การชักนำและเพิ่มจำนวนโนดูลาร์แคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา (*Elaeis guineensis* Jacq.) ในหลอดทดลอง

Nodular Callus Induction and Proliferation from Immature Zygotic of Oil Palm Pisifera (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera)

ธิดารัตน์ ทองแผ่

Tidarat Thongpae

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

2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำและเพิ่มจำนวนโนดูลาร์แคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา (*Elaeis guineensis* Jacq.)ในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นางสาวธิดารัตน์ ทองแผ่

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ

(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

.....กรรมการ

(ดร.สุนทรียา กาละวงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

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

ลงชื่อ.....
(นางสาวธิดารัตน์ ทองแผ่)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวธิดารัตน์ ทองแผ่)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำและเพิ่มจำนวนโนดูลาร์แคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา (*Elaeis guineensis* Jacq.) ในหลอดทดลอง
ผู้เขียน นางสาวธิดารัตน์ ทองแผ่
สาขาวิชา พืชศาสตร์
ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสูตรอาหาร สภาพวางเลี้ยงและการสร้างแผลให้กับแคลลัสโดยการสับเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กเป็นจำนวนครั้งที่แตกต่างกันต่อกระบวนการชักนำโนดูลาร์แคลลัส จากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา ที่ได้จากต้นผสมเปิดอายุ 5 ปี ที่สถานีวิจัยและฝึกภาคสนามคลองหอยโข่ง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา พบว่า อาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การสร้างโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์หลังวางเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 3 เดือน ส่วนการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส ในอาหารสูตรเดิมเติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดให้ขนาดโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 122 ตารางมิลลิเมตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เมื่อย้ายโนดูลาร์แคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบา 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มน้ำหนักโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 0.22 กรัม หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน สำหรับการเพิ่มปริมาณแคลลัสพบว่า ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด แคลลัสที่ผ่านการสับจำนวน 70 ครั้งให้น้ำหนักสดแคลลัสได้สูงสุด 0.4 กรัม แต่ไม่พบการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสผลจากการศึกษานี้จะมีประโยชน์ในการดูแล และเพิ่มปริมาณแคลลัส ชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่เพื่อใช้ในการการขยายพันธุ์ รวมไปถึงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพในอนาคต

Thesis Title Nodular Callus Induction and Proliferation from Immature Zygotic of Oil Palm Pisifera (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera)
Author Tidarat Thongpae
Major Program Plant Science
Academic Year 2015

Abstract

Effects of culture media and conditions and wound application by chopping callus at various frequencies on nodular callus induction from immature zygotic embryo of oil palm, Pisifera type (collected from five years old plant maintained at Khong Hoi Khong Research Station and Field Training, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Amphoe Klong Hoi Khong, Songkhla Province) were examined. The embryos cultured on MS medium under darkness condition gave the highest nodular callus induction at 50% after culturing for 3 months. MS medium supplemented with 1 mg/L dicamba gave the biggest size of nodular callus at 122 mm^2 after culturing under darkness condition for 1 month. Then transferring nodular callus to MS medium supplemented with 0.5 mg/L dicamba gave the best fresh weight of nodular callus at 0.22 g after culturing for 2 months. However, MS medium with low concentration of dicamba at 0.1 mg/L in the present of high concentration of sucrose at 40 g/L was optimum for nodular callus proliferation and maintenance. Application of wound by chopping the nodular callus at frequency of 70 times gave the best result in proliferation of nodular callus fresh weight at 0.4 g. Unfortunately, embryogenic callus was not obtained. The results obtained from this study will bevery useful forfurther studying in of proliferation and induction of embryogenic callus subsequent to plantlet regeneration in order to improve oil palm trees through a biotechnological method in the future.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความกรุณาของ ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้ความรู้ คำสั่งสอน ทั้งด้านการเรียน การวิจัย ด้านคุณธรรม จริยธรรม และสอนทักษะในด้านต่าง ๆ ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ดร.ทัศนี ขาวเนียม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ คอยแนะนำให้คำปรึกษา และสอนทักษะต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยขอขอบคุณ ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และดร.สุนทรียา กาละวงศ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำต่าง ๆ รวมถึงการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องภายในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ พ่อพงศ์พัทธ์ ทองแผ่ ผู้ชายที่แสนดีทุกสุดในโลก ที่คอยเป็นแรงผลักดัน คอยให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และเลี้ยงดูตลอดจนให้ทุนการศึกษาตลอดมา ขอขอบพระคุณ แม่วรรณรักษ์ จะรา ที่คอยแนะนำสั่งสอน ให้กำลังใจ เป็นห่วง ช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ตลอดมา

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ชาวพืชศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ร่วมทำกิจกรรมและให้การพึ่งพาอาศัยจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณทุนบัณฑิตศึกษาภายใต้โครงการวิจัยมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ และสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูกทุกท่านที่คอยเป็นกำลังใจ คอยช่วยเหลือและคำปรึกษาในทุก ๆ ด้าน

ธิดารัตน์ ทองแผ่

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายกายภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(11)
หนังสือตอบรับตีพิมพ์	(12)
สรุปเนื้อหา	
บทที่ 1 บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	8
บทที่ 2 การทดลอง	
การทดลองที่ 1 ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงต่อการชักนำโนดูลาร์แคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมัน พิสิเฟอรา (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera)	9
การทดลองที่ 2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) แบบพิสิเฟอรา	25
การทดลองที่ 3 ปัจจัยที่มีผลต่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากโนดูลาร์แคลลัสขอปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) แบบพิสิเฟอรา	36
บทที่ 3 สรุป	48
เอกสารอ้างอิง	50
ภาคผนวก	55
ผลงานตีพิมพ์	57
ประวัติผู้เขียน	63

รายการตาราง

ตางรางที่		หน้า
2.1	ผลของไดแคมบาต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	19
2.2	ผลของ 2-iP และ 2,4-D ต่ออัตราการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	20
2.3	ผลของผงถ่านต่อการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	28
2.4	ผลของความเข้มข้นไดแคมบาต่อเพิ่มจำนวนโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร OPCM หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	30
2.5	ผลของน้ำตาลซูโครส และ ซอร์บิทอล ต่อการตอบสนองของโนดูลาร์แคลลัสหลังวางเลี้ยง2 เดือนบนอาหารสูตร MS ร่วมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลิกรัมต่อลิตร	32
2.6	ผลของไดแคมบาและซูโครสต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	40
2.7	ผลของ GA_3ต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	42
2.8	ผลของการสับโนดูลาร์แคลลัสต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส และการพัฒนาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน	44
ภาคผนวก1		
	องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร	56

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.1	สัดส่วนการผลิตน้ำมันพืชในตลาดโลก	3
1.2	การนำปาล์มน้ำมันไปใช้ประโยชน์	4
2.1	ลักษณะของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอราจากผลอายุ 5 เดือนหลังการผสมเกสรอายุต้น 5 ปี	11
2.2	ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสของปาล์มน้ำมันหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (ย้ายเลี้ยงทุกเดือน)	15
2.3	ลักษณะของโนดูลาร์แคลลัสจากคัพภะอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรและสภาพวางเลี้ยงต่างๆ ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์= 2 มิลลิเมตร)	16
2.4	ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณของโนดูลาร์แคลลัสของปาล์มน้ำมันหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	17
2.5	ลักษณะของโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตรต่างๆ ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์= 2 มิลลิเมตร)	18
2.6	ปริมาณโนดูลาร์แคลลัสหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้นต่างๆ	19
2.7	ผลของ 2-iP และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่ออัตราการเพิ่มปริมาณของโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตรMS หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=2 มิลลิเมตร)	21
2.8	ผลของผงถ่านความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มปริมาณของโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (บาร์ = 5 มิลลิเมตร)	29
2.9	ผลของไดแคมบาความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มปริมาณของโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร OPCM หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (บาร์= 5 มิลลิเมตร)	30
2.10	ผลของน้ำตาล ซูโครสและ ซอร์บิทอล ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการตอบสนองของโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (บาร์= 5 มิลลิเมตร)	33
2.11	ผลของไดแคมบาและซูโครสต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=5 มิลลิเมตร)	41
2.12	ผลของ GA_3 ต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=5 มิลลิเมตร)	43
2.13	ผลของจำนวนครั้งในการสับแคลลัสต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	45

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

2,4-D	=	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
2-iP	=	N6-isopentenyl adenine
BA	=	6-benzyadenineacid
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan's multiple range test
GA_3	=	Gibberellic acid
MS	=	Murashige and Skoog medium
NAA	=	1-Naphthaleneaceticacid
OPCM	=	Oil palm culture medium
PBZ	=	Paclobutrazol
SE	=	Somatic embryo
WPM	=	Woody plant medium

หนังสือตอบรับตีพิมพ์

หนังสือตอบรับตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

วันที่ 18 มีนาคม 2558

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาตีพิมพ์บทความวิจัย
เรียน ผู้แต่ง

ตามที่ท่านได้ส่งบทความวิจัย **ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera)** เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์นั้น กองบรรณาธิการฯ ได้พิจารณาแล้วเห็นว่าบทความวิจัยดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับการตีพิมพ์ในวารสารฯ จึงตอบรับตีพิมพ์ลงวารสารฯ ในปีที่ 2 ฉบับที่ 2 (เมษายน-มิถุนายน 2558) หน้า 41-45 ทั้งนี้ กองบรรณาธิการฯ จะเผยแพร่ผลงานในรูปแบบ e-journal ซึ่งท่านสามารถดาวน์โหลดบทความต้นฉบับได้จากเว็บไซต์ของวารสารฯ

กองบรรณาธิการหวังว่าจะได้รับการเสนอผลงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารฯ จากท่านในโอกาสต่อไป

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)
บรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

กองบรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์
ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
โทร. 074-286138-39

หนังสือตอบรับตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

วันที่ 7 ธันวาคม 2558

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาตีพิมพ์บทความวิจัย
เรียน ผู้แต่ง

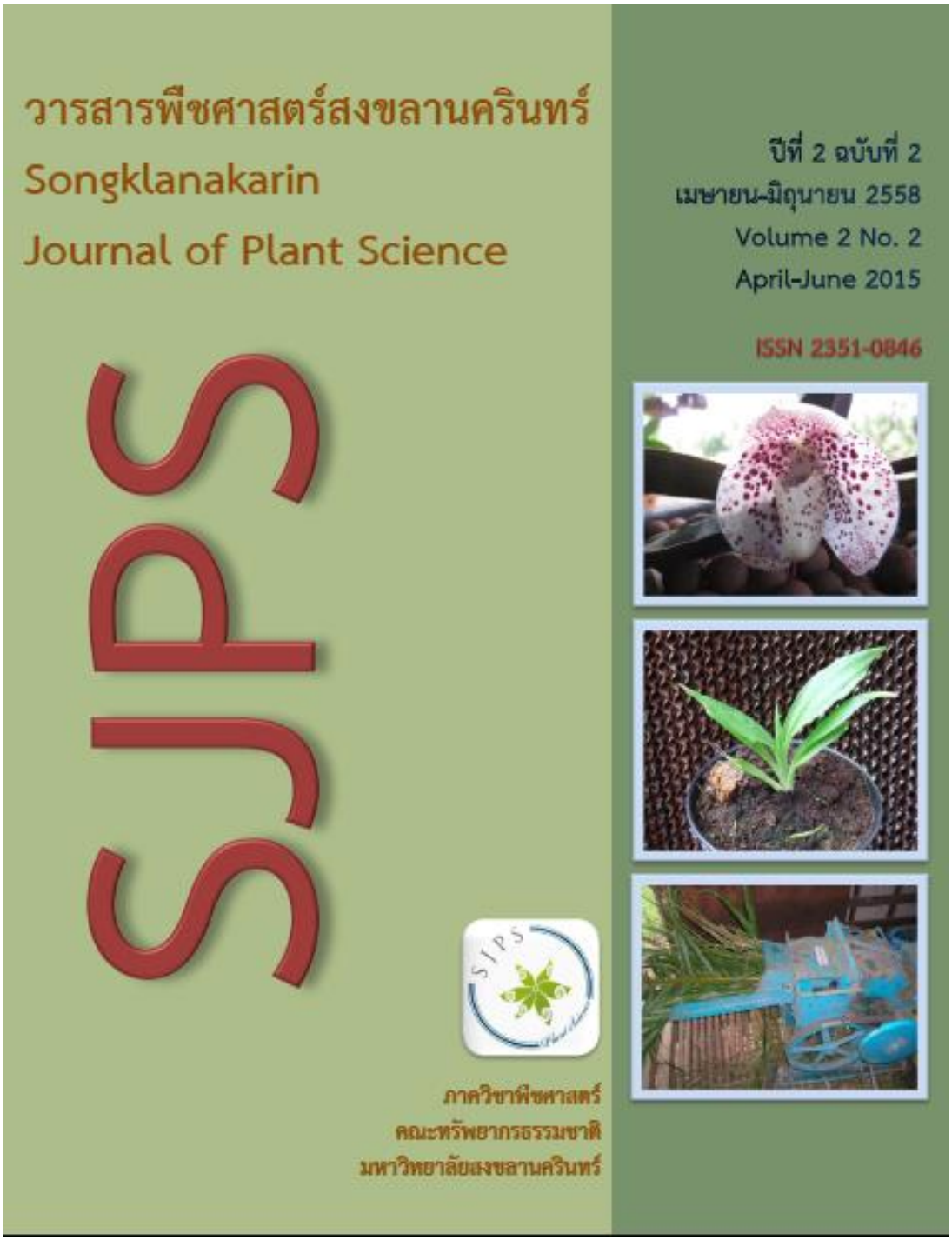
ตามที่ท่านได้ส่งบทความวิจัยเรื่อง **ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera)** เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์นั้น กองบรรณาธิการฯ ได้พิจารณาแล้วเห็นว่าบทความวิจัยดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับการตีพิมพ์ในวารสารฯ จึงตอบรับตีพิมพ์ลงวารสารฯ ในปีที่ 3 ฉบับที่ 1 (มกราคม-มีนาคม 2559) ทั้งนี้กองบรรณาธิการฯ จะเผยแพร่ผลงานในรูปแบบ e-journal ซึ่งท่านสามารถดาวน์โหลดบทความต้นฉบับได้จากเว็บไซต์ของวารสารฯ

กองบรรณาธิการหวังว่าจะได้รับการเสนอผลงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารฯ จากท่านในโอกาสต่อไป

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)
บรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

กองบรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์
ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
โทร. 074-286138-39


วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์
Songklanakarin
Journal of Plant Science
SJPS
ปีที่ 2 ฉบับที่ 2
เมษายน-มิถุนายน 2558
Volume 2 No. 2
April-June 2015
ISSN 2351-0846
ภาควิชาพืชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

น้ำมันเป็นพลังงานชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตนอกจากการใช้ในชีวิตประจำวันแล้วยังมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจ น้ำมันเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ใช้แล้วหมดไปและไม่สามารถหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ในปัจจุบันนี้น้ำมันถือได้ว่าเป็นตัวขับเคลื่อนสำคัญทางระบบเศรษฐกิจ ไม่ว่าจะด้านการขนส่งทั้งทางบก ทางน้ำ และทางอากาศ นอกจากนี้ยังใช้ในด้านอุตสาหกรรม และเกษตรกรรมอีกด้วย ความต้องการน้ำมันจึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ตามจำนวนประชากรที่เพิ่มสูงขึ้น และในระบบเศรษฐกิจที่มีการขยายตัวอย่างต่อเนื่องความต้องการพลังงานก็เพิ่มสูงขึ้นจนไร้ขีดจำกัดแต่ในทางกลับกันน้ำมันธรรมชาติก็ลดปริมาณลงเรื่อยๆทำให้ในแต่ละประเทศมีการตื่นตัวและพยายามที่จะหาพลังงานทดแทนจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียนทางธรรมชาติ หนึ่งในนั้นก็คือพืชน้ำมัน พืชน้ำมันมีหลายชนิดแต่ชนิดที่ให้ผลตอบแทนน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่มากที่สุดเมื่อเทียบกับพืชชนิด คือ ปาล์มน้ำมันรองลงมาคือถั่วเหลืองเรฟซีดมะพร้าว และถั่ว (ภาพที่1.1) จึงถือได้ว่าปาล์มน้ำมันเป็นพืชพลังงานทางเลือกที่สำคัญพืชหนึ่งเมื่อนำน้ำมันที่สกัดได้มาผ่านกระบวนการทางเคมีต่างๆจะกลายเป็นไบโอดีเซล ทั้งยังมีการนำไปใช้บริโภคโดยตรงหรือการแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่าในอุตสาหกรรมต่อเนื่อง (สรัชพงศ์, 2556) เช่น น้ำมันปาล์มโอเลอีนทำอาหารในครัวเรือน สบู่ ผงซักฟอก เนยเทียม ไขมันผสม ขนมปังกรอบ ครีม เนยขาว วาสนาปาตี ไขมันมันบริสุทธิ์เมลโลรีน กลีเซอรีน เนยโกโก้เครื่องสำอาง อาหารสัตว์ และโอเลโอเคมีคอล (oleochmical) ซึ่งรวมไปถึงการผลิตเชื้อเพลิง (เมทานอล) (ภาพที่ 1.2) นอกจากนี้ในส่วนของลำต้นนำมาผลิตเป็นเฟอร์นิเจอร์เชื้อเพลิงอัดเม็ด ที่มีค่าซัลเฟอร์ต่ำ ซึ่งช่วยลดปัญหามลพิษได้ดี ทางใบปาล์ม ยังสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารสัตว์ทดแทนหญ้าในกรณีที่มีหญ้าขาดแคลน ทะลายเปล่าใช้ในการเพาะเห็ดฟาง เป็นต้น (ธีระ และคณะ, 2548) ปาล์มน้ำมันจึงเป็นพืชพลังงานทางเลือกที่สามารถนำมาทดแทนพืชน้ำมันชนิดอื่นๆได้ ทั้งยังมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น ความหลากหลายของการใช้ประโยชน์ดังกล่าวจึงเป็นตัวแปรสำคัญที่ส่งผลให้ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญทั้งในระดับโลกและระดับประเทศสำหรับประเทศไทยพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่อยู่ทางภาคใต้ของประเทศประกอบกับในที่ช่วงปี พ.ศ. 2557 ราคายางพาราตกต่ำรัฐบาลส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาปลูกปาล์มน้ำมันแทนยางพารา โดยการออกนโยบายจูงใจต่าง ๆ อาทิ การให้เงินสงเคราะห์สำหรับชาวสวนยางพาราที่หันมาปลูกปาล์มน้ำมันสูงถึง 2.6 หมื่นบาทต่อไร่ ในขณะที่ปลูกยางพาราจะได้รับเงินสงเคราะห์เพียง 1.6 หมื่นบาทต่อไร่ (พวงเพชร, 2558)

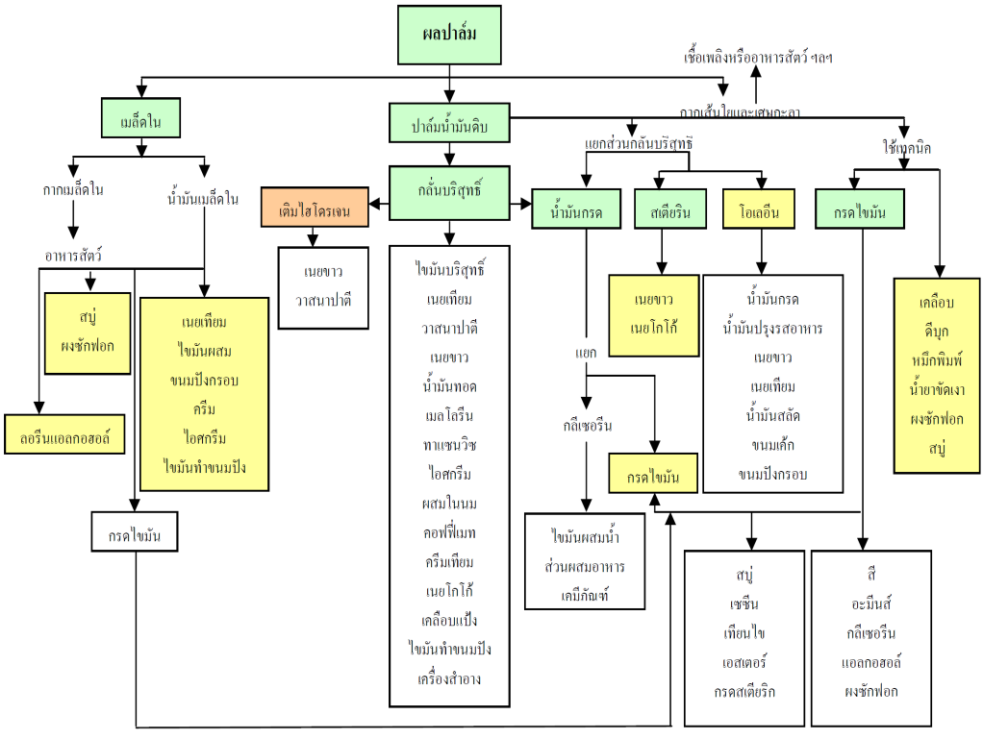
ปาล์มน้ำมันจัดอยู่ในสกุล *Elaeis* สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ *E. guineensis* *E. oleifera* และ *E. odora*แต่ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ คือ *E. guineensis* ปาล์มน้ำมันชนิดนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ แบบดูรา แบบพิสิเฟอรา และแบบเทเนอราโดยแบบที่นิยมปลูกเป็นการค้า คือ แบบเทเนอรา ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างแม่แบบดูรา กับพ่อแบบพิสิเฟอรา (ธีระ, 2554) หลังจากที่ปลูก 2-2ปีครึ่ง จะเริ่มให้ผลผลิต และเก็บเกี่ยว ให้ผลผลิตทะลายตลอดทั้งปีสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้นานมากกว่า 25 ปี ลักษณะโดยทั่วไปของปาล์มน้ำมันจะมีลำต้นเดียวตั้งตรง ส่วนของโคนต้นจะใหญ่กว่าส่วนบน ใบมีลักษณะเรียบแบนมีขนาดใหญ่เป็นแบบรูปขนนก มีหนามสั้นๆ ที่โคนก้านใบ (ธีระ, 2554) ให้ผลผลิตน้ำมันดิบเฉลี่ย 4-5 ตันต่อเฮกตาร์ และอาจเพิ่มสูงขึ้น 7ตันต่อเฮกตาร์ (Biofuel, 2007) นอกจากนี้ยังทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ค่อนข้างแปรปรวน มีปัญหาเรื่องโรคศัตรูพืชน้อย และดูแลรักษาง่ายกว่าพืชอายุสั้น

ปาล์มน้ำมันมีถิ่นกำเนิดอยู่ในหลายประเทศบริเวณชายฝั่งตะวันตกและตอนกลางของทวีปอัฟริกา ซึ่งเป็นพืชในเขตร้อนชื้น (ธีระ, 2554) แพร่ขยายพันธุ์ไปยังทวีปยุโรป อเมริกาและเอเชีย (ศูนย์พัฒนานิคมสร้างตนเองภาคใต้, 2534) ปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่นเดียวกับ มะพร้าว ตาล จาก และระกำ (พรชัย, 2523) เป็นพืชยืนต้นผสมข้ามมีช่อดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกันแต่ช่วงเวลาการบานดอกไม่พร้อมกัน จัดเป็นพืชที่มีการผสมพันธุ์แบบผสมข้ามต้น การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดทำให้พันธุกรรมของชั่วรุ่นลูกที่ได้ไม่มีความสม่ำเสมอ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ศักยภาพในการให้ผลผลิตของต้นปาล์มน้ำมันแตกต่างกันในแต่ละต้น แม้ว่าในปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราได้มาโดยการควบคุมการผสมระหว่างต้นแม่แบบดูรากับต้นพ่อแบบพิสิเฟอราก็ตาม แต่เนื่องจากในการผสมข้าม ต้นพ่อต้นแม่พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการผสมพันธุ์ยังไม่ได้เป็นสายพันธุ์แท้ที่มากพอ ลูกที่เกิดจากการผสมจึงไม่มีความสม่ำเสมอ (ธีระ, 2554) และต้นที่ได้จากเมล็ดหนึ่งเมล็ดส่วนใหญ่จะได้พืชต้นใหม่แค่ต้นเดียวแต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะสามารถเพิ่มจำนวนได้เป็นทวีคูณและต้นใหม่ที่ได้จะมีลักษณะเหมือนต้นเดิมทุกประการ เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้าม การใช้ต้นพ่อแม่พันธุ์ที่ได้จากการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองจะช่วยทำให้ลดอัตราความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้

มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันโดยใช้คัพภะ (Te-chato,1998; Kanchanapoom and Domyas, 1999) ใบอ่อน (สมปอง และคณะ, 2547) ราก (Wooi, 1995) ช่อดอก (Teixeira *et al.*, 1994) แต่การรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ทำในต้นเทเนอรา

ภาพที่ 1.1สัดส่วนการผลิตน้ำมันพืชในตลาดโลก
ที่มา: อุตสาหกรรมน้ำมันพืช (2555)

ในส่วนของต้นพ่อพันธุ์แบบพิสิเฟอรานั้น ยีนควบคุมความหนาของกะลาเป็นยีนด้อย (Sh¯Sh¯) ลักษณะผลไม่มีกะลาหรือมีกะลาบางมีข้อเสียคือช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมันทำให้ผลฝ่อลีบทะลายเล็กเนื่องจากผลไม่พัฒนา ให้ผลผลิตทะลายต่ำมากไม่ใช้ปลูกเพื่อเป็นการค้าแต่จะใช้เป็นต้นสายพันธุ์พ่อเพื่อผลิตลูกผสมแบบเทเนอรา ที่เป็นพันทางการค้า (สำนักงานเกษตรจังหวัดกระบี่ , 2555) ดั้งนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน ในหลอดทดลองจะสามารถเพิ่มจำนวนต้นพ่อพันธุ์ที่ดีได้พอสำหรับใช้เป็นต้นพ่อพันธุ์ในการผลิตต้นพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมสายพันธุ์เทเนอราได้ ระยะเริ่มแรกของการเพาะเลี้ยงเนื้อปาล์มน้ำมันถือได้ว่าเป็นขั้นตอนสำคัญในการผลิตต้นปาล์มแบบพิสิเฟอราในหลอดทดลอง ตั้งแต่ระยะของการชักนำแคลลัสไปถึงขั้นตอนในการดูแลรักษาแคลลัสเพื่อให้ประสบความสำเร็จมากยิ่งขึ้นการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจึงถือได้ว่าเป็นกระบวนการที่สำคัญที่จะผลิตต้นกล้า รวมไปถึงปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอราในหลอดทดลองต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 1.2การนำปาล์มน้ำมันไปใช้ประโยชน์
ที่มา: ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันจังหวัดสุราษฎร์ธานี (2558)

ตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของผลของปาล์มน้ำมันจะแตกต่างกันตามแบบ ซึ่งเป็นผลจากยีนควบคุมความหนาของกะลา 1 คู่จำแนกได้ 3 แบบดังนี้แบบดูรามีกะลาหนา 2-8 มิลลิเมตรและไม่มีวงเส้นประสีดำอยู่รอบกะลาเปลือกนอกบาง 35-60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผลมียีนควบคุมเป็นลักษณะเด่น ($Sh^{+}Sh^{+}$) แบบที่สองคือพิสิเฟอรา มียีนควบคุมลักษณะผลเป็นลักษณะด้อย ($Sh^{-}Sh^{-}$) ลักษณะผลไม่มีกะลา หรือมีกะลาบางมีข้อเสียคือช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมันทำให้ผลฝ่อลีบทะลายเล็กเนื่องจากผลไม่พัฒนา ให้ผลผลิตทะลายต่ำมากไม่นิยมปลูกเพื่อการค้า จึงมีการนำมาใช้เป็นแหล่งของพ่อพันธุ์ที่สามารถให้เรณูเพื่อผสมกับต้นแม่พันธุ์แบบดูรา (ธีระ, 2554) แบบที่สามคือเทเนอรามีกะลาบางตั้งแต่ 0.5-4 มิลลิเมตร มีวงเส้นประสีดำอยู่รอบกะลาเปลือกนอกบาง 60-90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผลเป็นพันธุ์ทางเกิดจากการผสมข้ามระหว่างแบบดูรา และแบบพิสิเฟอรา ($Sh^{+}Sh^{-}$)

สำหรับประชากรแหล่งพ่อพันธุ์

แหล่งประชากรพ่อพันธุ์ที่สำคัญเช่น AVROS เป็นกลุ่มพันธุ์ที่ใช้เป็นแหล่งพ่อพันธุ์โดยสถาบัน AVROS อินโดนีเซียได้รับมาจากสวนพฤกษาศาสตร์ EALA ประเทศแซร์คัดเลือกได้สายพันธุ์ที่ดีเด่นเรียกว่า SP 540 ที่มีลักษณะดีซึ่งใช้เป็นพ่อพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ YANGGAMBI เป็นกลุ่มพันธุ์พ่อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ AVROS มีถิ่นกำเนิดในประเทศแซร์ ทวีปอัฟริกา ดังนั้นลักษณะลูกผสมที่มีพันธุ์พ่อกลุ่ม YANGGAMBI จะมีลักษณะคล้ายลูกผสมที่มีพันธุ์พ่อจากกลุ่ม

พันธุ์ AVROS La Me เป็นพันธุ์ที่มีบางสายพันธุ์มีการปรับปรุงพันธุ์ที่เมือง La Me ประเทศไอวอรีโคสต์ทวีปอัฟริกาลักษณะของลูกผสมที่มีพ่อพันธุ์เป็นกลุ่ม La Me จะมีต้นเตี้ยผลเล็กผลมีลักษณะเป็นรูปหยดน้ำทะลายมีขนาดเล็กกะลาหนากว่าลูกผสมอื่น ๆ ขนาดเมล็ดในเล็กแต่เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงลักษณะเด่นคือก้านทะลายยาว EKONA เป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีบางสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคเหี่ยวจากเชื้อ Fusarium ลักษณะต้นเตี้ย และให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงกว่าพันธุ์จากกลุ่มอื่น ๆ CALABAR กลุ่มพันธุ์นี้มีถิ่นกำเนิดเดิมจาก CALABAR ประเทศไนจีเรียทวีปอัฟริกาลูกผสมที่ใช้ CALABAR เป็นพ่อพันธุ์พบว่าเจริญเติบโตได้ดีในสภาพฝนตกชุกความชื้นสูงและในสภาพที่แสงแดดน้อยผลดิบมีสีเขียวและเปลี่ยนเป็นสีส้มเมื่อสุก (สำนักงานเกษตรจังหวัดกระบี่, 2555)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันเป็นการขยายพันธุ์อีกวิธีหนึ่งที่จะช่วย ในการผลิตต้นกล้าให้เพียงพอกับความต้องการไม่ว่าจะใช้สำหรับผลิตต้นพ่อแม่พันธุ์ และลูกผสมที่ใช้ในทางการค้า โดยกระบวนการตัดแยกชิ้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ในสภาพปลอดเชื้อ การขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ให้ประสบความสำเร็จนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

1. สูตรอาหาร

กระบวนการตัดแยกชิ้นส่วนพืชมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อภายในห้องที่มีการควบคุมแสง อุณหภูมิ และความชื้นที่เหมาะสม เพื่อชักนำ แคลลัส หรือพืชต้นใหม่โดยตรง ทวีต้นพันธุ์จำนวนมากในเชิงการค้า เพิ่มจำนวนพืชที่ขยายพันธุ์ยาก ใกล้จะสูญพันธุ์ ผลิตพืชปลอดเชื้อ สูตรอาหารที่เลือกเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การศึกษาในแต่ละระยะของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจนไปถึงการเกิดเป็นพืชต้นใหม่สำเร็จ (สมปอง, 2539) การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถทำได้หลายวิธี ใช้ระยะเวลาสั้นและได้ต้นที่ตรงตามพันธุ์ (ปิยะดา และอารีย์, 2551) ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยง สามารถสร้างยอดใหม่ได้จำนวนมาก และยังสามารถนำแคลลัสมาใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ได้ การเจริญเติบโต และพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น พบว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จ สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายสูตรด้วยกัน ซึ่งสูตรอาหารแต่ละสูตรมักเรียกชื่อตามนักวิทยาศาสตร์ที่เป็นผู้คิดสูตรเช่น สูตรอาหารของมูราชิกและสกุค (Murashige and Skoog;MS) สูตรอาหารของไวท์ (W) สูตรอาหารของแกมบอร์ก (B5) สูตรอาหารของเชนและฮิลดีแบรนด์ (SH) สูตรอาหารของลินสเมียและสกุค (LS) สูตรอาหารของเฮลเลอร์ (H) อาหารแต่ละสูตรมีส่วนประกอบที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ การใช้งาน และชิ้นส่วนของพืชที่เพาะเลี้ยง (สมปอง, 2539) Maureen และคณะ (1990) รายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะอ่อนของมะละกออายุ 90-114 วันหลังระยะดอกบานบนอาหารสูตร MS สามารถชักนำยอดรวมจำนวนมากหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 150 วัน Kanchanapoom แล Damyaos (1999) ตัดแยกคัพภะปาล์มน้ำมันมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 ร่วมกับ 2,4-D (2,4-Dichorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวสามารถชักนำแคลลัสได้ภายใน 8 สัปดาห์ หลังจากเพาะเลี้ยง

และชักนำเอ็มบริออยด์ (Embryoid) บนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่พบการเจริญเป็นต้นอ่อน Teixeira และคณะ (1993) ได้ใช้ชิ้นส่วนของคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันหลังการผสมเกสร 77 91 100 114 128 140 และ 193 วัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 พบว่าอายุของคัพภะแตกต่างกันส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส และลักษณะแคลลัสที่แตกต่างกัน โดยคัพภะอายุ 193 วันให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 93 เปอร์เซ็นต์ Te-chato (1998) เพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA เข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าให้การสร้างแคลลัสดีที่สุด

2. ความเข้มข้นของสูตรอาหารและน้ำตาล

สภาพเครียดจากการใช้สารเคมี โดยเฉพาะชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ (สมปอง, 2539) Wilsom และคณะ (1996) รายงานผลของน้ำตาลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่า เป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์แสงของพืช นิยมเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช Te-chato และ Hilae (2007) ศึกษาความเข้มข้นองค์ประกอบของอาหารสูตร MS3 ระดับคือ อาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง อาหารสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารเหลือหนึ่งในห้าส่วน และอาหารสูตร MS ร่วมกับน้ำตาลกลูโคส ซูโครส ฟรักโทส แมนนิทอล หรือซอร์บิทอลเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 โมลาร์พบว่าอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ส่งเสริมการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราสูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ สกุลรัตน์ และสมปอง (2553) รายงานผลของน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ให้การสร้างโพรโทคอร์มของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรสูงสุด 51.25 เปอร์เซ็นต์ Kong และคณะ (2012) รายงานผลของอาหารสูตร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร ในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากใบเลี้ยงของ Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) ให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 23.6 เปอร์เซ็นต์หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ Raju และคณะ (2013) รายงานผลของสูตรอาหาร MSที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ร่วมกับน้ำตาลเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของขมิ้นขาวป่าพบว่าให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 84.71 เปอร์เซ็นต์หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ Renและคณะ (2010) ได้รายงานการใช้น้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในข้าวสายพันธุ์ Zhoumai 18 สามารถชักนำแคลลัสสูงสุด 77.76 เปอร์เซ็นต์ และในสายพันธุ์ Yumai 34 น้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 82.74 เปอร์เซ็นต์

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโต ที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันนั้นมักจะเป็นสารออกซิน ผลของออกซินในระดับเซลล์โดยทั่วไปช่วยในการแบ่งเซลล์ เพิ่มปริมาณของเซลล์ และสร้างผนังเซลล์เพิ่มขึ้นพืชสามารถสร้างสารออกซินได้เองบริเวณเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย ใบอ่อน และใบที่กำลังขยายตัว ดอก ผล ปลายราก ปลายยอด และส่วนบริเวณที่ยังอ่อนอยู่ (เยาวลักษณ์

, 2527) Scherwinski และคณะ (2010) รายงานผลของการใช้พิคลอแรมและ 2,4-D ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของปาล์มน้ำมันจากต้นอ่อนทำการตัดแบ่งเป็น 3 ส่วน คือส่วนโคน ส่วนกลาง และส่วนปลาย พบว่าส่วนโคนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับพิคลอแรมเข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 41.5 เปอร์เซ็นต์ Silva และคณะ (2012) ได้ทดลองเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมัน 9 สายพันธุ์บนอาหารสูตร MS ร่วมกับพิคลอแรมเข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ หลังจากวางเลี้ยง 60 วัน พบว่าสายพันธุ์ C2001 สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 81 เปอร์เซ็นต์ Khairun และ Te-chato (2012) ได้ชักนำดอกของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองใช้อาหารสูตรMS ร่วมกับ NAA (1-Naphthaleneaceticacid: NAA) เข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อลิตรและ PBZ (Paclobutrazol:PBZ) เข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำดอกได้สูงสุด 10.2 เปอร์เซ็นต์สมปอง และคณะ (2547) รายงานการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี บนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 15 เปอร์เซ็นต์

4. สภาพการเพาะเลี้ยง

แสงเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งที่จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด และชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง Te-chato (1998) รายงานผลการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร MS ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเซตเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 6,000 ลักซ์ ต่อการชักนำเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (ใบเลี้ยง) (Haustorium: HE) จากต้นอ่อนระยะเริ่มแรกของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราได้สูงสุด 48.15 เปอร์เซ็นต์ Te-chato (2002) รายงานผลของอาหารสูตร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรและไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวันสามารถชักนำ SE จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสได้สูงสุด61.11 เปอร์เซ็นต์หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา30 วัน Raju และคณะ (2014) ชักนำการงอกของ SE (Somatic embryo: SE) ของใบขมิ้นขาวเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ร่วมกับ GA_3 (Gibberellin: GA_3) เข้มข้น 1.44 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 86.7 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงในที่มืด 3 สัปดาห์Raju และคณะ (2013) ชักนำแคลลัสจากใบของขมิ้นขาวป่าเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรMS ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA (6-Benzyadenineacid: BA) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 86.7 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ Hasbullah และคณะ (2011) วางเลี้ยงใบของเยอบีร่าบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 1.8 ถึง 2 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อชักนำโนดูลาร์แคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนพันธุ์ปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา
2. เพื่อเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสไว้ใช้ในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในการขยายพันธุ์รวมไปถึงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราในอนาคต

บทที่ 2

การทดลองที่ 1
ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงต่อการชักนำโนดูลาร์แคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมัน พิสิเฟอรา (*Elaeisguineensis*Jacq. var. Pisifera)

Effects of Culture Media and Conditions on Nodular Callus Induction from Immature Zygotic Embryo of Oil Palm Pisifera (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera)

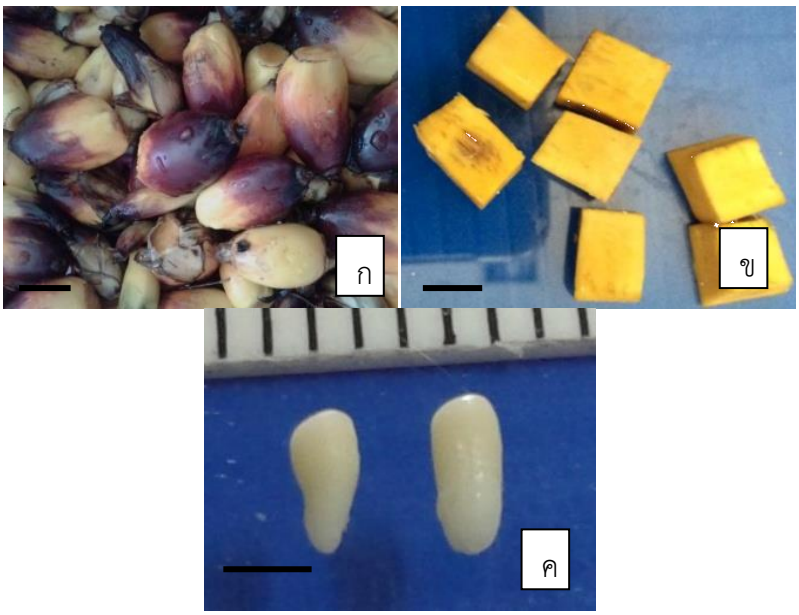
บทนำ

น้ำมันเป็นพลังงานชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต นอกจากการใช้ในชีวิตประจำวันแล้วยังมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจ ในขณะเดียวกันความต้องการน้ำมันก็ขยายตัวสูงขึ้นทำให้ในแต่ละประเทศมีการตื่นตัว และพยายามที่จะหาพลังงานทดแทน จากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียนก็คือพืชน้ำมัน (สรัชพงศ์, 2556) โดยปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจเพียงชนิดเดียวในโลกที่ให้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่สูงสุดเมื่อเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น ปาล์มน้ำมันจัดอยู่ในสกุล *Elaeis* สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ *E. guineensis E. oleifera*และ *E. odora* แต่ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ คือ *E. guineensis* ปาล์มน้ำมันชนิดนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ แบบดูรา แบบพิสิเฟอรา และแบบเทเนอรา โดยแบบที่นิยมปลูกเป็นการค้า คือ แบบเทเนอราเป็นลูกผสมระหว่าง สายพันธุ์แม่ คือ แบบดูรา และสายพันธุ์พ่อ คือ แบบพิสิเฟอรา (ธีระ, 2554) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในหลายประเทศบริเวณชายฝั่งตะวันตกของทวีปแอฟริกาตอนกลาง เป็นพืชในเขตร้อนชื้น (ธีระ, 2554) และได้มีการแพร่ขยายพันธุ์ไปยังทวีปยุโรป อเมริกาและเอเชีย (ศูนย์พัฒนานิคมสร้างตนเองภาคใต้, 2534) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่นเดียวกับ มะพร้าว ตาล จาก และระกำ (พรชัย, 2523) โดยทั่วไปปาล์มน้ำมันใช้เมล็ดในการขยายพันธุ์ ทำให้พันธุกรรมของชั่วรุ่นลูกที่ได้ไม่มีความสม่ำเสมอ เนื่องจากปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชที่มีการผสมพันธุ์แบบผสมข้ามต้น จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ศักยภาพในการให้ผลผลิตของต้นปาล์มแตกต่างกันในแต่ละต้น การผสมข้ามต้นพ่อต้นแม่ปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการผสมพันธุ์หากใช้ต้นพ่อต้นแม่พันธุ์ที่ไม่ได้มีความเป็นสายพันธุ์แท้ที่มากพอลูกที่เกิดจากการผสมจะไม่มีความสม่ำเสมอ แม้จะอยู่ในการควบคุมการผสมพันธุ์ระหว่างต้นแม่ดูรากับต้นพ่อพิสิเฟอราก็ตาม (ธีระ, 2554) และหนึ่งเมล็ดให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันเพียงหนึ่งต้น แต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเพิ่มปริมาณต้นกล้าจำนวนมาก และต้นใหม่ที่ได้จะมีลักษณะเหมือนต้นเดิมทุกประการ เนื่องจากปาล์มน้ำเป็นพืชผสมข้ามการใช้ต้นพ่อแม่พันธุ์ที่ได้จากการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองจะช่วยทำให้ลดอัตราการแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ ในส่วนของต้นพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา ยีนควบคุมความหนาของกะลาเป็นลักษณะด้อย (recessive, $Sh^{-}Sh^{-}$) ลักษณะผลไม่มีกะลาหรือมีกะลาบางแต่มีข้อเสียคือช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมันทำให้ผลฝ่อลีบทะลายเล็กเนื่องจากผลไม่พัฒนา ผลผลิตทะลายต่ำมากไม่ใช้ปลูกเพื่อการค้าแต่จะใช้เป็นต้นสายพันธุ์พ่อเพื่อผลิตลูกผสมเทเนอราที่เป็นพันธุ์ทางการค้า (สำนักงานเกษตรจังหวัดกระบี่, 2555) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา นั้นระยะของการเกิดเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากชิ้นส่วนของพืชจนกระทั้งเกิดเป็นพืชต้นใหม่จะประสบความสำเร็จได้ขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร ชิ้นส่วนปาล์มน้ำมัน สภาพการวางเลี้ยง นอกจากนี้ยังมีสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ที่ส่งเสริมให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ประสบความสำเร็จมากขึ้น ในส่วนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส สามารถพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ในอัตราสูง ดั้งนั้นในระยะนี้หากมีการใช้สูตรอาหาร ชิ้นส่วนปาล์มน้ำมัน และวางเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสม ก็จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ และในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการศึกษานี้จะมีประโยชน์ในการขยายพันธุ์ รวมไปถึงการปรับปรุงแบบปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

ในการศึกษานี้ใช้คัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอราจากผลอายุ 5 เดือนหลังการผสมเกสรจากต้นปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราพันธุ์ผสมเปิดที่มีอายุต้น 5 ปี เก็บทะลายปาล์มน้ำมันเมื่อวันที่ 1 มีนาคม 2557 จากสถานีวิจัยและฝึกภาคสนามคลองหอยโข่งคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา แยกผลปาล์มออกจากทะลาย คัดผลปาล์มน้ำมันขนาดประมาณ 2×3.5×2 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.1ก) นำผลปาล์มทั้งหมดจุ่มแช่น้ำเป็นเวลา 150 นาที แล้วล้างด้วยทีโพล และปล่อยน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นใช้กรรไกรตัดเส้นใยออก ตัดเอาส่วนที่ห่อหุ้มคัพภะอยู่เป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาด 5×5×5 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2.1ข) นำชิ้นส่วนที่ได้จุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ พร้อมเขย่าเป็นเวลา 30 วินาที ฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยคลอร๊อกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน- 20 1-2 หยดต่อสารฟอกฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นใช้ปากคีบและมีดผ่าตัด ตัดแยกนำส่วนที่เป็นคัพภะออกมา (ภาพที่ 2.1ค) แล้วนำไปวางเลี้ยงเพื่อชักนำโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสังเคราะห์



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอราจากผลอายุ 5 เดือนหลังการผสมเกสรอายุต้น 5 ปี
ก. ผลปาล์มน้ำมันขนาดประมาณ 2×3.5×2 เซนติเมตร (บาร์=1เซนติเมตร)
ข. ผลปาล์มน้ำมันที่ตัดเส้นใยออกรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาด 5×5×5 มิลลิเมตร (บาร์=0.5 เซนติเมตร)
ค. คัพภะอ่อนขนาด 1.5×2 มิลลิเมตร

วิธีการศึกษา

1.ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงชักนำโนดูลาร์แคลลัสจากคัพภะอ่อน

นำชิ้นส่วนคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบฟิสิเฟอรา จากผลอายุ 5 เดือน หลังการผสมเกสรตัดทะลายปาล์มในเดือน มีนาคม 2557 เพาะเลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร คือสูตร MS OPCM (oil palm culture medium: OPCM) และ WPM (woody plant medium: WPM) ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงในที่มืดหรือสภาพความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อชักนำโนดูลาร์แคลลัส ย้ายเลี้ยงทุกเดือน เป็นเวลา 3 เดือน ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การสร้างโนดูลาร์แคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารโดย วางแผนทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (DMRT) แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ๆ ละ 2 หลอด

2.ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส

ย้ายโนดูลาร์แคลลัสจากการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS OPCM หรือ WPM ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลิกรัมต่อลิตร สูตรอาหารทั้ง 3 สูตรปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื่อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงในมืดหรือหรือสภาพความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1เดือน ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของโนดูลาร์แคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารโดยวางแผนทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 2 ซ้ำๆ ละ 2 หลอด

3.ผลของความเข้มข้นไดแคมบาต่อการเพิ่มจำนวนโนดูลาร์แคลลัส

ย้ายโนดูลาร์แคลลัสจากการทดลองที่ 2 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุกเดือน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ตรวจสอบน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของได

แคมบาวางแผนทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

4.ผลของ 2-iP และ 2,4-D ต่อเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส

ย้ายโนดูลาร์แคลลัสที่เก็บรักษาบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2-iP (N6-isopentenyl adenine: 2-iP) เข้มข้น 0.025 0.05 0.075 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D เข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27±1 องเซลศาเซียส หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การตอบสนองของโนดูลาร์แคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ 2-iP และ 2,4-D วางแผนทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 หลอด

ผลการทดลอง

1. การชักนำเอ็มโนดูลาร์แคลลัสจากคัพภะอ่อน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอราบนอาหารสูตร MS OPCM หรือ WPM ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในที่มืดหรือที่สว่าง เป็นเวลา 3 เดือน เพื่อชักโนดูลาร์แคลลัส พบว่าการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ในที่มืดให้การสร้างโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2.2) รองลงมาสูตรอาหาร OPCM วางเลี้ยงในที่สว่าง ให้การสร้างโนดูลาร์แคลลัส 28.57 เปอร์เซ็นต์ และวางเลี้ยงในที่มืดให้การสร้างโนดูลาร์แคลลัส 25 เปอร์เซ็นต์ในส่วนของสูตรอาหาร WPM วางเลี้ยงในที่สว่างให้การสร้างโนดูลาร์แคลลัสต่ำสุด 20 เปอร์เซ็นต์นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีการสร้าง โนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร WPM วางเลี้ยงในที่มืดและบนอาหารสูตร MS วางเลี้ยงในที่สว่าง (ภาพที่ 2.3ก-ซ)

2.ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส

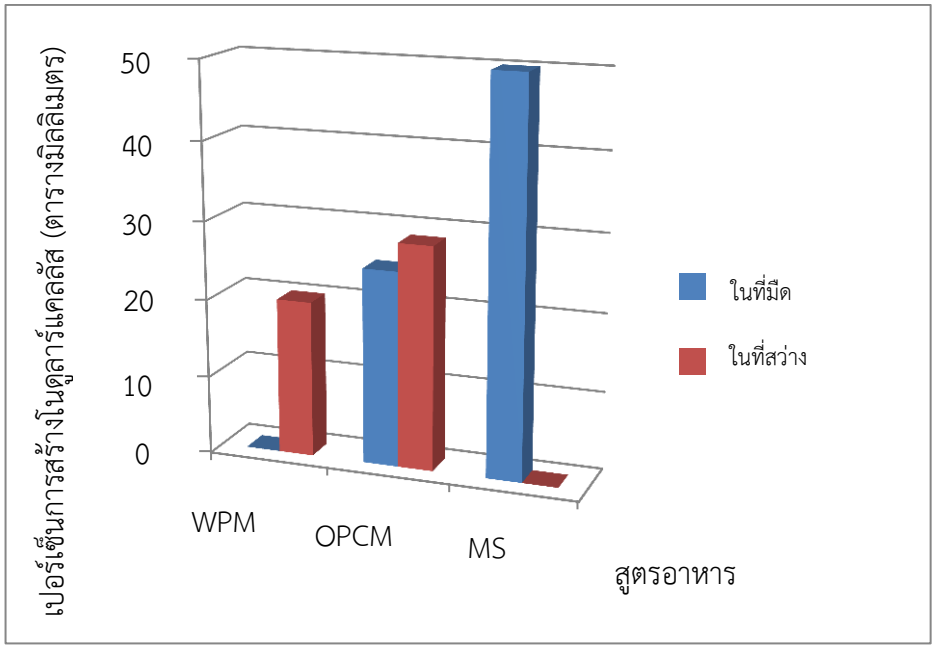
เมื่อย้ายโนดูลาร์แคลลัสที่ได้จากการทดลองแรกไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมแต่ลดความเข้มข้นของไดแคมบาเป็น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ในที่มืดให้ขนาดโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 122 ตารางมิลลิเมตร (ภาพที่ 2.4 และ 2.5ก) รองลงมาเป็นการวางเลี้ยงในที่สว่างบนสูตรอาหาร OPCM ให้ขนาดโนดูลาร์แคลลัส 97.5 ตารางมิลลิเมตร (ภาพที่ 2.5ข) และการวางเลี้ยงในที่มืดให้ขนาดโนดูลาร์แคลลัส 82.5 ตารางมิลลิเมตร (ภาพที่ 2.5ค) ในส่วนการวางเลี้ยงบนสูตรอาหาร WPM ในที่สว่างให้ขนาดโนดูลาร์แคลลัสต่ำสุด 6.5 ตารางมิลลิเมตร (ภาพที่ 2.5 ง) หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

3.ผลของความเข้มข้นไดแคมบาต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส

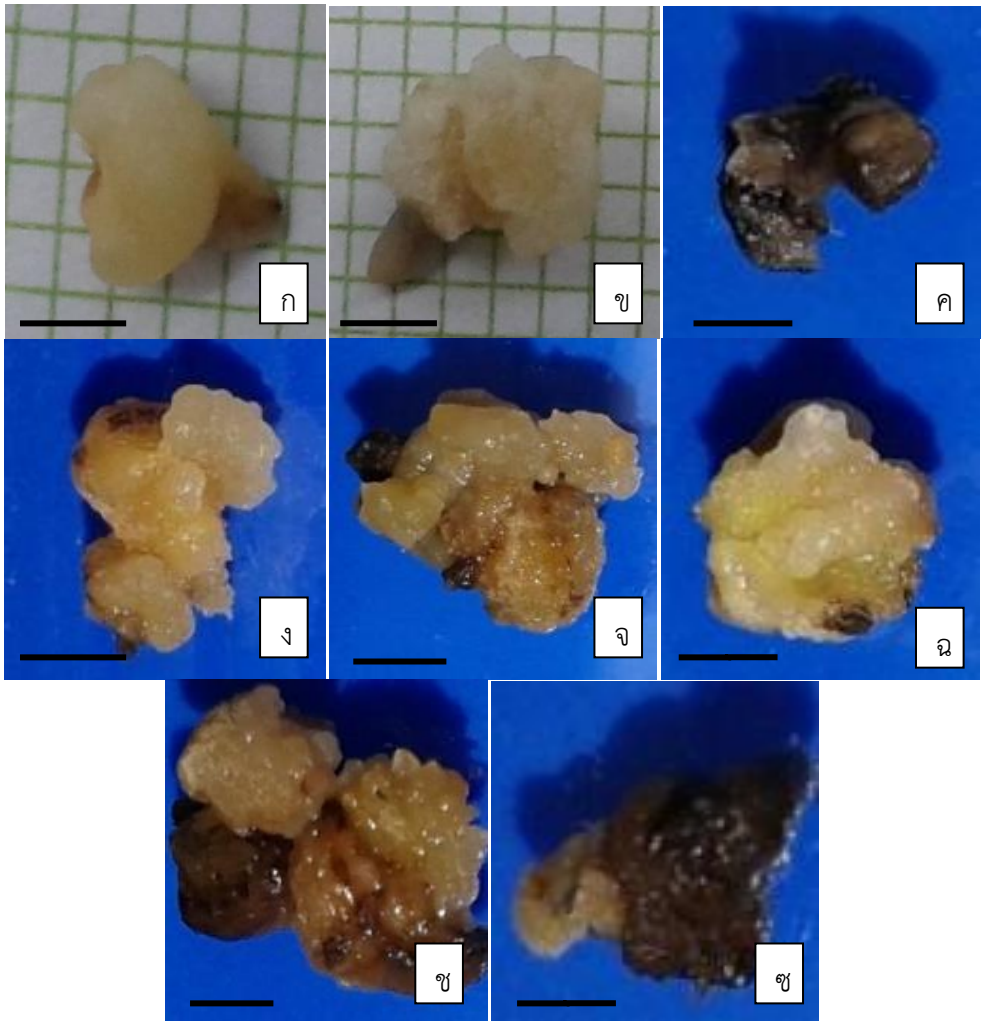
จากการทดลองเพาะเลี้ยงโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบา เข้มข้น 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบา เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 0.22 กรัม (ตารางที่ 2.1และ ภาพที่ 2.6ก) รองลงมาคือแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสได้ 0.19 กรัม (ภาพที่ 2.6ข) และไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณโนดูลาร์ แคลลัสได้น้อยที่สุด 0.13 กรัม (ภาพที่ 2.6ค)

4.ผลของ 2-iP และ 2,4-D ต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2-iP เข้มข้น 0.025 0.05 0.075 และ0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D เข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อ ลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ให้การสร้างโนดูลาร์แคลลัสสูงกว่า 2-iP (ตารางที่ 2.2) 2,4-D เข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 68.75 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความ แตกต่างทางสถิติกับ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ให้อัตราการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส 62.5 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D เข้มข้น และเมื่อลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลงเป็น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ อัตราการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส 56.25 เปอร์เซ็นต์ โนดูลาร์แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบน 2,4-D ทั้ง 3 ความเข้มข้นมีสีเหลือง (ภาพที่ 2.7จ-ช) และ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเพิ่ม ปริมาณโนดูลาร์แคลลัส 31.25 เปอร์เซ็นต์มีสีเหลืองปนน้ำตาล (ภาพที่ 2.7ซ) ในส่วนของ 2-iP เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรให้อัตราการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 25 เปอร์เซ็นต์2-iP เข้มข้น 0.05 และ 0.075 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส 18.75 เปอร์เซ็นต์ โนดู ลาร์แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม 2-iP ทั้ง 3 ความเข้มข้นมีเหลืองเข้มปนน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 2.7 ข-ง) และ 2-iP เข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสน้อยที่สุด 12.5 เปอร์เซ็นต์โนดูลาร์แคลลัสที่สร้างมีสีน้ำตาลปนดำ (ภาพที่ 2.7ก)



ภาพที่ 2.2 ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสของปาล์มน้ำมันหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (ย้ายเลี้ยงทุกเดือน)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของโนดูลาร์แคลลัสจากคัพภะอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรและสถาพวางเลี้ยงต่าง ๆ ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์= 2 มิลลิเมตร)

ก. คัพภะอ่อนที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในที่มืดเป็นเวลา 1 เดือน

ข. แคลลัสเริ่มต้นบนอาหารสูตร MS ในที่มืดเป็นเวลา 2 เดือน

ค. คัพภะอ่อนบนอาหารสูตร WPM ในที่มืดเป็นเวลา 3 เดือน

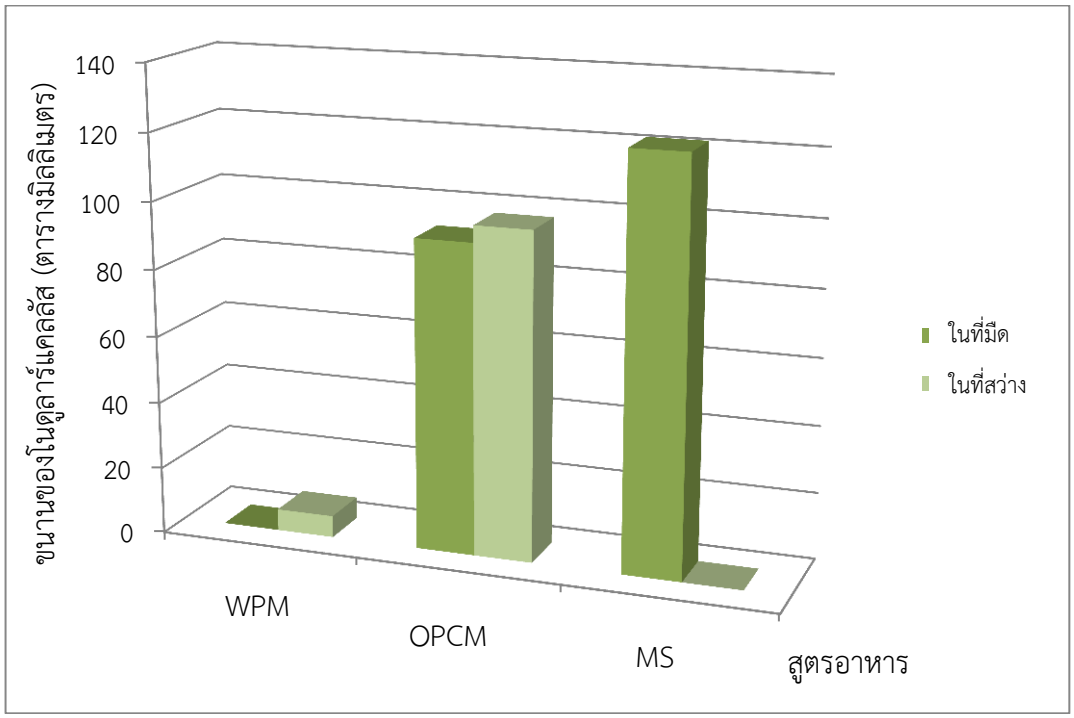
ง. โนดูลาร์แคลลัสเริ่มต้นบนอาหารสูตร WPM ในที่สว่างเป็นเวลา 3 เดือน

จ. โนดูลาร์แคลลัสเริ่มต้นบนอาหารสูตร OPCM ในที่มืดเป็นเวลา 3 เดือน

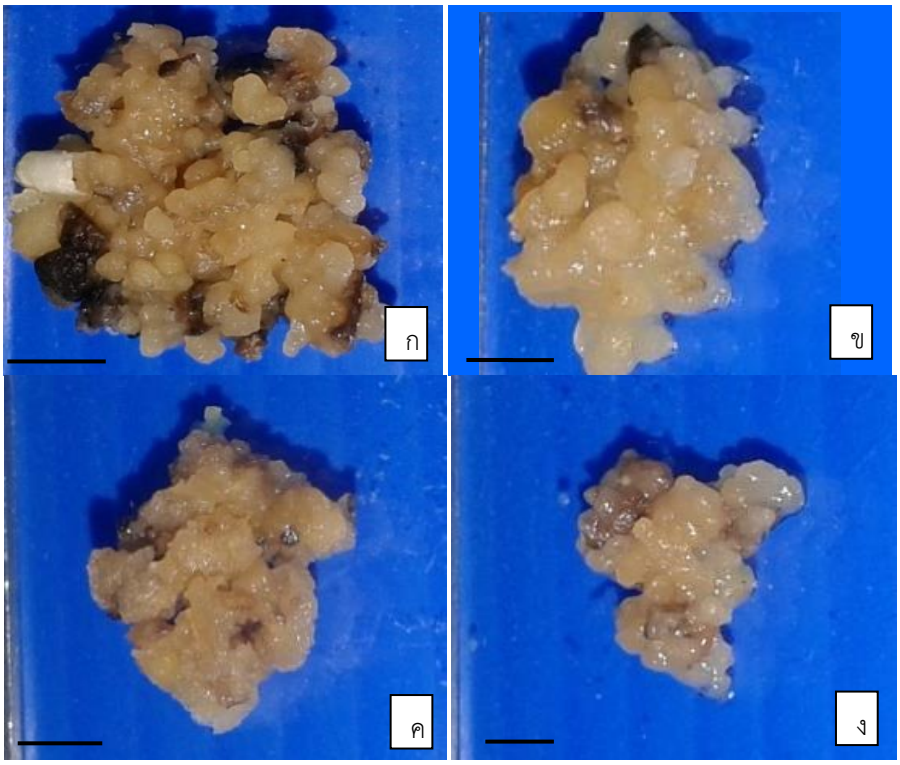
ฉ. โนดูลาร์แคลลัสเริ่มต้นบนอาหารสูตร OPCM ในที่สว่างเป็นเวลา 3 เดือน

ช. โนดูลาร์แคลลัสเริ่มต้นบนอาหารสูตร MS ในที่มืดเป็นเวลา 3 เดือน

ซ. คัพภะอ่อนเริ่มต้นบนอาหารสูตร MS ในที่สว่างเป็นเวลา 3 เดือน



ภาพที่ 2.4 ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณของโนดูลาร์แคลลัสของปาล์มน้ำมันหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 2.5 ลักษณะของโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตรต่าง ๆ ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=2 มิลลิเมตร)

ก. โนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS ในที่มืด

ข.โนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร OPCM ในที่สว่าง

ค. โนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร OPCM ในที่มืด

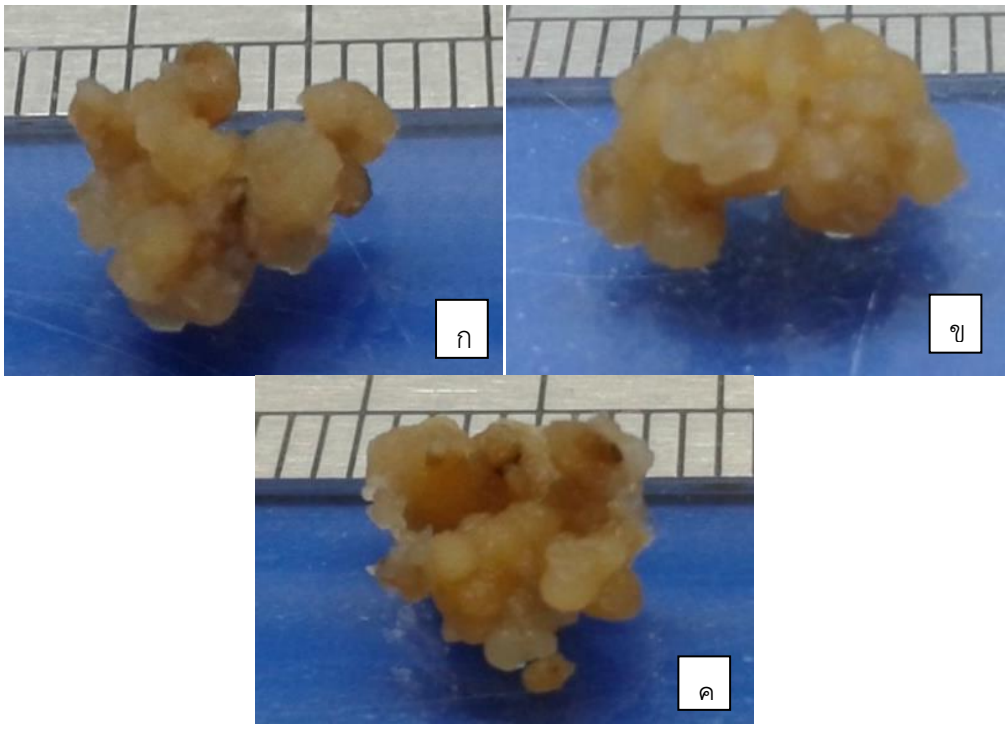
ง. โนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร WPM ในที่มืด

ตารางที่ 2.1ผลของไดแคมบาต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ไดแคมบา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส (กรัม)
0.1	0.13 [b]
0.5	0.22[a]
1.0	0.19 [a]
F-test	**
C.V. (%)	19.57

**แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P≤0.01)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.6 ปริมาณโนดูลาร์แคลลัสหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้นต่างๆ

ก. 0.1มิลลิกรัมต่อลิตร ข. 0.5มิลลิกรัมต่อลิตร

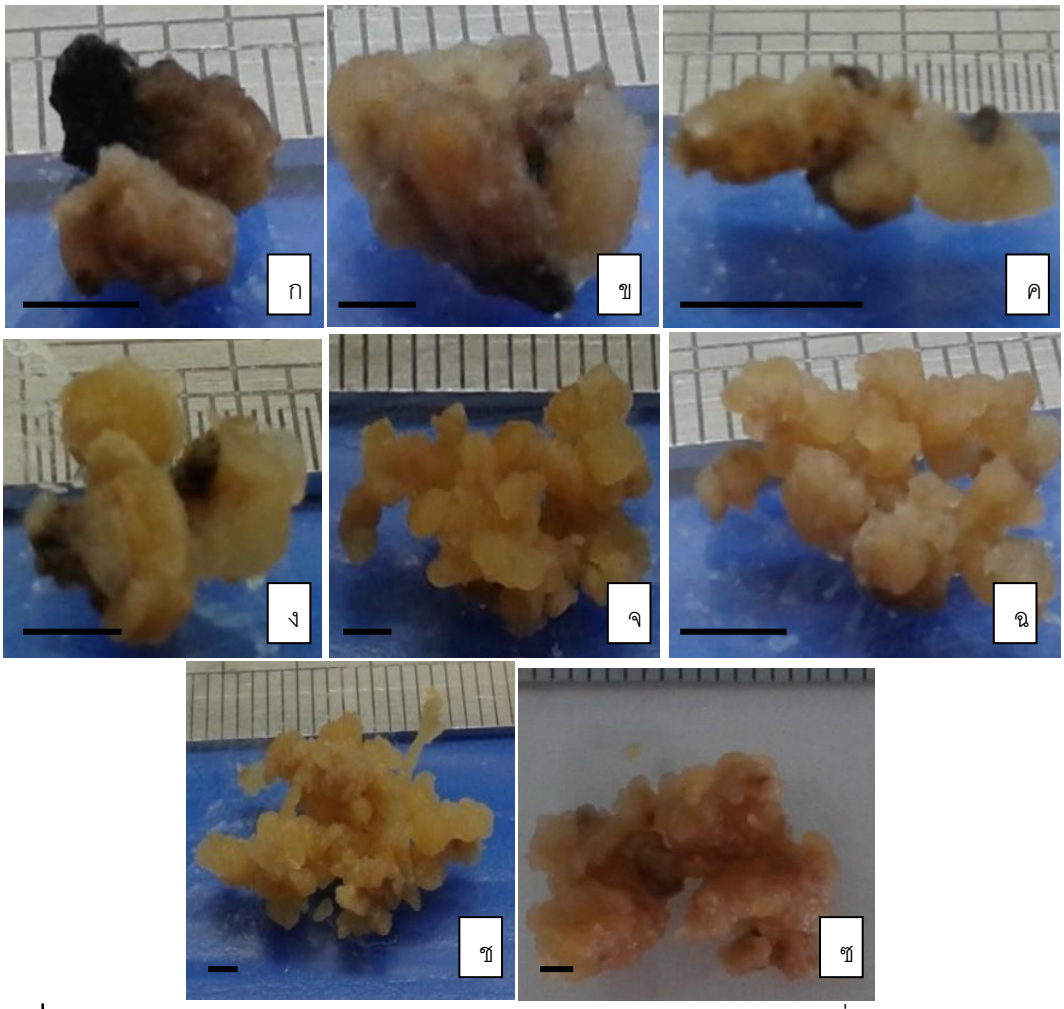
ค. 1.0มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 2.2 ผลของ 2-iP และ 2,4-D ต่ออัตราการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา1เดือน

ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อัตราการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส(%)	ลักษณะสีของโนดูลาร์แคลลัส
2-iP	0.025	12.5จ[c]	น้ำตาลปนดำ
	0.05	18.75 [c]	เหลืองเข้มปนน้ำตาลเข้ม
	0.075	18.75 [c]	เหลืองเข้มปนน้ำตาลเข้ม
	0.100	25.00 [c]	เหลืองเข้มปนน้ำตาลเข้ม
2,4-D	0.250	56.25[ab]	เหลือง
	0.500	62.50 [a]	เหลือง
	0.750	68.75[a]	เหลือง
	1.000	31.25[bc]	เหลืองปนน้ำตาล
F-test		**	
C.V.(%)		38.7	

**แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P≤0.01)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.7 ผลของ 2-iP และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่ออัตราการเพิ่มปริมาณของโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตรMS หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=2 มิลลิเมตร)

ก. 2i-P เข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อลิตร ข. 2i-P เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร
ค. 2i-P เข้มข้น 0.075 มิลลิกรัมต่อลิตร ง. 2i-P เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
จ. 2,4-D เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉ. 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ช. 2,4-D เข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ซ. 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิจารณ์ผลการทดลอง

สูตรอาหารมีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาก โดยสูตรอาหารแต่ละสูตรมีองค์ประกอบของธาตุที่แตกต่างกันออกไป ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันจากคัพภะอ่อนนั้น การเลือกใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างโนดูลาร์แคลลัสได้มากขึ้น ซึ่งสูตรอาหาร MS ที่วางเลี้ยงในที่มืดให้อัตราการสร้างโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด และสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีกว่าสูตรอาหาร OPCM และ WPM เนื่องจากสูตรอาหาร MS มีธาตุโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) และโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) ซึ่งมีความจำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สามารถรวมกับสารอื่นได้ดียิ่งขึ้น ช่วยในการควบคุมศักย์ออสโมซิส ซึ่งมีผลต่อการ แบ่งเซลล์ แมกนีเซียมซัลเฟตทำหน้าที่ช่วยเร่งหรือเพิ่มกิจกรรมของเอมไซม์ และทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์สำหรับเอนไซม์ที่มีบทบาทในการถ่ายโอนฟอสเฟส มีส่วนในการสังเคราะห์โปรตีน และการจัดแบ่งส่วนคาร์โบไฮเดรตจากแหล่งที่สร้าง และส่วนที่รับ ทำให้มีการสะสมแป้ง และน้ำตาลในตำแหน่งที่เหมาะสม แมกนีเซียมในแวคิวโอลจะเป็นไอออนบวกที่ทำหน้าที่ประกบคู่กับไอออนลบของกรดอินทรีย์ และอนินทรีย์ จึงทำให้เกิดสมดุลระหว่างไอออน (มุกดา, 2544) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับสกุลรัตน์ (2553) ที่รายงานว่าการชักนำแคลลัส และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา 16 คู่ผสม บนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าคู่ผสมที่ 7 ให้การสร้างแคลลัสสูง 33.33 เปอร์เซ็นต์ และคู่ผสมที่ 14 ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแแคลลัสสูง 18 เปอร์เซ็นต์หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน Chehmalee และTe-chato (2008) ได้เพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา โดยนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้น้ำหนักสดสูง 0.58 กรัม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือนสมปอง และคณะ (2547) รายงานการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี บนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 15 เปอร์เซ็นต์ Scherwinski และคณะ (2010) รายงานผลของการใช้ต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันที่มีความสูงขนาด 8-10 เซนติเมตร นำมาตัดรากและใบออก แล้วตัดแบ่งต้นอ่อน เป็น 3 ส่วน คือ ส่วนโคน ส่วนกลาง และส่วนปลาย เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS พบว่าส่วนโคน ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงที่สุด 41.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

ในส่วนของการวางเลี้ยงในที่มืดสามารถชักนำโนดูลาร์แคลลัสได้ดีกว่าในที่แสงโดยในธรรมชาติพืชจะใช้พลังงานแสงเปลี่ยนเป็นพลังงานเคมีมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในการสร้าง อาหารจากโมเลกุลของคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต แต่เนื่องจากในอาหารสังเคราะห์มีแหล่งของคาร์โบไฮเดรตอยู่แล้วซึ่งได้มาจากซูโครสทั้งยังมีสารออกซินที่เติมลงเพื่อส่งเสริมการแบ่งเซลล์ทำให้พืชเกิดความสมดุลระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโต แสงจึงไม่มีความจำเป็นในสังเคราะห์น้ำตาลและสารออกซิน ส่งผลให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นไปได้ดีกว่าในที่มืด สอดคล้องกับ Rajesh และคณะ (2003) รายงานผลของการชักนำแคลลัสจากผลแก่ของปาล์มน้ำมันลูกผสม วางบนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 0.045 ไมโครโมลาร์ และputrescine เข้มข้น 1

ไมโครโมลาร์ วางเลี้ยงในที่มืด ให้จำนวนการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูง 0.70 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส Balzon และคณะ (2013) ชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสจากคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมัน บนอาหารสูตร MS ร่วมกับพิคลอเข้มข้น 450 ไมโครโมลลาร์ พบว่าสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลัสสูงสุด 97.5 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 150 วัน

การจากศึกษาเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสบนอาหาร และสภาพวางเลี้ยงเดิมจากการทดลองที่ 1 แต่ลดความเข้มข้นไดแคมบาลงเป็น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการวางเลี้ยงในที่มืดบนสูตรอาหาร MS ให้ขนาดโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 122 ตารางมิลลิเมตรเนื่องการในระยะนี้พืชสามารถสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตได้เองหากมีการใช้ความเข้มข้นสูงทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายซึ่งไดแคมบาเป็นสารในกลุ่มของออกซินโดยทั่วไปจะใช้ในความเข้มข้นสูงเพื่อกำจัดวัชพืชแต่ในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันจะถูกนำมาใช้เพื่อส่งเสริมการชักนำแคลลัสในระยะเริ่มแรกและลดความเข้มข้นลงเพื่อเพิ่มปริมาณการสร้างแคลลัส สอดคล้องกับสกุลรัตน์ (2553) ซึ่งรายงานผลของคู่ผสม 16 คู่ผสม บนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำแคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา เป็นเวลา 3 เดือน และลดความเข้มข้นของไดแคมบาลงเป็น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดแคลลัสและส่งเสริมพัฒนาการของแคลลัส นอกจากนี้ ซูไฮมิน (2551) รายงานผลการเพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมัน อายุ 4 5 และ 6 วัน หลังการผสมเกสรบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำแคลลัสของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน ก็ลดความเข้มข้นของไดแคมบาลงเป็น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อตรวจสอบอัตราการพัฒนาของแคลลัสชนิดต่าง ๆ รวมทั้งเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว น้ำหนักสดและพัฒนาการของแคลลัสจากปมที่เพิ่มขึ้นต่อแคลลัสแต่อย่างไรก็ตามการจากศึกษาครั้งนี้เอ็มบริโอเจนิคที่ได้จากทุกสูตรอาหาร และสภาพวางเลี้ยงจะมีลักษณะฉ่ำน้ำไม่มีการพัฒนาเป็นระยะอื่นต่อไป ซึ่งตรงข้ามกับ สกุลรัตน์ (2553) และซูไฮมิน (2551) ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับพันธุกรรม และปัจจัยต่างๆที่ทำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลัลสไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ดังที่กล่าวมาในบทนำข้างต้น

การเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสในการทดลองที่ 2 พบว่าโนดูลาร์แคลลัสที่ได้นั้นยังไม่สามารถพัฒนาเป็นโนดูลาร์แคลลัสในลักษณะที่ต้องการและนอกจากนี้โนดูลาร์แคลลัสที่ได้มีลักษณะฉ่ำน้ำ ดังนั้นในการทดลองที่ 3 จึงศึกษาผลของไดแคมบาเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร บนอาหารสูตร MS วางเลี้ยงในที่สว่าง 14 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าไดแคมบาความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 0.22 กรัม ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มจำนวนโนดูลาร์แคลลัสได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากไดแคมบาจะช่วยส่งเสริมกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงในชั้นอิพิเดอร์มิสพาเรนไคมาและชั้นของเนื้อเยื่อเจริญมัดท่อน้ำท่ออาหาร (Te-chato *et al.,* 2003; Thawaro and Te-chato, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับ Chehmalee และTe-chato (2008) รายงานการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันได้สูงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรสมปอง และคณะ (2547) รายงานการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันสูงสุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2-iP เข้มข้น 0.025 0.050 0.075 และ 0.100 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D เข้มข้น 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อดูอัตราการตอบสนองของ พบว่าอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ให้อัตราการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสสูงกว่าอาหารที่เติม 2i-P 2,4-D เข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 68.75 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซิน 2,4-D ช่วยส่งเสริมการแบ่งเซลล์ในชั้น epidermis (Te-chato*et al*., 2003) Devi และคณะ (2014) รายงานผลของ 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และไบโอตินเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตรในสูตรอาหาร MS ว่าสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจาก Sugar Palm [*Arenga pinnata* (Wurmb) Merr.] ได้สูงสุด 73.4 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์จิระศักดิ์และคณะ (2553) รายงานผลของ 2,4-D เข้มข้น 0.012 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรบนอาหารสูตร MS พบว่าสามารถชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอออนของปาล์มน้ำมันลูกผสมได้สูงสุด 4.55 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ สกุลรัตน์ (2553) รายงานผลของคู่ผสม 10 คู่ผสม บนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.1 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรว่าคู่ผสมที่ 2 เพาะเลี้ยงบน 2,4-D เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การสร้างน้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 0.86 กรัม หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

การทดลองที่ 2

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา (*Elaeis guineensis* Jacq. *var.* Pisifera)

Factors Affecting Nodular Callus Proliferation of Oil Plam, Pisifera Type (*Elaeis guineensis* Jacq. *var.* Pisifera)

บทนำ

แคลลัสที่เกิดขึ้นในหลอดทดลองจะมีลักษณะเหมือนกันกับที่เกิดกับต้นพืชในขณะที่พืชได้รับบาดแผล แต่จะมีความแตกต่างกันทางด้านลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญเติบโต กระบวนการเมตาบอลิซึม และโครงสร้างเซลล์ ระหว่างแคลลัสที่มาจากการชักนำจากชิ้นส่วนพืชในหลอดทดลอง และแคลลัสที่มาจากการเกิดบาดแผลตามธรรมชาติ (บุญยืน, 2547) แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อพืชที่ยังไม่มีการพัฒนาไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของพืช เป็นเพียงเซลล์ที่เกาะรวมกันเป็นกลุ่ม ประกอบด้วยเซลล์พาเรงไคมา ไม่มีรูปร่างชัดเจน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ สีม่วงจากแอนโทไซยานิน และสีเหลืองจากแคโรทีนอยด์แคลลัสที่มีการเกาะกลุ่มกันแน่นเรียกว่า compact callus ส่วน friable callus เป็นกลุ่มแคลลัสที่รวมตัวกันอย่างหลวม ๆ ขึ้นอยู่กับชนิดพืช ธาตุอาหาร สภาพแวดล้อม สารควบคุมการเจริญเติบโต และแหล่งคาร์บอน การเพิ่มปริมาณแคลลัสเป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่มีความสำคัญในการขยายพันธุ์พืชในหลอดโดยผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซีสจนพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ นอกจากนี้ยังสามารถนำแคคลัสมาแยกโปรโตพลาสต์ชักนำการสร้างสารเคมีจากกระบวนการเมตาบอลิซึมซึ่งสารบางชนิดนำมาใช้ในอุตสาหกรรมและทางการแพทย์ ผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด โดยใช้สารโคลชิซิน เก็บรักษาพันธุกรรมพืช และผลิตพืชทนทานหรือต้านทาน (รังสฤษดิ์, 2540) เช่นเดียวกับแคลลัสของปาล์มน้ำมัน สำหรับปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรามีลักษณะเนื้อปาล์มชั้นนอกหนา กะลาเป็นเยื่อบาง ๆ หุ้มเมล็ดในยีนควบคุมลักษณะผลแบบนี้เป็นลักษณะด้อย (recessive, $Sh^{-}Sh^{-}$) ข้อเสียคือช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมันทำให้ผลฝ่อลีบทะลายเล็กเนื่องจากผลไม่พัฒนา ให้ผลผลิตทะลายต่ำมากไม่ใช้ปลูกเพื่อเป็นการค้าแต่จะใช้เป็นต้นสายพันธุ์พ่อเพื่อผลิตลูกผสมแบบเทเนอรา ที่เป็นพันธุ์ทางการค้า ดังนั้นในการทดลองนี้การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสจึงถือได้ว่ามีส่วนสำคัญที่จะส่งเสริมการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่โดยผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิคซีสเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ในการศึกษานี้เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสเพื่อใช้ในการชักนำเอ็มโอเจนิคแคลลัสในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา และการใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

ใช้โนลาร์แคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอราอายุ 5 เดือนหลังการผสมเกสร จากต้นปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราพันธุ์ผสมเปิดอายุ 5 ปี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) เก็บรักษาไว้ที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา

วิธีการลอง

1.ผลของผงถ่านต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส

ย้ายโนดูลาร์แคลลัสที่เก็บรักษาบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหนักเริ่มต้นในทุกการทดลอง 0.1 กรัม ต่อ 1 หลอดทดลอง เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่านเข้มข้น 1 1.5 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื่อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส วางแผนทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 หลอด

2.ผลของไดแคมบาต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส

ย้ายโนดูลาร์แคลลัสที่เก็บรักษาบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร OPCM ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200มิลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุกเดือน เป็นเวลา 2 เดือน ตรวจสอบน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส วางแผนทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

3.ผลของน้ำตาลซูโครส และ ซอร์บิทอล ต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส

ย้ายโนดูลาร์แคลลัสที่เก็บรักษาบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอลเข้มข้น 10 20 30 40 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุกเดือน เป็นเวลา 2 เดือน ตรวจสอบน้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัส วางแผนทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

ผลการทดลอง

1.ผลของผงถ่านต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส

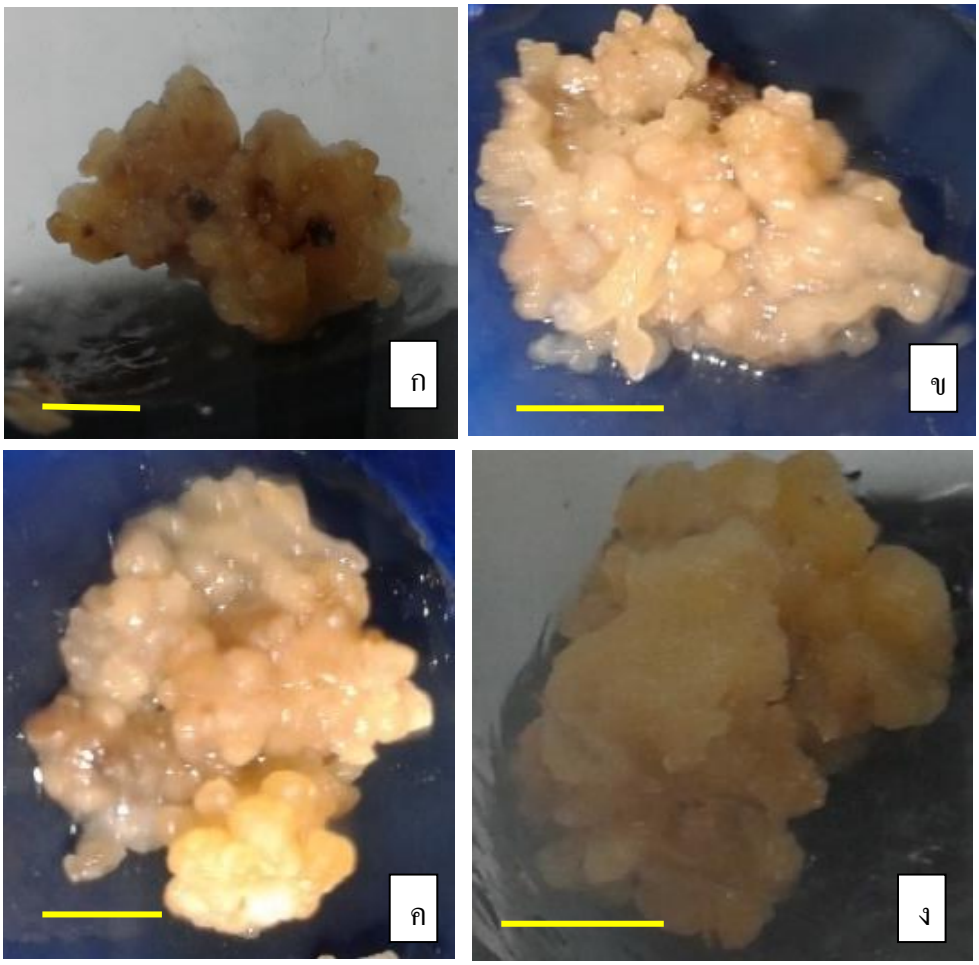
จากการทดลองเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่านเข้มข้น 1 1.5 2 และ 2.5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือนพบว่าผงถ่านความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 0.21 กรัม (ตารางที่ 2.3) รองลงมาผงถ่านเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัส 0.17 กรัมผงถ่านเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัส 0.16 กรัมและผงถ่านเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัสน้อยสุด 0.15 กรัม (ภาพที่ 2.8ก-ง) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางที่ 2.3 ผลของผงถ่านต่อการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ผงถ่าน(เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส(กรัม)
0.10	0.15 [b]
0.15	0.16 [b]
0.20	0.21 [a]
0.25	0.17 [ab]
F-test	**
C.V.(%)	28.5

**แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P≤0.01)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMR



ภาพที่ 2. 8 ผลของผงถ่านความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณของโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MSหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (บาร์=5 มิลลิเมตร)

ก. 1 กรัมต่อลิตร ข. 1.5 กรัมต่อลิตร

ค. 2 กรัมต่อลิตร ง. 2.5 กรัมต่อลิตร

2.ผลของความเข้มข้นไดแคมบาต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส

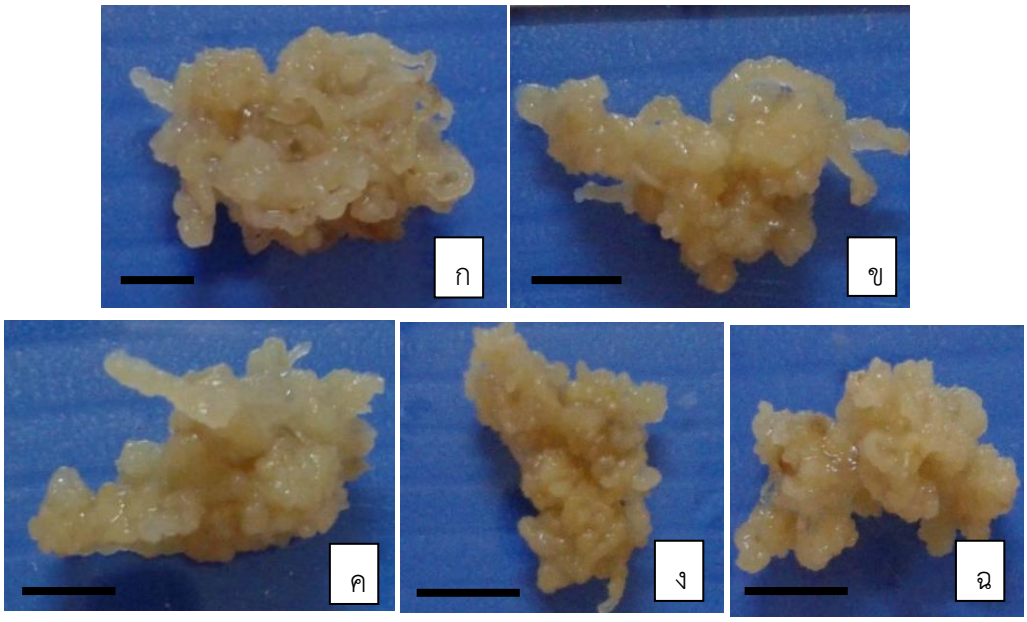
จากการทดลองปริมาณแคลลัสบนอาหารสูตร OPCM ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้มแคมบาเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนพบว่าไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถเพิ่มน้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 0.33 กรัม รองลงมาสูตรอาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มน้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัส 0.27 กรัม ไดแคมบาเข้มข้น 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มน้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัส 0.25 กรัม และไดแคมบาเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มน้ำหนักโนดูลาร์แคลลัสได้น้อยที่สุด 0.20 กรัม (ตารางที่ 2.4) นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารสูตร OPCM ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้นต่ำให้โนดูลาร์แคลลัสที่มีลักษณะยืดยาวคล้ายรากมากกว่าไดแคมบาเข้มข้นสูง (ภาพที่ 2.9ก–จ)

ตารางที่ 2.4 ผลของความเข้มข้นไดแคมบาต่อเพิ่มจำนวนโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร OPCM หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ไดแคมบา(มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส(กรัม)
0.1	0.33[a]
0.2	0.27[b]
0.3	0.26 [b]
0.4	0.25 [b]
0.5	0.20 [c]
F-test	**
C.V. (%)	22.2

**แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.9 ผลของไดแคมบาความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มปริมาณของโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตรOPCM หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (บาร์= 5 มิลลิเมตร)

ก. 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ข.0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ง. 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.ผลของน้ำตาลซูโครส และ ซอร์บิทอล ต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส

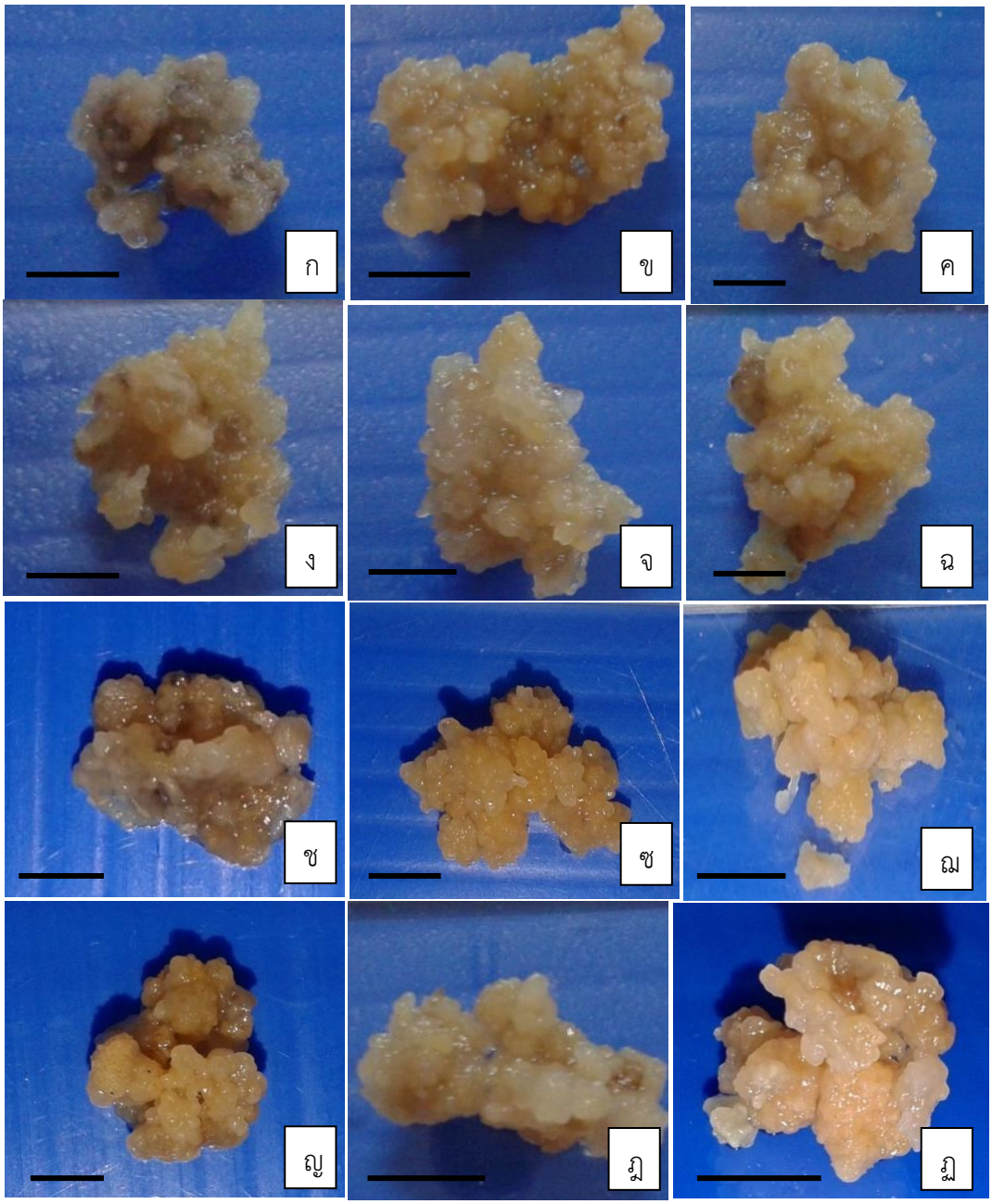
จากการทดลองเพิ่มจำนวนโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS น้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล10 20 30 40 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ไดแคมบาความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรสามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสได้สูงสุด 0.34 กรัม ไม่มีความแตกต่างทางสติถิกับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส0.33 กรัม (ตารางที่ 2.5) รองลงมาคือ น้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.29 และ 0.28 กรัม ตามลำดับ ส่วนของน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณน้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัส 0.26 0.25 และ 0.24 กรัม ตามลำดับ น้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 10 และ 50 กรัมต่อลิตรให้น้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัส 0.23 และ 0.20 กรัม ตามลำดับ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัส 0.18 กรัม และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัสน้อยที่สุด 0.16 กรัม แตกต่างทางสติถิอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ภาพที่ 2.10ก-ฏ)

ตารางที่ 2. 5 ผลของน้ำตาลซูโครส และ ซอร์บิทอล ต่อการตอบสนองของโนดูลาร์แคลลัสหลังวางเลี้ยง 2 เดือนบนอาหารสูตร MS ร่วมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลิกรัมต่อลิตร

น้ำตาล (ขนิดของน้ำตาล)	ความเข้นข้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส (กรัม)
ซูโครส	10	0.28^{abc}
	20	0.33^{ab}
	30	0.18^{fg}
	40	0.34^{a}
	50	0.26^{bcd}
	60	0.16^{g}
ซอร์บิทอล	10	0.23^{cdef}
	20	0.25^{cd}
	30	0.29^{abc}
	40	0.24^{cde}
	50	0.20^{defg}
	60	0.18^{efg}
	F-test	**
	C.V. (%)	14.5

**แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.10 ผลของน้ำตาล ซูโครสและ ซอร์บิทอล ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการตอบสนองของโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (บาร์= 5 มิลลิเมตร)

ก. ซอร์บิทอลเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ข.ซอร์บิทอลเข้นข้น 20 กรัมต่อลิตร
ค. ซอร์บิทอลเข้นข้น 30 กรัมต่อลิตร ง. ซอร์บิทอลเข้นข้น 40 กรัมต่อลิตร
จ. ซอร์บิทอลเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ฉ.ซอร์บิทอลเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร
ช. ซูโครสเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ซ. ซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร
ฌ. ซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ญ. ซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร
ฎ. ซูโครสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ฏ. ซูโครสเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองเติมผงถ่านความเข้มข้นต่างๆ ในสูตรอาหาร MS ร่วมกับไดแคมบา เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าผงถ่านความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มน้ำหนักโนดูลาร์แคลลัสได้สูงสุด 0.21 กรัม เนื่องจากผงถ่านมีคุณสมบัติในการลดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและดูดซับสารประกอบฟีนอล ผงถ่านมีความละเอียดจึงมีพื้นผิวในการดูดซับสารพิษได้มาก (สมปอง, 2539) สอดคล้องกับสมดังใจ (2554) ชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของเมล็ดข้าวบนอาหารสูตรดัดแปลง Linsmaier และ Skoog (LS: ดัดแปลง)ร่วมกับผงถ่านกัมมันตเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 60.67 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.57 มิลลิเมตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

การศึกษาผลของไดแคมบา เข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ0.5 มิลลิกรัมต่อ บนอาหารสูตร OPCM พบว่า ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 0.33 กรัม ลักษณะแคลลัสที่ได้เป็นเซลล์ที่ยืดยาวออกมาคล้ายรากเป็นลักษณะแคลลัสที่ผิดปกติ ในขณะที่ศตปพรและสมปอง (2557) ชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด 30 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถเพิ่มน้ำหนักเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด 0.33 กรัม เพ็ญติมาส (2552) รายงานการเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรได้สูงสุด 3.36 เท่า และสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวเฉลี่ยได้ 6 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง เนื่องจากสูตรอาหาร OPCM มีธาตุอาหารโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) และแมกนีเซียมซัลเฟตมีเพียงครึ่งหนึ่งของสูตรอาหาร MS ซึ่งอาจจะไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช ธาตุอาหารในกลุ่มของโพแทสเซียมเมื่ออยู่ในพืชจะเคลื่อนย้ายได้ง่ายทั้งภายนอกและในเซลล์ การเคลื่อนย้ายระยะไกลทางไซเลมและโฟลเอ็ม ทำหน้าที่ลดความต่างศักย์ออสโมซิสภายในเซลล์และเนื้อเยื่อของพืชที่ไม่ทนเค็ม ผลต่อการแบ่งเซลล์ ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในส่วนของแมกนีเซียมสามารถรวมตัวกับเอนไซม์ได้สารเชิงซ้อนไตรภาค ทั้งมีบทบาทควบคุมเอนไซม์มีขนาดและรูปทรงอันเข้ากันได้ดีที่สุดกับซับสเทรต นอกจากนี้ยังช่วยควบคุมสภาพกรดด่างในเซลล์ให้พอเหมาะอยู่เสมอพืชจึงต้องการธาตุนี้ค่อนข้างมาก (ยงยุทธ, 2543) และประกอบกับการลดความเข้มข้นของไดแคมบาลงทำให้ ธาตุอาหารและสารคุมการเจริญเติบโตไม่เพียงพอกับความต้องการของพืช แคลลัสที่ได้ไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้มีเพื่อกลุ่มเซลล์ที่ยืดยาวออกมาคล้ายกับราก ซึ่งเป็นลักษณะของแคลลัสที่ผิดปกติในการศึกษาสูตรอาหาร และไดแคมบาเข้มข้นนี้จึงไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัสของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลองนั้นน้ำตาลถือได้ว่าเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดตรซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์แสงของพืช นิยมเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จากการศึกษาผลของน้ำตาลซูโครส และ ซอร์บิทอล ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส พบว่าน้ำตาลซูโครสเพิ่มจำนวนน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสได้ดีกว่าน้ำตาลซอร์บิทอล น้ำตาล

ซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 0.34 กรัม เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ที่สามารถสลายตัวได้ง่าย เมื่อสะลายตัวแล้วจะได้เป็นน้ำตาลกลูโคส และฟรักโทส เป็นสารประกอบสำคัญในขั้นตอนไกลโคลิซิส ในกระบวนการของการหายใจ (ประดิษฐ์, 2547) เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรตสำคัญในกระบวนการหายใจของพืช เพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงานไปใช้ภายในเซลล์ มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมในการหายใจที่เข้าสู่กระบวนการไกลโคลิซีสและวัฏจักรเครบ และในที่สุดจะปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อใช้ในกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์อีกด้วย (ชวนพิศ, 2544) น้ำตาลชนิดนี้พบมากในพืชชั้นสูง เนื่องจากในธรรมชาติพืชเก็บสะสมพลังงานในรูปของน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ (สมปอง, 2539) นอกจากนี้ Paiva และ Otoni (2003) รายงานว่าน้ำตาลซูโครสให้ค่าออสโมติกโพเทนเชียลที่ต่ำกว่าน้ำตาลชนิดอื่น ๆ และมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยง ทั้งยังสามารถรักษาระดับความเป็นกรดเป็นด่างได้ใกล้เคียงกับค่าเป็นกรดและด่างก่อนและหลังนึ่งฆ่าเชื้ออาหารทั้งนี้ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่ให้เติมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับการชนิด ชิ้นส่วนและระยะของการพัฒนาของพืชด้วย ในส่วนของปาล์มน้ำมันแบพิสิเฟอรา ยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนแคลลัส

การทดลองที่ 3

ปัจจัยที่มีผลต่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากโนดูลาร์แคลลัสของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) แบบพิสิเฟอรา

Factors Affecting Embryogenic Callus Induction from Nodular Calluof Oil Plam, PisiferaType (*Elaeis guineensis* Jacq. *var.* Pisifera)

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระยะของการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้นั้น ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดพืช ธาตุอาหาร สภาพแวดล้อม สารควบคุมการเจริญเติบโต และแหล่งคาร์บอน การขยายพันธุ์พืชด้วยโซมาติกเอ็มบริโอเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่มีความสำคัญในพืชหลายๆชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีตามปกติที่ทำได้ยากในธรรมชาติ พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอมี 4 ระยะ เอ็มบริโอรูปกลม รูปหัวใจ รูปทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง (สมปอง, 2539) โซมาติกเอ็มบริโอเกิดจากบางเซลล์ของแคลลัสที่มีความพร้อม และเปลี่ยนแปลง adventive cells เซลล์พวกนี้มีไซโตพลาสซึมและ organelles หนาแน่น แบ่งตัวอย่างรวดเร็ว (รังสฤษดิ์, 2540) การชักนำการเกิด โซมาติกเอ็มบริโอเอ็มในหลอดทดลองจะทำให้พืชสามามารถพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งสามารถเพิ่มจำนวน โซมาติกเอ็มบริโอเอ็มชุดที่สองได้โดยไม่ต้องเริ่มต้นจากแคลลัส ทั้งนี้การงอกและพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ของโซมาติกเอ็มบริโออาจขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ เช่นอุณหภูมิ แสง ภาชนะเพาะเลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโตสำหรับในปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเท่านั้นไม่มีการแตกหน่อทำให้ได้จำนวนต้นที่จำกัด (Rajesh *et al.*, 2003) ไม่เพียงพอต่อความต้องการ นอกจากนี้ปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรามีข้อจำกัดหลายประการในการขยายพันธุ์แบบดั้งเดิมดังที่กล่าวมาในบทนำข้างต้น การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในหลอดทดลองจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยผลิตต้นพ่อพันธุ์ ดั้งนั้นในการศึกษานี้เพื่อศึกปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอจากแคลลัสร่นระยะเวลาในการขยายพันธุ์และเพื่อใช้ในการผลิตต้นกล้าสายพันธุ์พ่อให้เพียงพอกับความต้องการในการผลิตลูกผสมเทอเนราที่เป็นพันธุ์ทางการค้าในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

ใช้โนดูลาร์แคลลัสจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำตาลซูโครส40 กรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงในสภาพการให้ความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุกเดือนจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา

วิธีการทดลอง

1.ผลของไดแคมบาและซูโครสต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ย้ายโนดูลาร์แคลลัสที่เก็บรักษาบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น40 กรัมต่อลิตร ไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 20 30 และ 40 กรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื่อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของไดแคมบาและน้ำตาลซูโครสโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละ ทรีตเมนต์ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ๆ ละ 2 หลอด

2.ผลของ GA_3 ต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสและเอ็มบริโอเจนิค แคลลัส

ย้ายโนดูลาร์แคลลัสจากสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 เข้มข้น0 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส เปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ GA_3 โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ๆ ละ 2 หลอด

3.ผลของการสับโนดูลาร์แคลลัสต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำโนดูลาร์แคลลัสจากสูตรที่ดีที่สุดจาการทดลองที่ 2 มาสับจำนวน 0 40 50 60 และ 70 ครั้ง เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละจำนวนการสับโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ๆ ละ 2 หลอด

ผลการทดลอง

1.ผลของไดแคมบาและซูโครสต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

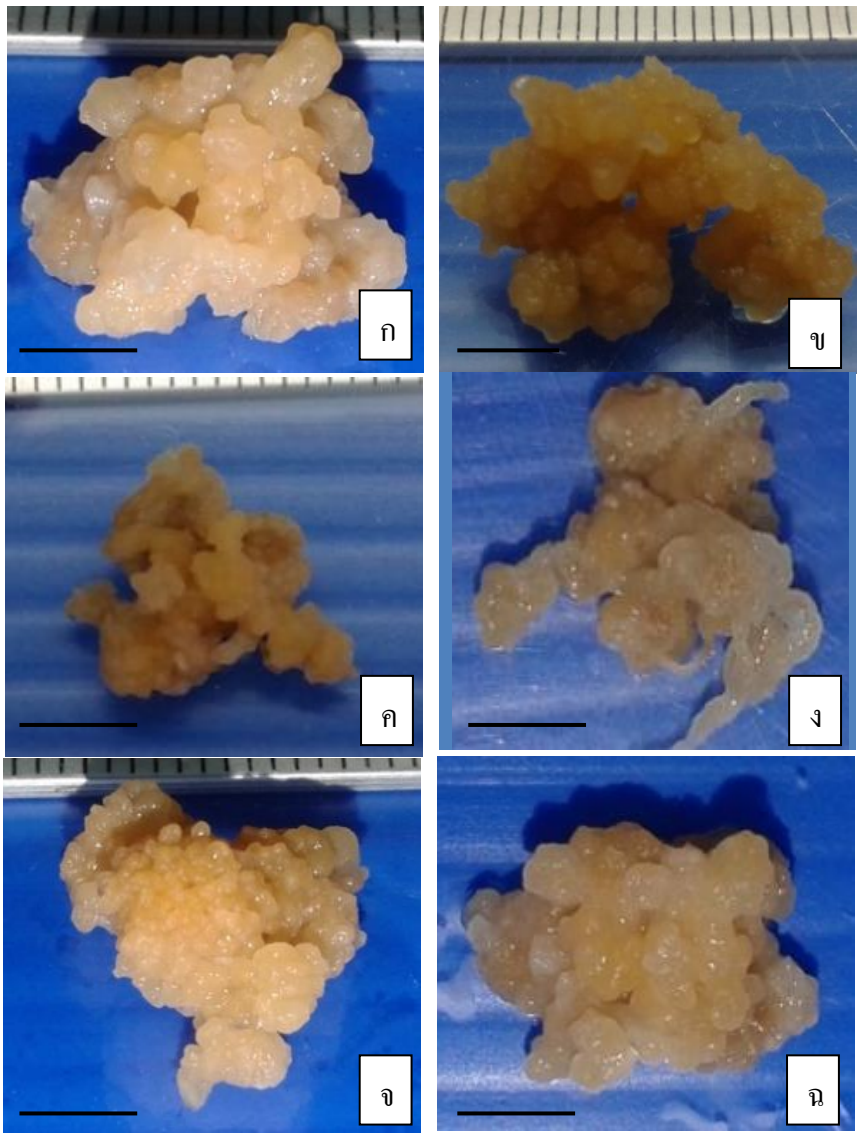
จากการทดลองเพาะเลี้ยงโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20 30 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรให้การสร้างน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 0.26 กรัมรองลงมาคือไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรให้น้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส 0.23 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับความไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรโดยให้น้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส 0.22 กรัม ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรให้น้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส 0.20 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับความไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรโดยให้การสร้างน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส 0.19 กรัมแต่ทุกความเข้มข้นของไดแคมบาและซูโครสไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ (ตารางที่ 2.6 ภาพที่ 2.11ก-ฉ)

ตารางที่ 2. 6 ผลของไดแคมบาและซูโครสต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ไดแคมบา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ซูโครส (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส (กรัม)	อัตราการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส(%)
0.1	20	0.20[b]	0
1.0	20	0.22[ab]	0
0.1	30	0.19 [b]	0
1.0	30	0.23[ab]	0
0.1	40	0.26[a]	0
1.0	40	0.20[b]	0
F-test		**	
C.V. (%)		15.80	

**แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.11 ผลของไดแคมบาและซูโครสต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน(บาร์=5 มิลลิเมตร)

ก. ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

ข. ไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

ค. ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

ง. ไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

จ. ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

ฉ. ไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

2.ผลของ GA_3 ต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส และเอ็มบริโอเจนิค

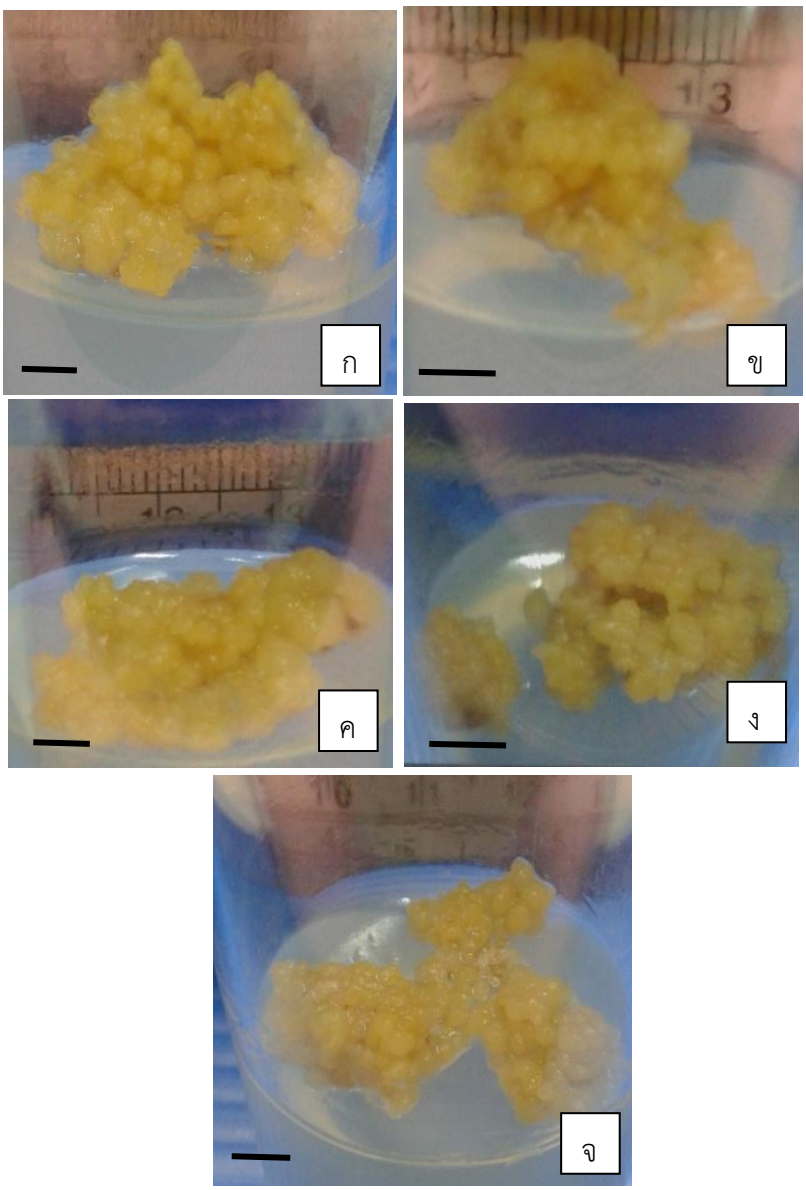
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 เข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 มิลลิกรัม พบว่าอาหารสูตร MS ไม่เติม GA_3 ให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงที่สุด 0.27 กรัม รองลงมา GA_3เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัส 0.21 กรัม ในส่วนของ GA_3 เข้มข้น 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสด 0.20 กรัม ส่วน GA_3 เข้มข้น 2 มิลลิตรกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสน้อยที่สุด 0.18 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งอย่างไรก็ตามทุกเข้มข้นของ GA_3 ไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสได้ (ตารางที่ 2.7 ภาพที่ 2.12ก-จ)

ตารางที่ 2. 7 ผลของ GA_3 ต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัส (กรัม)	อัตราการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (%)
0.0	0.27^{a}	0
0.5	0.21^{b}	0
1.0	0.20^{bc}	0
1.5	0.20^{bc}	0
2.0	0.18^{c}	0
F-test	**	
C.V. (%)	10.34	

**แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ตารางที่ 2.12 ผลของ GA_3 ต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=5 มิลลิเมตร)

ก. ชุดควบคุม

ข. GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. GA_3 เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. GA_3 เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. GA_3 เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.ผลของการสับแคลลัสต่อการปริมาณโนดูลาร์แคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

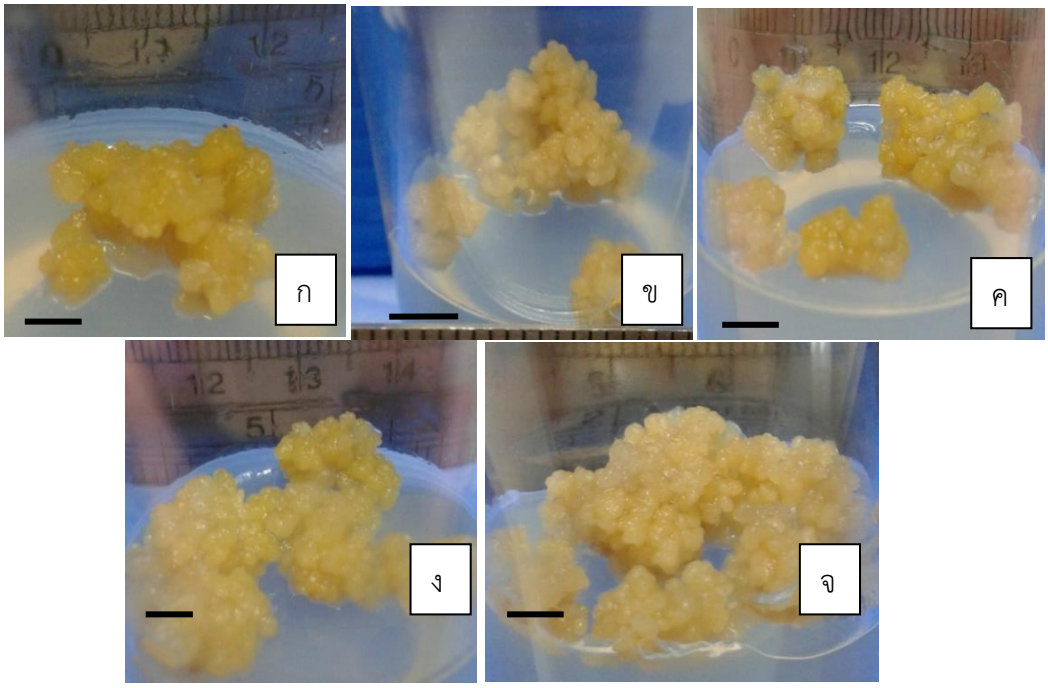
จากการศึกษาการ ไม่สับ และ สับโนดูลาร์แคลลัสจำนวน 40 50 60 และ 70 ครั้ง จากนั้นย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร พบว่าจำนวนครั้งที่สับมีผลต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส แต่ไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ แคลลัสที่ผ่านการสับจำนวน 70 ครั้งให้น้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัสได้สูงสุด 0.4 กรัม รองลงมาเป็นโนลาร์แคลลัสที่สับ 50 และ 60 ครั้ง สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสได้ 0.36 กรัมโนดูลาร์แคลลัสที่สับจำนวน 40 ครั้ง สามารถให้การเพิ่มน้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัสได้ 0.35 กรัมส่วนโนดูลาร์แคลลัสที่ไม่มีการสับ เพิ่มน้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัสได้น้อยสุด 0.34 กรัม (ตารางที่ 2.8 ภาพที่ 2.13ก-จ) อย่างไรก็ตามการสับโนดูลาร์แคลลัสไม่มีผลต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ตารางที่ 2. 8 ผลของการสับโนดูลาร์แคลลัสต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส และการพัฒนาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน

จำนวนครั้งการสับ	น้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัส (กรัม)	อัตราการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส(%)
0	0.34[ab]	0
40	0.35[ab]	0
50	0.36[ab]	0
60	0.36[ab]	0
70	0.40[a]	0
F-test	ns	
C.V. (%)	23.64	

[ns]ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.13 ผลของจำนวนครั้งในการสับโนดูลาร์แคลลัสต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ก. ชุดควบคุม
ข. สับจำนวน 40 ครั้ง
ค. สับจำนวน50 ครั้ง
ง. สับจำนวน60 ครั้ง
จ. สับจำนวน70 ครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการความเข้มข้นของไดแคมบาและซูโครส ต่อการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส และการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส พบว่าปัจจัยดังกล่าวไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ มีเพียงแต่ปริมาณโนดูลาร์แคลลัสเท่านั้นอาหารเพาะเลี้ยงเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 0.26 กรัม สอดคล้องกับ เพ็ญติมาส (2552) รายงานว่าการเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรได้สูงสุด 3.36 เท่า และสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวได้ 6 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง

จากการศึกษาผลของ GA_3 ต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส พบว่าปัจจัยดังกล่าวไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้นอกจากนี้ยังให้น้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสน้อยกว่าอาหารสูตรที่ไม่เติม GA_3 เนื่องจากในโนดูลาร์แคลลัสปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอราอาจจะมีจิบเบอเรลลินที่เพียงพอกับความต้องการ โดยทั่วไป GA_3จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช โดยทำให้เกิดการยืดยาวของเซลล์ แต่ในพืชบางชนิดอาจจะไม่ตอบสนองต่อ GA_3 ที่ได้รับจากภายนอกซึ่งอาจเป็นเพราะว่าพืชสามารถสร้าง GA_3 ได้เอง ดังนั้นการเติม GA_3 ความเข้มข้นต่าง ๆ จึงไม่มีผลต่อการพัฒนาของแคลลัส แต่ในการศึกษาระยะการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันอาสลัน (2551) รายงานว่าการใช้ GA_3เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถส่งเสริมการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 สูงสุด 35.74 เปอร์เซ็นต์ สกุลรัตน์ (2553) รายงานการใช้ GA_3 เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ให้การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 20.1 เอ็มบริโอต่อชิ้น

การสับแคลลัสก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส รังสฤษฎ์ (2540) รายงานว่าการสร้างบาดแผลเป็นการช่วยส่งเสริมฮอร์โมนพืชจากตำแหน่งอื่นย้ายมาตำแหน่งที่เกิดบาดแผล และยังเป็นการเพิ่มช่องทางให้ชิ้นส่วนพืชดูดซับน้ำและธาตุอาหารได้ดียิ่งขึ้นผ่านทางบาดแผล ซึ่งจะเป็นตัวกระตุ้นการพัฒนาส่วนต่างๆในบริเวณนี้ สอดคล้องกับ Othmani และคณะ (2009) ที่ชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของอินทผาลัมด้วยการสร้างบาดแผลด้วยใบมีดโกนแล้วเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าสามารถสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพิ่มขึ้น 3.5 เท่า เมื่อเทียบกับแคลลัสที่ไม่สร้างบาดแผล และยังสามารถชักนำการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุดเฉลี่ย 51 เอ็มบริโอ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 55 วัน นอกจากนี้ชญาณีย์ (2557) ศึกษาการสับชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันเป็นชิ้นเล็กๆแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าสามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอใหม่ได้สูงสุด 2.35 เอ็มบริโอต่อหลอดและยังมีการสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้นหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ กาญจนี (2553) รายงานการสร้างบาดแผลให้กับโนดูลาแคลลัสของปาลม์น้ำมันโดยใช้ใบมีด ว่าการสร้างบาดแผลสามารถชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้มากกว่าที่ไม่มีการสร้างบาดแผล ซึ่งตรงกันข้ามกับการทดลองในครั้งนี้ ไม่สามารถชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ได้มีเพียงแต่การเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 0.4 กรัม ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้จึงยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก ไม่เหมือนกับในสายพันธุ์ลูกผสมเทเนอราซูไฮมิน (2551) สกุลรัตน์ (2553) Silva และคณะ (2012) Balzon และคณะ (2013) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนเป็นต้นสำเร็จในหลอดทดลอง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางสายพันธุ์ Eshraghi และคณะ (2005) รายงานว่า พันธุ์ที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอของอินทผาลัม โดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอดของอินทผาลัมต้นโต อายุ 3-4 ปี 2 พันธุ์ คือ Khanizi และ Mordarsing เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 453 ไมโครโมลาร์2-iP ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ และ IBA ความเข้มข้น 13 ไมโครโมลาร์ พบว่าพันธุ์ Khanizi สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะรูปกลม หัวใจ ทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง ในขณะที่สายพันธุ์ Mordarsing ส่วนใหญ่ให้การสร้างแคลลัสในส่วนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการสร้างแต่น้อยเมื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะเอ็มบริโอรูปกลมแล้วไม่มีการพัฒนาต่อไป ทั้งนี้ทุกการทดลองในครั้งนี้ไม่ค่อยประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องมาจากปัจจัยที่ควบคุมปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอราเองที่มียีนควบคุมลักษณะผลเป็นลักษณะด้อย (Sh¯Sh¯) ผลไม่มีกะลา หรือมีกะลาบางมีข้อเสียคือช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมันทำให้ผลฝ่อลีบทะลายเล็กเนื่องจากผลไม่พัฒนา ร่วมทั้ง คัพภะอ่อนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีจำนวนจำกัดทำให้เป็นอุปสรรคในการทดลอง นอกจากนี้ช่วงเวลาในการเก็บทะลายปาล์มอาจจะยังไม่เหมาะสมทำให้การสะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตในคัพภะอ่อนและไดแคมบาที่เติมลงยังไม่เกิดความสมดุลจนทำให้การเกิดโนดูลาร์แคลลัสยังไปได้น้อย และปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำการทดลองในครั้งนี้ยังไม่เหมาะสมสำหรับการชักนำโนดูลาร์แคลลัสรวมทั้งการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ในหลอดทดลอง

บทที่ 3

สรุปผลการทดลอง

สรุปการทดลอง

การเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และ กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลิกรัมต่อลิตรในที่มืดให้การสร้างโนดูลาร์แคลลัสสูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน สำหรับการเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส อาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลิกรัมต่อลิตรในที่มืดให้ขนาดแคลลัสสูงสุด 122 ตารางมิลลิเมตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และจากการทดลองเพิ่มปริมาณโนดูลาร์แคลลัส และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยการหั่นแคลลัส 70 ครั้ง เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัสได้สูงสุด 0.4 กรัมหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน แต่ไม่สามารถเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนี ทองเทพ. 2553. ปัจจัยทางกายภาพและเคมีต่อการเจริญและพัฒนาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์, ศิริชัย อุ่นศรีส่ง, ประสาทพร กออวยชัย, และปณิดา กันถาด. 2555. รายงานผลการวิจัยเรื่องการศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซีสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ. ชุมพร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ชวนพิศ แดงสวัสดิ์. 2544. สรีรวิทยาของพืช. กรุงเทพฯ: พัฒนาศึกษา. ภาควิชาชีววิทยา สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์.

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

ซูไฮมิน เจ๊ะมาลี. 2551. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราจากการเพาะเลี้ยงคัพภะ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

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

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2547. เทคโนโลยีเบื้องต้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช. ขอนแก่น. ชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ประดิษฐ์ มีสุข. 2547. ชีวเคมีเบื้องต้น (เคมีชีวิต). กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และอารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2551. บทปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ: บริษัท เอเจนเทค จำกัด.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2523. ปาล์มน้ำมัน.สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พวงเพชร อึ้งวิศิษฎ์วงศ์. 2558. ปาล์มน้ำมันความหวังใหม่ของเกษตรภาคใต้. สงขลา: ธนาคารแห่งประเทศไทยสำนักงานภาคใต้.

เพ็ญติมาส กระมุท. 2552. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสเซลล์ซัสเพนชั่นและการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มุกดา สุขสวัสดิ์. 2544. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

เยาวลักษณ์ จิตรภักดี. 2527. การเจริญเติบโตของพืชดอก. สงขลา: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ยงยุทธ โอสถสภา. 2543. ธาตุอาหารพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

ศูนย์พัฒนานิคมสร้างตนเองภาคใต้. 2534. ผลผลิตปาล์มน้ำมันสมาชิกนิคมสตูล.สตูล: ศูนย์พัฒนานิคมสร้างตนเองภาคใต้.

ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันจังหวัดสุราษฎร์ธานี. 2558.วิชาการปาล์มน้ำมัน. [Online].Available: http://www.doa.go.th/palm/linkTechnical/usefulness.html. (เข้าถึงเมื่อวันที่ 31/7/2558).

ศตปพร เกิดสุวรรณ และสมปองเตชะโต. 2557. ผลของไดแคมบาต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาเป็นต้นของปาล์มน้ำมัน.วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1(1): 2-9.

สรัชพงศ์ สิทธิชัย. 2556. ความหวังของปาล์มน้ำมันไทยจากโอกาสของไบโอดีเซล. สงขลา: ธนาคารแห่งประเทศไทยสำนักงานภาคใต้.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์ และสมปอง เตชะโต. 2553. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตน้ำตาลและผงวุ้นต่อการสร้างโพรโตคอร์มของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร. ว. สงขลานครินทร์. วทท 29: 647-654.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์. 2553. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมดังใจ สายสิงห์ทอง. 2554. อิทธิพลของผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ต่อการเกิดแคลลัสและการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิสเพื่อผลิตเมล็ดสังเคราะห์ของข้าว. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) พืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

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

สมปอง เตชะโต, อาสสัน หิเล และ อิบรอเฮม ยีดำ. 2547. การชักนำเอ็มบริโอเจนนิแคลลัสและพืชต้นใหม่จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี. ว. สงขลานครินทร์วทท29: 617-628.

สำนักงานเกษตรจังหวัดกระบี่. 2555. แหล่งเกษตรอุตสาหกรรมและพลังงานที่ยั่งยืน. กระบี่: สำนักงานเกษตรจังหวัด.

อาสลัน หิเล. 2551. การเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อุตสาหกรรมน้ำมันพืช. 2555. อุตสาหกรรมน้ำมันพืช. [Online]. Available: http://dit-km.myreadyweb.com/article/topic-41914.html. (เข้าถึงเมื่อวันที่ 31/7/2558).

Balzon., T. A., Luis, Z. G. and Scherwinski, P. J. E. 2013. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *In Vitro* Cellular and Developmenta Biology–Plant 49: 41–50.

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

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.

Devi, M. G., Purwito, A. and Husni, A. 2014.Globular embryo induction of sugar palm (*Arenga innata* (Wurmb) Merr.*)*. International Journal of Bioscience, biochemistry and bioinformatics., Vol. 4:60-66.

Eshraghi, P., Reza, Z. and Mitra, M. 2005. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. African Journol of Biotechnology 4: 1309-1312.

Hasbullah, N. A., Saleh. A., and Taha, R. M. 2011. Establishment of somatic embryogenesis from *Gerbera jamesonii* Bolus EX. Hook F. through suspension culture. African Journal of Biotechnology 10: 13762-13768.

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.

Khairun, N. and Te-Chato, S. 2012. *In vitro* flowering and fruit setting of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. Journal of Agricultural Technology 8: 1079-1088.

Kong, D. M., Preece, J. E. and Shen, H. L. 2012.Somatic embryogenesis in immature cotyledons of Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 108: 485–492.

Maureen, M., Fitch, M. and Manshardt, R. M. 1990.Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya*L.). Plant Cell Reports 9: 320-324.

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.

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

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

Raju, C. S., Kathiravan, K., Aslam, A. and Shajahan, A. 2013. An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 112: 387–393.

Raju, C. S., Aslam, A., Kathiravan, K. Palani, P. and Shajahan A. 2014. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf sheath explants of mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology–Plant 50: 752–759.

Ren, J. P., Wang, X. and Yin, J. 2010.Dicamba and sugar effects on callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of wheat. Agricultural Sciences in China 9: 31-37.

Scherwinski, P. J. E., 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 Plant 46: 378–385.

Silva, R. C., Luis, Z. G., Scherwinski, J. E. and Received, P. 2012. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 111: 59–67.

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

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

Te-chato, S. 2002. Improved callus induction and embryogenic callus formation from cultured young leaves of oil palm seedling. Thai Journal Agricultural Science 35: 407-413.

Te-chato, S., Hilae, A.and Yeedum, I. 2003.Histological study on oil palm of somatic embryos development at affected by sources of leaf explants and auxin. Journal of Agricultural Science 36: 243-250.

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

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

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

Thawaro, S. and Te-chato, S. (2007). Auxins as effect type of callus formation from maturezygotic embryo culture of hybrid oil palms. International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development, Bangkok, Thailand. 26-27 April 2007.

Wilsom, D. P. M., Sullivan, J. A., Marsolais, A. A., Tsujita, M. J. and Senaratna, T. 1996. Improvement of somatic embryogenesis in *Zonal geranium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 27-32.

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

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ตารางที่ 1องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
ธาตุอาหารหลัก	**MS**	**WPM**	**OPCM**
NH_4NO_3	1,650.000	400.000	1025.000
KNO_3	1,900.000	-	800.000
KH_2PO_4	170.000	170.000	170.000
$CaCl_2.2H_2O$	440.000	96.000	440.000
$Ca(No_3)_24H_2O$	-	556.000	278.000
$MgSO_4.7H_2O$	370.000	-	370.000
ธาตุอาหารรอง		**-**	
KI	0.830	-	00.415
H_3BO_3	6.200	6.200	6.200
$MnSO_4.1H_2O$	16.900	16.900	16.900
$ZnSO_4.7H_2O$	10.600	8.600	9.600
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	6.25	3.138
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250	0.250	0.250
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	-	0.0125
$FeSO_4.7H_2O$	27.800	27.800	27.800
Na_2EDTA	37.300	37.300	37.300
K_2SO_4	-	990.000	495.000
สารอินทรีย์			
Myo-inositol	100.000	100.00	100.000
Nicotinic acid	0.500	0.500	0.500
Pyridoxine HCl	0.500	0.500	0.500
ThaiamineHCl	0.100	0.100	0.100
Glycine	2.000	2.000	2.000
Sucrose (g)	30.000	30.000	30.000
Agar (g)	7.500	7.500	7.500
pH	5.7	5.7	5.7

ผลงานตีพิมพ์

ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากคัพภอ่อน ของปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera)

Effects of Culture Media and Conditions on Embryogenic Callus Induction from Immature Zygotic Embryo of Oil Palm Pisifera (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera)

วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 (เมษายน-มิถุนายน): 41-45, 2558
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 2, No.2 (April-June): 41-45, 2015

Research article

ผลของสูตรอาหารและสภาพวางเลี้ยงต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera)

Effects of Culture Media and Conditions on Embryogenic Callus Induction from Immature Zygotic Embryo of Oil Palm Pisifera (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera)

ธิดารัตน์ ทองแผ่ [1] ทัศนี ขาวเนียม [1] และ สมปอง เตชะโต [1*]
Thongpae, T.[1], Khawniam, T.[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, Thailand, 90112

*Corresponding author: stechato@yahoo.com
Received 12 February 2015; Revised 27 February 2015; Accepted 7 March 2015

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสูตรอาหาร และสภาพวางเลี้ยงต่อกระบวนการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา ที่ได้จากการผสมเปิดอายุ 5 ปี ที่สถานีวิจัยและฝึกภาคสนามคลองหอยโข่ง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมี 3 สูตรคือ MS สูตรเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมัน (oil palm culture medium: OPCM) และ WPM อาหารทุกสูตรเติมไดแคมบา เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่สว่าง 14 ชั่วโมงต่อวัน จากการศึกษาพบว่า อาหารสูตร MS ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน ในที่มืด ส่วนการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในอาหารสูตรเติมเติมไดแคมบา เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดให้ขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 122 ตารางมิลลิเมตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีประโยชน์ในการขยายพันธุ์ รวมไปถึงใช้ในการปรับปรุงแบบปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราในอนาคต
คำสำคัญ: ปาล์มน้ำมัน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส คัพภะอ่อน

Abstract

Effects of culture media and conditions on embryogenic callus induction from immature zygotic embryo of oil plam, Pisifera type (five years old plant maintained at Khong Hoi Khong Research Station and Field Training, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, AmphurKhong Hoi Khong, Songkhla Province) were examined. The embryos were cultured on three different culture media; MS, OPCM and WPM. All culture media were supplemented with 2.5 mg/L dicamba and maintained under darkness and light condition. The results revealed that MS medium in combination with maintaining under darkness gave the highest embryogenic callus induction (50%) after culturing for 90 days. MS medium supplemented with 1 mg/l dicamba maintained under darkness gave the biggest size of embryogenic callus at 122 mm^2 after culturing for 30 days. The results obtained from this study are very useful for propagation and improvement of oil palm, Pisifera, in the future.
Keywords: Oil palm, embryogenic callus, immature zygotic embryo

บทนำ

น้ำมันเป็นพลังงานชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต นอกจากการใช้ในชีวิตประจำวันแล้วยังมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจ ในขณะเดียวกันความต้องการน้ำมันก็ขยายตัวสูงขึ้นทำให้ในแต่ละประเทศมีการตื่นตัวและพยายามที่จะหาพลังงานทดแทน จากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียนก็คือพืชน้ำมัน (สรัชพงศ์, 2556) โดยปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจเพียงชนิดเดียวในโลกที่ให้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่

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.

สูงสุดเมื่อเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น ปาล์มน้ำมันจัดอยู่ในสกุล *Elaeis* สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ *E. guineensis E. oleifera* และ *E. odora* แต่ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ คือ *E. guineensis* ปาล์มน้ำมันชนิดนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ แบบดูรา แบบพิสิเฟอรา และแบบเทเนอรา โดยแบบที่นิยมปลูกเป็นการค้า คือ แบบเทเนอราเป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์แม่ คือ ดูรา กับสายพันธุ์พ่อ คือ พิสิเฟอรา (ธีระ, 2554) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในหลายประเทศบริเวณชายฝั่งตะวันตกของทวีปแอฟริกา ตอนกลาง เป็นพืชในเขตร้อนชื้น (ธีระ, 2554) และได้มีการแพร่ขยายพันธุ์ไปยังทวีปยุโรป อเมริกาและเอเชีย (ศูนย์พัฒนานิคมสร้างตนเองภาคใต้, 2534) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่นเดียวกับ มะพร้าว ตาล จาก และระกำ (พรชัย, 2523) โดยทั่วไปปาล์มน้ำมันใช้เมล็ดในการขยายพันธุ์ทำให้พันธุกรรมของชั่วรุ่นลูกที่ได้มีความไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชที่มีการผสมพันธุ์แบบผสมข้ามต้น จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ศักยภาพในการให้ผลผลิตของต้นปาล์มแตกต่างกันในแต่ละต้น การผสมข้ามต้นพ่อต้นแม่ปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการผสมพันธุ์หากใช้ต้นพ่อต้นแม่พันธุ์ที่ไม่ได้มีความเป็นสายพันธุ์แท้ที่มากพอ ลูกที่เกิดจากการผสมจะไม่มีความสม่ำเสมอ แม้จะอยู่ในการควบคุมการผสมพันธุ์ระหว่างต้นแม่ดูรากับต้นพ่อพิสิเฟอราก็ตาม (ธีระ, 2554) และหนึ่งเมล็ดให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันเพียงหนึ่งต้น แต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเพิ่มปริมาณต้นกล้าจำนวนมาก และต้นใหม่ที่ได้จะมีลักษณะเหมือนต้นเดิมทุกประการ เนื่องจากปาล์มน้ำเป็นพืชผสมข้ามการใช้ต้นพ่อแม่พันธุ์ที่ได้จากการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองจะช่วยทำให้ลดอัตราการแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ ในส่วนของต้นพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา ยีนควบคุมลักษณะผลเป็นลักษณะด้อย (recessive, Sh˙Sh˙) ลักษณะผลไม่มีกะลาหรือมีกะลาบางมีข้อเสียคือช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมันทำให้ผลฝ่อลีบทะลายเล็กเนื่องจากผลไม่พัฒนา ให้ผลผลิตทะลายต่ำมากไม่ใช้ปลูกเพื่อเป็นการค้าแต่จะใช้ในการเป็นต้นสายพันธุ์พ่อเพื่อผลิตลูกผสมเทเนอราที่เป็นพันธุ์ทางการค้า (สำนักงานเกษตรจังหวัดกระบี่, 2555) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา ระยะของการเกิดเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนของพืชจนกระทั่งเกิดเป็นพืชต้นใหม่จะประสบความสำเร็จได้นั้นสูตรอาหาร ชิ้นส่วนปาล์มน้ำมัน สภาพการวางเลี้ยง มีความสำคัญมาก นอกจากนี้ยังมีสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ที่ส่งเสริมให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จมากขึ้น ในส่วนของ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เนื่องจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ ดังนั้นในระยะนี้หากมีการใช้สูตรอาหาร ชิ้นส่วนปาล์มน้ำมัน และวางเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสม ก็จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ และในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นดังนั้นการศึกษานี้จะมีประโยชน์ในการขยายพันธุ์ รวมไปถึงการปรับปรุงแบบปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

ใช้ศักภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอราอายุ 5 เดือนหลังการผสมเกสรจากต้นปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราพันธุ์สุมเปิดอายุ 5 ปี ที่สถานีวิจัยและฝึกภาคสนามคลองหอยโข่งคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา แยกผลปาล์มออกจากทะลาย คัดผลปาล์มน้ำมันขนาดประมาณ 2×3.5×2 เซนติเมตร (Fig. 1A) นำผลปาล์มทั้งหมดจุ่มแช่น้ำเป็นเวลา 150 นาที แล้วล้างด้วยทีโพล และปล่อยน้ำไหลผ่านเป็น 20 นาที หลังจากนั้นใช้กรรไกรตัดเส้นใยออก ตัดเอาส่วนที่ห่อหุ้มศักภะอยู่เป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาด 5×5 ×5 มิลลิเมตร (Fig. 1B) นำชิ้นส่วนที่ได้จุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ พร้อมแขย่าเป็นเวลา 30 วินาที ฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยคลอร็อกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน-20 1-2 หยดต่อสารฟอกฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นใช้ปากคีบและมีดผ่าตัด ตัดแยกนำส่วนที่เป็นศักภะออก (Fig. 1C) แล้วนำไปวางเลี้ยงเพื่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์

1. การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากศักภะอ่อน

นำชิ้นส่วนของศักภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา อายุ 5 เดือน หลังการผสมเกสร เพาะเลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร คือสูตร MS OPCM และ WPM เติมไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลิกรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงในที่มืดหรือที่สว่าง 14 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากศักภะอ่อนวางแผนทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 2 ซ้ำๆ ละ 2 หลอด

2. การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการทดลองแรกเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS OPCM และ WPM เติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลิกรัมต่อลิตร สูตรอาหารทั้ง 3 สูตรปรับความเป็นกรด - ด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางเลี้ยงในที่มืด และที่สว่าง14 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบขนาดการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางแผนทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละ ทรีตเมนต์ทำการทดลอง 2 ซ้ำๆ ละ 2 หลอด

ผลการทดลอง

1. ผลของสูตรอาหารต่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากศักภะอ่อน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงศักภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอราบนสูตรอาหาร MS OPCM และ WPM เติมไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในที่มืดหรือที่สว่างเป็นเวลา 90 วัน เพื่อชักนำ

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส พบว่า การเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ในที่มืดให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์ (Fig.1D–F) รองลงมาสูตรอาหาร OPCM วางเลี้ยงในที่สว่าง ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 28.57 เปอร์เซ็นต์ และวางเลี้ยงในที่มืดให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 25 เปอร์เซ็นต์ในส่วนของสูตรอาหาร WPM วางเลี้ยงในที่สว่างให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่ำสุด 20 เปอร์เซ็นต์นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนสูตรอาหาร WPM ที่วางเลี้ยงในที่มืด และบนสูตรอาหาร MS ที่วางเลี้ยงในที่สว่าง (Table1)

จากการย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการทดลองแรกเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS OPCM และ WPM เติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อพบว่าสูตรอาหาร MS วางเลี้ยงในที่มืดให้ขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 122 ตารางมิลลิเมตร (Fig. 1G) รองลงมาสูตรอาหาร OPCM วางเลี้ยงในที่สว่าง ให้ขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 97.5 ตารางมิลลิเมตร และการวางเลี้ยงในที่มืดให้ขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 82.5 ตารางมิลลิเมตรในส่วนของสูตรอาหาร WPM วางเลี้ยงในที่สว่างให้ขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่ำสุด 6.5 ตารางมิลลิเมตรหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (Fig. 2)

2. การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

Table 1 Effects of culture media and conditions on embryogenic callus induction fromimmature zygotic embryos after 90 days of culture (Subculture was carried out every month).

Culture media	Embryogenic callus induction (%)	
	Darkness	Light
WPM	0	20.00
OPCM	25.00	28.57
MS	50.00	0

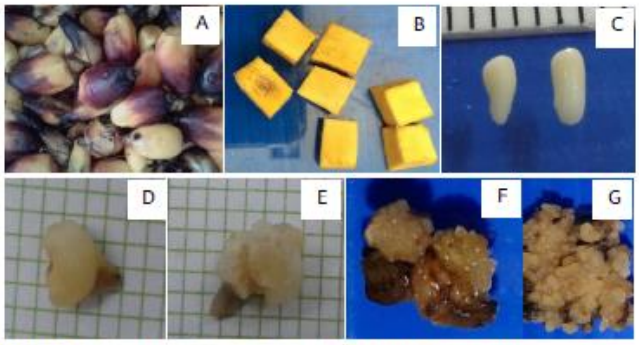


Fig. 1 Preparation and developmental stages of immature zygotic embryos of oil palm, Pisifera type at 5monthsafter pollination.
A = Immature fruits of oil palm, Pisifera type from bunch (bar = 2 cm).
B = Immature seeds after removed the mesocarp at 5 x 5 x 5 mm^3 (bar = 5 mm).
C = Zygotic embryos from immature seeds.
D = Swelling of zygotic embryos after cultured on 2.5 mg/l dicamba and maintain under darkness for 30 days.
E = Start of formation and progression of the primary calli after cultured on 2.5 mg/l dicamba and maintain under darkness 60 days.
F = Embryogenic callus after cultured on 2.5 mg/l dicambaand maintain under darkness for 90 days (bar = 3 mm).
G = Embryogenic callus after cultured on 1 mg/l dicamba and maintain under darkness for 12o days (bar = 3 mm).

วิจารณ์ผลการทดลอง

สูตรอาหาร มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากโดยสูตรอาหารแต่ละสูตรมีองค์ประกอบของธาตุที่แตกต่างกันออกไป ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำจากคัพภะอ่อนการเลือกใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้มากขึ้น ซึ่งสูตรอาหาร MS ที่วางเลี้ยงในที่มืดให้เปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด และสามารถเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าสูตรอาหาร OPMC และ WPM เนื่องจากสูตรอาหาร MS มีธาตุไพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) และไพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) ซึ่งมีความจำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สามารถรวมกับสารอื่นได้ดียิ่งขึ้น ช่วยในการควบคุมศักย์ออสโมซิสซึ่งมี

ผลต่อการแบ่งเซลล์ แมกนีเซียมซัลเฟตทำหน้าที่ช่วยเร่งหรือเพิ่มฤทธิ์ของเอมไซม์ และทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์สำหรับเอนไซม์ที่มีบทบาทในการถ่ายโอนฟอสเฟส มีส่วนในการสังเคราะห์โปรตีน และการจัดแบ่งส่วนคาร์โบไฮเดรตจากแหล่งที่สร้างและส่วนที่รับ ทำให้มีการสะสมแป้งและน้ำตาลในตำแหน่งที่เหมาะสม แมกนีเซียมในแวคิวโอลจะเป็นไอออนบวกที่ทำหน้าที่ประกบคู่กับไอออนลบของกรดอินทรีย์และอนินทรีย์ จึงทำให้เกิดสมดุลระหว่างไอออน (มุกดา, 2544) ซึ่งสอดคล้องกับสกุลรัตน์ (2553) รายงาน การชักนำแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา 16 คู่ผสม วางเลี้ยงบนอาหารสูตรสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า คู่ผสมที่ 7 ให้การสร้างแคลลัสสูง 33.33 เปอร์เซ็นต์ และคู่ผสมที่ 14 ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูง 18 เปอร์เซ็นต์ หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน Chehmalee และ Te-chato (2008) ได้เพิ่มจำนวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา โดยนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดสูง 0.58 กรัม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน สมปอง และคณะ (2547) รายงานการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี ในอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 15 เปอร์เซ็นต์ Scherwinski และคณะ (2010) รายงานผลของการใช้ต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันที่มีความสูงขนาด 8-10 เซนติเมตร นำมาตัดรากและใบออก แล้วตัดแบ่งต้นอ่อน เป็นสามส่วน คือ ส่วนโคน ส่วนกลาง และส่วนปลาย เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS พบว่า ส่วนโคนให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงที่สุด 41.5 เปอร์เซ็นต์หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในส่วนของการวางเลี้ยงในที่มืดสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีกว่าในที่แสงเนื่องจากการวางเลี้ยงในที่มืดพืชได้รับคาร์โบไฮเดรตจากน้ำตาลที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงแล้วโดยในธรรมชาติพืชจะใช้พลังงานแสงเปลี่ยนเป็นพลังงานเคมีมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในการสร้างอาหารจากโมเลกุลของคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งมีผลต่อการจริญเติบโต แต่ในทางกลับกันในกระบวนการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสแสงไม่มีความจำเป็นกับการพัฒนาของพืชในระยะนี้เพราะพืชอาจไม่จำเป็นต้องใช้แสงในการสังเคราะห์น้ำตาลส่งผลให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นไปได้ดีกว่าในที่มืดสอดคล้องกับ Rajesh และคณะ (2003) รายงาน ผลของการชักนำแคลลัสจากผลแก่ของปาล์มน้ำมันลูกผสมวางบนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) เข้มข้น 0.045 ไมโครโมลาร์ และ putrescine เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ วางเลี้ยงในที่มืด ให้จำนวนการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูง 0.70 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส Balzon และคณะ (2013) ชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสจากแคลลัสที่ได้จากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมัน วางบนอาหารสูตรMS วางเลี้ยงในที่มืดให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลัสสูงสุด 97.5 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้พบว่า ในระยะการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันแบบฟิสิเฟอราสูตรอาหาร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในที่มืดให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน ส่วนการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตรเติมเติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดให้ขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 122 ตารางมิลลิเมตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

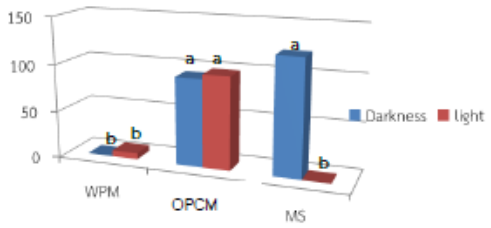


Fig. 2 Effects of culture media and conditions on size of embryogenic callus on 1 mg/l dicamba after 30 days of culture (value followed by different letter are significantly different according to DMRT significant difference at $p \leq 0.01$ level).

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนบัณฑิตศึกษาภายใต้โครงการวิจัยมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สถาบันวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ และสถาบันวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

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

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2523. ปาล์มน้ำมัน.สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มุกดา สุขสวัสดิ์. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. 2544. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์. ศูนย์พัฒนานิคมสร้างตนเองภาคใต้. 2534. ผลผลิตปาล์มน้ำมันสมาชิกนิคมสตูล. สตูล: ศูนย์พัฒนานิคมสร้างตนเองภาคใต้.

สมปอง เดชะโต, อาสลัน หิเล และอิบรอเฮม ยีดำ. 2547. การชักนำเอ็มบริโอเจนนิแคลลัส และพืชต้นใหม่จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี. ว. สงขลานครินทร์วทท.

สรัชพงศ์สิทธิชัย. 2556. ความหวังของปาล์มน้ำมันไทยจากโอกาสของไบโอดีเซล. สงขลา: ธนาคารแห่งประเทศไทยสำนักงานภาคใต้.

สกุลรัตน์ แสนปุดะวงษ์. 2553. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงศัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักงานเกษตรจังหวัด. 2555. แหล่งเกษตรอุตสาหกรรมและพลังงานที่ยั่งยืน. กระบี่: สำนักงานเกษตรจังหวัด.

Balzon, T.A., Luis, Z.G. and Scherwinski, P.J.E. 2013. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology Plant 49: 41–50.

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.

Rajesh, M.K., Radha, E., Karun, A. and Parthasarathy, V.A. 2003. Plant regeneration from embryo–derived callus of oil palm–the effect of exogenous polyamines. Plant Cell, Tissue and Organ Culture75: 41–47.

Scherwinski, P.J.E., 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 Plant 46: 378–385.

SJPS-OP-HM02-120215-010