ผลของออกซินต่อการชักนำให้เกิดโซมาติคเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

Effect of auxin on somatic embryo induction and plant regeneration of oil palm SUP-PSU

วราภรณ์ หีดฉิม[1,2], สมปอง เตชะโต[1,2*] และ สุรีรัตน์ เย็นช้อน[1,2]

Waraporn Heedchim[1,2], Sompong Te-chato[1,2*] and Sureerat Yenchon[1,2]

บทคัดย่อ: ปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี การผลิตในเชิงการค้าใช้วิธีการเพาะเมล็ด ซึ่งใช้ระยะเวลานานและไม่เพียงพอต่อความต้องการ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของออกซินและสูตรอาหารต่อการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง โดยนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (embryogenic callus; EC) ที่ได้จากการเลี้ยงคัพภะวางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน (oil palm culture medium; OPCM) ที่เติม 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (ไดแคมบา) ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่า ไดแคมบา 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติคเอ็มบริโอ (somatic embryo; SE) สูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์และจำนวน SE เฉลี่ย 1.4 เอ็มบริโอต่อหลอด แต่แคลลัสที่ได้มีลักษณะคล้ายรากสีน้ำตาล ในขณะที่ไดแคมบา 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 1.14 ยอดต่อหลอด แคลลัสที่ได้มีสีเหลือง จากนั้นนำยอดที่ได้วางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 6 สัปดาห์ เพื่อให้ยอดยืดยาว แล้ววางเลี้ยงบนอาหารชักนำรากที่ประกอบด้วยชนิดสูตรอาหาร และความเข้มข้นของ α-naphthalene acetic acid (NAA) แตกต่างกัน พบว่า อาหาร OPCM ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดรากสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากเฉลี่ย 7.38 รากต่อต้น ความยาวรากเฉลี่ย 1.5 เซนติเมตร ดัชนีการเจริญเติบโต 1.22 และจำนวนใบ 3.75 ใบต่อต้น หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ และเมื่อย้ายต้นกล้าลงปลูกในดินผสม พบว่าต้นกล้ามีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายปลูกนาน 8 สัปดาห์ ดังนั้นอาหารสูตร OPCM ที่เติมไดแคมบา 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับชักนำ SE ในขณะที่อาหารสูตร OPCM ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการชักนำรากของปาล์มน้ำมัน ซึ่งสามารถใช้สูตรอาหารและออกซินทั้งชนิดและความเข้มข้นดังกล่าวในการช่วยส่งเสริมการผลิตต้นกล้าเพื่อการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ปาล์มน้ำมัน, ทรัพย์ ม.อ., ออกซิน, โซมาติคเอ็มบริโอ, การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

Received December 12, 2018

Accepted June 12, 2019

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ การอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, 10900, Thailand

[*] Corresponding author: stechato@yahoo.com

ABSTRACT: Oil palm cv. SUP-PSU is high yield variety that can adapt well in various growing environments. Commercial production is generally carried out by conventional method through seed propagation. However, it is time-consuming, and the number of plants is not enough for demanding of growers. Tissue culture technique is an alternative method to solve those problems. Thus, the objectives of this research was to study effects of auxins and culture media on plantlet regeneration of oil palm *in vitro*. The embryogenic callus (EC) derived from culturing zygotic embryo was transferred to oil palm culture medium (OPCM) supplemented with different concentrations of 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) for 4 weeks. The results showed that 0.1 mg/l dicamba could induce the highest percentage of somatic embryo (SE) induction (80%) as well as number of SEs (1.4 embryos/tube) with root-like structure obtaining callus whereas the highest number of shoots (1.14 shoots/tube) was obtained on the medium added with 0.3 mg/l dicamba with yellowish callus. Subculturing shoots to OPCM without plant growth regulators resulted in shoot elongation. Rooting of the shoots was successfully obtained on OPCM augmented with 0.5 mg/l α-naphthalene acetic acid (NAA). On this culture medium, the highest root induction at 100%, average number of roots at 7.38 roots/shoot, root length at 1.5 cm, growth index at 1.22 and number of leaves at 3.75 leaves/plant were noticed at 8 weeks. Therefore, OPCM with 0.3 mg/l dicamba are suitable for SE induction while adding 0.5 mg/l NAA to the medium are optimum for root induction. Both plant growth regulators containing medium can apply for propagation and improvement of oil palm in future.
Keywords: Oil palm, “SUP-PSU”, auxins, somatic embryo, plant regeneration

บทนำ

ปาล์มน้ำมัน เป็นพืชยืนต้นผสมข้ามที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย มีศักยภาพในการให้น้ำมันสูงถึง 4,000-5,000 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันอื่นๆ ทุกชนิด (Sheil et al., 2009) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลายทั้งด้านอาหารและไม่ใช่อาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ประโยชน์ในรูปของพลังงานทดแทน ที่รู้จักกันดีคือ ไบโอดีเซล ส่งผลให้มีการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการใช้ โดยเกษตรกรต้องการพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตทะลายสูง ต้นเตี้ย ทางใบสั้น ในขณะที่ผู้ประกอบการโรงงานมีความต้องการพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตน้ำมันปาล์มดิบสูง จึงนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อให้ได้พันธุ์ที่ดี มีผลผลิตทะลายและผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่ปลูกสูง รวมทั้งสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี (ธีระ, 2554) ปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. เป็นพันธุ์ปาล์มน้ำมันชนิดเทเนอราที่นิยมปลูกทางการค้าได้รับการปรับปรุงพันธุ์จากภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยลักษณะพิเศษของปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้ คือ ผลผลิตทะลายและผลผลิตน้ำมันสูง โดยให้ผลผลิตทะลายไม่น้อยกว่า 4 ตันต่อไร่ต่อปี ที่อายุ 7-8 ปี ซึ่งจะสูงกว่าพันธุ์ที่ไม่ทราบแหล่งที่มาของพันธุ์อย่างน้อยหนึ่งเท่า เนื้อในเมล็ดมีขนาดปานกลาง มีพันธุกรรมที่สามารถปรับตัวเข้ากับดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ สภาพแห้งแล้ง เนื่องจากต้นพ่อและแม่ถูกคัดเลือกภายใต้สภาพแวดล้อมดังกล่าว (สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2561) การผลิตต้นกล้าในเชิงการค้าใช้วิธีการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ซึ่ง 1 เมล็ดสามารถผลิตต้นกล้าได้เพียง 1 ต้น ในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันในแปลงปลูกของเกษตรกรใช้เวลา 14 เดือน ตั้งแต่เริ่มเพาะเมล็ดจนกระทั่งพัฒนากลายเป็นต้นกล้าที่พร้อมจะออกปลูกได้ (ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี, 2553) ส่งผลให้ต้นกล้าไม่เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถขยายพันธุ์พืชให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันสามารถทำได้ผ่านกระบวนการสร้างโซมาติคเอ็มบริโอ (somatic embryo; SE) โดยต้นกล้าปาล์มน้ำมันหนึ่งต้นสามารถพัฒนามาจากเซลล์เพียงแค่หนึ่งเซลล์ ทำให้สามารถผลิตต้นกล้าได้จำนวนมาก ซึ่งใช้ระยะเวลาเพียงแค่ 6-8 เดือน ก็สามารถนำไปอนุบาลเพื่อย้ายออกปลูกลงแปลงต่อไป การขยายพันธุ์ผ่านกระบวนการสร้าง SE ได้ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น หม่อน (Agarwal et al., 2004) พืชปาล์ม (Steinmacher et al., 2011) โอ๊ค (Mallon et al., 2012) อินทผลัม

(Kurup et al., 2014) สำหรับปาล์มน้ำมัน กระบวนการนี้มีรายงานการใช้ชิ้นส่วนหลายชนิด เช่น คัพภะ (Promchan et al., 2012) ราก (Wooi, 1995) ใบอ่อน (สมปอง และคณะ, 2547) ช่อดอกอ่อน (Teixeira et al., 1994; Jayanthi et al., 2015) อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ยังน้อย ทั้งนี้ความสำเร็จในการชักนำเป็นพืชต้นใหม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นต้น สูตรอาหารเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากชิ้นส่วนพืชจะมีการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้โดยตรงจากสูตรอาหารที่ใช้ สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งชนิดและความเข้มข้นที่เติมลงไปในอาหารสังเคราะห์มีผลต่อความสามารถในการเกิดสัณฐานของพืช โดยเฉพาะกลุ่มออกซิน ซึ่งมีผลในการส่งเสริมการแบ่งเซลล์และการแบ่งเซลล์ที่เป็นไปในลักษณะการชักนำราก (สมปอง, 2539) ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าว อินทผลัม และปาล์มน้ำมัน เป็นต้น พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินมีผลต่อกระบวนการสร้างโซมาติคเอ็มบริโอ สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินมีหลายชนิด แต่ในปาล์มน้ำมันพบว่า 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (ไดแคมบา) มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอ (ศตปพร และสมปอง, 2557; ชีรวัลย์ และคณะ, 2560) ไดแคมบาเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิดหนึ่งซึ่งจะช่วยส่งเสริมกิจกรรมการแบ่งเซลล์ในชั้นอิพิเดอร์มิส พาเรนไคมา ชั้นของเนื้อเยื่อเจริญ และชั้นของเนื้อเยื่อเจริญมัดของท่อน้ำท่ออาหาร (ธนวดี, 2551) อย่างไรก็ตามพืชต่างชนิดกันจะตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้นของออกซินแตกต่างกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของออกซินและสูตรอาหารต่อการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ผ่านกระบวนการสร้างโซมาติคเอ็มบริโอ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมวัสดุพืช

นำเมล็ดปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. คู่ผสม 155/1-A อายุ 5 เดือน หลังจากการผสมเกสร กะเทาะเอากะลาออก จากนั้นล้างด้วยน้ำยาทีโพล แล้วจุ่มแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 20% ร่วมกับ ทวีน-20 150 ไมโครลิตรต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร นาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจากนั้นใช้มีดผ่าตัดตัดแยกเอาเฉพาะส่วนของคัพภะวางเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติมไดแคมบา 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็น กรด-ด่าง เป็น 5.7 และเติมผงวุ้น 6.0 กรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ คัพภะมีการสร้างแคลลัสที่มีโครงสร้างเกาะกันแบบหลวมๆ สีเหลือง จากนั้นย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน (oil palm culture medium; OPCM) ที่เติมไดแคมบา 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4 สัปดาห์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 10 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เพื่อชักนำและเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (embryogenic callus; EC) สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

วิธีการศึกษา

ผลของไดแคมบาต่อการเพิ่มปริมาณ SE

นำ EC น้ำหนักสดแคลลัส 1 กรัม ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณข้างต้น สับให้มีขนาดเล็กด้วยความถี่ 100 ครั้ง จากนั้นแบ่งชั่งน้ำหนักสด 0.1 กรัม วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่เติมไดแคมบา ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 6.0 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.7 วางเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมเช่นเดียวกับข้างต้น หลังจากวางเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเพิ่มปริมาณแคลลัส อัตราการชักนำ SE จำนวน SE ต่อหลอด และจำนวนยอดต่อหลอด เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของไดแคมบา วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละสิ่งทดลองทำ 5 ซ้ำๆ ละ 3 หลอด จากนั้นนำยอดที่ได้ไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญ

ผลของสูตรอาหารและ α-naphthalene acetic acid (NAA) ต่อการชักนำราก

นำยอดปาล์มน้ำมันที่ยืดยาวบนอาหารแข็งข้างต้น วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS หรือ OPCM เติมกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมหรือไม่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ หลังจากวางเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดราก จำนวนรากต่อต้น ความยาวราก ดัชนีการเจริญเติบโต (ดังสมการ) และจำนวนใบต่อต้น เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารและความเข้มข้นของ NAA วางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละสิ่งทดลองทำ 5 ซ้ำๆ ละ 2 ขวดๆ ละ 1 ต้น

ดัชนีการเจริญเติบโต =

$$\frac{\text{ความสูงต้นสุดท้าย (ซม.)} - \text{ความสูงต้นเริ่มต้น (ซม.)}}{\text{ความสูงต้นเริ่มต้น (ซม.)}}$$

การอนุบาลลงดินปลูก

นำต้นกล้าที่มียอดและรากที่สมบูรณ์แข็งแรงล้างเอาวุ้นออกด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำปลูกในกระถางที่บรรจุด้วยดินผสม จากนั้นครอบต้นกล้าด้วยขวดแก้วเพื่อควบคุมความชื้นเป็นเวลา 2 สัปดาห์ วางเลี้ยงในโรงเรือนที่มีการพรางแสง 70 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส รดน้ำทุกวันๆ ละ 1 ครั้ง หลังจากนั้นเปิดขวดแก้วออก หลังจากย้ายปลูกนาน 8 สัปดาห์ บันทึกอัตราการรอดชีวิต

ผลและวิจารณ์

ผลของไดแคมบาต่อการเพิ่มปริมาณ SE

การลดความเข้มข้นของไดแคมบาส่งผลให้เกิดการสร้าง SE เพิ่มขึ้น จากการศึกษาพบว่า EC ที่ผ่านการสับ 100 ครั้ง แล้ววางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM ที่เติมไดแคมบา 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเพิ่มปริมาณแคลลัสสูงสุด **(Table 1)** สำหรับอัตราการเกิด SE พบว่าไดแคมบา 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิด SE สูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เติมไดแคมบา ความเข้มข้นสูงกว่านี้ส่งผลให้อัตราการเกิด SE ลดลง โดยไดแคมบา ความเข้มข้น 0.2 0.3 04 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิด SE 60 60 40 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ชุดควบคุม (ไม่เติม ไดแคมบา) ไม่สามารถชักนำ SE ได้ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) **(Table 1)** สำหรับจำนวน SE พบว่าไดแคมบา 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวน SE สูงสุด 1.5 เอ็มบริโอต่อหลอด ไม่แตกต่างทางสถิติกับความเข้มข้นอื่น แต่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) กับชุดควบคุมซึ่งไม่สามารถชักนำ SE ได้ **(Table 1)** สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการสร้าง SE อย่างไรก็ตาม ไดแคมบาความเข้มข้นต่ำมีประสิทธิภาพในการชักนำ SE ในปาล์มน้ำมัน Kurup และคณะ (2014) รายงานว่าการเติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 6 Benzylaminopurine (BAP) ลงในอาหาร มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิด SE ในอินทผลัม ในขณะที่ ชาคริยา และคณะ (2560) รายงานว่าการเติม N6-(2-isopentenyl) adenine (2-iP) 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิด SE ของปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. มากที่สุดคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวน SE 42.95 เอ็มบริโอต่อหลอด Jayanthi และคณะ (2015) พบว่า 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 150 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ picloram 150 ไมโครโมลาร์ มีผลให้อัตราการเกิดเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าเพิ่มขึ้น 6.8-9.35 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ อภิชญา และคณะ (2560) รายงานว่าอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้อัตราการเกิด SE สูงสุดทั้งอัตราการสร้างโซมาติคเอ็มบริโอระยะรูปกลม (100%) และโซมาติคเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (81.82%) การตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันเนื่องมาจากชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นและพันธุกรรมที่แตกต่างกันแม้ว่าจะเป็นพืชชนิดเดียวกัน

โดยทั่วไปหลังจากการเพาะเลี้ยงจนได้ SE จำเป็นต้องย้าย SE ไปวางเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดยอด หรือในกรณีที่ SE ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้สามารถย้าย SE ไปวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอลก่อนเพื่อชักนำการสร้างโซมาติคเอ็มบริโอเอ็มบริโอชุดที่สอง (secondary somatic embryo; SSE) (สกุลรัตน์ และคณะ, 2557; Hilae and Te-chato, 2005; Promchan et al., 2012)

เติบโต นาน 6 สัปดาห์ เพื่อให้ยอดยืดยาว

แล้วจึงชักนำให้ SSE มีการงอกต่อไป นอกจากนี้พันธุกรรมเป็นปัจจัยสำคัญต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติคเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน (Corley and Tinker, 2003) สำหรับปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. คู่ผสม 155/1-A ซึ่งพบว่าอาหารที่เติมไดแคมบา 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้โดยไม่ผ่านการสร้าง SSE โดยไดแคมบา 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ได้สูงสุด1.14 ยอดต่อหลอด รองลงมาคือ 0.1 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเท่ากัน 1.12 ยอดต่อหลอด ในขณะที่ชุดควบคุมและความเข้มข้นอื่นๆ ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) **(Table 1; Figure 1)**

Table 1 Effect of concentrations of dicamba on SE induction of oil palm “SUP-PSU” cultured on OPCM after 4 weeks of culture

Dicamba (mg/l)	Callus proliferation	SE induction (%)	No. of SEs/tube	No. of shoots/ tube	Characteristics of callus
0	++	0e	0.00±0.00b	0.00±0.00b	brown callus + root
0.1	++	80a	1.40±0.24a	1.12±0.12a	brown callus + root
0.2	++	60b	1.40±0.24a	1.12±0.12a	brown callus + root
0.3	+++	60b	1.00±0.00a	1.14±0.23a	yellowish callus
0.4	++	40c	1.50±0.22a	0.00±0.00b	Yellowish callus
0.5	++	20d	1.00±0.00a	0.00±0.00b	brown
F-test		**	**	**	
C.V. (%)		1.86	47.47	40.21	

++ minimal proliferated callus

+++ moderate proliferated callus

** significantly different (P<0.01)

Mean values followed by the same letter within column are not significantly different according to Duncan’s multiple range test (DMRT).

จากการศึกษานี้พบว่าทุกชุดการทดลองสามารถชักนำการสร้าง SE ได้ ยกเว้นชุดควบคุม ในขณะที่มีเพียง 3 ชุดการทดลองเท่านั้นที่สามารถชักนำการสร้างยอดได้ คือ ไดแคมบา ความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าทุกชุดการทดลองสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ แต่ชุดควบคุม (ไม่เติมไดแคมบา) และไดแคมบาความเข้มข้นต่ำจะส่งเสริมให้แคลลัสมีโครงสร้างคล้ายราก สีน้ำตาล ในขณะที่ไดแคมบา ความเข้มข้น 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมให้แคลลัสมีโครงสร้างเกาะกันแบบหลวมๆ สีเหลือง แต่ไดแคมบา ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งเสริมให้แคลลัสมีการสร้างสารสีน้ำตาล **(Figure 1)** เนื่องมาจากไดแคมบาความเข้มข้นสูงจะกระตุ้นให้พืชเกิดความเครียดแล้วปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลซึ่งมีสีน้ำตาลออกมามาก

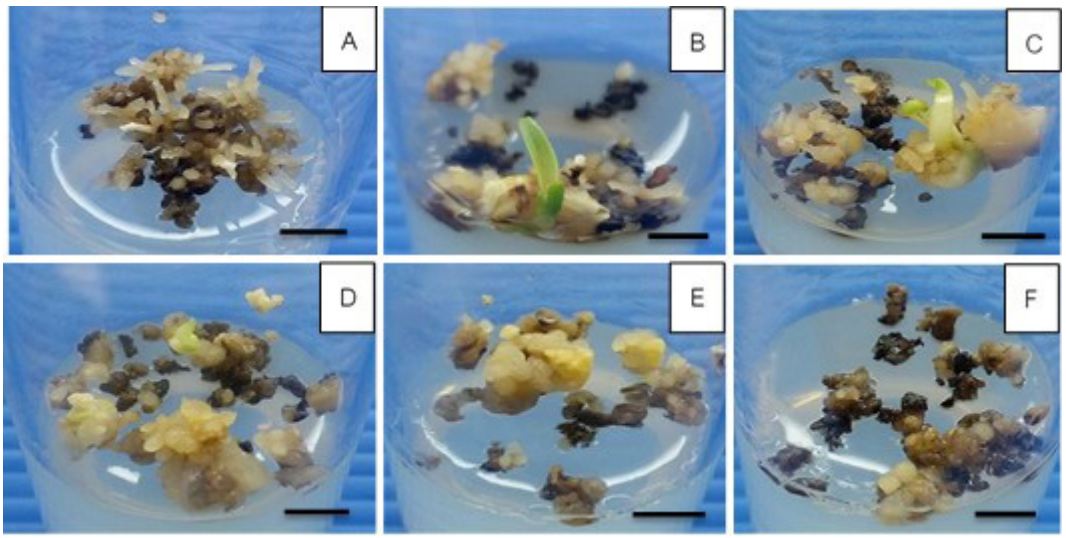

Figure 1 Characteristics of callus, SE and plantlet of oil palm "SUP-PSU" cultured on OPCM supplemented with different concentrations of dicamba and 200 mg/l ascorbic acid after 4 weeks of culture (bar = 0.5 cm)

A. 0 mg/l dicamba B. 0.1 mg/l dicamba C. 0.2 mg/l dicamba
D. 0.3 mg/l dicamba E. 0.4 mg/l dicamba F. 0.5 mg/l dicamba

เมื่อนำยอดที่ชักนำได้ข้างต้นวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ายอดมีการยืดยาวเพิ่มขึ้น 5-7 เซนติเมตร ยอดที่ได้แข็งแรง มีใบสีเขียว 2-3 ใบต่อต้น (Figure 2)

Figure 2 Elongation of shoot of oil palm "SUP-PSU" on OPCM without plant growth regulators after 6 weeks of culture (bar= 1 cm).

ผลของสูตรอาหารและ NAA ต่อการชักนำราก

จากการศึกษาพบว่า อาหารแข็งสูตร OPCM ให้อัตราการสร้างราก 100 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) กับอาหารสูตร MS **(Table 2)** สำหรับจำนวนราก พบว่าอาหารสูตร OPCM ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลสูงสุด 7.38 รากต่อต้น รองลงมาคือ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร OPCM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้จำนวนราก 3.75 3.13 และ 1.00 รากต่อต้น ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) **(Table 2)** เมื่อพิจารณาความยาวราก พบว่า อาหารสูตร OPCM ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากสูงสุด 1.50 เซนติเมตร รองลงมาคือ MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร OPCM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ความยาวราก 0.89 0.75 และ 0.45 เซนติเมตร ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) **(Table 2)** เช่นเดียวกับการศึกษาของ ยุพาภรณ์และสมปอง (2557) ที่รายงานว่าอาหารสูตร OPCM หรือ ARDA ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากของปาล์มน้ำมันได้ทั้งสองสายต้นคือ สายต้นกระบี่และคลองหอยโข่ง ในขณะที่ Gomes และคณะ (2015) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 53.7 ไมโครโมลาร์ ให้ผลดีที่สุดในการชักนำรากปาล์มน้ำมันทั้งอัตราการสร้างราก (81.3%) จำนวนราก (7.1 รากต่อต้น) และความยาวราก (1.2 ซม) นอกจากนี้ สกุลรัตน์และคณะ (2557) พบว่าอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้การสร้างรากดีที่สุด อย่างไรก็ตามการลดองค์ประกอบของธาตุอาหาร MS ลงครึ่งหนึ่งก็สามารถชักนำรากของปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงคัพภะแก่ได้ (Thawaro and Te-chato, 2010) จะเห็นได้ว่าพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่แตกต่างกันตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่แตกต่างกัน สำหรับดัชนีการเจริญเติบโต พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ดัชนีการเจริญเติบโตสูงสุด 1.35 รองลงมาคือ OPCM ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และ OPCM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีค่าดัชนีการเจริญเติบโต 1.22 0.83

Table 2 Effects of culture media and concentrations of NAA on root induction of oil palm “SUP-PSU” cultured on medium with 200 mg/l ascorbic acid for 8 weeks

Culture media	NAA (mg/l)	Root induction (%)	No. of roots /plant	Root length (cm)	Growth index	No. of leaves /plant
MS	0	50c	1.00±0.00c	0.45±0.02b	0.83±0.06b	3.81±0.49
MS	0.5	80b	3.75±0.25b	0.89±0.07b	1.35±0.15a	4.25±0.25
OPCM	0	100a	3.13±0.31b	0.75±0.04b	0.77±0.03b	3.13±0.13
OPCM	0.5	100a	7.38±0.37a	1.50±0.18a	1.22±0.14ab	3.75±0.14
F-test		**	**	**	**	ns
C.V. (%)		4.94	14.41	23.04	21.36	15.67

ns= not significantly different

** significantly different (P<0.01)

Mean values followed by the same letter within column are not significantly different according to DMRT.

และ 0.77 ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) เมื่อพิจารณาจำนวนใบพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดการทดลอง โดยอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนใบสูงสุด 4.25 ใบต่อต้น รองลงมาคือ สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต OPCM ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตร OPCM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้จำนวนใบ 3.81 3.75 และ 3.13 ใบต่อต้น ตามลำดับ (Table 2; Figure 3)

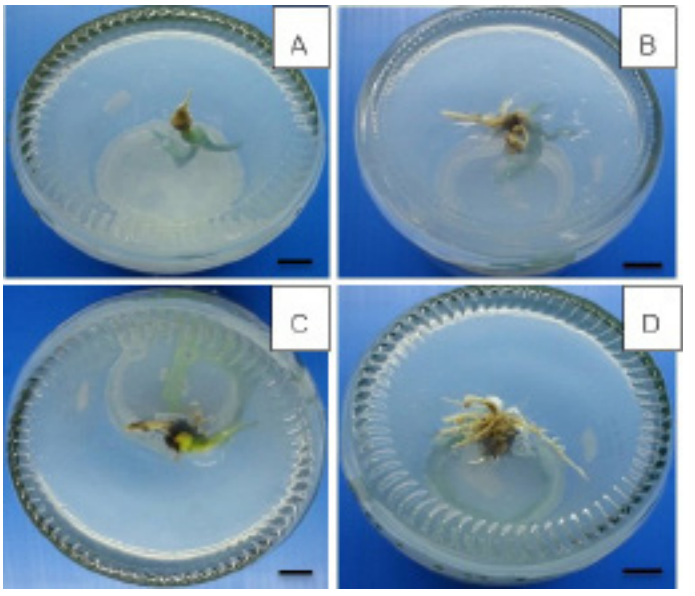

Figure 3 Characteristics of roots of oil palm “SUP-PSU” cultured on different culture media with or without NAA after 8 weeks of culture (bar= 1 cm).
A. PGRs-free MS B. MS + 0.5 mg/l NAA
C. PGRs-free OPCM D. OPCM + 0.5 mg/l NAA

จากการศึกษาพบว่า รากของปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. จะมีลักษณะเป็นรากฝอยสีขาว มีจุดกำเนิดของรากจากบริเวณเดียวกัน (Figure 3) ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้มีลำต้นแข็งแรง มีใบ 2-3 ใบ สีเขียวเข้ม (Figure 4)

การอนุบาลลงดินปลูก

หลังจากอนุบาลต้นกล้าลงดินปลูกเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในกระถางพลาสติกที่บรรจุด้วยดินผสมพบว่าต้นกล้ามีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตได้ดีทั้งความสูงและจำนวนใบที่เพิ่มขึ้น ใบมีสีเขียวเข้มขึ้นหลังจากอนุบาลต้นกล้าได้ 2 สัปดาห์

สรุป

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าอาหารสูตร OPCM ที่เติมไดแคมบา 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด SE โดยสามารถชักนำ SE ได้ 60 เปอร์เซ็นต์ จำนวน SE เฉลี่ย 1 เอ็มบริโอต่อหลอด จำนวนยอดเฉลี่ย 1.14 ยอดต่อหลอด ยอดมีการยืดยาวเมื่อวางเลี้ยงบน

Figure 4 Morphology of complete plantlets derived from different media after 8 weeks of culture (bar = 1 cm)

A. PGRs-free MS B. MS + 0.5 mg/l NAA
C. PGRs-free OPCM D. OPCM + 0.5 mg/l NAA

Figure 5 Accimatized plantlets under greenhouse condition after 8 weeks of transfer (bar=2 cm).

อาหารสูตร OPCM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนาน 6 สัปดาห์ สำหรับการชักนำราก พบว่าอาหารสูตร OPCM ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนราก 7.38 รากต่อต้น และความยาวราก 1.5 เซนติเมตร และเมื่อย้ายต้นกล้าลงปลูกในดินผสม พบว่าต้นกล้ามีอัตราการรอดสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายปลูกนาน 8 สัปดาห์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมันระยะที่ 2 ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

ชาคริยา นิหะ, สุรีรัตน์ เย็นช้อน และสมปอง เตชะโต. 2560. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 4: 25-30.

ชีรวัลย์ สิทธิศักดิ์, ทัศนี ขาวเนียม และสมปอง เตชะโต. 2560. ผลของการสับและสภาพวางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 4: 41-46.

ธนวดี พรหมจันทร์. 2551. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต้นปาล์มน้ำมันที่พัฒนาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2554. การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน. สำนักวิจัยและพัฒนา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

ยุพาภรณ์ ศิริโสม และสมปอง เตชะโต. 2557. การประเมินการสร้างรากของปาล์มน้ำมัน 2 สายต้นในหลอดทดลอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1: 6-9.

ศตปพร เกิดสุวรรณ และสมปอง เตชะโต. 2557. ผลของไดแคมบาต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นต้นของปาล์มน้ำมัน. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1: 2-9.

ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี. 2553. วิชาการปาล์มน้ำมัน. แหล่งข้อมูล: http://www.doa.go.th/palm/linkTechnical/nursery%20seedling.html. ค้นเมื่อ 3 สิงหาคม 2561.

สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2561. ปาล์มน้ำมัน “พันธุ์ทรัพย์ ม.อ.”. แหล่งข้อมูล: http://www.rdi.ku.ac.th ค้นเมื่อ 3 สิงหาคม 2561.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์, สมปอง เตชะโต และสรพงค์ เบญจศรี. 2557. ผลของผงถ่านและอาหารเหลวต่อการงอกและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองของปาล์มน้ำมัน. วารสารแก่นเกษตร 42: 456-461.

สมปอง เตชะโต. 2539. ตำราเรียนรายวิชา 510-401 บทปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต, อาสลัน หิเล และอิบรอเฮม ยีดำ. 2547. การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและพืชต้นใหม่จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี. วารสารสงขลานครินทร์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 26: 617-628.

อภิชญา นุกูลรัตน์, สุรีรัตน์ เย็นช้อน และสมปอง เตชะโต. 2560. ผลของกรดแอสคอร์บิค ออกซิน และน้ำตาลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 4: 1-7.

Agarwal, S., K. Kanwar and D. R. Sharma. 2004. Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba* L. Acta Hort. 102: 359–368.

Corley, R. H. V. and P. B. Tinker. 2003. The Oil Palm, 4th ed. Blackwell Publishing, Oxford.

Gomes, H. T., P. M. C. Bartos and J. E. Scherwinski-Pereira. 2015. Optimizing rooting and survival of oil palm (*Elaeis guineensis*) plantlets derived from somatic embryos. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 51: 111-117.

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 quineensis* Jacq.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 27: 629-635.

Jayanthi, M., B. Susanthi, N. M. Mohan and P. K. Mandal. 2015. *In vitro* somatic embryogenesisand plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palmsof *Elaeis guineensis* (Jacq.) SpringerPlus 4: 1-7.

Kurup, S. S., M. A. M. Aly, G. Lekshmi and N. H. Tawfik. 2014. Rapid *in vitro* regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Kheneizi using tender leaf explant. Emir. J. Food Agr. 26: 539-544.

Mallon, R., P. Covelo and A. M. Vieitez. 2012. Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. Tree 26: 731–741.

Promchan, T., S. Sanputawong and S. Te-chato. 2012. Effect of sizes of haustorium embryo on secondary somatic embryo formation and histological study in oil palm. J. Agric. Technol. 8: 671-679.

Sheil, D., A. Casson, E. Meijaard, M. V. Noordwijk, J. Gaskell, J. Sunderland-Groves, K. Wertz and M. Kanninen. 2009. The impacts and opportunities of oil palm in Southeast Asia. Occasional 51: 1-67.

Steinmacher, D. A., M. P. Guerra, K. Saare-Surminski and R. Lieberei, R. 2011. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. Ann. Bot. 108: 1463–1475.

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

Thawaro, S. and S. Te-chatoS. 2010. Effect of culture medium and genotype on germination of hybrid oil palm zygotic embryos. ScienceAsia 36: 26–32.

Wooi, K. C. 1995. Oil palm tissue culture–current practice and constraints. P. 56-57. In. V. Rao, I. E. Henson and N. Rajanaidu. Recent Developments in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology Palm Oil Research Institute of Malaysia, Bangi.