



รายงานผลการวิจัย

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การเกิดไซมาติคเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน
พันธุ์การค้าในสภาพปลอดเชื้อ

SOMATIC EMBRYOGENESIS OF OIL PALM
(*Elaeis guineensis* Jacq.) THROUGH *IN VITRO* CULTURE

โดย

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์ ศิริชัย อุ่นศรีสง ประสาทพร กอวยชัย
สมพร มีแสงแก้ว ปณิดา กันถาด



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การเกิดไซมาติคเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์การค้าในสภาพปลอดเชื้อ
SOMATIC EMBRYOGENESIS OF OIL PALM (*Elaeis guineensis* Jacq.)
THROUGH IN VITRO CULTURE

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2551
จำนวน 68,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

นายจิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์

ผู้ร่วมโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย อุ่นศรีสง

นายประสาทพร กอวยชัย

นายสมพร มีแสงแก้ว

นางสาวปณิดา กันถาด

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

...../...../.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง การเกิดไซมาติคเอมบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์การค้าในสภาพ -
ปลอดเชื้อ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัย
แม่โจ้ ในปีงบประมาณ 2551 เป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น 68,000.- บาท บัดนี้ โครงการวิจัยนี้ได้เสร็จสิ้น
เป็นที่เรียบร้อยแล้ว และบรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เทพ พงษ์พานิช อธิการบดีมหาวิทยาลัย
แม่โจ้ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริชัย อุ่นศรีสง ผู้อำนวยการมหาวิทยาลัยแม่โจ้ - ชุมพร ที่ได้
กรุณาสับสนุนโครงการจัดตั้งห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ตลอดจนกระทั่งให้คำปรึกษาและ
ชี้แนะแนวทางที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ โครงการจัดตั้งห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่สนับสนุนอุปกรณ์ในการ
ศึกษาวิจัย ขอขอบคุณ ฟาร์มมหาวิทยาลัยฯ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ด
พันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเพื่อการวิจัย ขอขอบคุณ คุณณิชาพล แก้วชญา นักวิทยาศาสตร์ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณ นายบุญโรช ศรีละพันธ์ นักวิชาการ
เกษตร ที่ให้ข้อมูลต้นแม่พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ปลูกในพื้นที่ฟาร์มมหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ ทุกท่านที่มีได้เอื้อนนาม ซึ่งมีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
ขอบเขตของการวิจัย	11
อุปกรณ์และวิธีการ	12
อุปกรณ์	12
วิธีการวิจัย	13
ผลการวิจัย	17
วิจารณ์ผลการวิจัย	43
สรุปผลการวิจัย	48
บรรณานุกรม	49
ภาคผนวก	54

(ก)

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. เพอร์เซ็นต์รอดชีวิตของชิ้นส่วน เพอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดแคลลัส รูปร่าง แคลลัส เมื่อเลี้ยงเอ็มบริโออ่อน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ IAA นาน 355 วัน	19
2. จำนวนใบ ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นส่วนปลายยอด เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPM เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 60 วัน	22
3. จำนวนใบ ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนยอด เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPM เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน	27
4. ความกว้างและความยาวกลุ่มยอด จำนวนกลุ่มยอด ความยาวยอดใหม่ เพอร์เซ็นต์ใบย่อย และจำนวนใบย่อย เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดที่เกิดกลุ่มยอด ในอาหารเหลว สูตร OPM เป็น นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร VW นาน 147 วัน	35
5. การเปลี่ยนแปลงของส่วนปลายยอด เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งและอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน และอาหารเหลวสูตร VW ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 147 วัน	38
6. เปรียบเทียบลักษณะการเกิดไซมาติคเอ็มบริโอเจเนซิส (somatic embryogenesis) และออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) ของเอ็มบริโออ่อน	41

(ต่อ)

สารบัญตาราง

ตารางผนวกที่	หน้า
1. องค์ประกอบอาหารสูตร OPM, MS (1962) และ VW (1949)	55
2. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะจำนวนใบ ความยาวยอด และเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วน เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 60 วัน	56
3. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะจำนวนใบ ความยาวยอด และเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วน เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน	57
4. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ความกว้างยอด ความยาวยอด จำนวนกลุ่มยอด ความยาวยอดใหม่ เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW นาน 10 วัน รวมเวลา 200 วัน	58
5. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ความกว้างยอด ความยาวยอด จำนวนกลุ่มยอด ความยาวยอดใหม่ จำนวนใบย่อย เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงปลายยอดที่เกิดกลุ่มยอด ในอาหารเหลวสูตร VW 122 วัน รวม 312 วัน	59
6. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ความกว้างยอด ความยาวยอด จำนวนกลุ่มยอด ความยาวยอดใหม่ จำนวนใบย่อย เส้นผ่านศูนย์กลางกลุ่มยอดย่อย เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงปลายยอดที่เกิดกลุ่มยอดในอาหารเหลวสูตร VW นาน 147 วัน รวม 337 วัน	61

(ข)

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แผนผังวิธีการวิจัย	16
2. พัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และลักษณะเซลล์ภายในแคลลัส	20
3. จำนวนใบที่ปรากฏ เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับ การเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลานาน 60 วัน	23
4. ความยาวยอด เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับการ เลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลานาน 60 วัน	24
5. เส้นผ่านศูนย์กลางของปลายยอด เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลานาน 60 วัน	25
6. จำนวนใบที่ปรากฏ เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับ การเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลานาน 190 วัน	28
7. ความยาวยอด เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับการ เลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลานาน 190 วัน	29
8. เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนปลายยอด เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลานาน 190 วัน	30
9. การเจริญและพัฒนาของส่วนปลายยอด และลักษณะของกลุ่มยอด (cluster shoot)	31
10. การเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนปลายยอด และการเกิดกลุ่มยอด เมื่อ เลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร VW(1949) เป็นเวลา 10 วัน เพื่อเพิ่มกลุ่มยอด รวมเลี้ยง 200 วัน	33
11. การเจริญพัฒนาของส่วนปลายยอด และลักษณะกลุ่มยอด เมื่อเลี้ยงใน อาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนกลุ่มยอด ใน อาหารเหลวสูตร VW 122 วัน รวมเวลา 312 วัน	36
12. การเจริญของชิ้นส่วนปลายยอด และพัฒนาการของกลุ่มยอด เมื่อเลี้ยง ส่วนกลุ่มยอดในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน (ระยะ ก - ข) แล้ว ย้ายเลี้ยงกลุ่มยอด ในอาหารเหลวสูตร VW 147 วัน รวมเวลา 337 วัน	39

(ต่อ)

สารบัญภาพ

ภาพที่

หน้า

13. การเพิ่มปริมาณและพัฒนาการของกลุ่มยอดที่เจริญจากส่วนปลายยอด
เอ็มบริโอ

42



การเกิดโซมาติคเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน พันธุ์การค้าในสภาพปลอดเชื้อ

SOMATIC EMBRYOGENESIS OF OIL PALM (*Elaeis guineensis* Jacq.) THROUGH *IN VITRO* CULTURE

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์¹ ศิริชัย อุ่นศรีสง² ประสาทพร กอวยชัย¹
สมพร มีแสงแก้ว¹ และ ปณิดา กันถาด¹

JIRASAK WICHASAWASDI¹ SIRICHAH UNSRISONG²
PRASATPORN KOAUYYCHAI¹ SOMPHON MEESANGKAEW¹
AND PANIDA KUNTUD¹

1. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ - ชุมพร

1. Maejo University at Chumphon.

2. ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

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

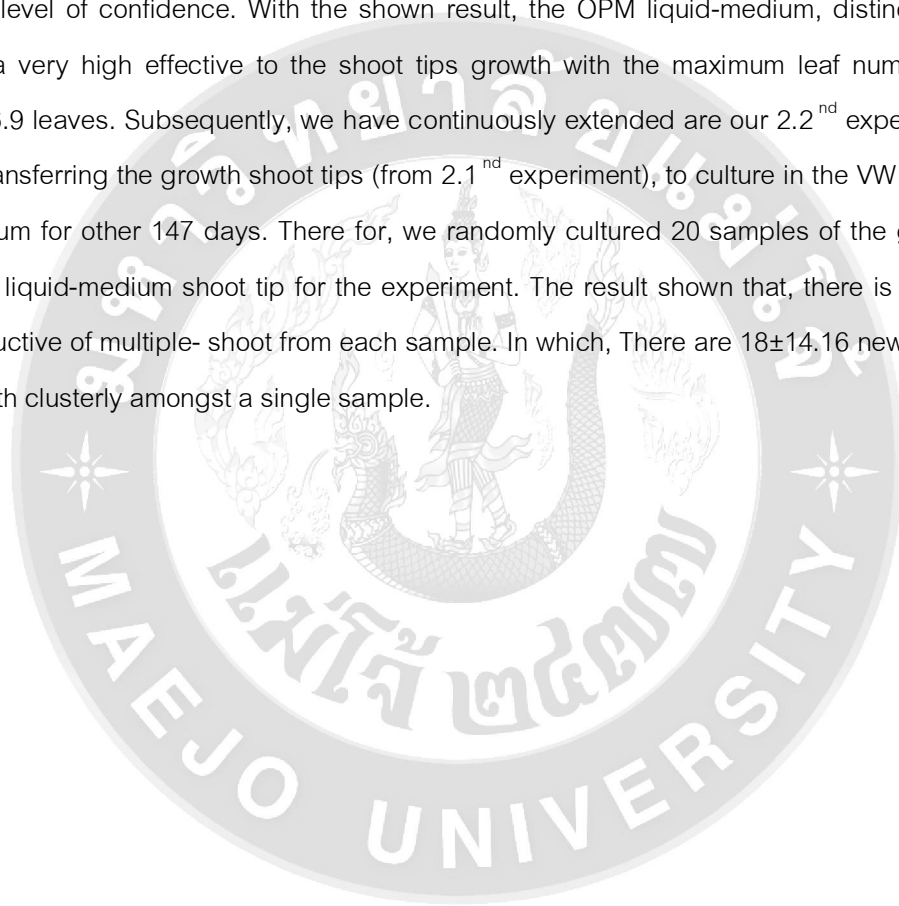
Thailand

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัย คือ ศึกษาการเกิดโซมาติคเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์การค้าในสภาพปลอดเชื้อ (การทดลองที่1) และ ศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ส่วนปลายยอด โดยมีการเปรียบเทียบผลของอาหารแข็งและอาหารเหลว สูตร OPM ที่มีต่อการเติบโตของชิ้นส่วนปลายยอดในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อเลี้ยงนาน 190 วัน พบว่า อาหารเหลว ทำให้มีจำนวนใบมากที่สุด 6.4 ± 6.9 ใบ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หลังจากนั้นได้นำยอดที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว (จากการทดลองที่ 2.1) จำนวน 20 ตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW นาน 147 วัน พบว่า มีการเพิ่มปริมาณยอดเฉลี่ย 18 ± 14.16 ยอดต่อชิ้นส่วน

Abstract

The objective of this research is study on the somatic embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) through *in vitro* culture (1st experiment) and the study of shoot multiplication of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) by shoot tip culture. A comparison of the OPM liquid-medium and OPM solid-medium cultured the Oil palm shoot tips for a period of 190 days. According to the paired t-test, means are significantly different at 95% level of confidence. With the shown result, the OPM liquid-medium, distinctively, has a very high effective to the shoot tips growth with the maximum leaf number of 6.4 ± 6.9 leaves. Subsequently, we have continuously extended are our 2.2nd experiment by transferring the growth shoot tips (from 2.1nd experiment), to culture in the VW liquid-medium for other 147 days. There for, we randomly cultured 20 samples of the growth OPM liquid-medium shoot tip for the experiment. The result shown that, there is a high productive of multiple- shoot from each sample. In which, There are 18 ± 14.16 new shoot growth clusterly amongst a single sample.



คำนำ

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledonous) ที่มีอายุหลายปี จัดเป็นพืชที่มีการผสมพันธุ์แบบผสมข้าม (allogamous) (Gorret *et al.*, 2004) มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ คือ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย อัตราการเพิ่มของการผลิตปาล์มน้ำมันในโลก สำหรับประเทศนำเข้ารายใหญ่ในปี 2545 คือ อินเดีย ยุโรป จีน และปากีสถาน(ชาย และสุรจิตติ, 2548) ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในระดับโลก ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่มากกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ (Gorret *et al.*, 2004; ธีระ และคณะ, 2548) สำหรับส่วนแบ่งการผลิตน้ำมันปาล์มต่อน้ำมันพืชของโลกเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ถูกนำมาใช้ร่วมกับเทคนิควิธีการต่างๆ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช (Chukwuemeka *et al.*, 2005; Duval *et al.*, 1993) ได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันมายาวนานหลายปีแล้ว เพื่อพัฒนาศักยภาพในการเพิ่มผลผลิตปาล์มน้ำมัน เริ่มต้นจากเมื่อปี ค.ศ.1991 มีผู้ศึกษาชักนำให้เกิดต้นใหม่ (regenerable) โดยการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในสภาพอาหารเหลว (embryogenic cell suspension culture) ซึ่งพัฒนาการมาจากใบอ่อน (de Touchet *et al.*,1991) ในเวลาต่อมา ได้มีผู้ศึกษาตัดแยกไซโกติกเอ็มบริโอ (zygotic embryo) จากผลปาล์มแล้วนำไปชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อเอ็มบริโอเจนิค (embryogenic tissue) (Gorret *et al.*, 2004) แม้ว่าทั้งสองวิธีการดังกล่าวต่างประสบความสำเร็จสามารถทำให้เกิดไซโกติกเอ็มบริโอจากการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคในสภาพอาหารเหลว(embryogenic suspension culture) แต่ก็มีข้อจำกัดคือ มีอัตราการเกิดไซมาติคเอ็มบริโอต่ำ ในปี ค.ศ. 1999 Aberlenc-Bertossi ได้พัฒนาวิธีการเพื่อปรับปรุงคุณภาพในการชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มปริมาณยอด (Gorret *et al.*, 2004) ในปี ค.ศ. 2002 Te-chato และคณะ รายงานว่า การชักนำให้เกิดไซมาติคเอ็มบริโอจากใบอ่อน (young leaf culture) เป็นวิธีหนึ่งในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ส่วนใหญ่ใช้สารไดแคมบา (dicamba) เป็นปัจจัยสำคัญในการส่งเสริมขบวนการนี้ อย่างไรก็ตาม อัตราการพัฒนาของไซมาติคเอ็มบริโอเป็นพืชต้นใหม่นั้น ยังคงมีอัตราต่ำอยู่ การส่งเสริมให้เกิดการงอกของไซมาติคเอ็มบริโอจึงเป็นเรื่องสำคัญต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในเชิงการค้า (Hilae และ Te-chato, 2005)

ในปัจจุบัน ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันอย่างกว้างขวางมากขึ้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นกระบวนการที่ใช้หลักการ “true-to-type” ต้นที่ได้ตรงตามสายพันธุ์ เช่น ผลผลิตสูง มีความต้านทานโรค ทนต่อสภาพแห้งแล้ง และต้นไม่สูงมากนัก

(Mutert E., 1999) ปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความปลอดภัย ตรงตามสายพันธุ์ ได้ต้นปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว

งานวิจัยนี้ มุ่งศึกษาผลของ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) และ IAA (Indole acetic acid) ต่อการเกิดไซมาติคเอมบริโอของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ และศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ส่วนปลายยอดเพื่อนำความรู้ประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันเชิงการค้าในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของ 2,4 -D และ IAA ต่อการเกิดไซมาติคเอมบริโอของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ
2. เพื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ส่วนปลายยอด
3. เพื่อให้ทรัพยากรที่มีอยู่แล้วในพื้นที่ให้เป็นประโยชน์ทางการศึกษา วิจัยและพัฒนา



การตรวจเอกสาร

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชน้ำมันที่ให้น้ำมันในปริมาณสูง (Abdullah *et al.*, 2005) สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล จังหวัดที่มีการปลูกมากที่สุดในประเทศไทย ได้แก่ กระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง ตามลำดับ (ชาย และสุรจิตติ, 2548 ; ธีระ และคณะ, 2548) สายพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า ได้แก่ ลูกผสมเทเนอรา (ดูรา X ฟิลีเฟอรา) (ชาย และสุรจิตติ, 2548) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูป ปาล์มน้ำมัน คือ ครีมเทียม มาการีน (เนยเทียม) เนยขาว วานาสปาติ ไขมัน และน้ำมันทอด ผลิตภัณฑ์วิตามินอี อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ หรือใช้ทำสบู่ (วิชัย, 2548)

ได้มีการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์ม น้ำมันอย่างต่อเนื่องและกว้างขวาง การพัฒนางานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่สำคัญ เริ่มต้น ในปี ค.ศ.1970 Rabechault และคณะ ได้ศึกษาการเลี้ยงกลุ่มเซลล์โคโลนี (cell colonies) และ เอ็มบริอยด์ (embryoids) จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากเอ็มบริโอ (embryo callus) ในปี ค.ศ. 1970 Staritsky พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดอ่อน (apical explant) สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ในขณะเดียวกัน ได้มีนักวิทยาศาสตร์ คือ Smith และ Jones ศึกษากระตุ้นให้เกิดแคลลัสและเซลล์แขวนลอย (cell suspension) จากการเลี้ยงเอ็มบริโอได้ ในปี ค.ศ. 1972 Rabechalt และคณะ ศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) ที่ได้จากแคลลัส ต่อมา ในปี ค.ศ. 1973 Smith และ Thomas ได้ศึกษาเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวหรือเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension cultures) โดยใช้ชิ้นส่วนรากและเนื้อเยื่อปลายยอด (apical tissue) ในปี ค.ศ. 1974 Jones ได้ศึกษาวิธีการเก็บรักษาเอ็มบริอยด์และพัฒนาการของต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ (Bajaj, 1989)

Gorret *et al.* (2004) รายงานว่า ได้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน โดยใช้วิธีเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension cell) ในระบบไบโอรีแอคเตอร์ (bioreactor) การขยายพันธุ์โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นพืชที่มีอายุหลายปี และเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวนั้น มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตปาล์มน้ำมันให้ได้ผลผลิตสูง ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์ม น้ำมันภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์ ได้ศึกษาธาตุอาหาร (nutrients) และขบวนการเมตาบอลิท์ ภายในเซลล์ (extracellular metabolites) ค่าพารามิเตอร์ไคเนติก (kinetic parameters) และ ธาตุอาหารกับผลผลิตชีวมวล (nutrient - to - biomass conversion yields) จากการวิเคราะห์ พบว่า แหล่งธาตุไนโตรเจน ขนาดชิ้นส่วน ส่วนประกอบอาหาร (conditioned medium) มีผลต่อการผลิตต้นพันธุ์ปริมาณมาก (biomass production) ในขวดรูปชมพู่ (flask cultures) ปริมาณ

กลูตามีน (glutamine) ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณขึ้นส่วน ปริมาณ และความหนาแน่น (density) แอมโมเนีย ส่วนประกอบอาหาร (conditioned medium) มีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive) และมีปฏิริยาแบบเสริมกัน (synergistic effects) กับการผลิตเนื้อเยื่อให้ได้ต้นจำนวนมาก (biomass production)

ในปี ค.ศ.1982 Hardon และคณะ ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตโคลน (clones) ใหม่ ๆ ของปาล์มน้ำมันเพื่อประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ มีการพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเซลล์เดี่ยวและการทำโปรโตพลาสต์เพื่อให้เกิดลักษณะใหม่ตามความต้องการ จุดประสงค์การปรับปรุงพันธุ์มีหลายประการ เช่น เพิ่มผลผลิตต่อไร่ การต้านทานโรค ปรับปรุงปริมาณน้ำมัน องค์ประกอบภายในเมล็ด ทนแล้ง เป็นต้น รวมทั้งได้มีการสร้างลูกผสมใหม่ ระหว่าง *Elaeis guineensis* และ *E.oleifera* เพื่อปรับปรุงให้มีคุณภาพดีขึ้น (Bajaj, 1989) ในปี ค.ศ.1993 Corley และคณะ ได้ปลูกปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแปลงปลูก พบว่า ปาล์มน้ำมันนั้นให้ผลผลิตสูง (Abdullah *et al.*, 2005)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอมบริโอปาล์มน้ำมันและการใช้ประโยชน์

ปี ค.ศ. 1985 Rohani และ Paranjothy ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอมบริโอปาล์มน้ำมันด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ร่วมกับไคเนติน และผงถ่าน ช่วยปรับสมดุลการพัฒนาการของยอดและรากได้ สำหรับการเพาะเลี้ยงเอมบริโอสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน งานวิจัยดังกล่าวประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเอมบริโอปาล์มน้ำมันพันธุ์ Pisifera (Bajaj, 1989) ในปีเดียวกัน Cui และคณะ สามารถชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอที่ตัดแยกจากเมล็ดบนอาหารที่เติม 2,4-D และ NAA (Naphthalene acetic acid) (สมปอง, 2539)

ในปี ค.ศ. 1986 Nwankwo และ Krikorian ได้รายงานการเพาะเลี้ยงไซโกติกเอมบริโอระยะเจริญเต็มที่ โดยใช้อาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 268.8 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้เกิดต้นสมบูรณ์ได้ (Trevor, 1995)

Teixeira *et al.* (1995) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงไซโกติกเอมบริโออ่อน (immature zygotic embryos) พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิดแน่นที่มีลักษณะก้อนกลม (primary globular callus) สำหรับกรณีเลี้ยงไซโกติกเอมบริโอที่เจริญเต็มที่ (mature zygotic embryos) ทำให้เกิดเนื้อเยื่อเอมบริโอเจริญชนิดหลวม (friable embryogenic tissue) โดยการเลี้ยงด้วยอาหารสูตร Eeuwens หรือ Y3 และสูตร Murashige and Skoog (1962) หรือ MS ที่เติม 2,4-D หรือ picloram

และผงถ่านกัมมันต์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิดแคลลัสชนิดหลวมได้ภายในเวลา 2 เดือน และในเวลา 3 - 5 เดือน สามารถเกิดแคลลัสชนิดแน่นที่มีลักษณะก้อนกลม สำหรับกลุ่มเนื้อเยื่อเอ็มบริโอเจนิคชนิดหลวมที่เลี้ยงในอาหารเหลวสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอและต้นที่สมบูรณ์ได้

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

Abdullah *et al.* (2005) รายงานไว้ว่า การเลี้ยงเอ็มบริโอเหมาะสมต่องานปรับปรุงพันธุ์ (breeding programs) ซึ่งได้ศึกษาวิธีการชักนำแคลลัส และกระตุ้นขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) จากชิ้นส่วนเอ็มบริโอ พบว่า เอ็มบริโอมีการตอบสนองได้ดีกว่าชิ้นส่วนใบและเนื้อเยื่อรากเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสในระยะเวลาอันสั้นกว่า มีประสิทธิภาพดีในการเจริญเป็นต้นกล้าใช้เวลาเพาะเลี้ยงน้อยและพบจำนวนต้นผิปกติน้อย มีการใช้เทคนิคนี้ร่วมกับการนำยีนเข้าสู่เซลล์หรือแคลลัสของปาล์มน้ำมันเพื่อพัฒนาพันธุ์ปาล์มให้มีลักษณะดีเด่นตามความต้องการ

การเกิดไซมาติคเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

มีรายงานความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน (young spear leaves) แต่แคลลัสพัฒนาเป็นไซมาติคเอ็มบริโอหรือเอ็มบริอยด์ได้น้อย และมีอัตราการงอกต่ำ (Wong *et al.*, 1997)

ในปี ค.ศ. 1970 Staritsky กับ Rabechault และคณะ ได้ศึกษาการชักนำแคลลัสจากใบปาล์มน้ำมันที่ได้จากเอ็มบริโอภายในเมล็ดของต้นที่ปลูกในสภาพแปลงปลูก (Wong *et al.*, 1997)

มีการใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ NAA พบว่า เกิดแคลลัสได้ 20 % เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือน นอกจากนี้ ปาล์มน้ำมันที่นำมาเลี้ยงเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสได้เพียง 3 % เท่านั้น ในการผลิตโคลนปาล์มน้ำมันจำนวนมากยังต้องมีการดำเนินการต่อไปโดยการศึกษาชักนำให้ส่วนเอ็มบริอยด์ (embryoid) พัฒนาเป็นยอด แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องนี้ (Wong *et al.*, 1997)

ได้มีผู้ศึกษาการใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ NAA ซึ่งเป็นสารกลุ่มออกซิน ในการชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction) โดยใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมันที่ตัดห่างจากส่วนเนื้อเยื่อส่วนปลายapical (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 พบเอ็มบริอยด์หรือไซมาติคเอ็มบริโอครั้งแรก เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วน 5 เดือน และจะเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสภายหลังจากเลี้ยงนานกว่า 18 เดือน (มีการเปลี่ยนย้ายอาหารทุก 2 เดือน) (Wong *et al.*, 1997)

Kamnoon และ Preamrudee (1999) ได้เลี้ยงไซโกติคเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์เทเนอรา ด้วยอาหารสูตร Eeuwens ที่เติม 2,4-D ปริมาณ 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและไซมาติคเอ็มบริโอได้ สำหรับไซมาติคเอ็มบริโอมีการพัฒนาเป็นต้นพืช นอกจากนี้ มีการใช้อาหารสูตร MS-CAP ที่เติม 2,4-D 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 2.5 มก./ล. เพื่อชักนำให้ไซมาติคเอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้นใหม่ (plantlet) ได้

Kamnoon และ Preamrudee (1999) รายงานว่า ลักษณะแคลลัสหลังเลี้ยงเอ็มบริโอนาน 4 สัปดาห์ พบเซลล์ 3 ถึง 4 เซลล์ ในชั้นเอพิเดอร์มิส (epidermis) เซลล์เหล่านี้มีขนาดเล็ก มีไซโทพลาสซึมที่เข้มข้น (dense cytoplasm) และมีนิวเคลียสสมบูรณ์ (well-stained nucleus) แคลลัสประกอบด้วยเซลล์เมอริสเต็มอยู่ภายใน แคลลัสมีการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่อง ภายหลังเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์ พบแคลลัสลักษณะก้อนกลม (nodular callus) เซลล์ที่อยู่ส่วนกลางของแคลลัสมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่อยู่โดยรอบ เซลล์แคลลัสที่อยู่โดยรอบศูนย์กลางเมอริสเต็ม (meristematic centers) พบว่า มีขนาดใหญ่และแวคิวโอลมาก แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นไซมาติคเอ็มบริโอหรือเอ็มบริอยด์ โดยพบการแบ่งเซลล์ในระยะต่างๆ คือ ระยะก้อนกลม (globular stage) และรูปหัวใจ (heart shape)

ในปี ค.ศ. 2002 Te-chato และคณะ รายงานว่า การชักนำให้เกิดไซมาติคเอ็มบริโอใช้วิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อน (young leaf culture) โดยส่วนใหญ่ใช้สารไดแคมบา (dicamba) ส่งเสริมขบวนการนี้ อัตราการพัฒนาของไซมาติคเอ็มบริโอเป็นพืชต้นใหม่นั้นยังต่ำอยู่ (Hilae และ Te-chato, 2005)

Abdullah *et al.* (2005) ได้เลี้ยงเอ็มบริโออ่อน (immature embryo) ของปาล์มน้ำมัน และสามารถเกิดแคลลัสด้วยอาหารสูตร N₆ 2.5 หรือสูตร Chu และคณะ, 1975 ที่เติม 2,4-D 2.5 มก./ล. และสูตร Chu และคณะ (ดัดแปลง) โดยเกิดแคลลัสภายหลังเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเอ็มบริโอเจเนติกแคลลัส (embryogenic callus) พัฒนาเป็นไซมาติคเอ็มบริโอ (somatic embryo)

ภายหลังเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ และพบไซมาติคเอมบริโอในระยะทอริปิโอ (torpedo-shaped) และระยะต้นอ่อน (plantlet) ในอาหารสูตร Chu และคณะ, 1975 ที่ไม่เติม 2,4-D

Hilae และ Te-chato (2005) ได้รายงานว่าการเติมแมนนิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในอาหารสูตร MS ช่วยส่งเสริมการเจริญรากของไซมาติคเอมบริโอได้สูงสุด 40 % การเติมน้ำตาล-แมนนิทอลความเข้มข้นสูง และการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารช่วยส่งเสริมการสร้างรากของปาล์มน้ำมัน

การเกิดไซมาติคเอมบริโอของพืชบางชนิดในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อปี ค.ศ. 1958 Reinert และ Steward พร้อมคณะ ได้มีการศึกษาเรื่องเอมบริโอเจนเนซิสเป็นครั้งแรกในแครอท (carrot) (Ikeda *et al.*, 2006)

Ikeda *et al.* (2006) ได้ศึกษาการใช้ 2,4-D เพื่อส่งเสริมการพัฒนาการของไซมาติค - เอมบริโอของพืชสกุล Arabidopsis โดยใช้ส่วนตายอด (shoot apical tip) มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร B₅ ที่เติม 2,4-D 4.5 ไมโครโมลาร์ แต่ไม่เติมสารฮอร์โมนพืช (phytohormone) พบว่า เกิดการพัฒนาของไซมาติคเซลล์จากเซลล์เมอร์ริสเต็มของตายอด (shoot apical meristem cells) และเกิดไซมาติคได้

ในปี ค.ศ. 1995 Sako และ Lou ได้รายงานว่าการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง (0.25 หรือ 0.5 โมลาร์) ส่งเสริมการงอกไซมาติคเอมบริโอของแตงกวา (cucumber) (Hilae และ Te-chato, 2005)

ในปี ค.ศ. 2000 Mamima และ Sakamoto รายงานว่าการงอกของไซมาติคเอมบริโอของหน่อไม้ฝรั่ง (asparagus) เกิดได้ดีเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่มีปริมาณธาตุ 2 เท่าของสูตร MS (double strength MS medium) ในปี ค.ศ. 2005 พบว่า สูตร MS ที่เติม dicamba ช่วยส่งเสริมการชักนำให้เกิดไซมาติคเอมบริโอจากใบอ่อนและราก (Hilae และ Te-chato, 2005)

Hilae และ Te-chato (2005) กล่าวว่า มีผู้ศึกษาชนิดของน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน คือ กลูโคส ฟรุคโตส แมนนิทอล และซอร์บิทอล ส่งผลต่อการงอกของไซมาติคเอมบริโอในหน่อไม้ฝรั่ง (asparagus) และแตงกวา (cucumber)

Ikeda *et al.* (2006) กล่าวว่า เอ็มบริโอเจเนซิสเป็นขบวนการหนึ่งที่สำคัญในวงจรชีวิตของพืชขบวนการหนึ่ง เริ่มจากการปฏิสนธิซ้อน (double fertilization) หลังจากนั้น เกิดส่วนหลักของเอ็มบริโอ 3 ส่วน คือ longitudinal lateral และ radial และเกิดการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเอ็มบริโอ (morphologic changes of the embryos) คือ ระยะก่อนกลม รูปหัวใจ และ ระยะทอริปโด ในเวลาต่อมาเกิดการสะสมโปรตีนในเมล็ดและภายในเอ็มบริโอ (seed storage proteins accumulate in the embryos) และสุดท้ายเอ็มบริโอพักตัว ขบวนการเหล่านี้มีปัจจัยเกี่ยวข้อง คือ ฮอโมนพืช (phytohormones) เอนไซม์และสารประกอบอื่นที่จำเป็นต่อขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส ได้มีความพยายามศึกษาเพื่อให้เข้าใจกลไกที่ควบคุมการเกิดเอ็มบริโอในพืช การศึกษาการเกิดไซมาติกเอ็มบริโอในระบบเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นแนวทางหนึ่งที่ควบคู่กับการศึกษาในสภาพธรรมชาติ



ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีขอบเขตตั้งแต่การเตรียมชิ้นส่วนเอมบริโอโดยคัดเลือกเมล็ดพันธุ์เทเนอร์่าจากต้นที่ให้ผลผลิตสูงซึ่งปลูก ณ ฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้ - ชุมพร นำเมล็ดมาตัดแยกเอมบริโอแล้วนำเอมบริโออ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว แบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ งานวิจัยมุ่งเน้นศึกษาผลของ 2,4-D และ IAA ต่อการเกิดไซมาติคเอมบริโอของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ และมุ่งเน้นศึกษาเพิ่มปริมาณยอดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ส่วนปลายยอดเพื่อนำองค์ความรู้ประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันในอนาคตต่อไป รวมทั้งเป็นประโยชน์ต่องานส่งเสริมการปลูกปาล์มน้ำมันให้กับเกษตรกร การนำผลงานวิจัยตีพิมพ์เผยแพร่และเป็นเอกสารทางวิชาการต่อไป



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการเตรียมอาหารย้ายเนื้อเยื่อ และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. สารเคมี ได้แก่
 - 2.1 สารที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962) หรือ MS
 - 2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ 6 - benzylaminopurine (BAP) และ Indole acetic acid (IAA)
 - 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร
 - 2.4 สารที่ใช้เตรียมอาหารสูตร Vacin และ Went (1949) หรือ VW (ตารางผนวกที่ 1)
 - 2.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร OPM (ตารางผนวกที่ 1)
3. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พร้อมชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ติดหลอดไฟ มีความเข้มแสง 1,500 - 3,000 ลักซ์
4. เครื่องเขย่า (shaker)
5. อุปกรณ์บันทึกภาพและข้อมูล
6. เมล็ด และผลอ่อน (immature fruit) ของปาล์มน้ำมันพันธุ์ tenera ต้นที่ให้ผลผลิต 3 - 5 ตัน/ไร่ จากฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร

วิธีการวิจัย

เริ่มดำเนินการวิจัย เมื่อเดือน ตุลาคม 2550 สิ้นสุดเดือน ธันวาคม 2553 รวมเป็นระยะเวลา 2 ปี 3 เดือน ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และ ฟาร์มมหาวิทยาลัยฯ โดยทำการสุ่มตัวอย่าง และทำรหัสต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตสูงจากฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร

การเตรียมชิ้นส่วนและการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเอมบริโอ

คัดเลือกต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา ที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งมีอายุประมาณ 5 ปี แล้วทำสัญลักษณ์กำหนดหมายเลขไว้ จากนั้นปลิดผลอ่อน ขนาดผล 3 X 3.5 เซนติเมตร ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 9.50 กรัมต่อผล นำเมล็ดพันธุ์มาล้างด้วยน้ำยาซันไลต์ 3 ครั้ง และน้ำสะอาด 3 ครั้ง ฉีดพ่นด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % 5 นาที แล้วปล่อยให้แห้ง ใช้มีดผ่าแบ่งผลบริเวณใกล้กับเอมบริโอ ปอกเปลือกหุ้มผล จากนั้นนำเอมบริโอที่ติดอยู่กับเนื้อผลมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรีน 10 % ที่เติมทวิน-20 (tween20) เขย่าเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ใช้ปากคีบ คีบเอมบริโอมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1 ผลของ 2,4 D และ IAA ต่อการเกิดไซมาติคเอมบริโอในสภาพปลอดเชื้อ

เพาะเลี้ยงเอมบริโออ่อน บนอาหารแข็งสูตร MS (pH 6.5) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.012 และ 0.024 มิลลิกรัมต่อลิตร (มก./ล.) ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0, 2 และ 3 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (%) วุ้น 0.7 % หนึ่งอาหารด้วยหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ 1.4 กก./ตร.ซม. เป็นเวลา 20 นาที เลี้ยงเอมบริโอในสภาพที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน (ชม./วัน) เป็นเวลา 355 วัน อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยง 25 ± 2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 3 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 18 ซ้ำ ๆ ละ 2 ชิ้นส่วนต่อขวด ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 อาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0 มก./ล. ร่วมกับ IAA 0 มก./ล.

สิ่งทดลองที่ 2 อาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.012 มก./ล. ร่วมกับ IAA 2 มก./ล.

สิ่งทดลองที่ 3 อาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.024 มก./ล. ร่วมกับ IAA 3 มก./ล.

บันทึกการเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏ ลักษณะการเจริญเติบโต เช่น ความสูงยอด จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวราก เป็นต้น พร้อมบันทึกภาพ

การทดลองที่ 2 การเพิ่มปริมาณยอดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ส่วนปลายยอด

เพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อน บนอาหารแข็งสูตร MS (pH 5.6) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 % ผงวุ้น 7 % อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยง 25 ± 2 องศาเซลเซียส เลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (cool-white fluorescent light) 16 ชม./วัน เป็นเวลา 45 วัน หลังจากนั้น ตัดแยกปลายยอด (shoot tip) ของเอ็มบริโอ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย คือ

การทดลองที่ 2.1 เปรียบเทียบของผลการเลี้ยงส่วนปลายยอดด้วยอาหารเหลว และอาหารแข็ง

นำส่วนปลายยอดมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร OPM (ดูตารางผนวกที่ 1) และในอาหารเหลวสูตร OPM (pH 5.6 -5.7) ที่มี BAP เข้มข้น 0.46 มก./ล. ร่วมกับ IAA 0.01 มก./ล. น้ำมะพร้าว 3 มล./ล. น้ำตาลซูโครส 3 % กรณีเลี้ยงในอาหารเหลว ไม่เติมผงวุ้น โดยวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที สำหรับอาหารแข็งเติมผงวุ้น 0.7 % (w/v) (หนึ่งอาหารด้วยหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ 1.4 กก./ตร.ซม. เป็นเวลา 20 นาที) เลี้ยงปลายยอดดังกล่าวในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชม./วัน อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยง 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 190 วัน

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 2 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 20 ซ้ำ ๆ ละ 1 ชั้นส่วนต่อขาด ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 อาหารแข็งสูตร OPM

สิ่งทดลองที่ 2 อาหารเหลวสูตร OPM

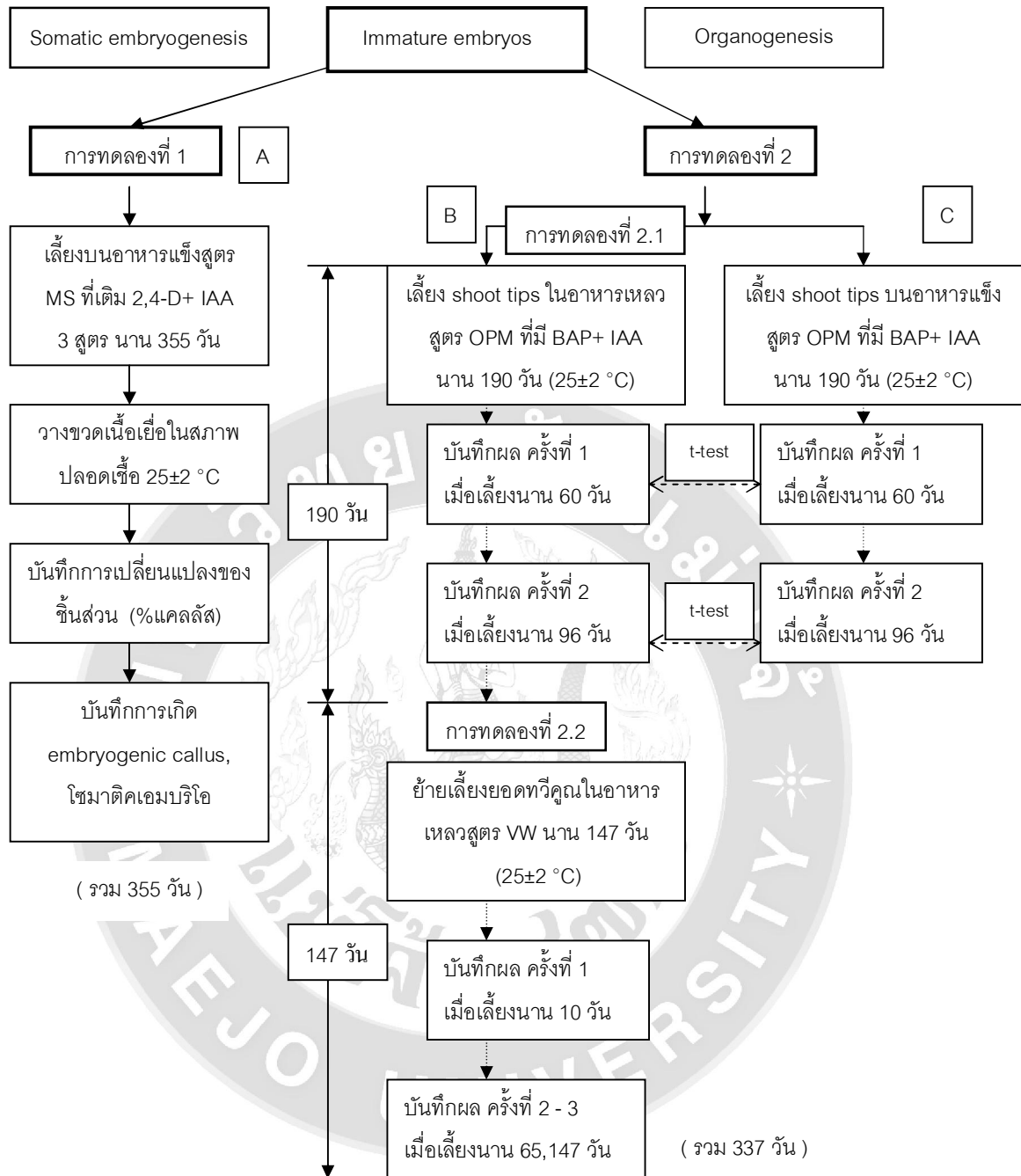
บันทึกการเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏ เมื่อเลี้ยงนาน 90 96 และ 190 วัน เช่น จำนวนใบ ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางชั้นส่วน เป็นต้น พร้อมบันทึกภาพ วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี One - sample t - test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$)

การทดลองที่ 2.2 ผลของอาหารเหลวสูตร VW ต่อการพัฒนายอด

นำส่วนกลุ่มยอดที่เกิดจากปลายยอดซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 - 1.0 ซม. และผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM (pH 5.6 - 5.7) เป็นเวลา 190 วัน จากการทดลองที่ 2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW (1949) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. น้ำมะพร้าว 150 มล./ล. ปรับค่า pH 4.8 - 5.2 (ดูตารางผนวกที่ 1) วางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อบนเครื่องเขย่า ที่มีความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที เลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชม./วัน อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยง 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 147 วัน

บันทึกการเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏ เมื่อเลี้ยงนาน 10 65 และ 147 วัน เช่น ความกว้างกลุ่มยอด ความยาวกลุ่มยอด จำนวนกลุ่มยอด ความยาวยอดใหม่ การสร้างใบย่อย จำนวนใบย่อย เป็นต้น พร้อมบันทึกภาพ หาค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง สุ่มเก็บข้อมูล 20 ตัวอย่าง





ภาพที่ 1 แผนผังวิธีการวิจัย

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 ผลของ 2,4-D และ IAA ต่อการเกิดไซมาติคเอมบริโอในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อนำเอมบริโออ่อน มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร MS (pH 6.5) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.012 และ 0.024 มิลลิกรัมต่อลิตร (มก./ล.) ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0, 2 และ 3 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (%) วุ้น 0.7 % เลี้ยงภายใต้สภาพแสง เป็นเวลา 355 วัน ปรากฏผล ดังนี้

1. การเกิดยอดและราก

เมื่อเลี้ยงเอมบริโอ นาน 355 วัน พบว่า เอมบริโอมีการพัฒนายอดและรากได้ดี ในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สำหรับสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.012 มก./ล. ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2 มก./ล. และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.024 มก./ล. ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 3 มก./ล. ขึ้นส่วนมีการขยายขนาด แต่ไม่เกิดยอดและราก (ตารางที่ 1, ภาพที่ 2)

2. เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต

เมื่อเลี้ยงเอมบริโออ่อน ด้วยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.024 มก./ล. ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 3 มก./ล. ทำให้ขึ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด 100 % รองลงมา คือ การใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0.012 มก./ล. ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2 มก./ล. คิดเป็น 86.36 %

สำหรับอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำให้เปอร์เซ็นต์ขึ้นส่วนมีชีวิตน้อยที่สุด 48.15 % (ตารางที่ 2, ภาพที่ 2)

3. เปอร์เซ็นต์การเกิดไซมาติคเอ็มบริโอ ในระยะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.012 มก./ล. ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ทำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด 4.55 % รองลงมาคือ อาหารสูตรที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.024 มก./ล. ร่วมกับ IAA เข้มข้น 3 มก./ล. คิดเป็น 2.27 % ส่วนการไม่เติม 2,4-D และ IAA พบว่า ไม่เกิดแคลลัส (ตารางที่ 1, ภาพที่ 2)

4. ขนาด, ลักษณะก้อนแคลลัสที่ปรากฏ และอื่นๆ

เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนเอ็มบริโออ่อน ด้วยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.012 มก./ล. ร่วมกับ IAA เข้มข้น 2 มก./ล. และสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.024 มก./ล. ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 3 มก./ล. พบว่า สามารถเกิดไซมาติคเอ็มบริโอในระยะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (embryogenic callus) แบบหลวม มีรูปร่างไม่แน่นอน สีขาวขุ่น ส่วนการเติม 2,4-D และ IAA ความเข้มข้น 0 มก./ล. พบว่า ไม่เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (ตารางที่ 1, ภาพที่ 2)

จากการทดลองที่ 1 ปรากฏว่า ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ IAA ระดับต่างๆ สามารถชักนำให้เกิดไซมาติคเอ็มบริโอ ในระยะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดังกล่าวอยู่ในระดับต่ำ และแคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นไซมาติคเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ได้ จึงไม่ได้นำไปศึกษาทดลองต่อไป

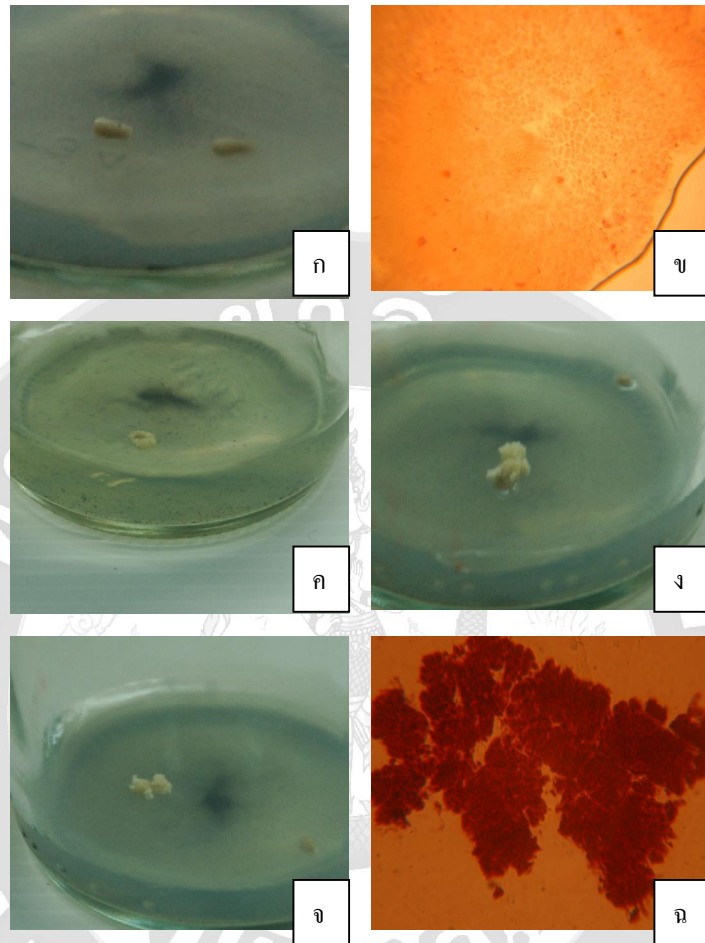
ตารางที่ 1 เพอร์เซ็นต์รอดชีวิตของชิ้นส่วน เพอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดแคลลัส รูปร่างแคลลัส เมื่อเลี้ยงเอ็มบริโออ่อน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ IAA นาน 355 วัน

สูตรอาหาร MS ที่เติม		ลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏ				
2,4-D (มก./ล.)	IAA (มก./ล.)	เพอร์เซ็นต์ รอดชีวิตของ ชิ้นส่วน	เพอร์เซ็นต์ การเกิด แคลลัส ^{1/}	ขนาด แคลลัส (มิลลิเมตร)	รูปร่างของ แคลลัส	ลักษณะอื่นๆ
0	0	48.15	0	-	-	มีการพัฒนาเป็น ยอดและราก
0.012	2	86.36	4.55	3.5 X 4.5	ไม่แน่นอน	ไม่มีการพัฒนา ยอดและราก
0.024	3	100	2.27	3.0 X 5.0	ไม่แน่นอน	ไม่มีการพัฒนา ยอดและราก
เฉลี่ย		78.17	2.27	-	-	

หมายเหตุ

1/ = นับเฉพาะแคลลัสชนิดแน่นที่มีลักษณะก้อนกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง

2 - 3 มิลลิเมตร



ภาพที่ 2 พัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และลักษณะเซลล์ภายในแคลลัส

- ก) เอ็มบริโออ่อน ในระยะเริ่มเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์
- ข) เซลล์ของเอ็มบริโออ่อนที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพตัดตามขวาง กำลังขยาย 10 เท่า)
- ค) เอ็มบริโออ่อนมีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส
- ง - จ) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการขยายขนาดมากขึ้น
- ฉ) ลักษณะเซลล์ภายในแคลลัสชนิดหลวมที่เปลี่ยนแปลงจากเอ็มบริโออ่อน เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่เติม 2,4-D และ IAA (กำลังขยาย 40 เท่า)

การทดลองที่ 2 การเพิ่มปริมาณยอดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ส่วนปลายยอด

แบ่งการทดลอง เป็น 2 การทดลองย่อย คือ

การทดลองที่ 2.1 เปรียบเทียบของผลการเลี้ยงส่วนปลายยอดด้วยอาหารเหลว และอาหารแข็ง

เมื่อนำส่วนปลายยอด (Shoot tips) ของเอ็มบริโอ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OPM (pH 5.6 -5.7) ที่มี BAP ความเข้มข้น 0.46 มก./ล. ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.01 มก./ล. (เปรียบเทียบการเลี้ยงบนอาหารแข็งกับ เลี้ยงในอาหารเหลว) เป็นเวลา 190 วัน ผลปรากฏ ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏ เมื่อเลี้ยงปลายยอด นาน 60 วัน

1.1) จำนวนใบ

อาหารเหลวสูตร OPM ที่มี BAP ร่วมกับ IAA ทำให้มีจำนวนใบ เท่ากับ 2.68 ± 1.05 ใบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนใบที่เลี้ยงขึ้นส่วนบนอาหารแข็ง ซึ่งมีใบ 1.55 ± 1.11 ใบ (ตารางที่ 2, ภาพที่ 3)

1.2) ความยาวยอด

อาหารเหลวสูตร OPM ที่มี BAP ร่วมกับ IAA ทำให้ยอดมีความยาวมากที่สุด คือ 1.90 ± 0.83 ซม. (เซนติเมตร) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับยอดที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็งในสูตรเดียวกัน (ตารางที่ 2, ภาพที่ 4)

1.3) เส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วน

ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPM ที่มี BAP ร่วมกับ IAA ทำให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุด คือ 0.41 ± 0.08 ซม. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว

สำหรับลักษณะอื่นๆ ที่ปรากฏ คือ ปรากฏแคลลัส 25 % เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง ส่วนในอาหารเหลว ไม่ปรากฏแคลลัส แต่บางชิ้นส่วนมีการเจริญแขนงยอดเล็กๆ แต่ส่วนใหญ่ ยอดที่ปรากฏมีรูปร่างยังไม่สมบูรณ์

ตารางที่ 2 จำนวนใบ ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นส่วนปลายยอด เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 60 วัน

อาหาร ที่ใช้เลี้ยง	ลักษณะที่ปรากฏ			
	จำนวนใบเฉลี่ย* (ใบ)	ความยาวยอด (ซม.)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง ชิ้นส่วน (ซม.)	ลักษณะอื่นๆ
อาหารแข็ง สูตร OPM	1.55 ± 1.11 b ^{1/}	1.71 ± 0.80 a	0.41 ± 0.08 a	พบแคลลัส ^{2/} 25% ใบคล้ำ
อาหารเหลว สูตร OPM	2.68 ± 1.05 a	1.90 ± 0.83 a	0.32 ± 0.12 b	ไม่พบแคลลัส ใบสีเขียว
t-test; t-value	3.28	0.76	2.77	
Sig.	**	ns	**	
%CV.	51.28	44.98	27.49	

หมายเหตุ

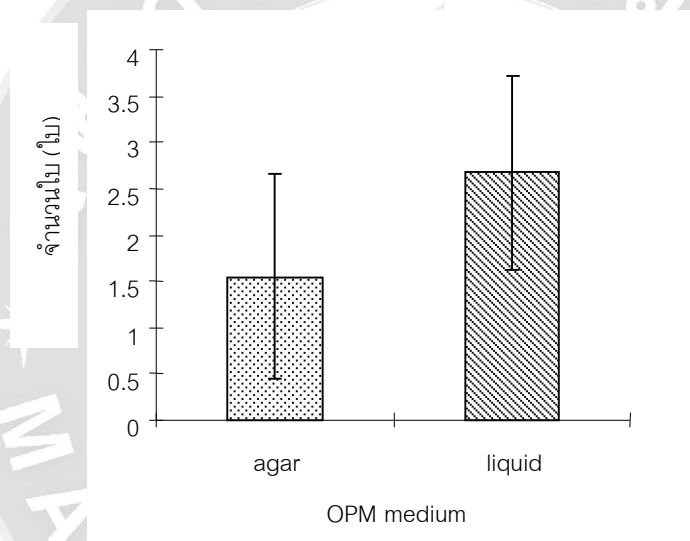
1/ ตัวเลขในแนวดิ่งที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย แบบ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์
± values represent the standard deviation (mean ± SD.)

** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Significant at $P < 0.01$)

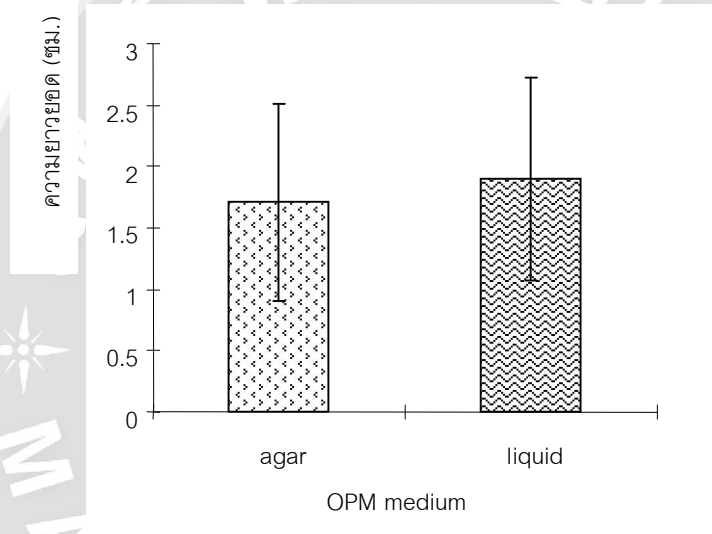
Ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Not significant at $P < 0.05$)

2/ = callus มีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ ที่ฐานชิ้นส่วนบริเวณใกล้รากเทียม

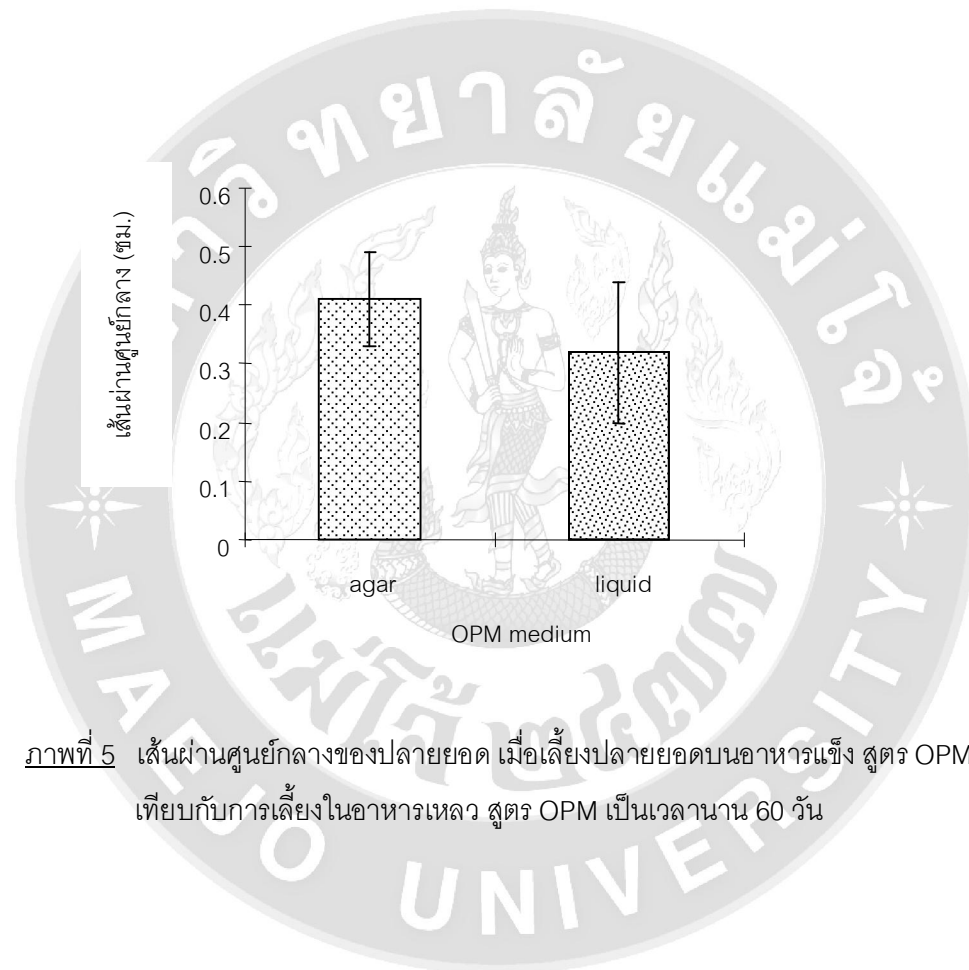
OPM = อาหารสูตรสำหรับเพิ่มจำนวนยอด (oil palm multiple shoot medium)



ภาพที่ 3 จำนวนใบที่ปรากฏ เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลานาน 60 วัน



ภาพที่ 4 ความยาวยอด เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลานาน 60 วัน



ภาพที่ 5 เส้นผ่านศูนย์กลางของปลายยอด เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลานาน 60 วัน

2.การเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏ เมื่อเลี้ยงปลายยอด นาน 190 วัน

2.1) จำนวนใบ

เมื่อเลี้ยงขึ้นส่วนด้วยอาหารเหลว สูตร OPM ที่มี BAP และ IAA ทำให้มีจำนวนใบมากที่สุด เฉลี่ย 6.38 ± 6.94 ใบ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเลี้ยงบนอาหารแข็งในสูตรเดียวกัน (ตารางที่ 3, ภาพที่ 6 และ 9)

2.2) ความยาวยอด

เมื่อเลี้ยงขึ้นส่วนด้วยอาหารแข็ง และอาหารเหลวสูตร OPM ที่มี BAP และ IAA ทำให้มีความยาวยอด 4.30 ± 2.26 ซม. และ 3.85 ± 1.48 ซม. ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 7)

2.3) เส้นผ่านศูนย์กลางขึ้นส่วน

เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง ทำให้ขึ้นส่วนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.91 ± 0.28 ซม. ส่วนการเลี้ยงในอาหารเหลว ทำให้ขึ้นส่วนมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.76 ± 0.41 ซม. แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 8)

นอกจากนี้ ผลการทดลอง พบว่า เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง ทำให้ใบมีลักษณะเรียวยาว ใบใหญ่ สำหรับการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร OPM พบว่า ขึ้นส่วนมีการสร้างกระจุกใบเล็กๆ จำนวนมาก ใบยังไม่สมบูรณ์ บางใบเรียวยาว สีเขียวเข้ม บางขึ้นส่วนมีสีเขียวอ่อน สีขาว ปลายใบมีสีน้ำตาล บางขึ้นส่วนพบก้อนเนื้อเยื่อผิวขรุขระ รูปร่างไม่แน่นอน ส่วนขึ้นส่วนบวมพอง มีสีเขียว

ตารางที่ 3 จำนวนใบ ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนยอด เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPM เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน

อาหาร ที่ใช้เลี้ยง	ลักษณะที่ปรากฏ			
	จำนวนใบ (ใบ)	ความยาวยอด (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง ส่วนยอด(ซม.)	ลักษณะอื่นๆ
อาหารแข็ง สูตร OPM	1.85 ± 0.92 b ^{1/}	4.30 ± 2.26 a	0.91 ± 0.28 a	ขึ้นส่วนมีสีเขียว ใบ เรียวยาว ใบใหญ่
อาหารเหลว สูตร OPM	6.38 ± 6.94 a	3.85 ± 1.48 a	0.76 ± 0.41 a	ใบเป็นกระจุก จำนวนมาก ใบเล็ก มาก สีเขียว
t-test; t-value	2.89	0.74	1.35	
Sig.	**	ns	ns	
%CV.	120.29	47.01	42.16	

หมายเหตุ

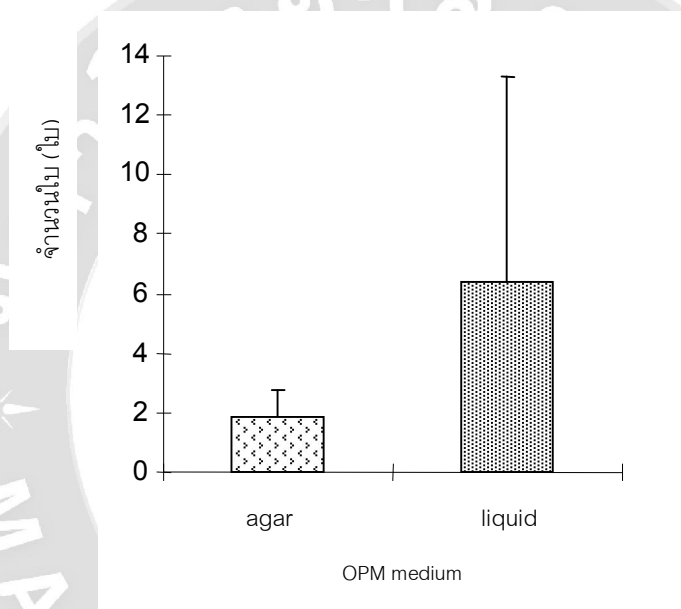
1/ ตัวเลขในแนวตั้งที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อ
วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย แบบ T - test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

$\pm$ values represent the standard deviation (mean $\pm$ SD.)

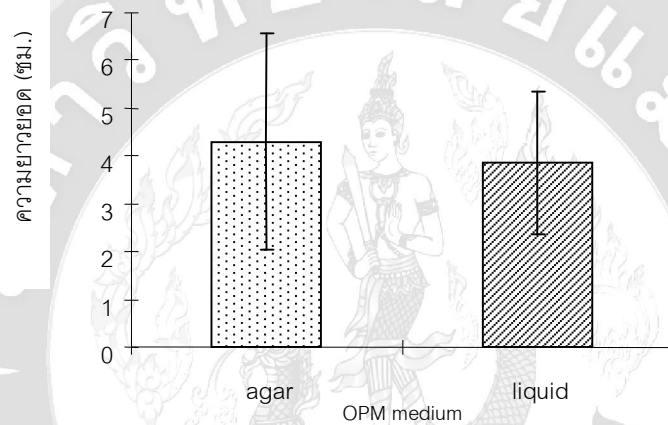
** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Significant at $P < 0.01$)

Ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Not significant at $P < 0.05$)

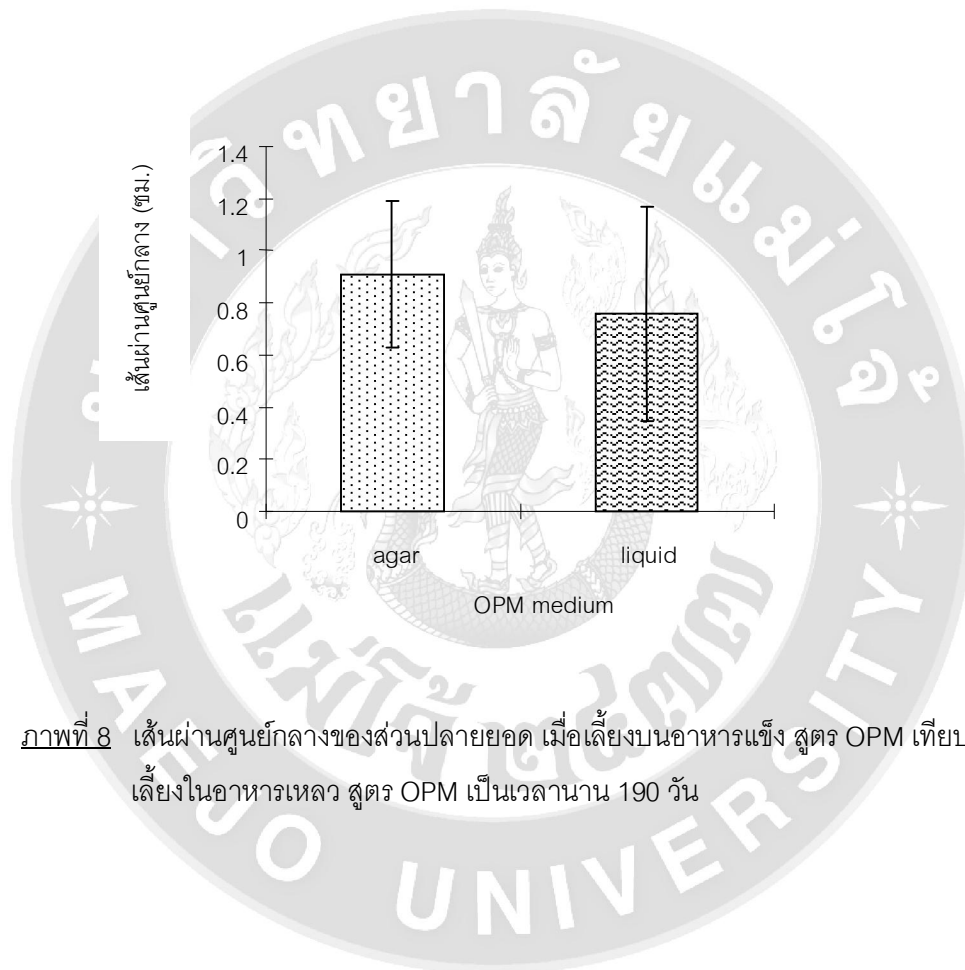
OPM = อาหารสูตรสำหรับเพิ่มจำนวนยอด (oil palm multiple shoot medium)



ภาพที่ 6 จำนวนใบที่ปรากฏ เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับการเลี้ยง
ในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลานาน 190 วัน



ภาพที่ 7 ความยาวยอด เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลานาน 190 วัน



ภาพที่ 8 เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนปลายยอด เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร OPM เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลานาน 190 วัน



ภาพที่ 9 การเจริญและพัฒนาของส่วนปลายยอด และลักษณะของกลุ่มยอด (cluster shoot)

(ก) เมื่อเลี้ยงปลายยอดด้วยอาหารแข็งสูตร OPM เป็นเวลา 190 วัน

(ข) เมื่อเลี้ยงปลายยอด ในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลา 190 วัน

การทดลองที่ 2.2 ผลของอาหารเหลวสูตร VW ต่อการพัฒนายอด

1. เมื่อนำส่วนปลายยอดที่เกิดกลุ่มยอดซึ่งผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลา 190 วัน มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW(1949) เป็นเวลา 10 วัน ปรากฏผลดังนี้

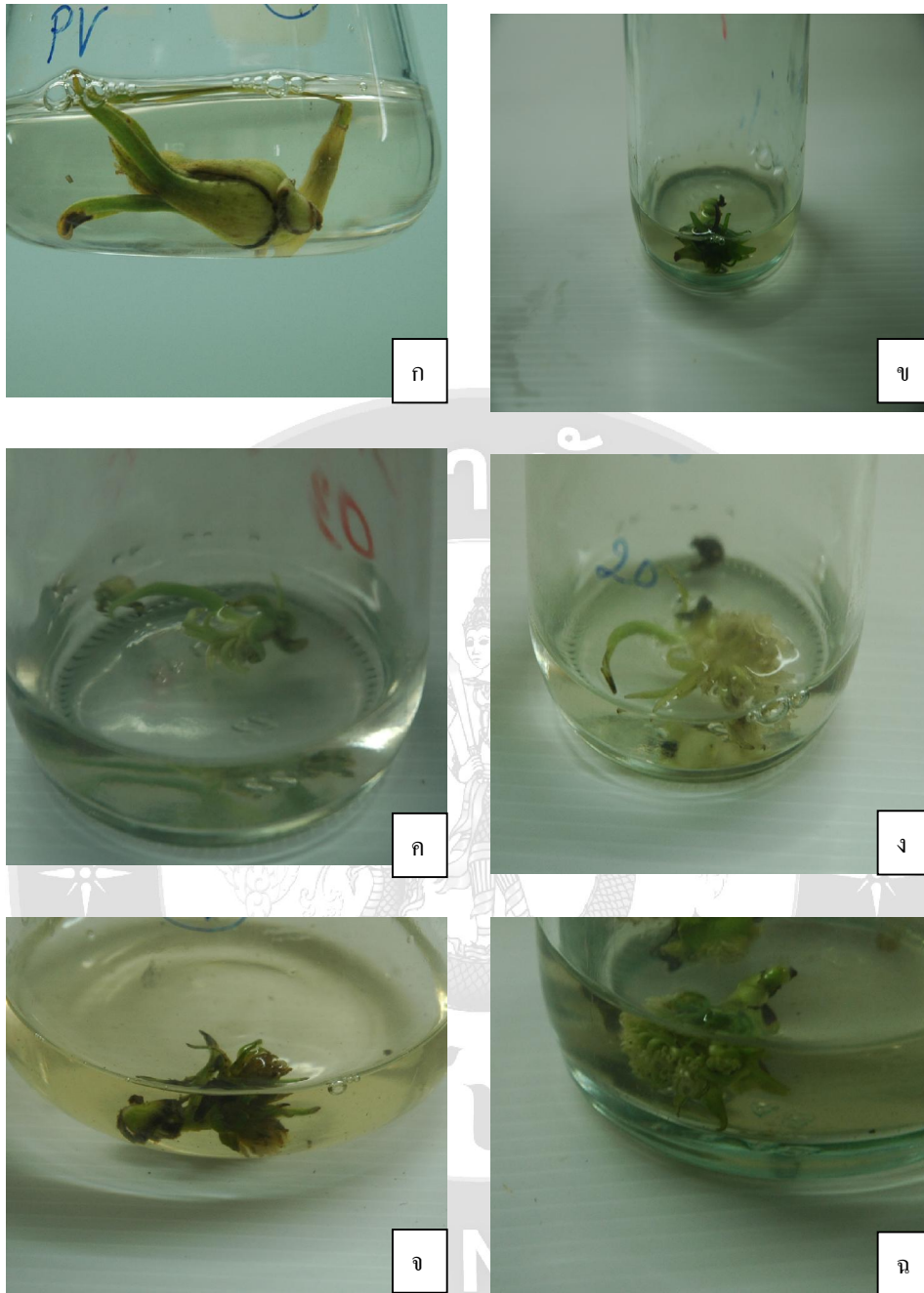
ชิ้นส่วนกลุ่มยอดมีขนาดเพิ่มขึ้น มีความกว้าง 1.06 ± 0.51 ซม. และความยาว 2.11 ± 0.76 ซม. เกิดกลุ่มยอดขนาดเล็ก เฉลี่ย 6.30 ± 11.36 ยอด สำหรับความยาวยอดเฉลี่ย เท่ากับ 0.75 ± 0.87 ซม. มีการสร้างใบย่อยขนาดเล็ก 70 % (ตารางที่ 4, ภาพที่ 10)

นอกจากนี้ บางชิ้นส่วนพบใบย่อยอัดเรียงกันแน่นตรงกลางชิ้นส่วน ขนาดใบย่อย ประมาณ 1×3 มม. แต่ในบางชิ้นส่วน พบว่า ตรงกลางชิ้นส่วนมีลักษณะป่อง พองตัว และบางชิ้นส่วนไม่เกิดใบย่อย แต่ใบยืดยาวออก ชิ้นส่วนขยายขนาดเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบแคลลัส

2. เมื่อนำชิ้นส่วนปลายยอดที่เกิดกลุ่มยอดซึ่งผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลา 190 วัน มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW เป็นเวลา 122 วัน รวม 312 วัน พบว่า

ชิ้นส่วนกลุ่มยอด มีการเปลี่ยนแปลงด้านขนาดเพิ่มขึ้น โดยมีความกว้างเฉลี่ย เท่ากับ 1.63 ± 1.20 ซม. ความยาวเฉลี่ย 3.05 ± 1.08 ซม. จำนวนกลุ่มยอดขนาดเล็ก เฉลี่ย 9.69 ± 12.15 ยอด ความยาวยอดใหม่ เฉลี่ย 0.83 ± 0.64 ซม. มีการสร้างใบย่อยขนาดเล็ก คิดเป็น 92 % มีจำนวนใบย่อย เฉลี่ย 51.38 ± 102.13 ใบ สำหรับ คะแนนการเกิดยอด เท่ากับ 2 คะแนน (ตารางที่ 4, ภาพที่ 11)

นอกจากนี้ กลุ่มยอดส่วนใหญ่เป็นยอดที่มีสีเขียว มีลักษณะอัดตัวกันแน่น มีกลุ่มยอดที่มองเห็นใบย่อย ขนาด 2×3 มม. เป็นแผ่นใบเล็กๆ ใบที่เกิดชิ้นส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก แต่มีรูปร่างค่อนข้างสมบูรณ์ ขนาดประมาณ 2×2 มม. ขึ้นไป ลักษณะใบเรียวเล็ก มองดูคล้ายแผ่นใบที่มีขนาดเล็ก



ภาพที่ 10 การเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนปลายยอด และการเกิดกลุ่มยอด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยง ในอาหารเหลว สูตร VW (1949) เป็นเวลา 10 วัน เพื่อเพิ่มกลุ่มยอด รวมเลี้ยง 200 วัน (ระยะ ก - ฉ)

3. เมื่อนำชิ้นส่วนปลายยอดที่เกิดกลุ่มยอด ซึ่งผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลา 190 วัน มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW เป็นเวลา 147 วัน รวม 337 วัน พบว่า

ชิ้นส่วนกลุ่มยอด มีการเปลี่ยนแปลงด้านขนาดเพิ่มขึ้น โดยมีความกว้างเฉลี่ย เท่ากับ 2.98 ± 1.18 ซม. ความยาวเฉลี่ย 4.17 ± 0.60 ซม. จำนวนกลุ่มยอด เฉลี่ย 18 ± 14.16 ยอด ความยาวยอดใหม่ เฉลี่ย 1.45 ± 0.81 ซม. เปอร์เซ็นต์การสร้างใบย่อย คิดเป็น 100 % มีจำนวนใบย่อย เฉลี่ย 25.5 ± 18.36 ใบ สำหรับ คะแนนการเกิดยอด เท่ากับ 3 คะแนน (ตารางที่ 4, ภาพที่ 12)

สำหรับเส้นผ่านศูนย์กลางกลุ่มยอดอ่อน มีค่าเฉลี่ย 0.72 ± 0.45 ซม. นอกจากนี้ ยอดที่เกิดใหม่มีสีเขียวเข้มและสีเขียว อย่างละ 50 % สีโคนชิ้นส่วนมักมีสีเขียว หรือสีเขียวปนน้ำตาล



ตารางที่ 4 ความกว้างและความยาวกลุ่มยอด จำนวนกลุ่มยอด ความยาวยอดใหม่ เปอร์เซ็นต์ไบย่อย และจำนวนไบย่อย เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดที่เกิดกลุ่มยอด ในอาหารเหลว สูตร OPM เป็น นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร VW นาน 147 วัน

ลักษณะการเปลี่ยนแปลง ที่ปรากฏ	สูตรอาหาร และจำนวนวันที่เลี้ยง			
	OPM 190 วัน + VW 10 วัน ^{A/}	OPM 190 วัน + VW 122 วัน	OPM 190 วัน + VW 147 วัน	ค่าเฉลี่ย
ความกว้างกลุ่มยอด (ซม.)	1.06 ± 0.51	1.63 ± 1.20	2.98 ± 1.18	2.0
ความยาวกลุ่มยอด(ซม.)	2.11 ± 0.76	3.05 ± 1.08	4.17 ± 0.60	3.1
จำนวนกลุ่มยอด ^{1/}	6.30 ± 11.36	9.69 ± 12.15	18 ± 14.16	11.31
ความยาวยอดใหม่ ^{2/}	0.75 ± 0.87	0.83 ± 0.64	1.45 ± 0.81	1.0
การสร้างไบย่อย ^{3/} (%)	70	92	100	87.3
จำนวนไบย่อย (ใบ)	0	51.38 ± 102.13	25.5 ± 18.36	25.6

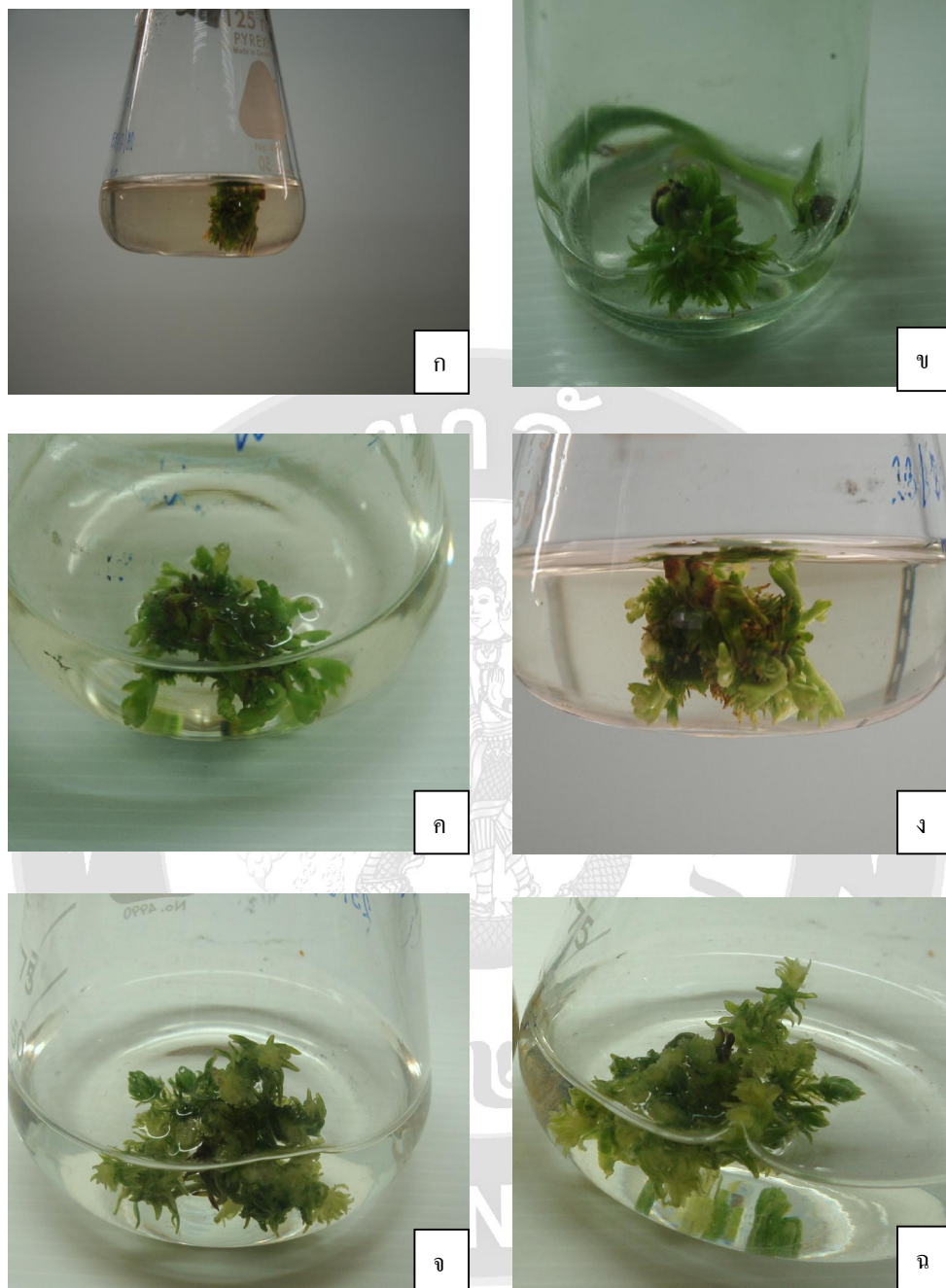
หมายเหตุ 1/ = จำนวนกลุ่มยอดใหม่ที่มีรูปร่างโครงสร้างเป็นยอดอ่อนที่ชัดเจน ยอดมีจำนวนมาก (ส่วนกลางยอดสีเขียวอ่อนหรือสีเขียวแกมขาว ด้านนอกสีเขียวเข้ม)

2/ = ความยาวยอดใหม่ เป็นกระจุกยอดสีเขียว มีแผ่นไบย่อยเล็กๆ ขนาด 2X3 มม.

3/ = เก็บข้อมูลเฉพาะกลุ่มที่ไบย่อยคลี่แล้ว และมีขนาดตั้งแต่ 1X3 มม. ขึ้นไป

A/ = สุ่มเก็บข้อมูล 20 ตัวอย่าง

mean ± values represent the standard deviation (mean ± SD.)



ภาพที่ 11 การเจริญพัฒนาของส่วนปลายยอด และลักษณะกลุ่มยอด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงขึ้นส่วนกลุ่มยอด ในอาหารเหลวสูตร VW 122 วัน รวมเวลา 312 วัน (ระยะ ก - ฉ)

4. การเปลี่ยนแปลงของส่วนปลายยอดที่เกิดกลุ่มยอด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM ที่เติม BAP ร่วมกับ IAA นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร VW เป็นเวลา 147 วัน รวม 337 วัน

เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร OPM นาน 30 วัน ส่วนปลายยอดขยายขนาด จากนั้นเกิดใบอ่อน 1-2 ใบต่อชิ้นส่วน ต่อมาอีก 30 วัน มีการพัฒนาใบอ่อน ใบคลี่ออก ชิ้นส่วนมีลักษณะอวบขึ้น และเกิดแคลลัสชนิดแน่น เมื่อเลี้ยงนาน 96 วัน ชิ้นส่วนมีสีเขียวเข้มขึ้น ฐานชิ้นส่วนบวมพอง ใบเรียวยาวมากขึ้น ชิ้นส่วนขยายขนาดยืดยาว (ตารางที่ 5) ทั้งนี้ ไม่ได้นำไปเลี้ยงต่อไป เนื่องจากได้จำนวนยอดอ่อนน้อย

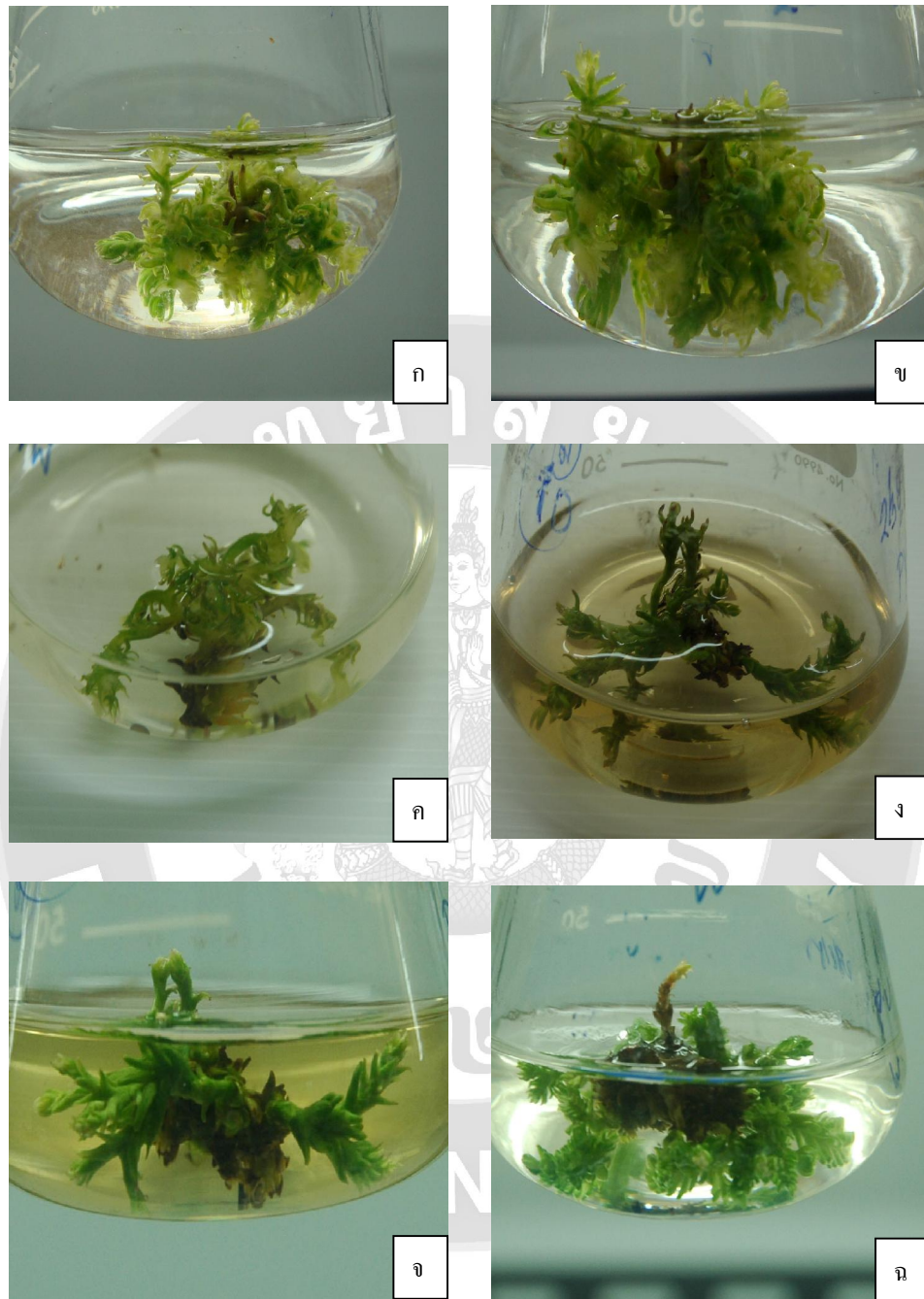
สำหรับ การเลี้ยงส่วนที่เกิดกลุ่มยอดด้วยอาหารเหลว สูตร OPM เป็นเวลา 30 วัน ชิ้นส่วนมีการขยายขนาดและมีสีเขียวเข้มขึ้น เกิดใบอ่อน 1-2 ใบต่อชิ้นส่วน เมื่อเลี้ยงนาน 60 วัน มีการพัฒนาใบอ่อน ใบขยายขนาดมากขึ้น และชิ้นส่วนอวบมากขึ้น แต่ไม่พบแคลลัส เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 96 วัน ชิ้นส่วนมีสีเขียวเข้มขึ้น ฐานบวมพอง ใบเรียวยาวมากขึ้น ต่อมาเกิดกระจุกใบอ่อนจำนวนมาก และพบใบย่อยขนาดเล็กๆ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 190 วัน ยอดมีความยาวมากขึ้น แต่นับจำนวนยอดได้ยาก (ตารางที่ 5, ภาพที่ 12)

การย้ายชิ้นส่วนที่เกิดกลุ่มยอด เลี้ยงในอาหารเหลว สูตร VW(1949) นาน 147 วัน ปรากฏผลดังนี้ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร VW นาน 10 วัน ใบย่อยมีการยืดยาวมากขึ้น แต่ใบไม่คลี่ เมื่อครบ 65 วัน ปรากฏรูปร่างใบย่อยชัดเจนมากขึ้น ใบคลี่ขยายขนาด เมื่อเลี้ยง 122 วัน พบว่า ใบย่อยมีรูปร่างสมบูรณ์ชัดเจนมากขึ้น มีสีเขียว เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร VW ครบ 147 วัน พบว่า เกิดยอดอ่อนที่สมบูรณ์ดี รูปร่างใบชัดเจน ใบขยายขนาดมากขึ้น (ตารางที่ 5, ภาพที่ 12)

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของส่วนปลายยอด เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งและอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน และอาหารเหลวสูตร VW ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 147 วัน

จำนวนวัน เพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏ	
	อาหารแข็งสูตร OPM	อาหารเหลว สูตร OPM
30 วัน	- ขึ้นส่วนปลายยอดขยายขนาด (ระยะ A ^{1/}) - เกิดใบอ่อน 1-2 ใบต่อขึ้นส่วน (ระยะ B)	- ขึ้นส่วนปลายยอดขยายขนาดและมีสีเขียวเข้มขึ้น (ระยะ A ^{1/}) - เกิดใบอ่อน 1-2 ใบต่อขึ้นส่วน (ระยะ B1)
60 วัน	- มีการพัฒนาใบอ่อน ใบคลี่ (ระยะ C) - ขึ้นส่วนมีลักษณะอวบขึ้น และพบแคลลัสชนิดแน่น (ระยะ D)	- มีการพัฒนาใบอ่อน ใบขยายขนาดมากขึ้น (ระยะ C1) - ขึ้นส่วนมีลักษณะอวบมากขึ้น แต่ไม่พบแคลลัส (ระยะ D1)
96 วัน	- ขึ้นส่วนมีสีเขียวเข้มขึ้น ใบเรียวยาวมากขึ้น ฐานขึ้นส่วนบวมพอง (ระยะ E) - ขึ้นส่วนขยายขนาด ยืดยาวมากขึ้น (ระยะ F)	- ขึ้นส่วนมีสีเขียวเข้มขึ้น ฐานบวมพอง ใบเรียวยาวมากขึ้น (ระยะ E1) - บางขึ้นส่วนขยายขนาดยืดยาวมากขึ้น (F1) - เกิดกระจุกใบอ่อนจำนวนมาก หรือยอดทวิคูณ มีใบขนาดเล็กๆ (ระยะ G1)
190 วัน	NA	- กลุ่มยอดขนาดเล็กมีความยาวมากขึ้น แต่นับจำนวนยอดไม่ชัดเจน (ระยะ H1)
ย้ายลงในอาหารเหลว สูตร VW (1949)		
10 วัน	NA	- ใบย่อยมีความยาวมากขึ้น ไม่คลี่ (ระยะ I1)
65 วัน	NA	- ปรากฏรูปร่างใบย่อยชัดเจน ใบคลี่ (ระยะ J1)
122 วัน	NA	- ใบย่อยมีรูปร่างสมบูรณ์ มีสีเขียว (ระยะ K1)
147 วัน	NA	- เกิดยอดใหม่มีความสมบูรณ์ รูปร่างใบชัดเจน ขยายขนาดมากขึ้น (ระยะ L1)

หมายเหตุ 1/ = อักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่า ขึ้นส่วนมีการเปลี่ยนแปลงในเวลาเดียวกัน ส่วนอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่า พบการเปลี่ยนแปลงเรียงตามลำดับอักษร
NA = ไม่นำขึ้นส่วนมาเลี้ยงในอาหารสูตร VW เนื่องจาก การเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร OPM ทำให้มีอัตราการเกิดกลุ่มยอดน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน



ภาพที่ 12 การเจริญของชิ้นส่วนปลายยอด และพัฒนาการของกลุ่มยอด เมื่อเลี้ยงส่วนกลุ่มยอดในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน (ระยะ ก - ข) แล้วย้ายเลี้ยงกลุ่มยอด ในอาหารเหลวสูตร VW 147 วัน รวมเวลา 337 วัน (ระยะ ค - ฉ)

สรุปการเกิดไซมาติคเอมบริโอ และออร์แกโนเจเนซิสของเอมบริโอ

การเกิดไซมาติคเอมบริโอ และออร์แกโนเจเนซิสของเอมบริโออ่อนภายหลังจากเลี้ยงชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตรต่างๆ (จากการทดลองที่ 1 และ 2) สรุปได้ดังนี้

1) ปัจจัยที่ใช้เลี้ยง และสภาพการเลี้ยง

ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้ ชิ้นส่วนเอมบริโออ่อน ใช้สำหรับไซมาติคเอมบริโอ ส่วนขบวนการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิส ใช้ชิ้นส่วนปลายยอด (ขนาดเฉลี่ย 0.5×0.7 ซม.)

สูตรอาหารชักนำแคลลัส การเลี้ยงเอมบริโออ่อนในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ IAA ทำให้เกิดเอมบริโอเจนิคแคลลัส (ระยะแรก) ส่วนการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM ที่มี BAP และ IAA ทำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิสได้ (ตารางที่ 6)

2) การเกิดกลุ่มแคลลัสในอาหาร

ในการไซมาติคเอมบริโอ พบว่า เกิด nodular callus เป็นก้อนใส เกาะกันอย่างหลวมๆ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ IAA แต่เกิดขบวนการของไซมาติคเอมบริโอเจเนซิสไม่สมบูรณ์ กล่าวคือไม่สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นไซมาติคเอมบริโอที่สมบูรณ์ได้ ส่วนออร์แกโนเจเนซิสนั้น พบว่า เกิด direct shoot organogenesis ในอาหารเหลวสูตร OPM และบางชิ้นส่วนพบแคลลัส แบบ compact callus ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน (ตารางที่ 6)

3) ระยะเวลาเริ่มพบแคลลัส

ในการศึกษาขบวนการไซมาติคเอมบริโอ พบว่าเกิดแคลลัส ภายหลังจากเลี้ยงนาน 90 วันขึ้นไป ส่วนขบวนการออร์แกโนเจเนซิส พบหลังเลี้ยงตั้งแต่ 96 วันขึ้นไป (ตารางที่ 6)

4) การเกิดใบย่อยขนาดเล็ก

การชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิส สามารถเกิดใบย่อยขนาดเล็ก ภายหลังจากเลี้ยงตั้งแต่ 96 วันขึ้นไป แต่ขบวนการไซมาติคเอมบริโอเจเนซิสไม่พบว่าเกิดใบย่อยขนาดเล็ก (ตารางที่ 6, ภาพที่ 12 และ 13)

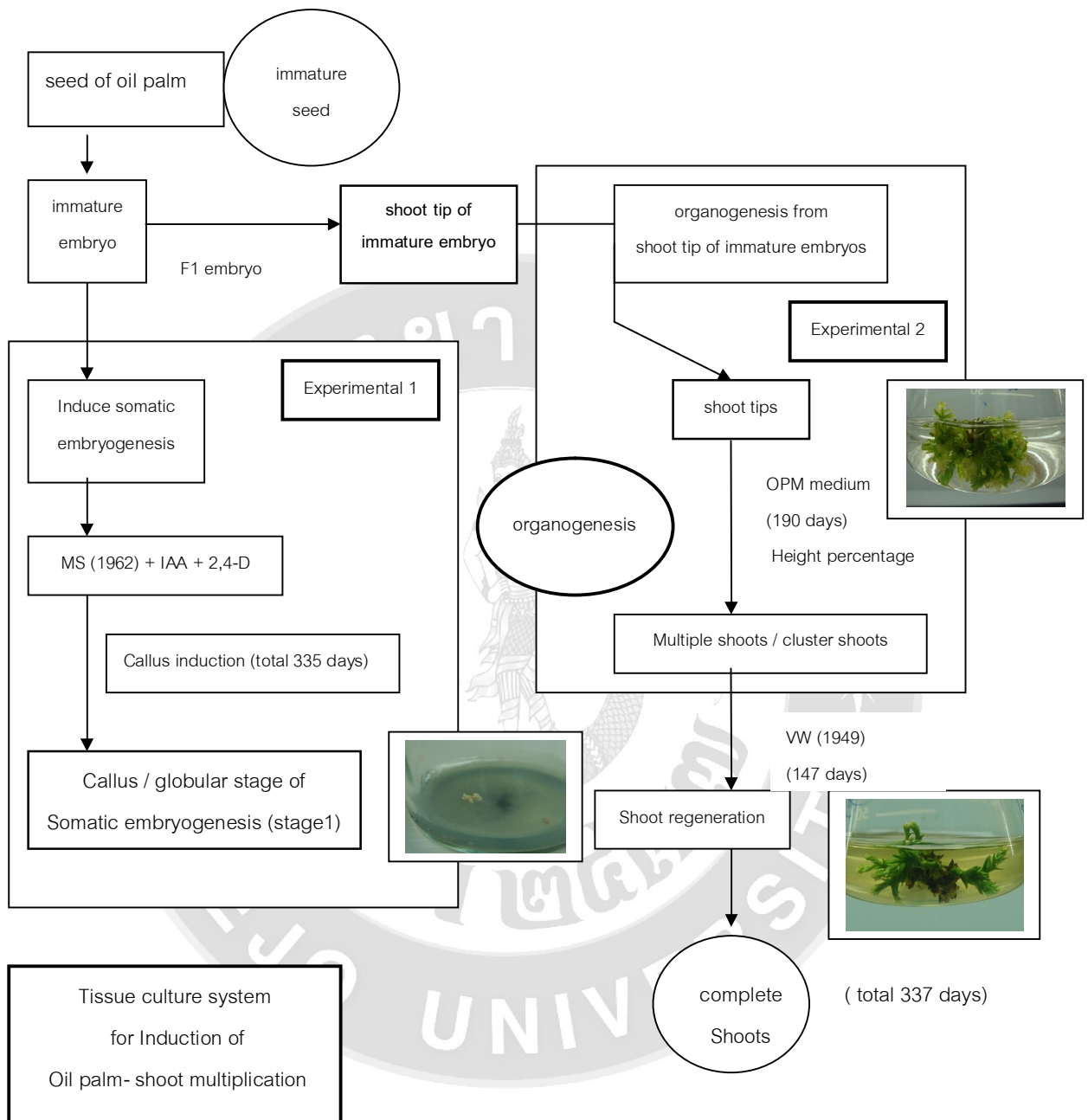
5) การเกิดกลุ่มยอด (cluster shoots)

จากการทดลองนี้ การเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ IAA ไม่เกิดกลุ่มยอด ส่วนการเลี้ยงปลายยอดในอาหารเหลวสูตร OPM ที่มี BAP และ IAA นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW เป็นเวลา 147 วัน (รวมเวลา 337 วัน) ทำให้เกิดกลุ่มยอดได้ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 12 และ 13)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส (somatic embryogenesis) และ
ออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) ของเอ็มบริโออ่อน

ลักษณะที่ศึกษา	somatic embryogenesis	organogenesis
1. ปัจจัยที่ใช้เลี้ยง 1.1 ชิ้นส่วนเริ่มต้น 1.2 สูตรอาหารที่ชักนำแคลลัส/ กลุ่มเนื้อเยื่อ	เอ็มบริโออ่อน (ทั้งชิ้นส่วน) อาหารแข็ง MS(1962) ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ IAA	เอ็มบริโออ่อน /ปลายยอด อาหารเหลว OPM ^{1/} ที่มี BAP และ IAA
2. การเกิดกลุ่มแคลลัสในอาหาร	เกิด nodular callus เป็นก้อนใส เกาะ กันอย่างหลวมๆ ในอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ IAA	เกิด direct shoot เกิดแคลลัสชนิดแน่น รูปร่าง- ไม่แน่นอน ในอาหารเหลวสูตร OPM ^{1/} ที่มี BAP และ IAA
3. ระยะเวลาเริ่มพบแคลลัส	หลังเลี้ยงตั้งแต่ 90 วัน ขึ้นไป	หลังเลี้ยงนาน 96 - 190 วัน ขึ้นไป
4. การเกิดใบย่อยขนาดเล็ก	ไม่ปรากฏ	ปรากฏกระจุกใบย่อย หลังเลี้ยง ตั้งแต่ 96 วันขึ้นไป
5. การเกิดกลุ่มยอด (cluster shoots formation)	ไม่ปรากฏกลุ่มยอด ในอาหารแข็ง สูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ IAA	ปรากฏกลุ่มยอดในอาหารเหลว สูตร OPM ที่มี BAP ร่วมกับ IAA หลังจากเลี้ยงนาน 190 - 337 วัน

หมายเหตุ 1/ = oil palm multiple shoot medium (อาหารสำหรับเพิ่มจำนวนยอด, ดูตารางผนวกที่1)



ภาพที่ 13 การเพิ่มปริมาณและพัฒนารูปร่างของกลุ่มยอดที่เจริญจากส่วนปลายยอดเอ็มบริโอ

วิจารณ์ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 ผลของ 2,4-D และ IAA ต่อการเกิดไซมาติคเอ็มบริโอในสภาพปลอดเชื้อ

ในการทดลองนี้ ได้นำเอ็มบริโออ่อน มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร MS (pH 6.5) ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0, 0.012 และ 0.024 มก./ล. ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0 2 และ 3 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3 % ภู่น 0.7 % เป็นเวลา 355 วัน พบว่า เมื่อเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนด้วยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.012 มก./ล. ร่วมกับ IAA เข้มข้น 2 มก./ล. นาน 335 วันทำให้เกิดไซมาติคเอ็มบริโอในระยะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ สอดคล้องกับ Wong *et al.* (1997) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ NAA ทำให้เกิดแคลลัสได้ 20 % ในเวลา 12 เดือน และ Abdullah *et al.* (2005) ได้เลี้ยงเอ็มบริโออ่อนปาล์มน้ำมันในอาหารสูตร chu และคณะ ,1975 ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 2.5 มก./ล. ทำให้เกิดแคลลัสได้ภายหลังเลี้ยง 4 สัปดาห์ Teixeira *et al.* (1995) ได้เลี้ยงเอ็มบริโออ่อนปาล์มน้ำมัน ด้วยอาหารสูตร Y3 หรือ MS ที่เติมสาร 2,4-D นาน 3 - 5 เดือน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสชนิดก้อนกลม Kamnoon และ Preamrudee (1999) ได้เลี้ยงเนื้อเยื่อไซโกติคเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันลูกผสม พันธุ์เทเนอรา บนอาหารสูตร Eeuwien ที่เติม 2,4-D ปริมาณ 0.5 มก./ล.เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและไซมาติคเอ็มบริโอได้ นอกจากนี้ อาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันมีผลต่อการพัฒนาไซมาติคเอ็มบริโอ กล่าวคือ ในระยะแรกของการเลี้ยงออกซินมีผลต่อการเกิดเอ็มบริโอ การเพิ่มออกซินแล้วลดปริมาณลง ทำให้เกิดไซมาติคเอ็มบริโอได้ดี ส่วนระยะที่สอง การเติม BAP ร่วมกับ 2,4-D ทำให้ไซมาติคเอ็มบริโอมีการพัฒนาที่ดี (Kamnoon และ Preamrudee, 1999)

Bonga (1977) รายงานไว้ว่า เมื่อพืชได้รับอาหารหรือสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง จะเกิดสมดุขของฮอร์โมนที่อยู่ภายในพืช ทำให้ขึ้นส่วนพืชที่เลี้ยงพัฒนาเป็นแคลลัสได้ ออกซินมีผลต่อการแบ่งเซลล์ ส่งเสริมการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีน การเติมออกซินในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจมีผลยับยั้งอิทธิพลของไซโทไคนินและช่วยกระตุ้นการเกิดแคลลัส (Robert และ Dennis, 1999) ได้มีผู้ศึกษาใช้ออกซินและไซโทไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน และพืชวงศ์ปาล์ม ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เช่น ในปี ค.ศ.1994 Teixeira และคณะ รายงานว่า การเลี้ยงช่อดอกของปาล์มน้ำมันพันธุ์ฟิลิเพอราบนอาหารทำให้เกิดแคลลัสชนิดแน่นที่ประกอบด้วยแคลลัสที่เป็นเม็ดกลมสีขาวเป็นแคลลัสที่สามารถเพิ่มปริมาณและพัฒนาเข้าสู่ระยะก้อนกลมที่พัฒนาเป็นต้นพืชต่อไปได้ แคลลัสชนิดนี้เกิดบริเวณส่วนฐานของดอกโดยพัฒนา

มาจากเนื้อเยื่อรอบๆ ท่อลำเลียง(vascular bundle) ของดอก สำหรับเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของดอก ขึ้นกับอายุของช่อดอก และระดับความเข้มข้นของออกซินที่ใช้ (วรรณรัฐ, 2540)

จากการทดลองนี้ ปรากฏแคลลัสชนิดหลวม มีลักษณะก้อนกลมเล็กๆ สีขาวขุ่น เกาะกัน อย่างหลวมๆ สอดคล้องกับรายงานของ Teixeira และคณะ เมื่อปี ค.ศ. 1993 ซึ่งได้กล่าวว่า การเกิดแคลลัสจากการเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนของปาล์มน้ำมันว่ามีลักษณะเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสชนิดแน่น (compact embryogenic callus) ที่เป็นก้อนกลมๆ สีขาว สามารถเพิ่มปริมาณและแปรรูป (differentiation) ไปสู่โครงสร้างที่คล้ายเอ็มบริโอ (embryo - like structure) (วรรณรัฐ, 2540) และรายงานของ Rabechalt ในปี 1970 (Abdullah *et al.*, 2005) สำหรับรูปร่างของแคลลัสเกิดได้หลายแบบ มีผู้รายงานไว้ว่า แคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันในอาหารที่เติม NAA และ 2-4,D มีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจน แคลลัสในอาหารที่เติม NAA มีลักษณะเป็นแคลลัสชนิดหลวม ในขณะที่แคลลัสที่ชักนำด้วยอาหารที่เติม 2,4-D มักมีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นปม เรียกว่า nodule (สมปอง, 2539) นอกจากนี้ วรรณรัฐ (2540) รายงานว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของระกำและสะก้า บนอาหารสูตร Y3 ที่เติม 2,4-D สามารถกระตุ้นให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและพัฒนาเป็นโครงสร้างคล้ายเอ็มบริโอที่สังเกตเห็นได้ชัดเจน

ในการทดลองนี้ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ไม่สามารถพัฒนาต่อไปเป็นไซมาติคเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ได้ในอาหารสูตรดังกล่าว อาจเนื่องจากหลายปัจจัย เช่น ระดับหรือความเข้มข้นของ 2,4-D อาจน้อยเกินไป ฮอริโมนภายในเอ็มบริโอ ปริมาณธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยง และอายุชิ้นส่วน เป็นต้น

การทดลองที่ 2 การเพิ่มปริมาณยอดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ส่วนปลายยอด

การทดลองที่ 2.1 เปรียบเทียบของผลการเลี้ยงส่วนปลายยอดด้วยอาหารเหลว และอาหารแข็ง

การเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอด (shoot tips) ของเอ็มบริโอ ด้วยอาหารแข็งและอาหารเหลว สูตร OPM (pH 5.6 - 5.7) ที่มี BAP เข้มข้น 0.46 มก./ล. ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.01 มก./ล.เป็น เวลา 190 วัน เพื่อศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณ (multiplication) และการสร้างกลุ่มยอด (proliferation of cluster shoot) พบว่า การเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารเหลว ทำให้มีจำนวนใบ 6.4 ± 6.9 ใบ ส่วนความยาวยอด และเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ในการทดลองนี้สามารถทำให้เกิดยอดพิเศษ (adventitious shoot) ได้ สอดคล้องกับ

จิระศักดิ์ และคณะ (2550) รายงานว่า สามารถชักนำยอดพิเศษของปาล์มน้ำมันได้ในอาหารสูตรที่เติม BAP และ IAA อาจเกิดจากอิทธิพลร่วมระหว่าง BAP IAA และน้ำมะพร้าว ซึ่งเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นขบวนการออร์แกโนเจเนซิส ทำให้มีการพัฒนาเซลล์โซมาติกได้ ยอดพิเศษดังกล่าวอาจเกิดจากอินไดเรคตออร์แกโนเจเนซิส (indirect - organogenesis) โดยอวัยวะเกิดจากแคลลัสบนชิ้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง (Dixon, 1987; Evan *et al.*, 1981) สำหรับการเติม BAP ในระยะพัฒนาของยอด สามารถชักนำให้ปลายยอดมีพัฒนาการ (shoot apex differentiation) และช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของราก (germination rate) ได้เป็น 70 % นอกจากนี้ การเพิ่มปริมาณยอดนั้นเป็นผลจากการได้รับไซโทไคนินอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานในระหว่างการพัฒนาของเอ็มบริโอ ในทางตรงข้ามหากชิ้นส่วนเอ็มบริโอได้รับสารฮอร์โมน BAP ในระยะเวลาสั้นๆ ทำให้ได้ยอดเดี่ยว (single shoot) (Aberlenc-Bertossi *et al.*, 1999) สำหรับไซโทไคนินทำงานในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ซึ่งต้องอาศัยออกซินทำงานร่วมกัน เนื่องจากไซโทไคนินเป็นตัวเพิ่มการสังเคราะห์ทีอาร์เอ็นเอ (tRNA) ช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) และเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ในส่วนของออกซินจะช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์อาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA) ดังนั้น การเติมสารทั้งสองร่วมกันในอาหารสังเคราะห์ช่วยให้เนื้อเยื่อเกิดการแบ่งเซลล์ได้ดีและเติบโตได้ดีกว่าการใช้ออกซินหรือไซโทไคนินเพียงอย่างเดียว (Street, 1977)

Zaerr และ Mapes (1982) รายงานว่า BAP เป็นสารในกลุ่มไซโทไคนินที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกระตุ้นการเกิดยอด การที่ BAP ทำหน้าที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และกระตุ้นการสร้างยอด (Brock และ Kaufman, 1991) เนื่องจากสาร BAP เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีน กระตุ้นการแบ่งเซลล์ จึงส่งผลให้เกิดการสร้างยอดได้ดี (McGrew, 1987) นอกจากนี้ BAP ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส แต่มีผลส่งเสริมการเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอในแคลลัส (สมปอง, 2539)

ในการทดลองนี้ พบว่า การเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาพเขย่า (shake culture conditions) ทำให้มีอัตราการเกิดยอดได้มากขึ้น เนื่องจากการเขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนหรืออากาศ (aeration) ให้กับเนื้อเยื่อซึ่งเป็นปัจจัยต่อการเติบโตอย่างรวดเร็ว (Shakti *et al.*, 2007; Othmani *et al.*, 2009) สำหรับการเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารเหลวช่วยให้เนื้อเยื่อที่เลี้ยงได้รับธาตุอาหารหรือฮอร์โมนอย่างทั่วถึง และในปริมาณที่มากขึ้น (Shakti *et al.*, 2007; Othmani *et al.*, 2009) การเขย่าขวดเนื้อเยื่ออย่างต่อเนื่องทำให้ชิ้นส่วนปลายยอดที่เลี้ยงมีการแตกตาข้าง (axillary bud) (Shakti *et al.*, 2007)

ในการเลี้ยงเนื้อเยื่ออินทผาลัม (*Phoenix dactylifera* L.) พบว่า การเลี้ยงกลุ่มยอดในอาหารเหลวที่เติม NAA BAP และ kinetin ภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์ (Temporary immersion bioreactor; TIB) ช่วยส่งเสริมการเพิ่มปริมาณและพัฒนาการของกลุ่มยอด (shoot clusters) ได้ (Othmani *et al.*, 2009) การเติม BAP ในระยะพัฒนาการของเนื้อเยื่อช่วยชักนำการเจริญเติบโตของส่วนปลายยอดได้ (Aberlenc - Bertossi *et al.*, 1999)

การทดลองที่ 2.2 ผลของอาหารเหลวสูตร VW ต่อการพัฒนายอด

เมื่อนำส่วนปลายยอดที่เกิดกลุ่มยอดซึ่งผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM ที่มี BAP เข้มข้น 0.46 มก./ล. ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.01 มก./ล. เป็นเวลา 190 วัน มาเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร VW(1949) เป็นเวลา 147 วัน พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่เป็นจำนวนมากได้ มีจำนวนกลุ่มยอดเฉลี่ย 18 ± 14.16 ยอด

ในการทดลองนี้ อาหารเหลวสูตร VW ที่เติมสาร BAP และ IAA ทำให้กลุ่มยอดหรือยอดพิเศษมีการพัฒนาเป็นรูปร่างที่ชัดเจนและขยายขนาดมากขึ้น ทำให้สามารถนับจำนวนยอดได้ง่ายขึ้น อาจเนื่องจากอิทธิพลร่วมระหว่างสาร BAP และ IAA ซึ่งเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นกระบวนการออร์แกโนเจเนซิส เซลล์เนื้อเยื่อยังได้รับธาตุอาหารจากน้ำมะพร้าวซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ตามธรรมชาติที่ช่วยให้เซลล์เจริญเติบโตและพัฒนาได้ดี เนื่องจากน้ำมะพร้าวมีสาร zeatin (Robert and Dennis, 1999) และแร่ธาตุต่างๆ อารีย์ (2541) กล่าวว่า กระบวนการสร้างอวัยวะนั้น เซลล์พืชจะมีการแบ่งเซลล์หรือเพิ่มปริมาณเซลล์ แล้วเข้าสู่ระยะแปรสภาพ (differentiation) บางเซลล์อาจพัฒนามีลักษณะจำเพาะในรูปร่างและหน้าที่ เนื่องจากถูกควบคุมด้วยยีน บางเซลล์สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ในที่สุด

ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับรายงานของ de Touchet *et al.* (1991) ได้ศึกษาการเลี้ยงปาล์มน้ำมันในขวดรูปชมพู่ (flask cultures) มีรายงาน Shakti *et al.* (2007) และ Gorret *et al.* (2004) ได้เลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่างๆ ในอาหารเหลว เช่น ข้าวโพด และอินทผาลัม (Othmani *et al.*, 2009; Chukwuemeka *et al.*, 2005; Tisserat, 1984) กาแฟ สับปะรด ชา แอปเปิ้ล และกล้วย (Othmani *et al.*, 2009)

การเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวทำให้เกิดไซมาติคเอนมบริโอได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง (Othmani *et al.*, 2009; Duval *et al.*, 1993) นอกจากนี้ การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้ส่วนที่

ไม่ใช่เซลล์สืบพันธุ์มาเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้พัฒนาเป็นยอดอ่อนได้ (Staritsky *et al.*, 1970; Teixeira *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1997)

ปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่างประสบความสำเร็จในหลายประเทศ ล้วนมีเทคนิควิธีที่แตกต่างกันไป สำหรับในการทดลองนี้ ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดโดยเทคนิคการชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) เพื่อเพิ่มปริมาณยอดในอาหารเหลว สอดคล้องกับ มีรายงานการศึกษาเลี้ยงส่วนปลายยอดในพืชวงศ์ปาล์ม เช่น มะพร้าว อินทผลาล์ม (Verdel *et al.*, 1992; Hadrami *et al.*, 1995) ได้สำเร็จ

สำหรับในอนาคตควรมีการศึกษองค์ประกอบธาตุอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดไซมาติคเอดมบริโอในอัตราที่สูงขึ้น และศึกษาผลของฮอร์โมนหรือธาตุอาหารต่อการเกิดกลุ่มยอดและรากปาล์มน้ำมันเพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้ระบบเขย่าหรือไบโอรีแอกเตเตอร์เพื่อการขยายพันธุ์ อนุรักษพันธุ์ และศึกษาพันธุ์วิศวกรรมของปาล์มน้ำมัน



สรุปผลการวิจัย

1. อิทธิพลของ 2,4-D และ IAA ต่อการเกิดไซมาติคเอ็มบริโอในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เมื่อเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนด้วยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.012 มก./ล. ร่วมกับ IAA เข้มข้น 2 มก./ล. นาน 335 วัน ทำให้เกิดไซมาติคเอ็มบริโอ ในระยะเอ็มบริโอเจนิกแคลลัส ทั้งนี้ เอ็มบริโอเจนิกแคลลัส ไม่สามารถพัฒนาต่อไปเป็นไซมาติคเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ได้

2. การเพิ่มปริมาณยอดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ส่วนปลายยอด

2.1) เปรียบเทียบของผลการเลี้ยงส่วนปลายยอดด้วยอาหารเหลว และอาหารแข็ง

เมื่อนำปลายยอดมาเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร OPM ที่มี BAP และ IAA นาน 60 วัน พบว่า อาหารเหลวทำให้มีจำนวนใบมากที่สุด คือ 2.7 ± 1.1 ใบ และทำให้ยอดมีความยาวมากที่สุด 1.9 ± 0.8 ซม. สำหรับ อาหารแข็งทำให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วนมากที่สุด คือ 0.4 ± 0.1 ซม.

การเปลี่ยนแปลงของปลายยอดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารอาหารแข็งเทียบกับอาหารเหลว สูตร OPM ที่มี BAP และ IAA เป็นเวลา 190 วัน พบว่า อาหารเหลว ทำให้มีใบมากที่สุด 6.4 ± 6.9 ใบ ส่วนความยาวยอด และเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วน พบว่า การเลี้ยงทั้งสองลักษณะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

2.2) ผลของอาหารเหลวสูตร VW ต่อการพัฒนายอด

การเพิ่มปริมาณยอด และการพัฒนายอดในอาหารเหลว สูตร OPM ที่มี BAP และ IAA นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร VW นาน 147 วัน ผลปรากฏว่า เกิดจำนวนกลุ่มยอดใหม่ 18 ยอด มีความยาวยอดใหม่ เฉลี่ย 1.5 ± 0.8 ซม. การสร้างใบย่อย 25 ± 18 ใบ เส้นผ่านศูนย์กลางกระจุกยอด เฉลี่ย 0.7 ซม.

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตร. 2548. **ปาล์มน้ำมัน**. พิมพ์ครั้งที่ 2. เอกสารวิชาการ ลำดับที่ 16/2547.

กรุงเทพฯ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 188 น.

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์, ศิริชัย อุ้นศรีสง, สมพร มีแสงแก้ว, ประสาทพร กอวยชัย และ นิติยา

แก้วขญา. 2550. **อิทธิพลของ Benzyl aminopurine และ Indole acetic acid ต่อการ**

เกิดแคลลัสของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ. ชุมพร : รายงาน

ผลการวิจัย, มหาวิทยาลัยแม่โจ้. มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร. 49 น.

ชาย โฆรวิส และสุรกิตติ ศรีกุล. 2548. ประวัติและความสำคัญ, น. 1 - 6. ใน **ปาล์มน้ำมัน**.

เอกสารวิชาการ ลำดับที่ 16/2547. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรมนิยม, ประกิจ ทองคำ และ สมเกียรติ

สีสนอง. 2548. **เส้นทางสู่ความสำเร็จการผลิตปาล์มน้ำมัน**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สงขลา :

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตปาล์มน้ำมัน, คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัย

สงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 117 น.

วรณัฐ ศรีพาเพลิน. 2540. **ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

พืชสกุลระกำในสภาพปลอดทดลอง. กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,

มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. 81 น.

วิชณีย์ ออมทรัพย์สิน. 2548. การแปรรูปปาล์มน้ำมัน, น.151-171. ใน **ปาล์มน้ำมัน**. กรุงเทพฯ :

กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สมปอง เตชะโต. 2539. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ**.

สงขลา : พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพืชศาสตร์, คณะทรัพยากรธรรมชาติ,

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 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**. Springer Netherlands. 56 (1) : 53 - 57.
- Bajaj, Y. P. S. 1989. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg. 5 : 622 p.
- Bonga, J. M.1977. Application of Tissue Culture is forestry, pp. 93 -108. *In* J. Reinert and Y. P. S. Bajaj, eds. **Application and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Berlin : Springer – Verlag.
- Brock, T. G. and P. B. Kaufmann. 1991. Growth regulators: an account of hormones and growth regulation, pp. 27 - 34. *In* F.G.Steward, ed. **Plant physiology: A Treatise**. Vol.10 : Growth and Development. London : Academic Press Inc.
- 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.
- Dixon, R.A. 1987. **Plant Cell Culture : A Practical approach**. Oxford : Information Press. 236 p.

- Duval, Y.; A. Rival ; J. L. Verdeil ; and J. Buffard - Morel.1993. Advances in oil palm and coconut micropropagation, pp.106 - 116. *In Proceedings of the Southeast Asian Regional Workshop on Propagation Techniques for Commercial crops of the tropics*. France.
- Evan, D.A.W.; R. Sharp ; and C.E. Flick. 1981. Growth and behavior of cell culture : Embryogenesis and Organogenesis, pp.45 - 113. *In* T.A. Thorpe, ed. **Plant Tissue Culture**. New York : Academic Press.
- 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. **Biologiplantarum**. 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.
- Ikeda, M.; M. Umehara ; and H. Kamada. 2006. Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and Arabidopsis. The Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology. **Plant Biotechnology**. 23 : 153 - 161.
- 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, pp. 76 - 93. *In* P. J. Davies, ed. **Plant hormones and there role in plant development**. Dordrect : Martinus Nihoff Publishers.

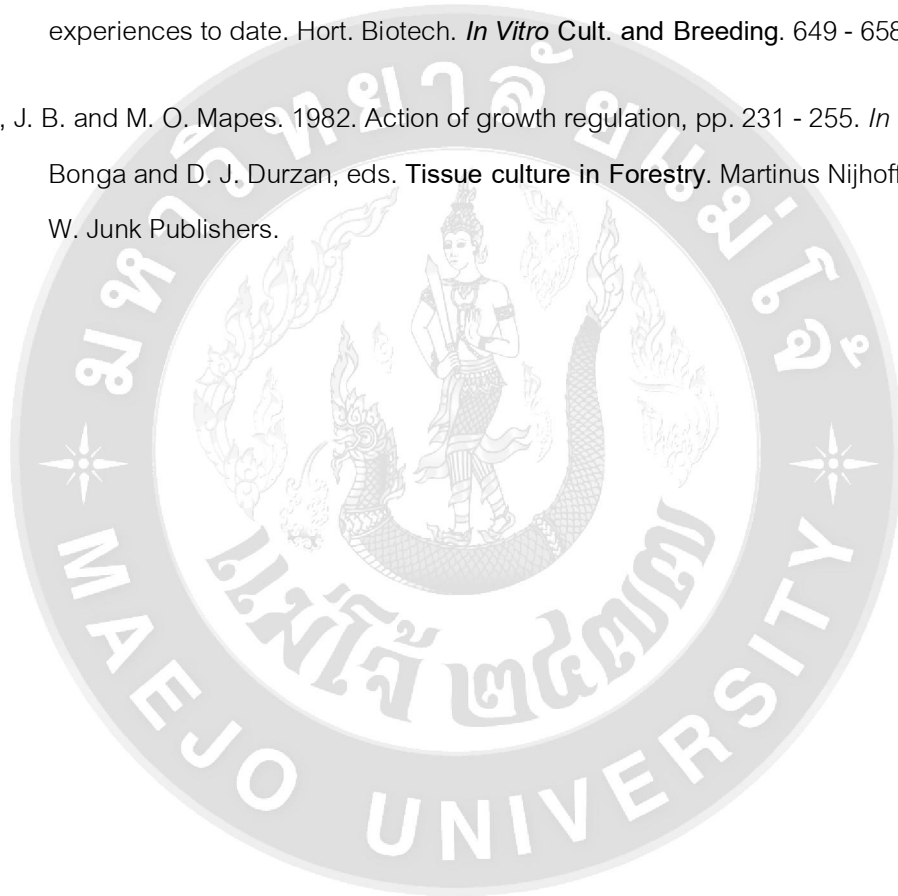
- Murashige, T. and F. Skoog .1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**. 15 (3) : 473 - 497.
- Mutert E. and T.H. Fairhurst .1999. Oil Palm Clones: Productivity enhancement for the future. **Better Crops International**. Malaysia.1 (3) : 45 – 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.
- Robert, N. T. and J. G. Dennis. 1999. **Plant tissue culture concepts and Laboratory Exercises**. Second edition. New York : C.R.C Press. 454 p.
- 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.
- Staritsky, G.1970. Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. **Euphytica**. 3 (19) : 288 - 292.
- Street, H. E. 1977. **Plant tissue and cell culture**. London : Blackwell Scientific Publication. 617 p.
- Teixeira, J.B.; M.R. Sondahl ; T. Nakamura ; and E.G. Kirby. 1995. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. Netherlands : Kluwer Academic Publishers. 40 : 105 - 111.
- Tisserat, B.1984. Propagation of date palms by shoot tip cultures. **Horticultural Science**. 19 : 230 - 231.
- Trevor, A. T. 1995. **In Vitro embryogenesis in plants**. Plant physiology research group Department of Biological Sciences. Canada : The University of Calgary. 558 p.

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.

Zaerr, J. B. and M. O. Mapes. 1982. Action of growth regulation, pp. 231 - 255. *In* J. M. Bonga and D. J. Durzan, eds. **Tissue culture in Forestry.** Martinus Nijhoff Dr. W. Junk Publishers.





ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบอาหารสูตร OPM, MS (1962) และ VW (1949)

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	OPM ^{1/} (mg/l)	MS(1962) (mg/l)	VW (1949) (mg/l)
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	1,650	1,650	-
Potassium nitrate	KNO_3	1,904.4	1,900	525
Ammonium sulfate	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.165	-	500
Calcium chloride	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	440	
Magnesium sulfate	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	372.1	370	250
Potassium dihydrogen - phosphate	KH_2PO_4	172.1	170	250
Boric acid	H_3BO_3	6.2	6.2	-
Manganese sulfate	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6.96	6.9	5.7
Zinc sulfate	$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6.14	6.14	-
Potassium iodide	KI	0.83	0.83	-
Sodium molybdate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25	-
Copper sulfate	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	-
Cobalt chloride	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	-
EDTA Disodium Salt	Na_2EDTA	37.56	37.25	37.25
Iron sulfate	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28.08	27.85	27.85
Glycine	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	2.0	2.0	-
Nicotinic acid	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0.5	0.5	-
Pyridoxine-HCl	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$	0.5	0.5	-
Thiamine-HCl	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$	0.1	0.1	-
Calcium phosphate	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.67	-	200
Myo - inositol		100	100	-
Sucrose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	30,000	30,000	20,000
Coconut water		3.0 ml	-	150 ml
BAP		0.46	-	-
IAA		0.01	-	-
		pH 5.6-5.7	pH 5.6-5.7	pH 4.8 – 5.0

หมายเหตุ 1/ = OPM: oil palm multiple shoot medium; modifying from MS (1962) and VW (1949)

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ลักษณะต่างๆ ของปลายยอดที่เจริญในอาหารเหลว สูตร OPM

1. จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (simple linear correlation) ระหว่างลักษณะจำนวนใบ ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางปลายยอดที่นำมาเลี้ยง ในอาหารแข็ง และอาหารเหลว สูตร OPM นาน 60 วัน ปรากฏว่า

1.1) การเลี้ยงบนอาหารแข็ง จำนวนใบ ความยาวยอด และเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วน มีความสัมพันธ์กันในทางบวก และมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 2)

1.2) การเลี้ยงด้วยอาหารเหลว ความยาวยอด มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับจำนวนใบ และเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วน สำหรับ จำนวนใบ ไม่มีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วน (ตารางผนวกที่ 2)

ตารางผนวกที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะจำนวนใบ ความยาวยอด และเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วน เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 60 วัน

	อาหารแข็งสูตร OPM		อาหารเหลวสูตร OPM	
	ความยาวยอด (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง ชิ้นส่วน (ซม.)	ความยาวยอด (ซม.)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง ชิ้นส่วน (ซม.)
จำนวนใบ	0.556 **	0.586 **	0.699 **	0.374 ^{ns}
ความยาวยอด (ซม.)		0.625 **		0.444 *

df = 18

*, ** คือ มีนัยสำคัญ และมีนัยสำคัญยิ่ง ตามลำดับ

ns คือ ไม่มีนัยสำคัญ

2. จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง ลักษณะจำนวนใบ ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วนเมื่อเลี้ยงปลายยอดในอาหารแข็งและอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน
ปรากฏผลดังนี้

2.1) การเลี้ยงบนอาหารแข็ง

ความยาวยอด มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับจำนวนใบ และเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วน และมีนัยสำคัญทางสถิติ

จำนวนใบ ไม่มีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วน (ตารางผนวกที่ 3)

2.2) การเลี้ยงด้วยอาหารเหลว

จำนวนใบ ความยาวยอด และเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วน ไม่มีความสัมพันธ์กัน (ตารางผนวกที่ 3)

ตารางผนวกที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะจำนวนใบ ความยาวยอด และเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นส่วน เมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน

	อาหารแข็งสูตร OPM		อาหารเหลวสูตร OPM	
	ความยาวยอด (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง ชิ้นส่วน (ซม)	ความยาวยอด (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง ชิ้นส่วน (ซม)
จำนวนใบ (ใบ)	0.402 *	0.189 ^{ns}	- 0.187 ^{ns}	0.132 ^{ns}
ความยาวยอด (ซม.)		0.481 *		- 0.022 ^{ns}

df = 18

*, * * คือ มีนัยสำคัญ และมีนัยสำคัญยิ่ง ตามลำดับ

ns คือ ไม่มีนัยสำคัญ

3. จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างยอด ความยาวยอด จำนวนกลุ่มยอด ความยาวยอดใหม่ จำนวนใบย่อย ในอาหารเหลวสูตร OPM นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงปลายยอดที่เกิดกลุ่มยอดในอาหารสูตร VW นาน 10 วัน (รวมเลี้ยงเป็นเวลา 200 วัน)

3.1) ความยาวยอดใหม่ มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความยาวชิ้นส่วน (มีนัยสำคัญทางสถิติ)

3.2) จำนวนกลุ่มยอด และความกว้างชิ้นส่วน ไม่มีความสัมพันธ์กับความยาวยอดใหม่

3.3) จำนวนกลุ่มยอดมีความสัมพันธ์ในทางบวกกับความกว้างชิ้นส่วน (มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ)

3.4) ความยาวชิ้นส่วน ไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนกลุ่มยอด และความกว้างชิ้นส่วน (ตารางผนวกที่ 4)

ตารางผนวกที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ความกว้างยอด ความยาวยอด จำนวนกลุ่มยอด ความยาวยอดใหม่ เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW นาน 10 วัน รวมเวลา 200 วัน

	ความยาวยอด (shoot length)	จำนวนกลุ่มยอด (shoot number)	ความยาวยอดใหม่ (new shoot length)
ความกว้างยอด (shoot wide)	0.265 ^{ns}	0.537 ^{**}	0.235 ^{ns}
ความยาวยอด (shoot length)		0.106 ^{ns}	0.447 [*]
จำนวนกลุ่มยอด (shoot number)			- 0.121 ^{ns}

df = 18

*, ** คือ มีนัยสำคัญ และมีนัยสำคัญยิ่ง ตามลำดับ

ns คือ ไม่มีนัยสำคัญ

4. จากการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความกว้างยอด ความยาวยอด จำนวนกลุ่มยอด ความยาวยอดใหม่ จำนวนใบย่อย ในอาหารเหลวสูตร OPM นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงปลายยอดที่เกิดกลุ่มยอดในอาหารเหลวสูตร VW นาน 122 วัน (รวมเป็นเวลา 312 วัน)

4.1) จำนวนใบย่อย มีความสัมพันธ์ในทางบวกกับ ความกว้างยอด และจำนวนกลุ่มยอด แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับความยาวยอด และความยาวยอดใหม่

4.2) ความยาวยอดใหม่ ไม่มีความสัมพันธ์กับความกว้างยอด ความยาวยอด และจำนวนกลุ่มยอด (ตารางผนวกที่ 5)

4.3) จำนวนกลุ่มยอด มีความสัมพันธ์ในทางบวกกับความกว้างยอด แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับความยาวยอด นอกจากนี้ความกว้างยอดไม่มีความสัมพันธ์กับความยาวยอด (ตารางผนวกที่ 5)

ตารางผนวกที่ 5 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ความกว้างยอด ความยาวยอด จำนวนกลุ่มยอด ความยาวยอดใหม่ จำนวนใบย่อย เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงปลายยอดที่เกิดกลุ่มยอด ในอาหารเหลวสูตร VW 122 วัน รวม 312 วัน

	ความยาว ยอด (shoot length)	จำนวน กลุ่มยอด (shoot number)	ความยาว ยอดใหม่ (new shoot length)	จำนวน ใบย่อย (leaflet number)
ความกว้างยอด (shoot wide)	0.400 ^{ns}	0.882 ^{**}	0.232 ^{ns}	0.635 ^{**}
ความยาวยอด (shoot length)		0.284 ^{ns}	0.405 ^{ns}	0.334 ^{ns}
จำนวนกลุ่มยอด (shoot number)			0.186 ^{ns}	0.772 ^{**}
ความยาวยอดใหม่ (shoot length)				0.298 ^{ns}

df = 11 *, ** คือ มีนัยสำคัญ และมีนัยสำคัญยิ่ง ตามลำดับ ns คือ ไม่มีนัยสำคัญ

5. จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างยอด ความยาวยอด จำนวนกลุ่มยอด ความยาวยอดใหม่ จำนวนใบย่อย เส้นผ่านศูนย์กลางกลุ่มยอดย่อย เมื่อเลี้ยงขึ้นส่วนปลายยอดด้วยอาหารเหลว สูตรOPM เป็นเวลา 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW นาน 147 วัน รวม 337 วัน

- 5.1) เส้นผ่านศูนย์กลางกลุ่มยอด มีความสัมพันธ์ในทางบวกกับความยาวยอดใหม่ และจำนวนใบย่อย
- 5.2) เส้นผ่านศูนย์กลางกลุ่มยอด มีความสัมพันธ์ในทางลบกับความกว้างยอด และจำนวนกลุ่มยอด
- 5.3) จำนวนใบย่อย มีความสัมพันธ์ในทางบวกกับความยาวยอดใหม่
- 5.4) จำนวนกลุ่มยอดและความกว้างยอด มีความสัมพันธ์ในทางลบกับจำนวนใบย่อย
- 5.5) จำนวนกลุ่มยอด ความยาวยอดใหม่ จำนวนใบย่อย และเส้นผ่านศูนย์กลางกลุ่มยอดย่อย ไม่มีความสัมพันธ์กับความยาวยอด
- 5.6) ความกว้างส่วนยอด ความยาวยอด และจำนวนกลุ่มยอด ไม่มีความสัมพันธ์กับความยาวยอดใหม่
- 5.7) จำนวนกลุ่มยอด มีความสัมพันธ์ในทางบวกกับความกว้างยอด
- 5.8) ความกว้างและความยาวยอด ไม่มีความสัมพันธ์กัน (ตารางผนวกที่ 6)

ตารางผนวกที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ความกว้างยอด ความยาวยอด จำนวนกลุ่มยอด
ความยาวยอดใหม่ จำนวนใบย่อย เส้นผ่านศูนย์กลางกลุ่มยอดย่อย เมื่อเลี้ยง
ขึ้นส่วนในอาหารเหลว สูตร OPM นาน 190 วัน แล้วย้ายเลี้ยงปลายยอดที่เกิด
กลุ่มยอดในอาหารเหลว สูตร VW นาน 147 วัน รวม 337 วัน

	ความยาว ยอด (shoot length)	จำนวน กลุ่มยอด (shoot number)	ความยาว ยอดใหม่ (new shoot length)	จำนวน ใบย่อย (leaflet number)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง กลุ่มยอด ย่อย
ความกว้างยอด (shoot wide)	0.187 ^{ns}	0.903 ^{**}	- 0.634 ^{ns}	-0.971 ^{**}	-0.924 ^{**}
ความยาวยอด (shoot length)		0.222 ^{ns}	0.529 ^{ns}	-0.024 ^{ns}	0.112 ^{ns}
จำนวนกลุ่มยอด (shoot number)			-0.435 ^{ns}	-0.795 [*]	-0.756 [*]
ความยาวยอดใหม่ (new shoot length)				0.749 [*]	0.864 [*]
จำนวนใบย่อย (leaflet number)					0.960 ^{**}
df = 4					

*, ** คือ มีนัยสำคัญ และมีนัยสำคัญยิ่ง ตามลำดับ

ns คือ ไม่มีนัยสำคัญ