คำนำ

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

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

ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันมากขึ้นโดยใช้หลักการ "true-to-type" เพื่อให้ได้ต้นที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์ เช่น ผลผลิตสูง ต้านทานโรค ทนต่อสภาพแห้งแล้ง (Mutert, 1999) นอกจากนี้ สมชาติ (2550) กล่าวว่า ข้อดีของต้นกล้าปาล์มที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ มีการแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อยมาก มีลักษณะเด่นเหมือนต้นพ่อแม่ทุกประการ การเจริญเติบโตดีให้ผลผลิตเร็วกว่าปาล์มที่มาจากการเพาะเมล็ด มีความต้านทานโรคสูง และให้ผลผลิตสูง

แนวทางใหม่ที่มีประสิทธิภาพลดปัญหากลายพันธุ์จากการผลิตต้นกล้าโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ วิธีการชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซีสโดยใช้เทคนิคเมอริสเต็มคัลเจอร์หรือการปั่นตายอด ซึ่งขบวนการนี้ไม่ต้องผ่านการเกิดแคลลัสทำให้ลดโอกาสเกิดการกลายพันธุ์จากแคลลัสได้

งานวิจัยนี้ มุ่งศึกษาการชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซีส (organogenesis) โดยไม่ต้องผ่านการชักนำแคลลัสเพื่อลดปัญหาความผิดปรกติของต้นกล้าโดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอดของเอมบริโอในการเริ่มต้นเพาะเลี้ยง องค์ความรู้ประยุกต์ที่ได้รับใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันเชิงการค้าในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซีสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ช่วยพัฒนาองค์ความรู้ด้านการวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน และนักวิจัยสามารถนำความรู้ที่ได้ไปปรับใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ และการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันในอนาคต

2. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปลอดโรค ตรงตามสายพันธุ์ และให้ผลผลิตต่อไร่สูง รวมทั้งเป็นการสนับสนุนการผลิตต้นกล้าลูกผสมชั่วที่หนึ่งในระยะเวลาอันรวดเร็วสำหรับสายพันธุ์ดีเด่น และเป็นแนวทางการสร้างลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ๆ ในอนาคต

3. สร้างประโยชน์ต่อกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกปาล์มน้ำมัน และสถาบันวิจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องสามารถนำความรู้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป รวมถึงโครงการความร่วมมือสหกิจศึกษาทางวิชาการเกษตรระหว่างมหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร กับภาคเอกชน

4. เสริมสร้างความเข้มแข็งให้กับประเทศในสภาวะการแข่งขันแบบเสรีทางการค้า ลดการนำเข้าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต่างประเทศ

การตรวจเอกสาร

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชน้ำมันที่ให้น้ำมันในปริมาณสูง (Abdullah *et al.,* 2005) จัดเป็นพืชที่มีศักยภาพในการแข่งขันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นทั้งในด้านการผลิตและการตลาด ในประเทศไทยส่วนแบ่งการผลิตน้ำมันปาล์มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว คาดว่าในช่วงปี 2559-2563 จะเพิ่มเป็นร้อยละ 31 ประเทศผู้ผลิตที่สำคัญ คือ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย (กรมวิชาการเกษตร, 2548) น้ำมันปาล์มสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล จังหวัดที่ปลูกปาล์มน้ำมันมาก ได้แก่ กระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง ตามลำดับ (ชาย และสุรกิตติ, 2548 ; ธีระ และคณะ,2548) สายพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า ได้แก่ ลูกผสมเทเนอรา (ดูรา X ฟีสิเฟอรา) (ชาย และสุรกิตติ, 2548) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปปาล์มน้ำมัน คือ ครีมเทียม มาการีน (เนยเทียม) เนยขาว วานาสปาติ ไขมัน และน้ำมันทอด ผลิตภัณฑ์วิตามินอี อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (วิชณีย์, 2548)

การพัฒนางานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่สำคัญ

Gorret *et al.* (2004) รายงานว่า ได้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันโดยใช้วิธีเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในระบบไบโอรีแอคเตอร์ (bioreactor) ศึกษาธาตุอาหาร (nutrients) และขบวนการเมตาบอไลท์(metabolites)ระหว่างภายในเซลล์ ค่าพารามิเตอร์ไคเนติก (kinetic parameters) และธาตุอาหารกับผลผลิตชีวมวล พบว่า ไนโตรเจนมีผลต่อการเพิ่มปริมาณด้นในขวดทดลอง กลูตามีน(glutamine)ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนและความหนาแน่น(density) แอมโมเนียทำให้มีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive) และมีปฏิกิริยาแบบเสริมกัน (synergistic effects)ทำให้ผลิตเนื้อเยื่อได้ต้นจำนวนมาก

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

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

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

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

Hilae and Te-chato (2005) ได้รายงานว่า การเติมแมนนิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในอาหารสูตร MS ช่วยส่งเสริมการเจริญรากของโซมาติคเอมบริโอได้สูงสุด 40 % การเติมน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้นสูงและการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารช่วยส่งเสริมการสร้างรากของปาล์ม

Abdullah *et al.* (2005) ได้เลี้ยงเอมบริโออ่อน (immature embryo) ของปาล์มน้ำมัน และสามารถเกิดแคลลัสด้วยอาหารสูตร N_6 2.5 หรือสูตร Chu 1975 ที่เติม 2,4-D 2.5 มก./ล. และสูตร Chu โดยเกิดแคลลัสภายหลังเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเอมบริโอเจนิคแคลลัส (embryogenic callus) พัฒนาเป็นโซมาติคเอมบริโอ (somatic embryo) ภายหลังเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ และพบโซมาติคเอมบริโอในระยะทอร์ปิโอ (torpedo-shaped) และ ระยะต้นอ่อน (plantlet) ในอาหารสูตร Chu และคณะ, 1975 ที่ไม่เติม 2,4-D

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

Abdullah *et al.*(2005) รายงานว่า การเลี้ยงเอมบริโอเหมาะสมต่องานปรับปรุงพันธุ์ (breeding programs) โดยได้ศึกษากระตุ้นขบวนการเอมบริโอเจเนซีส (embryogenesis) เอมบริโอมีการตอบสนองได้ดีกว่าชิ้นส่วนใบและเนื้อเยื่อราก เอมบริโอเกิดเอมบริโอเจเนซีสได้และมีประสิทธิภาพดีในการเจริญเป็นต้นกล้า ใช้เวลาเพาะเลี้ยงน้อยและจำนวนต้นผิดปกติน้อย เทคนิคนี้สามารถใช้ร่วมกับการนำยีนเข้าสู่เซลล์หรือแคลลัสของปาล์มน้ำมันเพื่อพัฒนาพันธุ์ปาล์มให้มีลักษณะดีตามที่ต้องการ

จิระศักดิ์ และคณะ (2550) ได้เลี้ยงชิ้นส่วนเอมบริโออ่อนของปาล์มน้ำมัน ด้วยอาหารแข็งสูตร VW ที่เติม BAP เข้มข้น 4 มก/ล. IAA เข้มข้น 1 มก/ล. น้ำมะพร้าว 22.5 % นาน 355 วัน ทำให้เกิดแคลลัสแล้วพัฒนาเป็นยอดพิเศษได้โดยผ่านกระบวนออร์แกโนเจเนซีส(organogenesis) สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิคแคลลัสชนิดหลวมและแน่นได้คือ อาหารแข็งสูตร VW ที่เติม BAP 4 มก/ล. IAA 1 มก/ล. น้ำมะพร้าว 22.5 % เอมบริโอเจนิคแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นโครงสร้างที่คล้ายกระจุกยอดได้ เมื่อเลี้ยงนาน 150 วัน

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

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

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

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

วิธีการวิจัย

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

การเตรียมชิ้นส่วนและการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเอมบริโอ

คัดเลือกต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่า ที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งมีอายุประมาณ 5 ปี แล้วทำสัญลักษณ์กำหนดหมายเลขไว้ จากนั้นปลิดผลอ่อน ขนาดผล 2.5 X 3.7 เซนติเมตร ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 9.5 กรัมต่อผล นำเมล็ดพันธุ์มาล้างด้วยน้ำยาซันไลด์ 3 ครั้ง และน้ำสะอาด 3 ครั้ง ฉีดพ่นด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 % 5 นาที แล้วปล่อยให้แห้ง ใช้มีดผ่าแบ่งผลบริเวณใกล้กับเอมบริโอ ปอกเปลือกหุ้มผล จากนั้นนำเอมบริโอที่ติดอยู่กับเนื้อผลมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 10 % ที่เติมทวิน-20 (tween20) เขย่าเป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ใช้ปากคีบ คีบเอมบริโอมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ตามแผนการทดลองต่อไป

การศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซีสในสภาพปลอดเชื้อ

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

สิ่งทดลองที่ 1 อาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 0 มก./ล.
สิ่งทดลองที่ 2 อาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 มก./ล.
สิ่งทดลองที่ 3 อาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 4 มก./ล.

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

ผลการวิจัย

การศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซีสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

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

1. จำนวนยอด

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

2. ความยาวยอด

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

3. เส้นผ่านศูนย์กลางส่วนปลายยอดอ่อน และเส้นผ่านศูนย์กลางเอมบริโอทั้งชิ้นส่วน

การเลี้ยงด้วยอาหารทุกสูตรอาหาร ไม่ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางปลายยอดอ่อน มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

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

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

4. จำนวนใบย่อย

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

5. ความยาวใบ

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

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

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

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

หมายเหตุ

1/ ตัวเลขในแนวตั้งที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

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

ตารางที่ 2 จำนวนยอด ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางส่วนปลายยอดอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางของเอมบริโอทั้งชิ้น จำนวนใบย่อย ความยาวใบ เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนเอมบริโอในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 200 วัน

อาหารเหลวสูตร VW ร่วมกับ BAP ระดับต่างๆ	ลักษณะที่ปรากฏ					
	จำนวนยอด (ยอด)	ความยาวยอด(ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางปลายยอดอ่อน (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางทั้งชิ้นส่วน (ซม.)	จำนวนใบย่อย (ใบ)	ความยาวใบ (ซม.)
BAP 0 มก./ล	1.0 b[1]	4.2 ab	0.5 a	3.0 a	5.6 b	4.7 a
BAP 2 มก./ล	1.0 b	5.3 a	0.5 a	2.8 a	3.2 b	5.7 a
BAP 4 มก./ล	1.5 a	3.0 b	0.5 a	1.3 b	17.4 a	1.2 b
F-test; F-value	5.3	3.5	0.1	9.9	4.7	9.9
Sig.	*	*	ns	* *	*	* *
%CV.	35.4%	44.3%	40.0%	38.2%	121.2%	58.6%

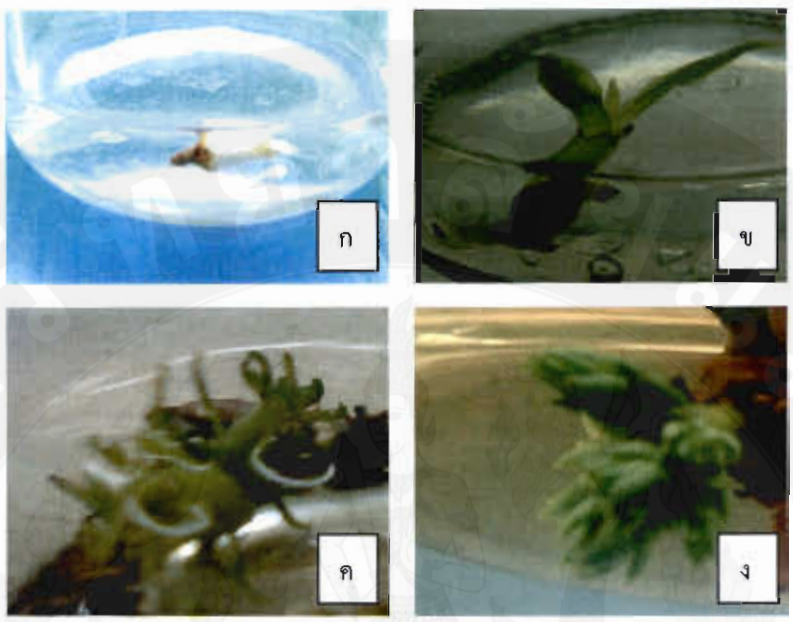
หมายเหตุ

1/ ตัวเลขในแนวตั้งที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

* = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

* * = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

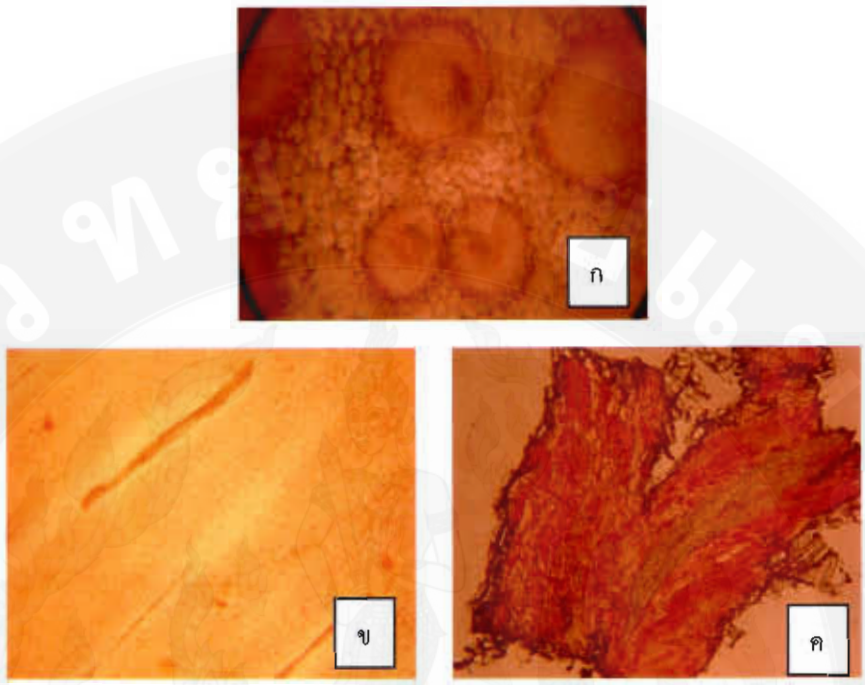


ภาพที่ 1 สภาพเนื้อเยื่อเอมบริโอหลังเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน (ก) และลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนและพัฒนาการเกิดยอดใหม่ เมื่อเลี้ยงเอมบริโอในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ระดับ 0 2 และ 4 มก./ล. นาน 200 วัน (ข – ง)

ข) BAP 0 มก./ล.

ค) BAP 2 มก./ล.

ง) BAP 4 มก./ล.

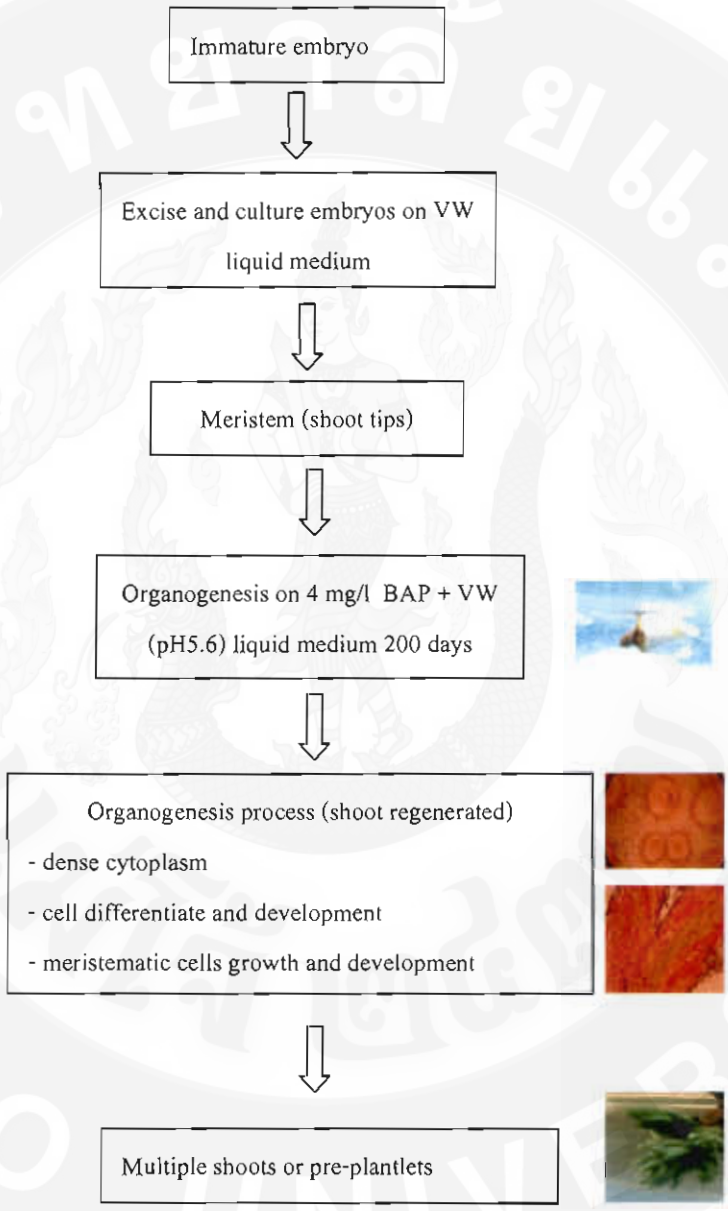


<u>ภาพที่ 2</u> ลักษณะภายในของเซลล์เนื้อเยื่อเอมบริโอ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ก) เอมบริโออ่อนในระยะแรกๆ มองเห็นท่อไซเลมชัดเจน แวคิวโอลมีขนาดใหญ่ (ภาพตัดขวางด้านบน)

ข) ระยะแรกๆ ภายในเซลล์ ไซเลมมีการจัดเรียงตัวของเซลล์ค่อนข้างเป็นระเบียบ เซลล์ยังไม่มีการแบ่งตัว ส่วนแวคิวโอลมีขนาดใหญ่ (ภาพตัดตามยาวของเนื้อเยื่อ)

ค) เมื่อเลี้ยงไปนานมากขึ้น กลุ่มเซลล์พาเรนไคมาที่อยู่ใกล้เคียงกันมีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ ทำให้ไซโทพลาสซึมเข้มข้นขึ้น ส่วนแวคิวโอลเดิมมีขนาดใหญ่ก็เล็กลง จึงมองดูเหมือนเซลล์จัดเรียงแบบไร้ระเบียบ คาดว่า เซลล์น่าจะมีการแบ่งตัวในอัตราที่สูงขึ้น (ภาพตัดตามยาวของเนื้อเยื่อ)



ภาพที่ 3 ขบวนการชักนำให้เกิด organogenesis ของเอมบริโอ ภายใต้ระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวที่เติม BAP ร่วมกับการเขย่า (shake)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซีสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ

การศึกษานี้ เน้นการชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซีสของปาล์มน้ำมันโดยไม่ต้องผ่านการชักนำให้เกิดแคลลัสก่อน จากการทดลองนี้ได้เลี้ยงเอมบริโออ่อนในอาหารเหลวสูตร VW (pH 5.6) ที่เติม BAP ระดับ 4 มก./ล. และซูโครส 2.0 % เป็นเวลา 200 วัน พบว่า ทำให้มีจำนวนยอดมากที่สุด เฉลี่ย 1.5 ยอด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตรอื่นๆ ส่วนการไม่เติม BAP ทำให้ไม่เกิดยอดใหม่ หรือกล่าวได้ว่า ไม่เกิดออร์แกโนเจเนซีส แต่การเติม BAP ทำให้เกิดออร์แกโนเจเนซีสได้จึงช่วยเพิ่มปริมาณยอดให้มากขึ้น สอดคล้องกับ จิระศักดิ์ และคณะ (2550) รายงานว่าสามารถชักนำยอดพิเศษของปาล์มน้ำมันได้ในอาหารสูตรที่เติม BAP และ IAA สามารถกระตุ้นให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซีสได้และ การเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารเหลวที่เติม BAP ร่วมกับ IAA และน้ำมะพร้าว ทำให้มีการพัฒนาเป็นยอดพิเศษจำนวนมากได้ (จิระศักดิ์ และคณะ, 2553) ซึ่งเกิดจากอินไดเร็คออร์แกโนเจเนซีส (indirect - organogenesis) การเติม BAP ทำให้โซมาติคเอมบริโอมีการพัฒนาที่ดี (Kamnoon and Preamrudee, 1999) การวิจัยนี้จึงเป็นทำซ้ำเพื่อยืนยัน และสนับสนุนข้อมูลวิจัยดังกล่าวได้

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

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

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

1995) ซึ่งขบวนการ organogenesis เป็นขบวนการเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ โดยการรวมตัวของกลุ่มเซลพาเรนไคมาที่อยู่ใกล้เคียงกัน ซึ่งกลุ่มเซลพาเรนไคมาเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซล ทำให้ไซโทพลาสซึมเข้มข้นขึ้น ส่วนของแวคิวโอลซึ่งแต่เดิมมีขนาดใหญ่ก็จะเล็กลง เซลมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลเจริญ (meristemaic cell) ทำให้เซลมีการแบ่งตัวในอัตราสูง เซลเหล่านี้ยังมีขนาดเล็ก กลุ่มเซลเหล่านี้บางทีอาจจะเรียกว่า "Merisemoids" ซึ่งจะเจริญไปเป็นจุดกำเนิดยอด หรือราก (shoot or root primordia) ต่อไป การเกิดยอดหรือรากจะเป็นอิสระต่อกันขึ้นอยู่กับว่าเนื้อเยื่อส่วนนั้นจะได้รับสิ่งกระตุ้นในการเจริญไปเป็นอวัยวะ(ชลิต, 2532) โดยในการทดลองนี้ได้นำเนื้อเยื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์และปรากฏลักษณะเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงต่างๆ สอดคล้องกับข้อมูลดังกล่าว

สรุปผลการวิจัย

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

2. การเลี้ยงเอมบริโอ ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BAP ระดับ 4 มก./ล. และซูโครส 2.0 % สามารถชักนำให้เกิดขบวนการออร์แกโนเจเนซีสได้โดยไม่ต้องผ่านการชักนำแคลลัสก่อน จึงช่วยให้เพิ่มปริมาณยอดได้โดยตรง (direct multiple shoots)

ข้อมูลเหล่านี้ น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต่อไปในอนาคต