รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการ : การวิจัยและพัฒนาปาล์มน้ำมัน

2. โครงการวิจัย : การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

กิจกรรม : การวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามสปีชีส์ (*Elaeis guineensis* X *E. oleifera*)

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Tissue culture of Oil Palm interspecific Hybrid (*Elaeis guineensis X E. oleifera*)

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	**:** นางสาวเตือนจิตร เพ็ชรรุณ	สังกัด ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี
ผู้ร่วมงาน	**:** นางสาวอรรัตน์ วงศ์ศรี	สังกัด ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี
	: นางสาวสุวิมล กลศึก	สังกัด ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี
	: นายกษิดิศ ดิษฐบรรจง	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	: นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	: นางชยานิจ ดิษฐบรรจง	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามสปีชีส์ (*Elaeis guineensis* X *E. oleifera*) บนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) เติม dicamba และ picloram ความเข้มข้น 1 1.5 2 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสพบว่า คัพภะอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม picloram ความเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 0.46 0.44 และ 0.42 กรัม ตามลำดับ เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจินิคแคลลัส บนอาหารสูตร MS เติม dicamba picloram และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มในการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอจินิคแคลลัสสูงสุด 35.0 และ 26.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารสูตร MS ที่เติม dicamba 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 15.78 เปอร์เซ็นต์ และเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 11.76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีรูปแบบพัฒนาการ 3 ระยะ คือ รูปกลม รูปหัวใจ และระยะสร้างจาว โดยโซมาติกเอ็มบริโอสามารถพัฒนาเป็นยอดที่มีลักษณะรวมเป็นกระจุก 1-2 ยอด แต่ไม่ยืดยาวและไม่ปรากฏการเจริญของรากในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

Abstract

Young embryos of oil palm interspecific hybrid (*Elaeis guineensis X E. oleifera*) were cultured on medium Murashige and Skoog (MS) and supplemented with dicamba and picloram at concentrations of 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 mg/l for callus induction. Young embryos were cultured on MS medium supplemented with picloram concentrations of 1.5, 2.0 and 2.5 mg/l showed the highest weight callus at 0.46, 0.44 and 0.42 g, respectively. Those calli cultured on MS medium supplemented with dicamba 1.0 mg/l and 2,4-D 0.1 mg/l presented the highest embryogenic callus at 35% and 26%, respectively. The development of somatic embryos cultured on MS medium supplemented with dicamba 1.0 mg/l was 15.78% and supplemented with 2,4-D 0.1 mg/l was 11.76%. The development forms consisted of globular-shaped stage, heart-shaped stage and haustorium stage. The somatic embryo developed about 1-2 apical shoots without root development on MS medium supplemented with NAA concentration of 5.0 mg/l.

6. คำนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศ มีศักยภาพในการแข่งขันสูงทั้งด้านการผลิตและการตลาด เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตและราคาต่ำกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งสินค้าอุปโภคและบริโภค เกษตรกรจึงมีความต้องการปลูกปาล์มน้ำมันเพิ่มมากขึ้นทุกปี ดังนั้นเพื่อให้เกษตรกรได้ปลูกปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี และประเทศไทยสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ใช้ได้เอง ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร จึงได้รับมอบหมายให้เป็นหน่วยงานหลักในการศึกษาวิจัยและปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ปัจจุบันมีเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน *Elaeis guineensis* ซึ่งมีลักษณะดี คือ ผลใหญ่ กะลาบาง และให้ผลผลิตน้ำมันสูง และเชื้อพันธุ์ *Elaeis oleifera* ซึ่งเป็นพันธุ์ป่าที่มีลักษณะดี คือ ลำต้นเตี้ย มีความต้านทานโรค และการเกิดผลโดยไม่มีเมล็ด ปัจจุบันศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีทำการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีมาตรฐาน โดยการผสมพันธุ์ข้ามสปีชีส์ระหว่าง *E. guineensis* x *E. oleifera* แล้วสร้างลูกผสมแบบผสมกลับตามโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีผลผลิตสูง ต้นเตี้ย และเพิ่มปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวให้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมให้ได้ปริมาณมาก และมีแนวโน้มให้ความแปรปรวนค่อนข้างสูง

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นเทคนิคการชักนำพืชต้นใหม่จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชขนาดเล็กในสภาพปลอดเชื้อ และเมื่อได้สูตรอาหารและสภาพที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแล้วจะสามารถเพิ่มปริมาณได้เป็นจำนวนมากในเวลาอันสั้น ได้ต้นกล้าที่มีความสม่ำเสมอสูง ดังนั้นเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นแนวทางที่สามารถเพิ่มการผลิตพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมได้ในเชิงปริมาณเพื่อการขยายพันธุ์ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการผลิตต้นพ่อแม่พันธุ์ รวมทั้งใช้ในการวิจัยปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาปาล์มน้ำมันต่อไป ปัจจุบันในบางประเทศที่เป็นแหล่งผลิตพันธุ์ปาล์มน้ำมันของโลกประสบความสำเร็จในการผลิตพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำหรับประเทศไทยมีรายงานการศึกษาเรื่องนี้เช่นกัน แต่ต้นกล้าที่ได้ไม่มีความสม่ำเสมอจึง

ยังคงไม่มีการผลิตออกมาเพื่อการขยายพันธุ์ ดังนั้นมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน เพื่อให้ได้เทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพันธุ์ที่ดี มีคุณภาพ และมีความสม่ำเสมอ

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มออกซิน
2. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Murashige and Skoog (MS)
3. สารเคมีสำหรับใช้ฆ่าเชื้อ
4. น้ำตาลซูโครส
5. ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น
6. ตู้ย้ายเลี้ยง
7. เครื่องแก้ว ด้ามมีดละใบมีดผ่าตัด คีมปากคีบ อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร จานและขวดเพาะเลี้ยง
8. ตู้อบแห้ง หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ และตู้เย็น
9. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัด pH กระดาษกรอง และเครื่องกรองมิลลิพอร์

วิธีการ

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

นำคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามสปีชีส์ระหว่าง *E. guineensis* และ *E. oleifera* ที่คัดเลือกมาศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba และ picloram ที่ระดับความเข้มข้น 1 1.5 2 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ Gelrite ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ pH 5.7 เลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 เดือน

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำ รวม 11 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร MS + dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 2 อาหาร MS + dicamba เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 อาหาร MS + dicamba เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 อาหาร MS + dicamba เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 5 อาหาร MS + dicamba เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 6 อาหาร MS + picloram เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 7 อาหาร MS + picloram เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 8 อาหาร MS + picloram เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 9 อาหาร MS + picloram เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 10 อาหาร MS + picloram เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 11 อาหาร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

การบันทึกข้อมูล บันทึกน้ำหนักแคลลัส ชนิดของแคลลัสและลักษณะของแคลลัส

2. การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (embryogenic callus)

นำแคลลัสที่เกิดจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามสปีชีส์จากขั้นตอนที่ 1 มาศึกษาการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจินิคแคลลัสมาในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba picloram และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ Gelrite ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ pH 5.7 ให้แสงวันละ 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 เดือน

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ รวม 9 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร MS + dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 2 อาหาร MS + dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 อาหาร MS + dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 อาหาร MS + picloram เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 5 อาหาร MS + picloram เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 6 อาหาร MS + picloram เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 7 อาหาร MS + 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 8 อาหาร MS + 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 9 อาหาร MS + 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การบันทึกข้อมูล บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

3. การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอจินิคแคลลัสที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 มาศึกษาการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ Gelrite ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ pH 5.7 ให้แสงวันละ 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 เดือน

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ รวม 9 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร MS + dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 2 อาหาร MS + dicamba เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 อาหาร MS + dicamba เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 อาหาร MS + 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 5 อาหาร MS + 2,4-D เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 6 อาหาร MS + 2,4-D เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 7 อาหาร MS + NAA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 8 อาหาร MS + NAA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 9 อาหาร MS + NAA เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

การบันทึกข้อมูล บันทึกลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนายอด

เวลาและสถานที่

เริ่มต้นเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2553 สิ้นสุด เดือน กันยายน พ.ศ. 2558

สถานที่ทำการทดลอง

ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

การชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนบนอาหารสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba และ picloram ความเข้มข้น 1 1.5 2 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า คัพภะอ่อนสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้บนอาหารสูตร MS ที่เติม dicamba และ picloram ในทุกความเข้มข้น แต่แคลลัสมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดในสูตรอาหาร MS เติม picloram ความเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย 0.46 0.44 และ 0.42 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แคลลัสที่เกิดมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เกาะตัวกันแน่น (compact callus) เป็นก้อนสีเหลืองอ่อน ลักษณะฉ่ำน้ำ ซึ่งเป็นลักษณะของแคลลัสที่พบเป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 1) และแคลลัสอีกลักษณะที่พบเป็นเซลล์กลมๆ สีขาวขุ่นเกาะกันแน่น (nodular callus) แต่พบในปริมาณน้อย (ภาพที่ 2a) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ กษิดิศ และคณะ (2556) และชยานิจ และคณะ (2552) ได้รายงานว่า ลักษณะของแคลลัสที่พบจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นก้อนแข็งสีเหลืองอ่อน เกาะตัวกันแน่น เรียกว่า compact callus และ Te-chato และคณะ (1998) และ Teixeira และคณะ (1993) รายงานว่า คัพภะอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดและใช้เวลาในการเกิดแคลลัสน้อยที่สุด 4 เดือน และให้แคลลัสที่เกาะตัวกันแน่น เนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อที่อยู่ในระยะ juvenile stage ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีอายุน้อยสามารถตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตได้ดี กษิดิศ และคณะ (2556) รายงานว่า จากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันชนิดพิสิเฟอรา พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร MS ที่เติม dicamba ความเข้มข้น 5-10 μM คิดเป็น 62.4-69.6 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับชยานิจ และคณะ (2552) ได้รายงานว่า จากการ

เพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 3 พบว่า คัพภะอ่อนมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 83.3% บนอาหารสูตร MS ที่เติม dicamba ความเข้มข้น 10 μM ซึ่งต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ โดยการตอบสนองต่อชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันดังกล่าวข้างต้น อาจเนื่องมาจากผลของสภาพแวดล้อมในแปลงปลูก อายุของคัพภะ และแหล่งของพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันที่ใช้เพาะเลี้ยงต่างกัน ส่งผลให้การใช้ dicamba เพื่อชักนำแคลลัสจากคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามสปีชีส์ มีประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสต่ำกว่า picloram

ส่วนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าคัพภะอ่อนเกิดการพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้โดยไม่ผ่านแคลลัส (ภาพที่ 2b) อาจเนื่องมาจากคัพภะอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงอยู่ในระยะการพัฒนาที่พร้อมเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ ดังนั้นเมื่อคัพภะได้รับธาตุอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจึงสามารถพัฒนาเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งสามารถนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในการร่นระยะเวลาในการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้และเป็นประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามสปีชีส์ในกรณีที่คัพภะไม่สามารถพัฒนาเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ จึงนำคัพภะอ่อนมาเพาะเลี้ยงให้เป็นต้นได้อีกแนวทางหนึ่ง

Table 1 Callus fresh weight induced from young embryo culture of oil palm interspecific hybrid (*Elaeis guineensis X E. oleifera*) after cultured for 4 months

Media	Callus fresh weight (g)
MS + dicamba 1.0 mg/l	0.27 abc
MS + dicamba 1.5 mg/l	0.21 c
MS + dicamba 2.0 mg/l	0.23 bc
MS + dicamba 2.5 mg/l	0.15 c
MS + dicamba 3.0 mg/l	0.18 c
MS + picloram 1.0 mg/l	0.26 abc
MS + picloram 1.5 mg/l	0.46 a
MS + picloram 2.0 mg/l	0.44 a
MS + picloram 2.5 mg/l	0.42 ab
MS + picloram 3.0 mg/l	0.35 abc
CV%	**45.91**

The same letters in the same column indicate that difference is not significant at $p<0.05$

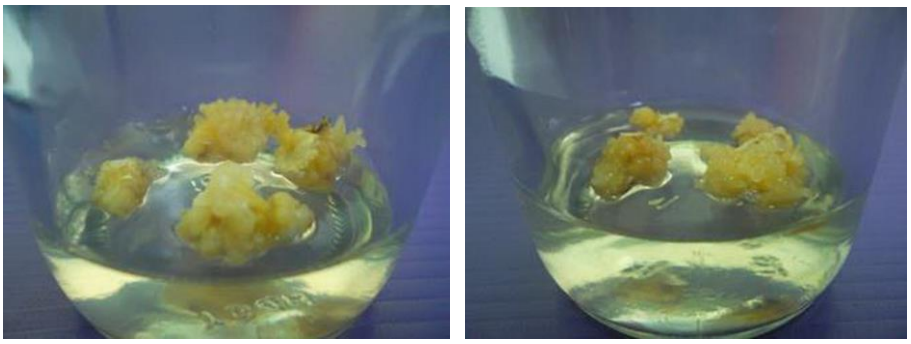


Figure 1 Compact callus induced from young embryo culture of oil palm interspecific hybrid (*Elaeis guineensis X E. oleifera*)

Figure 2 Nodular callus and shoots developed from young embryo culture of oil palm interspecific hybrid (*Elaeis guineensis X E. oleifera*) cultured on Murashige and Skoog media without plant growth regulator. (a) is nodular callus and (b) is shoots.

2. การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

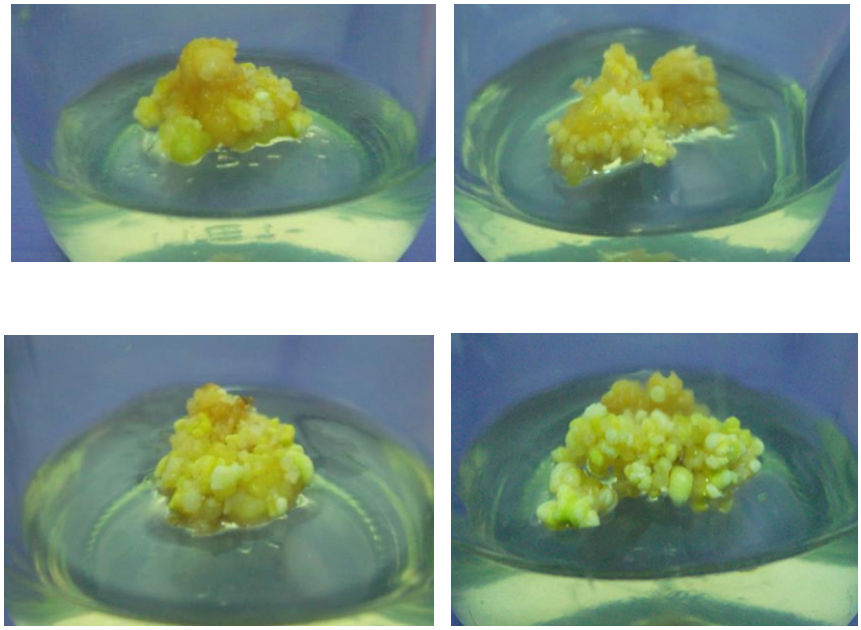
จากการนำแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่นและเกิดจากการนำคัพภะอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba picloram และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า แคลลัสมีแนวโน้มพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 35 และ 26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะจากการขยายขนาดเซลล์เนื้อเยื่อใหญ่ขึ้นเริ่มเปลี่ยนสีเนื้อเยื่อเป็นสีขาวขุ่นและมีลักษณะเป็นกลุ่มเม็ดกลมๆ บนก้อนเนื้อเยื่อเพิ่มปริมาณขึ้น ตั้งแต่ช่วงเดือนที่ 3 หลังเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Te-chato (1998) รายงานว่า สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และ อาสลัน (2545) รายงานว่า สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุดบนอาหารสูตร MS ที่เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้การพัฒนาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน อาจขึ้นอยู่กับชนิดหรือพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ชนิดของชิ้นส่วนที่นำมาชักนำให้เกิดแคลลัส รวมทั้งอายุของแคลลัสด้วย

เมื่อเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่อเนื่องบนอาหารสูตรเดิมอีก 3 เดือน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ โดยพบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในสูตรอาหาร MS ที่เติม dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 15.78 เปอร์เซ็นต์ และเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 11.76 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ซึ่งมีรูปแบบพัฒนาการที่เห็น 3 ระยะ คือ รูปกลม รูปหัวใจ และระยะสร้างจาว (สมปอง, 2539) โดยโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะสร้างจาวมีสีเขียวเกิดขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากมีการสร้างคลอโรฟิลล์ทำให้สามารถสังเคราะห์แสงและเจริญเติบโตรวดเร็วจนพัฒนาเป็นยอดได้ แต่ยอดดังกล่าวยังไม่ยืดยาว (ภาพที่ 3)

Table 2 Embryogenic callus and somatic embryo induced from callus culture for 4 months

Media	embryogenic callus (%)	Somatic embryo (%)
MS + dicamba 0.1 mg/l	12 b	0
MS + dicamba 0.5 mg/l	10 b	0
MS + dicamba 1.0 mg/l	26 ab	15.78
MS + picloram 0.1 mg/l	20 ab	0
MS + picloram 0.5 mg/l	15 ab	0
MS + picloram 1.0 mg/l	20 ab	0
MS + 2,4-D 0.1 mg/l	35 a	11.76
MS + 2,4-D 0.5 mg/l	7 b	0
MS + 2,4-D 1.0 mg/l	21 ab	0
CV%	**78.14**	

The same letters in the same column indicate that difference is not significant at $p<0.05$



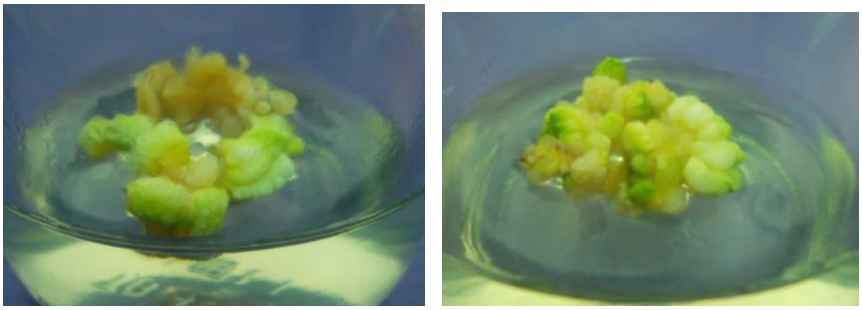


Figure 3 Development of embryogenic callus induced from callus culture.

3. การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากขั้นตอนที่ 2 ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 6 เดือน ส่งผลให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอซึ่งมีรูปแบบพัฒนาการ 3 ระยะ คือ รูปกลม รูปหัวใจ และระยะสร้างจาว ซึ่งเห็นได้ชัดในระยะรูปกลมและระยะสร้างจาว จึงนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่ความเข้มข้น 5 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โซมาติกเอ็มบริโอสามารถพัฒนาเป็นยอดที่มีลักษณะรวมเป็นกระจุก 1-2 ยอดแต่ไม่ยืดยาวและไม่ปรากฏการเจริญของราก (ภาพที่ 5) ส่วนในอาหารสูตรอื่นไม่พบการพัฒนาเป็นยอดแต่บางส่วนยังคงมีสีเขียวและเนื้อเยื่อบางส่วนจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด (ภาพที่ 4) อาจเนื่องมาจากชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อให้พัฒนาเป็นยอดได้ ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในสูตรอาหารและจากการสร้างขึ้นมาของเนื้อเยื่อเกิดความไม่สมดุลจึงทำให้ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ อาสลัน (2545) รายงานว่า สามารถชักนำการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอโดยนำเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวมาเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น โดยชั้นล่างเป็นอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมผงถ่านเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกันเติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร โซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวสามารถพัฒนากลายเป็นยอดสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ กษิดิศ และคณะ (2556) รายงานว่า โซมาติกเอ็มบริโอสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

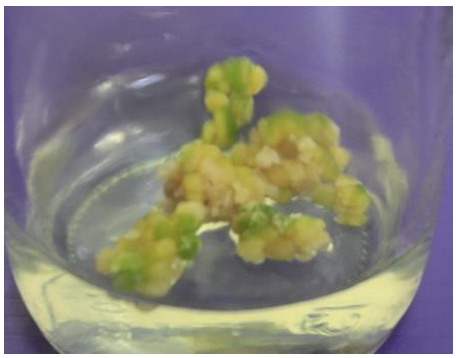
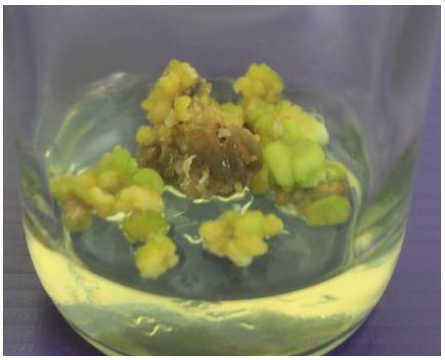
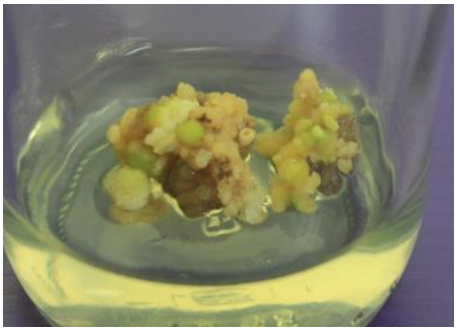




Figure 4 Somatic embryos developed without shoot and root development.

Figure 5 Apical shoots induced on MS medium supplemented with NAA concentration of 5.0 mg/l.

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามสปีชีส์มีปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อความสำเร็จ จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้บนอาหารสูตร MS ที่เติม picloram ความเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด 0.46 0.44 และ 0.42 กรัม ตามลำดับ

แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนมีแนวโน้มในการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอจินิคแคลลัสสูงสุดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 35.0 และ 26.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอบนสูตรอาหาร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 15.78 เปอร์เซ็นต์ และเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 11.76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีรูปแบบพัฒนาการ 3 ระยะ คือ รูปกลม รูปหัวใจ และระยะสร้างจาว

โซมาติกเอ็มบริโอมีการพัฒนาในอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถพัฒนาเป็นยอดที่มีลักษณะรวมเป็นกระจุก 1-2 ยอด แต่ไม่ยืดยาวและไม่ปรากฏการเจริญของราก

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปใช้ประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามสปีชีส์หรือผสมกลับในการเพิ่มปริมาณมากและมีลักษณะเหมือนต้นเดิมหรือในกรณีทำการผสมข้ามสปีชีส์แล้วคัพภะไม่สามารถพัฒนาเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ จึงนำคัพภะอ่อนมาเพาะเลี้ยงให้เป็นต้นได้และช่วยในการร่นระยะเวลาในการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อนำไปผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้

2. ได้ข้อมูลเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบื้องต้นที่สามารถนำไปพัฒนาต่อในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันต่อไป

11. เอกสารอ้างอิง

กษิดิศ ดิษฐบรรจง ชยานิจ ดิษฐบรรจง สุรกิตติ ศรีกุล อรรัตน์ วงศ์ศรี และ ภุมรินทร์ วนิชชนานันท์. 2556. การเกิด somatic embryogenesis และ organogenesis ในปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา. การจัดประชุมสัมมนาวิชาการปาล์มน้ำมันประจำปี 2555 วันที่ 12-13 มีนาคม 2556 ณ. โกลเด้น ไพน์ บีช รีสอร์ท ปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์.

ชยานิจ ดิษฐบรรจง กษิดิศ ดิษฐบรรจง ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ อรรัตน์ วงศ์ศรี และ อรุณี ใจเถิง. 2552. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน *ใน* เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 : สาขาพืช วันที่ 17-20 มีนาคม 2552 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 641 หน้า

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

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

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

Teixeira, J. B., Sondahi, M. R., Nakamura, T. and Kirby, E. G. 1994. Establishment of oil palm cell suspension culture and plant regeneration. Plant cell Tissue and Organ Culture. 45:159-164