกอบด้วยฟลาสก์ ปิเปต กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร จานเพาะเชื้อ ขวดเลี้ยง หลอดทดลอง
ปากคีบ มีดผ่าตัด พาราฟิล์ม
ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
เครื่องคนสารละลาย
ไมโครปิเปต
ปากกาเขียนเครื่องแก้ว
เครื่องวัด pH
ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาผลของการสร้างบาดแผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน

ในการศึกษานี้ใช้โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น สร้างบาดแผลให้กับชิ้นส่วนโดยการใช้ใบมีดโกนสับจำนวน 50 (ขนาดเฉลี่ย 0.1-0.3 ตร.ซม),100 (ขนาดเฉลี่ย 0.1-0.2) และ 150 ครั้ง (ขนาดเฉลี่ย 0.05- 0.1 ตร.ซม) (ภาพที่ 3 ก-ง) จะได้ชิ้นส่วนของโซมาติกเอ็มบริโอขนาดต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 15ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อหลอด เปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส การเกิดสีน้ำตาล เปรียบเทียบกันในแต่ละขนาดของการตัด โดยวางแผนทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s multiple range test (DMRT)



ภาพที่ 3 ขนาดของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

ก. โซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการสับ

ข. โซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสับด้วยความถี่ 50 ครั้ง

ค. โซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสับด้วยความถี่ 100 ครั้ง

ง. โซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสับด้วยความถี่ 150 ครั้ง

2. การศึกษาผลของสภาพการเพาะเลี้ยงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน

ใช้ชิ้นส่วนของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวมาสร้างบาดแผลโดยการสับตามจำนวนที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ โดยวางเลี้ยง 2 สภาพ คือ สภาพมืดหรือภายใต้การให้แสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ26 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อหลอด เปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส การเกิดสีน้ำตาล เปรียบเทียบกันในแต่ละสภาพการเพาะเลี้ยง โดยวางแผนทดลองแบบ CRD ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. การศึกษาผลของสารแอนติออกซิแดนท์และอุณหภูมิในการวางเลี้ยงต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน

นำโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่าน วางเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคหรือ PVP หรือกรดซิตริก เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ และวางเลี้ยง 2 สภาพ คือ ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอ และการเกิดสีน้ำตาล เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของสารแอนติออกซิแดนท์โดยวางแผนทดลองแบบแฟกตอเรียลใน CRD ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละสิ่งทดลองทำการทดลอง 5 ซ้ำๆ ละ 5 หลอด

4. การศึกษาผลของความเข้มข้นขององค์ประกอบสูตรอาหารและสารแอนติออกซิแดนท์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารก่อนการย้ายเลี้ยงต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน

นำโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการวางเลี้ยงในการทดลองที่ 3 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ความเข้มข้นขององค์ประกอบ 3 ระดับ คือ สูตรอาหาร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลง 3 ใน 4 (¼ MS) สูตรอาหาร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง (½ MS) สูตรที่มีธาตุอาหารครบตามปกติ (MS) ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แต่ละสูตรอาหารเติมกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดยอด และจำนวนยอด เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของสารแอนติออกซิแดนท์ โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียลใน CRD ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละสิ่งทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ 3 หลอด

5. การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน

นำโซมาติกเอ็มบริโอจากอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS: ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หรือน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ แต่ละสูตรอาหารเติม กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรลิตร ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดยอด และจำนวนยอด เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของน้ำตาล โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละสิ่งทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ 3 หลอด

ผล

1. ผลของการสร้างบาดแผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน

จากการนำชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวที่ไม่มีการสร้างบาดแผล และสร้างบาดแผลโดยการสับด้วยความถี่ 50 ครั้ง 100 ครั้งและ150 ครั้ง มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสับด้วยความถี่ 100 ครั้ง (มีขนาดโดยเฉลี่ย 0.1-0.2 ตร.ซม.) ให้การตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงสูงสุดทุกค่าตัวแปรที่ทดสอบ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) กับการไม่สร้างบาดแผล อัตราการเกิดโซมามาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 45% จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 4.13 เอ็มบริโอต่อหลอด และโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสร้างบาดแผลให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 100 % สูงกว่าโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการสร้างบาดแผล (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการเกิดสีน้ำตาลโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสร้างบาดแผลด้วยใบมีดโกนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาลและปริมาณชิ้นส่วนโซมาติกที่เป็นสีน้ำตาลสูงกว่าโซมาติกที่ไม่ผ่านการสร้างบาดแผล (ภาพที่ 4,5)

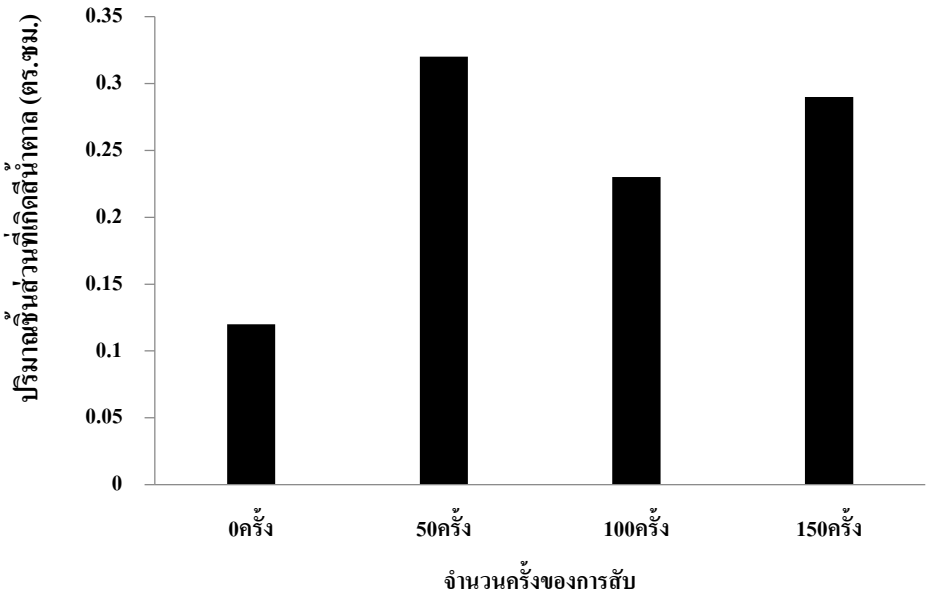
ตารางที่ 1 ผลของการสร้างบาดแผลชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง ต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน หลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การสร้างบาดแผลกับชิ้นส่วนพืช	การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ (%)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อหลอด	การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (%)	การเกิดสีน้ำตาล (%)
0 ครั้ง	10b	0.5b	85b	15b
50 ครั้ง	35a	3.88a	100a	85a
100 ครั้ง	45a	4.13a	100a	90a
150 ครั้ง	25ab	2.05ab	100a	95a
F-test	**	**	**	***
C.V (%)	36.20	52.61	5.19	21.82

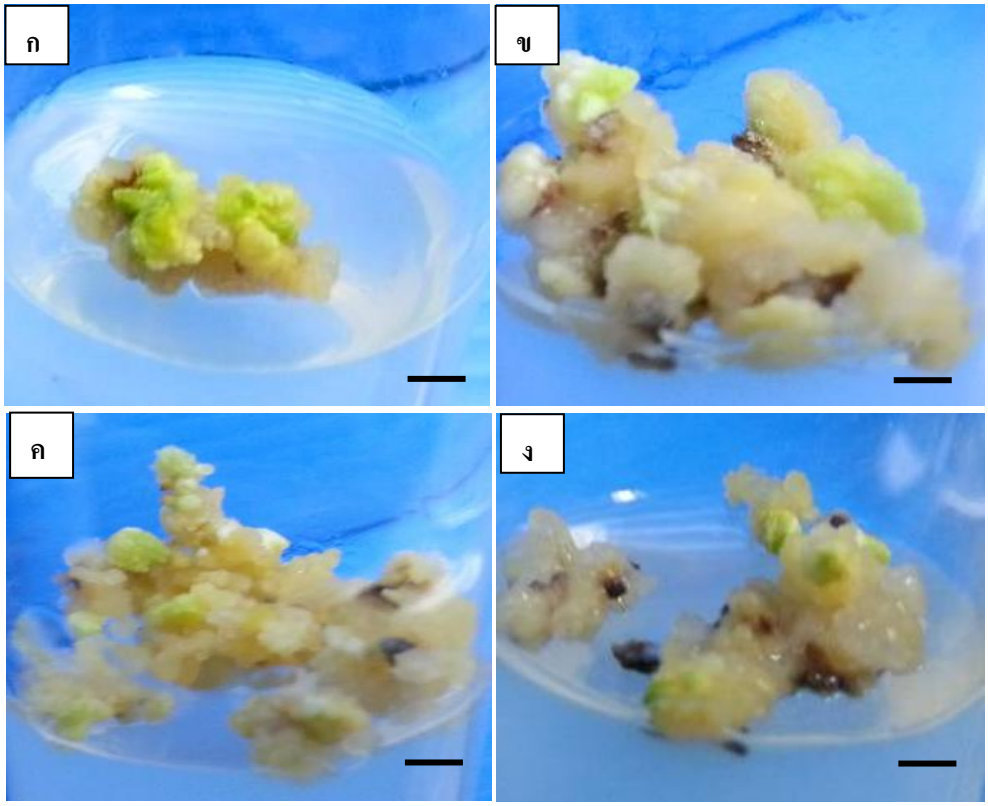
*** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.001$)

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 4 การเกิดสีน้ำตาลจากการสร้างบาดแผลด้วยจำนวนครั้งความถี่ที่แตกต่าง หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 5 ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านและไม่ผ่านการสร้างบาดแผลแล้วเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารแข็งสูตร OPCMเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก. โซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการสับ

ข. โซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสับด้วยความถี่ 50 ครั้ง

ค. โซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสับด้วยความถี่ 100 ครั้ง

ง. โซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสับด้วยความถี่ 150 ครั้ง

2. ผลของสภาพการวางเลี้ยงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการนำชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวที่ผ่านการสร้างบาดแผลโดยการสับด้วยความถี่ 100 ครั้ง ให้มีขนาดโดยเฉลี่ย 0.1-0.2 ตร.ซม. แล้ววางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรภายใต้การให้แสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมง และวางเลี้ยงในสภาพมืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทั้งสองสภาพการวางเลี้ยงให้อัตราการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอได้เท่ากัน 82 % ในขณะที่การวางเลี้ยงในสภาพที่มีแสงให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอได้สูง 5.06 เอ็มบริโอต่อหลอด สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในที่มืด (ตารางที่ 2 , ภาพที่ 6) สำหรับการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสนั้น พบว่าการวางเลี้ยงในที่มืดให้อัตราการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 90 % สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในที่มีแสง นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงในที่มืดช่วยลดการเกิดสีน้ำตาลจากชิ้นส่วนของโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสร้างบาดแผลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

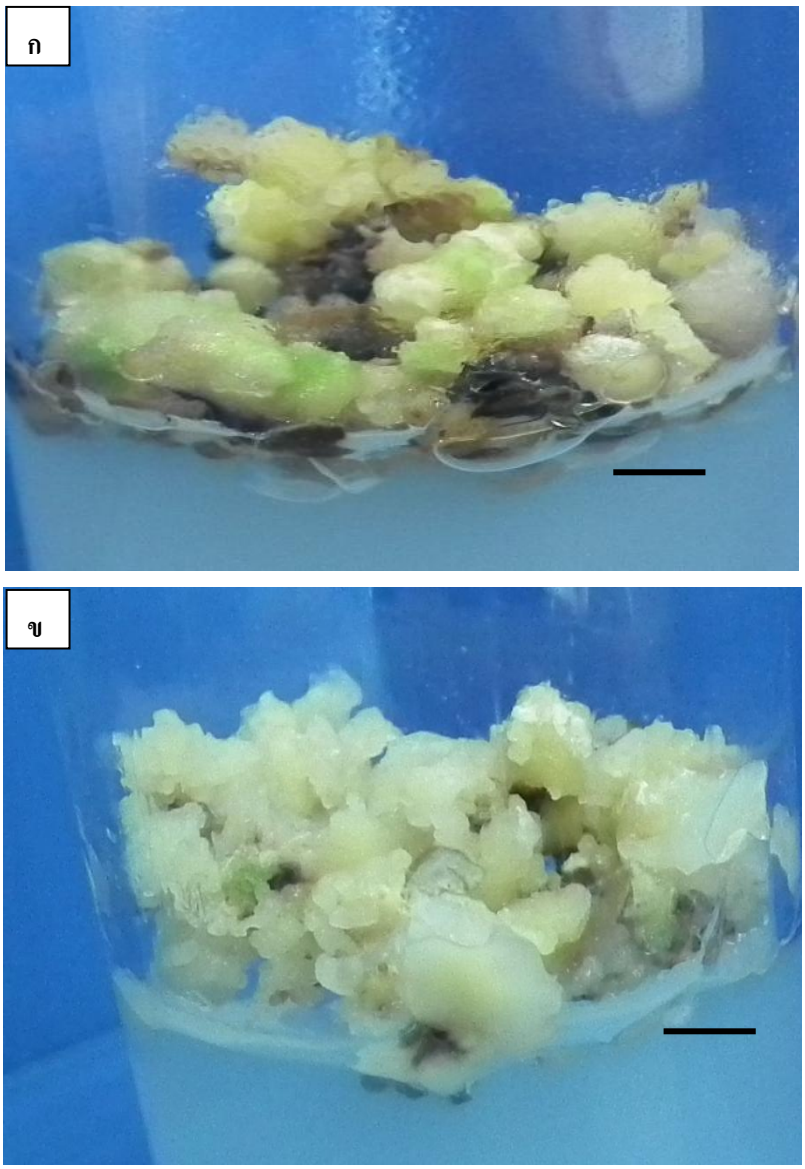
ตารางที่ 2 ผลของสภาพการวางเลี้ยงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันที่ผ่านการสับ 100 ครั้ง หลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สภาพการวางเลี้ยง	การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ (%)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อหลอด	การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (%)	การเกิดสีน้ำตาล (%)	การเกิดสีน้ำตาลในชิ้นส่วนพืช (ตร.ซม.)
แสง	82	5.06	58b	98	0.89a
มืด	82	4.11	90a	100	0.52b
F-test	ns	ns	*	ns	*
C.V. (%)	13.36	16.81	28.18	3.19	35.94

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 6 ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอ ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสับด้วยความถี่ 100 ครั้ง (0.1-0.2 ตร.ซม.) บนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก. การวางเลี้ยงในสภาพที่มีแสง

ข. การวางเลี้ยงในสภาพมืด

3. ผลของการศึกษาผลของสารแอนติออกซิแดนท์และอุณหภูมิในการวางเลี้ยงต่ออัตราการเกิดโซมาติก เอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน

นำโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสร้างบาดแผลด้วยการสับ 100 ครั้งมาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคหรือ PVP หรือ กรดซิตริก เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่า การวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26± 2 องศาเซลเซียส สามารถชักนำอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดคือ 96 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3) และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับสารแอนติออกซิแดนท์ สำหรับจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอนั้นพบว่าการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียสร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคให้จำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด คือ 9.15 เอ็มบริโอต่อหลอด (ตารางที่ 4) (ภาพที่ 7) ทั้งนี้ยังพบว่าการนำโซมาติกเอ็มบิโอที่ผ่านการสร้างบาดแผลด้วยการสับ 100 ครั้งมาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติมกรดซิตริกที่อุณหภูมิ 28 ±2 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด คือ 0.28 กรัม (ตารางที่ 5 และ 6) จำนวนชิ้นที่เกิดสีน้ำตาลน้อยที่สุด คือ 4.95 ชิ้นต่อหลอดทดลอง (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 3 ผลของสารแอนติออกซิแดนท์และอุณหภูมิในการวางเลี้ยงต่ออัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารแอนติออกซิแดนท์	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ(%)		เฉลี่ย[1] สารแอนติออกซิแดนท์
	26±2 องศาเซลเซียส	28±2 องศาเซลเซียส	
กรดแอสคอร์บิค	96	92	94±3.05
โพลิไวนิลไพโรลิโดน	96	88	92±4.42
กรดซิตริก	96	96	96±2.66
เฉลี่ย[2] อุณหภูมิ	96±2.14	92±3.27	
F-test	ns		
C.V.(%)	11.97		

nsไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 4 ผลของสารแอนติออกซิแดนท์และอุณหภูมิในการวางเลี้ยงต่อจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารแอนติออกซิแดนท์	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง		เฉลี่ย[1] สารแอนติออกซิแดนท์
	26±2 องศาเซลเซียส	28±2 องศาเซลเซียส	
กรดแอสคอร์บิค	7.46	9.15	8.30±0.74
โพลิไวนิลไพโรลิโดน	8.18	7.42	7.80±0.89
กรดซิตริก	8.29	7.38	7.83±0.96
เฉลี่ย[2] อุณหภูมิ	7.97±0.76	7.98±0.63	
F-test	ns		
C.V.(%)	35.54		

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 5 ผลของสารแอนติออกซิแดนท์และอุณหภูมิในการวางเลี้ยงต่ออัตราการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารแอนติออกซิแดนท์	การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (%)		เฉลี่ย[1] สารแอนติออกซิแดนท์
	26±2 องศาเซลเซียส	28±2 องศาเซลเซียส	
กรดแอสคอร์บิค	88	100	94±4.27
โพลิไวนิลไพโรลิโดน	92	96	94±3.06
กรดซิตริก	76	88	82±5.53
เฉลี่ย[2] อุณหภูมิ	85.33±0.76	94.66±3.06	
F-test	ns		
C.V.(%)	15.18		

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 6 ผลของสารแอนติออกซิแดนท์และอุณหภูมิในการวางเลี้ยงต่อน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน หลังจากวางเลี้ยงบนอาหสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารแอนติออกซิแดนท์	น้ำหนักเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (มิลลิกรัม)		เฉลี่ย[1] สารแอนติออกซิแดนท์
	26±2 องศาเซลเซียส	28±2 องศาเซลเซียส	
กรดแอสคอร์บิค	218	140	179±18.16
โพลิไวนิลไพโรลิโดน	203	182	192±21.61
กรดซิตริก	142	278	210±59.10
เฉลี่ย[2] อุณหภูมิ	187±17.08	200±39.56	
F-test	ns		
C.V.(%)	59.91		

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 7 ผลของสารแอนติออกซิแดนท์และอุณหภูมิในการวางเลี้ยงต่อชิ้นส่วนที่เกิดการเกิดสีน้ำตาล หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารแอนติออกซิแดนท์	จำนวนชิ้นที่เกิดสีน้ำตาล		เฉลี่ย[1] สารแอนติออกซิแดนท์
	26±2 องศาเซลเซียส	28±2 องศาเซลเซียส	
กรดแอสคอร์บิค	8.75a	5.70ab	7.23±0.81A
โพลิไวนิลไพโรลิโดน	8.42a	6.92ab	7.67±0.74A
กรดซิตริก	5.72ab	4.95b	5.34±0.37B
เฉลี่ย[2] อุณหภูมิ	7.63±0.60A	5.86±0.49B	
F-test	*		
C.V.(%)	28.58		

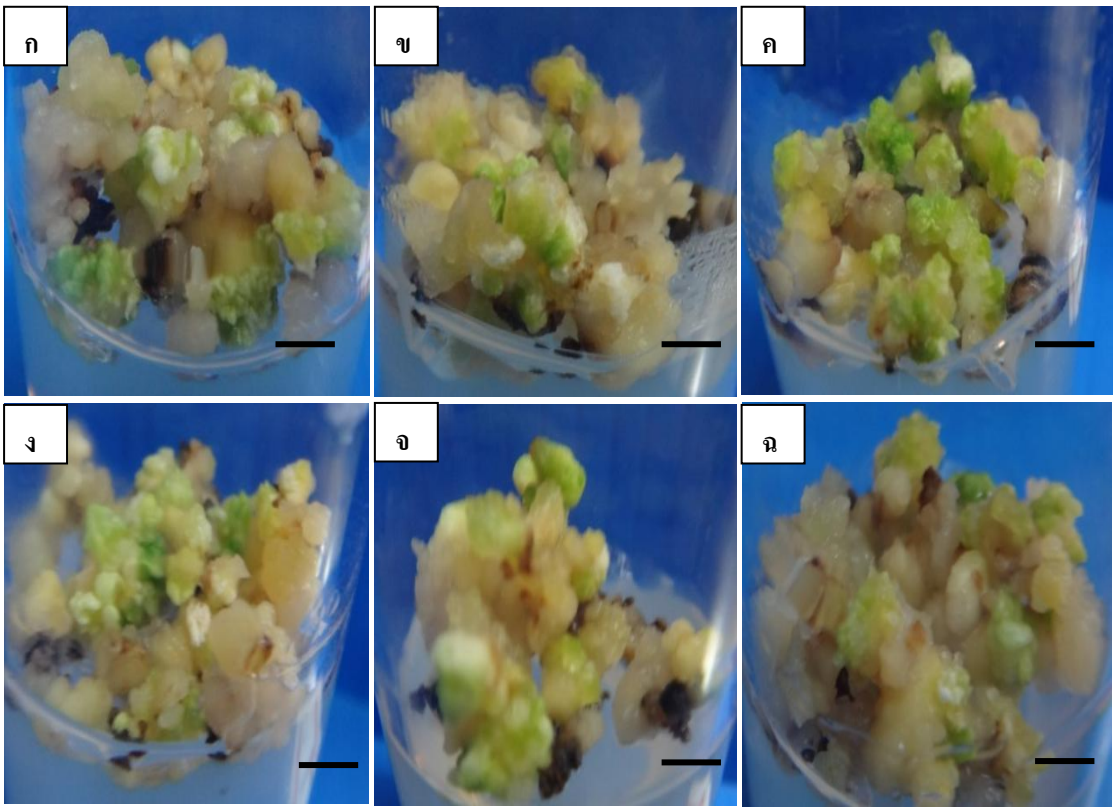
อุณหภูมิ = * ,

ชนิดสารแอนติออกซิแดนท์ = *

อุณหภูมิ X ชนิดสารแอนติออกซิแดนท์ = ns

1,2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวนอนและแนวตั้ง (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (อักษรพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบด้วย วิธี DMRT



ภาพที่ 7 พัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสร้างบาดแผลด้วยความถี่ 100 ครั้ง วางเลี้ยงที่อุณหภูมิแตกต่างกันบนอาหารแข็งสูตรOPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับการเติมสารแอนติออกซิแดนท์ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก. กรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส

ข. PVP ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส

ค. กรดซิตริก ความเข้มข้น 200มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส

ง. กรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส

จ. PVP ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส

ฉ. กรดซิตริก ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส

4. ผลของการศึกษาผลของความเข้มข้นขององค์ประกอบสูตรอาหารและสารแอนติออกซิแดนท์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารก่อนการย้ายเลี้ยงต่อการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน

นำโซมาติกเอ็มบริโอจากการทดลองที่ 3 มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ ¼ MS ½ MS MS ปกติ ร่วมกับการเติมน้ำซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการวางเลี้ยงในอาหารสูตร OPCM เติมกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำการเกิดยอดได้สูงกว่าสารแอนติออกซิแดนท์ชนิดอื่นแล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบแตกต่างกันให้การตอบสนองที่แตกต่างกัน สูตรอาหาร MS .ให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด คือ 44.44 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอด คือ 1.66 ยอดต่อโซมาติกเอ็มบริโอ (ตารางที่ 8-9) ในขณะที่กรดซิตริกไม่ส่งเสริมการสร้างยอดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบแตกต่างกัน (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้นขององค์ประกอบสูตรอาหาร และสารแอนติออกซิแดนท์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารก่อนการย้ายเลี้ยงต่ออัตราการเกิดยอด บนอาหารแข็ง เติมกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	อัตราการเกิดยอด (%)			เฉลี่ย[1] สูตรอาหาร
	กรดแอสคอร์บิค	โพลิไวนิลไพโรลิโดน	กรดซิตริก	
¼MS	11.11bc	11.11bc	0c	7.40±4.89A
½MS	22.22abc	33.33ab	0c	18.51±8.07A
MS	44.44a	0c	0c	14.81±8.07A
เฉลี่ย[2] สารแอนติออกซิแดนท์	25.92±9.25A	14.81.±5.80AB	0B	
F-test		*		
C.V.(%)		124.98		

ความเข้มข้นของสูตรอาหาร = ns ชนิดสารแอนติออกซิแดนท์ = *

ความเข้มข้นของสูตรอาหาร X ชนิดสารแอนติออกซิแดนท์ = ns

1,2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวนอนและแนวตั้ง (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (อักษรพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบด้วย วิธี DMRT

ตารางที่ 9 ผลของความเข้มข้นขององค์ประกอบสูตรอาหาร และสารแอนติออกซิแดนท์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารก่อนการย้ายเลี้ยงต่อจำนวนยอด บนอาหารแข็งเติม กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนยอด (ยอด/โซมาติกเอ็มบริโอ)			เฉลี่ย[1] สูตรอาหาร
	กรดแอสคอร์บิค	โพลิไวนิลไพโรลิโดน	กรดซิตริก	
¼MS	0.33bc	0.33bc	0c	0.22±0.14A
½MS	0.50abc	1.33ab	0c	0.61±0.26A
MS	1.66a	0c	0c	0.55±0.29A
เฉลี่ย[2] สารแอนติออกซิแดนท์	0.83±0.86A	0.55±0.47AB	0B	
F-test		**		
C.V.(%)		103.92		

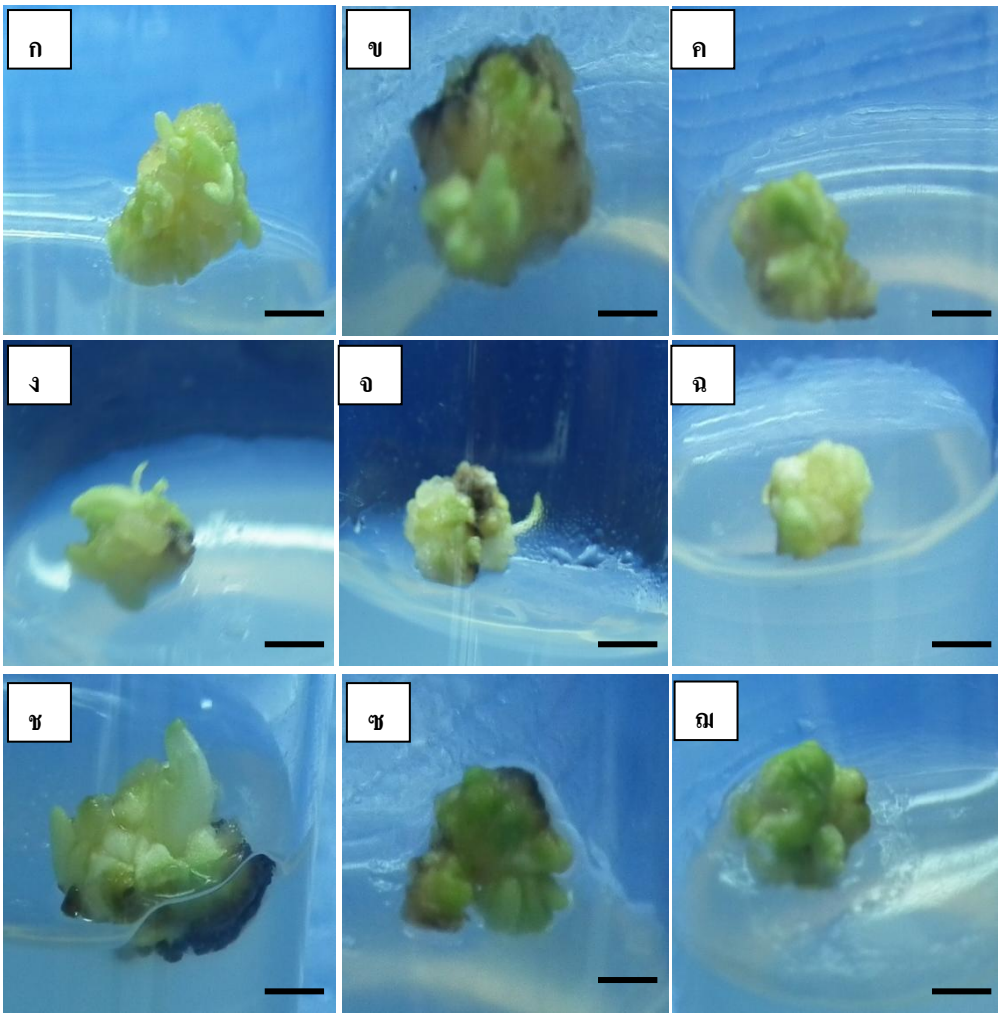
สูตรอาหาร = ns

ชนิดสารแอนติออกซิแดนท์ = **

ความเข้มข้นของสูตรอาหาร X ชนิดสารแอนติออกซิแดนท์ = **

1,2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวนอนและแนวตั้ง (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (อักษรพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบด้วย วิธี DMRT



ภาพที่ 8 พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ในความเข้มข้นขององค์ประกอบอาหารแตกต่างกัน เติมกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ก. กรดแอสคอร์บิคร่วมกับอาหารสูตร ¼MS

ข. PVP ร่วมกับอาหารสูตร ¼MS

ค. กรดซิตริกร่วมกับอาหารสูตร ¼MS

ง. กรดแอสคอร์บิคร่วมกับอาหารสูตร½MS

จ. PVP ร่วมกับอาหารสูตร½MS

ฉ. ฉ.กรดซิตริกร่วมกับอาหารสูตร½MS

ช. กรดแอสคอร์บิคร่วมกับอาหารสูตร MS

ซ. PVP ร่วมกับอาหารสูตร MS

ฌ. กรดซิตริกร่วมกับอาหารสูตร MS

5. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน

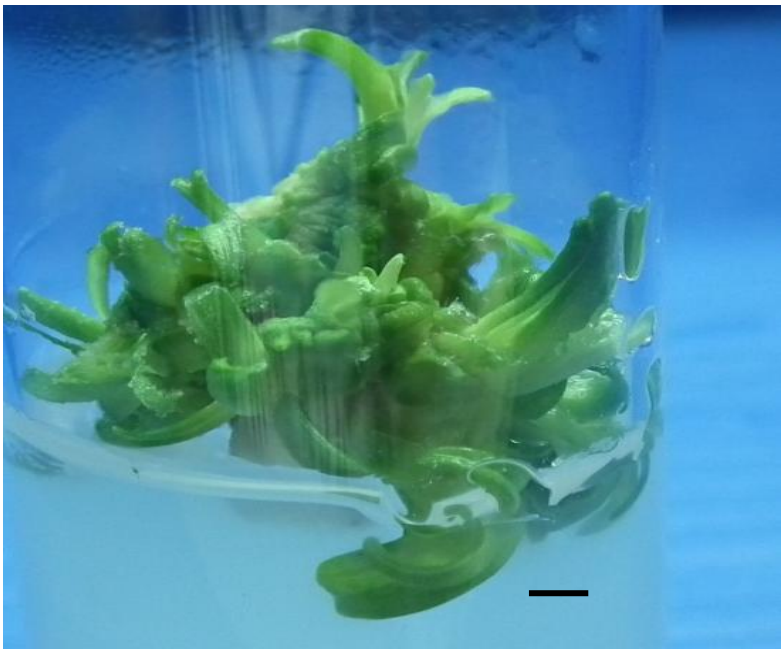
จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หรือน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ให้อัตราการสร้างยอด ได้ 100 เปอร์เซ็นต์และให้จำนวนยอดสูงสุด 7.11 ยอดต่อโซมาติกเอ็มบริโอ (ตารางที่ 10 ภาพที่ 9)

ตารางที่ 10 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

แหล่งของคาร์บอน	อัตราการเกิดยอด (%)	จำนวนยอด/โซมาติกเอ็มบริโอ(ยอด)
ซูโครส	44.44b	1.66b
ซอร์บิทอล	100a	7.11a
F-test	**	**
C.V. (%)	18.84	26.52

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 9 พัฒนาการของยอดจากโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์(บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

วิจารณ์ผล

การสับเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ Lowe และคณะ (1985) รายงานว่า ความเครียดที่เกิดจากการสับแคลลัสช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนและลดช่องว่างระหว่างเซลล์ และ Feher และคณะ (2003) รายงานว่า ชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็กสามารถสัมผัสอาหารได้จึงเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการเมแทบอลิซึมแก่เซลล์ จากการศึกษาผลของการสร้างบาดแผลโดยการสับด้วยการสับ 100 ครั้ง ให้มีขนาด 0.1 -0.2 ตร.ซม. แล้วนำมาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 82% จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 5.06 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลองเช่นเดียวกับ Fki และคณะ (2003) พบว่าการสร้างบาดแผลแคลลัสเริ่มต้นของอินทผาลัมด้วยใบมีด และวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 3เท่า Othmani และคณะ (2009) ได้ทำการสร้างบาดแผลแคลลัสของอินทผาลัมด้วยใบมีดโกน แล้ววางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 55 วัน สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมผงถ่าน 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน โซมาติกเอ็มบริโอสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ กาญจนี (2553) ได้ศึกษาผลของการสร้างบาดแผลแคลลัสของปาล์มน้ำมันโดยใช้ใบมีด ร่วมกับการใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้ขนาดของเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด 16.9 มิลลิเมตร หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน และภาณินี (2558) ศึกษาการสร้างบาดแผลจากการสับแคลลัสของต้นยางพารา พบว่า การสับชิ้นส่วนแคลลัส100 ครั้ง แคลลัสสามารถพัฒนาได้เป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด98.45เปอร์เซ็นต์และ 5.1 เอ็มบริโอ

จากการศึกษาปัจจัยของสภาพการวางเลี้ยง พบว่า ชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการสร้างบาดแผลด้วยความถี่ 100 ครั้งแล้วนำมาวางเลี้ยงในสภาพมีแสงสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอใหม่ได้สูงกว่าการวางในที่มืด เนื่องจากแสงเป็นตัวกระตุ้นให้พืชมีการเจริญและพัฒนาเป็นอวัยวะต่างๆได้ แสงจึงมีความสำคัญต่อต้นพืช เช่นเดียวกับ ชญานีย์ (2557) รายงานว่า ชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้ววางเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอใหม่ได้สูงกว่าการวางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 1,3,5 และ7 วัน ก่อนนำไปเลี้ยงในสภาพปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าการวางเลี้ยงในที่มืด สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงกว่า

การวางเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง ทั้งนี้เพราะการวางเลี้ยงในที่มืด ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ แต่ไม่มีการพัฒนา หรือมีแต่น้อยมาก การเพิ่มปริมาณแคลลัสจึงเป็นไปได้ดีกว่าที่มีแสง และพบว่าการเลี้ยงในที่มืดให้การเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนน้อยกว่าการวางเลี้ยงในที่สว่าง เพราะว่าการวางเลี้ยงในที่สว่างร่วมการสร้างบาดแผลทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนมากขึ้น เช่นเดียวกับ Xu และคณะ (2011) รายงานว่า การนำใบคาวทองมาสร้างบาดแผลและเพาะเลี้ยงในที่มืด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและตุ่มตามากกว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในที่สว่างและยังพบว่า การเลี้ยงในที่มืดมีเปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาลน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในที่สว่าง

สำหรับการศึกษาชนิดของสารแอนติออกซิแดนท์ที่แตกต่างกัน เพื่อมาแก้ไขปัญหาการสีน้ำตาล ที่เกิดจากการออกซิเดชั่นของสารประกอบพวก phenolic compounds ที่ปลดปล่อยออกมาจากบาดแผลของเนื้อเยื่อที่ถูกตัด ทำให้อาหารและชิ้นส่วนพืชเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาล พบว่า การเติมกรดแอสคอร์บิคลงในอาหารส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงกว่าการเติมสารแอนติออกซิแดนท์ชนิดอื่น เนื่องจากกรดแอสคอร์บิคช่วยลดการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชั่นควบคุมการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนพืช สอดคล้องกับ Te-chato (1998) และ Mondal (2012) ซึ่งรายงานว่าการใช้กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมในอาหารสามารถลดการสร้างฟีนอลและเพิ่มการแคลลัสได้ดี นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบว่าใช้ กรดซิตริกเป็นสารแอนติออกซิแดนท์สามารถชักนำการเกิดโซมาเอ็มบริโอได้ใกล้เคียงกับการใช้กรดแอสคอร์บิคที่มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นการนำกรดซิตริกมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการสร้างบาดแผลมาใช้ในเชิงการค้าจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้

สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ คือ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ระดับอุณหภูมิดังกล่าวส่งผลให้ชิ้นส่วนมีการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงกว่า การเพาะเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส Aril และคณะ (1986) รายงานว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันอยู่ระหว่าง 25-27 องศาเซลเซียส สมปอง (2545) ศึกษาการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 ปี พบว่า อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมในการสร้างแคลลัสที่สุด และ ธนวดี (2551) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำและพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน พบว่า การวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในขวดในสภาพการให้แสงที่อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส ส่งเสริมการเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสรวมสูงสุด 0.48 มิลลิเมตร ส่วนการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในจานเพาะเลี้ยงในที่มีแสง ที่อุณหภูมิ 26 ± 4 องศาเซลเซียส ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอรวมสูงสุด 26.21 เอ็มบริโอ

สำหรับสูตรอาหารในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ความเข้มข้นขององค์ประกอบของสูตรอาหารมีความจำเป็นต่อการพัฒนาเป็นพืชใหม่เนื่องจากการเจริญเติบโตของพืชต้องอาศัย

สารประกอบอินทรีย์อีกมากมายหลายชนิดซึ่งสารประกอบอินทรีย์เหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืชเป็นอย่างมากและความเข้มข้นขององค์อาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน(Park *et al*., 2005) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ พบว่า จากการวางเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวที่ผ่านการการสร้างบาดแผลบนอาหารแข็งสูตร OPCM ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคแล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการเกิดยอดสูงกว่าการใช้สารแอนติออกซิแดนท์ชนิดอื่นหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เนื่องจากกรดแอสคอร์บิคมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชและส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (Kaviani, 2014) สอดคล้องกับ สกุลรัตน์ (2553) ที่ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่2 (secondary somatic embryo: SSE) และการงอกของปาล์มน้ำมัน พบว่า การวางเลี้ยง SSE ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัม ให้การสร้างยอดเฉลี่ยสูงสุด 14.8 ยอดต่อชิ้นส่วน ซูไฮมิน (2551) ศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการงอกของ คัพภะปาล์มน้ำมันในแต่ละคู่ผสม พบว่า อาหารสูตร MS ให้การงอกเฉพาะยอดเฉลี่ย 63.96 เปอร์เซ็นต์สูงกว่า อาหารสูตร ½ MS ในขณะที่ อาหารสูตร ½ MS ให้การงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์และงอกเฉพาะรากเฉลี่ย 17.85 และ 6.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการศึกษาแหล่งของคาร์บอน 2 แหล่ง คือ น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลซอร์บิทอลต่อการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอ ในอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า น้ำตาลซอร์บิทอล เข้ม 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำการเกิดยอดได้สูงกว่าน้ำตาลซูโครส สอดคล้องกับ Hilae และ Te-chato (2005) ซึ่งรายงานว่าซอร์บิทอลที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS สามารถชักนำต้นอ่อนชุดที่สองของปาล์มน้ำมันได้ 40 เนื่องจากน้ำตาลซอร์บิทอล ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนภายในเซลล์อันเนื่องมาจากเซลล์เกิดสภาวะเครียดน้ำจึงช่วยเร่งกระบวนการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ (de Touchet *et al*. 1991)

สรุป

การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันให้ผลผลิตดีนั้น มีปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อความสำเร็จ คือ จำนวนครั้งในการสับเพื่อสร้างบาดแผล ชนิดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต สภาพและอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยง สูตรอาหาร และสารแอนติออกซิแดนท์ การนำโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวมาสร้างบาดแผลโดยการสับด้วยความถี่ 100 ครั้ง หรือให้มีขนาด 0.1 -0.2 ตร.ซม. แล้วนำมาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 82% ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 5.06 เอ็มบริโอต่อหลอด สำหรับวางเลี้ยงในที่มืดสามารถชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด 90 % และการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่าการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับการใช้กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนยอดสูงสุด คือ 7.11 ยอด/โซมาติกเอ็มบริโอ

เอกสารอ้างอิง

กัญญา อักษรเนียม และวิรัชญา จารุจารีต. 2555. ก้าวใหม่ปาล์มน้ำมันไทย. ว. เคหการเกษตร 36: 88 -110.

กาญจนี ทองเทพ. 2553. ปัจจัยทางกายภาพและเคมีต่อการเจริญเติบโต และพัฒนาการเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จรัสศรี นวลศรี. 2548. การปรับปรุงพันธุ์พืชสวน. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จริงแท้ ศิริพานิช.2553. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวายของพืช. กรุงเทพฯ. :ภาควิชาพืชสวน. คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

ชญานีย์ สังวาลย์. 2557. ผลของเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ที่ให้กับโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่พัฒนา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ซูไฮมิน เจ๊ะมาลี. 2551. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราโดยการเพาะเลี้ยงคัพภะ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธนวดี พรหมจันทร์. 2551. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองและวิเคราะห์ความแปรปรวนของต้นปาล์มน้ำมันที่พัฒนาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธิดารัตน์ ทองแผ่. 2558. การชักนำและเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบฟิสิเฟอรา. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

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

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

นภาพร นาคอุดม. 2548. การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยปาล์มน้ำมัน วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เพ็ญจันทร์ เพชรสุด. 2546. อิทธิพลของวุ้น น้ำตาล และการสร้างบาดแผลต่อการเจริญของยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดมังคุดในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เพ็ญติมาส กระมุท. 2552. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิค เซลล์ซัสเพนชั่นและการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ภาณินี ช่วยมี. 2558. การขยายพันธุ์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิมจากการเพาะเลี้ยงตาเขียว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ. 2544. การชักนำแคลลัส การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบในตระกูล *Garcinia* บางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

สมปอง เตชะโต. 2541. การชักนำการกลายพันธุ์ในมังคุด : การตรวจสอบความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อความสามารถในการสร้างแคลลัส. ว. แก่นเกษตร 26: 184-194.

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

สมปอง เตชะโต. 2555. การขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยกระบวนการทางชีวภาพ. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

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

สุจินต์ จินายน, ประเสริฐ ชิตพงศ์, พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และสมปอง เตชะโต. 2530. ภาวะปัญหาและแนวทางแก้ไขการขาดแคลนต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีในประเทศไทย. ว. สงขลานครินทร์ 9: 105-110.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. สถานการณ์สินค้าการเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2559. เข้าถึงได้จาก http:// www.oae.go.th (เข้าถึงเมื่อ 9 พฤษภาคม 2559).

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

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

Duval, Y., Engelmann, F. and Duran-Gasselin, T. 1995. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry (ed. Y.P.S. Bajaj) Vol. 30, pp. 335-353. Berlin: Springer-Verlag.

Feher, A., Pester, T. P., Duditis, D. 2003. Transition of somatic plant to embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 201-228.

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

Garcia, R., Cidade, D., Castellar, A., Lips, A., Magioli, C., Calldo, C. and Mansur, E. 2007. *In vitro* morphogenesis patters from shoot apices of sugarcane as determined by light and type of growthregulator. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 90: 181-190.

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

Hussey, G. 1958. An analysis of the factors controlling the germination of the seed of oil palm, *Elaeis guineensis* (Jacq.). Annals of Botany 22: 259-284.

Jameel, M. A. and Abdullaziz, M. A. 2001. Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm, (*Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulturae 89: 291-298.

Kanchanapoom, K. and Damyoas, P. 1999. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. ScienceAsia 25: 195-202.

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

Kaviani, B. 2014. Effect of ascorbic acid and concentration on structural characteristics of apical meristem on *in vitro Aloe barbadensis* Mill. Journal of Hortorum Cultus 13 :49-56.

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

Lowe, K., Taylor, B. P., Kygan, P., Paterson, K. E. 1985. Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B73. Plant Sciences 41: 125-132.

Mondal, S., Ahirwar, M.U., Singh, M.K., Singh, P. and Singh, R.P. 2012. Effect of coconut water and ascorbic acid on shoot regeneration in banana variety Dwarf Cavendish. Journal of Horticulture 7: 416-419.

Morfeine, E. A. 2013. Effect of anti-browning on inifaiation phase of *Musa* species grand nain *in vitro*. Forest Products and Industres. 2(2): 45-47.

Othmani, A., Bayoudh, C., Drira, N., Marrakchi, M. and Trifi, M. 2009. Somatic embryogenesis and plantregeneration 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.

Rabechault, H. and Martin, J. P. 1976. Multiplication vegetative du palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) a laide de culture de tissus foliaires. Comptes Rendus de l Academie des Scienc Serie III, Sciences de la Vie (Paris) 283: 1735–1737.

Roberto, V. A. and Trevor, A. T. 1987. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejibate palm (*Bactric gasipaes* H.B.K.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10: 149-156.

Sarasan, V., Ramsay, M. M. and Roberts, A. V. 2002. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in Botle palm [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E. Moore] a critically endangered Mauritian palm. Plant Cell Reports 20:1107-1111.

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

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

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

Tonon, G., Capuana, M. and Di-Marcro, A. 2001. Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis. Scientia Horticulturae 87: 291-301.

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. 21-32. Bangi: Malaysian Palm Oil Board.

Xu, Y. W., Zeng, J. W., Zou, Y. T., Husaini, A.M., Yao, R. Y., Wu, D. G. and Wu, W. 2011. Combined effect of dark and wounding on regeneration potential of *Houttuynia cordata* Thumb. leaves. Indian Journal of Experimental Biology 49: 540-546.

Zimmerman, J.L. 1993. Somatic embryogenesis : a model for early development in higher plants. Journal of The Plant Cell 5: 1411-1423.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ องค์ประกอบธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมัน

องค์ประกอบ	**ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)**	
	สูตร MS	สูตร OPCM
ธาตุอาหารหลัก		
NH_4NO_3	1,650.00	1,025.00
KNO_3	1,900.00	950.00
KH_2PO_4	170.00	170.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00	
$MgSO_4.7H_2O$	370.00	
ธาตุอาหารรอง		
KI	0.83	0.41
K_2SO_4		495.00
H_3BO_3	6.20	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60	9.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	3.138
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.0125
$FeSO_4.7H_2O$	27.80	27.80

ภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวก องค์ประกอบธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมัน

องค์ประกอบ	**ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อลิตร)**	
	สูตร MS	สูตร OPCM
สารอินทรีย์		
Myo-inositol	100.00	100.00
Nicotinic acid	0.50	0.50
Pyridoxine HCl	0.50	0.50
Thaiamine HCl	0.10	0.55
Glycine	2.00	2.00
Sucrose (กรัม)	30.00	30.00
วุ้น(กรัม)	7.50	7.50
pH	5.70	5.70

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวชีรวัลย์ สิทธิศักดิ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5610620014

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีสำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2555

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสุนนส่วนหนึ่งจาก สถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2

ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ทุนสนับสนุนการผลิตบัณฑิต สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ชีรวัลย์ สิทธิศักดิ์, สมปอง เตชะโต และทัศนี ขาวเนียม. ผลของการสับและสภาพวางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์. (วารสารตอบรับให้ตีพิมพ์แล้ว)