การเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี

Enhanced Germination Efficiency of Somatic Embryos from Young Leaf Culture of Oil Palm Ortet

อาสลัน หิเล

Aslan Hilae

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Plant Science
Prince of Songkla University
2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี

ผู้เขียน นายอาสลัน หิเล

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของปัจจัยต่อการเพิ่มปริมาณ และ ประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีดังนี้คือ ภาชนะเพาะเลี้ยง แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของธาตุอาหาร การลดความความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอ สารควบคุมการเจริญเติบโต (BA และ GA_3) การใช้ผงถ่านร่วมกับการเติมอาหารเหลว นอกจากนี้ศึกษาการชักนำราก การอนุบาลต้นกล้า ตลอดจนการตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ จากการศึกษา พบว่า ภาชนะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอคือหลอดทดลอง โดยให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอทั้งหมด โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวสูงสุด 21.37 และ 5.37 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้การพัฒนาของ SSE สูงสุด 77.92 เปอร์เซ็นต์ และ SSE ดังกล่าวสามารถพัฒนาให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์สูงสุด 35.72 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต การลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอบางส่วน 12.47 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พบว่า ให้การสร้าง SSE 23.21 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว 8.30 เปอร์เซ็นต์ และการงอกของ SSE 35.45 เปอร์เซ็นต์ การใช้ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับการเติม GA_3 เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้าง SSE 28.56 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว 10.1 เปอร์เซ็นต์ การงอกของ SSE 29.76 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าการใช้ซอร์บิทอลเพียงลำพัง BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบที่มีประสิทธิภาพต่ำในการชักนำการงอกของ SSE การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารเติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม ให้การสร้าง SSE 14.89 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว 13.02 เปอร์เซ็นต์ และการงอกของ SSE 10.47 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าการใช้ซอร์บิทอลเพียงอย่างเดียว ในอาหารเติม BA พบลักษณะต้นที่ผิดปกติโดยยอดมีลักษณะใบม้วนเป็นหลอด เมื่อใบคลี่มีลักษณะเป็นพุ่มไม้กวาด

27.88 เปอร์เซ็นต์ การใช้ผงถ่านร่วมกับการเติมอาหารเหลวให้ประสิทธิภาพต่ำในการชักนำการงอกของ SSE โดยการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับผงถ่าน เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกันเติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีการสร้าง SSE 17.98 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว 10.04 เปอร์เซ็นต์ และการงอกของ SSE เพียง 8.75 เปอร์เซ็นต์

อาหารสูตร MS เติมซูโครสเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ชักนำรากได้ 31.25 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน การอนุบาลต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยการครอบต้นกล้าด้วยขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ ให้การรอดชีวิตของต้นกล้าสูงสุด 93.27 เปอร์เซ็นต์ ในการตรวจสอบความแปรปรวนของใบอ่อนของต้นล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ พบว่าอัตราส่วนของชิ้นส่วนพืชต่อบัฟเฟอร์สกัดที่เหมาะสมสำหรับสกัดเอนไซม์จากใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคือ 1:5 ระบบเอนไซม์เอสเทอเรส เป็นระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมเหมาะสมที่สุดในการทดสอบความสม่ำเสมอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยสามารถย้อมติดสีเอนไซม์ชัดเจนและแถบเอนไซม์สูงสุด 5 แถบ รูปแบบของไอโซไซม์ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกัน จึงสามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าทั้งในและนอกหลอดทดลอง ดังนั้น การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นโตที่ให้ผลผลิตดี สามารถผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีความสม่ำเสมอสูง

Thesis Title	Enhanced Germination Efficiency of Somatic Embryos from Young Leaf Culture of Oil Palm Ortet
Author	Mr. Aslan Hilae
Major Program	Plant Science
Academic Year	2008

ABSTRACT

Enhanced germination efficiency of somatic embryos from young leaf culture of oil palm ortet var. *tenera* was studied on the effect of various factors, such as types of culture vessel, carbon sources and composition of MS medium, partially desiccation of somatic embryos, plant growth regulators (BA and GA_3) and activated charcoal with liquid medium. In addition, root induction and acclimatization were of *in vitro* shoot without root also studied root. The variation of shoots or complete plantlets derived from this study were detected by isozyme technique. The results revealed that test tube was the best culture vessel for somatic embryos proliferation. A number of somatic embryos and haustorium stage embryos obtained from the cultures were 27.37 and 5.37 embryos/ culture, respectively. The concentration of carbon source and composition of medium had markedly influence on SSE development. Development of SSE of 77.92% on MS medium supplemented with 0.2 M sorbitol, subsequent to complete germination (shoot with root) at 35.72% on MS medium without plant growth regulator. Partial desiccation of somatic embryo at approximately 12.47% before culturing on MS medium supplemented with 0.2 M sorbitol gave SSE development of 23.21 embryos/culture and haustorium stage embryo of 8.30 %. Combination of GA_3 at concentration 0.01 mg/l in the culture medium supplemented with 0.2 M sorbitol promoted SSE development of 23.21 embryos/culture and haustorium stage embryo of 8.30 %. Germination of SSE of 35.45% was obtained in hormone-free MS medium. BA resulted in a low efficiency for germination of SSE. SSE derived from culturing on MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA gave the low germination of 10.47% and

promoted shoot abnormality of 27.88 %. Most of abnormalities were classified as roll leaves with muti-axillary buds. SSE were cultured on MS solid medium supplemented with 0.25% activated charcoal and overlay with MS liquid medium supplemented with 0.06 mg/l NAA and 0.03 mg/l BA gave the lowest germination efficiency of 8.75%.

Root induction at frequency of 31.25% was observed in MS medium supplemented with 0.2 M sucrose after 2 months of culture. Plantlets were hardened by covering with 8 ounce bottle glass gave the survival rate at 93.27%. Detection of plantlets obtained through this procedure by isozyme technique revealed that esterase system gave the best result. Proportion of leaf tissues and extraction buffer at ratio of 1:5 was proved to give the best resolution of enzyme patterns. Esterase system gave 5 clearly uniform bands of the regenerants. Both *in vitro* and hardened-plantlets *ex vitro* of oil palm gave unique enzyme patterns without variation. So, propagation of oil palm ortet through culturing of young leaf gave uniformity of plantlets.

กิตติกรรมประกาศ

“มนุษย์ต้องเรียนรู้ศึกษาตั้งแต่หลังเกิดจนถึงหลุมฝังศพ” คำกล่าวนี้มีความสำคัญต่อข้าพเจ้าให้ตระหนักถึงความสำคัญของการศึกษาว่าเป็นเรื่องสำหรับคนทุกๆ วัย และจะนำความรู้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อเพื่อนมนุษย์

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ นายอับดุลเลาะ และนางแวกือซง หิเล ที่คอยสนับสนุนทั้งทุนการศึกษาและกำลังใจ จนข้าพเจ้าเกิดความมุ่งมั่นที่เรียนต่อจนถึงระดับปริญญาเอก ตลอดจนพี่ๆ น้อง ของตระกูลหิเลของข้าพเจ้า ได้แก่นายวันมูฮำมัดอัดนัน นายอัซมัน นายอัสมี นายอารีเพ็ญ นางมะดีหะ และ ด.ช. เอกชัยผู้ล่วงลับ ที่เป็นกำลังใจ และคอยดูแลเรื่องการศึกษาเป็นอย่างดี ตลอดจนสนับสนุนกิจกรรมทางการศึกษาทุกประเภท

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาการวิจัยตั้งแต่ระดับปริญญาตรีและคอยอบรมสั่งสอนตลอดจนประสิทธิ์ประสาทวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมสำหรับการประสิทธิ์ประสาทวิชาด้านชีวโมเลกุล และคอยให้คำแนะนำดีๆ ทั้งเรื่องส่วนตัวและการเรียน ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์สำหรับการประสิทธิ์ประสาทวิชาด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช และรองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์สำหรับคำแนะนำต่างๆ ในการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนการศึกษาวิจัยและทุนการศึกษาประเภทผู้มีผลการเรียนดีเด่นระดับบัณฑิตศึกษาเป็นระเวลา 6 ภาคการศึกษา

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้บริหารของมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ทุกท่าน ได้แก่นายจงรัก พลาศัย อธิการบดี ดร.สุพัฒน์ ศรีสวัสดิ์ นายมงคล กิมแหลม และนายทวี บุญภิรมณ์ ที่ให้คำปรึกษาและสนับสนุนให้ข้าพเจ้าได้เขียนวิทยานิพนธ์เล่มนี้แล้วเสร็จ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ชาวพืชศาสตร์ และชาวมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนรินทร์ทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือต่างๆ ในทุกๆ เรื่อง

สุดท้ายขอบคุณความมุ่งมั่นของตัวเอง ที่สามารถยืนหยัดและทนต่อแรงกดดันต่างๆ จนสานฝันด้านการศึกษาสำเร็จ

อาสลัน หิเล

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(11)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	11
2. วิธีการวิจัย	
วัสดุและอุปกรณ์	12
วิธีดำเนินการ	14
3. ผล	18
4. บทวิจารณ์	44
5. บทสรุป	58
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก	66
ประวัติผู้เขียน	73

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของชนิดของภาชนะเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	18
2	ผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลและองค์ประกอบของธาตุอาหารต่อการงอก การสร้างยอด และรากของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน	23
3	การงอกของ SSE ที่ชักนำได้จากชนิดและความเข้มข้นของแหล่งของคาร์บอนและองค์ประกอบของอาหารต่างๆ บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	25
4	ขนาดของต้นที่ได้ หลังจากชักนำการงอก 4 เดือน ในอาหารชักนำการงอก และ 2 เดือนหลังย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต	26
5	ความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอที่ลดลงหลังจากผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างๆ กัน	28
6	ผลของ BA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวน SSE ที่สร้างและการงอกของ SSE ของปาล์มน้ำมันหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 เดือน	31
7	ผลของ GA_3 ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการงอกของ SSE ปาล์มน้ำมัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 เดือน	34
8	ตารางเปรียบเทียบประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอโดยใช้ปัจจัยในการชักนำการงอกที่แตกต่างกัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 เดือน	35

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
9	ผลของการเติมผงถ่านร่วมกับการเติมอาหารเหลวต่อการงอกของ SSE ปาล์มน้ำมันหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 เดือน	36
10	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลและองค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS ที่แตกต่างกันต่อการชักนำรากของยอดปาล์มน้ำมันหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	37
11	ผลของอัตราส่วนของชิ้นส่วนพืชต่อ Extraction buffer ต่อจำนวนโซนของไอโซไซม์ที่ย้อมด้วยระบบเอนไซม์ 8 ระบบ	41

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (haustorium embryos:HE) หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอก ก, ข : การเกิด SSE ค: การสร้างรากของโซมาติกเอ็มบริโอในซอร์บิทอลความเข้มข้นสูง ง: การงอกของ SSE (ยอด, Sh กับราก, R)	21
2	พัฒนาการของ SSE เป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ก,ข :SSE เริ่มงอก, ค1, ค2: ยอดของปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจาก SSE หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 และ 3 เดือน ตามลำดับ ง: ต้นกล้าที่สมบูรณ์	22
3	ผลของการลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอบางส่วนต่อจำนวน SSE ที่สร้าง (ก) SSE ระยะสร้างจาว (ข) และการงอกของ SSE (ค) หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 4 เดือน	29
4	ลักษณะของต้นกล้าผิดปกติจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร: ยอดมีลักษณะใบม้วนเป็นหลอด (ก) เมื่อใบคลี่มีลักษณะกระจุกเหมือนพุ่มไม้กวาด (ข)	32
5	ยอดปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน (ก) รากปาล์มน้ำมันมีลักษณะยืดยาวได้จากการชักชำรากบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 0.2 โมลาร์ (ข)	38
6	พัฒนาของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน ก: ต้นกล้าสมบูรณ์ก่อนอนุบาล ข: หลังจากอนุบาล 1 เดือน ค: หลังจากอนุบาล 3 เดือน และ ง: หลังจากอนุบาล 6 เดือน จ: หลังจากอนุบาล 7 เดือน ฉ: หลังจากอนุบาลประมาณ 1 ปี	39
7	รูปแบบไอโซไซม์จากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ก: แอซิดฟอสฟาเทส, ข: เปอร์ออกซิเดส ค: เอสเตอเรส	43

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยและคาบสมุทรมลายู โดยเฉพาะประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย นอกจากนี้ยังมีประเทศอื่นๆ ในแถบอัฟริกาและอเมริกาใต้ เช่น ไนจีเรีย โคลอมเบีย และไอโวรี่โคท เป็นต้น (สมปอง, 2544) ในปี 2547 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 1,935,000 ไร่ และสามารถผลิตน้ำมันปาล์มได้ 685,000 ตัน จัดเป็นอันดับ 4 และ 6 ของโลกตามลำดับ (เปรมปรี, 2549) จากความสำคัญของพืชดังกล่าวข้างต้น มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์จึงจัดปาล์มน้ำมันเป็น 1 ใน 7 ยุทธศาสตร์หลักของมหาวิทยาลัยฯ เพื่อมุ่งพัฒนาการวิจัยให้มีความเชี่ยวชาญในศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับพืชน้ำมันชนิดนี้ ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Elaeis* สามารถแบ่งได้ 3 ชนิดคือ *Elaeis guineensis*, *E. oleifera* และ *E. odora* (ศักดิ์ศิลป์ และคณะ, 2541) ชนิดที่ปลูกเพื่อการค้าในปัจจุบันได้แก่ *E. guineensis* ซึ่งมี 3 แบบคือ ดูรา (Dura) พิสิเฟอรา (Pisifera) และเทเนอรา (Tenera) แบบที่นิยมปลูกเป็นการค้าคือเทเนอราซึ่งเป็น ลูกผสมระหว่างแบบดูรากับพิสิเฟอรา เป็นแบบที่มีเปลือกผลสำหรับอัดน้ำมันมาก ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง มีกะลาบาง (0.5-4 มิลลิเมตร) มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบประมาณ 22-25 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักทะลายสด และทะลายดกกว่าพันธุ์ดูรา (ศักดิ์ศิลป์ และคณะ, 2541) น้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในของปาล์มน้ำมันประกอบด้วยกรดไขมันอิสระชนิดต่างๆ คือกรดโอเลอิกและกรดสเตียริกซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวและอิ่มตัวที่สำคัญที่สุด สามารถแยกให้บริสุทธิ์นำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่อเนื่องเพื่อการบริโภคต่างๆ ได้แก่อุตสาหกรรมนมข้นหวาน นมจืด บะหมี่สำเร็จรูป เนยแข็ง เนยเทียม ครีมเทียม สบู่ พลาสติก เครื่องสำอาง น้ำมันล่อลื่น เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถนำมาผลิตเป็นน้ำมันดีเซลชีวภาพซึ่งพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงมีพระราชกรณียกิจในการพัฒนาน้ำมันดีเซลล์จากน้ำมันปาล์มตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2529 (อำพล, 2544)

การใช้น้ำมันปาล์มเพื่อการบริโภคและอุตสาหกรรมต่อเนื่องของโลกสูงขึ้นเฉลี่ยปีละ 6.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความต้องการใช้น้ำมันปาล์มเพิ่มขึ้นจาก 33.32 ล้านตันในปี 2548 เป็น 35.4 ล้านตัน ในปี 2549 (เปรมปรี, 2549) จากการที่ราคาน้ำมันเชื้อเพลิงที่ใช้เป็นพลังงานทั่วไปขยับตัวสูงขึ้น รวมทั้งปัญหาอุณหภูมิโลกที่ร้อนขึ้นเนื่องจากการใช้พลังงานที่ปลดปล่อยก๊าซที่ทำลายชั้นบรรยากาศโลก ทำให้เกิดการกระตุ้นให้เพิ่มการใช้น้ำมันไบโอดีเซลที่มีส่วนผสมของ

น้ำมันพืชรวมทั้งน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่า โดยเฉพาะในยุโรปและอเมริกา (เปรมปรี, 2549) อนาคตน้ำมันปาล์มจึงไม่เพียงเป็นเพียงน้ำมันเพื่อการบริโภคและอุตสาหกรรมต่อเนื่องปกติเท่านั้น แต่ยังมีบทบาทสำคัญอีกบทบาทหนึ่งก็คือการใช้ผลิตไบโอดิเซลหรือไบโอฟูเอล (เปรมปรี, 2549) Ebong และคณะ (1999) รายงานว่าน้ำมันปาล์มจัดเป็นน้ำมันเพื่อการบริโภคที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพตามที่เคยมีการรายงานในอดีตว่า น้ำมันปาล์มมีกรดไขมันอิ่มตัวในปริมาณที่สูงได้แก่ กรดปาล์มมิติค (palmitic) ซึ่งมีสูงถึง 44 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามกรดไขมันดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น non-hypercholesterolemic ซึ่งมีผลต่อการสร้างคลอเลสเตอรอลในปริมาณน้อยมาก ส่วนกรดไขมันอิ่มตัวชนิดอื่นๆ ในน้ำมันปาล์มคือ ลอริค และไมรีสติค แม้จะมีผลต่อการเพิ่มคลอเลสเตอรอลในร่างกาย แต่กรดไขมันทั้งสองชนิดมีปริมาณเพียง 0.2 และ 1.1 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น นอกจากนี้น้ำมันปาล์มยังมีสารประกอบสำคัญชนิดอื่นเช่น สควาลีน (squalene) ซึ่งสารชนิดนี้สามารถสกัดได้จากปลาฉลาม มีฤทธิ์ต้านกระบวนการสร้างสารก่อมะเร็งได้ sterols เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง สเตอรอยด์ ฮอร์โมน (steroid hormone) สาร แคโรทีน (carotenes) เป็นสารตั้งต้นในการสร้างไวตามินเอ นอกจากนี้ยังมีไวตามันอีสูงถึง1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกด้วย (Ebong *et al.,* 1999)

ประเทศไทยเริ่มต้นการปลูกปาล์มน้ำมันเป็นการค้าครั้งแรกตั้งแต่ พ.ศ. 2511 แม้ว่ามีการปลูกนานกว่า 40 ปี แล้วก็ตาม แต่เมื่อเทียบกับประเทศมาเลเซียและอินโดนิเซียแล้วพบว่า ประเทศไทยเริ่มต้นปลูกปาล์มน้ำมันช้ากว่า 2 ประเทศดังกล่าวกว่า 50 ปี (ธีระ และคณะ, 2548) ปัจจุบันประชากรโลกบริโภคน้ำมันปาล์มสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณน้ำมันพืชทั้งหมด (น้ำมันปาล์มจากเนื้อปาล์มชั้นนอก 27 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดในปาล์มน้ำมัน 3 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งจัดอยู่ลำดับที่ 2 รองมาจากน้ำมันถั่วเหลือง (ธีระ และคณะ, 2548) เพื่อรองรับการขยายตัวของอุตสหกรรมน้ำมันปาล์ม และนโยบายของรัฐบาลในการใช้น้ำมันปาล์มเป็นพลังงานทดแทนน้ำมันดิเซลที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นจึงต้องมีการเพิ่มปริมาณการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำนวนมาก เป้าหมายในปี 2572 จะมีการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 10 ล้านไร่ (สุดารัตน์, 2548) ดังนั้นการเพิ่มผลผลิตน้ำมันนอกจากทำได้โดยการเพิ่มพื้นที่ปลูกแล้ว การปรับปรุงพันธุ์ให้ผลผลิตสูงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตปาล์มน้ำมันให้เพียงพอต่อความต้องการของประเทศ แต่เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีมาตรฐาน ต้องใช้ระยะเวลาหลายปี อีกทั้งพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่เพาะปลูกในปัจจุบันเป็นพันธุ์เทเนอรา ซึ่งเป็นเฮเทอโรไซกัสได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ดูรากับพิสิเฟอราเท่านั้น จึงไม่สามารถเก็บเมล็ดใต้ต้นไปขยายพันธุ์ได้ นอกจากนี้การซื้อต้นพันธุ์จากต่างประเทศต้องคำนึงถึงการปรับตัวของพันธุ์ที่นำเข้ามากับสภาพแวดล้อมที่ปลูก

ด้วย เนื่องจากลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของปาล์มน้ำมัน อันได้แก่ องค์ประกอบของทะลายปาล์มน้ำมัน (% ผล/ทะลาย %เนื้อปาล์มชั้นนอก/ผล และ %เนื้อในเมล็ด/ผล) ลักษณะผลผลิตทะลาย (%จำนวนทะลาย/ต้น น้ำหนัก/ทะลาย และน้ำหนักทะลาย/ต้น) ลักษณะผลผลิตน้ำมัน (% น้ำมัน/ผล %น้ำมัน/ทะลาย และ ผลผลิตน้ำมัน/ต้น) เป็นลักษณะเชิงปริมาณ มียีนควบคุมหลายคู่ มีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแปรปรวนตั้งแต่ต่ำ-สูงและมีอิทธิพลของปัจจัยสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องถึง 55 เปอร์เซ็นต์ (ธีระ และคณะ, 2548) ดังนั้นเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าอาจเป็นเมล็ดพันธุ์ไม่ดี เนื่องจากความผิดพลาดในการผลิตเมล็ดพันธุ์หรือการปลอมปนโดยตั้งใจ นอกจากนี้ยังเสี่ยงต่อโรค แมลงที่อาจติดกับเมล็ดหรือต้นกล้า ทำให้ต้องสูญเสียเงินตราในการซื้อพันธุ์ปาล์มเป็นจำนวนมาก เนื่องจากมีราคาค่อนข้างสูง (สุจินต์ และคณะ, 2530) แม้ว่าจะมีบริษัทที่พยายามผลิตลูกผสมพันธุ์เทเนราออกจำหน่ายให้กับเกษตรกร แต่ยังไม่มีการประกันว่าเป็นพันธุ์ดีให้ผลผลิตสูงและยังคงเก็บเมล็ดใต้โคนต้นมาเพาะเพื่อจำหน่ายต้นพันธุ์ในราคาถูก (สมปอง, 2544) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตสูงเป็นแนวทางสำคัญในการผลิตต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี มีรายงานการนำต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนในประเทศมาเลเซียมาปลูกทดสอบมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 โดยงานส่วนใหญ่ดำเนินการโดยหน่วยงานของเอกชนได้แก่ นิคมพัฒนาที่ดินสร้างตนเอง และบริษัทอะโกรคอม ในกรณีของบริษัทอะโกรคอมได้ร่วมมือกับกลุ่มผู้ปลูกปาล์มน้ำมัน ปลูกปาล์มน้ำมันมากกว่า 100 โคลนในพื้นที่กว่า 9,000 ไร่ ในหลายสภาพแวดล้อมและหลายสภาพปลูกทั่วประเทศมาเลเซีย ซึ่งพบการกลายพันธ์เพียง 1 เปอร์เซ็นต์ (Khaw and Ng, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าต้นพันธุ์ดังกล่าวให้ผลผลิตสูงกว่าต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเมล็ดอย่างน้อย 30 เปอร์เซ็นต์ (สมปอง, 2544) ดังนั้น การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนับวันจะเริ่มมีบทบาทมากขึ้น ในประเทศมาเลเซีย FELDA (Federal Land Development Authority) ซึ่งเป็นรัฐวิสาหกิจภายใต้การกำกับดูแลของรัฐได้คัดเลือกต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี ที่มีลักษณะโดดเด่น ให้จำนวนทะลายดกและลำต้นไม่สูงมาใช้ในการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (เปรมปรี, 2549) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการเพาะปลูกต้นปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนโดย Te-chato (1998) โดยปลูกทดสอบตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533/34 จนขณะนี้ไม่พบความผิดปกติใดๆ ผลผลิตที่ได้มีแนวโน้มสูงกว่าต้นที่ปลูกจากเมล็ด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในช่วงของการชักนำแคลลัสจนได้จนกระทั่งได้พืชต้นใหม่มีการใช้ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), BA (N^6-Benzyladenine) และ NAA (∝-Naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้นต่ำ การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันโดย dicamba (2-Methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) ความเข้มข้นต่ำ (0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถร่นระยะเวลาการ

เพาะเลี้ยงลง 6-9 เดือน (อาสลัน และสมปอง, 2545) สำหรับการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีในประเทศไทยพบว่า สามารถชักนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในระยะใบเลี้ยง (haustorium) ได้สำเร็จ (อาสลัน, 2545) แม้สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจำนวนมากก็ตาม แต่เปอร์เซ็นต์การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอยังคงต่ำอยู่ นอกจากนี้การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นสูงเช่น GA_3 (gibberellic acid) ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโออาจส่งผลต่อความแปรปรวนของต้นพันธุ์ได้ ในการศึกษาในครั้งนี้จะได้เพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อให้ได้ต้นกล้าจำนวนมาก ในเวลารวดเร็ว โดยศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมการสร้าง secondary somatic embryo (SSE) จำนวนมากโดยพยายามใช้ปัจจัยที่ลดความแปรปรวนของต้นกล้า 2 ปัจจัยคือ ปัจจัยทางเคมีได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่แตกต่างกัน การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่ำ องค์ประกอบของธาตุอาหารที่แตกต่างกัน และปัจจัยทางกายภาพได้แก่ การลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอบางส่วน ชักนำการงอกของ SSE ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งโซมาติกเอ็มบริโอที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีจากแหล่งปลูกที่สำคัญของภาคใต้ ที่มีประวัติการให้ผลผลิตสูงโดยเป็นพันธุ์เทเนอราที่ตรงตามพันธุ์มีน้ำหนักทะลายและเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง สามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ต้านทานต่อโรคแมลง

การตรวจเอกสาร

1 การชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

กระบวนการสร้างพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 2 กระบวนการคือ ออร์การโนเจเนซีสและเอ็มบริโอเจนีซีส ซึ่งทั้งสองกระบวนการนี้ พืชต้นใหม่ที่ได้อาจเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงหรือเกิดขึ้นโดยผ่านการสร้างแคลลัส ต่างกันตรงที่กระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส ให้พืชต้นใหม่มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะต่างๆ เหมือนกับการสร้างเอ็มบริโอจากการผสมพันธุ์ ส่วนกระบวนการออร์กาโนเจนีซีสมีการสร้างยอดหรือรากหรือทั้งยอดและรากพร้อมกัน (นิจวรรณ, 2545) เรียกเอ็มบริโอที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่างกายว่าโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) หรือเอ็มบริออยด์ (embryoid) การขยายพันธุ์ด้วยโซมาติกเอ็มบริโอเป็นการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศที่มีความสำคัญในพืชหลายชนิดโดยเฉพาะพืชที่การขยายพันธุ์โดยวิธีปกติทำได้ยาก (Stasolla and Yeung, 2003) พืชที่สามารถขยายพันธุ์ด้วยโซมาติกเอ็มบริโอได้

เช่น ปาล์มน้ำมัน (อาสลัน และสมปอง 2545) มะพร้าว (Chan *et al.,* 1998) และอินทผลัม (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2001) เป็นต้น ซึ่งโซมาติกเอ็มบริโอดังกล่าวมีระยะการพัฒนาแบ่งได้ 4 ระยะ คือ รูปกลม รูปหัวใจ ระยะทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง (สมปอง, 2539) อย่างไรก็ตามโซมาติกเอ็มบริโอดังกล่าวจะพัฒนาให้เป็นพืชต้นใหม่ได้นั้นต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ในการชักนำการงอก ซึ่งพืชแต่ละชนิดต้องการปัจจัยในการชักนำการงอกที่แตกต่างออกไป โดยปัจจัยในการพัฒนาและชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่สำคัญมีดังนี้

1.1 น้ำตาล

น้ำตาลจัดเป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนที่สำคัญในการชักนำกระบวนการสุกแก่และการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ ชนิดของน้ำตาลที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่ ซูโครส กลูโคส ฟรุคโทส นอกจากนี้ยังใช้น้ำตาลที่อยู่ในรูปของแอลกอฮอล์ ได้แก่ แมนนิทอล และซอร์บิตอล (Lou and Kako, 1995; Mamiya and Sakamoto, 2000; David and Wayne, 2001; Nakagawa *et al.,* 2001; Paiva and Otoni, 2003) ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอนั้น อาจจะใช้น้ำตาลเพียงชนิดเดียวหรือใช้หลายชนิดร่วมกันก็ได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เพาะเลี้ยง ในการใช้น้ำตาลเพื่อการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอนั้นควรคำนึงถึงปัจจัยดังต่อไปนี้

1.1.1 ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสม

Mamiya และ Sakamoto (2000) รายงานการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L.) บนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) เติมน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุคโทส ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า น้ำตาลทั้งสามชนิดส่งเสริมให้โซมาติกเอ็มบริโอพัฒนาให้ยอดและรากแต่มีการเจริญของรากมากกว่ายอด อย่างไรก็ตามการใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้การเจริญของรากเพิ่มขึ้นด้วยในขณะที่การเจริญของยอดลดลง นอกจากน้ำตาลจะมีผลต่อในการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอแล้วยังมีผลต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโออีกด้วย โดยน้ำตาลซูโครสจัดเป็นแหล่งของคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอซึ่งในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบเลี้ยงพืชจำพวกแตง พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอคือ 200 มิลลิโมลาร์ (Nakagawa *et al.,* 2001)

Lou และ Kako (1995) รายงานว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง (0.25, 0.50 โมลาร์)สามารถชักนำกระบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของแตงกวาได้ดีที่สุด และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเพิ่มขึ้นโดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่เหมาะสมร่วมกับน้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่น ซอร์บิทอลหรือกลูโคส โดยนำแคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของแตงกวามาชักนำโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยการเติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ร่วมกับแมนนิทอลหรือกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ความเข้มข้นของแมนนิทอลหรือกลูโคสที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อจำนวนและเปอร์เซ็นต์ของเอ็มบริโอที่มีทั้งขั้วรากและยอด (bipolar embryo) Levi และ Sink (1990) อ้างโดย Mamiya และ Sakamoto (2000) กล่าวว่า น้ำตาลกลูโคสมีผลส่งเสริมการเจริญของราก น้ำตาลฟรุคโทส ส่งเสริมการพัฒนาของยอด ส่วนน้ำตาลซูโครสส่งเสริมการพัฒนาทั้งรากและยอด ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้กล่าวข้างต้น พบว่าน้ำตาลซูโครสจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยน้ำตาลดังกล่าวแม้จะผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในขั้นตอนของการเตรียมอาหารแล้วก็ตาม แต่ก็ยังสามารถรักษาระดับความเป็นกรดด่างได้ใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรดด่างก่อนการนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร ในขณะที่การเติมน้ำตาลกลูโคสส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงจาก 5.7 เป็น 4.65 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างที่เกิดขึ้น (ลดลง) มีสาเหตุเนื่องมาจากความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการนึ่งอาหาร ส่งผลให้เกลือมีการแตกตัวเป็นไอออน (Paiva and Otoni, 2003) มีรายงานการใช้น้ำตาลซอร์บิทอลในการเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง โดย David และ Wayne (2001) พบว่า การเติมซอร์บิทอลในอาหารชักนำการงอกส่งเสริมการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอเพิ่มขึ้น 2 เท่า ในขณะที่อาหารที่เติมแมนนิทอลไม่ได้เพิ่มประสทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ นอกจากนี้ยังมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของ hypocotyl อีกด้วย

1.1.2 ออสโมติกโพเทลเชียล

น้ำตาลที่เติมลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงนอกจากจะเป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนที่สำคัญสำหรับพืชแล้ว ยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมติกโพเทลเชียลของอาหาร Paiva และ Otoni (2003) รายงานว่าค่าออสโมติกโพเทนเชียลที่วัดได้จากการเติมชนิดและเปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสของพืช ในการเพาะเลี้ยงละอองเกรเกสร พบว่า เมื่อเติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในอาหารวัด

ค่าออสโมติกโพเทนเชียลได้เท่ากับ –0.158 MPa ซึ่งเป็นค่าออสโมติกโพเทียนเชียลที่เหมาะสมต่อการสร้างแคลลัส การพัฒนาของเอ็มบริโอ และ การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ Mamiya และ Sakamoto (2000) รายงานว่าแรงดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ยับยั้งการเจริญของยอด แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของราก การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยง พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ส่งผลให้อาหารมีค่าออสโมติกโพเทนเชียลลดลง (ค่าติดลบมากขึ้น) การลดลงของค่าออสโมติกโพเทนเชียลดังกล่าวทำให้เกิดการเป็นพิษซึ่งส่งผลต่อความสำเร็จในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุดคือ 58.4 มิลลิโมลาร์ (2 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งจะมีค่าออสโมติกโพเทนเชียล -0.158 MPa โดยให้จำนวนเอ็มบริโอทั้งหมด และเอ็มบริโอปกติสูงสุด 4.3 และ 1.8 เอ็มบริโอตามลำดับ ในสภาวะที่พืชได้ปัจจัยส่งเสริมความเครียด เช่น การเติมซอร์บิทอลความเข้มข้นสูงในอาหารส่งเสริมให้พืชมีการสร้างกรดอมิโนและคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น Heng และคณะ (1999) เพาะเลี้ยงเซลล์ซันเพนชันของมันเทศในอาหารที่เติมซอร์บิทอลความเข้มข้นสูง (0.6 โมลาร์) พบว่าเซลล์ซัสเพนชันของมันเทศมีการสะสมของกรดอมิโนชนิดต่างๆ เช่น อลานีน กลูตามีน และโพรลีนมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ 3-4 เท่า นอกจากนี้มีการสะสมคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส ซูโครส และ ฟรุคโทส อย่างไรก็ตามมีการสะสมซูโครสสูงสุด นอกจากนี้ส่งผลให้น้ำหนักสดลดลงอีกด้วย

1.2 **สภาพการเพาะเลี้ยง**

ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของอินทผลัม พบว่า สภาพที่เหมาะสมต่อการงอกคือ การเลี้ยงแบบเขย่าในฟลาสค์เติมอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร สภาพการเลี้ยงดังกล่าวเป็นสภาพการเลี้ยงที่ส่งผลให้โซมาติกเอ็มบริโองอกได้ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงสภาพอื่นๆ เช่น การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งในภาชนะต่างๆ คือ จานเพาะเลี้ยงหลอดทดลอง และการเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองที่เป็นตัวค้ำจุนในอาหารเหลว ไม่สามารถชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอได้ นอกจากนี้พบว่า เมื่อนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในระยะเวลาต่างๆ คือ 2, 4 และ 6 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งก็ยังไม่สามารถชักนำการงอกได้ (Veramendi and Navarro, 1996)

1.3 **องค์ประกอบของอาหาร**

องค์ประกอบของอาหารนับเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งต่อการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของ *Asparagus officinalis* L. บนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบของธาตุอาหารที่แตกต่างกัน พบว่า ความเข้มข้นของธาตุอาหารยิ่งสูงขึ้นส่งผลให้การเจริญของยอดเพิ่มขึ้น โดยพบว่า การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบอาหารเป็น 2 เท่า ให้การเจริญของยอดสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นขององค์ประกอบของธาตุอาหารที่แตกต่างส่งผลให้การเจริญของรากใกล้เคียงกัน (Mamiya and Sakamoto, 2000) ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของฝ้ายพบว่า องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS ปกติให้การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 70 เปอร์เซ็นต์ การลดความเข้มข้นองค์ประกอบของอาหารลงครึ่งหนึ่ง (1/2MS) และ หนึ่งในห้าเท่าของสูตรปกติ (1/5MS) ส่งผลให้การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอลดลงเหลือ 40-50 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (Kumria *et al*., 2003)

1.4 **ความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอ**

การลดความชื้นจะมีผลต่อการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอโดย Find (1997) นำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของสนนอรเวย์ (*Picea abies* (L.) Karst) ที่ชักนำการสุกแก่ในอาหารเติม ABA (abscisic acid) เข้มข้น 15 และ 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับการเติมหรือไม่เติม PEG (polyethylene glycol) เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มาลดความชื้นบางส่วน โดยการนำโซมาติกเอ็มบริโอมาวางในจานเพาะเลี้ยงที่รองด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 54) จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงดังกล่าวไปวางในโถดูดความชื้นที่มีการแบ่งพื้นที่ให้มีส่วนวางโซมาติกเอ็มบริโอและส่วนที่เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 0, 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ แล้วนำเอ็มบริโอที่ผ่านการลดความชื้นตามระยะเวลาข้างต้นมาชักนำการงอกในจานเพาะเลี้ยงที่รองด้วยกระดาษกรองเติมอาหารเหลวสูตรชักนำการงอกปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต (growth chamber) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซียลเซียส พบว่า การลดความชื้นบางส่วนมีผลต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ ในขณะที่โซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่ได้ผ่านการลดความชื้น ไม่สามารถงอกได้เลย การลดความชื้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด การลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอมีผลทำให้การสร้าง storage protein ที่เรียกว่าเบตาโคนิเฟอรินลดลง (Leal *et al* .,1995)

1.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มแรกมีการรายงานโดย Corley และคณะ (1986) แต่การขยายพันธุ์ช่วงแรกนั้นได้จากต้นแม่ที่ไม่ได้รับการคัดเลือกและไม่มีการประเมินผลผลิตในแปลงปลูก สำหรับประเทศไทยมีรายงานการนำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรากและใบอ่อนของทีมงานจากประเทศอังกฤษหรือบริษัทยูนิลิเวอร์กับทีมงานประเทศฝรั่งเศส (IRHO) ไปปลูกที่อำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่ ซึ่งพบการกลายพันธุ์สูงมากหรือเกือบทั้งหมด (สมปอง, 2544) หากพิจารณาสาเหตุการกลายพันธุ์ที่สำคัญคือสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นสูงในช่วงของการชักนำการสร้างแคลลัสและซัสเพนชัน ซึ่งมีรายงานว่าใช้ 2,4-D เข้มข้นสูงถึง 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (Teixeria *et al.,* 1995; Aberlence-Bertossi *et al.,* 1999) และในขั้นตอนการชักนำการงอกของคัพภะที่พัฒนามาจากแคลลัสต้องใช้ GA_3 เข้มข้นสูงในช่วง 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ต้นกล้าที่ได้มีลักษณะผิดปกติ ใบเรียวเล็ก (สมปอง, 2544) Nwanko and Krikorian (1983) อ้างโดย สมปอง (2544) รายงานว่าการใช้ GA_3 เข้มข้นเพียง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็เพียงพอต่อการส่งเสริมอาการใบม้วน และยับยั้งการสร้างราก อย่างไรก็ตามมีรายงานการผลิตปาล์มน้ำมันปกติจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนโดย Te-chato (1998) และปลูกทดสอบตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533/34 จนขณะนี้ไม่พบลักษณะความผิดปกติใดๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในช่วงของการชักนำแคลลัสใช้ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำเพียง 1-5 มิลลิกรัม/ลิตร เท่านั้นและช่วงการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอใช้ NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร เช่นเดียวกับประเทศมาเลเซียมีรายงานว่าหลังจากที่บริษัทอะโกรคอมนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปเพาะปลูกในหลายๆ พื้นที่และหลายๆ สภาพแวดล้อมพบว่า นอกจากผลผลิตจะสูงกว่าต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นยังน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ อีกด้วย (Ng, 1999)

2. การทดสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

ไอโซไซม์ (isozyme) คือเอนไซม์ (enzyme) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรตตัวเดียวกันแต่มีรูปแบบของโมเลกุล และคุณสมบัติบางประการที่แตกต่างกันโดยมีสาเหตุทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (วิไลวรรณ และอมรรัตน์, 2533) ซึ่งจัดเป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรม การวิวัฒนาการและกระบวนการเมทาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต ในด้านพืชนั้นสามารถเป็นดัชนีระบุสายพันธุ์ ความแปรปรวนทางพันธุกรรม การตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ และ

วินิจฉัยโรคพืชต่าง ๆ Te-chato และคณะ (1995) ใช้เทคนิคไอโซไซม์เพื่อแยกความแตกต่างของ *Lansium domesticum* Correa. 4 พันธุ์คือ ลองกอง ลางสาด ดูกู และ ดูกูแปรแมร์ พบว่าระบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้รายละเอียดความแตกต่างของพืช 4 พันธุ์ได้ดีที่สุด ในส่วนของการจำแนกพันธุ์ไม้ดอกนั้น ศิริลักษณ์และนิยะดา (2541) ใช้ประโยชน์จากเทคนิคไอโซไซม์และเทคนิคทางอิเลคโตรโพรีซีสในการจำแนกพันธุ์เข็มพบว่า มีเพียงระบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเท่านั้นที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์เข็มได้ วิไลวรรณ และอมรรัตน์ (2533) นำใบของปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนราที่ปลูกในบริเวณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์มาศึกษาไอโซไซม์พบว่า ต้นปาล์มน้ำมันที่นำมาศึกษาแม้จะเป็นพันธุ์เทเนราเหมือนกัน แต่ก็มีรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังมีการใช้ไอโซไซม์ระบบสีย้อมเอสเทอเรส ศึกษาระยะทางในการแพร่กระจายของการแพร่กระจายของละอองเกสรยางพาราในสภาพธรรมชาติ โดยรวบรวมเมล็ดพันธุ์ยางพาราในพื้นที่ใกล้เคียงมาตรวจไอโซไซม์ จากวิธีการดังกล่าวสามารถหาระยะทางการแพร่กระจายของละอองเกสรยางพาราซึ่งอยู่ระหว่าง 0.3-1 กิโลเมตร (Yeang and Chevallier, 1999)

วัตถุประสงค์

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน โดยใช้ปัจจัยในการส่งเสริมการงอกคือ ปัจจัยทางเคมี (น้ำตาล สารควบคุมการเจริญเติบโต การลดองค์ประกอบของอาหาร, ผงถ่าน) และปัจจัยทางกายภาพ (ความชื้น, ชนิดภาชนะที่เพาะเลี้ยง) เพื่อชักนำต้นกล้าจำนวนมาก ตลอดจนตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าที่ได้ ด้วยเทคนิคไอโซไซม์

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุพืช

1.1 การศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

ใช้โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (haustorium) ของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีอายุ 10 ปี จากสถานีวิจัยเทพา อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา บนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยย้ายเลี้ยงทุกๆ 1 เดือน

1.2 การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

ใช้ใบอ่อนจากยอดของปาล์มน้ำมันอายุ 6 เดือนหลังการงอก ที่ชักนำได้จากการทดลองที่ 1.2-1.6 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS (รายละเอียดในตารางภาคผนวก)

2.2 น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น กลูโคส ฟรุคโทส ซูโครส แมนนิทอล และซอร์บิทอล

2.3 ผงถ่าน

2.4 กรดแอสคอร์บิค

2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น dicamba, BA, NAA, GA_3

2.6 สารเคมีที่ใช้สกัดเอนไซม์ ดังต่อไปนี้

2.6.1 Tris-HCl

2.6.2 2-Mercapthoethanol

2.6.3 PVP (Polyvinylpyrolidone)

2.6.4 Na_2EDTA

2.6.5 น้ำกลั่น

2.7 สารเคมีที่ใช้แยกเอนไซม์ ดังต่อไปนี้

2.7.1 Glycine

2.7.2 3-Amino-9-ethylcarbazole

2.7.3 β-Napthol

2.7.4 Acetone

2.7.5 Acetic acid

2.7.6 Hydrogen peroxide

2.7.7 Sodium acetate

2.7.9 Magnesium chloride ($MgCl_2.6H_2O$)

2.7.10 fast black K salt

2.7.11 α-Napthyl acid phosphate

2.7.12 Shikimic acid

2.7.13 $NADP^+$ (β-Nicotinamide adenine dinucleotile phosphate)

2.7.14 MTT (Methylhthiazolydiphenyl tetrazolium bromide)

2.7.15 PMS (N-methyl-phenazonium methyl sulfate)

2.7.16 Glycerol

2.7.17 G-6-P-DH (α-D-Glucose-6-phosphate dehydrogenase)

2.7.18 NAD^+ (β-Nicotinamide adenine dinucleotile monohydrate)

2.7.19 fast B salt

2.7.20 α-Naptyl acetate in absolute alcohol

2.7.21 Bromphenol blue

2.7.22 polyacrylamide gel

2.7.23 TEMED(N, N, N′, N′-tetramethylethylenediamine)

2.7.24 APS (ammoniumperoxydisulphate)

2.7.25 Fructose-6-P (Na)

2.7.26 DL malate

2.8 แอลกอฮอล์เข้มข้น 70, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์

3. อุปกรณ์

3.1 ชุดเครื่องกรองมิลลิพอร์ และกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาดช่อง 0.45 ไมโครเมตร

3.2 อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น กระบอกตวง volumetric flask จานเพาะเลี้ยง ไปเปต ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 4 และ 8 ออนซ์

3.3 ไมโครไปเปต หลอดเอฟเพนดอร์ฟ

3.4 อุปกรณ์โลหะ เช่น ปากคีบ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด

3.5 อุปกรณ์ฆ่าเชื้อ เช่น หม้อนึ่งความดันอัดไอ หม้ออบความร้อนแห้ง

3.6 ตู้ย้ายเลี้ยง

3.7 ชุดอิเลกโตรโพรีซีสแบบแนวตั้ง

3.8 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง

3.9 กล้องจุลทรรศน์พร้อมกล้องบันทึกภาพ

3.10 กล้องบันทึกภาพแบบดิจิตอล

3.11 เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง

วิธีดำเนินการ

1. การปรับปรุงวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันเพื่อการขยายพันธุ์

1.1 ผลของชนิดภาชนะเพาะเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอ

นำโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่บรรจุในภาชนะชนิดต่างๆ ดังนี้คือ หลอดทดลอง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร) ขวดเพาะเลี้ยงขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 8.8 เซนติเมตร) ขวดเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ (เส้นผ่าน

ศูนย์กลาง 5.6 เซนติเมตร สูง 11 เซนติเมตร) และ จานเพาะเลี้ยง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร) โดยจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในแต่ละชนิดของภาชนะข้างต้นแตกต่างกันดังนี้คือ 1, 3, 5 และ 8 เอ็มบริโอ ตามลำดับ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1300 ลักซ์ ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของโซมาติกเอ็มบริโอโดยการนับจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่เพิ่มขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดภาชนะที่เพาะเลี้ยงโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ (จานเพาะเลี้ยง ซ้ำละ 5 จาน ขวดขนาดกลางและเล็กซ้ำละ 7 ขวด และหลอดทดลองซ้ำละ 20 หลอด)

1.2 ผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของธาตุอาหารต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

นำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวของปาล์มน้ำมันมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ คือ กลูโคส ซูโครส ฟรุคโทส แมนนิตอล และซอร์บิทอล ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0.1, 0.2 และ 0.3 โมลาร์ แต่ละชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลผันแปรจำนวนเท่าองค์ประกอบของอาหารสูตร MS แตกต่างกัน 3 ระดับคือ 1, 1/2 และ 1/5 เท่า จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1300 ลักซ์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลและองค์ประกอบของอาหารโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ใน factorial ในแต่ละหน่วยทดลองย่อย (treatment combination) ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 หลอด (หลอดละ 1 เอ็มบริโอ)

1.3 ผลของการลดความชื้นต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

นำโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวของปาล์มน้ำมันมาลดความชื้น โดยการรวบรวมโซมาติคเอ็มบริโอระยะสร้างจาวใส่จานเพาะเลี้ยง จากนั้นนำไปผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยง (laminar air flow) เป็นระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที จากนั้นนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการผึ่งลม ณ เวลาต่างๆ มาตรวจสอบความชื้นที่ลดลงโดยการหาเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโซมาติกเอ็มบริโอที่เปลี่ยนแปลงหลังจากผึ่งลม จากนั้นนำโซมาติกเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมชนิดน้ำตาลและองค์ประกอบของธาตุ

อาหารที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1.2 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1300 ลักซ์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน นำ SSE ที่ชักนำได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลาอีก 4 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE เปรียบเทียบกันในแต่ละระยะเวลาในการดึงน้ำออก โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 หลอด (หลอดละ 1 เอ็มบริโอ)

1.4 ผลของ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

นำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเหมาะสมจากการทดลองที่ 1.2 เติม BA เข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1300 ลักซ์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน นำ SSE ที่ชักนำได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลาอีก 4 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 หลอด (หลอดละ 1 เอ็มบริโอ)

1.5 ผลของ GA_3 ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

นำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเหมาะสมจากการทดลองที่ 1.2 เติม GA_3 เข้มข้น 0, 0.01 0.05, 0.10, 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสงสองระดับคือ 1178 และ 1554 ลักซ์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน นำ SSE ที่ชักนำได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลาอีก 4 เดือนบันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ GA_3 โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 หลอด (หลอดละ 1 เอ็มบริโอ)

1.6 ผลของผงถ่านร่วมกับการเติมอาหารเหลวต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

นำโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวมาเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น โดยชั้นล่างเป็นอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ร่วมกับการเติมหรือไม่เติมผงถ่าน 0.25 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกันที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1300 ลักซ์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน นำ SSE ที่ชักนำได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลาอีก 4 เดือนบันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE เปรียบเทียบผลของการเติมหรือไม่เติมผงถ่าน โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 หลอด (หลอดละ 1 เอ็มบริโอ)

2. การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

สุ่มตัวอย่างใบ (ใบที่ 1 และ 2 นับจากยอด) ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน (ระบบเอนไซม์ละ 30 ต้น) ที่ได้จากการทดลองที่ 1.2-1.5 มาบดให้ละเอียดภายในโกร่งเย็นเติมบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ (extraction buffer) ปริมาณต่างๆ คือ 5, 10 และ 30 เท่า ของน้ำหนักใบ จากนั้นจึงดูดของเหลวที่ได้จากการสกัดข้างต้นเทใส่เอฟเพนดอร์ฟขนาดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C หลังจากนั้นดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) ที่อยู่ส่วนบนมาใส่เอฟเพนดอร์ฟใหม่ที่สะอาด นำส่วนใสข้างต้นมาแยกเอนไซม์ผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้นอะคริลาไมด์ชนิดไม่ต่อเนื่อง (discontinuous) ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมสีเอนไซม์ 8 ระบบ คือ เอสเทอเรส , เปอร์ออกซิเดส, แอซิดฟอสฟาเทส, แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส, แลคเตทดีไฮโดรจีเนส, มาเลทดีไฮโดรจีเนส และชิกิเมทดีไฮโดรจีเนส โดยการย้อมสีเอนไซม์ทำในสภาพมืด ภายใต้สภาพเขย่าบนเครื่องเขย่า 80 ครั้งต่อนาที รอจนเห็นแถบเอนไซม์ชัดเจนหรือแถบสีคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้งตรวจสอบรูปแบบของ zymogram เปรียบเทียบกันระหว่าง somaclone ที่ได้ ใช้ระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษาข้างต้น มาตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองจำนวน 50 ต้น และต้นกล้านอกหลอดทดลองจำนวน 8 ต้น เปรียบเทียบความแตกต่างของ zymogram ของต้นกล้าแต่ละต้น

บทที่ 3

ผล

1. ผลของชนิดภาชนะเพาะเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในภาชนะที่แตกต่างกัน พบว่า ชนิดของภาชนะเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันส่งผลให้การเพิ่มปริมาณของโซมาติกเอ็มบริโอที่แตกกัน การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอในหลอดทดลองให้การเพิ่มปริมาณของโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 21.37 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน รองลงมาได้แก่การเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาดกลางโดยให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ 19.44 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 1) เมื่อนับจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่พัฒนาเข้าสู่ระยะสร้างจาวก็ให้ผลการทดลองไปแนวทางเดียวกัน โดยการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวสูงสุด 5.37 เอ็มบริโอ/ชิ้นส่วน รองลงมาคือการเพาะเลี้ยงในขวดขนาดใหญ่ให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว 4.25 เอ็มบริโอ/ชิ้นส่วน ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของชนิดของภาชนะเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ภาชนะเลี้ยง	โซมาติกเอ็มบริโอทั้งหมด (เอ็มบริโอ)	โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (เอ็มบริโอ)
จานเพาะเลี้ยง	10.23b	2.47
หลอดทดลอง	21.37a	5.37
ขวดเพาะเลี้ยงขนาดกลาง	19.44a	3.80
ขวดเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่	16.69ab	4.25
F-test	*	ns
C.V. (%)	17.83	52.04

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

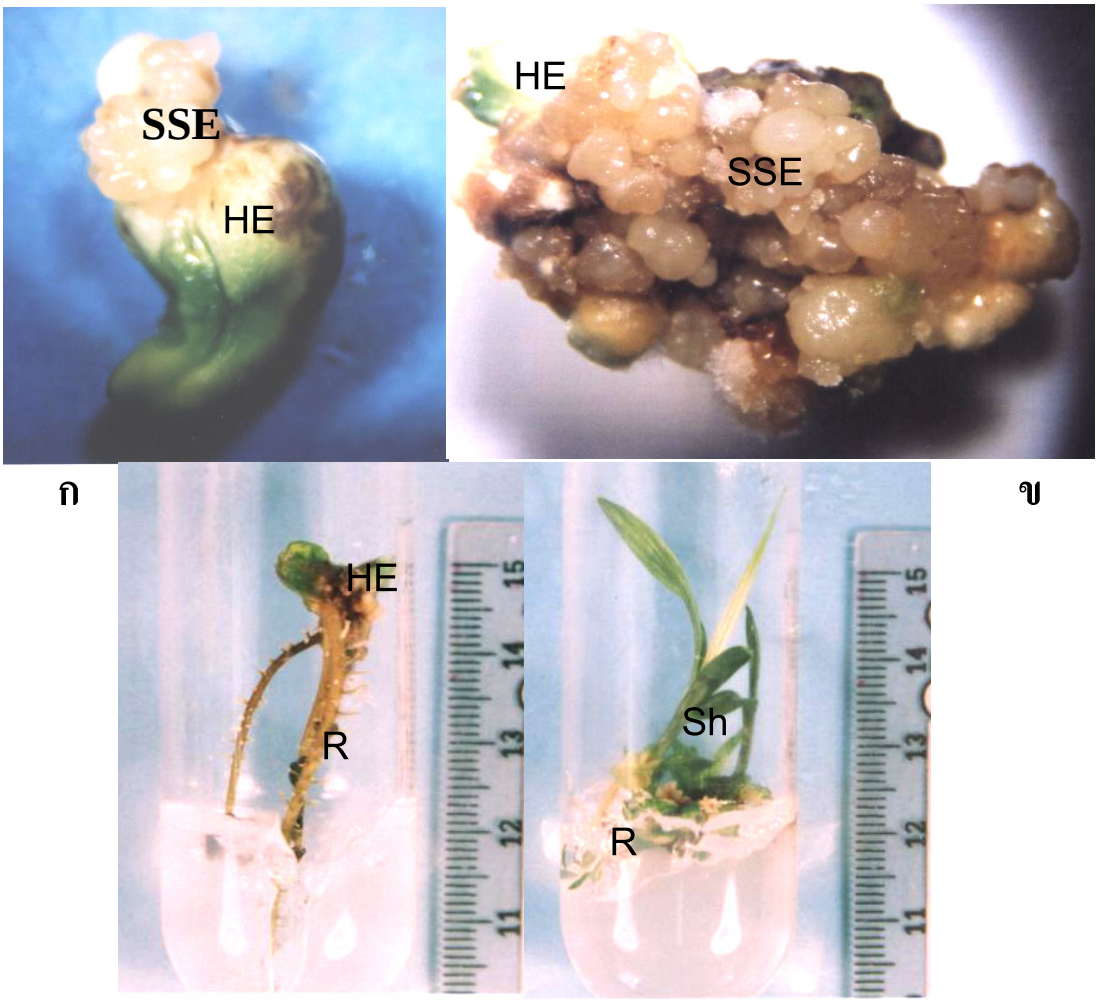
ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

2. ผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของธาตุอาหารต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว ไปชักนำการงอกบนอาหารสูตร MS ที่ผันแปรองค์ประกอบของธาตุอาหาร 3 ระดับ คือ 1 1/2 และ 1/5 เท่า ของธาตุอาหารสูตรปกติ ร่วมกับการเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ 5 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส ฟรุคโทส แมนนิทอล และซอร์บิทอล เข้มข้นชนิดละ 0.1, 0.2.และ 0.3 โมลาร์ พบว่า การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารที่เติมน้ำตาลเกือบทุกชนิด (ยกเว้นแมนนิทอล) และในทุกองค์ประกอบส่งเสริมการสร้างเอ็มบริโอทุติยภูมิ (secondary somatic embryos: SSE) บริเวณฐานของโซมาติกเอ็มบริโอเดิมหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (รูปที่ 1ก, ข) ซึ่งจำนวนการสร้าง SSE นั้นมีความแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาล และองค์ประกอบของธาตุอาหาร โดยการสร้าง SSE สูงสุด 22.0 เอ็มบริโอ/ชิ้นส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS ที่มีองค์ประกอบธาตุอาหารเท่ากับสูตรปกติเติมน้ำตาลซูโครส 0.1โมลาร์ รองลงมาคือการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดังกล่าวเติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (21.50 เอ็มบริโอ/ชิ้นส่วน) (ตารางที่ 2) การลดองค์ประกอบของธาตุอาหารทำให้การสร้าง SSE ลดลง ในทุกชนิดของน้ำตาล แต่เมื่อความเข้มข้นน้ำตาลสูงขึ้นมีผลทำให้การสร้าง SSE ลดลงเช่นกัน ความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้นและการลดองค์ประกอบของอาหารส่งผลให้โซมาติกเอ็มบริโอมีการสร้างรากสูง (รูปที่ 1ค) SSE มีการสร้างยอด (1-3 ยอด/ชิ้นส่วน) (รูปที่ 1ง) บนอาหารเพาะเลี้ยงเดิมที่เติมน้ำตาลเพียง 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และซอบิทอล อย่างไรก็ตาม SSE มีการสร้างยอดสูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ (ชิ้นส่วนที่สร้างยอด/ชิ้นส่วนทั้งหมดที่วางเลี้ยง) โดยพัฒนาให้ยอดสูงสุด 2.75 ยอด/ชิ้นส่วน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เมื่อเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารเติมซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ ยอดปาล์มน้ำมันที่ชักนำในอาหารสูตรชักนำการงอก (ทุกองค์ประกอบของธาตุอาหารและชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่สามารถชักนำให้มีการสร้างยอดได้) มีขนาดเล็ก (0.5-0.8 เซนติเมตร) (ตารางที่ 4) และมีปริมาณน้อยมากนอกจากนี้ ยังพบว่า การทดลองข้างต้นส่งเสริมให้มีการสร้าง SSE จำนวนมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้หาแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของ SSE ซึ่งจะได้กล่าวต่อไปนี้

ยังไม่มีรายงานการชักนำการงอกของ SSE ในประเทศไทยมาก่อน จากการนำ SSE จากบางหน่วยทดลองที่สามารถงอกได้ในอาหารสูตรเดิมเติมชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลดังที่ได้อธิบายแล้วข้างต้นไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า SSE สามารถงอกได้หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (รูปที่ 2ก,ข) อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE แตกต่างกันโดย SSE ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอ

บนอาหารสูตร MS ที่เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้การสร้างยอดสูงสุดถึง 77.92 เปอร์เซ็นต์ (มีการย้ายเลี้ยงอย่างสม่ำเสมอเดือนละ 1 ครั้ง บันทึกข้อมูลเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกสะสมเป็นเวลา 4 เดือน) (รูปที่ 2ค, ตารางที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจาก SSE สร้างยอดเป็นเวลา 2 เดือน ก็จะเริ่มสร้างรากได้เอง 35.71 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 2ง, ตารางที่ 3) ลักษณะเด่นของของ SSE ที่ชักนำได้จากอาหารที่เติมซอร์บิทอลคือ มีการเกาะกันอย่างหลวมๆ ดังนั้นหลังจากพัฒนาเป็นยอดแล้วสามารถตัดแบ่งยอดได้ง่าย (รูปที่ 2 ก,ข) หากพิจารณาความสามารถพัฒนาให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์แล้ว พบว่า SSE ที่ได้จากการชักนำบนน้ำตาลซอร์บิทอลมีศักยภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพการงอกได้ดีกว่าชนิดน้ำตาลอื่นๆ โดยสามารถพัฒนาทั้งยอดและรากสูงสุด หลังจากได้ทำการทดลองยืนยันศักยภาพของน้ำตาลดังกล่าวอีกครั้งพบว่า ความเข้มข้นและองค์ประกอบอาหารเช่นเดียวกับตารางที่ 2 พบว่ายังให้ผลเหมือนเดิมคือ การใช้ซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ ให้การสร้างยอดสูงสุด (ไม่แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงได้นำวิธีการที่ค้นพบดังกล่าวไปใช้ในการทดลองอื่นๆ คือเริ่มแรกย้าย SE ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำ SSE เป็นเวลา 4 เดือน (เติมหรือไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับการทดลองนั้นๆ หลังจากนั้นนำ SSE ที่ได้ไปชักนำการงอกบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 เดือน



ก ข

ค ง

รูปที่ 1 พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (haustorium embryos:HE) หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอก ก, ข : การเกิด SSE ค: การสร้างรากของโซมาติกเอ็มบริโอในซอร์บิทอลความเข้มข้นสูง ง: การงอกของ SSE (ยอด, Sh กับราก, R)

รูปที่ 2 พัฒนาการของ SSE เป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ก,ข :SSE เริ่มงอก, ค1, ค2: ยอดของปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจาก SSE หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 และ 3 เดือน ตามลำดับ ง: ต้นกล้าที่สมบูรณ์

ตารางที่ 2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลและองค์ประกอบของธาตุอาหารต่อการงอกการสร้างยอด และรากของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (โมลาร์)	องค์ประกอบธาตุอาหาร	จำนวน SSE (เอ็มบริโอ)		ยอด (%)	ราก (%)
			ทั้งหมด	ระยะสร้างจาว (%)		
ซูโครส	0.1	1	22.00	10.09	0	30.00
	0.2		15.40	10.38	20.00	40.00
	0.3		7.80	14.23	10.00	20.00
	0.1	½	10.60	24.52	30.00	20.00
	0.2		10.10	14.54	0	40.00
	0.3		11.44	17.48	0	50.00
	0.1	1/5	6.60	24.24	10.00	20.00
	0.2		4.00	25.00	0	50.00
	0.3		6.20	17.74	0	20.00
ฟรุคโทส	0.1	1	6.67	44.97	0	0
	0.2		2.40	54.16	0	20.00
	0.3		3.80	44.73	0	0
	0.1	½	7.00	32.85	0	10.00
	0.2		5.20	36.53	0	0
	0.3		1.10	90.90	0	40.00
	0.1	1/5	3.20	62.50	0	40.00
	0.2		2.90	44.82	0	10.00
	0.3		1.00	100.00	0	30.00
กลูโคส	0.1	1	16.67	38.63	10.00	0
	0.2		17.00	11.05	10.00	0
	0.3		19.30	12.43	0	10.00

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (โมลาร์)	องค์ประกอบธาตุอาหาร	จำนวน SSE (เอ็มบริโอ)		ยอด (%)	ราก (%)
			ทั้งหมด	ระยะสร้างจาว(%)		
กลูโคส	0.1	½	14.60	21.90	0	0
	0.2		17.25	7.97	0	0
	0.3		8.80	13.60	10.00	10.00
	0.1	1/5	6.22	23.15	0	10.00
	0.2		7.00	27.71	0	0
	0.3		15.20	7.23	0	0
แมนนิทอล	0.1	1	0	0	0	0
	0.2		0	0	0	0
	0.3		0	0	0	0
	0.1	½	0	0	0	0
	0.2		0	0	0	0
	0.3		0	0	0	0
	0.1	1/5	0	0	0	0
	0.2		0	0	0	0
	0.3		0	0	0	0
ซอร์บิทอล	0.1	1	21.55	21.11	35.00	12.50
	0.2		11.55	27.87	40.00	11.11
	0.3		2.22	45.04	0	20.00
	0.1	½	11.16	41.75	22.22	22.22
	0.2		3.71	46.09	22.22	12.50
	0.3		5.12	58.59	22.22	14.28
	0.1	1/5	7.25	27.58	20.00	25.00
	0.2		3.71	46.09	0	22.22
	0.3		4.99	31.11	0	44.40

ตารางที่ 3 การงอกของ SSE ที่ชักนำได้จากชนิดและความเข้มข้นของแหล่งของคาร์บอนและองค์ประกอบของอาหารต่างๆ บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

SSE ที่ถูกชักนำ			การงอกของ SSE (%)	ต้นกล้าที่สมบูรณ์ (%)
แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (โมลาร์)	องค์ประกอบของธาตุอาหาร		
ซูโครส	0.2	1	61.68	2.94b
	0.3	1	57.69	0c
	0.1	½	33.01	0c
	0.1	1/5	15.15	0c
กลูโคส	0.1	1	11.99	0c
ซอร์บิทอล	0.1	1	25.52	6.89b
	0.2		77.92	35.71a
	0.1	½	62.72	4.54b
	0.3		58.59	0c
	0.1	1/5	41.37	0c
F-test			-	**
C.V. (%)			-	44.13

**= แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) - = ไม่ได้วิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ยอดปาล์มน้ำมันที่ชักนำได้จากอาหารที่เติมซอร์บิทอลมีความยาวมากกว่า (เฉลี่ย 1.5 เซนติเมตร) ยอดปาล์มน้ำมันที่ได้จากการชักนำในอาหารเติมซูโครส (เฉลี่ย 1.13 เซนติเมตร) โดยยอดปาล์มน้ำมันที่ชักนำได้ในอาหารเติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีความยาวสูงสุด 1.94 เซนติเมตร ซึ่งมากกว่าการชักนำการงอกในอาหารเติมซูโครสที่ระดับความเข้มข้น

เดียวกัน 0.94 เซนติเมตร ดังนั้นเมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ยอดปาล์มน้ำมันมีการเจริญเติบโตสูงสุด 3.74 เซนติเมตร (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ขนาดของต้นที่ได้ หลังจากชักนำการงอก 4 เดือน ในอาหารชักนำการงอก และ 2 เดือนหลังย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (โมลาร์)	องค์ประกอบธาตุอาหาร	ขนาดยอดในอาหารชักนำการงอก (ซม)	ขนาดต้นกล้าหลังเพาะเลี้ยงใน MS-free* (ซม)
ซูโครส	0.2	1	1.00ab	3.71a
	0.3	1	0.83b	2.05ab
	0.1	½	1.60a	2.70ab
	0.1	1/5	1.10ab	1.40b
กลูโคส	0.1	1	-	-
ซอร์บิทอล	0.1	1	1.90a	3.73a
	0.2		1.94a	3.74a
	0.1	½	1.83a	2.36ab
	0.3		1.40ab	2.76ab
	0.1	1/5	0.43b	1.80b
F-test			*	*
C.V. (%)			47.23	35.32

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

- = ปนเปื้อน ไม่สามารถบันทึกข้อมูลได้

* อาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

3. ผลของการลดความชื้นบางส่วนต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวของปาล์มน้ำมันมาลดความชื้นบางส่วนโดยการผึ่งลมในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลาต่างๆ พบว่า ความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาในการผึ่งลมที่เพิ่มขึ้น โดยโซมาติกเอ็มบริโอมีความชื้นหลังจากผึ่งลมเป็นเวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที เท่ากับ 100, 95.85, 94.81, 93.39, 89.12, 87.53 และ 85.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) การลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอบางส่วนมีผลต่อจำนวน SSE ที่สร้าง SSE ระยะสร้างจาว และการงอกของ SSE ดังนี้

3.1 จำนวน SSE ที่สร้าง

จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการลดความชื้นบางส่วนโดยการผึ่งลมเป็นระยะเวลาต่างๆ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า การลดความชื้นบางส่วนมีผลต่อการสร้าง SSE โดยการลดความชื้นบางส่วนเป็นเวลา 5 – 15 นาที (ความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอลดลง 4.15-6.61 เปอร์เซ็นต์) ส่งผลให้การสร้าง SSE ลดลงจากชุดควบคุมประมาณ 1.6-2.5 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน (รูปที่ 3 ก) การสร้าง SSE เพิ่มขึ้นเมื่อลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 20-25 นาที โดยมีการสร้าง SSE สูงสุด 23.21 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน เมื่อลดความชื้นเป็นเวลา 25 นาที (ลดความชื้น 12.47 เปอร์เซ็นต์) เมื่อลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 30 นาที ส่งผลให้การสร้าง SSE น้อยกว่าการลดความความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 25 นาที (19.05 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน) (รูปที่3 ก)

3.2 SSE ระยะสร้างจาว

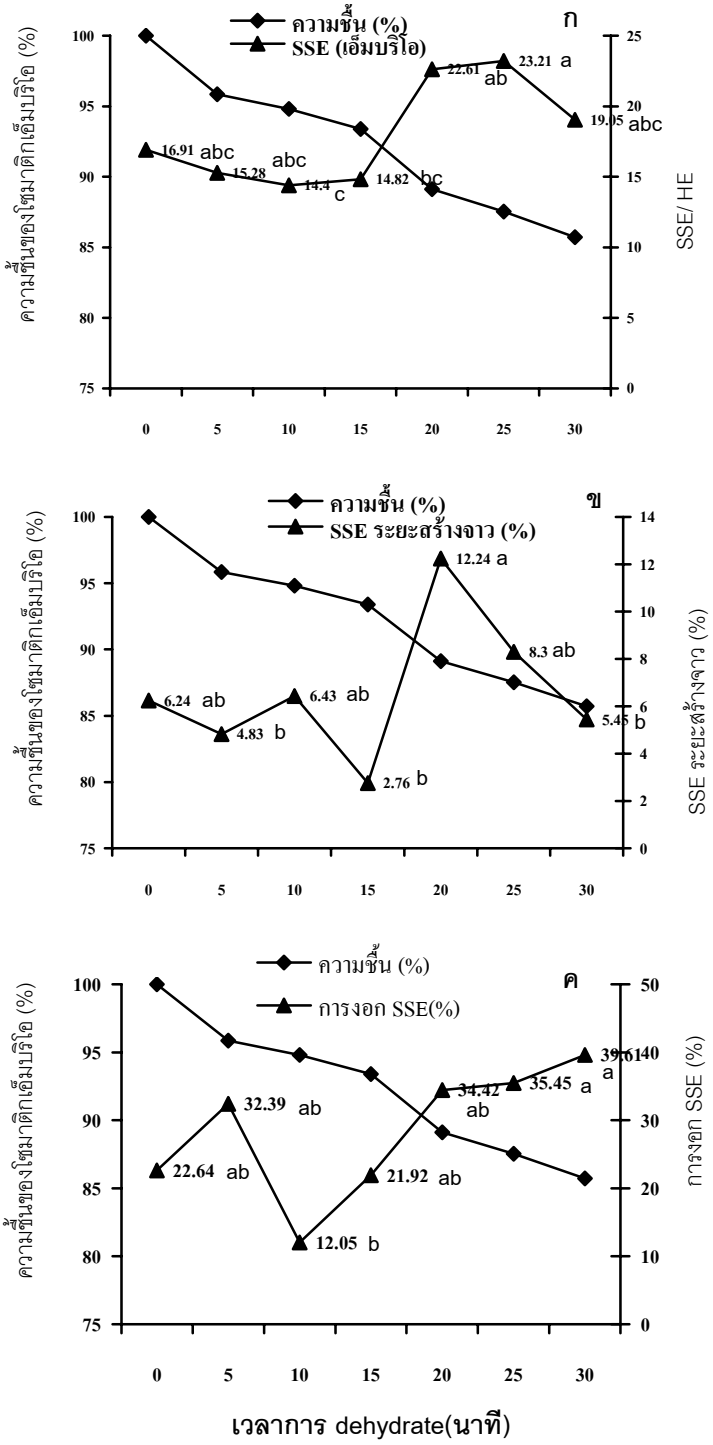
จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการลดความชื้นบางส่วนโดยการผึ่งลมเป็นระยะเวลาต่างๆ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า จำนวน SSE ระยะสร้างจาวมีจำนวนลดลงหลังจากลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 5-15 นาที เมื่อลดความชื้นเป็นเวลา 20 นาที พบว่า จำนวน SSE ระยะสร้างจาวสูงสุด 12.24 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3 ข) หลังจากลดความชื้นเป็นเวลา 25 และ 30 นาที พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอมีจำนวนลดลงกว่าการผึ่งลมในเวลาข้างต้นเป็น 8.30 และ 5.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3.3 การงอกของ SSE

จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการลดความชื้นโดยการผึ่งลมส่วนเป็นระยะเวลาต่างๆ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 4 เดือน จากนั้นนำไปชักนำการงอกบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลาอีก 4 เดือน พบว่า การลดความชื้นช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของ SSE โดยการลดความชื้นเป็นเวลา 20-30 นาที (ความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอลดลง 10.88-14.28 เปอร์เซ็นต์) ส่งเสริมให้การงอกของ SSE สูงกว่า 34 เปอร์เซ็นต์ โดยการงอกของ SSE สูงสุด 39.61 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 นาที (ลดความชื้น 14.28 เปอร์เซ็นต์) (รูปที่ 3 ค)

ตารางที่ 5 ความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอที่ลดลงหลังจากผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างๆ กัน

เวลาในการผึ่งลม (นาที)	**ความชื้น (%)**
0	100.00
5	95.85
10	94.81
15	93.39
20	89.12
25	87.53
30	85.72



รูปที่ 3 ผลของการลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอบางส่วนต่อจำนวน SSE ที่สร้างสร้าง (ก) SSE ระยะสร้างจาว (ข) และการงอกของ SSE (ค) หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 4 เดือน

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันบนเส้นแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$)

4. ผลของ BA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

หลังจากนำ SSE ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวบนอาหารสูตร MS เติม ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับการเติม BA ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของ BA ที่สูงขึ้น ส่งผลให้การสร้าง SSE ลดลง (ตารางที่ 6) โดยการสร้าง SSE สูงสุด 18.40 เอ็มบริโอ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร SSE พัฒนาไปสู่ระยะสร้างจาวสูงสุด 35.15 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อนำ SSE ที่ชักนำได้ข้างต้นไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าให้การสร้างยอดต่ำในทุกความเข้มข้นของ BA โดย การเติม BA ส่งเสริมให้ SSE มีการงอกสูงสุดเพียง 2.69 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ปรับปรุงวิธีการชักนำการงอก โดยนำ SSE ที่ยังไม่งอกไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่งเสริมการงอกของ SSE สูงสุดเป็น 10.47 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) จากการชักนำการงอกของ SSE โดยใช้ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร แม้ว่าการย้าย SSE ไปยังอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้ SSE งอกมากขึ้น อย่างไรก็ตาม พบว่า ต้นกล้าที่ได้จากวิธีการดังกล่าวมีลักษณะผิดปกติ โดยยอดต้นกล้ามีลักษณะม้วนเป็นหลอด เมื่อใบคลี่มีลักษณะเป็นกระจุกคล้ายพุ่มไม้กวาด (27.88 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะที่ผิดปกติดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาได้ และตายตั้งแต่ยังอยู่ในหลอดทดลอง (รูปที่ 4)

ตารางที่ 6 ผลของ BA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวน SSE ที่สร้างและการงอกของ SSE ของปาล์มน้ำมันหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 เดือน

BA (มก/ล)	SSE/HE [1]	SSE ระยะสร้างจาว (%)[1]	การงอก (%) [2]	การงอก (%)[3]
0.0	16.91a	6.24b	22.64a	Nd
0.1	18.40a	11.79b	0.18b	0.41
0.5	15.41a	19.16ab	1.79b	2.95
1.0	14.89a	13.02b	2.69b	10.47
2.5	12.23ab	19.59ab	0.58b	1.37
5.0	7.82b	35.15a	0.95b	3.17
F-test	*	*	**	-
C.V. (%)	25.84	44.84	35.41	-

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

- = ไม่ได้วิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

[1] เก็บข้อมูลหลังจากเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 4 เดือน

[2] เก็บข้อมูลหลังเพาะเลี้ยง SSE จาก [1] บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 เดือน

[3] เก็บข้อมูลหลังเพาะเลี้ยง SSE จาก [2] บนอาหารสูตร MS เติม BA1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน

Nd : ไม่ได้ทดลอง

ก ข

รูปที่ 4 ลักษณะของต้นกล้าผิดปกติจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร: ยอดมีลักษณะใบม้วนเป็นหลอด (ก) เมื่อใบคลี่มีลักษณะกระจุกเหมือนพุ่มไม้กวาด (ข)

5. ผลของ GA_3 ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับการเติม GA_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.01, 0.05, 0.10, 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า GA_3 เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ช่วยส่งเสริมการสร้าง SSE (ตารางที่ 7) โดยการสร้าง SSE สูงสุด 33.7 เอ็มบริโอ/ชิ้นส่วน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม GA_3 เข้มข้น 0.10 มิลลิกรัม/ลิตร SSE พัฒนาสู่ระยะสร้างจาวสูงสุด 16.89 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม GA_3 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มแสงมีผลต่อการงอกของ SSE โดยการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1554 ลักซ์ ส่งเสริมการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1178 ลักซ์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE เฉลี่ยทุกความเข้มข้น เมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1554 และ 1178 ลักซ์ เท่ากับ 21.58 และ 12.11เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7) การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารเติม GA_3 เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การงอกของ SSE สูงสุด 29.79 และ 20.07 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงทั้งสองความเข้มแสงข้างต้น (ตารางที่ 6)

จากการเปรียบเทียบการใช้ปัจจัยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ 2 ปัจจัยร่วมกัน ได้แก่สารเคมีร่วมกับกายภาพ และการใช้ปัจจัยสารเคมีร่วมกัน 2 ปัจจัย เพื่อการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันดังตารางที่ 8 พบว่า การใช้ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับการลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอ 12.47 เปอร์เซ็นต์ และการใช้ซอร์บิทอลเข้มข้นเช่นเดียวกันกับความเข้มข้นข้างต้นร่วมกับการใช้สาร GA_3 ความเข้มข้นต่ำเพียง 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำการสร้าง SSE SSE ระยะสร้างจาว และการงอกของ SSE สูงกว่าการใช้ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เพียงปัจจัยเดียว (ตารางที่ 8) โดยการใช้ปัจจัย 2 ปัจจัยร่วมกันข้างต้นช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสร้าง SSE 23.21 และ 28.56 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน การสร้าง SSE ระยะสร้างจาว 8.30 และ 10.1 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน และการงอกของ SSE 35.45 และ 29.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 ผลของ GA_3 ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการงอกของ SSE ปาล์มน้ำมัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 เดือน

GA_3(มก/ล)	SSE /HE[1]	SSE ระยะสร้างจาว (%)[1]	การงอกของ SSE (%) ที่ความเข้มแสง (ลักซ์)	
			1554	1178
0.01	28.56	10.10	29.76	20.07
0.05	30.12	9.41	18.52	3.49
0.10	33.70	11.19	16.25	19.04
0.25	26.83	16.89	24.96	7.17
0.50	31.06	14.02	18.43	10.79
		การงอกเฉลี่ย (%)	21.58	12.11
F-test	ns	Ns	ns	-
C.V. (%)	27.93	31.56	44.98	-

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ - = ไม่ได้วิเคราะห์ทางสถิติ

[1]เก็บข้อมูลหลังจากเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารเติมซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 4 เดือน

ตารางที่ 8 ตารางเปรียบเทียบประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอโดยใช้ปัจจัยในการชักนำการงอกที่แตกต่างกัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 เดือน

ปัจจัยชักนำการงอก	SSE (เอ็มบริโอ/ชิ้นส่วน)[1]	SSE ระยะสร้างจาว (%)[1]	การงอก (%)[2]
ซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์	16.91b	6.24	22.64a
ซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์+ ลดความชื้น 12.47%	23.21ab	8.30	35.45a
ซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์+ ผงถ่าน 0.25 %+อาหารเหลว*	17.98b	10.04	8.75b
ซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์+ GA_3 0.01 มก/ล	28.56a	10.10	29.76 a
ซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์+ BA 1.0 มก/ล	14.89b	13.02	10.47b
F-test	*	ns	*
C.V. (%)	16.51	48.68	25.11

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

[1] เก็บข้อมูลหลังจากเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารเติมซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 4 เดือน

[2] เก็บข้อมูลหลังเพาะเลี้ยง SSE จาก [1] บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 เดือน

* อาหารเหลวสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

6 ผลของผงถ่านร่วมกับการเติมอาหารเหลวต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวมาเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น โดยชั้นล่างเป็นอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับการเติมหรือไม่เติมผงถ่าน 0.25 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกันที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเติมผงถ่าน 0.25 เปอร์เซ็นต์ส่งเสริมการสร้าง SSE (17.98 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน) การงอกของ SSE (8.75 เปอร์เซ็นต์) และการตายของชิ้นส่วนพืช (38.33 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าการไม่เติมผงถ่าน (ตารางที่ 9) อย่างไรก็ตามการเติมผงถ่านให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (10.04 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งต่ำกว่าการไม่เติมผงถ่าน

ตารางที่ 9 ผลของการเติมผงถ่านร่วมกับการเติมอาหารเหลวต่อการงอกของ SSE ปาล์มน้ำมันหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 เดือน

ผงถ่าน (%)	SSE/HE[1]	SSE ระยะสร้างจาว (%)[1]	ชิ้นส่วนตาย (%)	การงอก (%)[2]
0.25	17.98	10.04	38.33	8.75
0	13.59	16.94	28.33	5.41
F-test	ns	Ns	ns	ns
C.V. (%)	24.64	37.69	43.30	53.93

[1]เก็บข้อมูลหลังจากเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารเติมซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 4 เดือน

[2] เก็บข้อมูลหลังเพาะเลี้ยง SSE จาก [1] บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 เดือน

การชักนำราก

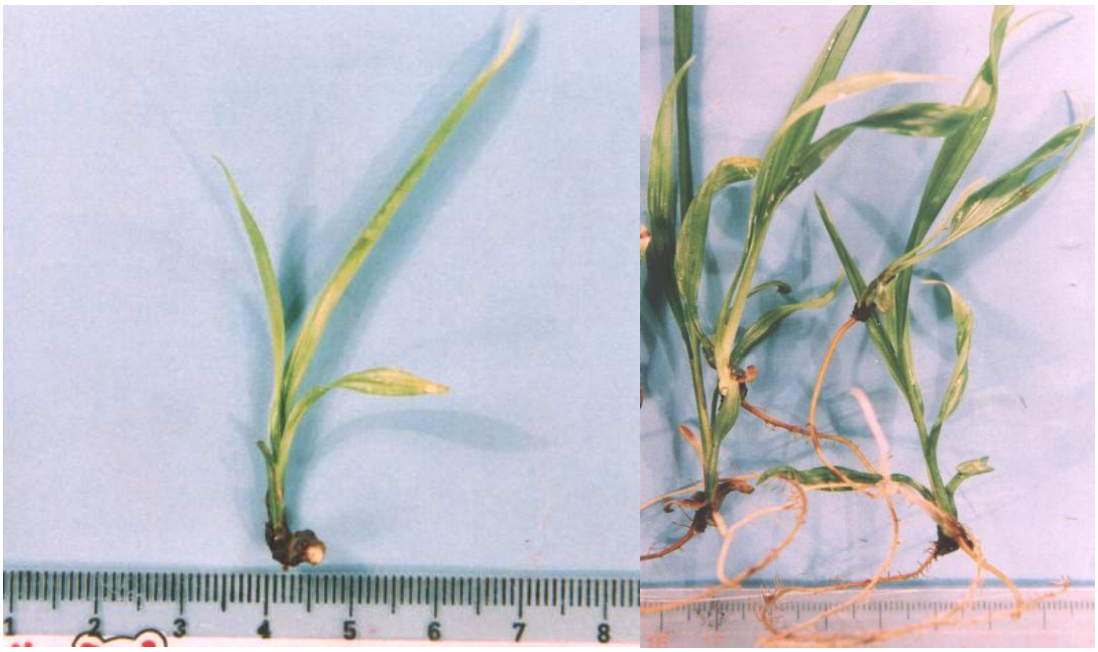
นำยอดปาล์มน้ำมันที่ชักนำได้ข้างต้นไปชักนำรากในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.2 และ 0.3 โมลาร์ ร่วมกับการผันแปรองค์ประกอบของธาตุอาหารเป็น 1, 1/2 และ 1/5 เท่า หรือนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันเติมซอร์บิทอล 0.3 โมลาร์ ร่วมกับการเติมน้ำตาลซูโครส 0, 0.03, 0.05, 0.08 และ 0.16 โมลาร์ ร่วมกับการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารเป็น 1/5 เท่าของสูตรปกติ พบว่าน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับความเข้มข้นของธาตุอาหาร 1 เท่า ส่งเสริมการงอกของรากสูงสุด 31.25 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 เดือน รากที่สร้างมีจำนวน 1-2 ราก/ยอด (ตารางที่ 10 รูปที่ 5)

ตารางที่ 10 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลและองค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS ที่แตกต่างกันต่อการชักนำรากของยอดปาล์มน้ำมันหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้น (โมลาร์)		ความเข้มข้นของธาตุอาหาร	การสร้างราก (%)
ซอร์บิทอล	ซูโครส		
0.3	0	1/5	9.09cd
0.3	0.03	1/5	26.67ab
0.3	0.05	1/5	18.75bc
0.3	0.08	1/5	18.75bc
0.3	0.16	1/5	0d
-	0.2	1	31.25a
-	0.2	1/2	13.33c
-	0.2	1/5	0d
-	0.3	1	0d
-	0.3	1/2	10.00cd
-	0.3	1/5	9.52cd
F-test			*
C.V. (%)			37.65

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

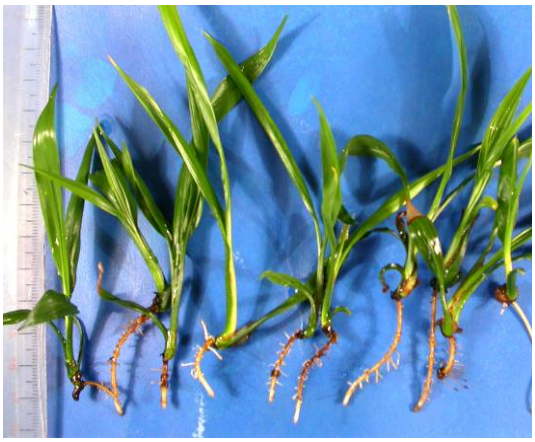


ก ข

รูปที่ 5 ยอดปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน (ก) รากปาล์มน้ำมันมีลักษณะยืดยาวได้จากการชักนำรากบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 0.2 โมลาร์ (ข)

การอนุบาลต้นกล้า

นำต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีรากเพียง 1-2 ราก มาล้างวุ้นที่ติดมากับรากให้สะอาด เพื่อป้องกันรากเน่า หลังจากนั้นย้ายไปปลูกในวัสดุปลูกครอบต้นกล้าด้วยขวดใสขนาด 8 ออนซ์ หรือพลาสติกใส เป็นเวลา 1 เดือน หลังจากครอบต้นกล้าเป็นเวลา 1 เดือนแล้วให้นำวัสดุครอบออก หลังจากอนุบาลโดยวิธีการดังกล่าว พบว่าต้นกล้าสามารถปรับตัวและให้อัตราการรอดชีวิตสูงถึง 93.27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต้นกล้าที่ได้มีพัฒนาการดังรูปที่ 6



ก

ข

ค

ง

จ

ฉ

รูปที่ 6 พัฒนาของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน ก: ต้นกล้าสมบูรณ์ก่อนอนุบาล ข: หลังจากอนุบาล 1 เดือน ค: หลังจากอนุบาล 3 เดือน ง: หลังจากอนุบาล 6 เดือน จ: หลังจากอนุบาล 7 เดือน และ ฉ: หลังจากอนุบาลประมาณ 1 ปี

2. การตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยเทคนิคไอโซไซม์

จากการนำใบของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองอายุ 6 เดือนหลังชักนำการงอกมาตรวจสอบความแปรปรวนโดยเทคนิคไอโซไซม์ 8 ระบบคือ เอสเตอเรส เปอร์ออกซิเดส แอซิดฟอสฟาเทส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส มาเลทดีไฮโดรจีเนส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และ ชิคิเมทดีไฮโดรจีเนส พบว่า มีเพียงระบบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเท่านั้นที่ย้อมไม่ติดสี อย่างไรก็ตามเอนไซม์ระบบอื่นๆ แม้สามารถย้อมติดสีได้แต่มีเพียง 3 ระบบเท่านั้นที่ติดสีได้ชัดเจน (ตารางที่ 11) ได้แก่ แอซิดฟอสฟาเทส (รูปที่7 ก) เปอร์ออกซิเดส (รูปที่7 ข) และเอสเตอเรส (รูปที่7 ค) โดย ระบบเอสเทอเรสให้รูปแบบ (แถบ) เอนไซม์ 2 โซน ให้จำนวนแถบเอนไซม์มากที่สุดทั้งหมด 5 แถบ โดยโซนที่ 1 มีแถบเอนไซม์ 2 แถบ และโซนที่ 2 มีแถบเอนไซม์ 3 แถบ (ตารางที่ 11 รูปที่ 7 ค) จึงเป็นระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง

อัตราส่วนของตัวอย่างใบกับ extraction buffer มีส่วนสำคัญต่อความชัดเจนของการติดสีของระบบเอนไซม์ อัตราส่วนของตัวอย่างใบกับ extraction buffer ที่เหมาะสมคือ 1: 5 หากใช้อัตราส่วนดังกล่าวในอัตรา 1:10 และ 1:30 ส่งผลต่อความชัดของการติดสี และจำนวนแถบลดลง (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลของอัตราส่วนของชิ้นส่วนพืชต่อ extraction buffer ต่อจำนวนโซนของไอโซไซม์ที่ย้อมด้วยระบบเอนไซม์ 8 ระบบ

ระบบเอนไซม์	ตัวอย่างพืช: extraction buffer	จำนวนโซน (โซน)	จำนวนแถบสี (ตำแหน่ง)	การติดสี
EST	1:5	2	5	+++
ACP		2	4	+++
PER		1	1	+++
ADH		-	-	-
PGI		1	1	+
PGM		1	1	+
MDH		1	1	+
shDH		1	1	+
EST	1:10	2	5	++
ACP		2	4	++
PER		1	1	+++
ADH		Nd	Nd	Nd
PGI		Nd	Nd	Nd
PGM		Nd	Nd	Nd
MDH		Nd	Nd	Nd
shDH		Nd	Nd	Nd

PER: เปอร์ออกซิเดส EST: เอสเตอเรส

ACP: แอซิดฟอสฟาเทส MDH: มาเลทดีไฮโดรจีเนส

PGI: ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส PGM: ฟอสโฟกลูโคมิวเทส

ADH: แอลกอฮอร์ดีไฮโดรจีเนส ShDH: ชิคิเมทดีไฮโดรจีเนส

+++ : ติดสี และแยกแถบสีได้ชัดเจน ++: ติดสี และแยกแถบสีได้ปานกลาง

+ : ติดสี ชัดเจนน้อย หรือเป็นปื้น - : ไม่ติดสี Nd: ไม่ได้ทดลอง

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ระบบเอนไซม์	ตัวอย่างพืช: extraction buffer	จำนวนโซน (โซน)	จำนวนแถบสี (ตำแหน่ง)	การติดสี
EST	1:30	1	3	+
ACP		1	2	-
PER		1	1	+++
ADH		Nd	Nd	Nd
PGI		Nd	Nd	Nd
PGM		Nd	Nd	Nd
MDH		Nd	Nd	Nd
shDH		Nd	Nd	Nd

PER: เปอร์ออกซิเดส EST: เอสเตอเรส

ACP: แอซิดฟอสฟาเทส MDH: มาเลทดีไฮโดรจีเนส

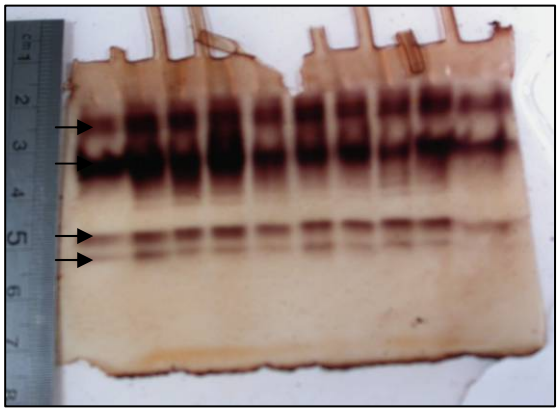
PGI: ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส PGM: ฟอสโฟกลูโคมิวเทส

ADH: แอลกอฮอร์ดีไฮโดรจีเนส ShDH: ชิคิเมทดีไฮโดรจีเนส

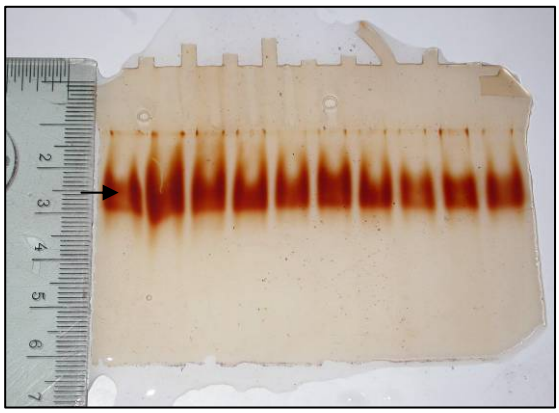
+++ : ติดสี และแยกแถบสีได้ชัดเจน ++: ติดสี และแยกแถบสีได้ปานกลาง

+ : ติดสี ชัดเจนน้อย หรือเป็นปื้น - : ไม่ติดสี Nd: ไม่ได้ทดลอง

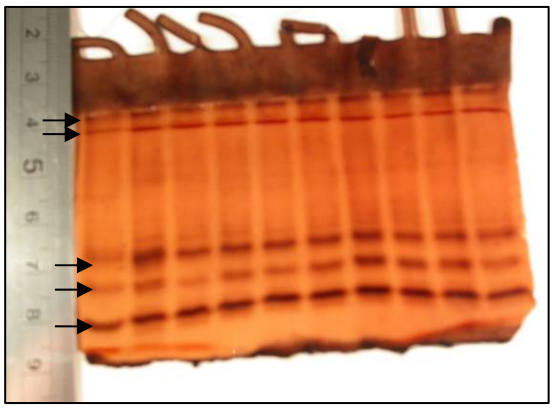
จากการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง 50 ต้น และนอกหลอดทดลอง 8 ต้น โดยใช้ระเอนไซม์เอสเทอเรส พบว่า ไม่มีความแปรปรวนของแถบเอนไซม์



ก



ข



ค

รูปที่ 7 รูปแบบไอโซไซม์จากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ก: แอซิดฟอสฟาเทส, ข: เปอร์ออกซิเดส ค: เอสเตอเรส

บทที่ 4

บทวิจารณ์

การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดขึ้นจาก 2 กระบวนการคือ ออร์กาโนเจเนซีส ซึ่งเป็นกระบวนการสร้างอวัยวะต่างๆ เช่น รากหรือยอดจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืช และเอ็มบริโอเจเนซีส ซึ่งเป็นกระบวนการกำเนิดและพัฒนาเป็นต้นอ่อน และเนื่องจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่มีองค์ประกอบของเซลล์หรือเนื้อเยื่อของเซลล์ร่างกาย ดังนั้นจึงเรียกกระบวนการนี้ว่าโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส (นิจวรรณ, 2545) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นพบว่า โซมาติกเอ็มบริโอเป็นแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศซึ่งมีความสำคัญในพืชหลายชนิดโดยเฉพาะพืชที่การขยายพันธุ์โดยวิธีปกติทำได้ยาก (Stasolla and Yeung, 2003) พืชหลายชนิดต้องการปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำพืชต้นใหม่ที่แตกต่างกัน โดยมีปัจจัยที่สำคัญดังนี้คือ ปัจจัยทางเคมีได้แก่ องค์ประกอบของธาตุอาหารที่แตกต่างกัน (Mamiya and Sakamoto, 2000) น้ำตาล (Lou and Kako,1995; Mamiya and Sakamoto, 2000; David and Wayne, 2001; Nakagawa *et al.,* 2001; Paiva and Otoni, 2003) สารควบคุมการเจริญเติบโต (Teixeria *et al.,* 1995; Aberlence-Bertossi *et al.,* 1999; Ng, 1999; Te-chato, 1998,) ปัจจัยทางกายภาพ เช่น การลดความชื้นบางส่วน (Find, 1997) เป็นต้น

ยังไม่มีรายงานการศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตให้ผลผลิตดีอายุ 10-20 ปี ในประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาตั้งแต่ปัจจัยพื้นฐานที่อาจเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน โดยเริ่มตั้งแต่การศึกษาผลของชนิดของภาชนะที่แตกต่างกันต่อการเพิ่มปริมาณของโซมาติกเอ็มบริโอ โดยเฉพาะโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาว ซึ่งจัดเป็นแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ (อาสลัน, 2545) จากผลการศึกษา พบว่าชนิดของภาชนะเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันมีผลต่อการเพิ่มปริมาณ และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวที่แตกต่างกัน โดยการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองให้การสร้างจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอทั้งหมดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระสร้างจาวสูงสุด ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงให้การเพิ่มปริมาณของโซมาติกเอ็มบริโอต่ำสุด Joy และคณะ (1991) รายงานว่าชนิดของภาชนะที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่างกัน ซึ่งปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มากช่วยส่งเสริมการเกิดพืชต้นใหม่และการพัฒนาของเซลล์พืช

เช่นเดียวกับ Kvaalen และ Arnold (1991) รายงานในลักษณะเดียวกันคือคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจน มีผลต่อการสร้าง การเพิ่มปริมาณ และการสุกแก่ของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไซโกติกเอ็มบริโอของ *Picia abies* อย่างไรก็ตาม ผลของออกซิเจนจะขึ้นกับองค์ประกอบของอาหาร โดยการใช้องค์ประกอบของอาหารเต็มสูตร กระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อเอ็มบริโอเจนิค แต่จะยับยั้งการสร้างเนื้อเยื่อเอ็มบริโอเจนิค หากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ดังนั้นจึงสันนิฐานได้ว่าปริมาตรของภาชนะมีส่วนสำคัญมากต่อการเพิ่มปริมาณของโซมาติกเอ็มบริโอ จากการคำนวณปริมาตรของภาชนะชนิดต่างๆ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีปริมาตรต่างๆ ดังนี้ (ลบปริมาตรอาหาร) หลอดทดลอง 59 ลูกบาศก์เซนติเมตร จานเพาะเลี้ยง 71 ลูกบาศก์เซนติเมตร ขวดทดลองขนาดเล็ก 111 ลูกบาศก์เซนติเมตร และ ขวดทดลองขนาดใหญ่ 221.55 ลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อคำนวณปริมาตรภาชนะเพาะเลี้ยงต่อชิ้น ของภาชนะต่างๆ คือ หลอดทดลอง จานเพาะเลี้ยง ขวดขนาดเล็ก และขวดขนาดใหญ่ มีปริมาตรเท่ากับ 59, 8.8, 37 และ 44.31 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ เป็นไปตามข้อสันนิฐานข้างต้น โดยการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอและโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวสูงสุด นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอในหลอดทดลอง โซมาติกเอ็มบริโอสามารถใช้ปัจจัยในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่มากขึ้น เช่น แสง อากาศและอาหารได้เต็มที่จึงมีผลต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในภาชนะอื่นๆ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในจานเพาะเลี้ยงที่พันด้วยพาราฟิล์มให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอทั้งหมดและโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวต่ำสุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากภาชนะดังกล่าวมีปริมาตรอากาศที่จำกัดและสูญเสียความชื้นได้ง่ายกว่าภาชนะอื่นๆ ประกอบกับการเพาะเลี้ยงในภาชนะดังกล่าวสามารถเพาะเลี้ยงได้หลายชิ้น ทำให้เกิดการจำกัดทั้ง ธาตุอาหาร ความชื้น และอากาศ ซึ่งส่งเสริมให้ชิ้นส่วนเกิดความเครียดและปลดปล่อยสารสารฟีโนลิกออกมา การเลือกใช้ชนิดของภาชนะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมอาจเป็นกุญแจสำคัญให้การเพาะเลี้ยงเนื้อพืชพืชบางชนิด ที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาก เช่น ปาล์มน้ำมัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำแนวคิดที่ได้จากการทดลองที่ 1 ไปประยุกต์ใช้ในการทดลองอื่นๆ ร่วมกับการสังเกตพฤติกรรมการเจริญเติบโตอย่างใกล้ชิด (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งพบว่าในการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงใบอ่อนนั้น ภาชนะเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผลการวิจัยประสบความสำเร็จ โดยในช่วงของการชักนำ SSE ควรใช้หลอดทดลองจะทำให้ได้ปริมาณ SSE สูงสุด ส่วนในช่วงของการชักนำการงอกให้ใช้ขวดขนาด 8 ออนซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่) หากใช้ขวดขนาดเล็กกว่านี้ พบว่านอกจากจะต้องย้ายเลี้ยงบ่อยขึ้นแล้ว ชิ้นส่วนมีการสร้างสารฟีโนลิกออกมามาก ส่งผลให้การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอยังต่ำ

กว่าขวดขนาด 8 ออนซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่) อีกด้วย จากการศึกษาครั้งนี้จึงได้ข้อแนะนำในการปรับใช้ในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเชิงการค้าในอนาคตได้

ในกระบวนการชักนำเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันที่ผู้วิจัยได้ศึกษามาตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2543 โดยได้ศึกษาวิจัยจากต้นกล้าอายุ 1 ปี และต้นโตอายุระหว่าง 10-20 ปี นั้น พบว่า ขั้นตอนที่ยากมี 3 ขั้นตอนคือ การชักนำแคลลัส และการชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ อย่างไรก็ตามโซมาติกเอ็มบริโอสามารถเพิ่มปริมาณมากได้ตามต้องการด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้นต่ำเพียง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Te-chato *et al*., 2002) ความแตกต่างของโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นกล้าและต้นโตคือ การเกาะตัวของโซมาติกเอ็มบริโอ โดยโซมาติกเอ็มบริโอของต้นกล้ามีการเกาะกันแน่น หลังจากนำไปชักนำการงอกแล้วทำให้ตัดแยกต้นกล้าได้ยาก ในขณะที่โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากต้นโตมีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ ทำให้แยกต้นกล้าได้โดยง่าย (ไม่ได้แสดงข้อมูล) จากการสังเกตกระบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพบว่า มีระยะการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอที่ปรากฏเด่นชัดมี 3 ระยะ ได้แก่ รูปกลม ทอร์ปิโดและระยะสร้างจาว (haustorium) ซึ่งโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวเป็นระยะที่เหมาะสมต่อการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ (อาสลัน, 2545) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้โซมาติกเอ็มบริโอในระยะดังกล่าวเพื่อการทดลองการชักนำการงอก โดยโซมาติกเอ็มบริโอที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเลือกโซมาติกเอ็มบริโอที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (มีความยาวและกว้างประมาณ 0.5 เซนติเมตร) อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญของการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณของโซมาติกเอ็มบริโอคือ การปนเปื้อนแบคทีเรีย สันนิษฐานว่าเป็นเชื้อที่อยู่ภายในชิ้นส่วนเองเกิดจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน จึงควรย้ายเลี้ยงให้บ่อยขึ้น (2-3 สัปดาห์ต่อครั้ง) รวมถึงควรย้ายชิ้นส่วนที่ยังไม่ปนเปื้อนไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่อยู่เสมอ และเพาะเลี้ยงในบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้อย เพื่อลดการเกิดไอน้ำในขวดเพาะเลี้ยงเอง ซึ่งไอน้ำจะเป็นตัวกลางให้เชื้อแบคทีเรียเคลื่อนที่ไปทั่วขวด หากย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียอย่างสม่ำเสมอจะช่วยลดเชื้อได้ อย่างไรก็ตามโซมาติกเอ็มบริโอที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียเป็นโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่เหมาะสมต่อการนำไปชักนำการงอกมากนัก เนื่องจากให้จำนวนต้นกล้าน้อยมาก (จากการสังเกต) ซึ่งโดยส่วนใหญ่ฐานโซมาติกเอ็มบริโอ (ส่วนที่สัมผัสอาหาร) จะมีการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ หากมีการปนเปื้อนจะทำให้ส่วนที่ปนเปื้อนเชื้อไม่สามารถสร้างโซมาติกเอ็มบริโอได้เลย หากมีการปนเปื้อนเชื้อปริมาณมากบางโซมาติกเอ็มบริโออาจตายได้

น้ำตาลจัดเป็นแหล่งของคาร์บอนที่สำคัญในการชักนำกระบวนการสุกแก่และการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ (Corrdoira, *et al.,* 2003) ชนิดของน้ำตาลที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโทส นอกจากนี้ยังใช้น้ำตาลในรูปของแอลกอฮอล์ ได้แก่ ซอร์บิทอล และแมนนิทอล (Lou and Kako,1995; Mamiya and Sakamoto, 2000; David and Wayne, 2001; Nakagawa *et al.,* 2001; Paiva and Otoni, 2003) แม้มีรายงานการใช้น้ำตาลหลายชนิด เพื่อชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอในพืชต่างๆ เช่น หน่อไม้ฝรั่ง (Mamiya and Sakamoto, 2000; Nakagawa *et al.,* 2001) แตงกวา (Lou and Kako, 1995) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการใช้น้ำตาลเพื่อชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน ดังนั้นในเบื้องต้นของการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันโดยตรงจึงใช้น้ำตาลเพื่อการชักนำการงอก 5 ชนิด ได้แก่ ซูโครส กลูโคส ฟรุคโทส แมนนิทอลและซอร์บิทอล ในความเข้มข้นชนิดละ 0.1, 0.2 และ 0.3 โมลาร์ ร่วมกับการผันแปรองค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS เป็น 1, 1/2 และ 1/5 เท่าของสูตรปกติ จากการศึกษา พบว่า การเติมน้ำตาลชนิดต่างๆ ลงไปในอาหารเพื่อชักนำการงอกมีผลต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันน้อยมาก (เริ่มงอกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน) (การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการงอกเอ็มบริโอละ 1-2 ต้น) อย่างไรก็ตาม สิ่งที่ค้นพบจากการเติมน้ำตาลเพื่อชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอคือ การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอทุติยภูมิ (SSE: secondary somatic embryo) จากโซมาติกเอ็มบริโอเดิม โดย SSE ดังกล่าวจะเริ่มสร้างที่ฐานของโซมาติกเอ็มบริโอเดิมหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จำนวนของ SSE ที่สร้างขึ้นมากหรือน้อยอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติมลงในอาหาร โดยชนิดของน้ำตาลที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการสร้าง SSE มี 4 ชนิดคือ กลูโคส ซูโครส ฟรุคโทส และซอร์บิทอล มีเพียงน้ำตาลแมนนิทอลเท่านั้นที่ไม่มีผลต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชหลังจากเพาะเลี้ยง แม้ว่าแมนนิทอลมีโครงสร้างทางเคมีที่ไม่แตกต่างกับซอร์บิทอลมากนัก อย่างไรก็ตามในขณะนี้ยังไม่ทราบเหตุผลที่แน่นอนว่าเหตุใดแมนนิทอลจึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงหลังจากเพาะเลี้ยง สันนิษฐานว่าในปาล์มน้ำมันอาจไม่มีเอนไซมม์ที่ทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลแมนนิทอลไปใช้ประโยชน์ได้ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการสร้าง SSE พบว่าการสร้าง SSE มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้น การเติมน้ำตาลความเข้มข้นสูงส่งเสริมให้ชิ้นส่วนพืชสร้างสารประกอบฟีโนลิคมากขึ้นบางชิ้นส่วนตาย หลังจากเพาะเลี้ยง SSE ที่สร้างขึ้นข้างต้นเป็นเวลา 4 เดือน ในอาหารเดิมพบว่า SSE บางส่วนก็สามารถงอกได้แต่มีการงอกน้อยมาก (สูงสุด 9.52 เปอร์เซ็นต์:ไม่ได้แสดงข้อมูล) จากการตรวจสอบพบว่ามีน้ำตาลเพียง 3 ชนิด เท่านั้นที่ส่งเสริมการงอกของ SSE ได้แก่ ซูโครส กลูโคส

และซอร์บิทอล โดยการเติมน้ำตาลซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ ส่งผลต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ ซอร์บิทอลเป็นน้ำตาลที่มีศักยภาพในการชักนำการงอกของ SSE สูงสุด โดยส่งผลให้ SSE งอกในเกือบทุกความเข้มข้น และองค์ประกอบอาหาร Mark และคณะ (2005) รายงานการใช้น้ำตาลซอร์บิทอลเพื่อชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลืองพบว่า ซอร์บิทอลมีประสิทธิภาพในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลืองมากกว่าแมนนิทอล สอดคล้องกับการศึกษานี้ ที่พบว่าแมนนิทอลเป็นน้ำตาลที่ไม่เหมาะสมต่อการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ เนื่องจากไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนหลังจากเพาะเลี้ยงแต่อย่างใด เหตุผลที่ซอร์บิทอลมีคุณภาพดีกว่าแมนนิทอลนั้น ขณะนี้ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน (David and Wayne, 2001) แต่ตามรายงานของ David and Wayne (2001) ซึ่งชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วลิสงพบว่า การใช้ซอร์บิทอลส่งเสริมให้โซมาติกเอ็มบริโอมีการสะสมของสาร triglyceride ในขณะที่การใช้แมนนิทอลไม่มีการสะสมของสารดังกล่าว เหตุผลที่โซมาติกเอ็มบริโอสามารถงอกได้ในอาหารที่เติมน้ำตาลนั้นยังไม่มีรายงานชัดเจนมากนัก อย่างไรก็ตามการเติมน้ำตาลลงในอาหารร่วมกับการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน ในอาหารชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโออาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมติกโพเทนเชียลของอาหาร การเติมน้ำตาลความเข้มข้นยิ่งสูงส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของแรงดันออสโมติก Mamiya และ Sakamoto (2000) รายงานว่าแรงดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ยับยั้งการเจริญของยอดแต่ไม่มีผลต่อการเจริญของราก ดังนั้นการเติมน้ำตาลความเข้มข้นยิ่งสูงขึ้นอาจทำให้เกิดความเป็นพิษซึ่งอาจส่งผลต่อความสำเร็จของการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ สอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลยิ่งสูงขึ้นส่งผลให้มีการสร้าง SSE ลดลง อีกทั้งยังทำให้ชิ้นส่วนพืชมีการปลดปล่อยสารฟีโนลิคเพิ่มขึ้น ทำให้ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล หากไม่ย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนพืชก็อาจตายได้ในที่สุด นอกจากนี้น้ำตาลยังจัดเป็นสาร plasmolyzing osmoticum ซึ่งมีความแตกต่างจากสาร non-plasmolyzing osmoticum โดยทั่วไป เช่น PEG โดยสาร plasmolyzing osmoticum สามารถผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์และส่งผลให้เกิด plasmolysis แบบชั่วคราว ซึ่งโดยทั่วไปการเติมน้ำตาลโดยทั่วไปในอาหารชักนำการสุกแก่เพื่อกระตุ้นการเกิดสภาวะขาดน้ำ เพื่อส่งเสริมการเจริญพัฒนาของพืช ซึ่งมีการใช้หลักของการชักนำกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนีซีสของสนทั่วไป อย่างไรก็ตามข้อเสียของการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานโดยไม่ย้ายเลี้ยงของปาล์มน้ำมันก็คือ การเกิดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน แบคทีเรียจะแทรกซึมอยู่ในชิ้นส่วน การเพิ่มระยะเวลาการย้ายเลี้ยงจะช่วยเพิ่มปัจจัยในการเจริญของแบคทีเรียได้ SSE ที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียสามารถนำไปชักนำการงอกได้ตามปกติ จากการสังเกต พบว่าแม้สามารถ

ชักนำการงอกได้ แต่แบคทีเรียจะขัดขวางการดูดน้ำและธาตุอาหาร ทำให้มีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ แนวทางสำหรับการศึกษาขั้นต่อไปสำหรับการศึกษานี้คือ การย้ายเลี้ยงให้บ่อยขึ้น

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS ต่อการสร้าง SSE พบว่า การสร้าง SSE ลดลงตามองค์ประกอบของอาหารที่ลดลงจากสูตรปกติ สอดคล้องกับการทดลองของ Grool และคณะ (2002) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของมันสำปะหลัง บนอาหารสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงเหลือ ½ และ1/4 พบว่า ทำให้การงอกของเอ็มบริโอลดลง 21 และ 55.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้จากการศึกษา พบว่าการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารส่งเสริมให้โซมาติกเอ็มบริโอมีการสร้างรากโดยตรงจากโซมาติกเอ็มบริโอเดิม อีกทั้งยังกระตุ้นการสร้างสารประกอบฟีนอลเพิ่มขึ้นอีกด้วย ดังนั้นการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS สูตรปกติจึงเหมาะสมต่อการชักนำ SSE มากที่สุด Kumria และคณะ (2003) รายงานว่าในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของฝ้ายนั้น องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS ปกติให้การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 70 เปอร์เซ็นต์ การลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งหรือหนึ่งในห้าเท่าของสูตรปกติ ส่งผลให้การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอลดลงเหลือ 40-50 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

แม้ว่าวัตถุประสงค์เดิมของการศึกษานี้คือการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรง แต่ พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอดังกล่าวมีการงอกต่ำมาก พบการสร้าง SSE จำนวนมากซึ่ง SSE นับเป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นโตที่ให้ผลผลิตดีแล้วเพื่อให้ได้ต้นจำนวนมาก ผู้วิจัยได้ค้นพบว่า เมื่อทดลองนำ SSE ที่มีการงอกบางส่วนบนอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นและองค์ประกอบที่ส่งเสริมการงอกไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าทุกหน่วยทดลองสามารถชักนำการงอกของยอดได้ แต่พบว่า SSE ที่ได้จากอาหารที่เติมซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ มีการงอกสูงสุด 77.92 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่า ยอดปาล์มน้ำมันที่ได้สามารถสร้างรากได้เองมีจำนวนประมาณ 35.71 เปอร์เซ็นต์ การที่ SSE ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลเป็นเวลา 4 เดือน สามารถงอกเป็นต้นกล้าหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต อาจเนื่องจากการเพาะเลี้ยง SSE บนอาหารโดยที่ไม่มีการย้ายเลี้ยงเป็นเวลานาน ส่งเสริมให้โซมาติกเอ็มบริโอมีการปลดปล่อยสารฟีโนลิคลงไปในอาหาร (จากการสังเกต) นอกจากนี้ยังทำให้ความแข็งของอาหารเพิ่มขึ้นเนื่องจากการระเหยของน้ำทำให้ค่าออสโมติกโพเทนเชียลในอาหารลดลงอีกด้วย ความแตกต่างของค่าออสโมติกโพเทนเชียลระหว่างอาหารและโซมาติกเอ็มบริโอก่อให้เกิดสภาวะเครียดน้ำ การดูดน้ำของโซมาติกเอ็มบริโอเป็นไปอย่างช้าๆ มีการปรับสมดุลของสาร ABA ซึ่งเป็นสารที่ส่งเสริมให้เมล็ดพักตัว (Bewley,

1997) กระบวนการดังกล่าวข้างต้นอาจส่งผลให้กิจกรรมของสาร ABA ลดลง ดังนั้นหลังจากนำ SSE ข้างต้นไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ ทำให้โซมาติกเอ็มบริโอเริ่มดูดน้ำและอาจมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงคล้ายกับการงอกของเมล็ดและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการย่อยอาหารสะสมในโซมาติกเอ็มบริโอและการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ (Bewley, 1997) Merkle และคณะ (1995) อ้างโดย Corredoira (2002) รายงานว่า โดยทั่วไปแล้ววัตถุประสงค์ของการลดความชื้นเพื่อการยับยั้งการพักตัวของโซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดจากผลของ ABA ในกรณีของโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากอาหารเติมน้ำซอร์บิทอลมีการสร้างยอดและรากมากกว่าโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากอาหารเติมน้ำตาลซูโครส สันนิษฐานว่าอาหารที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล มีผลต่อการเพิ่มค่าออสโมติกโพเทนเชียลของอาหารซึ่งเป็นสภาวะเครียดน้ำกลไกดังกล่าวคล้ายกับการลดความชื้นที่กล่าวแล้วข้างต้น ดังนั้นการใช้น้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เหมาะสมต่อการงอกของ SSE มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้แม้ว่าทราบชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน แต่ยังไม่ทราบค่าของออสโมติกโพเทนเชียล และเปอร์เซ็นต์ความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอที่ลดลง จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลข้างต้น ดังนั้น แนวทางการศึกษาในอนาคตนั้นควรมีการวัดค่าออสโมติกโพเทนเทียลของอาหาร และหาความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอที่ลดลง ในส่วนของการศึกษาค่าออสโมติกโพเทนเชียลที่เหมาะสมต่อการงอกของ SSE นั้น ควรพิจารณาค่าออสโมติคโพเทนเชียลของอาหารก่อนเพาะเลี้ยงและหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างๆ กัน เนื่องจากการการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารนานถึง 4 เดือน โดยไม่มีการย้ายเลี้ยงนั้น ส่งผลให้ค่าออสโมติกโพเทนเชียลเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้สาเหตุอาจเนื่องมาจากการปลดปล่อยสารประฟีโนลิคของชิ้นส่วนพืชเอง และการระเหยของน้ำในอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้ค่าออสโมติกโพเทนเทียลแตกต่างกันตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามในพืชบางชนิดสามารถใช้ประโยชน์จากน้ำตาลซอร์บิทอลได้ดีกว่าน้ำตาลซูโครส Ahmad และคณะ (2007) เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอลในการเพิ่มปริมาณยอดและรากของท้อพบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมซอร์บิทอลให้การสร้างยอดและรากสูงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสในทุกความเข้มข้น โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมซอร์บิทอลเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดและรากสูงกว่า 2.5 และ 1.7 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ พบว่า ในการเพาะเลี้ยงแอปเปิ้ลและพืชตระกูลกุหลาบ พบว่า ซอร์บิทอลมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการหายใจ และการสร้างอาหารสะสม นอกจากนี้พืชชนิดดังกล่าวอาจมีเอนไซม์บางชนิด

เช่น ซอร์บิทอลดีไฮโดรจีเนส และซอร์บิทอลออกซิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนซอร์บิทอลเป็นกลูโคสและฟรุคโทส นอกจากนี้ซอร์บิทอลอาจทำให้การแบ่งเซลล์ของพืชรวดเร็วขึ้นอาจส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดี (Ahmad *et al.,* 2007)

การลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอเพื่อชักนำการงอกในการศึกษานี้ทำโดยการผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างๆ กัน เป็นการเพิ่มปัจจัยสนับสนุนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ (pre-treatment) หลังจากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการชักนำการสร้าง SSE และการงอกของ SSE เช่นเดียวกันกับกระบวนการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งจะใช้วิธีนี้เป็นวิธีหลักของทุกๆ การทดลอง (ชักนำการงอกของ SSE โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต) ความชื้นจัดเป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอในหลายๆ ชนิด เช่น สนนอรเวย์ (Find, 1997) การนำโซมาติกเอ็มบริโอในจานเพาะเลี้ยงที่รองด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 54) จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงดังกล่าวไปวางในโถดูดความชื้นที่มีการแบ่งพื้นที่ให้วางโซมาติกเอ็มบริโอและภาชนะที่เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ส่งเสริมให้โซมาติกเอ็มบริโองอกสูงสุด 76 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม รายงานดังกล่าวไม่ได้กล่าวถึงเปอร์เซ็นต์ของการลดความชื้น ในขณะที่โซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการลดความชื้นไม่สามารถงอกได้เลย Corredoira และคณะ (2003) ชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอเกาลัดโดยการลดความชื้นด้วยการวางโซมาติกเอ็มบริโอบนจานเพาะเลี้ยงที่ใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ใน 2 ของจานเพาะเลี้ยง (quadrant Petri dish) ในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ลดความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์) แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่งเสริมให้โซมาติกเอ็มบริโองอก 41.7 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าการลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอ 14.28 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้ SSE มีการงอกสูงสุด 39.61 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการลดความชื้นบางส่วน นอกจากส่งเสริมให้ SSE งอกเพิ่มขึ้นแล้ว ยังกระตุ้นให้มีการสร้าง SSE เพิ่มขึ้นอีกด้วย ขณะนี้ยังไม่มีรายงานการอธิบายกระบวนการเปลี่ยนแปลงภายในโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันหลังจากลดความชื้น อย่างไรก็ตาม รายงานของการลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอของสนนอร์เวย์มีผลต่อการสร้างโปรตีนสะสมที่เรียกว่าเบตาโคนิเฟอรินลดลง (Leal *et al.,* 1995) การลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอมากขึ้น (ใช้เวลาในการผึ่งลมมากขึ้น) ส่งผลให้ SSE มีความเครียดมากขึ้น ซึ่งสามารถสังเกตได้จากเมื่อนำ SSE ที่ได้ไปชักนำการงอกพบว่า มีการสร้างสารประกอบฟีโนลิคเพิ่มขึ้น ทำให้ต้องมีการย้ายเลี้ยงบ่อยขึ้นด้วย หากไม่ย้ายเลี้ยงส่งผลให้ SSE ตายในที่สุด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอบางส่วนช่วยส่งเสริมการสร้างและการงอกของ SSE ปาล์มน้ำมัน โดยการลด

ความชื้นของโซมามาติกเอ็มบริโอลงประมาณ 10-12 เปอร์เซ็นต์ หรือผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงประมาณ 20-25 นาที

กรดจิบเบลเรลลิค (GA_3) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีคุณสมบัติกระตุ้นการยืดยาวของปล้อง และจำเป็นต่อการเจริญของเนื้อเยื่อเจริญ (สมพร, 2549) Arteca (1996) รายงานว่าจิบเบอเรลลินเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์อะไมเลส (α-amylase) และเอ็นไซม์ไฮดรอไลซิสชนิดอื่นๆ ในการส่งเสริมการเกิดไฮดรอไลซิสของอาหารสะสม เอนไซม์อะไมเลสถูกสร้างในชั้นแอลิวโรน (aluerone) และเคลื่อนย้ายเข้าสู่เอนโดสเปอร์ม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาล การทำงานของเอนไซม์อะไมเลสที่กระตุ้นโดยกรดจิบเบลเรลลิคข้างต้นถูกยับยั้งในระดับการถอดรหัสโดย ABA นอกจากนี้ จิบเบลเรลลิน ยังออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกับเมื่อพืชได้รับแสงสีแดง เช่น ในการกระตุ้นให้เกิดการงอกของเมล็ดและการทดแทนความต้องการอุณหภูมิต่ำ หรือความยาวช่วงวัน เพื่อใช้ในการทำลายการพักตัวในพืชหลายชนิด อย่างไรก็ตาม ในการใช้ GA_3 เพื่อชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นต่ำระหว่าง 0.01-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงการชักนำให้เกิดความแปรปรวนจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกับเนื้อเยื่อพืช มีรายงานการใช้สาร GA_3 ในการชักนำการงอกของคัพภะปาล์มน้ำมันที่พัฒนามาจากแคลลัสความเข้มข้นสูงถึง 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดดังกล่าวในความเข้มข้นที่สูงส่งเสริมให้ต้นกล้ามีลักษณะผิดปกติ ใบเรียวเล็ก (สมปอง, 2544) Nwanko and Krikorian (1983) อ้างโดย สมปอง (2544) รายงานว่าการใช้ GA_3 เข้มข้นเพียง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็เพียงพอต่อการส่งเสริมอาการใบม้วน และยับยั้งการสร้างราก อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ใช้ GA_3 ความเข้มข้นต่ำเพียง 0.01-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น ดังนั้นจึงไม่มีผลให้ต้นกล้าถูกยับยั้งการสร้างราก มีรายงานการใช้ GA_3 เข้มข้นต่ำเพียง 0.34 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำการงอกของไซโกติกเอ็มบริโอของมะพร้าว (Magdalita *et al.,* 2004) และใช้ความเข้มข้น 2.5-5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของมันฮ่อ (English walnut) ซึ่งสามารถชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ 25-28 เปอร์เซ็นต์ (Tang *et al*., 2000) เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวกับการศึกษานี้ซึ่งพบว่าใช้ GA_3 ความเข้มข้นต่ำกว่าถึง 250-500 เท่า แต่มีการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ใกล้เคียงกัน (ใช้ GA_3 เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ 29.76 เปอร์เซ็นต์) การงอกของของโซมาติกเอ็มบริโอยังขึ้นอยู่กับความเข้มแสงอีกด้วย ความเข้มแสง 1,554 ลักซ์ ส่งเสริมให้โซมาติกเอ็มบริโองอกเฉลี่ยสูงกว่าที่ความเข้มแสง 1,178-

ลักซ์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรศึกษาผลของความเข้มแสงที่เหมาะสมเพื่อเพื่อประสิทธิภาพการงอกของ SSE ต่อไป

BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน มีคุณสมบัติช่วยในการแบ่งเซลล์ และช่วยส่งเสริมการสร้างยอด (shoot formation) นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการชักนำให้เกิดต้น (สมพร, 2549) มีรายงานการใช้ BA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด เช่น *Gardinia jasminoided* (Chuenboonngarm *et al.,* 2001.) Water Chestnut (Hogue *et al.,* 2006) กล้วย (อรอุมา, 2550) เป็นต้น อย่างไรก็ตามพบว่า BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพต่ำในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน เมื่อเปรียบเทียบกับ GA_3 โดยให้เปอร์เซ็นต์การงอกของ SSE ต่ำกว่า GA_3 ประมาณ 4 เท่า (เปรียบจากความเข้มข้นที่ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดในแต่ละชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ BA ความเข้มข้นยิ่งสูงขึ้นส่งผลให้การสร้าง SSE ลดลง และพบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดนี้ส่งผลต่อลักษณะความผิดปกติของการเพาะเลี้ยงเนื้อปาล์มน้ำมันในอัตราที่สูง โดยส่งผลทำให้ต้นกล้ามีลักษณะผิดปกติถึง 27.88 เปอร์เซ็นต์ การทดลองนี้นำมาสู่ข้อสมมติฐานที่ว่า ปัญหาการกลายพันธุ์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันนั้น สาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากการใช้สาร BA ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ BA เข้มข้นเพียง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงของการชักนำการงอกก็เพียงพอต่อการเกิดความผิดปกติจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ โดยใบของต้นกล้ามีลักษณะม้วนเป็นหลอดคล้ายการออกดอก นอกจากนี้พบว่า การใช้ BA ส่งผลต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอน้อยมาก การงอกของต้นกล้ามีลักษณะสั้นๆ เป็นกระจุกทำให้ยากต่อการตัดแยกต้นกล้าไปชักนำราก มีรายงานการใช้ BA ในการเพาะเลี้ยงปลายยอดของกล้วยน้ำว้า ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (อรอุมา, 2550) พบว่าส่งผลให้ต้นกล้วยมีลักษณะผิดปกติคือใบสีซีดจำนวน 1.5 เปอร์เซ็นต์ หลังการย้ายเลี้ยงครั้งที่สองพบลักษณะใบดาบสูงถึง 25.76 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบลักษณะผิดปกติอื่นๆหลังการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 คือ ลำต้นยืดยาว หน่อปม และใบเป็นเส้นม้วนงอ ปัญหาต้นกล้าไม่ยืดยาวจากการนำ SSE ที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA แม้สามารถแก้ปัญหาได้โดยการย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดดังกล่าวลงเข้มข้น1 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการชักนำการงอกโดยกระบวนการนี้ ไม่พบต้นกล้าที่สมบูรณ์เลย ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันจึงควรมีการหลีกเลี่ยงการใช้สารควบคุมชนิดดังกล่าว การปรับสมดุลของสรีรวิทยาโดยใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น ซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ แทน จากผลการศึกษาข้างต้นเป็นเพียงข้อสรุปเบื้องต้นจากการใช้ BA เพื่อชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันเท่านั้น ส่วนไซโตไคนินชนิดอื่นๆ มีผลต่อความ

แปรปรวนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันหรือไม่นั้น ไม่ได้ทำการศึกษา ดังนั้น ในการศึกษาครั้งต่อไปน่าจะศึกษาผลของสารควบคุมเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินชนิดอื่นๆ เช่น ไคนีทิน (kinetin) ซีเอทิน (zeatin) หรือน้ำมะพร้าวต่อความผิดปกติในการงอก SSE ปาล์มน้ำมัน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซีสที่ผ่านมา พบว่า มีการใช้สาร 2,4-D ความเข้มข้นสูงถึง 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Teixeria *et al.,* 1995; Aberlence-Bertossi *et al.,* 1999) และในขั้นตอนการชักนำการงอกของคัพภะที่พัฒนามาจากแคลลัสต้องใช้ GA_3 เข้มข้นสูงในช่วง 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นสูงข้างต้นส่งผลให้เกิดความแปรปรวนของต้นกล้า ลักษณะความผิดปกติที่เกิดขึ้นทั้งระยะที่เป็นต้นกล้าในเรือนอนุบาลก่อนปลูก (pre-nursery stage) เช่น การแตกกอ การพัฒนาดอกที่ยอด และระยะต้นโตในแปลงปลูก (mature palm in the field) มีการผลิตเฉพาะดอกตัวผู้ การผลิตเฉพาะดอกกะเทย และ การเกิดผลลักษณะเมนเทิ้ล (สมปอง, 2544) โดยลักษะผลแบบแมนเทิ้ลนั้น พบว่า มีการสร้างดอกตัวเมียตามปกติแต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นผลที่สมบูรณ์ (ไม่สุกยังคงมีสีดำ ขนาดเท่าเดิม) เมื่อตรวจสอบโดยการผ่าผลดู พบว่า มีพูทั้งหมด 6 พู (จากเดิมมี 3 พู) พูที่พัฒนาขึ้นมาเป็นการพัฒนาของกลีบเลี้ยง (sepal) (สมปอง, 2544) เพื่อลดปัญหาที่อาจส่งผลต่อความแปรปรวนจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นสูงข้างต้น การศึกษานี้จึงใช้สารออกซินความเข้มข้นต่ำชนิดใหม่คือ dicamba (2-Methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) โดยในช่วงชักนำการสร้างแคลลัสใช้ความเข้มข้นเพียง 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้น และในช่วงของการชักนำเอ็มบริโอเจเนซีสใช้สาร dicamba ความเข้มข้นลดลงเหลือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงของการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอนั้นมีการหลีกเลี่ยงการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตโดยการปรับสมดุลทางสรีรวิทยาของโซมาติกเอ็มบริโอโดยใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ หรือหากใช้ก็ใช้ในความเข้มข้นต่ำมากเช่น GA_3 ความเข้มข้นต่ำ (0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร) จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบลักษณะผิดปกติ คล้ายกับการออกดอกในหลอดทดลองเพียง 0.03 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นมีการใช้ผงถ่าน (activated charcoal) มักใช้ผงถ่านความเข้มข้น 0.2-3 เปอร์เซ็นต์ โดยผงถ่านมีความสามารถในการดูดซับสารบางตัวออกจากอาหารได้ เนื่องจากผงถ่านมีช่องว่างที่ละเอียดมาก มีพื้นที่ผิวในช่องว่างสูง จึงใช้ผงถ่านในการดูดซับสารพิษเช่น สารประกอบฟีนอล เอทิลีน ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ (สมปอง, 2539) ในการศึกษาการใช้ผงถ่านเพื่อชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอครั้งนี้ พบว่า การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอน้อยกว่าการชักนำการงอกโดยวิธีอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเติมอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.03

มิลลิกรัมต่อลิตร) ในปริมาณเพียง 1 มิลลิลิตร เท่านั้น ซึ่งน้อยมาก เหตุผลของการเติมอาหารเหลวเพียง 1 มิลลิลิตร เนื่องจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ใช้ในการชักนำการงอกมีขนาดเฉลี่ยเพียง 5 x 6 มิลลิเมตร เท่านั้น หากเติมอาหารเหลวมากกว่า 1 มิลลิลิตร ทำให้โซมาติกเอ็มบริโอจมลงไปในอาหาร นอกจากนี้พบว่า การเติมอาหารเหลวส่งผลให้มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียมากขึ้น ทำให้ชิ้นส่วนพืชตายในอัตราที่สูง และการเติมผงถ่านชิ้นส่วนพืชตายถึง 38.33 เปอร์เซ็นต์

การชักนำรากเป็นปัญหาหนึ่งในการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตภายหลังการอนุบาลต้นกล้าลงดินปลูกจากการศึกษานี้ พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอสามารถสร้างรากได้ในอาหารเติมน้ำตาลความเข้มข้นสูง โดยเฉพาะ ซูโครส และซอร์บิทอล พบว่าน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว สามารถส่งเสริมให้ยอดปาล์มน้ำมันสร้างรากได้ จากการนำยอดของปาล์มน้ำมันไปชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่ผันแปรองค์ประกอบของธาตุอาหาร เติมน้ำตาลความเข้มข้นสูง พบว่า ยอดปาล์มน้ำมันสามารถสร้างรากได้สูงสุด 31.25 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 0.2 โมลาร์ (7.2 เปอร์เซ็นต์) ผลดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่ายอดปาล์มน้ำมันปรับตัวในสภาวะขาดน้ำ โดยพืชจะมีการปรับตัวให้อยู่รอดกับสภาวะดังกล่าว โดยกระตุ้นให้พืชมีการสร้างราก อย่างไรก็ตามการเติมน้ำตาลความเข้มข้นสูงส่งผลให้พืชปลดปล่อยสารประกอบฟีโนลในอาหาร ให้การดูดน้ำของพืชถูกขัดขวาง รากที่ชักนำได้โดยวิธีการนี้มีความยาวกว่ายอดประมาณ 3 เท่า ซึ่งอาจเนื่องมาจากการปรับตัวของพืชเพื่อความอยู่รอดในสภาวะขาดน้ำทำให้รากปรับตัวและยืดยาวมากขึ้น อย่างไรก็ตามใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันจะมีลักษณะเหี่ยว และเหลืองเช่นเดียวกับอาการขาดน้ำของพืชโดยทั่วไป อาจเนื่องมาจากในสภาวะที่พืชขาดน้ำมีผลให้พืชมีการสร้าง เอทธิลีน ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบลดลงส่งผลให้ใบพืชแก่และร่วง (สายัณห์ และระวี, 2547) แม้ว่าการชักนำรากโดยวิธีการดังกล่าวส่งเสริมให้พืชเหี่ยว แต่เป็นวิธีการที่น่าสนใจซึ่งช่วยให้พืชมีการปรับตัวตั้งแต่อยู่ในสภาพหลอดทดลอง อันจะส่งผลให้หลังจากย้ายต้นกล้าไปอนุบาลในสภาพนอกหลอดแล้วพืชจะมีอัตรารอดชีวิตสูงขึ้น

ในการอนุบาลต้นกล้าปาล์มน้ำมันเพื่อให้มีอัตราการรอดชีวิตที่สูง ทำได้โดยการควบคุมความชื้นให้ใกล้เคียงกับความชื้นในหลอดทดลอง เนื่องจากระบบรากของต้นยังไม่แข็งแรงนัก (มีเพียง 1 ราก) หากไม่ควบคุมความชื้นต้นกล้าจะเหี่ยว ในการอนุบาลต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ขวดแก้วครอบต้นกล้าประมาณ 1 เดือน ความเข้มแสง 800-1000 ลักซ์ ซึ่งข้อดีของการครอบต้นกล้าด้วยขวดแก้วคือการระบายความร้อนที่ดี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในขวดแก้วมากนัก ทั้งนี้สามารถสังเกตเบื้องต้นจากการที่ไม่มีไอน้ำปรากฏภายในขวดเลย

อย่างไรก็ตามหากพบว่าหลังจากครอบด้วยขวดแก้ว 1 เดือนแล้ว เมื่อนำขวดที่ครอบออก ต้นกล้าปาล์มน้ำมันยังมีอาการเหี่ยวอยู่ก็ให้ครอบต่อไปอีกประมาณ 2 สัปดาห์ ซึ่งในช่วงของการครอบด้วยขวดแก้วต้นกล้าได้รับอากาศที่จำกัดทำให้มีการเจริญเติบโตไม่ดีนัก การครอบต้นกล้าด้วยถุงพลาสติกมีข้อเสียคือการเกิดความร้อนและไอน้ำขึ้นในถุงทำให้ต้นกล้าตายนึ่ง ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าที่ต่ำลง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันมีการเจริญเติบโตดีและมีอัตราการรอดชีวิตสูง ควรอนุบาลเมื่อต้นกล้ามีความสูงประมาณ 8 เซนติเมตร ขึ้นไป (จากการสังเกต) โดยต้นกล้าที่มีขนาดเล็กให้ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ก่อน อัตราการสร้างใบของต้นกล้าหลังเพาะเลี้ยงอนุบาลประมาณ 1 ใบต่อเดือน ในช่วงที่ต้นกล้ามีจำนวนใบ 1-5 ใบแรก ต้นกล้าจะมีลักษณะใบแคบ ต้นกล้าจะเริ่มสร้างใบที่มีขนาดใหญ่ขึ้นตั้งแต่ใบที่ 6 นอกจากนี้พบว่า การชักนำรากโดยใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูง เพื่อให้ต้นกล้ามีการปรับตัวและช่วยส่งเสริมการสร้างรากก่อนอนุบาลนั้น ส่งผลให้รากของต้นกล้ายืดยาว และใบเหลือง โดยรากที่งอกมีลักษณะลีบเล็ก ทำให้ต้องใช้ระยะเวลาในการฟื้นตัวหลังจากอนุบาลนานขึ้น มีรายงานการแตกกอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (สมปอง, 2544) ผลดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่า อาจเป็นต้นกล้าที่ตัดแยกเพื่อชักนำรากนั้นผ่านการตัดที่มีจุดเจริญของยอดที่กำลังพัฒนาต่อไปด้วย เมื่ออนุบาลลงดินปลูกจุดเจริญส่วนยอดพัฒนาให้ต้นที่มีลักษณะ เหมือนการแตกกอเป็นสองต้น

ในการใช้เทคนิคไอโซไซม์เพื่อการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคไอโซไซม์มาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองเท่านั้น Werner (1992) อ้างโดย อรอุมา (2550) รายงานว่าพืชแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อระบบเอนไซม์ในแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังนั้นในเบื้องต้นได้ศึกษาระบบเอนไซม์รวมทั้งสิ้น 8 ระบบ อย่างไรก็ตาม มีระบบเอนไซม์พียง 3 ระบบเท่านั้นที่สามารถย้อมติดสีได้ชัดเจนได้แก่ แอซิดฟอสฟาเทส เปอร์ออกซิเดส และเอสเตอเรส ระบบเอนไซม์ 3 ระบบดังกล่าวให้จำนวนแถบเอนไซม์ที่แตกต่างกัน โดย ระบบเอสเทอเรสสามารถย้อมติดสีเอนไซม์ได้ชัดเจนสูงสุด 5 แถบ ดังนั้นจึงเป็นระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน ธัญญาพร (2547) ศึกษาระบบเอนไซม์ต่างๆ เพื่อใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนของหน้าวัวในหลอดทดลอง พบว่า ระบบเอนไซม์เอสเทอเรสเป็นระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบความแปรปรวนของหน้าวัวในหลอดทดลอง โดยให้การติดสีและการกระจายตัวของแถบเอนไซม์ดีที่สุด สามารถใช้ระบบเอนไซม์ดังกล่าวตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง (6 เดือน และ 1 ปี หลังจากงอก) และต้นกล้าที่อนุบาลเป็นเวลา 6 เดือน

(ไม่ได้แสดงข้อมูล) สำหรับชิ้นส่วนใบนอกหลอดทดลองนั้นแม้สามารถย้อมติดสีได้ก็ตาม แต่ไม่เหมาะสมมากนักเนื่องจากอาจมีการปนเปื้อนของสิ่งสกปรกในสภาวะนอกหลอดทดลองมากกว่า ทำให้แถบเอนไซม์ที่ได้มีลักษณะปื้นแยกความแตกต่างของแถบเอนไซด์ได้ไม่ชัดเจน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) นอกจากนี้ใบจากนอกหลอดทดลองมีความแข็งและมีเส้นใยมากกว่าใบในหลอดทดลองมาก ทำให้สกัดเอนไซม์ยาก อย่างไรก็ตาม สามารถแก้ไขได้โดยใช้ไนโตรเจนเหลวบดตัวอย่างพืชก่อนนำไปสกัดเอนไซม์ (วิไลวรรณ และอมรรัตน์, 2533) เหตุผลที่เลือกชิ้นส่วนใบ (ใบที่ 1 และ 2) เป็นแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่นำมาตรวจสอบความแปรปรวนเนื่องจาก ชิ้นส่วนดังกล่าวถือเป็นตัวแทนของต้นกล้าแต่ละต้นอย่างแท้จริง และต้นกล้าไม่เกิดความเสียหาย สามารถติดตามผลการเปลี่ยนแปลงจนถึงระยะการให้ผลผลิตได้ สัดส่วนของบัฟเฟอร์สกัดต่อชิ้นส่วนพืชเป็นปัจจัยหลักต่อความชัดเจนในการตรวจสอบ นอกจากนี้ พบว่า น้ำหนักใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันนั้นถือว่าน้อยมาก ดังนั้นควรใช้อัตราส่วนของตัวอย่างใบกับบัฟเฟอร์อย่างเหมาะสม อัตราส่วนของชิ้นส่วนใบต่อบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดคือ 1:5 หากใช้อัตราส่วนของบัฟเฟอร์สกัดที่น้อยกว่านี้ ส่งผลให้ไม่สามารถเก็บของเหลวที่สกัดได้เลย เนื่องจากใบของปาล์มน้ำมันมีปริมาณน้ำในใบน้อย ในทางตรงกันข้ามหากใช้อัตราส่วนตัวอย่างพืชและบัฟเฟอร์สกัดที่สูงกว่า 1:5 ส่งผลเอนไซม์ที่สกัดได้เจือจางลงทำให้การติดสีของเอนไซม์น้อยแม้จะใช้ระบบที่เหมาะสมก็ตาม

จากการนำเอนไซม์ที่สกัดเอนไซม์จากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองจำนวน 50 ต้น และนอกหลอดทดลองจำนวน 8 ต้น มาตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้ระบบเอนไซม์เอสเทอเรส พบว่า ให้รูปแบบไอโซไซม์ที่เหมือนกัน จึงสรุปได้ว่า ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นโตที่ให้ผลผลิตดี ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม หากต้องการความมั่นใจยิ่งขึ้นควรตรวจสอบความแปรปรวนด้วยวิธีการอื่นๆ ด้วย เช่น RAPD, AFLP และ SSR

บทที่ 5

บทสรุป

1. การเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอ

ภาชนะเพาะเลี้ยงที่เป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันที่แตกต่างกัน โดยการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอในหลอดทดลองให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอทั้งหมด และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวสูงสุด 21.37 และ 5.37 เอ็มบริโอตามลำดับ

2. การเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

2.1 น้ำตาลซอร์บิทอล เป็นน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำการสร้าง SSE ของปาล์มน้ำมัน โดย SSE ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีการงอกสูงสุด 77.92 เปอร์เซ็นต์ และพัฒนาให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์สูงสุด 35.71 เปอร์เซ็นต์

2.2 การลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันบางส่วน ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พบว่า ให้การสร้าง SSE (23.21 เอ็มบริโอ) โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (8.30 เปอร์เซ็นต์) และการงอกของ SSE (35.45 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าการใช้ซอร์บิทอลเพียงลำพัง

2.3 การใช้ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับการเติม GA_3 เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้าง SSE (28.56 เอ็มบริโอ) โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (10.10 เปอร์เซ็นต์) การงอกของ SSE (29.76 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าการใช้ซอร์บิทอลเพียงลำพัง

2.4 BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบที่มีประสิทธิภาพต่ำในการชักนำการงอกของ SSE การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารเติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม พบว่า การสร้าง SSE (14.89 เอ็มบริโอ) โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (13.02 เปอร์เซ็นต์) การงอกของ SSE 10.47 (เปอร์เซ็นต์) ต่ำกว่าการใช้ซอร์บิทอลเพียงลำพัง นอกจากนี้ยังพบลักษะต้นที่ผิดปกติโดยยอดมีลักษณะใบม้วนเป็นหลอด เมื่อใบคลี่มีลักษณะเป็นพุ่มไม้กวาด 27.88 เปอร์เซ็นต์

2.5 การใช้ผงถ่านร่วมกับการเติมอาหารเหลวลงให้ประสิทธิภาพต่ำในการชักนำการงอกของ SSE โดยการเพาะเลี้ยงโซมมาติกเอ็มบริโอบนอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร MS เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับ ผงถ่าน เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกันเติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีการสร้าง SSE 17.98 เอ็มบริโอ โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว 10.04 เปอร์เซ็นต์ และการงอกของ SSE เพียง 8.75 เปอร์เซ็นต์

3 การชักนำราก

สามารถชักนำรากของยอดปาล์มน้ำมันบางส่วนได้ โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซูโครสเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 2 เดือน โดยสามารถชักนำรากได้ 31.25 เปอร์เซ็นต์

4. กาอนุบาลต้นกล้า

การอนุบาลต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยการครอบต้นกล้าด้วยขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ เป็นเวลา 1 เดือน ให้การรอดชีวิตของต้นกล้าสูงสุด 93.27 เปอร์เซ็นต์

5. การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

อัตราส่วนของชิ้นส่วนพืชต่อบัฟเฟอร์สกัดที่เหมาะสมสำหรับสกัดเอนไซม์จากใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคือ 1:5 ระบบเอนไซม์เอสเทอเรส เป็นระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมเหมาะสมที่สุดในการทดสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยสามรถย้อมติดสีเอนไซม์ชัดเจนและแถบเอนไซม์สูงสุด 5 แถบ รูปแบบของไอโซไซม์ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกัน จึงสามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าทั้งในและนอกหลอดทดลองได้ ดังนั้น การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นโตที่ให้ผลผลิตดี สามารถผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีความสม่ำเสมอ ไม่มีความแปรปรวนหรือผิดปกติของต้นกล้า

เอกสารอ้างอิง

เปรมปรี ณ สงขลา. 2549. ผู้ยิ่งใหญ่แห่งปาล์มน้ำมัน. ว. เคหการเกษตร 11: 76-98.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำ และสมเกียรติ สีสนอง. 2548. เส้นทางความสำเร็จ การผลิตปาล์มน้ำมัน สงขลา: ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ 117 หน้า

ธัญญาพร สุสานนท์. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน้าวัว (*Anthurium* spp.). วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิจวรรณ สนิทงาม. 2545. การชักนำพืชต้นใหม่ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสะเดาช้าง (*Azadirachta exceisa (Jack)* Jacob). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศักดิ์ศิลป์ โชติสกุล, วินาภรณ์ กุฎีรัตน์ และกิจจารักษ์ วงษ์กุดเลาะ. 2541. ปาล์มน้ำมัน. กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร.

สมปอง เตชะโต. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันใช้เพื่อการขยายพันธุ์ได้จริงหรือ: กรณีการวิจัยที่ผ่านมา. ว. สงขลานครินทร์ (ฉบับพิเศษ) : ปาล์มน้ำมัน 23: 753-761

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

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. ปัตตานี: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สายันห์ สดุดี และ ระวี เจียรวิภา. 2547. ความสำคัญของน้ำที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไม้ผล. โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการจัดการสวนไม้ผลในสภาวะแห้งแล้งของภาคใต้ วันที่ 29 พฤษภาคม 2547 ณ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา.

สุดารัตน์ เตชะศรีประเสริฐ. 2548. แผนยุทธศาสตร์ปาล์มน้ำมัน. การสัมมนาเรื่อง ปาล์มน้ำมัน: เส้นทางสู่ความสำเร็จของเกษตรกร วันที่ 8-9 กันยายน 2548 ณ โรงแรมมารีไทม์ ปาร์ค แอนด์ สปา รีสอร์ท จังหวัดกระบี่.

สุจินต์ จินายน, ประเสริฐ ชิตพงศ์, พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และสมปอง เตชะโต. 2530. ภาวะ ปัญหา และแนวทางแก้ไขการขาดแคลนต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีในประเทศไทย. ว.สงขลานครินทร์ 9: 105-110.

วิไลวรรณ โชติเกียรติ และอมรรัตน์ พงศ์ดารา. 2533. การศึกษาโปรตีนและไอโซไซม์ในสารสกัดปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนรา. ว.สงขลานครินทร์ 12: 21-28.

ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม และนิยะดา ตั้งศิริมิตร. 2541. การจำแนกพันธุ์เข็มโดยใช้ไอโซไซม์และเทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีส. ว. เกษตรก้าวหน้า 12: 61-75.

อาสลัน หิเล และสมปอง เตชะโต. 2545. การปรับปรุงวิธีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน. การประชุมเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษาของประเทศไทย ครั้งที่ 3 วันที่ 18-19 กรกฎาคม 2545 ณ มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา.

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อำพล เสนาณรงค์. 2544. พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวกับการพัฒนาน้ำมันดีเซลจากน้ำมันปาล์ม. ว. เกษตรก้าวหน้า 4: 9-15.

อรอุมา บุญมี. 2550. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยน้ำว้า [*Musa* (ABB group)] และความแปรปรวนทางพันธุกรรม วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตรมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Aberlence-Bertossi, F., Noirot, M. and Duval, Y. 1999. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension culttures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 53-57.

Ahmad, T., Abbasi, N.A., Hafiz, I.A. and Ali, A. 2007. Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677. Pak .J. Bot. 39(4): 1269-1275.

Al-Khayri, J.M. and Al-Bahrany, A.M. 2001. Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulturae 89: 291-298.

Arteca, R.N. 1996. Plant growth substance: principles and application.Chapman and Hall, New York. 332 p

Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. The Plant Cell 9:1055-1066.

Chan, J.L., Saenz, L., Talavera, C., Hornung, R., Robert, M. and Oropeza, C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Rep. 17: 515-521.

Chuenboonngarm, N., Charoonsote, S. and Bhamarapravati, S. 2001. effect of BA and 2iP on shoot proliferation and somaclonal variation of *Gardenia jasminoides* Ellis *in vitro* culture. ScienceAsia 27: 137.141.

Corley, R.H.V., Lee, C.H., Law, I.H. and Wong, C.Y. 1986. Abnormal flower development in oil palm clones. Planter 62: 233-240.

Corredoira, E., Ballester, A. and Vieitez, A.M. 2003. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. Annals of Botany 92: 129-136.

David, R.W. and Wayne, A.P. 2001. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryos germination and conversion. Plant Cell Tissue and Organ Culture 64: 55-62.

Ebong, P.E., Owu, D.O. and Isong, E.U. 1999. Influence of palm oil (*Elaeis guineensis*) on health. Plant Food for Human Nutrition 53: 209-222.

Find, J.I. 1997. Changes in endogenous ABA level in developing somatic embryos of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] in relation to maturation medium, desiccsation and germination. Plant Science 128: 75-83.

Grool, J., Mycock, D.J. and Gray, M. 2002. Effect of medium salt concentration on differentiation and maturation of somatic embryos of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Annals of botany 89: 645-648.

Heng, L.W., Ping, D.L., Li, F.L. and Jong, C.S. 1999. Effect of sorbitol induce osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension culture. Bot. Bull. Sin 40: 219-225.

Hogue, A., Biswas, M.K. and Alam, S. 2007. Variation of callus induction trough anther culture in water chestnut (*Trapa sp.*) Turk. J. Biol. 31: 41-45.

Jens, I.F. 1997. Changes in endogenous ABA level in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination. Plant Science 128: 75-83.

Joy, R. W., Kumar, P.P. and Thorpe, T.A. 1991. Long-term storage of somatic embryogenic white spruce tissue at ambient temperature. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25: 53-60.

Khaw, C.H. and Ng. S.K. 1999. Agrocom's proven tissue culture technology for oil palm. 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, Hotel Meritime, Krabi, Thailand, pp. 1-10.

Kumria, R., Sunnichan, V.G., Das, D.K. Gupta, S.K., Reddy, V.,S. Bhatnager, R.K. and Leelavathi, S. 2003. High-frequency somatic embryos production and maturation into normal plant in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. Plant Cell Rep. 21 : 635-639.

Kvaalen, H. and Arnold, S.V. 1991. Effects of various partial pressures of oxygen and carbon-dioxide on different stages of somatic embryogenesis in *Picea abies*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 27: 49.57.

Leal, I., Misra, S., Attree, S.M. and Fowke, L.C. 1995. Effect of abscisic acid, osmoticum and desiccation on 11S storage protein gene expression in somatic embryos of white spruce. Plant Science 106: 121.128.

Lou, H and Kako, S. 1995. Role of high sugar concentration in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. Scientia Horticulturae 64: 11-20.

Magdalita, P.M., Damasco, O.P., Beredo, J.C. and Adkins, S.W. 2004. Effect of physical, chemical and light-treatments on germination and growth of tissue culture coconut proceeding of International crop science Brisbane, Australia, 26 Sep-1 Oct 2004.

Mamiya, K. and Sakamoto, Y. 2000. Effects of sugar concentration and strenght of basal medium on conversion of somatic embryos in *Asparagus officinalis* L. Scientia Horticulturae 84 : 15-26.

Mark F.B., Julie, M., Edward, C.Y. and Cladio, S. 2005. The effect of osmoticum on ascorbate and glutathione metabolism during white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development. Plant Physiology and Biochemistry 43: 337-346.

Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S. and Ito, A. 2001. Effects of sugar and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. Scientia Horticulturae 90: 85-92.

Ng, S.E. 1999. Challenges for the oil palm plantation industry in the 21st century. 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, Hotel Meritime, Krabi, Thailand, pp. 1-10.

Paiva, N. V.B. and Otoni, W.C. 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture : does it matter?. Scientia Horticulturae 97: 193-202.

Stasolla, C. and Yeung, E.C. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improveing somatic embryo quality. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 15-35.

Tang, H., Ren, Z., and Krezal, G. 2000. Improvement of English walnut somatic embryo germination and conversion by desiccation treatments and plantlet development by lower medium salts. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36: 47-50.

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

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

Te-chato, S., Nawarangsan, W. and Lim, M. 1995. Identification of *Lansium domesticum* Correa. by isozyme technique. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17: 355-361.

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

Veramendi, J. and Navarro, L. 1996. Influence of physical conditions of nutrient and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45: 159-164.

Yeang, H.Y. and Chevallier, M.H. 1999. Range of *Heavea brasiliensis* pollen dispersal esterase isozyme marker. Annual of Botany 84: 681-684.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1650.00
KNO_3	1900.00
KH_2PO_4	170.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10
Glycine	2.00
Sucrose (กรัม)	30.00
วุ้น (กรัม)	7.50
pH	5.7

ตารางภาคผนวกที่ 2 ตัวอย่างสารเคมีย้อมสีเอนไซม์ 3 ระบบ

ระบบเอนไซม์	ส่วนประกอบ
เปอร์ออกซิเดส (peroxidase: PER)	3-Amino-9-ethylcarbazole, ß-Napthol, Acetone, Tris-HCl, Acetic acid และ Hydrogen peroxidase 3%
แอลฟาเอสเทอเรส (esterase: EST)	Phosphate buffer (monobasic sodium phosphate และ dibasic sodium phosphate), Fast blue B Salt และ Napthyl acetate
แอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase : ACP)	Na acetate, $MgCl_2.6H_2O$, Fast black k salt, α-Napthyl acid phosphate (in 50% acetone)

ตารางภาคผนวกที่ 3 ส่วนประกอบของเจลตอนบน (stacking gel) และเจลตอนล่าง (separating gel) สำหรับเจล 2 แผ่น

สารเคมี	ความเข้มข้น (%)	
	เจลตอนล่าง (%)	เจลตอนบน (%)
30% acrylamide gel (ml)	3.0	0.30
1.5 M Tris-HCl (pH 8.9) (ml)	1.45	-
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) (ml)	-	0.375
น้ำกลั่น (ml)	4.435	2.265
TEMED (µl)	5.0	5
10% APS (µl)	225	120
ปริมาตรรวม (ml)	9.115	3.065

ที่มา: ธัญญาพร (2547)

ภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบสารเคมี

1. **Extraction buffer**

- Tris-HCl 0.5 M pH 7.5	6.05 กรัม
- PVP 2%	2.0 กรัม
- Na_2EDTA 2 Mn	0.074 กรัม
- น้ำกลั่น	100 มิลลิลตร

- 2-Mercapthoetanol 1% (เติมเมื่อบดตัวอย่าง)

2. **Electrode buffer**

- Tris-HCl 0.5 M pH 8.3	3.03 กรัม
- Glycine	14.04 กรัม

หมายเหตุ นำ Tris-HCl และ Glycine ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.3

3. **ระบบสีย้อมเอนไซม์**

แอลฟาเอสเทอเรส (α-Esterase)

1. Phosphate buffer 0.1 M pH 6.0 100 มิลลิลิตร

   สารเคมี Stock A

   - Solution of monobasic sodium phosphate 0.1 M 43.8 มิลลิลิตร

   สารเคมี Stock B

   - Solution of dibasic sodium phosphate 0.1 M 6.15 มิลลิลิตร

2. Fast blue S salt 150 มิลลิลิตร
3. α-Naphyl acetate in absolute alcohol 3 มิลลิลิตร

หมายเหตุ นำ Stock A และ Stock B ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับ pH 6.0 ละลายสารในข้อ 1 และ 2 ให้เป็นเนื้อเดียวกันกรองในที่มืด และเติมสารในข้อ 3 เมื่อเขย่าย้อมในที่มืดจนกว่าเจลจะติดสีชัดเจน

เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase)

สารเคมี Stock A

1. 3-Amino-9-ethylcarbazole	210 มิลลิลิตร
2. β-Napthol	145 มิลลิลิตร
3. Acetone	100 มิลลิลิตร

หมายเหตุ ละลายสารเคมีในข้อ 1 และ 2 ในข้อ 3 ให้เป็นเนื้อเดียวกันและเก็บในขวดสีชา

สารเคมี Stock B

1. Tris-HCl	1.50 มิลลิลิตร
2. Acetic acid	1.70 มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

สารเคมี Stock C

1. Hydrogen peroxidase 3% (H_2O_2)	1 มิลลิลิตร

หมายเหตุ ผสม Stock A: B: C ในอัตราส่วน 20: 80: 1 เท่า ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เขย่าย้อมในที่มืดจนกว่าเจลจะติดสีชัดเจน

แอซิดฟอสฟาเทส

1. Na acetate	100 มิลลิลิตร
2. $MgCl_2.6H_2O$	1 มิลลิลิตร
3. Fast black k salt	100 มิลลิกรัม
4. α-Napthyl acid phosphate (in 50% acetone)	3 มิลลิลิตร

หมายเหตุ ละลายสารในข้อ 3 ใน ข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเติมสารข้อ 2 และ 4 เมื่อจะย้อมสีเจล เขย่าย้อมในที่มืดเป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวกที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาของสีย้อมแต่ละระบบเอนไซม์

1. **แอลฟาเอสเทอเรส** (α-Esterase; EST)

เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทางเคมี

α-Naphyl acetate + H_2O ⟶ α-Naphthol + Acetate

เร่งปฏิกิริยาในสภาพมืด เกิดแถบสีม่วงหรือม่วงดำบนแผ่นเจล

2. **เปอร์ออกซิเดส** (Peroxidase; PER)

เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทางเคมี

H_2O_2 + Donor $\longrightarrow$ Oxidized donor + $2H_2O$

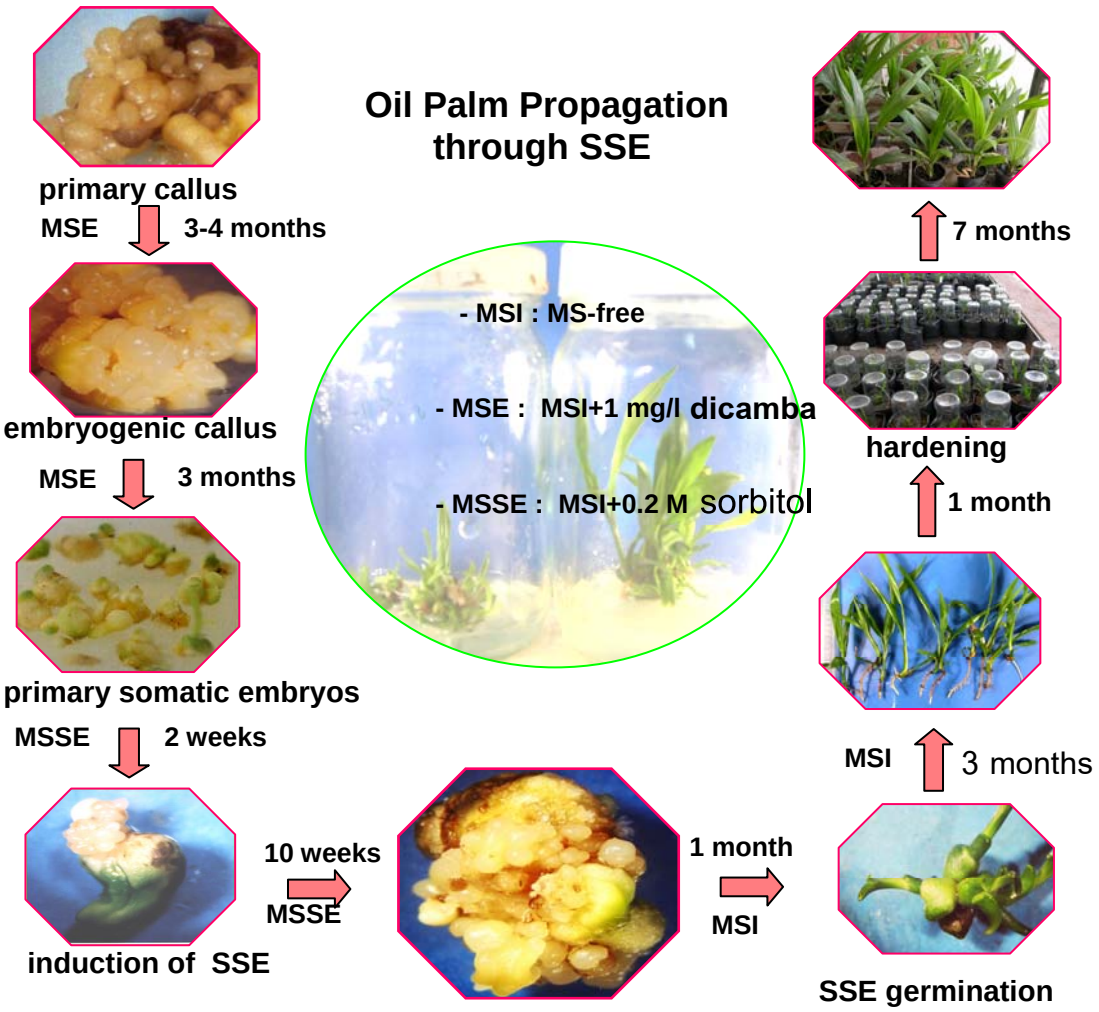
อาศัยหลักการเปลี่ยนสีของ Aromatic amides เช่น o-dianisidine เมื่อมี H_2O และ peroxidase เร่งปฏิกิริยาในสภาพมืดเกิดแถบสีน้ำตาล

3. **แอซิดฟอสฟาเทส** (Acid phosphatase: ACP)

เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทางเคมี

Orthophosphomoester + H_2O $\longrightarrow$ Alcohol + Orthophosphate

เร่งปฏิกิริยาในสภาพมืด เกิดแถบสีแดงบนแผ่นเจล



รูปภาคผนวก 1 การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีโดยใช้ SSE เป็นเครื่องมือในการขยายพันธุ์

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายอาสลัน หิเล

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4643006

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2541
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2545

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาประเภทผู้มีผลการเรียนดีเด่นระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาเอก) จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

อาจารย์ระดับ 5 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Te-chato, S. and Hilae, A. 2007. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.var. tenera). Journal of Agricultural Technology 3(2): 345-357.

Hilae, A. and Te-chato, S. 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(Suppl.3): 629-635.