



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษากระบวนการออ์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมัน
ในสภาพปลอดเชื้อ

The Study on Organogenesis Process in Oil palm
(*Elaeis guineensis*) Through *In Vitro* Culture

โดย

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์ และคณะ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2555

รหัสโครงการวิจัย มจ.1-54-021



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การศึกษากระบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ
The Study on Organogenesis Process in Oil palm (*Elaeis guineensis*)
Through *In Vitro* Culture

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2554
จำนวน 40,500 บาท

หัวหน้าโครงการ นายจิระศักดิ์ วิชาวสวัตดี
ผู้ร่วมโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย อุ่นศรีสง
นายประสาทพร กออวยชัย
นางสาวปณิดา กันถาด

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
วันที่ 30 ธันวาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ
(The Study on Organogenesis Process in Oil palm (*Elaeis guineensis*) Through *In Vitro* Culture)
ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2554

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำเนียร ยศราช อธิการบดีมหาวิทยาลัย
แม่โจ้ และอาจารย์สมพร มีแสงแก้ว ผู้อำนวยการมหาวิทยาลัยแม่โจ้ - ชุมพร ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา
และชี้แนะแนวทางที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ โครงการจัดตั้งห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่สนับสนุนอุปกรณ์ในการ
ศึกษาวิจัย ขอขอบคุณ ฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร และบริษัท อาร์.เอนด์ดี.เกษตร-
พัฒนา จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเพื่อการวิจัย ขอขอบคุณ
นักวิทยาศาสตร์ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุกท่านที่ได้เอื้อนาม ซึ่งมีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	(๗)
สารบัญภาพ	(๓)
บทคัดย่อ	1
Abstract	1
คำนำ	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	7
ผลการวิจัย	9
วิจารณ์ผลการวิจัย	15
สรุปผลการวิจัย	16
เอกสารอ้างอิง	17

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ความกว้างและความยาวของเอ็มบริโอ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 และ 4 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน	10
ตารางที่ 2 จำนวนยอด ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางส่วนปลายยอดอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางของเอ็มบริโอทั้งชิ้น จำนวนใบย่อย ความยาวใบ เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 200 วัน	11



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 สภาพเนื้อเยื่อเอ็มบริโอหลังเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน และลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนและพัฒนาการเกิดยอดใหม่ เมื่อเลี้ยงเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ระดับ 0.2 และ 4 มก./ล. นาน 200 วัน	12
ภาพที่ 2 ลักษณะภายในของเซลล์เนื้อเยื่อเอ็มบริโอ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน	13
ภาพที่ 3 ขบวนการชักนำให้เกิด organogenesis ของเอ็มบริโอ ภายใต้ระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดำอาหารเหลวที่เติม BAP ร่วมกับการเขย่า (shake)	14

การศึกษากระบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

The Study on Organogenesis Process in Oil palm

(*Elaeis guineensis*) Through *In Vitro* Culture

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์¹ ศิริชัย อุ้นศรีสง² ประสาทพร กอวยชัย¹ และ ปณิดา กันถาด¹

Jirasak Wichasawasdi¹ Sirichai Unsrisong² Prasatporn Koauychai¹ and

Panida Kuntud¹

1. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ - ชุมพร จ.ชุมพร 86170

1. Maejo University at Chumphon, Chumphon 86170

2. ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

2. Department of Agronomy, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiangmai 50290

บทคัดย่อ

การศึกษากระบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่ คือ อาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP 4 มก./ล. ซูโครส 2.0 % ทำให้มีจำนวนยอดสูงสุด เฉลี่ย 1.5 ยอด/ชิ้นส่วนเริ่มต้น เมื่อเลี้ยงนาน 200 วัน ข้อมูลจากการวิจัยเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในอนาคต

คำสำคัญ: ปาล์มน้ำมัน, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ออร์แกโนเจเนซิส

Abstract

The study on organogenesis process in oil palm (*Elaeis guineensis*) 'tenera' through *in vitro* culture, the successful medium for the best of shoots induction were the VW (pH 5.6) liquid medium with 4 mg/l BAP, 2.0 % sucrose and gave the highest success of shoot multiplication average 1.5 shoots/ explant for 200 days. This research output can be applied for the use of further study in oil palm micropropagation.

Key words: Oil palm (*Elaeis guineensis*), Tissue culture, Organogenesis

คำนำ

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีอายุหลายปี สืบพันธุ์แบบผสมข้าม(allogamous) มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ คือ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย ปาล์มน้ำมันให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่มากกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ (Gorret *et al.*, 2004)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์(Chukwuemeka *et al.*, 2005) ใน ค.ศ. 1991 มีการศึกษาชักนำให้เอ็มบริโอเจนิกแคลลัสที่ได้จากใบอ่อนเกิดเป็นต้นโดยเลี้ยงในสภาพอาหารเหลว (de Touchet *et al.*, 1991) ในปี ค.ศ. 1999 Aberlenc-Bertossi ได้พัฒนาวิธีการเพื่อปรับปรุงคุณภาพในการชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มปริมาณยอด (Gorret *et al.*, 2004) ในปี ค.ศ. 2002 Te-chato และคณะ รายงานว่า การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากใบอ่อน (young leaf culture) เป็นวิธีหนึ่งในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ส่วนใหญ่ใช้สารไดแคมบา (dicamba) เป็นปัจจัยสำคัญในการส่งเสริมขบวนการโซมาติกแต่ก็ประสบปัญหาอัตราการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอเป็นต้นใหม่มีอัตราต่ำ (Hilae and Te-chato, 2005) ในปี ค.ศ. 1985 Cui และคณะ สามารถชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่ตัดแยกออกจากเมล็ดบนอาหารที่เติม 2,4-D และ NAA ได้ (สมปอง, 2539)

ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันมากขึ้น โดยใช้หลักการ “true-to-type” เพื่อให้ได้ต้นที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์ เช่น ผลผลิตสูง ต้านทานโรค ทนต่อสภาพแห้งแล้ง (Mutert, 1999) นอกจากนี้ สมชาติ (2550) กล่าวว่า ข้อดีของต้นกล้าปาล์มที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ มีการแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อยมาก มีลักษณะเด่นเหมือนต้นพ่อแม่ทุกประการ การเจริญเติบโตทำให้ผลผลิตเร็วกว่าปาล์มที่มาจากการเพาะเมล็ด มีความต้านทานโรคสูง และให้ผลผลิตสูง

แนวทางใหม่ที่มีประสิทธิภาพลดปัญหาการกลายพันธุ์จากการผลิตต้นกล้าโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ วิธีการชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิสโดยใช้เทคนิคเมอร์สเต็มเซลล์เจอร์หรือการปั่นตายอด ซึ่งขบวนการนี้ไม่ต้องผ่านการเกิดแคลลัสทำให้ลดโอกาสเกิดการกลายพันธุ์จากแคลลัสได้

งานวิจัยนี้ มุ่งศึกษาการชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) โดยไม่ต้องผ่านการชักนำแคลลัสเพื่อลดปัญหาความผิดปกติของต้นกล้าโดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอดของเอ็มบริโอในการเริ่มต้นเพาะเลี้ยง องค์ความรู้ประยุกต์ที่ได้รับใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันเชิงการค้าในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ช่วยพัฒนาองค์ความรู้ด้านการวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน และนักวิจัยสามารถนำความรู้ที่ได้ไปปรับใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ และการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันในอนาคต
2. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปลอดโรค ตรงตามสายพันธุ์ และให้ผลผลิตต่อไร่สูง รวมทั้งเป็นการสนับสนุนการผลิตต้นกล้าผสมชั่วที่หนึ่งในระยะเวลาอันรวดเร็วสำหรับสายพันธุ์ดีเด่น และเป็นแนวทางการสร้างลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ๆ ในอนาคต
3. สร้างประโยชน์ต่อกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกปาล์มน้ำมัน และสถาบันวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง สามารถนำความรู้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป รวมถึงโครงการความร่วมมือสหกิจศึกษาทางวิชาการเกษตร ระหว่างมหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร กับภาคเอกชน
4. เสริมสร้างความเข้มแข็งให้กับประเทศในสภาวะการแข่งขันแบบเสรีทางการค้า ลดการนำเข้าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต่างประเทศ

การตรวจเอกสาร

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชน้ำมันที่ให้น้ำมันในปริมาณสูง (Abdullah *et al.*, 2005) จัดเป็นพืชที่มีศักยภาพในการแข่งขันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นทั้งในด้านการผลิตและการตลาด ในประเทศไทยส่วนแบ่งการผลิตน้ำมันปาล์มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว คาดว่าในช่วงปี 2559-2563 จะเพิ่มเป็นร้อยละ 31 ประเทศผู้ผลิตที่สำคัญ คือ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย (กรมวิชาการเกษตร, 2548) น้ำมันปาล์มสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล จังหวัดที่ปลูกปาล์มน้ำมันมาก ได้แก่ กระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง ตามลำดับ (ชาย และสุรจิตติ, 2548 ; ชีระ และคณะ, 2548) สายพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า ได้แก่ ลูกผสมเทเนอร่า (คูรา X ฟิสิเฟอร่า) (ชาย และสุรจิตติ, 2548) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปปาล์มน้ำมัน คือ ครีมเทียม มายาร์ริน (เนยเทียม) เนยขาว วานาสปาดิ ไขมัน และน้ำมันทอด ผลิตภัณฑ์วิตามินอี อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (วิชัย, 2548)

การพัฒนางานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่สำคัญ

Gorret *et al.* (2004) รายงานว่า ได้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันโดยใช้วิธีเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในระบบไบโอรีแอคเตอร์ (bioreactor) ศึกษาธาตุอาหาร (nutrients) และขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolites) ระหว่างภายในเซลล์ ค่าพารามิเตอร์ไคเนติก (kinetic parameters) และธาตุอาหารกับผลผลิตชีวมวล พบว่า ไนโตรเจนมีผลต่อการเพิ่มปริมาณต้นในขวดทดลอง กลูตามีน (glutamine) ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณขึ้นต้นและความหนาแน่น (density) แอมโมเนียทำให้มีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive) และมีปฏิริยาแบบเสริมกัน (synergistic effects) ทำให้ผลิตเนื้อเยื่อได้ต้นจำนวนมาก

ในปี ค.ศ.1993 Corley และคณะ ได้ปลูกปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแปลงปลูก พบว่า ปาล์มน้ำมันนั้นให้ผลผลิตสูง (Abdullah *et al.*, 2005)

ได้มีผู้ศึกษาการใช้สารอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ NAA ซึ่งเป็นสารกลุ่มออกซิน ในการชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction) โดยใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมันที่ตัดห่างจากส่วน เนื้อเยื่อส่วนปลาย (apical meristem) ประมาณ 15 ซม. เลี้ยงภายใต้สภาพมืด อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่า เกิดแคลลัสชนิดแน่น (compact callus) ได้ภายใน 1 เดือน เกิดลักษณะ nodular callus และเส้นผ่านศูนย์กลางก้อนแคลลัส ประมาณ 1 ซม. ซึ่งมีการเติบโตอย่างรวดเร็ว (Wong *et al.*, 1997) สำหรับการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) หรือการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส (callus differentiation) นั้น เกิดหลังจากเปลี่ยนย้ายอาหาร 6 ครั้ง พบเอ็มบริโอหรือโชมอดิกเอ็มบริโอครั้งแรก เมื่อเลี้ยงขึ้นส่วน 5 เดือน และจะเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสภายหลังจากเลี้ยงนานกว่า 18 เดือน (มีการเปลี่ยนย้ายอาหารทุก 2 เดือน) (Wong *et al.*, 1997)

Kamnoon and Preamrudee (1999) รายงานว่า ลักษณะแคลลัสหลังเลี้ยงเอ็มบริโอ นาน 4 สัปดาห์ เกิดเซลล์ 3 - 4 เซลล์ ในชั้นเอพิเดอร์มิส (epidermis) เซลล์มีขนาดเล็ก มีไซโทพลาสซึมที่เข้มข้น (dense cytoplasm) และมีนิวเคลียสสมบูรณ์ (well-stained nucleus) แคลลัสประกอบด้วยเซลล์เมอริสเต็มอยู่ภายใน แคลลัสมีการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่อง ภายหลังเลี้ยง 8 สัปดาห์ พบแคลลัสลักษณะก้อนกลม (nodular callus) เซลล์ที่อยู่ส่วนกลางแคลลัสมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่อยู่โดยรอบ เซลล์แคลลัสที่อยู่โดยรอบศูนย์กลางเมอริสเต็ม (meristematic centers) พบว่า มีขนาดใหญ่และแวคิวโอลมาก แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหรือเอ็มบริอยด์ โดยพบการแบ่งเซลล์ในระยะต่างๆ คือ ระยะก้อนกลม (globular stage) และรูปหัวใจ (heart shape)

ในปี ค.ศ. 2002 Te-chato และคณะ รายงานว่า การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอใช้วิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อน (young leaf culture) โดยส่วนใหญ่ใช้สารไดแคมบา (dicamba) ส่งเสริมขบวนการนี้ อัตราการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอเป็นพืชต้นใหม่นั้นยังต่ำอยู่ (Hilae and Te-chato, 2005)

Hilae and Te-chato (2005) ได้รายงานว่าการเติมแมนนิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในอาหารสูตร MS ช่วยส่งเสริมการเจริญรากของโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 40 % การเติมน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้นสูงและการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารช่วยส่งเสริมการสร้างรากของปลั้ม

Abdullah *et al.* (2005) ได้เลี้ยงเอ็มบริโออ่อน (immature embryo) ของปาล์มน้ำมัน และสามารถเกิดแคลลัสด้วยอาหารสูตร N_0 2.5 หรือสูตร Chu 1975 ที่เติม 2,4-D 2.5 มก./ล. และสูตร Chu โดยเกิดแคลลัสภายหลังเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเอ็มบริโอเจนิกแคลลัส (embryogenic callus) พัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) ภายหลังเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ และพบโซมาติกเอ็มบริโอในระยะทอร์ปิโด (torpedo-shaped) และ ระยะต้นอ่อน (plantlet) ในอาหารสูตร Chu และคณะ, 1975 ที่ไม่เติม 2,4-D

ในปี ค.ศ. 2005 Park รายงานว่า การเลี้ยงเนื้อเยื่ออาหารสูตร 1/3 strength MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ซูโครส 60 ก./ล. ส่งเสริมการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ (Hilae and Te-chato, 2005)

Abdullah *et al.* (2005) รายงานว่า การเลี้ยงเอ็มบริโอเหมาะสมต่องานปรับปรุงพันธุ์ (breeding programs) โดยได้ศึกษากระตุ้นขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) เอ็มบริโอมีการตอบสนองได้ดีกว่าชิ้นส่วนใบและเนื้อเยื่อราก เอ็มบริโอเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสได้และมีประสิทธิภาพดีในการเจริญเป็นต้นกล้า ใช้เวลาเพาะเลี้ยงน้อยและจำนวนต้นผิดปกติน้อย เทคนิคนี้สามารถใช้ร่วมกับการนำยีนเข้าสู่เซลล์หรือแคลลัสของปาล์มน้ำมันเพื่อพัฒนาพันธุ์ปาล์มให้มีลักษณะที่ต้องการ

จิระศักดิ์ และคณะ (2550) ได้เลี้ยงชิ้นส่วนเอ็มบริโออ่อนของปาล์มน้ำมัน ด้วยอาหารแข็ง สูตร VW ที่เติม BAP เข้มข้น 4 มก/ล. IAA เข้มข้น 1 มก/ล. น้ำมะพร้าว 22.5 % นาน 355 วัน ทำให้เกิดแคลลัสแล้วพัฒนาเป็นยอดพิเศษได้โดยผ่านกระบวนการออร์แกโนเจเนซิส(organogenesis) สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนติกแคลลัสชนิดหลวมและแน่นได้คือ อาหารแข็ง สูตร VW ที่เติม BAP 4 มก/ล. IAA 1 มก/ล. น้ำมะพร้าว 22.5 % เอ็มบริโอเจเนติกแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นโครงสร้างที่คล้ายกระจุกยอดได้ เมื่อเลี้ยงนาน 150 วัน

จิระศักดิ์ และคณะ (2553) ได้ศึกษาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ tenera โดยเฉพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนโดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอดเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร OPM (ดัดแปลงจากสูตร MS และ VW ที่เติม BAP ร่วมกับ IAA น้ำมะพร้าว 15% ซูโครส 2%) เลี้ยงในระบบเขย่า เป็นเวลา 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW เลี้ยงภายใต้สภาพเขย่า เป็นเวลา 147 วัน พบว่า มีการเพิ่มปริมาณยอดเฉลี่ย 18 ยอดต่อชิ้นส่วน

Yusnita (2011) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction) และโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส (somatic embryogenesis) ของปาล์มน้ำมันโดยใช้ชิ้นส่วนใบ เริ่มจากการใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนจากต้นที่สมบูรณ์ เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ระดับต่างกัน ร่วมกับการเติม/ไม่เติมผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) ที่เติม 2,4-D และ picloram พบว่า เมื่อใช้ 2,4-D ระดับ 450 μM และ BAP ระดับ 4.4 μM ร่วมกับผงถ่าน สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิสได้ สำหรับการเติม 2,4-D ระดับ 15 μM ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด ในการทดลองยังพบว่า primary callus (27 ใน 250 clumps) สามารถเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสได้ภายหลังเปลี่ยนย้ายอาหาร 2 - 3 ครั้ง สำหรับเอ็มบริโอเจเนติกแคลลัสพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม casein hydrolysate ร่วมกับ BAP ระดับ 1 μM หรือการไม่เติมฮอร์โมนร่วมกับการใช้ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการเตรียมอาหารย้ายเนื้อเยื่อ และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. สารเคมี ได้แก่
 - 2.1 สารที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Vacin and Went (1949) หรือ VW
 - 2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ 6 - benzylaminopurine (BAP)
 - 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร
3. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พร้อมชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ติดหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (white-fluorescent) มีความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ (Lux)
4. เครื่องเขย่า (shaker)
5. อุปกรณ์บันทึกภาพและข้อมูล
6. เมล็ด และผลอ่อน (immature fruit) ของปาล์มน้ำมันพันธุ์ tenera ต้นที่ให้ผลผลิต 3 - 5 ต้น/ไร่ จากฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร

วิธีการวิจัย

เริ่มดำเนินการวิจัย เมื่อเดือน มิถุนายน 2552 ถึงสิ้นเดือน มกราคม 2556 รวมระยะเวลา 3 ปี 8 เดือน ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และ ฟาร์มมหาวิทยาลัยฯ โดยทำการสุ่มตัวอย่าง และ ทารหัสต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตสูงจากฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร

การเตรียมชิ้นส่วนและการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเอมบริโอ

คัดเลือกต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์เทนเอร่า ที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งมีอายุประมาณ 5 ปี แล้วทำสัญลักษณ์กำหนดหมายเลขไว้ จากนั้นปลิดผลอ่อน ขนาดผล 2.5 X 3.7 เซนติเมตร ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 9.5 กรัมต่อผล นำเมล็ดพันธุ์มาล้างด้วยน้ำยาซันไลต์ 3 ครั้ง และน้ำสะอาด 3 ครั้ง ฉีดพ่นด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % 5 นาที แล้วปล่อยให้แห้ง ใช้มีดผ่าแบ่งผลบริเวณใกล้กับเอมบริโอ ปอกเปลือกหุ้มผล จากนั้นนำเอมบริโอที่ติดอยู่กับเนื้อผลมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรีกซ์ 10 % ที่เติมทวิน-20 (tween20) เขย่าเป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ใช้ปากคีบ คีบเอมบริโอมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ตามแผนการทดลองต่อไป

การศึกษาขบวนการออร์แกโนเจนซิสในสภาพปลอดเชื้อ

เพาะเลี้ยงเอมบริโออ่อนในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (มก./ล.) น้ำตาลซูโครส 2.0 เปอร์เซ็นต์ (%) นึ่งอาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 1.4 กก./ตร.ซม. เป็นเวลา 20 นาที เลี้ยงเอมบริโอในสภาพที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน (ชม./วัน) ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ วางบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 200 วัน อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยง 25±2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 3 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 9 ซ้ำ ๆ ละ 1 ชิ้นส่วนต่อขวด ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 อาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 0 มก./ล.

สิ่งทดลองที่ 2 อาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 มก./ล.

สิ่งทดลองที่ 3 อาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 4 มก./ล.

บันทึกการเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏ ลักษณะการเจริญเติบโต เช่น จำนวนยอด ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางยอดอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางทั้งชิ้นส่วนเอมบริโอ จำนวนใบย่อย ความยาวใบ สีใบ เป็นต้น พร้อมบันทึกภาพ

ผลการวิจัย

การศึกษาขบวนการออร์แกโนเจนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อนำเอมบริโออ่อน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (มก./ล.) ซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ (%) เลี้ยงภายใต้สภาพแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ระบบเขย่า เป็นเวลา 200 วัน ปรากฏผลดังนี้

1. จำนวนยอด

เมื่อเลี้ยงเอมบริโอด้วยอาหารที่เติม BAP 4 มก./ล. ทำให้มีจำนวนยอดสูงสุดเฉลี่ย 1.5 ยอด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BAP ระดับอื่นๆ (ตารางที่ 2)

2. ความยาวยอด

เมื่อเลี้ยงด้วย BAP ที่เติม 2 มก./ล. และไม่เติม BAP ทำให้ยอดมีความยาวเฉลี่ย 5.3 และ 4.2 ซม. ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่การเติม BAP 4 มก./ล. ทำให้ยอดมีความยาวน้อยที่สุด 3.0 ซม. แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเติม BA ระดับอื่นๆ (ตารางที่ 2)

3. เส้นผ่านศูนย์กลางส่วนปลายยอดอ่อน และเส้นผ่านศูนย์กลางเอมบริโอทั้งชิ้นส่วน

การเลี้ยงด้วยอาหารทุกสูตรอาหาร ไม่ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางปลายยอดอ่อน มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

เมื่อเลี้ยงเอมบริโอด้วยอาหารที่เติม BAP 0 และ 2 มก./ล. ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางเอมบริโอทั้งชิ้นส่วน เฉลี่ย 3 และ 2.8 ซม. ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

การเติม BAP ความเข้มข้น 4 มก./ล. ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางเอมบริโอทั้งชิ้น มีค่าน้อยที่สุด เฉลี่ย 1.3 ซม. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 2)

4. จำนวนใบย่อย

เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม BAP 4 มก./ล. ทำให้มีจำนวนใบย่อยมากที่สุด เฉลี่ย 17.4 ใบ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเมื่อเลี้ยงเอมบริโอในสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 2)

5. ความยาวใบ

เมื่อเลี้ยงเอมบริโอด้วยอาหารสูตรที่เติม BAP 2 มก./ล. และไม่เติม BAP ทำให้มีความยาวใบ เฉลี่ย 5.7 และ 4.7 ซม. ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกัน

เมื่อเติม BAP 4 มก./ล. ทำให้มีความยาวใบน้อยที่สุด เฉลี่ย 1.2 ซม. ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ความกว้างและความยาวของเอมบริโอ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0 2 และ 4 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน

สิ่งทดลอง	ลักษณะที่ปรากฏ ^{ก/}	
	ความกว้าง (มม.)	ความยาว (มม.)
BAP 0 มก./ล.	4.0±1.2 a	7.2±3.30 a
BAP 2 มก./ล.	3.4±1.5 a	6.9±3.84 a
BAP 4 มก./ล.	3.5±0.7 a	6.0±1.33 a
F - test	ns	ns
% CV	32.18	45.1

หมายเหตุ

1/ ตัวเลขในแนวตั้งที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ก/ ข้อมูลนี้ ได้จากผลการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 สิ่งทดลองๆ ละ 10 ซ้ำๆ ละ 1 ซีนส่วน รวม 30 ซีนส่วน สำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ปนเปื้อน (contaminated) ได้คัดทิ้ง และไม่ได้นำมาใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2 จำนวนยอด ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางส่วนปลายยอดอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางของ
 เอมบริโอทั้งชิ้น จำนวนใบย่อย ความยาวใบ เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนเอมบริโอในอาหารเหลว
 สูตร VW ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 200 วัน

อาหารเหลว สูตร VW ร่วมกับ BAP ระดับต่างๆ	ลักษณะที่ปรากฏ					
	จำนวนยอด (ยอด)	ความยาว ยอด(ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง กลางปลายยอด อ่อน (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง ทั้งชิ้นส่วน (ซม.)	จำนวนใบ ย่อย (ใบ)	ความยาว ใบ (ซม.)
BAP 0 มก./ล	1.0 b ¹	4.2 ab	0.5 a	3.0 a	5.6 b	4.7 a
BAP 2 มก./ล	1.0 b	5.3 a	0.5 a	2.8 a	3.2 b	5.7 a
BAP 4 มก./ล	1.5 a	3.0 b	0.5 a	1.3 b	17.4 a	1.2 b
F-test; F-value	5.3	3.5	0.1	9.9	4.7	9.9
Sig.	*	*	ns	**	*	**
%CV.	35.4%	44.3%	40.0%	38.2%	121.2%	58.6%

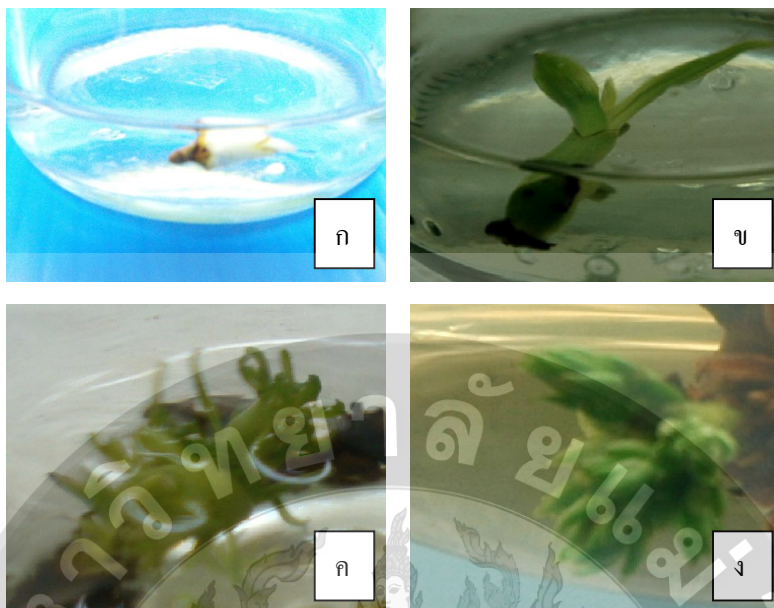
หมายเหตุ

1/ ตัวเลขในแนวดิ่งที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's
 multiple range test (DMRT)

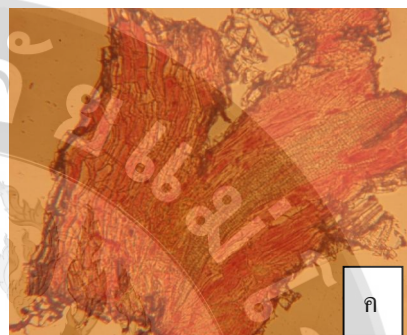
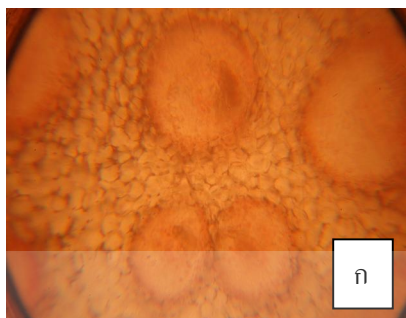
* = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

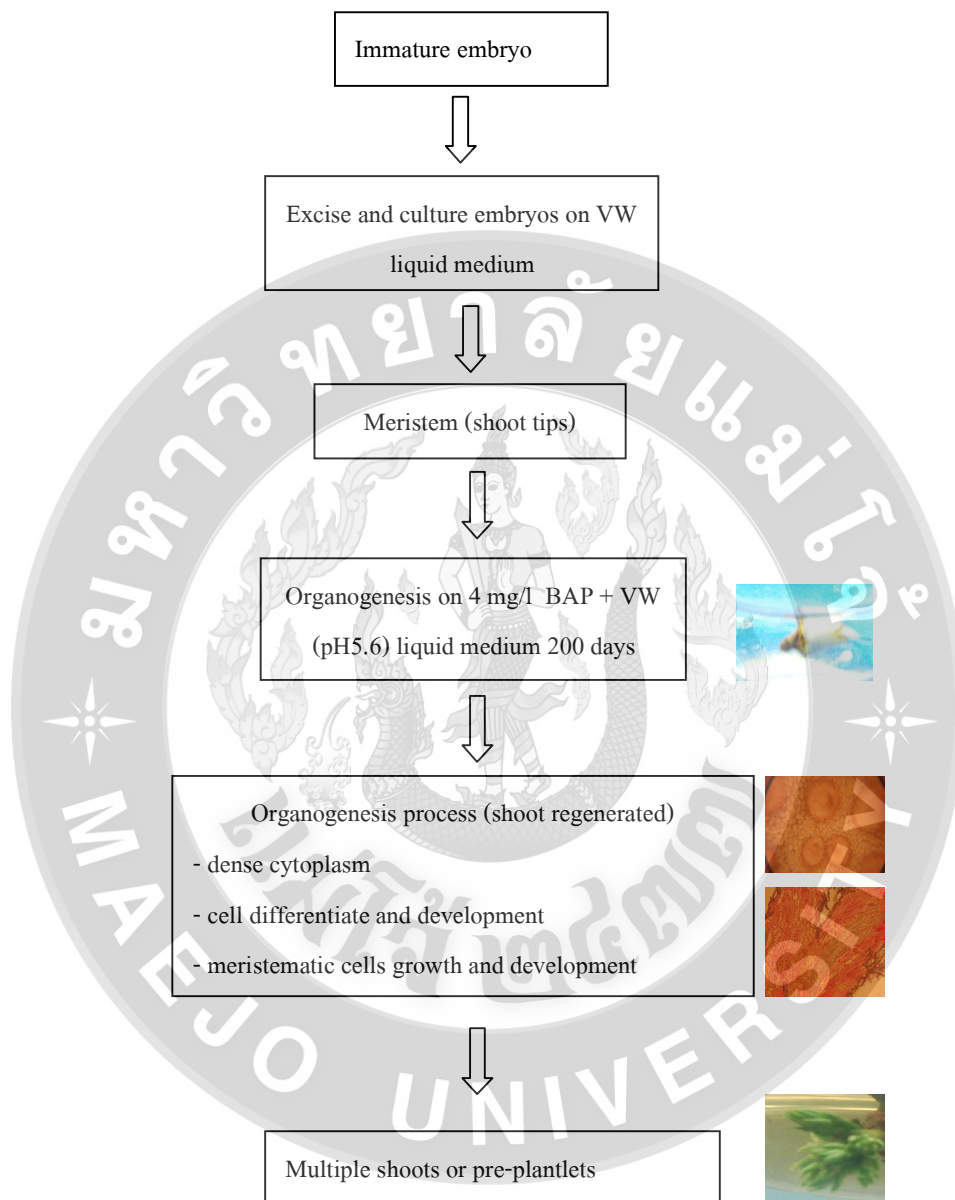
ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 1 สภาพเนื้อเยื่อเอ็มบริโอหลังเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน (ก) และลักษณะการเจริญของ
 ชิ้นส่วนและพัฒนาการเกิดยอดใหม่ เมื่อเลี้ยงเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร VW
 (pH 5.6) ที่เติม BAP ระดับ 0 2 และ 4 มก./ล. นาน 200 วัน (ข – ง)
 ข) BAP 0 มก./ล.
 ค) BAP 2 มก./ล.
 ง) BAP 4 มก./ล.



- ภาพที่ 2** ลักษณะภายในของเซลล์เนื้อเยื่อเอมบริโอ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน
- ก) เอมบริโออ่อนในระยะแรกๆ มองเห็นท่อไข่มุขชัดเจน แวคิวโอลมีขนาดใหญ่ (ภาพตัดขวางด้านบน)
 - ข) ระยะแรกๆ ภายในเซลล์ไข่มุขมีการจัดเรียงตัวของเซลล์ค่อนข้างเป็นระเบียบ เซลล์ยังไม่มีแบ่งตัว ส่วนแวคิวโอลมีขนาดใหญ่ (ภาพตัดตามยาวของเนื้อเยื่อ)
 - ค) เมื่อเลี้ยงไปนานมากขึ้น กลุ่มเซลล์พาราไคมาที่อยู่ใกล้เคียงกันมีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ ทำให้ไซโทพลาสซึมเข้มข้นขึ้น ส่วนแวคิวโอลเดิมมีขนาดใหญ่ก็เล็กลง จึงมองดูเหมือนเซลล์จัดเรียงแบบไร้ระเบียบ คาดว่า เซลล์น่าจะมีการแบ่งตัวในอัตราที่สูงขึ้น (ภาพตัดตามยาวของเนื้อเยื่อ)



ภาพที่ 3 ขบวนการชักนำให้เกิด organogenesis ของเอ็มบริโอ ภายใต้ระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยอาหารเหลวที่เติม BAP ร่วมกับการเขย่า (shake)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

การศึกษานี้ เน้นการชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิสของปาล์มน้ำมันโดยไม่ต้องผ่านการชักนำให้เกิดแคลลัสก่อน จากการทดลองนี้ได้เลี้ยงเอ็มบริโออ่อนในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ระดับ 4 มก./ล. และซูโครส 2.0 % เป็นเวลา 200 วัน พบว่า ทำให้มีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 1.5 ยอด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตรอื่นๆ ส่วนการไม่เติม BAP ทำให้ไม่เกิดยอดใหม่ หรือกล่าวได้ว่า ไม่เกิดออร์แกโนเจเนซิส แต่การเติม BAP ทำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสได้จึงช่วยเพิ่มปริมาณยอดให้มากขึ้น สอดคล้องกับ จิระศักดิ์ และคณะ (2550) รายงานว่า สามารถชักนำยอดพิเศษของปาล์มน้ำมันได้ในอาหารสูตรที่เติม BAP และ IAA สามารถกระตุ้นให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิสได้และ การเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารเหลวที่เติม BAP ร่วมกับ IAA และน้ำมะพร้าว ทำให้มีการพัฒนาเป็นยอดพิเศษจำนวนมากได้ (จิระศักดิ์ และคณะ, 2553) ซึ่งเกิดจากอินไดเรกต์ออร์แกโนเจเนซิส (indirect - organogenesis) การเติม BAP ทำให้ไซมาติกเอ็มบริโอมีการพัฒนาที่ดี (Kamnoon and Preamrudee, 1999) การวิจัยนี้จึงเป็นทำซ้ำเพื่อยืนยัน และสนับสนุนข้อมูลวิจัยดังกล่าวได้

มีผู้รายงานว่า การเพิ่มปริมาณยอดของเนื้อเยื่อเป็นผลจากการได้รับไซโทไคนินอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานในระหว่างการพัฒนาของเอ็มบริโอ แต่หากชิ้นส่วนเอ็มบริโอได้รับสารฮอร์โมน BAP ในระยะเวลาดั้งๆ ทำให้ได้ยอดเดี่ยว (single shoot) (Aberlenc-Bertossi *et al.*, 1999) Zaerr and Mapes (1982) รายงานว่า BAP เป็นสารในกลุ่มไซโทไคนินที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกระตุ้นการเกิดยอด การที่ BAP ทำหน้าที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และกระตุ้นการสร้างยอด (Brock and Kaufman, 1991) เนื่องจาก BAP เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีน กระตุ้นการแบ่งเซลล์ จึงส่งผลให้เกิดการสร้างยอดได้ดี (McGrew, 1987)

ในการทดลองนี้ พบว่า การเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาพเขย่า ทำให้มีอัตราการเกิดยอดได้มากขึ้น เนื่องจากการเขย่าอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาที่เพาะเลี้ยงช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนหรืออากาศ (aeration) ให้กับเนื้อเยื่อโดยตรงทำให้เนื้อเยื่อเติบโตอย่างรวดเร็ว (Shakti *et al.*, 2007 ; Othmani *et al.*, 2009) สำหรับการเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารเหลวช่วยให้เนื้อเยื่อที่เลี้ยงได้รับธาตุอาหารหรือฮอร์โมนอย่างทั่วถึง และในปริมาณที่มากขึ้น (Shakti *et al.*, 2007; Othmani *et al.*, 2009) การเขย่าขวดเนื้อเยื่ออย่างต่อเนื่องทำให้ชิ้นส่วนปลายยอดของพืชที่เลี้ยงมีการแตกตาข้าง (axillary bud) (Shakti *et al.*, 2007)

สำหรับในการทดลองนี้ ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดโดยเทคนิคการชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิสเพื่อเพิ่มปริมาณยอดในอาหารเหลว สอดคล้องกับมีรายงานทดลองเลี้ยงส่วนปลายยอดในมะพร้าวและอินทผาลัมได้สำเร็จ (Verdel *et al.*, 1992; Hadrami *et al.*,

1995) ซึ่งขบวนการ organogenesis เป็นขบวนการเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ โดยการรวมตัวของ กลุ่มเซลล์พาเรนไคมาที่อยู่ใกล้เคียงกัน ซึ่งกลุ่มเซลล์พาเรนไคมาเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงภายใน เซลล์ ทำให้ไซโทพลาสซึมเข้มข้นขึ้น ส่วนของแควิวโอลซึ่งแต่เดิมมีขนาดใหญ่ก็จะเล็กลง เซลล์มีการ เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์เจริญ (meristematic cell) ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในอัตราสูง เซลล์เหล่านี้ยังมีขนาด เล็ก กลุ่มเซลล์เหล่านี้บางทีอาจจะเรียกว่า “Meristemoids” ซึ่งจะเจริญไปเป็นจุดกำเนิดยอด หรือราก (shoot or root primordia) ต่อไป การเกิดยอดหรือรากจะเป็นอิสระต่อกันขึ้นอยู่กับว่าเนื้อเยื่อส่วนนั้น จะได้รับสิ่งกระตุ้นในการเจริญไปเป็นอวัยวะ(ชลิต, 2532) โดยในการทดลองนี้ได้นำเนื้อเยื่อส่ง ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์และปรากฏลักษณะเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงต่างๆ สอดคล้องกับข้อมูลดังกล่าว

สรุปผลการวิจัย

1. การเลี้ยงเอ็มบริโออ่อน (immature embryo) ในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ระดับ 4 มก./ล. และซูโครส 2.0 % เป็นเวลา 200 วัน พบว่า ทำให้มีจำนวนยอดมากที่สุด เฉลี่ย 1.5 ยอด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตรอื่นๆ จากการทดลอง พบแนวโน้มว่า การเติม BAP ระดับที่มากขึ้น ทำให้ยอดมีความยาวนานน้อยกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่เติม BAP หรือเติม 2 มก./ล. แต่การเติม BAP ระดับ 4 มก./ล. ทำให้มีจำนวนใบย่อยมากขึ้น และมีความยาวใบสั้นกว่าการเติม BAP ระดับ 2 มก./ล. และไม่เติมฮอร์โมน BAP

2. การเลี้ยงเอ็มบริโอ ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BAP ระดับ 4 มก./ล. และซูโครส 2.0 % สามารถชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิสได้โดยไม่ต้องผ่านการชักนำแคลลัสก่อน จึงช่วยให้ เพิ่มปริมาณยอดได้โดยตรง (direct multiple shoots)

ข้อมูลเหล่านี้ น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการ ปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2548. **ปาล์มน้ำมัน**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ.

188 น.

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์, ศิริชัย อุ่นศรีส่ง, สมพร มีแสงแก้ว, ประสาทพร กอวยชัย และ นิศยา

แก้วชญา. 2550. **อิทธิพลของ Benzyl aminopurine และ Indole acetic aid ต่อการเกิดแคลลัสของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ**. รายงานผลการวิจัย. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ - ชุมพร: ชุมพร.

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์, ศิริชัย อุ่นศรีส่ง, สมพร มีแสงแก้ว, ประสาทพร กอวยชัย และปณิดา กันถาด.

2553. **การเกิดโคมاتิคเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์การค้าในสภาพปลอดเชื้อ**. รายงานผลการวิจัย. มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร: ชุมพร.

ชลิต พงศ์สุกสมิทธิ์. 2532. **เทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. ภาควิชาพืชสวน, คณะผลิตกรรมการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. เชียงใหม่. 146 น.

ชาย โฆรวิศ และสุรกิตติ ศรีกุล. 2548. **ประวัติและความสำคัญ**. ใน: กรมวิชาการเกษตร (บรรณาธิการ) **ปาล์มน้ำมัน**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ. น. 1 - 6.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรมิขม, ประกิจ ทองคำ และ สมเกียรติ สีสนอง. 2548. **เส้นทางสู่ความสำเร็จการผลิตปาล์มน้ำมัน**. พิมพ์ครั้งที่ 2. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตปาล์มน้ำมัน, คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่: สงขลา. 117 น.

วิษณีย์ ออมทรัพย์สิน. 2548. **การแปรรูปปาล์มน้ำมัน**. ใน: กรมวิชาการเกษตร (บรรณาธิการ) **ปาล์มน้ำมัน**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ. น. 151 - 171.

สมชาติ สิงหะพล. 2550. **โครงการความร่วมมือสหกิจศึกษาทางวิชาการเกษตร**. ใน: ชมรมสื่อมวลชนเกษตรแห่งประเทศไทย (บรรณาธิการ) **เอกสารสัมมนาทิศทางการพัฒนาปาล์มน้ำมันเพื่อความมั่นคงของเกษตรกร**. กรุงเทพฯ.

สมปอง เตชะโต. 2539. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ**. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่: สงขลา. 135 น.

- Abdullah, R., Z. Alizah , Y. H. Wee , C .L. Leaw , C. B. Yeap , M. P. Lee , A. S. Salwa, Y. S. P. Winnie, L. J. Juanita, A. J. Siti, M. M. Rashdan, and L. H. Yeun . 2005. Immature embryo : A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. **Plant Biotechnology**. 1 (8).
- Aberlenc-Bertossi, F., M. Noirot, and Y.Duval. 1999. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**. 56 (1): 53 - 57.
- Brock, T. G. and P. B. Kaufmann. 1991. Growth regulators: an account of hormones and growth regulation. In: Steward, F.G. (ed.) **Plant physiology: A Treatise**. Academic Press Inc: London. pp. 27 - 34.
- Chukwuemeka, R.E., A.Peter, and A.Omorefe. 2005. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. **African Journal of Biotechnology**. 4(3): 244 - 246.
- de Touchet, B., Y.Duval, and C. Pannetier. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Rep**.10: 529 - 532.
- Gorret, N., S.K.bin Rosli, S.F.Oppenheim, L.B.Willis, P.A.Lessard, C.Rha, and A.J. Sinskey. 2004. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. **J.Biotechnol**. 108(3): 253 - 263.
- Hadrami, I., R. Cheikh, and M. Baaziz. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot-tip explants in *Phoenix dactylifera* L. **Biologiaplantarum**. 37 (2): 205 - 211.
- Hilae, A. and S. Te - chato. 2005. Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Songklanakarin J. Sci. Technol**. 27 (suppl.3): 629 - 635.
- Kamnoon K. and D.Preamrudee. 1999.The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. **Science Asia**. 25: 195 - 202 .

- McGraw, B.A. 1987. Cytokinin biosynthesis and metabolism. *In*: Davies, P. J. (ed.) **Plant hormones and there role in plant development**. Martinus Nihoff Publishers: Dordrect. pp. 76 - 93.
- Mutert, E. and T.H. Fairhurst . 1999. Oil Palm Clones: Productivity enhancement for the future. **Better Crops International**. 1(3): 45 - 47.
- Othmani, A., C.Bayoudh, N. Drira, and M.Trifi. 2009. *In vitro* cloning of date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Degletbey by using embryogenic suspension and temporary immersion bioreactor (TIB). **Biotechnol. and Biotechnol. EQ**. 1181 - 1188.
- Shakti, M., K.G. Manoj, K.K. Arun, and N.M. Bhatendu. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress to wards commercialization. **African Journal of Biotechnology**. 6(13): 1484 - 1492.
- Vacin, E.F. and F. Went .1949. Some pH changes in nutrient solutions. **Bot. Gaz**. 110: 605 - 613.
- Verdel, J.L., C. Huet, F. Grosdemanges, A. Rival, and J. Buffard – Morel. 1992. Embryogenese Somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.): Obten de plusieurs clones de vitroplants. **Oleagineux**. 47: 465 - 469.
- Wong, G., C.C.Tan, and A.C. Soh. 1997. Large scale propagation of oil palm clones - experiences to date. **Hort. Biotech. In Vitro Cult. and Breeding**. 649 - 658.
- Yusnita, D.H. 2011. *In Vitro* Callus Induction and Embryogenesis of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from Leaf Explants. **Journal of Biosciences**. 18 (2). 61 - 65.
- Zaerr, J. B. and M. O. Mapes. 1982. Action of growth regulation. *In*: Bonga, J. M. and D. J. Durzan, (eds.) **Tissue culture in Forestry**. Martinus Nijhoff Dr. W. Junk Publishers. pp. 231 - 255.