นิพนธ์ต้นฉบับ

การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและพืชต้นใหม่จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี

สมปอง เตชะโต[1] อาสลัน หิเล[2] และ อิบรอเฮม ยีดำ[3]

Abstract

Te-chato, S., Hilae, A. and Yeedum, I.
Induction of embryogenic callus and plantlet regeneration from young leaves of high yielding mature oil palm
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(5) : 617-628

Callus induction and plantlet regeneration from young leaves of high-yielding mature oil palm were carried out using 10-year and 20-year-old trees from Thepa Research Station, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, and Trang Agricultural College, respectively. Culture media used in this experiment were Murashige and Skoog (1962) and Oil Palm supplemented with various concentrations of α-naphthaleneacetic acid (NAA) or 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) or dicamba (Di) and anti-oxidants. Young leaves from 6th to 11st frond were excised, sterilized, cut into 5x5 mm pieces and cultured in the dark at 26±4ºC or 28±0.5ºC for 3 months. The results revealed that MS medium with 200 mg/l ascorbic acid (As) and 1 mg/l Di (MS-AsDi) gave the highest callus induction percentage (7.93) after culture for 3 months at 28±0.5ºC. Leaf segments from 6th - 8th frond yielded callus forming percentage at 10% (averaged from 1, 2.5 and 5 mg/l Di containing MS medium). Ascorbic acid as an antioxidant at concentration of 200 mg/l supplemented in MS medium in the presence of 2.5 mg/l Di produced the highest callus induction percentage (11.2) and number of nodules (7.06). A high percentage of embryogenic callus formation (66.67)

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

[1]Ph.D.(Plant Cell Technology), รองศาสตราจารย์ [2]นักศึกษาปริญญาเอก สาขาวิชาพืชศาสตร์ [3]M.Sc.(Agronomy), ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
Corresponding e-mail: tesompon@ratree.psu.ac.th
รับต้นฉบับ 30 มกราคม 2547 รับลงพิมพ์ 30 มีนาคม 2547

was obtained when the calli were transferred to the same medium component supplemented with 0.5 mg/l Di and 1,000 mg/l casein hydrolysate (CH) (MS-AsDiCH). Haustorial-staged embryos were observed to be isolated as an individual embryo and germinated on MS medium without plant growth regulator (MS-free). Development of root could be classified into two distinct types, fibrous and tap root.

Key words : oil palm, embryogenic callus, dicamba, young leaf, mature tree

บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต อาสลัน หิเล และ อิบรอเฮม ยีดำ

การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและพืชต้นใหม่จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2547 26(5) : 617-628

การชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีจากสถานีวิจัยเทพา จังหวัดสงขลา อายุ 10 ปี และวิทยาลัยเกษตรกรรมและเทคโนโลยีตรัง จังหวัดตรัง อายุ 20 ปี โดยนำใบอ่อนทางใบที่ 6-11 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และสูตรอาหาร Oil Palm เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ชนิด คือ α-naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ dicamba (Di) ในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 26±4 และ 28±0.5°C เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค 200 มก/ล dicamba เข้มข้น 1 มก/ล (MS-AsDi) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±0.5°C สร้างแคลลัสเริ่มแรกได้สูงสุด 7.93% หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 เดือน ทางใบที่ 6-8 สร้างแคลลัสสูงเฉลี่ย 10% บนอาหารสูตร MS เติม dicamba (เข้มข้น 1, 2.5 และ 5 มก/ล) การเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มก/ล ร่วมกับ dicamba เข้นข้น 2.5 มก/ล ในอาหารสูตร MS ให้ประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันสูงสุด 11.2% จำนวนปมเฉลี่ย 7.06 ปม/ชิ้นส่วน เมื่อย้ายแคลลัสเริ่มแรกไปเพาะเลี้ยงในอาหารเติม dicamba เข้มข้น 0.5 มก/ล เคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มก/ล (MS-AsDiCH) ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 66.67% โซมาติคเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (haustorial-staged embryo) หลุดแยกออกมาเป็นเอ็มบริโอเดี่ยว ๆ และงอกได้บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (MS-Free) ต้นกล้ามีการพัฒนาของราก 2 แบบ คือรากฝอย (fibrous root) และรากแก้ว (tap root)

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย และประเทศในคาบสมุทรมาลายูโดยเฉพาะประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย นอกจากนี้ยังมีประเทศอื่นๆ เช่น ไนจีเรีย โคลอมเบีย ไอโวรี่โคสท์ เป็นต้น ภาวะการผลิตปาล์มน้ำมันสำหรับประเทศไทยเรานั้นมาเป็นอันดับที่ 6 การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องใช้เวลามากกว่า 2 ปี ขึ้นไปจากชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ใบอ่อนจากต้นกล้า (Jones, 1973; Pannetier *et al*., 1981; Karun and Sajini,1996) ใบอ่อนจากต้นโต (Ahee *et al*., 1981; Khaw and Ng, 1998, 1999; Khoo *et al*., 1999) คัพภะ (Nwanko and Krikorian, 1983; Teixeira *et al*., 1995) และราก (Jones, 1983; Avril *et al*., 1986; Duval *et al*., 1995) Khow และ Ng (1999) รายงานว่าต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนในประเทศมาเลเซียให้ผลผลิตสูงกว่าต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเมล็ดอย่างน้อย 30% ประเทศไทยมีรายงานผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันจากแหล่งของชิ้นส่วนต่างๆ ได้แก่ คัพภะ (เจริญ และคณะ, 2532; Te-chato, 1998a; Kanchanapoom and Damyoas, 1999) ใบอ่อนจากต้นกล้าอายุ 195 วัน (Te-chato *et al*., 1988) สำหรับต้นใหม่ที่ได้โดยผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิสเมื่อย้ายลงดินปลูกให้ผลผลิตสูง (Te-chato, 1998 a, b) สูตรอาหารที่นิยมเพาะเลี้ยงโดยทั่วไปเป็นสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2.5 มก/ล (Te-chato, 1998b) ถึง 25 มก/ล (Karun and Sajini,1996)

Te-Chato และคณะ (2002) รายงานการย่นระยะ

เวลาการชักนำแคลลัส และพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ 1/3 ถึง 1/2 ของเวลาที่ใช้เดิม โดยใช้ dicamba ซึ่งเป็นออกซินชนิดใหม่ อย่างไรก็ตามใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีในประเทศไทยยังไม่มีรายงานจากหน่วยงานใดมาก่อน แม้มีการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตต้นพันธุ์ดีตั้งแต่ปี 2526 โดยไพบูลย์ และคณะ (ยังไม่ตีพิมพ์) ก็ตาม แต่คงเป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัสแต่ไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและพัฒนาให้พืชต้นใหม่ได้สำเร็จ

ในบทความนี้เป็นการอภิปรายผลของออกซินชนิดต่างๆ สารแอนติออกซิแดนท์ ตำแหน่งของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง ตลอดจนสภาพแวดล้อมในการชักนำแคลลัสเพื่อส่งเสริมผลสำเร็จในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตสูง เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. ต้นปาล์มน้ำมัน

เป็นการคัดเลือกต้นแม่จากประชากรต้นพันธุ์เทเนราที่ปลูกภายใต้สภาพการจัดการของสถานีวิจัยและฝึกภาคสนามของคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.เทพา จ.สงขลา และวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีตรัง จ.ตรัง เกณฑ์ของต้นที่คัดเลือกคือตรงตามพันธุ์ มีสัดส่วนของดอกตัวเมียสูง น้ำหนักทะลายสูง น้ำมันต่อทะลายสูง การเพิ่มของความสูงน้อย มีหนามสั้นง่ายต่อการเก็บเกี่ยว และไม่มีความผิดปกติในลักษณะต่างๆ เช่น มีเฉพาะดอกเพศผู้ หรือดอกกระเทยทั้งหมด ผลพัฒนาโดยไม่มีการผสม เป็นหมัน ไคเมอรา เป็นโรคยอดเน่า โคนเน่า ตัดยอดโดยวิธีการทำลายต้นแล้วนำมาตัดแยกใบอ่อนที่ยังไม่โผล่เป็นชิ้นยาว 5 ซม (ความกว้างตามขนาดของใบที่ปรากฏ) ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยใช้สารละลายคลอร๊อกซ์ 20% เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดให้มีความยาว 5x5 มม เลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารวุ้นดัดแปลงสูตร Murashige and Skoog (MS, 1962)

2. อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

2.1 อาหารชักนำแคลลัส

เลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนในอาหารวุ้นสูตร MS หรือ Oil Palm (Avril *et al*., 1986) เติมน้ำตาลซูโครส 3% กรดแอสคอร์บิค 200 มก/ล 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy-acetic acid) หรือ NAA (α-napthaleneacetic acid) หรือปิคลอแรม หรือ dicamba ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 1-50 มก/ล

2.2 อาหารเพิ่มปริมาณและชักนำโนดูลาแคลลัส

เป็นอาหารสูตร MS ที่ชักนำแคลลัสในข้อ 2.1 เติม 2,4-D หรือ dicamba 0.1 มก/ล (ลดความเข้มข้นลง 10 เท่าจากความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำแคลลัส) ดัดแปลงโดยการเติมสารที่สำคัญที่ส่งเสริมการเจริญของแคลลัสคือ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มก/ล นอกจากนี้อาจเติมเคซีนไฮโดรไลเสท ความเข้มข้น 1,000 มก/ล

3. สภาพแวดล้อมการเลี้ยง

ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำแคลลัสนั้นเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนในที่มืดที่อุณหภูมิแตกต่างกันในช่วง 3 ช่วงคือ

1. เลี้ยงในอินคูเบเตอร์ที่ควบคุมอุณหภูมิ 26±0.5ºC
2. เลี้ยงในอินคูเบเตอร์ที่ควบคุมอุณหภูมิ 28±0.5ºC
3. เลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิในช่วง 26±4ºC

ทำการย้ายเลี้ยงทุกเดือนจนกว่าจะมีการสร้างแคลลัส หลังจากที่มีการสร้างแคลลัสแล้วตัดแยกแคลลัส ย้ายไปเพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมงใน 1 วัน

วิธีการศึกษา

1. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงต่อการชักนำแคลลัส

นำใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ให้เห็น ทางใบที่ 6-8 ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีอายุ 10 ปี จากสถานีวิจัยเทพา คณะทรัพยากรธรรมชาติ มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร๊อกซ์เข้มข้น 20% วางบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวนความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย

น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง แล้วตัดใบอ่อนปาล์มน้ำมันให้มีขนาด 5x5 มม เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA หรือ dicamba หรือ 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มก/ล ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3% ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 ในสภาพมืดที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 28±0.5, 26±0.5 และ 26±4ºC บันทึกการสร้างแคลลัสและรากต่อจำนวนใบอ่อนทั้งหมดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

2. ผลของตำแหน่งทางใบ และสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงต่อการชักนำแคลลัส

นำใบอ่อนจากทางใบที่ 6-8 และ 9-11 (นับจากยอดที่ใบยังไม่คลี่) ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีอายุ 10 ปี จากสถานีวิจัยเทพา คณะทรัพยากรธรรมชาติ (ต้นที่ 2) มาฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการศึกษาที่ 1 แล้วตัดใบอ่อนปาล์มน้ำมันให้มีขนาดประมาณ 5x5 มม มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% และสูตร Oil Palm เติมน้ำตาลซูโครส 5% ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค 200 มก/ล และสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 1 ชนิดคือ picloram นำมาเลี้ยงในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 28±0.5ºC บันทึกการสร้างแคลลัสและรากหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

3. ผลของสารแอนติออกซิแดนท์และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัส

ศึกษาผลของการเติมสารแอนติออกแดนท์ 2 ชนิด คือ PVP และกรดแอสคอร์บิคต่อการสร้างแคลลัสของปาล์มน้ำมัน โดยนำใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ทางใบที่ 6-8 ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี อายุ 20 ปี จากวิทยาลัยเกษตรกรรมและเทคโนโลยีตรัง นำมาฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีข้างต้น จากนั้นตัดให้มีขนาดประมาณ 5x5 มม นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D หรือ dicamba เข้มข้น 1, 2.5 และ 5 มก/ล ร่วมกับการเติม PVP เข้มข้น 500 มก/ล หรือกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3% เพาะเลี้ยงในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 28±0.5ºC บันทึกจำนวนการสร้างแคลลัสและรากหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน

4. ผลของความเข้มข้นของ dicamba ต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

แคลลัสเริ่มแรกที่ได้จากการเลี้ยงใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1, 2.5 และ 5 มก/ล กรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3% นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1, 0.5 และ 1 มก/ล ร่วมกับการเติมหรือไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มก/ล แต่ละความเข้มข้นเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มก/ล เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±4ºC ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 1300 ลักซ์ ตรวจสอบการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในแต่ละความเข้มข้นของ dicamba หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน จากนั้นย้ายกลุ่มของโซมาติคเอ็มบริโอไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อส่งเสริมการงอกต่อไป

ผลการทดลอง

1. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงต่อการชักนำแคลลัส

แคลลัสเริ่มแรกเริ่มสร้างหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 เดือน โดยแคลลัสมีลักษณะเป็นปมสีเหลืองอ่อนเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดและผิวของชิ้นส่วน (Figure 1) โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มก/ล ที่อุณหภูมิ 28±0.5ºC ให้การสร้างแคลลัสสูงที่สุด 15% รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 26±0.5ºC และ 26±4ºC ให้การสร้างแคลลัส 7.93 และ 5.55% ตามลำดับ ในขณะที่การเติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก/ล ชักนำแคลลัสเฉพาะที่อุณหภูมิ 26±0.5ºC เท่านั้น อัตราการสร้างแคลลัส 2.78% ซึ่งน้อยกว่าการเติม dicamba (สร้างแคลลัส 7.93%) NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสต่ำสุดเพียง 1.67% เมื่อใช้ความเข้มข้น 10 มก/ล ที่อุณหภูมิ 26±4ºC เท่านั้น นอกจากนี้ พบว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดดังกล่าว (NAA) ส่งผลให้ชิ้นส่วนสร้างรากทั้งสองระดับอุณหภูมิโดยเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±0.5ºC ชิ้นส่วนสามารถสร้างรากได้เกือบทุกความเข้มข้นยกเว้นการเติม

Figure 1. Primary callus formation from young leaf cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l dicamba for 3 months in the dark (8X).

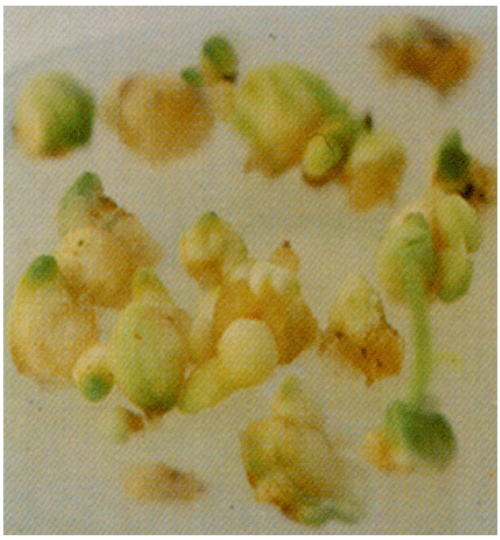
NAA เข้มข้น 1 มก/ล และที่อุณหภูมิ 26±4ºC มีการสร้างรากเมื่อเติม NAA เข้มข้น 5-40 มก/ล (Table 1) หลังจากย้ายรากดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicama หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 1, 2.5, 5 และ 10 มก/ล พบว่าไม่สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนดังกล่าวได้

2. ผลของตำแหน่งทางใบ และสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงต่อการชักนำแคลลัส

การเพาะเลี้ยงใบอ่อนทางใบที่ 6-8 บนอาหารสูตร MS สามารถชักนำแคลลัสได้เมื่อเติม dicamba เข้มข้น 1, 2.5 และ 5 มก/ล โดยสามารถชักนำแคลลัสได้ 6.25, 12.5, และ 11.25% ตามลำดับ ส่วน 2,4-D เข้มข้น 1 และ 2.5 มก/ล ชักนำแคลลัสได้ 16.25 และ 2.5% ตามลำดับ และ NAA เข้มข้น 50 มก/ล ชักนำแคลลัสได้ 2.5% ใบอ่อนของปาล์มน้ำมันจากทางใบที่ 9-11 ไม่สามารถชักนำแคลลัสได้เลยในทุกชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ทดสอบ พบแต่เพียงการสร้างราก 10.00% บนอาหารสูตรเดิมเติม NAA เข้มข้น 30 มก/ล เท่านั้น แคลลัสดังกล่าวมีลักษณะเป็นปมเมื่อนับจำนวนปมที่สร้าง/ชิ้นส่วน พบว่า การเพาะเลี้ยงใบอ่อนบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1, 2.5 และ 5 มก/ล มีการสร้างปม 9.25, 10.75 และ 5.00 ปม/ชิ้นส่วน ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงใบอ่อนในอาหารข้างต้นเติม 2,4-D เข้มข้น 1 และ 2.5 มก/ล สามารถสร้างปมได้ 5.66 และ 7.50 ปม/ชิ้นส่วน ตามลำดับ และการเลี้ยงใบอ่อนบนอาหารเติม NAA เข้มข้น 10 มก/ล มีการสร้างปม 7.00 ปม/ชิ้นส่วน (ไม่แสดงข้อมูล) ส่วนการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันในอาหารสูตร Oil Palm โดยใช้ทางใบลำดับต่างๆ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับข้างต้นไม่สามารถชักนำแคลลัสได้เลย คงมีเพียงการสร้างรากเมื่อเลี้ยงใบอ่อนทางใบที่ 6-8 บนอาหารสูตรดังกล่าวเติม NAA เข้มข้น 5 และ 50 มก/ล ซึ่งอัตราการสร้างรากเท่ากัน 2.5%

3. ผลของสารแอนติออกซิแดนท์และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากใบอ่อน

การใช้กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มก/ล เป็นสารแอนติออกซิแดนท์เติมลงในอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้นข้น 2.5 มก/ล ส่งผลให้ชิ้นส่วนสร้างแคลลัสสูงสุด 11.20% จำนวนปมเฉลี่ย 7.06 ปม/ชิ้นส่วน PVP เข้มข้น 500 มก/ล ในอาหารสูตรข้างต้นเติม 2,4-D เข้มข้นเท่ากัน ชิ้นส่วนสร้างแคลลัสเพียง 0.8% จำนวนปมเฉลี่ย 1.00 ปม/ชิ้นส่วน นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมสารแอนติออกซิ-แดนท์ที่แตกต่างกันส่งผลให้ชิ้นส่วนตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน โดยการเติมกรดแอสคอร์บิคลงในอาหารส่งเสริมให้ชิ้นส่วนสร้างแคลลัสได้เมื่อเติม dicamba หรือ 2,4-D ในขณะที่การเติม PVP



A

B

C

Figure 2. Development of somatic embryos and root formation from excised single shoot.
A: Haustorial embryos
B: Fibrous root system
C: Tap root or leading root system

Table 1. Effect of plant growth regulators and culture temperature on primary callus induction after culture on MS medium supplemented with 3% sucrose and 200 mg/l ascorbic acid for 3 months (subculture monthly intervals).

Plant growth regulators	Concentrations (mg/l)	Callus forming explant (%)			Root forming explant (%)		
		26±0.5ºC	26±4ºC	28±0.5ºC	26±0.5ºC	26±4ºC	28±0.5ºC
NAA	1	0	0	0		0	0
	2.5	0	0	0	3.40	0	0
	5	0	0	0	5.62	3.70	5.55
	10	0	1.67	0	6.79	5.00	0
	20	0	0	0	2.14	1.85	0
	30	0	0	0	6.67	1.67	0
	40	0	0	0	15.00	5.55	0
	50	0	0	0	5.83	0	0
2,4-D	1	2.78	0	0	0	0	0
	2.5	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0
Dicamba	1	7.93	5.55	15.0	0	0	0
	2.5	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0

ลงในอาหารและชุดควบคุม ชิ้นส่วนสามารถสร้างแคลลัสได้เมื่อเติม 2,4-D เท่านั้น (Table 2)

4. ผลของความเข้มข้นของ dicamba ต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

dicamba เข้มข้น 0.5 มก/ล เติมเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มก/ล ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 66.67% รองลงมาคือการเพาะเลี้ยงแคลลัสเริ่มต้นบนอาหารเติม dicamba เข้มข้น 1.0 มก/ล เคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มก/ล ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสแคลลัส 56.41% การเติมเคซีนไฮโดรไลเสทลงในอาหารส่งผลให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพิ่มขึ้น (Table 3)

โซมาติคเอ็มบริโอระยะสุดท้ายที่พร้อมงอก หรือระยะสร้างจาว (ใบเลี้ยง) (haustorial staged embryo) ที่พัฒนาในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสแยกออกมาเป็นอิสระจากแคลลัส มีสีเขียว (Figure 2 A) เมื่อย้ายกลุ่มโซมาติคเอ็มบริโอดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตช่วยส่งเสริมการงอกได้แต่รากมีการพัฒนาน้อยมาก อย่างไรก็ตามรากที่ได้มี 2 แบบคือ รากฝอยจำนวน 4-5 ราก ขนาดเท่ากัน มีกำเนิดมาจากลำต้น (Figure 2B) รากอีกแบบเป็นรากแก้ว คือมีรากแรกพัฒนาออกมาก่อน จากนั้นมีรากที่ 2 , 3 และ 4 ตามมา (Figure 2C)

Table 2. Effect of antioxidants and plant growth regulators on callus formation from young leaf culture after 4 months of culture on MS medium (subculture monthly intervals).

Antioxidant	Plant growth regulators	Concentration (mg/l)	No. of Culture	%Callus formation	No. of nodule per callus
No (Control)	dicamba	1	125	0	0
		2.5	125	0	0
		5	125	0	0
	2,4-D	1	125	3.2	4.75
		2.5	125	0	0
		5	125	2.4	5.33
Ascorbic acid	dicamba	1	125	0	0
		2.5	125	11.2	7.06
		5	125	0	0
	2,4-D	1	125	2.4	2.67
		2.5	125	0	0
		5	125	0	0
PVP	dicamba	1	125	0	0
		2.5	125	0	0
		5	125	0	0
	2,4-D	1	125	0	0
		2.5	125	0.8	1.00
		5	125	0	0

Table 3. Effect of dicamba and casein hydrolysate on embryogenic callus formation after culture primary callus on MS medium for 3 months.

Conc. of dicamba (mg/l)	No. of callus culture (piece)	Embryogenic callus formation (%)
0.1	41	39.02
0.5	33	51.51
1.0	21	28.57
0.1+CH	36	22.22
0.5+CH	27	66.67
1.0+CH	39	56.41

CH: Casein hydrolysate 1,000 mg/l

วิจารณ์

สมปอง (ยังไม่ตีพิมพ์) รายงานผลการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตว่าสามารถชักนำแคลลัสเริ่มแรกได้ในสูตรอาหารเติม 2,4-D แต่แคลลัสไม่สามารถที่จะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ เนื่องจากต้นที่ศึกษาไม่สมบูรณ์ ในการศึกษานี้ใช้ต้นปกติที่ให้ผลผลิตสูง และมีการบันทึกประวัติพันธุ์ พบว่า 2,4-D ก็สามารถชักนำแคลลัสได้ แต่ dicamba เป็นออกซินตัวใหม่ที่มีศักยภาพสูงกว่า ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้สูงถึง 15% (Table 1) ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในการชักนำแคลลัสปาล์มน้ำมันนั้น ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยง ชนิดและ

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เป็นต้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีคือ 28±0.5ºC ระดับอุณหภูมิดังกล่าวส่งผลให้ชิ้นส่วนมีการสร้างแคลลัสได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 26±4ºC (มีการปรวนแปรของอุณหภูมิในช่วงที่กว้าง) Avril และคณะ (1986) รายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันอยู่ระหว่าง 25-27 (26±1)ºC อย่างไรก็ตาม อาสลัน และสมปอง (2545) ได้ศึกษาเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 ปี พบว่าอุณหภูมิ 28+0.5ºC มีความเหมาะที่สุดในการสร้างแคลลัสในขณะที่ Kanchanapoom และ Domyoas (1999) เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันที่อุณหภูมิ 27ºC ความเข้มข้นของ dicamba ที่เหมาะสมซึ่งส่งผลต่อความสำเร็จในการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันอยู่ระหว่าง 1-5 มก/ล ความเข้มข้นสูงกว่า 5 มก/ล ไม่สามารถชักนำแคลลัสได้เลย อย่างไรก็ตาม Karun และ Sajini (1996) ใช้ 2,4-D เข้มข้นสูงถึง 25 มก/ล เพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตรข้างต้นพบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวสามารถสร้างแคลลัสได้ 10% ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ แม้ว่าจะมีรายงานความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดของ pejibaye palm โดยใช้ปิคลอแรม (Roberto *et al*., 1987) ก็ตาม แต่ในการทดลองครั้งนี้พบว่าปิคลอแรมทำให้ชิ้นส่วนใบอ่อนพองตัวหลังเพาะเลี้ยงและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเช่นเดียวกันกับเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ แต่ไม่สามารถสร้างแคลลัสหรือรากเลย การตอบสนองต่อความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันดังกล่าวข้างต้นอาจเนื่องมาจากผลของสภาพแวดล้อมที่เพาะปลูกและแหล่งของพันธุกรรม ตลอดจนระยะพัฒนาการทางสรีรวิทยาของต้นปาล์มน้ำมันที่ใช้เพาะเลี้ยงแตกต่างกัน การใช้ NAA เพื่อชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนดังกล่าวพบว่ามีประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสต่ำมาก การเพาะเลี้ยงใบอ่อนบนอาหารเติม NAA ส่งเสริมการสร้างคลอโรฟิลล์ในชิ้นส่วนใบทำให้ใบมีสีเขียวอ่อนและส่งเสริมการสร้างรากบริเวณรอยตัด

ตำแหน่งของทางใบอ่อนที่เหมาะสมเป็นปัจจัยที่สำคัญในการชักนำแคลลัสทางใบที่อ่อนเกินไป (1-5) ส่งผลให้ชิ้นส่วนเกิดความเสียหายจากการฟอกฆ่าเชื้อ เมื่อนำชิ้นส่วนดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงมีการพองตัวสูงมากแต่ยังคงมีสีขาวถึงสีเหลืองครีมโดยไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่สามารถสร้างแคลลัสได้ ในขณะที่การใช้ทางใบที่แก่เกินไป (ทางที่ 9 ขึ้นไป) ตอบสนองต่ออาหาร (พองตัว) หลังจากเพาะเลี้ยงน้อยมาก อีกทั้งยังสร้างสารประกอบฟีนอลสูงทำให้ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลและตายเพิ่มขึ้นและไม่สามารถสร้างแคลลัสได้เช่นเดียวกัน ชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันคือชิ้นส่วนจากทางใบที่ 6-8 ส่งผลต่อความสำเร็จในการชักนำแคลลัสสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างแคลลัสในอาหารสูตร MS และ Oil Palm พบว่าอาหารสูตร MS ชักนำแคลลัสได้ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Oil Palm ไม่สามารถสร้างแคลลัสได้เลย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสซึ่งในการศึกษานี้ใช้เพียง 3% ส่วนการทดลองของ Avril และคณะ (1986) ใช้สูงถึง 5% การเติมน้ำตาลความเข้มข้นสูงในการศึกษานี้ทำให้ชิ้นส่วนผลิตสารประกอบฟีนอลเพิ่มขึ้นซึ่งยับยั้งการสร้างแคลลัสของชิ้นส่วนได้ (ไม่แสดงข้อมูล) นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารสูตร Oil Palm มีการเติมธาตุอาหารรองบางตัวโดยเฉพาะ Co, Cu และ Na_2EDTA ที่สูงกว่าอาหารสูตร MS การเติมธาตุอาหารดังกล่าวที่สูงเกินความจำเป็นอาจส่งผลให้ยับยั้งการสร้างแคลลัสได้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานการใช้สูตรอาหาร MS อย่างแพร่หลายในพืชตระกูลปาล์ม เช่น อินทผาลัม (Veramendi and Navarro, 1996; Hervan *et al*., 1991; Wongkaew *et al*., 1991) pejibaye palm (Roberto *et al*., 1987) Christmas palm (Srinivasan *et al*., 1985) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างแคลลัสระหว่างทางใบในการศึกษานี้พบว่า 2,4-D 1 มก/ล ให้การสร้างแคลลัสสูงกว่า dicamba ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสายต้น (clone) ที่ใช้ต่างกันโดยเฉพาะอายุ ดังนั้นระยะพัฒนาการทางสรีรวิทยาแตกต่างกันส่งผลให้ตอบสนองต่อออกซินที่ต่างกัน แต่โดยรวม (ทุกความเข้มข้นที่สร้าง) dicamba ยังคงให้การสร้างแคลลัสสูงกว่า แม้ว่า 2,4-D ชักนำแคลลัสได้สูงกว่าแต่แคลลัสที่ได้ไม่มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้

ชนิดของสารแอนติออกซิแดนท์ที่ต่างกันส่งผลต่อ

ความสำเร็จในการชักนำแคลลัสที่ต่างกัน โดยพบว่าการเติมกรดแอสคอร์บิคลงในอาหารส่งเสริมให้ชิ้นส่วนสามารถสร้างแคลลัสได้ในอาหารเติม dicamba หรือ 2,4-D ทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงอินทผาลัม (Jameel and Abdul-laziz, 2001) ปาล์มน้ำมัน (อาสลัน และสมปอง, 2545) ส่วนการเติม PVP ในการทดลองครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการชักนำแคลลัสน้อยกว่าการเติมกรดแอสคอร์บิคโดยสามารถชักนำแคลลัสได้เพียง 0.8% เท่านั้น และยังน้อยกว่าชุดควบคุม แม้ว่ามีรายงานว่า PVP ให้ผลสำเร็จสูงต่อการป้องกันการเกิดสีน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงมังคุด (สมปอง, 2541; ลัดดาวัลย์, 2544) แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้ผลดี นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ผงถ่านเพื่อลดปัญหาดังกล่าวในการเพาะเลี้ยง Bottle palm (Sarasan *et al*., 2002) อินทผาลัม (Veramendi and Navarro, 1996b) แต่ไม่มีรายงานการใช้ในการศึกษานี้เพราะที่ผ่านมาผงถ่านยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติคเอ็มบริโอในแคลลัสด้วย (สมปอง, ยังไม่ตีพิมพ์)

อาสลัน และสมปอง (2545) ปรับปรุงกระบวนการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมันโดยใช้ dicamba เข้มข้น 1-4 มก/ล ในการชักนำแคคลลัส หลังจากนั้นย้ายแคลลัสลงไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ลดความเข้มข้นของ dicamba ลงเหลือ 0.1-0.5 มก/ล สามารถร่นระยะเวลาในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากวิธีข้างต้นลงประมาณ 6-9 เดือน สำหรับการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในปาล์มต้นโตที่ให้ผลลิตดีในการศึกษานี้ สามารถทำได้โดยย้ายแคลลัสเริ่มแรกไปเลี้ยงบนอาหารเติม dicamba เข้มข้น 0.1-1 มก/ล เติมหรือไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มก/ล แต่การเติมเคซีนไฮโดรไลเสทส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีกว่า เนื่องมาจากเคซีนไฮโดร-ไลเสทเป็นกรดอะมิโนเชิงซ้อนที่เติมลงไปในอาหารเพื่อส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (นิจวรรณ, 2545) การใช้สารดังกล่าวความเข้มข้น 500-1,000 มก/ล ช่วยส่งเสริมการพัฒนายอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงใบสะเดาช้าง (สมปอง และอรอุมา, 2542)

โซมาติคเอ็มบริโอในระยะสร้างจาว ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นกล้า และต้นโตที่ให้ผลผลิตแล้วมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน ในต้นโตเมื่อเข้าสู่ระยะนี้ ต้นอ่อนจะหลุดแยกออกมาเป็นอิสระ มีสีเขียวและมีขั้วยอดและรากที่ชัดเจน สะดวกต่อการนำไปชักนำการงอก ในขณะที่ต้นอ่อนระยะดังกล่าวที่ชักนำจากใบอ่อนในระยะต้นกล้าเกาะติดกับกลุ่มเอ็มบริโอเดิมอย่างแน่น แยกออกมาได้ลำบาก อย่างไรก็ตาม การงอกของโซมาติคเอ็มบริโอขณะนี้ยังคงต่ำ และกำลังดัดแปลงสภาพแวดล้อมการเพาะเลี้ยง เช่น การลดความชื้นบางส่วน การใช้สารเคมีที่ก่อให้เกิดสภาวะเครียดน้ำ เช่น แมนนิทอล โพลี-เอทธิลีนไกลคอล ตลอดจนการใช้สารเคมีที่ลดกิจกรรมการสร้างเอทธิลีน เช่น ซิลเวอร์ไนเตรท เป็นต้น มาเพิ่มประสิทธิภาพการงอก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่องการผลิตกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีด้วยการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นโตที่ให้ผลผลิตสูงฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทางคณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

เจริญ สิงห์ลอ, สมปอง เตชะโต, อารี กังแฮ และสาลี ดนัยสร. 2532. การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมันเพื่อทวีจำนวนต้นพันธุ์และย่นระยะเวลาการงอก. รายงานการสัมมนาทางวิชาการปาล์มน้ำมัน ณ มหา-วิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ 16-17 พฤษภาคม 2532 หน้า 73-85.

นิจวรรณ สนิทงาม. 2545. การชักนำพืชต้นใหม่ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสะเดาช้าง (*Azadirachta exceisa* (Jack) Jacob). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์.

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ. 2544. การชักนำแคลลัส การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบพืชในตระกูล *Garcinia* บางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2541. การชักนำการกลายพันธุ์ในมังคุด: การตรวจสอบความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อความสามารถในการสร้างแคลลัส. ว. แก่นเกษตร 26: 184-194.

สมปอง เตชะโต และ อรอุมา รุ่งน้อย. 2542. การชักนำยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยตรงจากการเพาะเลี้ยงใบต้นกล้าสะเดาเทียม (*Azadirachta exceisa* L.). ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย์) 33: 486-496.

อาสลัน หิเล และ สมปอง เตชะโต. 2545. การปรับปรุงวิธีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาของประเทศไทย ครั้งที่ 3 วันที่ 18-19 กรกฎาคม 2545 ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา.

Ahee, J., Arthuis, P., Cas, G., Duval, Y., Guenin, G., Hanower, J., Lievoux, D., Lioret, C., Malaurie, B., Pannetier, C., Raillot, D., Varechon, C. and Zuckerman, L. 1981. La multiplication vegetative in vitro du palmier a huile par embryogenese somatique. Oleagineux 36: 113-125.

Avril, L.B., Richard, L.B. and Jennet, B. 1986. Regeneration in palms. **In** Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants (ed. I.K. Vasil) Vol.3, pp. 207-222, London: Academic Press.

Duval, Y., Engelmann, F. and Duran-Gasselin, T. 1995. Somatic embryogene sis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **In** Biotechnology in Agriculture and Forestry (ed. Y.P.S. Bajaj) Vol.30, pp. 335-353. Berlin: Springer-Verlag.

Hervan, E.M., Shakib, A.M., Modiri, M., Afshari, M., Khoshkam, S. and Nazeri, S. 1991. Study of callus induction from *in vtro* culture of different parts of date palm. Seed and Plant 7: 1-2.

Jameel, M.A. and Abdullaziz, M.A. 2001. Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactyliferra* L.). Scientia Horticulturae 89: 291-298.

Jones, L.H. 1973. Plant cell culture and biochemistry studies for improved vegetable oil production. Proc. FEBS, Spec. Meet. pp. 813-833.

Jones, L.H. 1983. The oil palm and its clonal propagation by tissue culture. Biologist 30: 181-184.

Kanchanapoom, K. and Damyoas, P. 1999. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. ScienceAsia 25: 195-202.

Karun, A. and Sajini, K.K. 1996. Plantlet regeneration from leaf explants of oil palm seedlings. Current-Science 71: 922-926.

Khaw, C.H. and Ng, S.K. 1998. Performance of commercial scale clonal oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) planting in Malaysia. Proc. Int. Symp. on Biotech. Trop. and Subtrop. Species. Brisbane, Australia, pp 251-258.

Khaw, C.H. and Ng, S.K. 1999. Agrocom's proven tissue culture technology for oil palm. Paper presented at the special meeting on "Potential of the Oil Palm Industry and Clonal Tissue-Cultured Oil Palm Development in South Thailand. 6th November 1999 at Hotel Meritime, Krabi, Thailand.

Khoo, E.M., Simon, S. and Philip, L.C. 1999. An update of yield performances of clonal oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) planting in PPB oil palms Bhd-Sabah. Paper presented at the special meeting on "Potential of the Oil Palm Industry and Clonal Tissue-Cultured Oil Palm Development in South Thailand. 6th November 1999 at Hotel Meritime, Krabi, Thailand.

Nwanko, B.A. and Krikorian, A.D. 1983. Morphogenetic potential of embryo and seedling derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. Var pisifera Becc. Ann Bot 51: 65-76.

Pannetier, C., Arthuis, P. and Lievoux, D. 1981. Neoformation of young *E. guineensis* plantlets from primary calluses obtained on leaf fragments cultured *in vitro*. Oleagineux 26:119-122.

Roberto, V., Oscar, A. and Trevor, A.T. 1987. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10: 149-156

Sarasan, V., Ramsay, M.M. and Roberts, A.V. 2002. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in Botle palm (*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E. Moore) a critically endangered Mauritian palm. Plant Cell Rep 20: 1107-1111

Srinivasan, C., Litz, R.E., Barker, J. and Nostog, K. 1985. Somatic embryogenesis and plantlet formation from Christmas palm. HortScience 20: 278-280.

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

Te-chato, S. 1998b. Fertile plant from young leaves-derived somatic embryos of oil palm. Songklanakarin J. Sci. Technol. 20: 7-13.

Te-chato, S., Hilae, A. and Yeedum, A. 2002. Improve callus induction and embryogenic callus formation from cultured young leaves of oil palm seedling. Thai J. Agric. Sci. 35: 407-413.

Te-chato, S., Nualsri, C. and Kanchanapoom, K. 1988. Somatic embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) subsequent to plantlet regeneration. Microbial Utilization of Renewable Resources 6: 99-104.

Teixeira, J.B., Sondahl, M.R., Nakamura, T. and Kirby, E.G. 1995. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 105-111.

Veramendi, J. and Navarro, L. 1996. Influence of explant sources of adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) on embryogenic callus formation. Journal of Horticultural Science 72: 665-671.

Wongkaew, P., Pienngarn, B. and Polthampitak, T. 1991. Tissue culture of date palm. Khon Kaen Agric. 19: 191-200.