ผลของเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ที่ให้กับโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน ต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของต้นกล้าที่พัฒนา

Effect of Ethylmethanesulfonate (EMS) Treated with Somatic Embryo of Oil Palm on Genetic Variation of Development Seedlings

ชญานีย์ สังวาลย์

Chayanee Sangwan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผลของเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ที่ให้กับโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน ต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของต้นกล้าที่พัฒนา

Effect of Ethylmethanesulfonate (EMS) Treated with Somatic Embryo of Oil Palm on Genetic Variation of Development Seedlings

ชญานีย์ สังวาลย์

Chayanee Sangwan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ที่ให้กับโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของต้นกล้าที่พัฒนา

ผู้เขียน นางสาวชญานีย์ สังวาลย์

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ

(ดร.สุภาวดี รามสูตร)

……กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

……กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ธีระ เอกสมทราเมษฐ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวชญานีย์ สังวาลย์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวชญานีย์ สังวาลย์)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ที่ให้กับโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของต้นกล้าที่พัฒนา

ผู้เขียน นางสาวชญานีย์ สังวาลย์

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันโดยการนำโซมาติกเอ็มบริโอมาสร้างบาดแผลด้วยการหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Oil palm culture medium (OPCM) เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้การให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 2.35 เอ็มบริโอต่อหลอด จากนั้นนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้มาหั่นและไม่หั่นมาจุ่มแช่สารละลาย Ethylmethanesulfonate (EMS) เพื่อชักนำการกลายพันธุ์ พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่มีการหั่นและจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0-1 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตรารอดชีวิตสูงกว่า 50% แต่ต้นกล้ามีลักษณะทางสัณฐานที่ต่างจากต้นในชุดควบคุมคือ มีการเจริญเติบโตของต้นที่ช้ากว่าต้นควบคุม มีจำนวนใบที่มากกว่าต้นในชุดควบคุม และพบว่าที่ EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้มีการสร้างช่อดอกในหลอดทดลอง โดยที่ EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์มีการสร้างช่อดอกมากที่สุด 40 เปอร์เซ็นต์ สำหรับโซมาติกเอ็มบริโอที่มีการหั่นและจุ่มแช่ในสารละลาย EMS 0.81 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตรารอดชีวิต 50% ชิ้นส่วนที่รอดชีวิตมีการพัฒนาเป็นแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอใหม่ โดยที่ EMS เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอร่วมกับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมากที่สุด คือ 77.78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเจริญเป็นต้นกล้ามีลักษณะทางสัณฐานที่ต่างจากต้นในชุดควบคุมคือ คือ มีการเจริญเติบโตของต้นที่ช้ากว่าต้นควบคุม มีลักษณะใบที่หนา หยิก มีสีเขียวเข้ม มีจำนวนใบที่มากและขนาดใหญ่กว่าต้นในชุดควบคุม และพบว่าต้นมีการสร้างช่อดอกในทุกความเข้มข้นของ EMS โดยที่ EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์มีการสร้างช่อดอกมากที่สุด คือ 50 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่เจริญจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ด้วยเทคนิค Simple sequence repeat (SSR) โดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่ คือ EgCIR0008, EgCIR0243, EgCIR0337, EgCIR0409, EgCIR0446,

EgCIR0465, EgCIR0781, EgCIR0905 และ EgCIR1772 พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ EgCIR0465 ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphism และให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 275 bp ระหว่างต้นกล้าปกติกับต้นกล้าที่มีการสร้างช่อดอกที่เจริญจากโซมาติกเอ็มบริโอ SE ทั้งที่หั่นและไม่หั่นและผ่านจุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับไพรเมอร์อื่นๆ ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในทุกตัวอย่าง สรุปได้ว่า EMS ที่ความเข้มข้นสูงส่งผลต่อการออกดอกของต้นกล้า และทำให้รูปแบบของดีเอ็นเปลี่ยนแปลงไปเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SSR

Thesis Title	Effect of Ethylmethanesulfonate (EMS) Treated with Somatic Embryo of Oil Palm on Genetic Variation of Development Seedlings
Author	Miss Chayanee Sangwan
Major Program	Plant Science
Academic Year	2014

ABSTRACT

Somatic embryos of oil palm were chopped into small pieces. They were cultured on oil palm culture medium (OPCM) supplemented with 0.1 mg/l dicamba and 200 mg/l ascorbic acid under 14 h photoperiod at 28 ± 2°C for 4 weeks. The result showed that chopped SE gave the numbers of somatic embryos (SEs) at 2.35 embryos/test tube. After that, both non chopped SEs and chopped SEs were used for induction of mutation by treatment with ethylmethanesulfonate (EMS). In case of non chopped SEs, 0-1 % EMS gave the higher survival rate of SE than 50%. Plantlets derived from treatment SE with EMS had slow growth with high number of leaves. In addition, plantlets derived from treatment SE with EMS at 0.75 and 1% produced flowers *in vitro*. EMS at 1% gave the highest *in vitro flowering* plantlet at 40%. In case of chopped SEs, EMS at concentration of 0.81% gave the decrement of survival rate to 50% (LD_{50}). Some SEs produced yellow embryogenic callus alone while some others produced both embryogenic callus and SEs. EMS at 0.75% gave the highest embryogenic callus together with SE formation at 77.78%. Plantlets derived from treatment SE with EMS had slow growth with high number of leaves. The leaves were thick and curl. In addition, all EMS treatment promoted the formation of flowers *in vitro*. EMS at 1% gave the highest *in vitro flowering* plantlet at 50%.

Analysis of genetic variation of plantlets derived from treating SE with EMS by 9 primers of simple sequence repeat (SSR) marker revealed that EgCIR0465 gave polymorphism of DNA and also gave specific band at 275 bp. This DNA indicated

in vitro flowering plantlet developed from SE after treatment with 1% EMS. The other primers gave monomorphism of DNA in all samples tested. In conclusion, the high concentration of EMS affected flowering of plantlet and caused a change in DNA pattern as proving by SSR.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่คอยอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ ความเข้าใจ และแนวทางในการปฏิบัติการด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ดร.สุภาวดี รามสูตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำต่างๆ รวมถึงการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องภายในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณพ่อสุเทพและคุณแม่ดุษฎี สังวาลย์ ญาติพี่น้องทุกท่าน ที่คอยอบรบสั่งสอนและเลี้ยงดูตลอดจนการให้ทุนการศึกษาและให้กำลังใจจนข้าพเจ้าได้เรียนจนถึงระดับปริญญาโท ขอขอบคุณนายเฉลิมลาภ ธรรมรัตน์ ที่คอยให้กำลังใจ เอาใจใส่ตลอดจนการให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือรวมทั้งช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน ระยะที่ 2 และสถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาในการทำวิจัย

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ให้ความรู้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ชาวพืชศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ร่วมทำกิจกรรมและให้การพึ่งพาอาศัยกันจนสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูกทุกท่านที่เป็นกำลังใจ และร่วมกันทำกิจกรรมต่างๆ สร้างความสุขด้วยกันตลอดมา ขอขอบคุณนางสาววราภรณ์ หีดฉิม ที่เป็นทั้งเพื่อนและผู้ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในทุกๆ ด้าน ทั้งในด้านงานวิจัยและการดำเนินชีวิต ตลอดจนทุกสิ่งทุกอย่างที่ดลบันดาลให้ข้าพเจ้าได้ทำงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ชญานีย์ สังวาลย์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(13)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(17)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	12
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	13
วัสดุ อุปกรณ์	13
วิธีการวิจัย	17
3 ผล	24
4 วิจารณ์	57
5 สรุป	65
เอกสารอ้างอิง	67
ภาคผนวก	76
ประวัติผู้เขียน	82

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของชิ้นส่วนพืชและการหั่นต่อการการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันหลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	25
2	ผลของสภาพการเพาะเลี้ยงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน หลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	25
3	ผลของการหั่นชิ้นส่วนพืชและความเข้มข้นของสารละลาย EMS ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	27
4	พัฒนาการของ SSE จำนวนยอด และจำนวนที่ผิดปกติ ที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์	29
5	พัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	32
6	พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์	34
7	จำนวนใบ ความกว้างของใบ และความสูงของต้นกล้าที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน	38

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	จำนวนใบ ความกว้างของใบ ความสูงของต้นที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน	40
9	จำนวนต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งหมด ต้นกล้าที่เกิดช่อดอก และเปอร์เซ็นต์การเกิดช่อดอกของต้นกล้าที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรแข็ง MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 5 เดือน	42
10	จำนวนต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งหมด ต้นกล้าที่เกิดช่อดอก และเปอร์เซ็นต์การเกิดช่อดอกของต้นกล้าที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรแข็ง MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 5 เดือน	44

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันจากการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์	13
2	ลักษณะของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นก่อนการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ	18
3	ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	26
4	อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและหั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 90 นาที หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	28
5	พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	30
6	ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอที่มีลักษณะผิดปกติ ที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	31
7	ลักะษณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอที่พัฒนาจากชิ้นส่วนโซมาติกอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ด้วยสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	33

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (SSE) ที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (ก) และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ข) บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	35
9	ลักษณะยอดที่เกิดจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	36
10	ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอที่มีลักษณะผิดปกติ ที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	37
11	การเจริญเติบโตของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน	39
12	การเจริญเติบโตของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่าน การจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน	41
13	ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่สร้างช่อดอกที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 5 เดือน	43
14	ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่สร้างช่อดอกที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 5 เดือน	45

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ ที่สกัดตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) ด้วยวิธีการทางคุณภาพเปรียบเทียบกับ λ DNA	47
16	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0465	48
17	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008	49
18	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0243	50
19	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0337	51
20	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0409	52

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0446	53
22	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0781	54
23	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0905	55
24	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR1772	56

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

bp	=	base pair
5-BU	=	5-Bromouracil
CRD	=	Completely randomized design
CTAB	=	Hexadecyltrimethylammonium bromide
2, 4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
dES	=	Diethylsulphate
dicamba	=	3, 6-dichloro-2-methoxybenzoic acid
DMRT	=	Duncan's multiple range test
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	Deoxynucleotide triphosphate
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMS	=	Ethylmethanesulfonate
HCl	=	Hydrochloric acid
HE	=	Haustorium embryo
LD_{50}	=	Lethal dose
LSD	=	Least significant difference
MS	=	Murashige and Skoog medium
Na_2EDTA	=	Disodium ethylenediaminetetraacetate
OPCM	=	Oil palm culture medium
PCR	=	Polymerase chain reaction
PVP-40	=	polyvinyl pyrrolidone-40
PGR	=	Plant growth regulator
RAPD	=	Randomly amplified polymorphic DNA
SE	=	Somatic embryo
SSE	=	Secondary somatic embryo
SSR	=	Simple sequence repeats
TAE	=	Tris-acetic acid-disodium ethylenediaminetetraacetic acid

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันประชากรของโลกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงทำให้ความต้องการเครื่องอุปโภคและบริโภคย่อมสูงขึ้นตามไปด้วย โดยเฉพาะผลผลิตด้านการเกษตรที่ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของประชากร การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อผลิตพืชให้ได้ปริมาณมากและมีคุณลักษณะดีตรงตามความต้องการจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรได้ ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) จัดเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เป็นพืชน้ำมันที่มีศักยภาพในการแข่งขันทางเศรษฐกิจสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆทั้งด้านการผลิตและการตลาด เนื่องจากเป็นพืชที่ให้ผลผลิตน้ำมันปริมาณมากเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ (Konan *et al*., 2006) เช่น ในปี พ.ศ. 2551 มีผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงกว่าถั่วเหลือง เรปซีด ทานตะวัน ฝ้าย และถั่วลิสงประมาณ 8.60 5.04 7.72 20.62 และ 18.23 เท่าตามลำดับ (ธีระ, 2554) นอกจากนี้น้ำมันปาล์มยังเป็นน้ำมันพืชที่สามารถนำมาแปรรูปเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลายทั้งในด้านอุปโภคและบริโภค เช่น เป็นน้ำมันปรุงอาหาร ผลิตเนยเทียม เนยขาว ไขมันทำขนมปัง สบู่ เทียนไข และผงซักฟอก เป็นต้น โดยเฉพาะในยุคน้ำมันแพง ยังสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตพลังงานทดแทนได้อีกด้วย การผลิตน้ำมันปาล์มจึงมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคที่สูงขึ้น (เปรมปรี, 2549) พิจารณาได้จากการเพิ่มขึ้นของปริมาณการผลิตและการบริโภค ซึ่งพบว่าปริมาณการผลิตน้ำมันปาล์มของโลกมีการเพิ่มขึ้นอย่างก้าวกระโดดในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา จากที่สามารถผลิตได้เฉลี่ย 1.26 ล้านตันระหว่างปี 2501-2505 เพิ่มขึ้นเป็น 17 ล้านตันระหว่างปี 2539-2543 จนสามารถผลิตได้ถึง 53 ล้านตันในปี 2555 เพิ่มขึ้นจากปี 2554 5.1 เปอร์เซ็นต์ โดยประเทศผู้ผลิตน้ำมันปาล์มรายใหญ่ของโลกคืออินโดนีเซียและมาเลเซีย ทั้งสองประเทศสามารถผลิตน้ำมันปาล์มได้กว่า 87 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการผลิตน้ำมันปาล์มโลก โดยปี 2555 อินโดนีเซียผลิตได้ 52 เปอร์เซ็นต์ของโลก มาเลเซียผลิตได้ร้อยละ 35 ขณะที่ไทยผลิตได้ร้อยละ 3.3 (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2556)

การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ดี ให้ผลผลิตทะลาย และผลผลิตน้ำมัน/หน่วยพื้นที่/หน่วยระยะเวลาสูง และสามารถปรับตัวเข้ากับ

สภาพแวดล้อมในแหล่งปลูกได้ดีจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพราะจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพและลดต้นทุนในการผลิตตลอดอายุการเก็บเกี่ยวของปาล์มน้ำมันได้ (ธีระ, 2554) ซึ่งปกติแล้วการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันจะทำการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีดั้งเดิม (Conventional breeding) ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานานหลายปี (ธีระ และคณะ, 2543) การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีเป็นการปรับปรุงพันธุ์วิธีหนึ่งที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็ว วิธีดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่แตกต่างไปจากเดิม สารเคมีที่ใช้ในการก่อกลายพันธุ์ เช่น EMS (Ethylmethane sulfonate), dES (Diethylsulphate) และ 5-BU (5-Bromouracil) แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช คือ EMS เพราะมีประสิทธิภาพสูงในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์และใช้ได้ผลดีกับพืชหลายชนิด (สิรนุช, 2540) อย่างไรก็ตามได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นวิธีที่จะสามารถขยายพันธุ์ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นมาใช้ร่วมกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ จะสามารถช่วยสร้างสายพันธุ์ใหม่ๆ ในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของสารเคมี EMS ผ่านโซมาติกเอ็มบริโอ (Somatic embryo; SE) ของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง เพื่อให้ได้ต้นปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะใหม่ๆ จากนั้นจึงตรวจสอบผลของการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เพื่อช่วยยืนยันว่าต้นที่ได้นั้นมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากลักษณะเดิม

การตรวจเอกสาร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ กระบวนการตัดแยกชิ้นส่วนพืชมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ภายในห้องที่มีการควบคุมแสง อุณหภูมิ และความชื้นที่เหมาะสม เพื่อให้ชิ้นส่วนพืชมีการพัฒนาต่อไป (สมปอง, 2539) การขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีนี้ สามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้เป็นจำนวนมาก และใช้ระยะเวลาสั้น ปัจจุบันสามารถเพาะเลี้ยงส่วนของคัพภะและใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน ซึ่งสามารถสร้างยอดใหม่ได้จำนวนมาก และยังสามารถใช้แคลลัสเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ได้

Kanchanapoom และDamyaos (1999) ตัดแยกคัพภะปาล์มน้ำมันมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 (Eeuwens) เติม 2,4-D (2,4-dichorophenoxy-acetic acid) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวสามารถชักนำแคลลัสได้ภายใน 8 สัปดาห์ หลังจากเพาะเลี้ยง และชักนำเอ็มบริออยด์ (embryoid) บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5

มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่พบการเจริญเป็นต้นอ่อน Te-chato (1998b) รายงานการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปกติจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันจากต้นเทเนอราผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่ำ ทั้งในระยะชักนำแคลลัส พัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ การชักนำการงอกยอด และต้นกล้าที่ปกติ โดยทั่วไปกระบวนการสร้างพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 2 กระบวนการ คือ เอ็มบริโอเจนีซีส และออร์แกโนเจนีซีส ซึ่งพืชต้นใหม่ที่เกิดขึ้นอาจเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงหรือเกิดจากแคลลัส กระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสทำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่โดยการพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ เหมือนกับเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมพันธุ์ด้วยวิธีปกติ เรียกเอ็มบริโอที่มีพัฒนาการมาจากเซลล์ร่างกายว่าโซมาติกเอ็มบริโอ หรือเอ็มบริออยด์

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการใช้โซมาติกเอ็มบริโอ

การขยายพันธุ์ด้วย SE เป็นการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศที่มีความสำคัญในพืชหลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีตามปกติที่ทำได้ยาก เช่น ปาล์มน้ำมัน (Hilae and Te-chato, 2005) มะพร้าว (Chan *et al*., 1998) และอินทผลัม (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2001) เป็นต้น ซึ่งระยะการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 4 ระยะ คือ เอ็มบริโอระยะรูปกลม รูปหัวใจ รูปทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง (สมปอง, 2539) โดยโซมาติกเอ็มบริโอจะพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้นั้นสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือต้องอาศัยปัจจัยต่าง ๆ ในการงอกและพัฒนา เช่น อุณหภูมิ แสง ภาชนะเพาะเลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นต้น ธนวดี (2551) ได้ชักนำ SE โดยการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลัสของปาล์มน้ำมันมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแวดล้อม 2 สภาพ คือ มืดและสว่างที่อุณหภูมิ 26 ± 4 องศาเซลเซียส (ห้องวางเลี้ยง) และอุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส (ตู้ควบคุมอุณหภูมิ) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การวางเลี้ยงในสภาพให้แสงที่อุณหภูมิ 26 ± 4 องศาเซลเซียส ชักนำการเกิด SE รวมสูงสุด เฉลี่ย 23.28 เอ็มบริโอ Te-chato (1998a) ได้เพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร MS ที่เติมเคซีนไฮโดรไลเซส เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบสารควบคุมการเจริญเติบโตสองชนิด คือ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการให้แสงที่ความเข้มแสงต่างๆ คือ 2,500 4,500 และ 6,000 ลักซ์ พบว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภายใต้การให้แสงที่ความเข้มแสง 6,000 ลักซ์ ส่งเสริมให้มีการเปลี่ยนแปลงของ SE เป็นเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (ใบเลี้ยง) (Haustorium embryo: HE) ได้ 48.15 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ 2,4-D และความเข้มแสงอื่นๆ Te-chato (2002) ชักนำ SE ปาล์มน้ำมันโดยเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตสองชนิด คือ 2,4-D หรือ dicamba ที่ความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้การให้แสงความเข้ม 2,500 ลักซ์เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าการใช้ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมแคลลัสเริ่มต้นให้พัฒนาเป็นแคลลัสที่เจริญรวดเร็ว 61.11 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน ผลดังกล่าวทำให้ร่นระยะเวลาในการชักนำเป็นต้นได้ในเวลา 8-10 เดือน เมื่อชักนำการงอกของ SE และอนุบาลต้นกล้าลงดินปลูกไม่พบการผิดปกติของต้นกล้า Balzom และคณะ (2013) นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติมไฟตาเจล 2.5 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ picloram หรือ 2,4-D เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ พบว่าการใช้ 2,4-D ส่งเสริมให้เกิด SE สูงสุด 18 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน จากนั้นย้ายลงสูตรอาหารชักนำต้น ซึ่งสามารถเกิดการพัฒนาเจริญเป็นต้นกล้าต่อไปได้

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่สามารถกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชมีการสร้าง และพัฒนาเป็น SE ได้ เช่น การสร้างบาดแผลให้กับชิ้นส่วนพืช โดยรังสฤษดิ์ (2540) รายงานว่า การสร้างบาดแผลเป็นการเพิ่มช่องทางในการดูดอาหารของชิ้นส่วนพืช ชิ้นส่วนพืชจะสามารถดูดซับน้ำ และอาหารได้โดยตรงผ่านทางบาดแผลมากยิ่งขึ้น และยังเป็นการกระตุ้นการพัฒนาส่วนต่างๆ เช่น การศึกษาของ Othmani และคณะ (2009) พบว่าการสร้างบาดแผลให้กับแคลลัสของอินทผาลัมด้วยใบมีดโกน แล้ววางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด 3.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้สร้างบาดแผล และยังสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุดเฉลี่ย 51 เอ็มบริโอ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 55 วัน Fki และคณะ (2003) ทำการหั่นแคลลัสของอินทผาลัม และเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้เป็นจำนวนมาก

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการก่อกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต อาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสิ่งมีชีวิตที่เป็นลักษณะใหม่ๆ แตกต่างจาก

ลักษณะเดิม ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต มีประโยชน์ในการช่วยเพิ่มความแปรปรวนในพืช ซึ่งเป็นการเพิ่มความสำเร็จในการคัดเลือกพืชให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการ (นพพร, 2543) การกลายพันธุ์มี 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. **การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ** เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ มีความถี่ในการเกิดต่ำ สาเหตุของการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ เกิดขึ้นเองโดยไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน (สิรนุช, 2540) ซึ่งอาจเกิดจากองค์ประกอบทางกรรมพันธุ์ในพืช สภาพทางสรีระของพืช อาหาร อุณหภูมิ รังสีในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ หรือสิ่งก่อกลายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ โดยที่มนุษย์ไม่ได้ชักนำให้เกิดขึ้น

2. **การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ** การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยในการปรับปรุงผลผลิต ทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณให้ได้ลักษณะใหม่ๆ หรือลักษณะตามที่ต้องการ (Muthusamy and Jayabalan, 2011) วิธีการดังกล่าวสามารถทำได้ด้วยกระบวนการทางกายภาพและทางเคมี ซึ่งในทางกายภาพได้แก่การใช้รังสีชนิดต่างๆ เช่น รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา อนุภาคนิวตรอน และรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นต้น ส่วนในทางเคมี ได้แก่ การใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ สารเคมีที่ทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์มีอยู่หลายชนิด แต่ละชนิดจะให้ผลแตกต่างกันออกไป ซึ่งสารเคมีที่นิยมใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ได้แก่ EMS dES และ 5-BU เป็นต้น แต่ที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชมากที่สุดคือ EMS (Naik *et al*., 2012)

การชักนำการกลายพันธุ์ด้วย EMS

EMS จัดเป็นสารเคมีอยู่ในกลุ่ม alkylating agent นิยมใช้มากที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช เพราะมีประสิทธิภาพสูงในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ใช้ได้ผลดีกับพืชหลายชนิด (สิรนุช, 2540) โดยคุณสมบัติของสารมีดังนี้

สูตรทางเคมี	$CH_3SO_2OC_2H_5$ เป็นของเหลวใส ไม่มีสี
มวลโมเลกุล	124
ความหนาแน่น	1.203 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	85-86 องศาเซลเซียส ที่ 10 มิลลิเมตรปรอท
การละลายน้ำ	ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์

EMS ประกอบด้วยหมู่เอทิล (C_2H_5: ethyl group) 1 หมู่ จะถูกถ่ายให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอในปฏิกริยาแอลคิเลชัน (alkylation) สามารถเข้าทำปฏิกริยากับเบสเพียวรินและไพริ-มิดิน รวมทั้งหมู่ของฟอสเฟตของดีเอ็นเอ โดยปฏิกริยาแอลคิเลชันจะเกิดมากที่สุดในตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนิน (G) ภายหลังทำปฏิกิริยาแล้วกลายเป็น 7-เอทิลกัวนิน (7-ethylguanine) หรือที่เรียกว่า แอลคิเลเตตกัวนิน (alkylated guanine) (IAEA, 1977) วิธีการที่สาร EMS ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งรายงานโดย IAEA (1977) มีดังต่อไปนี้ เช่น ทำให้เกิดการเข้าแทนที่คู่เบส โดยการที่มีหมู่เอทิลมาอยู่ในโมเลกุลของ guanine ทำให้คุณสมบัติในการเกิด ionization ที่แตกต่างไปจากปกติ จึงเกิดการจับคู่เบสที่ผิดปกติไปจากเดิมได้ เช่น กรณีที่ 7-ethyguanine สามารถจับคู่กับเบส thymine (T) ซึ่งจะนำไปสู่การกลายพันธุ์ชนิด transition สาร EMS ยังทำให้เกิดการหลุดหายไปของเบสเพียวรีนจากสายดีเอ็นเอ เพราะการที่มีหมู่เอทิลเข้าไปจับอยู่ในตำแหน่งต่างๆ ในเบสเพียวรีน ทำให้เกิดการตัดขาดของพันธะที่เชื่อมระว่างน้ำตาลกับเบส จึงเกิดการหลุดออกไปของเบสเพียวรีนและเกิดช่องว่างขึ้น ต่อมาเมื่อเซลล์มีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเออาจจะเกิดความผิดพลาดได้ที่เบสที่แตกต่างไปจากเดิม ซึ่งนำไปสู่การกลายพันธุ์แบบ transition และ transversion ได้ และนอกจากนี้การตัดขาดของหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาล อาจทำให้เกิดการขาดจากกันของดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่ ซึ่งนำไปสู่การหลุดหายไปของส่วนดีเอ็นเอและเกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด

สาร EMS สามารถก่อกลายพันธุ์ได้ดีกับพืชหลายชนิด ทั้งสภาพในหลอดทดลองและนอกหลอดทดลอง โดยความถี่ของการกลายพันธุ์ที่ถูกชักนำด้วยการใช้สาร EMS มีค่าสูงกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติหลายเท่า (Sung, 1976) สายพันธุ์กลายที่ได้สามารถถ่ายทอดลักษณะการกลายพันธุ์ต่อได้อีกหลายรุ่น (Osorio *et al*., 1995) โดยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สาร EMS เพื่อชักนำให้พืชเกิดการกลายพันธุ์ เช่น Kumar และคณะ (2010) ได้นำแคลลัสของลัฟเลมอนมาทรีต EMS เข้มข้น 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ EMS เพิ่มขึ้น อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลง โดยที่ความเข้มข้นของ EMS 0.4 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้แคลลัสตายทั้งหมด และยังพบว่ามีเพียงแคลลัสกลุ่มควบคุมและแคลลัสที่ผ่านการทรีต EMS 0.1เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นที่สามารถพัฒนาต่อไปได้ คิดเป็น 9 และ 5.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Hohmann และคณะ (2005) ศึกษาโดยการใช้เมล็ดของ sugar beet จุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 6 8 12 และ 14 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 8 ชั่วโมง มีอัตราการงอกของต้นกล้า 88 เปอร์เซ็นต์ โดยต้นกล้าที่ได้จะมีลักษณะที่ผิดปกติ คือจะแสดงอาการใบเหลืองหรือใบด่างบางส่วน และเมื่อนำ

ต้นในรุ่น M_1 มาผสมตัวเอง พบว่าเมล็ดในรุ่น M_2 มีอัตราการงอกของต้นกล้า 69.6 เปอร์เซ็นต์ Venkataiah และคณะ (2005) ได้นำเมล็ดพริกจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาต่างๆ แล้วจึงนำเมล็ดที่ได้รับสาร EMS มาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติม atrazine 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าต้นกล้ามีลักษณะปกติ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และพบต้นอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติ คือ มีสีซีด 84 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะยอดเผือก 9.5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำต้นอ่อนที่มีลักษณะปกติและต้านทานต่อสาร atrazine ลงปลูกในแปลง พบว่าสามารถเจริญได้ตามปกติ Qin และคณะ (2011) ทำการศึกษาโดยใช้คัพภะของ loquat จุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.1- 0.9 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0.5 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ นาน 0.5 ชั่วโมง คัพภะมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 48.8 เปอร์เซ็นต์ และสามารถสร้างเอ็มบริโอใหม่ได้สูงสุด 46.2 เปอร์เซ็นต์ Dhakshanamoorthy (2010) ได้ชักนำการกลายพันธุ์ของสบู่ดำ โดยการนำเมล็ดมาจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าต้นที่เจริญจากเมล็ดที่ผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีการผลิตจำนวนช่อผลต่อต้นและจำนวนผลต่อช่อสูงที่สุด 14.66 ช่อและ 11.00 ผล ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าต้นที่เจริญจากเมล็ดที่ไม่ผ่านการจุ่มแช่สาร EMS อริยาภรณ์และธีระพงษ์ (2554) ได้ทำการคัดเลือกพันธุ์สบู่ดำเพื่อเพิ่มผลผลิตโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS พบว่าสบู่ดำต้นกลายที่ได้จากการแช่สาร EMS มีลักษณะน้ำหนักผลต่อต้น น้ำหนักเมล็ดต่อต้น น้ำหนัก 100 เมล็ด เปอร์เซ็นต์การกะเทาะเมล็ด ผลผลิตต่อต้น ปริมาณไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต เถ้า และเยื่อใย ที่หลากหลาย และสามารถคัดเลือกต้นกลายได้จำนวน 9 ต้น โดยต้นกลายที่คัดไว้มีปริมาณไขมันอยู่ในช่วง 33.77 – 37.54 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเมล็ดต่อต้นอยู่ในช่วง 162 – 368 กรัม และน้ำหนัก 100 เมล็ดต่อต้นอยู่ในช่วง 58.62 – 107.14 กรัม ซึ่งมีค่าสูงกว่าพันธุ์ควบคุม (พันธุ์ศรีสะเกษและพันธุ์พื้นเมือง) Vagera และคณะ (2004) ศึกษาการกลายพันธุ์ในข้าวบาร์เลย์ โดยใช้ EMS พบว่า ต้นข้าวบาร์เลย์ที่พัฒนาจากเมล็ดที่จุ่มแช่สารละลาย EMS ทุกความเข้มข้น (10-20 มิลลิโมลาร์) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถชักนำให้ต้นเกิดการกลายพันธุ์ของคลอโรฟิลล์ Luan และคณะ (2007) ได้ชักนำการกลายพันธุ์ในแคลลัสของมันเทศเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถต้านทานต่อความเค็ม โดยใช้ EMS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 0 1 1.5 2 2.5 และ 3 ชั่วโมง พบว่าแคลลัสที่จุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 และ 2.5 ชั่วโมง สามารถเจริญและพัฒนาต่อได้ในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปวีณา (2541) ศึกษาความแปรปรวนของการผลิตน้ำมัน และกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟี พบว่าแคลลัสจากใบเลี้ยงที่

ได้รับสาร EMS มีปริมาณน้ำมันสูงกว่าแคลลัสที่ไม่ได้รับสาร EMS และไม่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดไขมันหลัก

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ในพืช

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของพืชที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สาร EMS สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะทางสัณฐาน และตรวจสอบโดยการใช้เทคนิคทางโมเลกุล

1. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน

ความแปรปรวนจากการกลายพันธุ์ สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะทางสัณฐาน ซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถตรวจสอบได้ง่ายจากการสังเกตลักษณะที่เกิดขึ้นภายนอก มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านยีนบนโครโมโซมภายหลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งลักษณะที่ปรากฏเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงข้อมูลที่เป็นองค์ประกอบทางจีโนไทป์ และสิ่งแวดล้อมส่งผลให้แสดงลักษณะนั้นๆ ออกมา เช่น ลักษณะของการเจริญเติบโตทางลำต้น ใบ ดอก การขาดคลอโรฟิลล์ และลักษณะของผลหรือเมล็ด เป็นต้น (ธัญญาพร, 2548) ตัวอย่างการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานภายหลังการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS เช่น ปวีณา (2541) ได้ศึกษาความแปรปรวนของคำฝอยที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS ในช่วงความเข้มข้น 0.2-1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าต้นคำฝอยที่พัฒนาจากแคลลัสที่ผ่านการจุ่มแช่สาร EMS มีลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างจากต้นปกติ คือ ปริมาณยอดเพิ่มขึ้น มีลักษณะการยืดยาวของลำต้น การอวบน้ำของใบ รูปร่างใบ ความยาวหนามที่ใบ แตกต่างจากที่ไม่ผ่านการจุ่มแช่สาร EMS Bidabadi และคณะ (2012) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของยอดกล้วยที่ผ่านการจุ่มแช่สาร EMS พบว่ายอดที่ผ่านการจุ่มแช่สาร EMS มีสีของใบที่เปลี่ยนไป มีระยะห่างของใบที่สั้นลง ใบแคระเกร็นและชิ้นส่วนมีอาการฉ่ำน้ำ โดยชิ้นส่วนที่มีเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติมากที่สุด คือชิ้นส่วนที่ผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที Berenschot และคณะ (2008) ศึกษาลักษณะของต้นพิทูเนียที่ผ่านการทรีตด้วยสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารละลาย EMS สูงขึ้นส่งผลให้ต้นกล้ามีความสูงลดลง ใบเรียวและแคบลง ลายเส้นของใบซับซ้อนมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการทรีตด้วยสารละลาย EMS Ansari และคณะ (2012) ศึกษาลักษณะของต้นข้าวสาลี (*Triticum monococcum* L.) พบว่าต้นข้าวสาลีที่ผ่านการชักนำการ

กลายพันธุ์โดยใช้ EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีลักษณะของใบ กอ และรากที่เปราะบาง มีความสูงของลำต้น และจำนวนกอน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการทรีตด้วย EMS ยุพาภรณ์และสมปอง (2551) พบว่าลักษณะของต้นกล๊อกซิเนียที่จุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที มีลำต้นแคระแกร็น ใบหนา สีเขียวเข้ม และพบว่าดอกกล๊อกซิเนียมีลักษณะที่แตกต่างไปจากเดิม เช่น ดอกกล๊อกซิเนียที่ได้จากการทรีตด้วย EMS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สีดอกอ่อนลงและกลีบดอกมีขอบสีขาว ที่ความเข้มข้นของ EMS 0.75 เปอร์เซ็นต์ ให้สีของดอกเข้มขึ้น และกลีบดอกมี 2 ชั้น จากดอกปกติซึ่งกลีบดอกมี 3-4 ชั้น Singh และคณะ (2000) ศึกษาสีของดอกคาร์เนชั่น ที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้ EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งเติมในอาหารแข็งและในอาหารเหลวในสภาพเขย่าเลี้ยง 3 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้น 0.025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารแข็ง และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวสามารถชักนำให้เกิดยอดและดอกมากที่สุด โดยยอดมีลักษณะสีขาวสลับแดง และสีชมพูสลับขาว

ลักษณะทางสัณฐานที่ปรากฏออกมานอกจากเป็นผลของจีโนไทป์ บางลักษณะที่แสดงออกมาอาจเป็นผลร่วมกันระหว่างจีโนไทป์กับสภาพแวดล้อมด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าพืชบางพันธุ์มีลักษณะต่างๆใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยสายตา บางลักษณะอาจต้องรอระยะออกดอกหรือติดผลจึงสามารถตรวจสอบได้ (จรัสศรี, 2548) ดังนั้นจึงมีการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยวิธีการอื่นควบคู่ไปด้วยเพื่อเป็นการยืนยัน และร่นระยะเวลาการตรวจสอบความแปรผันให้สั้นลง

2. **การตรวจสอบความแปรปรวนโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล**

ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นทำได้โดยการสังเกตจากลักษณะภายนอกหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งลักษณะที่ปรากฏออกมานั้นมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (Powell *et al*., 1996) อีกทั้งพืชบางชนิดมีลักษณะต่างๆ ใกล้เคียงกันมาก จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างถูกต้องและแม่นยำด้วยสายตาได้ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช หรืออาจใช้เพื่อจำแนกและตรวจสอบพันธุ์พืช ซึ่งถือเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพสูง สามารถบอกถึงลักษณะหรือเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความเฉพาะเจาะจงที่นำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ (สุรีพร, 2546) อีกทั้งเป็นวิธีที่สามารถลดอิทธิพลที่เกิดมาจากสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย (ธีระ, 2554)

ชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลแบ่งออกเป็น 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบระดับโปรตีน เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานานได้ และดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในทุกเซลล์ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ทุกระยะเวลาการเจริญเติบโตของพืช โดยไม่ถูกควบคุมการแสดงออกโดยสภาพแวดล้อม (พรพันธ์ และศุกระกาญจน์ , 2553)

เครื่องหมายโมเลกุลในระดับดีเอ็นเออาจทำได้หลายวิธี เช่น วิธีอาร์เอฟแอลพี อาร์เอพีดี เอเอฟแอลพี และไมโครแซทเทลไลท์ หรือเอสเอสอาร์ เป็นต้น ในปาล์มน้ำมันนั้นมีรายงานว่าเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์ หรือ เอสเอสอาร์ (Simple sequence repeat: SSR) เป็นเทคนิคที่ให้ผลดี โดยสามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมและตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้ (Thawaro and Te-chato, 2010)

2.1 **เครื่องหมายเอสเอสอาร์**

SSR เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำกัน (repetitive DNA) เรียงต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ในโลกัสหนึ่งๆ โดยทั่วไปไมโครแซทเทลไลท์ประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) ตั้งแต่ 1-6 เบส ตัวอย่างเช่น เบสซ้ำหนึ่งเบส เรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น (A)n เบสซ้ำสองเบส เรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น (CA)n เบสซ้ำสามเบส เรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น (TAA)n และเบสซ้ำสี่เบส เรียกว่า tetra-nucleotide repeat เช่น (GATA)n โดยที่ n เป็นจำนวนครั้งของเบสซ้ำ ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์นี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม (Powell *et al.,* 1996) แต่การกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ บางบริเวณพบมาก บางบริเวณก็พบน้อย ตามแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต SSR เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction: PCR) เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่มีในไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่งเดียวกันในตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างที่ไม่เท่ากัน จะตรวจสอบได้ทันทีเมื่อนำมาแยกขนาดโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis จากคุณสมบัติที่จำนวนเบสซ้ำที่ไม่เท่ากันนั้นสามารถบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ (Ince *et al*., 2009) อีกทั้งเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ คือ สามารถแยกความแตกต่างแบบข่มร่วม (co-dominant) ได้ ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นพันธุ์แท้และพันธุ์ทางได้ สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้โดยใช้เทคนิค PCR

ต้องการดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยจะพบภายในยีนหรือระหว่างยีน โดยไพรเมอร์ (primer) ที่สร้างขึ้นมานั้นจะมีความจำเพาะเจาะจง สำหรับพืชหนึ่งๆ (ขวัญใจ และคณะ, 2552) จึงทำให้มีผู้นิยมใช้ในการคัดเลือกและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสายพันธุ์พืชอย่างแพร่หลาย และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ อีกมากมาย เช่น ยุวดี และศุจิรัตน์ (2553) ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของกวาวเครือขาว พบว่ามีขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 280 bp ถึง 1,550 bp ในจำนวนนี้มีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic band) จำนวน 293 ตำแหน่ง คิดเป็น 82.54% ของทั้งหมด และเป็นตำแหน่งที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic) จำนวน 62 ตำแหน่ง คิดเป็น 17.46% Malik และคณะ (2011) ใช้เครื่องหมาย SSR ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเมลอน (*Cucumis melo* L.) ที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสม โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 23 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ CMGA172 สามารถแยกความแตกต่างออกจากพ่อแม่ได้ Osorio และคณะ (2012) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) ด้วยเครื่องหมาย SSR พบว่า ไม่มีความแปรปรวนของต้นที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอในระยะที่แตกต่างกัน Manoj และคณะ (2012) ตรวจสอบความสม่ำเสมอทางพันธุกรรมของฝรั่งด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ พบว่า ต้นที่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองไม่มีความแตกต่างกับต้นแม่พันธุ์ Thawaro และ Te-chato (2010) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันลูกผสมด้วยเครื่องหมาย SSR พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR0008 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างลูกผสมกับพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังบอกความตรงตามพันธุ์ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง คัพภะ กนกพร และคณะ (2553) ทำการทดสอบหาไพรเมอร์ที่สามารถแสดงความเชื่อมโยงกับการตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าวสายพันธุ์กลาย 20-200-4 เพื่อติดตามการถ่ายทอดลักษณะการกลาย โดยใช้เครื่องหมาย SSR พบว่าไพรเมอร์ RM 410 สามารถตรวจสอบการกลายในข้าว 20-200-4 ที่เปลี่ยนแปลงในการตอบสนองต่อช่วงแสง โดยสามารถแยกลักษณะการออกดอกเร็วหรือช้าได้ สกุลรัตน์ (2553) ทำการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันทุกระยะคือ แคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าไม่มีความแปรปรวนจากกระบวนการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของทั้ง 3 ระยะ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน
2. เพื่อศึกษาผลของสาร EMS ต่อความมีชีวิตและพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน
3. เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการทรีตโซมาติกเอ็มบริโอในสารละลาย EMS โดยใช้เครื่องหมาย SSR

บทที่ 2

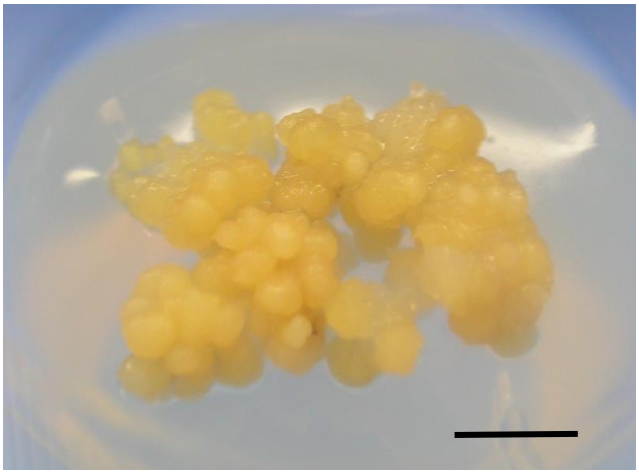
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ และอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (ภาพที่ 1) ที่ชักนำจากคัพภะแก่ของปาล์มน้ำมันลูกผสมเบอร์ 77 ที่เกิดจากการผสมระหว่างดูรา (366) กับฟิสิเฟอรา (172) จากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ดูแลแคลลัสและเพิ่มปริมาณโดยย้ายเลี้ยงทุก เดือนบนอาหารแข็งสูตรเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมัน (Oil palm culture medium: OPCM) เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นเวลา 3 เดือน จะได้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษาผลของ EMS ต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมต่อไป



ภาพที่ 1 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันจากการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์ 5 มิลลิเมตร)

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการชักนำการกลายพันธุ์

- EMS (Ethylmethane sulfonate) (Sigma, India)

1.2.2 สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS และ OPCM (รายละเอียดแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1)
- น้ำตาลซูโครส และซอร์บิทอล
- สารควบคุมการเจริญเติบโต คือ dicamba
- กรดแอสคอร์บิค
- วุ้น

1.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide)
- β-mercaptoethanol
- PVP-40 (polyvinyl pyrrolidone)
- NaCl (sodium chloride)
- Na_2EDTA (disodium ethylene diaminetetraacetate)
- Tris-HCl pH 8.0
- Chloroform
- Isopropanol
- Ethanol
- Liquid nitrogen

1.2.4 สารเคมีสำหรับใช้ทำอิเลคโทรโฟรีซีส

Agarose gel electrophoresis

- LE agarose (FMC Bioproduct, USA)
- Seakem agarose
- Glacial acetic acid
- Boric acid
- Tris-base
- Ethidium bromide
- Loading buffer
- Lamda DNA (λ DNA)
- 100 bp DNA Ladder (Operon, USA)

Denaturing polyacrylamine gel electrophoresis

- Acrylamide [bis-acrylamide solution (29:1)]
- Bind silane
- Repel silane
- Formamind
- Formaldehyde
- Urea
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethyethyenediamine)
- Ammonium persulfate
- Sodium thiosulfate
- Sodium carbonate
- Silver nitrate

1.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

- dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- Primer EgCIR0008, EgCIR0243, EgCIR0337, EgCIR0409, EgCIR0446, EgCIR0465, EgCIR0781, EgCIR0905 และ EgCIR1772
- $MgCl_2$
- 10X *Taq* buffer (Promega, USA)
- *Taq* DNA Polymerase (Promega, USA)

1.3 อุปกรณ์

1.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารและย้ายเลี้ยง

- เครื่องแก้วประกอบด้วย ฟลาสก์ ปิเปต กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร จานเพาะเลี้ยง ขวดเพาะเลี้ยงและหลอดทดลอง
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ประกอบด้วยปากคีบ ด้ามมีด ใบมีดผ่าตัด กระดาษชำระ พาราฟิล์ม และตู้ย้ายเลี้ยง
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (SANYO LABO AUTOCLAVE, MLS-3750)
- ตู้อบแห้ง และอบฆ่าเชื้อ (Binder, redLINE)
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (METTLER, PN1210)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (METTLER-TOLEDO (Thailand), AB204)
- เครื่องวัด pH (EUTECH INSTRUMENTS, Cyberscan)
- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง –20 องศาเซลเซียส
- เครื่องกรองมิลลิพอร์ กระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาดช่อง 0.45 ไมโครเมตร
- เครื่องคนสารละลาย

1.3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การทำอิเล็คโทรโฟรีซีส และการทำเอสเอสอาร์

- เครื่องไมโครเซ็นตริฟิวก์

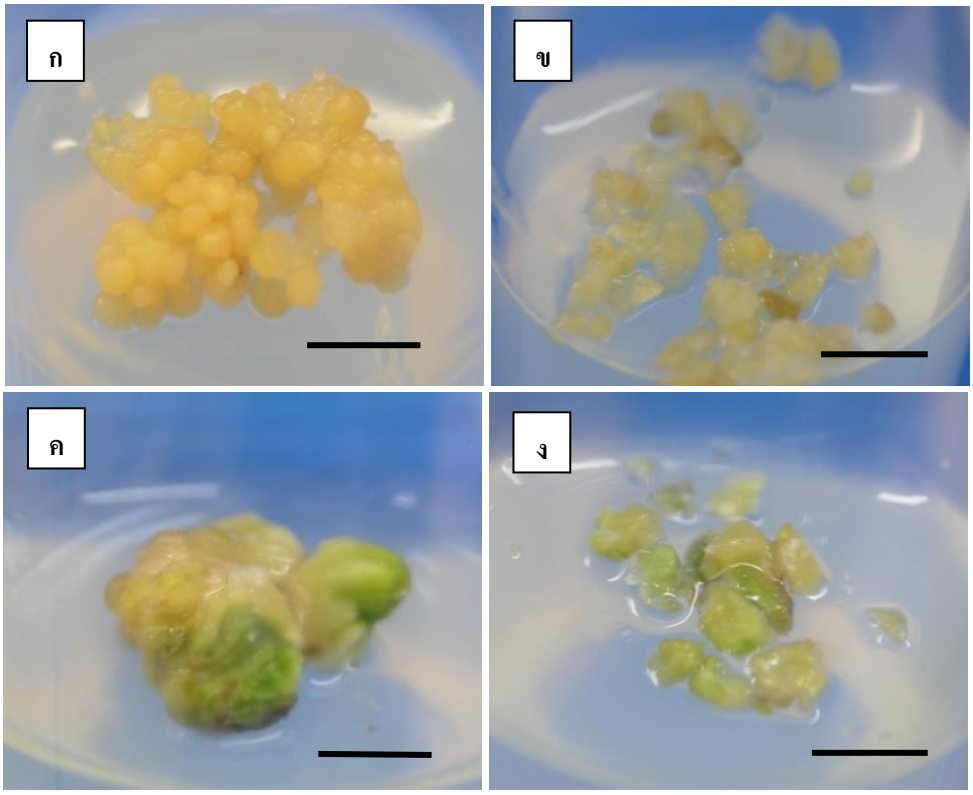
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องอิเล็คโทรโฟรีซีส (COSMO Bio, MyRun)
- เครื่องพีซีอาร์ (Lio Lab Internation, XP cycler)
- โกร่งบดตัวอย่าง
- หลอดไมโครเซนตริฟิวก์
- เครื่องถ่ายภาพเจล (Delta Laboratory, VILBER LOURMAT)
- micropipette และ tip
- กระติกน้ำแข็ง
- vortex mixture

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

1.1 การศึกษาผลของชิ้นส่วนพืชและการหั่นต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอที่มีลักษณะปกติและที่มีการหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2 ก-ง) มาวางเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด บันทึกจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอต่อหลอด หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันโดยใช้การแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลใน CRD (Completely randomized design) มี 2 ปัจจัย คือ ชนิดของชิ้นส่วนพืช มี 2 ระดับ คือ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ และสภาพของชิ้นส่วนพืช มี 2 ระดับ คือ ชิ้นส่วนที่ไม่มีการหั่นและหั่น เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD (Least significant difference)



ภาพที่ 2 ลักษณะของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นก่อนการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ (บาร์ 5 มิลลิเมตร)

ก. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ไม่มีการหั่น

ข. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีการหั่น

ค. โซมาติกเอ็มบริโอไม่ที่มีการหั่น

ง. โซมาติกเอ็มบริโอที่มีการหั่น

1.2 การศึกษาผลของสภาพแสงที่มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการทดลองที่ 1.1 ขนาด 1 เซนติเมตร มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1-2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2ง) แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งสภาพวางเลี้ยงออกเป็น 2 สภาพ คือ ให้แสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส และสภาพมืดเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิเดียวกัน หลังจากนั้นจึงนำมาเลี้ยงในสภาพแสงปกติ ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ

ละ 5 หลอด หลอดละ 5 ชิ้น บันทึกจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอต่อหลอด หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test)

2. การศึกษาผลของ EMS ต่อการตอบสนองของโซมาติกเอ็มบริโอ

2.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นสารละลาย EMS ต่ออัตราการรอดชีวิตของโซมาติกเอ็มบริโอ

นำโซมาติกเอ็มบริโอขนาด 1 เซนติเมตร ที่มีลักษณะเป็นชิ้นปกติ (ภาพที่ 2ค) และมีการหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ (ภาพที่ 2ง) ใส่ฟลาสค์ซึ่งบรรจุสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ปิดผนึกด้วยอะลูมินัมฟอยล์นำไปวางบนเครื่องเขย่า เขย่าที่ความเร็ว 40-50 รอบต่อนาที ในที่มืดเป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว แยกชิ้นส่วนพืชออกจากสารละลาย EMS ล้างในอาหารเหลวสูตร OPCM 3 ครั้ง แล้วจึงซับด้วยกระดาษชำระที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนแห้ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร OPCM ที่เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิข้างต้น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการจุ่มแช่ร่วมกับสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกันและหาความเข้มข้นของสาร EMS ที่ยับยั้งการรอดชีวิตได้ 50% (LD_{50}) ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 5 หลอด โดยใช้แผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลใน CRD มี 2 ปัจจัย คือ สภาพของชิ้นส่วนพืช มี 2 ระดับ คือ ชิ้นส่วนที่ไม่มีการหั่นและหั่นก่อนการจุ่มแช่สาร EMS และความเข้มข้นของสารละลาย EMS มี 5 ระดับ คือ 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.2 การศึกษาผลของสาร EMS ต่อการเจริญและพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

2.2.1 โซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้นที่ไม่หั่นแล้วจุ่มแช่สาร EMS

หลังจากศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนของชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอของการทดลอง 2.1 แล้ว แยกชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่รอดชีวิตมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 12 สัปดาห์ เพื่อชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (Secondary somatic embryos: SSEs) บันทึกจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ จำนวนยอด และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่ผิดปกติเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ EMS โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.2.2 โซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้นที่หั่นแล้วจุ่มแช่สาร EMS

สำหรับชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ที่รอดชีวิต นำมาเพาะเลี้ยงต่อไปในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ EMS จากนั้นทำการแยก HE มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำการสร้าง SSE และส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป บันทึกจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ จำนวนยอด และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่ผิดปกติเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้น โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. การศึกษาผลของสาร EMS ต่อลักษณะทางสัณฐานของต้นกล้าในหลอดทดลอง

เมื่อชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอมีการพัฒนาสร้างยอดขึ้นมาแล้ว จากนั้นย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 2 เดือน ตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าในแต่ละความเข้มข้นของ EMS เปรียบเทียบกัน โดยนำมานับจำนวนใบ วัดความกว้างของใบ ความสูงของต้นกล้า ทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมทุกๆ เดือนต่อเป็นเวลา 5 เดือน ตรวจสอบจำนวนต้นกล้าที่เกิดช่อดอก บันทึกลักษณะต่างๆ ในแต่ละสิ่ง

ทดลองเปรียบเทียบกัน โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้วิธี DMRT

4. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าโดยใช้เครื่องหมาย SSR

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตัวอย่างจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการจุ่มแช่โซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและไม่หั่นในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งต้นที่มีลักษณะปกติและมีการสร้างช่อดอกในหลอดทดลอง ตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) ดัดแปลง โดยเติมโพลีไวนิลไพโรลิโดน 40 (PVP-40) 10 มิลลิกรัม ผสมกับตัวอย่างใบอ่อน 200 มิลลิกรัม บดในไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งแช่เย็น เติมบัฟเฟอร์ CTAB ร่วมกับ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร (ก่อนใช้บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) ในโกร่งให้ละเอียด ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 800 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ได้สารละลายที่แยกชั้นใสส่วนบน ดูดสารละลายเฉพาะส่วนใสใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ใหม่ หลังจากนั้นจึงเติมไอโซโพรพานอล 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอหรือวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ที่ผ่านการแช่เย็นจำนวน 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 0.1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

4.2 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเลคโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจลอะกาโรส (LE Agarose, Promega, USA) เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอ

ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 - 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 - 10 นาที นำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเพื่อทราบปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง

4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามวิธีการที่รายงานโดย Thawaro และ Te-chato (2010) ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ซึ่งเป็น forward และ reverse ทั้งหมด 9 ไพรเมอร์ (EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772) รายละเอียดของไพรเมอร์แสดงในตารางภาคผนวกที่ 2 ปฏิกิริยาดังกล่าวประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 20 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละชนิดเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10X *Taq* บัฟเฟอร์ร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เข้มข้น 0.5 ยูนิต ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 4.1 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้ คือ อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 52 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส อีก 8 นาที

หลังเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอ โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่จะนำไปวิเคราะห์มาทำให้เสียสภาพก่อน เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการเสียสภาพธรรมชาติในเวลาต่างกันเมื่ออยู่ในเจล โดยผสมกับฟอร์มาไมด์ 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบใน loading buffer นำไปเพิ่มปริมาณที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยการทำอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส ใช้เจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมแถบดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต โดยนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย fixative (Acetic acid 10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 20 นาที เขย่าเบา ๆ ล้างในน้ำกลั่น 10 นาที นำแผ่นเจลมาย้อมในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ ก่อนนำแผ่นเจลจุ่มน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว (5 วินาที) เพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรตที่มากเกินพอออก แล้วนำแผ่น

เจลใส่ในสารละลาย developer (Sodium carbonate 25 เปอร์เซ็นต์ แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส Formaldehyde 40 เปอร์เซ็นต์ Sodium thiosulfate 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เขย่าด้วยความเร็วสม่ำเสมอ จนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยแช่แผ่นเจลในสารละลายกรดอะซิติก เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันชุดควบคุมกับชุดที่ได้การจุ่มแช่สารละลาย EMS

บทที่ 3

ผล

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

1.1 ผลของชิ้นส่วนพืชและการหั่นต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอที่มีลักษณะปกติและที่มีการหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าโซมาติกเอ็มบริโอสามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอใหม่เฉลี่ยได้สูงกว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และเมื่อพิจารณาการเตรียมชิ้นส่วนพืชก่อนการวางเลี้ยง พบว่าการหั่นชิ้นส่วนพืชสามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอใหม่เฉลี่ยได้สูงกว่าการไม่หั่นชิ้นส่วนพืช (ตารางที่ 1) ซึ่งเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ไม่มีการหั่น มีสีเหลืองคล้ำและมีเมือก (ภาพที่ 3ก) หากเพาะเลี้ยงต่อไปจะเกิดการปนเปื้อนได้สูง และไม่มีการสร้างเอ็มบริโอใหม่เกิดขึ้น ส่วนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีการหั่น มีการเพิ่มปริมาณของแคลลัสและแคลลัสมีสีเหลืองสว่าง (ภาพที่ 3ข) สำหรับโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่มีการหั่นจะไม่มีการสร้างเอ็มบริโอใหม่เกิดขึ้น (ภาพที่ 3ค) ส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่มีการหั่นมีการสร้างทั้งแคลลัสและโซมาติกใหม่ โดยสามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอใหม่ได้สูงสุดคือ 2.35 เอ็มบริโอต่อหลอด (ภาพที่ 3ง) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอใหม่จากการวิเคราะห์ทางสถิติ ของทั้งสองปัจจัย พบว่าชนิดของชิ้นส่วนพืชไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่สำหรับการเตรียมชิ้นส่วนโดยการไม่หั่นและหั่นชิ้นส่วนพืชนั้นมีความแตกต่างกันทางสถิติ และทั้งสองปัจจัยนี้มีปฏิสัมพันธ์ต่อกันทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

1.2 ผลของสภาพแสงที่มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสงที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การวางเลี้ยงในสภาพแสงสว่างปกติสามารถชัก

นำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดคือ 2.20 เอ็มบริโอต่อหลอด อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการให้สภาพมืดเป็นระยะเวลาต่างๆ ก่อนการเลี้ยงในสภาพที่มีแสง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลของชิ้นส่วนพืชและการหั่นต่อการการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน หลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การเตรียมชิ้นส่วน	การตอบสนอง		เฉลี่ย[2] การเตรียมชิ้นส่วน
	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส	โซมาติกเอ็มบริโอ	
ไม่หั่น	0.3bc	0c	0.15B
หั่น	1.1b	2.33a	1.725A
เฉลี่ย[1] การตอบสนอง	0.7A	1.175A	**
C.V. (%)	42.70		

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

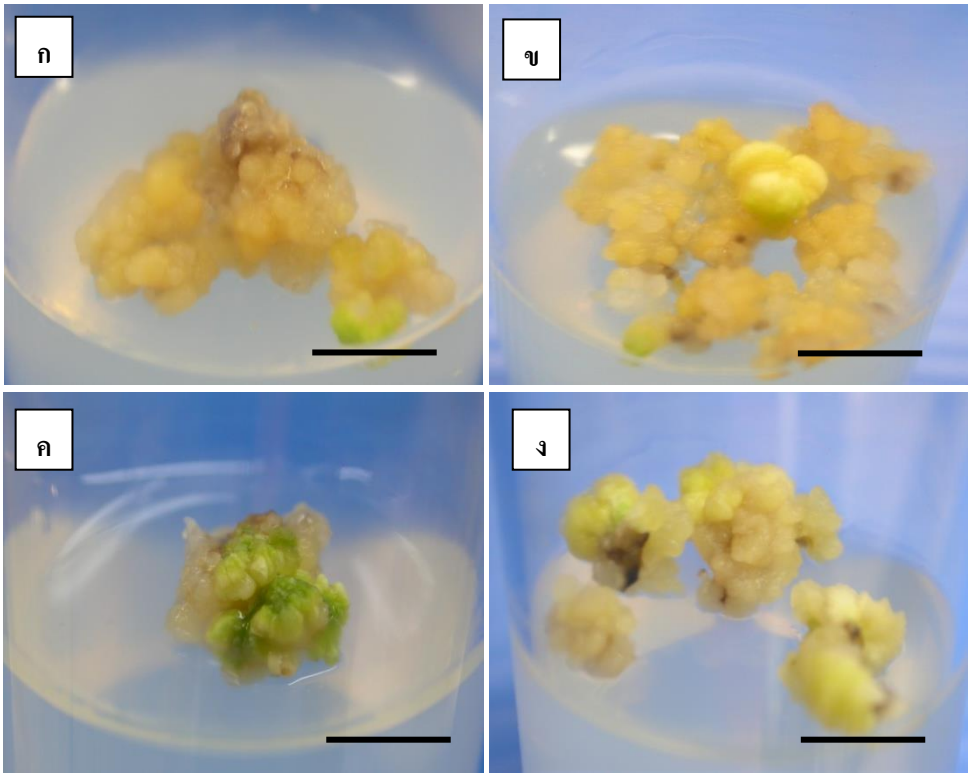
[1, 2] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวนอนและแนวตั้ง (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี LSD

ตารางที่ 2 ผลของสภาพการเพาะเลี้ยงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน หลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์-บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สภาพแสง	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อหลอด
สว่าง	2.20
มืด 1 วัน	1.56
มืด 3 วัน	1.40
มืด 5 วัน	1.30
มืด 7 วัน	1.35
F-test	ns
C.V. (%)	35.11

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 3 ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)

ก. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ไม่มีการหั่น

ข. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีการหั่น

ค. โซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่มีการหั่น

ง. โซมาติกเอ็มบริโอที่มีการหั่น

2. ผลของ EMS ต่อการตอบสนองของโซมาติกเอ็มบริโอ

2.1 ผลของการหั่นชิ้นส่วนพืชและความเข้มข้นสารละลาย EMS ต่ออัตราการรอดชีวิตของโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการจุ่มแช่ชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและหั่นในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่มีการหั่นแล้วจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิต 100 88.89 88.89 66.67 และ 55.56 ตามลำดับ ส่วนชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นแล้วจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นเดียวกันนั้น ให้อัตราการรอดชีวิต 100 69.26 61.63 31.48 และ 46.25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยพบว่า ชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่มีการหั่นมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังจากจุ่มสารละลาย EMS ต่ำกว่าโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่มีการหั่น และเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย EMS เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์ค่า LD_{50} โดยใช้สมการรีเกรสชั่น พบว่าชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นไม่สามารถหาค่า LD_{50} ได้ สำหรับโซมาติกเอ็มบริโอที่มีการหั่นมีค่า LD_{50} ของ EMS คือ 0.81 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4)

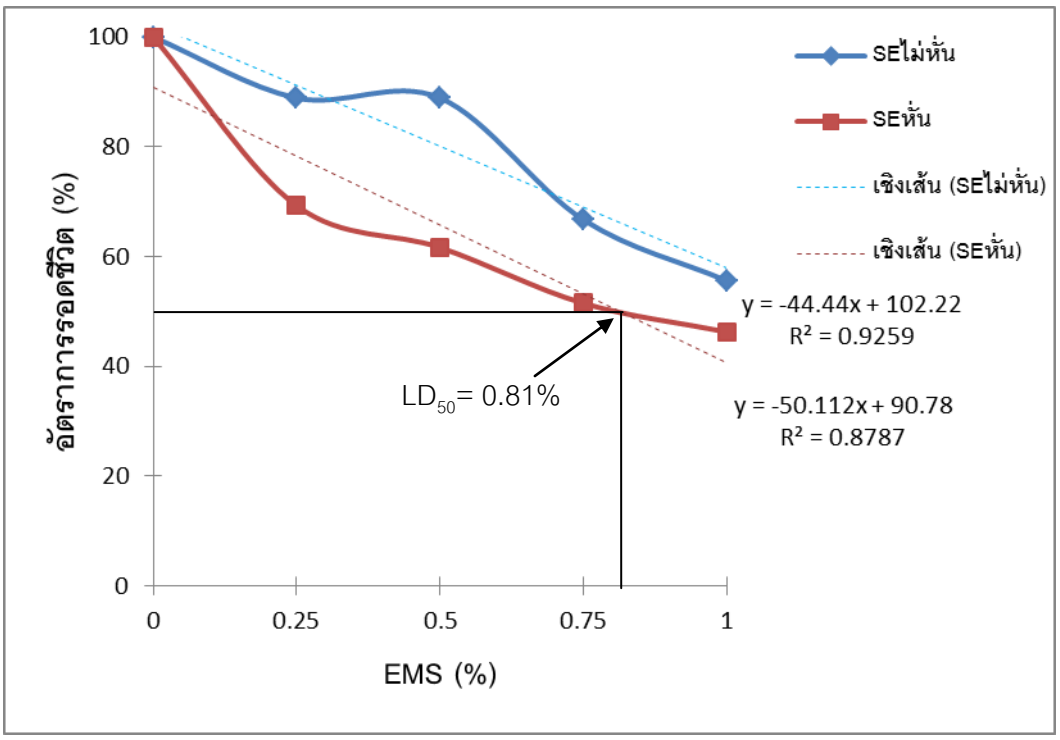
ตารางที่ 3 ผลของการหั่นชิ้นส่วนพืชและความเข้มข้นของสารละลาย EMS ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

EMS (%)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโซมาติกเอ็มบริโอ		เฉลี่ย[2] ความเข้มข้นของEMS
	ไม่หั่น	หั่น	
0	100a	100a	100A
0.25	88.89ab	69.26bc	79.07B
0.50	88.89ab	61.63c	75.26BC
0.75	66.67bc	51.48c	59.07CD
1	55.56c	46.25c	50.90D
เฉลี่ย[1] ชิ้นส่วนพืช	80.01A	65.27B	
C.V. (%)		14.47	

ความเข้มข้นของEMS = * , ชิ้นส่วนพืช = * ความเข้มข้นของ EMS X ชิ้นส่วนพืช = ns

[1, 2] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวนอนและแนวตั้ง (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 4 อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและหั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 90 นาที หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2.2 ผลของความเข้มข้น EMS ต่อการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอ

2.2.1 โซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS

การพัฒนาของชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันนั้น หลังจากแยกชิ้นส่วนที่รอดชีวิตมาเพาะเลี้ยงต่อไปในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าทุกชิ้นส่วนยังไม่มีการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (SSE) แต่มีการสร้างยอดขึ้นมาเลย (ภาพที่ 5ก-จ) โดยพบว่า EMS เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 3.58 ยอด แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) กับความเข้มข้นของ EMS อื่นๆ (ตารางที่ 4) และยังพบอีกว่า SE บางชิ้นส่วนมีลักษณะที่ผิดปกติ ไม่มีการสร้างยอด แต่มีการสร้างราก มีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไป

และไม่มีการพัฒนาต่อไป (ภาพที่ 6ก-จ) โดยชิ้นส่วนที่มีความผิดปกติมากที่สุด คือชิ้นส่วนที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 1เปอร์เซ็นต์ (0.42 ชิ้น) รองลงมาคือ EMS เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (0.41 ชิ้น) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้นของ EMS อื่นๆ

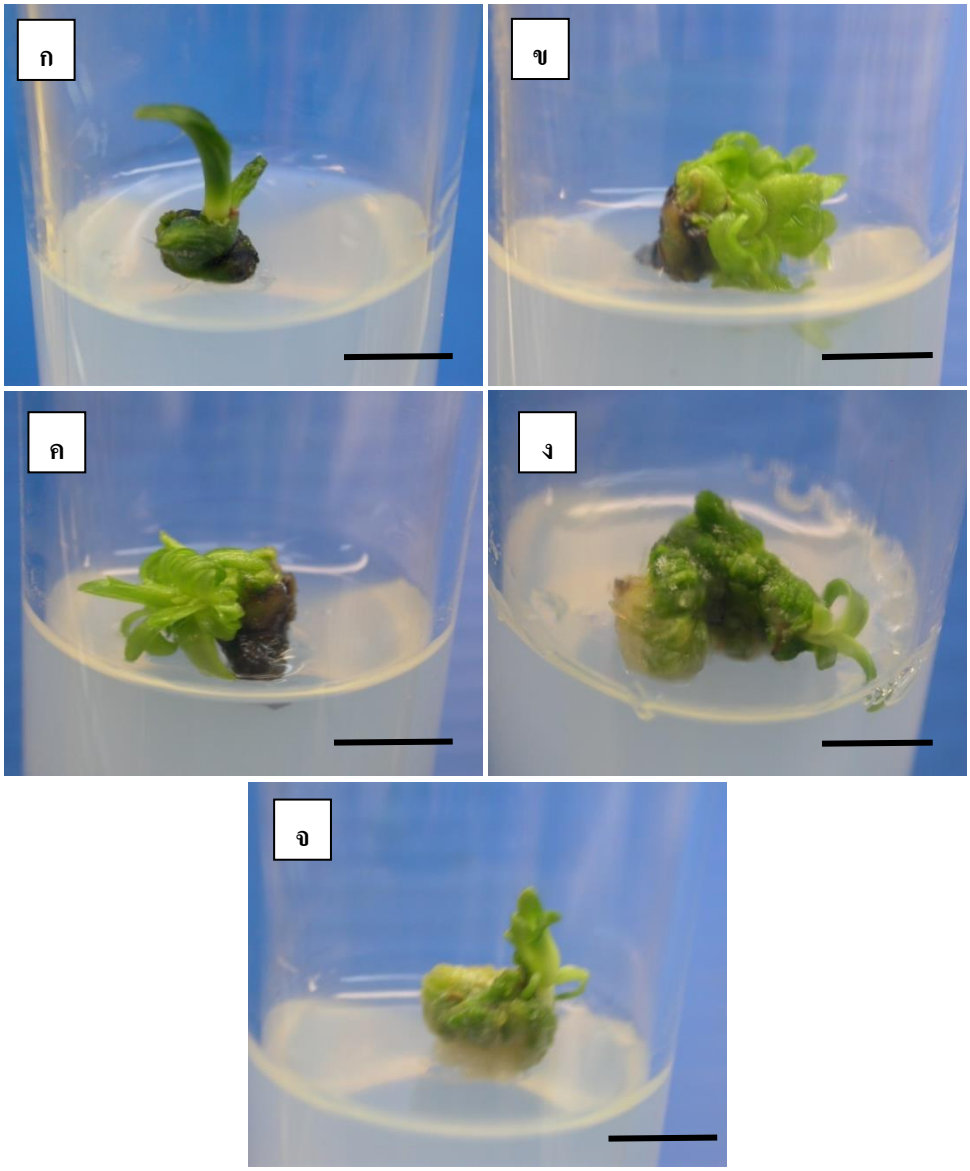
ตารางที่ 4 พัฒนาการของ SSE จำนวนยอด และจำนวน SE ที่ผิดปกติ ที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

EMS (%)	จำนวน SSE เฉลี่ย (ชิ้น)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)	จำนวน SE ที่ผิดปกติเฉลี่ย (ชิ้น)
0	0	3.25a	00.08
0.25	0	3.58a	0.16
0.50	0	2.42ab	0.33
0.75	0	0.92b	0.41
1	0	0.75b	0.42
F-test	-	*	ns
C.V. (%)	-	64.76	92.87

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

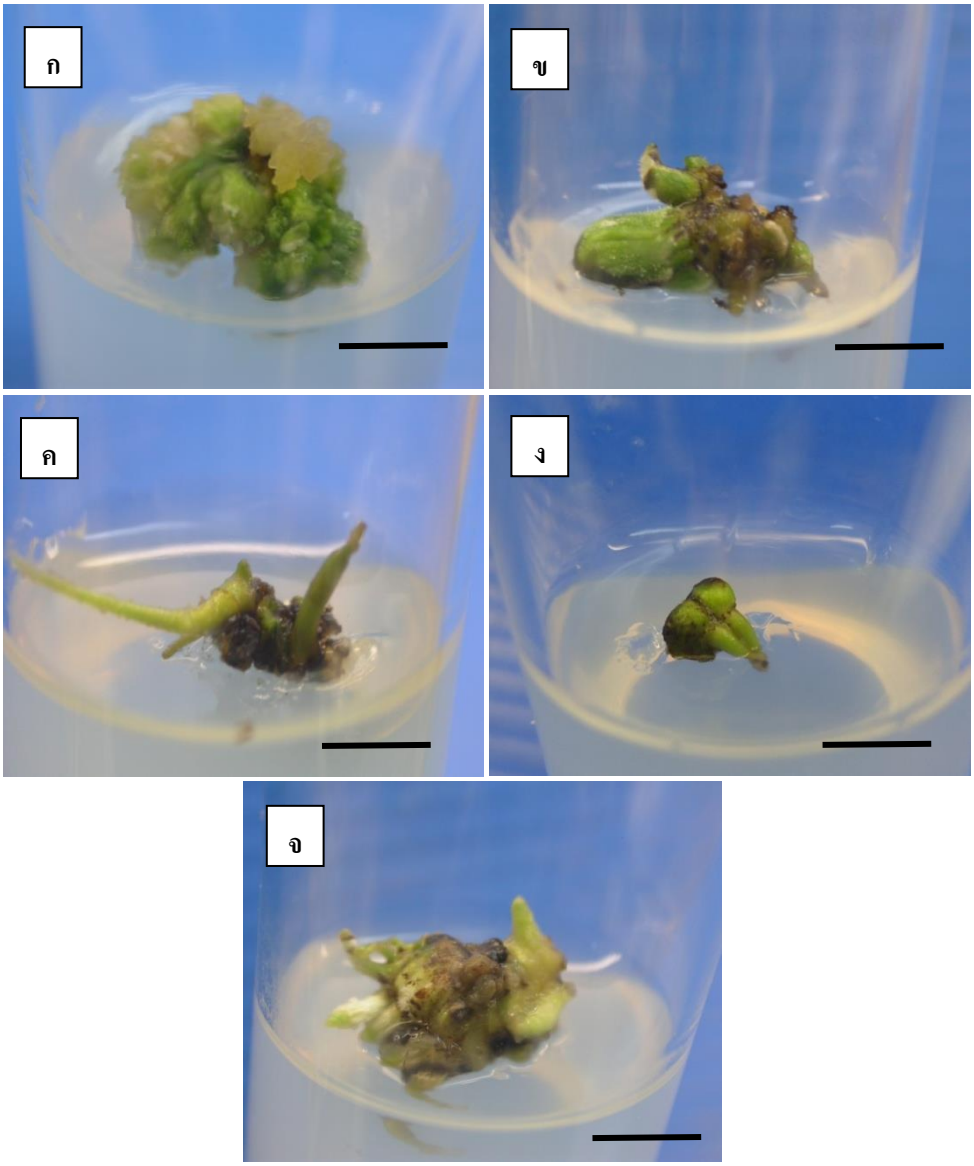
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 5 พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)

ก. 0 เปอร์เซ็นต์ ข. 0.25 เปอร์เซ็นต์ ค. 0.5 เปอร์เซ็นต์

ง. 0.75 เปอร์เซ็นต์ จ. 1 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 6 ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอที่ผิดปกติ ที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)

ก. 0 เปอร์เซ็นต์ ข. 0.25 เปอร์เซ็นต์ ค. 0.5 เปอร์เซ็นต์

ง. 0.75 เปอร์เซ็นต์ จ. 1 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 โซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS

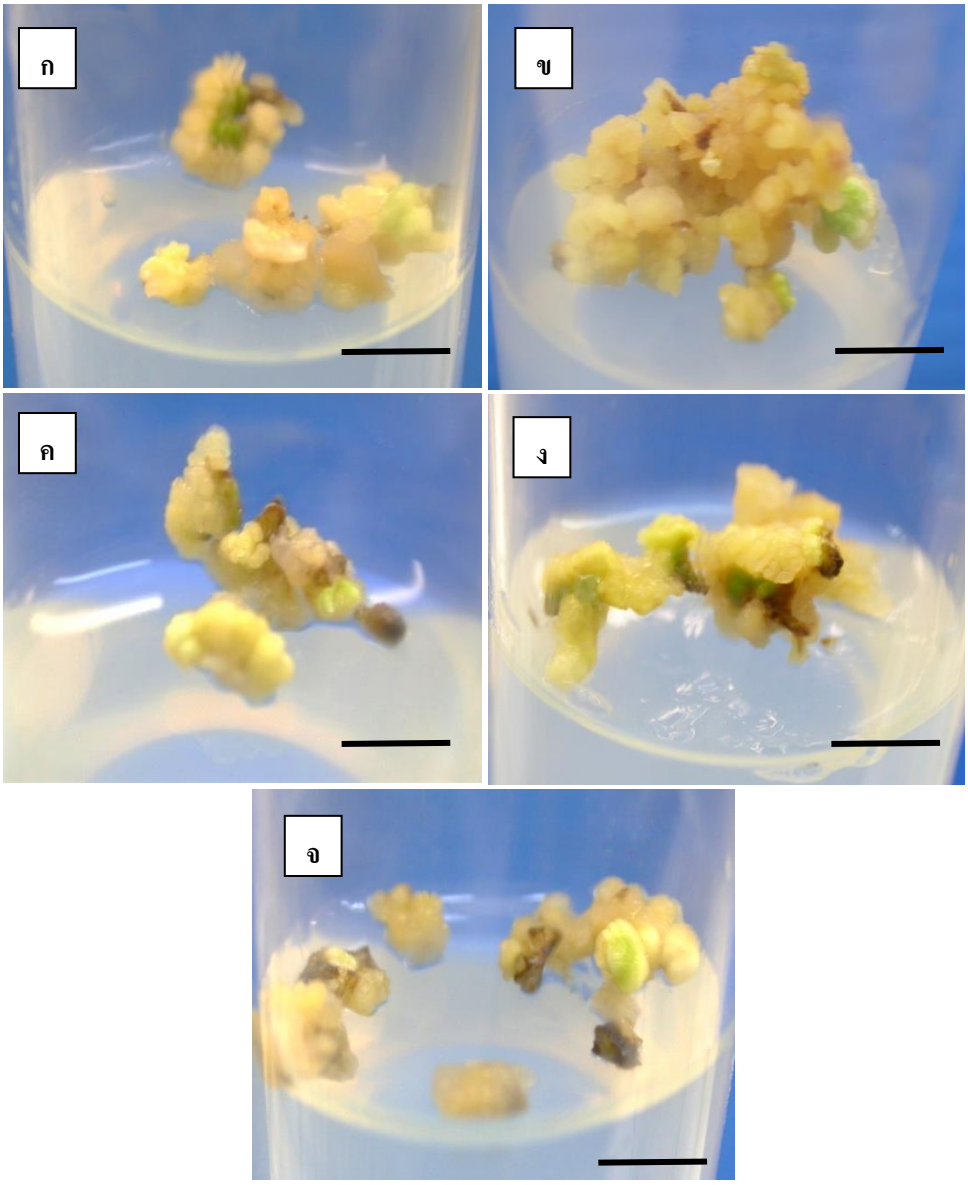
หลังจากแยกชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ ที่รอดชีวิตมาเพาะเลี้ยงต่อไปในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ในแต่ละความเข้มข้นของ EMS ให้ผลการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอที่แตกต่างกัน บางชิ้นส่วนพืชพัฒนาเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสีเหลืองเพียงอย่างเดียว และบางชิ้นส่วนพัฒนาเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ซึ่งมีสีเขียวร่วมกับการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วย โดยที่ EMS เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพียงอย่างเดียวสูงสุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ EMS เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 77.78 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) กับความเข้มข้นอื่นๆ (ตารางที่ 5, ภาพที่ 7)

ตารางที่ 5 พัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM ที่เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

EMS (%)	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอย่างเดียว (%)	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ (%)
0	23.08d	76.92b
0.25	75a	25e
0.50	44.44c	55.56c
0.75	22.22e	77.78a
1	66.67b	33.33d
F-test	**	**
C.V. (%)	10.85	10.57

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 7 ลักษณะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอที่พัฒนาจากชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ด้วยสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์-บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)

ก. 0 เปอร์เซ็นต์ ข. 0.25 เปอร์เซ็นต์ ค. 0.5 เปอร์เซ็นต์

ง. 0.75 เปอร์เซ็นต์ จ. 1 เปอร์เซ็นต์

หลังจากนั้นทำการแยกเฉพาะ SE มาเพาะเลี้ยงบนอาหารอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำการสร้าง SSE พบว่ามีเพียง SE ที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการสร้าง SSE โดยมีจำนวนชิ้นส่วน SE ที่มีการสร้าง SSE เฉลี่ย 0.16 และ 0.19 ชิ้น ตามลำดับ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 8ก-ข) สำหรับการเกิดยอด พบว่าชิ้นส่วน SE ที่ไม่ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS มีจำนวนยอดมากที่สุด คือ 2.33 ยอด (ภาพที่ 9ก-จ) และบางชิ้นส่วน SE ที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS มีลักษณะที่ผิดปกติ มีการสร้างรากและมีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไป (ภาพที่ 10ก-ง) โดยชิ้นส่วนที่มีความผิดปกติมากที่สุด คือ ชิ้นส่วน SE ที่ผ่านการจุ่มแช่ EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (0.25 ชิ้น)

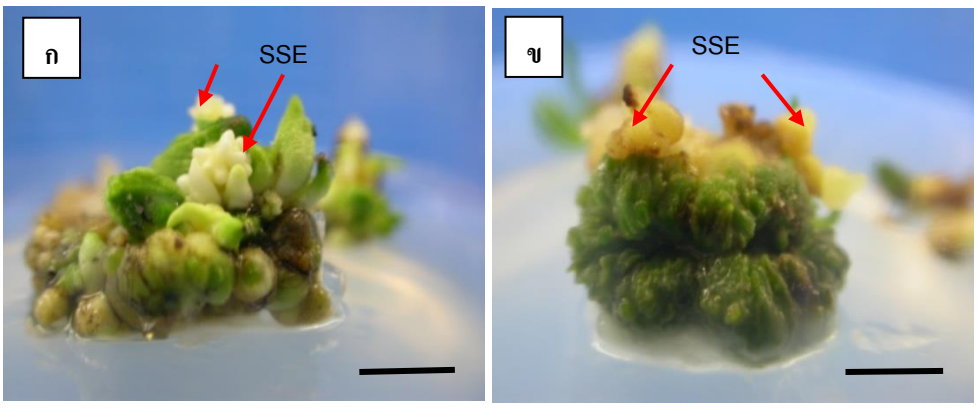
ตารางที่ 6 พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

EMS (%)	จำนวน SSE (ชิ้น)	จำนวนยอด (ยอด)	จำนวน SE ที่ผิดปกติ (ชิ้น)
0	0	2.33a	0
0.25	0	2.25a	0.08
0.50	0	1.25ab	0.16
0.75	0.16	0.83b	0.25
1	0.19	0.50b	0.25
F-test	ns	*	ns
C.V. (%)	127.71	63.37	91.46

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



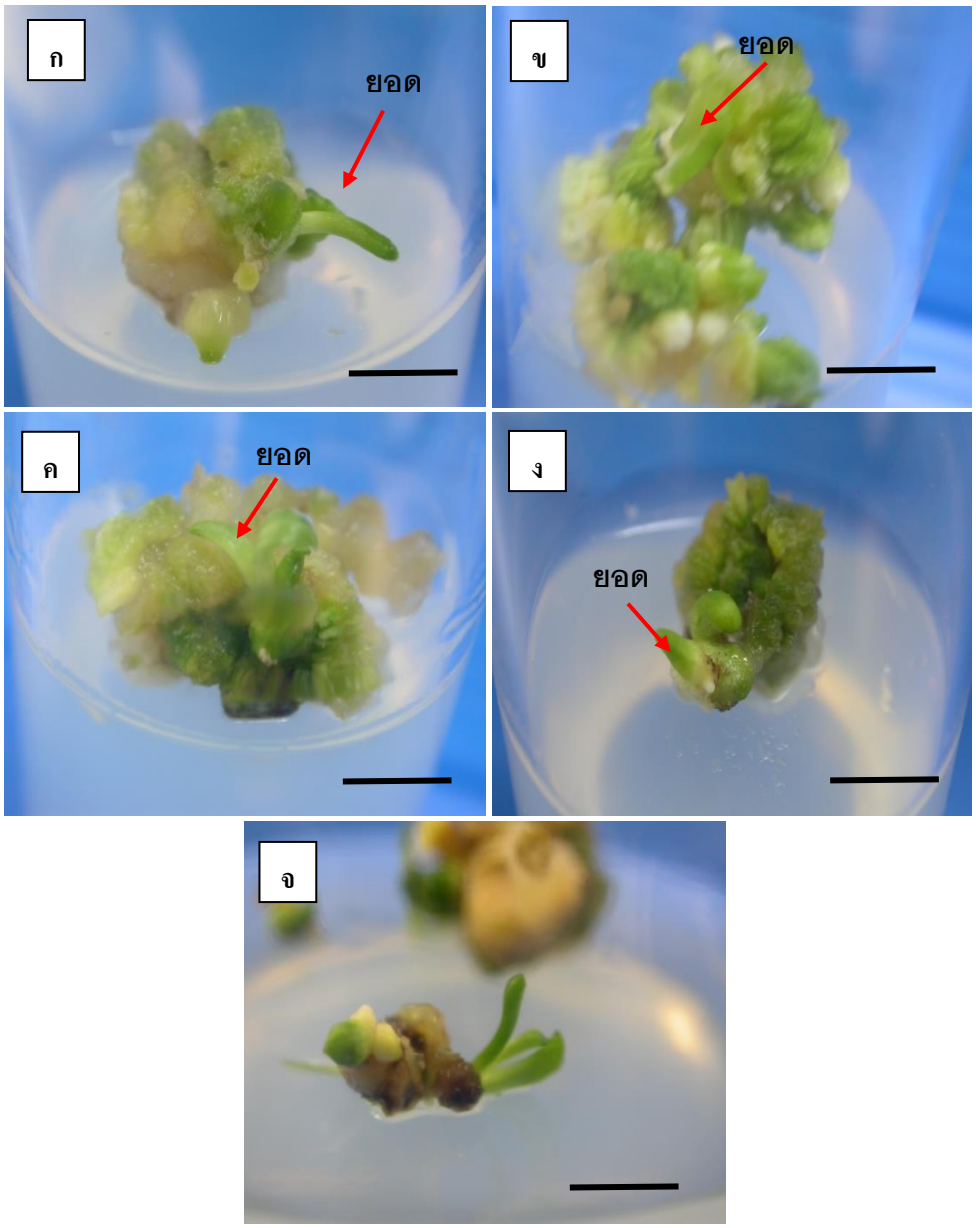
ภาพที่ 8 ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่ 2 (SSE) ที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (ก) และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ข) บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)

3. ผลของ EMS ต่อลักษณะทางสัณฐานของต้นกล้าในหลอดทดลอง

3.1 ใบและลำต้น

3.1.1 โซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS

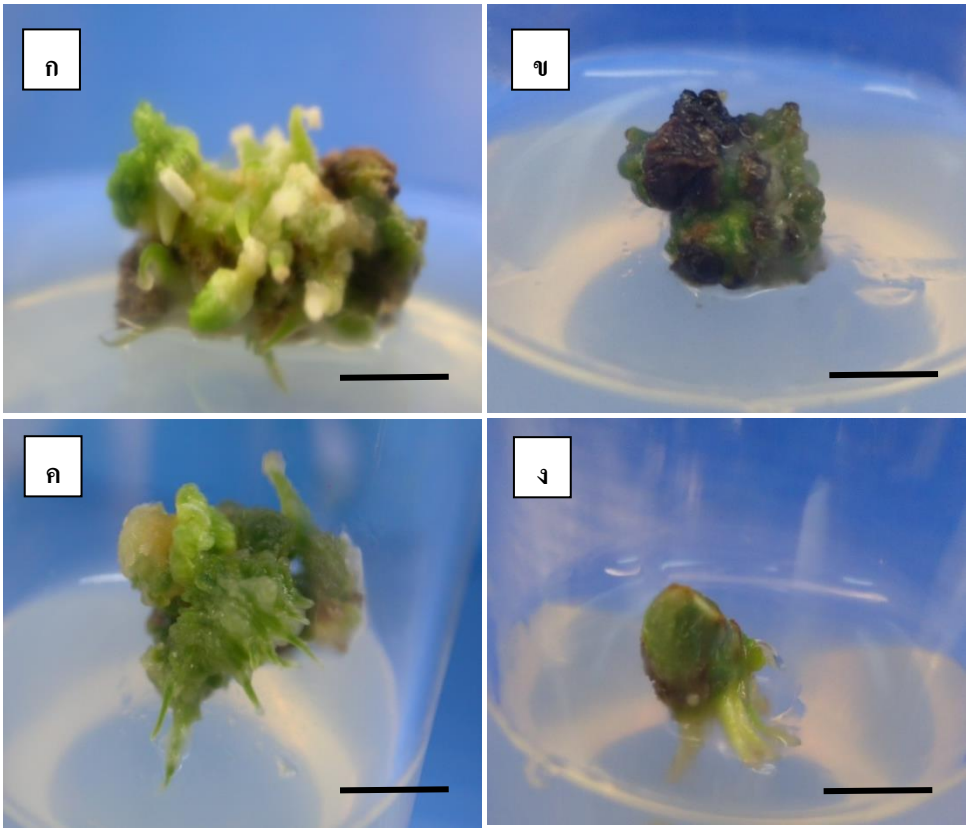
จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอที่มีการพัฒนาสร้างยอดแล้วมาย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าต้นกล้าที่พัฒนาจาก SE ที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS มีจำนวนใบมากกว่าต้นในชุดควบคุม (ตารางที่ 7) โดยต้นที่พัฒนาจาก SE ที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนใบมากที่สุดคือ 25.33 ใบ และมีขนาดของใบที่เล็กกว่าต้นในชุดควบคุม โดยพบว่า EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งให้ความกว้างของใบน้อยที่สุดคือ 0.29 เซนติเมตร (ภาพที่ 11ก-จ) สำหรับการเจริญเติบโตของต้นกล้า เมื่อพิจารณาจากความสูงของลำต้น พบว่าต้นที่พัฒนาจาก SE ที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS จะมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นในชุดควบคุม โดยเฉพาะต้นที่พัฒนาจาก SE ที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 0.5 – 1 เปอร์เซ็นต์ มีความสูงของต้นเฉลี่ยใกล้เคียงกัน 1.92 1.94 และ 1.96 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับต้นในชุดควบคุมและ EMS เข้มข้น 0.25% ซึ่งมีความสูงของต้นเฉลี่ย 3.12 และ 2.58 เซนติเมตร ตามลำดับ



ภาพที่ 9 ลักษณะยอดที่เกิดจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)

ก. 0 เปอร์เซ็นต์ ข. 0.25 เปอร์เซ็นต์ ค. 0.5 เปอร์เซ็นต์

ง. 0.75 เปอร์เซ็นต์ จ. 1 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 10 ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอที่มีลักษณะผิดปกติ ที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์ 0.5 เซนติเมตร)

ก. 0.25 เปอร์เซ็นต์ ข. 0.50 เปอร์เซ็นต์

ค. 0.75 เปอร์เซ็นต์ ง. 1 เปอร์เซ็นต์

3.1.2 **โซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร** EMS

จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอที่มีการพัฒนาสร้างยอดแล้ว มาย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าต้นกล้าที่พัฒนาจาก SE ที่หั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS มีลักษณะใบที่หนา หยิก และมีจำนวนใบที่มากกว่าต้นที่ในชุดควบคุม โดยต้นที่พัฒนาจาก SE ที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนใบมากที่สุดคือ 13.17 ใบ และต้นกล้าทุกความเข้มข้นของ EMS มีขนาดของใบที่ใหญ่กว่าต้นในชุดควบคุม โดยพบว่า EMS เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ มีความกว้างของใบ

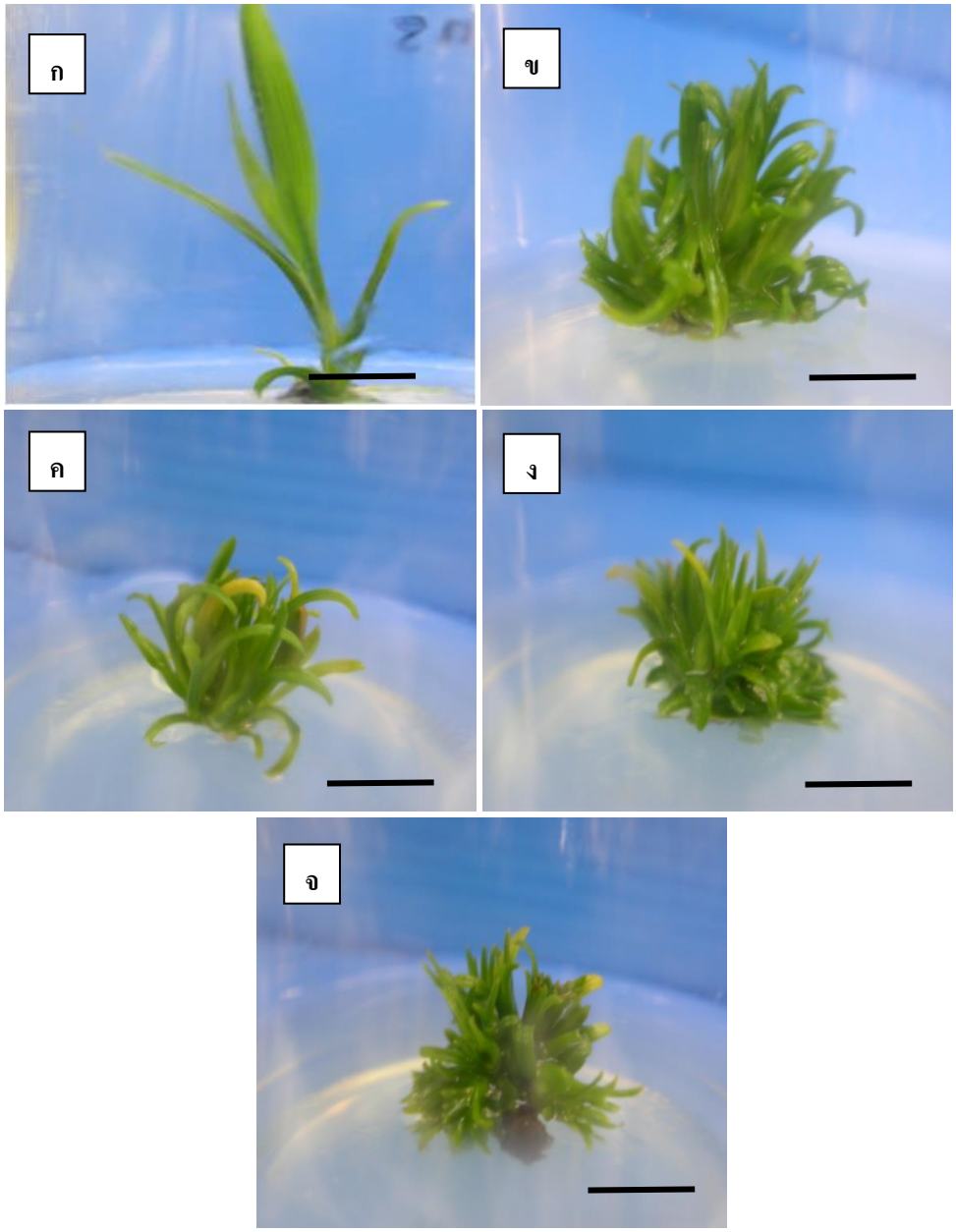
มากที่สุด 0.62 เซนติเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (ตารางที่ 8) ซึ่งใบจะหนา หยิก และมีสีเขียวเข้มกว่าต้นควบคุม (ภาพที่ 12ก-จ) สำหรับการเจริญของต้นกล้า เมื่อพิจารณาจากความสูงของต้นกล้า พบว่าต้นที่พัฒนาจาก SE ที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ทุกความเข้มข้นมีการเจริญช้ากว่าต้นควบคุม โดยต้นที่พัฒนาจาก SE ที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.75 เปอร์เซนต์ มีความสูงของต้นเฉลี่ยน้อยที่สุด 2.6 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ

ตารางที่ 7 จำนวนใบ ความกว้างของใบ และความสูงของต้นกล้าที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน

EMS (%)	จำนวนใบ (ใบ)	ความกว้างใบ (ซม.)	ความสูงต้น (ซม.)
0	6.17b	0.52a	3.12a
0.25	17.17a	0.42ab	2.58b
0.50	24.67a	0.34bc	1.92c
0.75	24.83a	0.30bc	1.94c
1	25.33a	0.29c	1.96c
F-test	**	**	**
C.V. (%)	40.9	19.74	9.65

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 11 การเจริญเติบโตของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน (บาร์ 1 เซนติเมตร)

ก. 0 เปอร์เซ็นต์ ข. 0.25 เปอร์เซ็นต์ ค. 0.5 เปอร์เซ็นต์

ง. 0.75 เปอร์เซ็นต์ จ. 1 เปอร์เซ็นต์

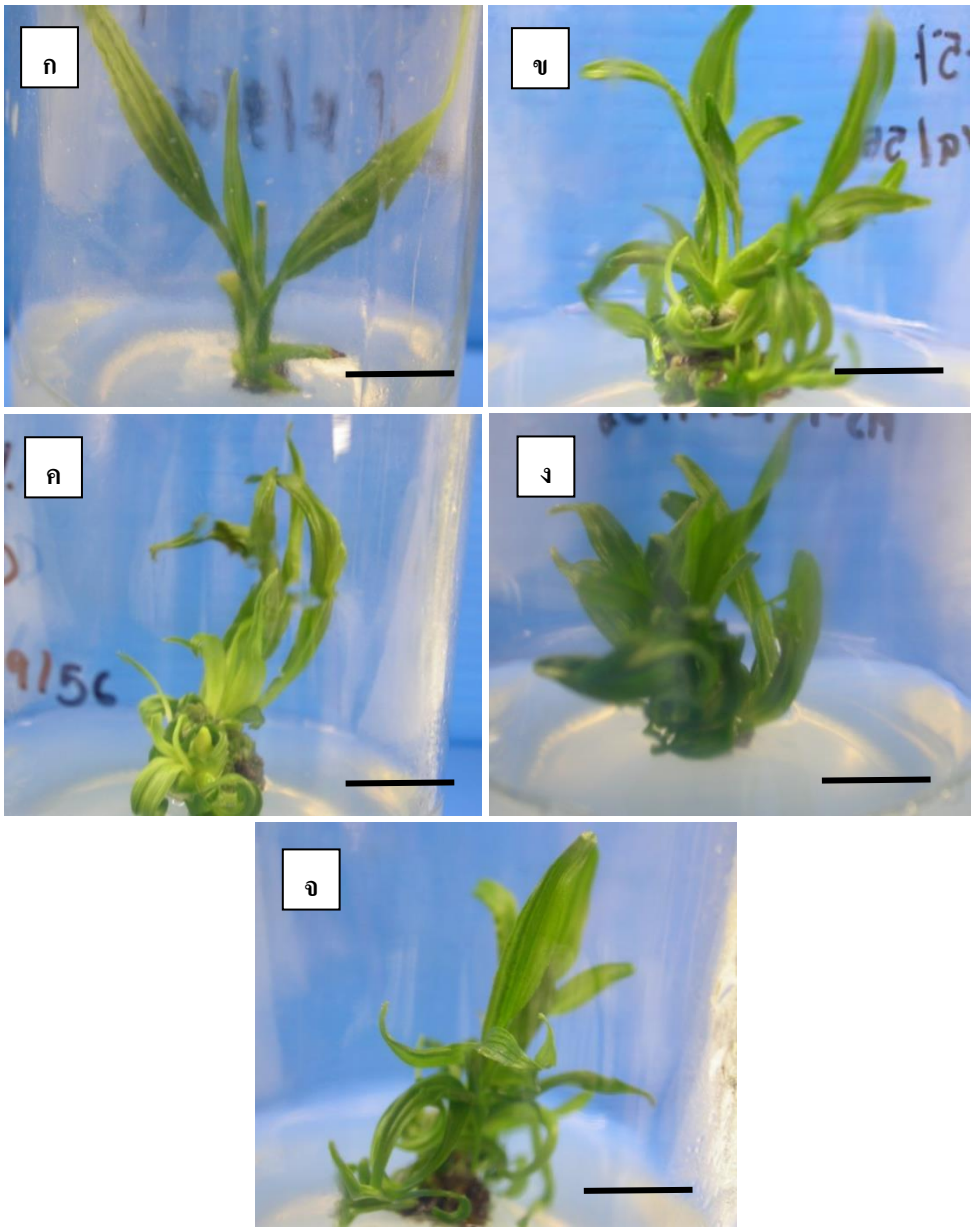
ตารางที่ 8 จำนวนใบ ความกว้างของใบ ความสูงของต้นที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน

EMS (%)	จำนวนใบ (ใบ)	ความกว้างใบ (ซม.)	ความสูงต้น (ซม.)
0	7.33	0.47	3.46a
0.25	8.00	0.52	2.98ab
0.50	8.83	0.58	2.92ab
0.75	13.17	0.62	2.60b
1	12.33	0.60	2.74b
F-test	ns	ns	**
C.V. (%)	47.14	19.85	11.78

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 12 การเจริญเติบโตของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน (บาร์ 1 เซนติเมตร)

ก. 0 เปอร์เซ็นต์ ข. 0.25 เปอร์เซ็นต์ ค. 0.5 เปอร์เซ็นต์

ง. 0.75 เปอร์เซ็นต์ จ. 1 เปอร์เซ็นต์

3.2 การชักนำดอกในหลอดทดลอง

3.2.1 โซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS

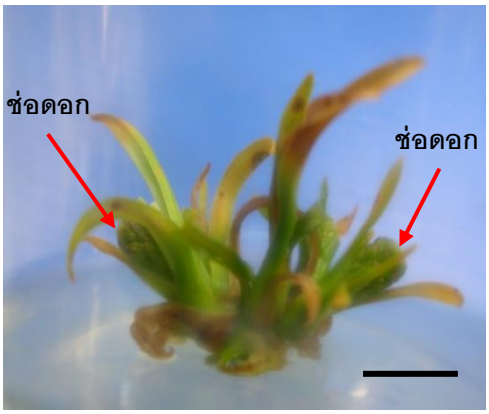
หลังจากย้ายต้นกล้าที่พัฒนาจาก SE ที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า มีเพียงต้นกล้าที่พัฒนาจาก SE ที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการสร้างช่อดอกในหลอดทดลอง 12.5 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 9) โดยช่อดอกที่เกิดขึ้นเป็นช่อดอกเพศผู้ มีรูปร่างยาวรี (ภาพที่ 13) และเมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมต่อไปจะพบว่า บางใบจะเหี่ยว เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล และเหลือเพียงแค่ช่อดอกซึ่งมีการเจริญเติบโตช้า

ตารางที่ 9 จำนวนต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งหมด ต้นกล้าที่เกิดช่อดอก และเปอร์เซ็นต์การเกิดช่อดอกของต้นกล้าที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 5 เดือน

EMS (%)	จำนวนต้นกล้าทั้งหมด (ต้น)	จำนวนต้นกล้าที่เกิดช่อดอก (ต้น)	การเกิดช่อดอก (%)
0	18	0	0
0.25	10	0	0
0.50	10	0	0
0.75	8	1	12.5
1	5	2	40

3.2.2 โซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS

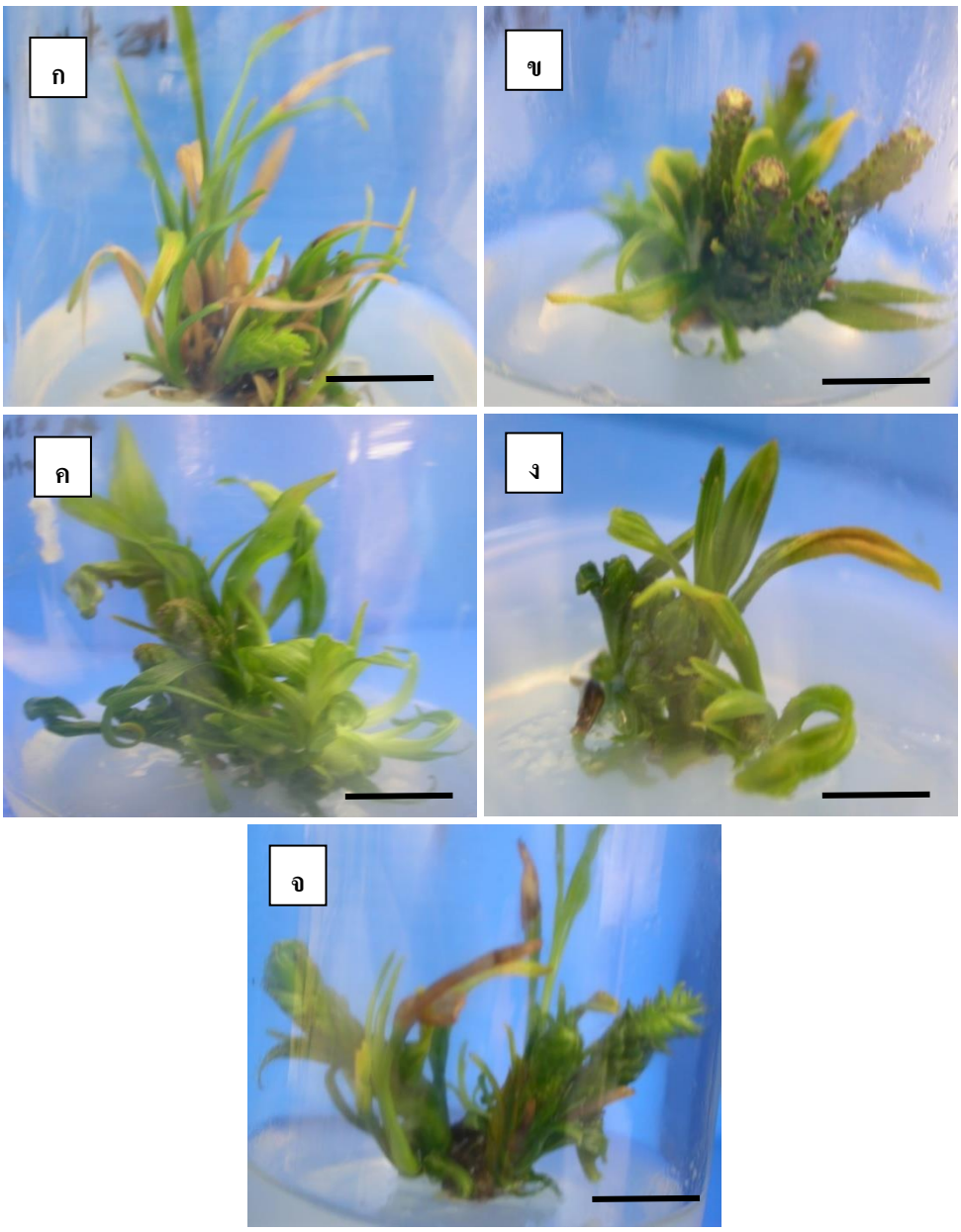
หลังจากการย้ายเลี้ยงต้นกล้าที่พัฒนาจาก SE ที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าต้นกล้าทุกความเข้มข้นของ EMS มีการเกิดช่อดอกในหลอดทดลอง รวมถึงต้นในชุดควบคุมด้วย โดยต้นในชุดควบคุมและต้นที่พัฒนาจาก SE ที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการสร้างช่อดอกในหลอดทดลอง 5 8 25 37.5 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 10) ซึ่งช่อดอกที่เกิดขึ้นเป็นช่อดอกตัวผู้ มีรูปร่างยาวรี (ภาพที่ 14ก-จ)



ภาพที่ 13 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่สร้างช่อดอกที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 5 เดือน (บาร์ 1 เซนติเมตร)

ตารางที่ 10 จำนวนต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งหมด ต้นกล้าที่เกิดช่อดอก และเปอร์เซ็นต์การเกิดช่อดอกของต้นกล้าที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรแข็ง MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 5 เดือน

EMS (%)	จำนวนต้นกล้าทั้งหมด (ต้น)	จำนวนต้นกล้าที่เกิดช่อดอก (ต้น)	การเกิดช่อดอก (%)
0	20	1	5
0.25	25	2	8
0.50	8	2	25
0.75	8	3	37.5
1	6	3	50



ภาพที่ 14 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่สร้างช่อดอกที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 5 เดือน (บาร์ 1 เซนติเมตร)

ก. 0 เปอร์เซ็นต์ ข. 0.25 เปอร์เซ็นต์ ค. 0.5 เปอร์เซ็นต์

ง. 0.75 เปอร์เซ็นต์ จ. 1 เปอร์เซ็นต์

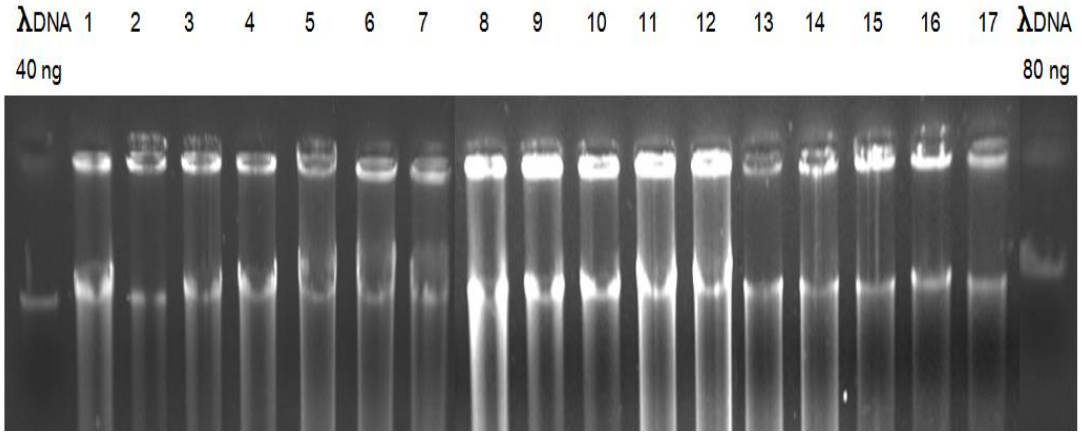
4. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

4.1 การสกัดและตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจาก SE ทั้งที่ไม่หั่นและหั่นและผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มีลักษณะปกติและต้นที่มีการสร้างช่อดอกตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ครั้งละ 30-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แต่ดีเอ็นเอไม่ค่อยสะอาด (ภาพที่ 15) อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอที่สกัดทั้งหมดนี้สามารถนำไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้

4.2 การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมาย SSR

เมื่อนำดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองที่พัฒนาจาก SE ที่ไม่หั่นและหั่นและผ่านการจุ่มแช่ EMS ความเข้มข้นต่างๆ มาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1172 หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วนำมาตรวจสอบบนอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าทุกไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง โดยไพร์เมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism) มีเพียงไพรเมอร์ EgCIR0465 ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ โดยให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 275 bp ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ได้จากต้นกล้าที่มีการสร้างช่อดอกที่พัฒนาจากชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอ ทั้งที่ไม่มีการหั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่ EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 16) สำหรับไพรเมอร์ที่เหลือ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1172 ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความแตกต่าง (monomorphism) (ภาพที่ 17-24) ตามลำดับ



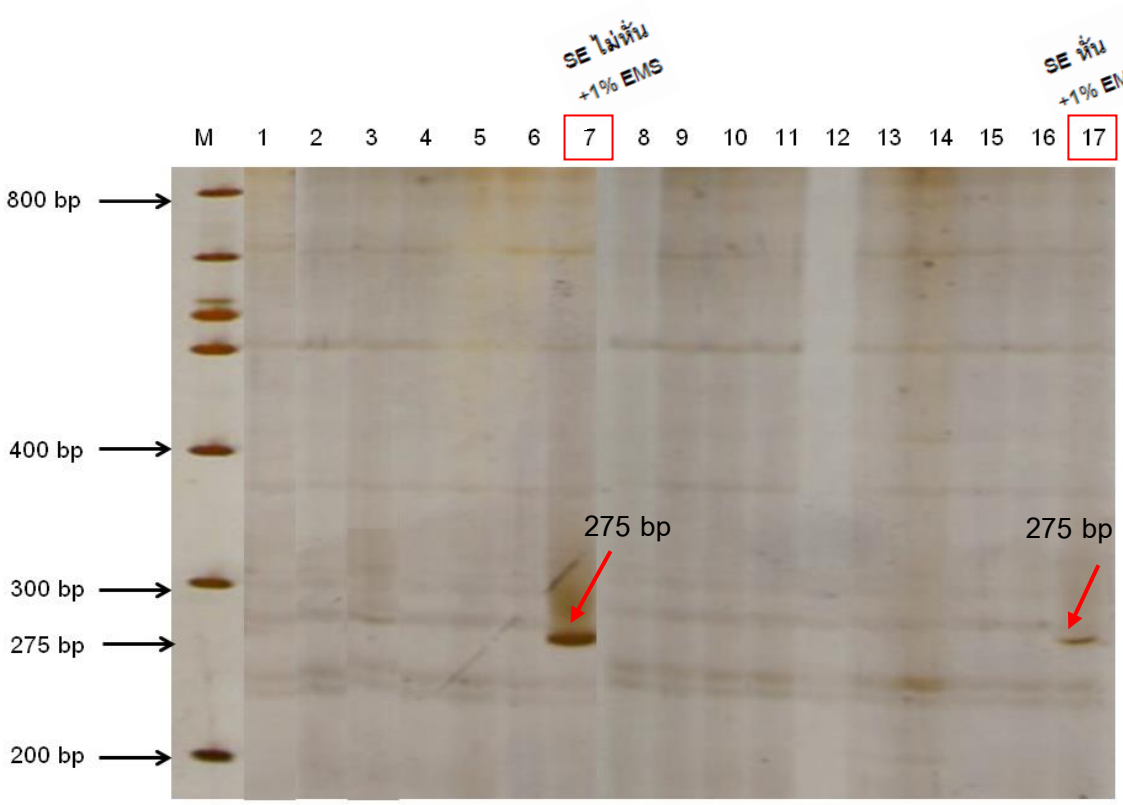
ภาพที่ 15 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ ที่สกัดตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) ด้วยวิธีการทางคุณภาพเปรียบเทียบกับ λ DNA

lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 6-7 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 8-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 13-17 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 16 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0465

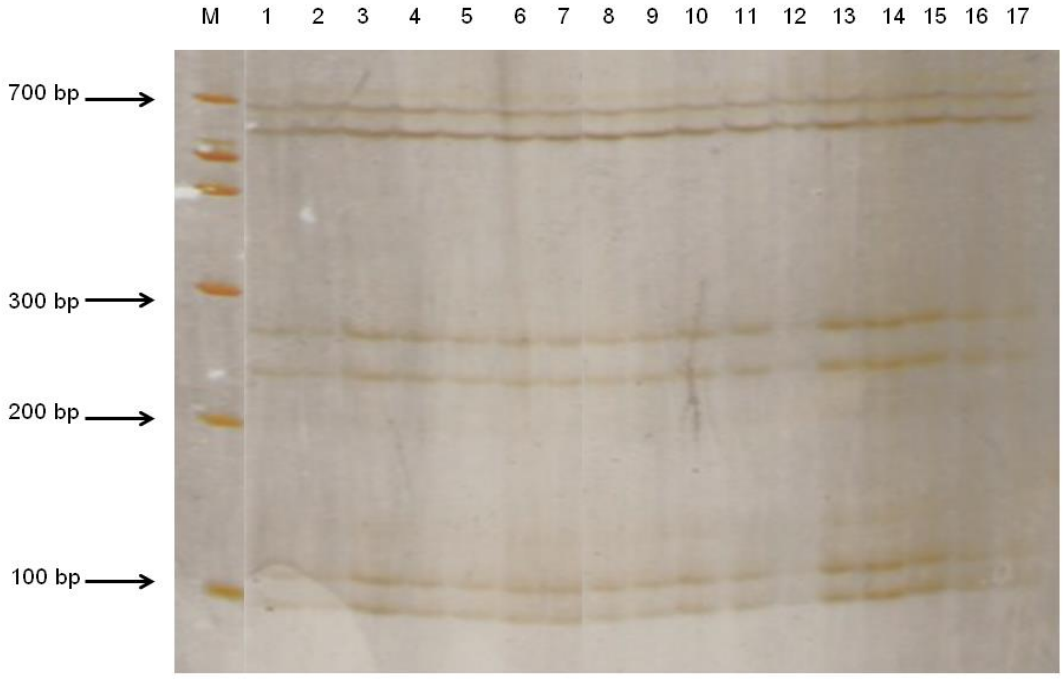
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 6-7 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 8-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 13-17 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 17 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008

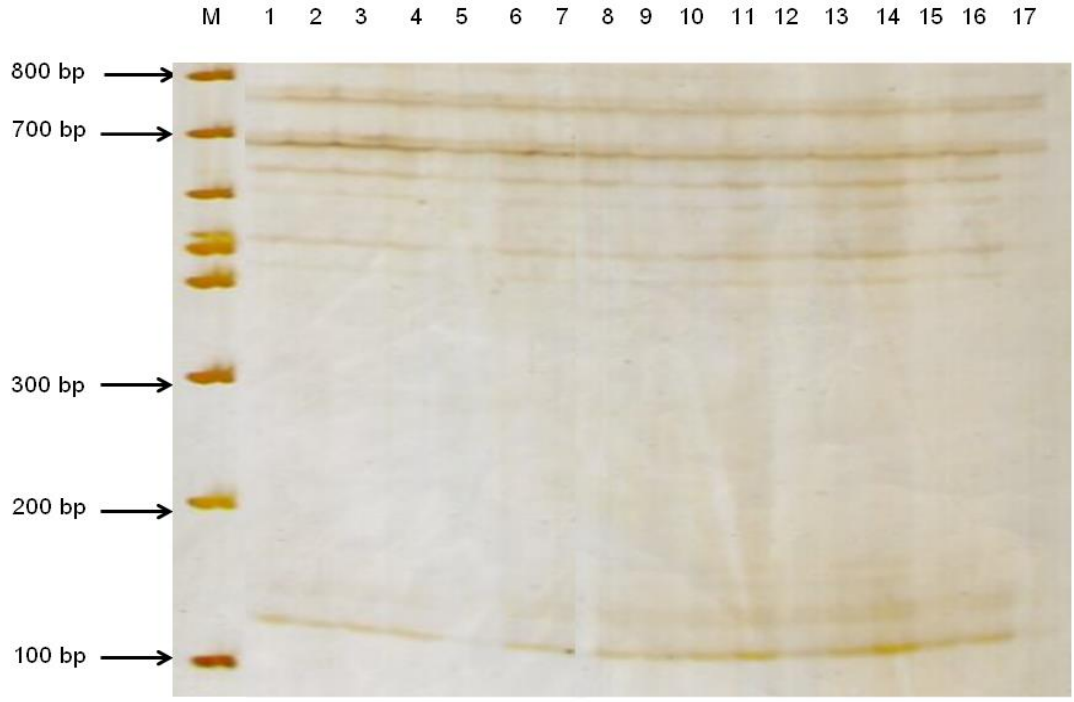
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 6-7 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 8-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 13-17 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 18 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0243

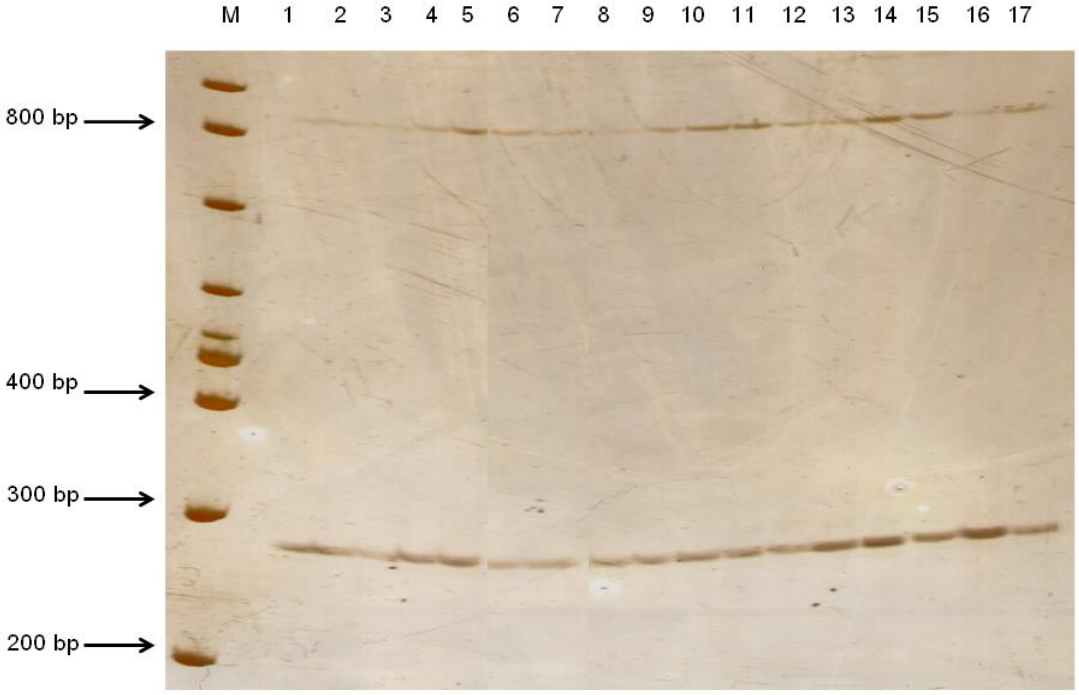
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 6-7 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 8-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 13-17 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 19 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0337

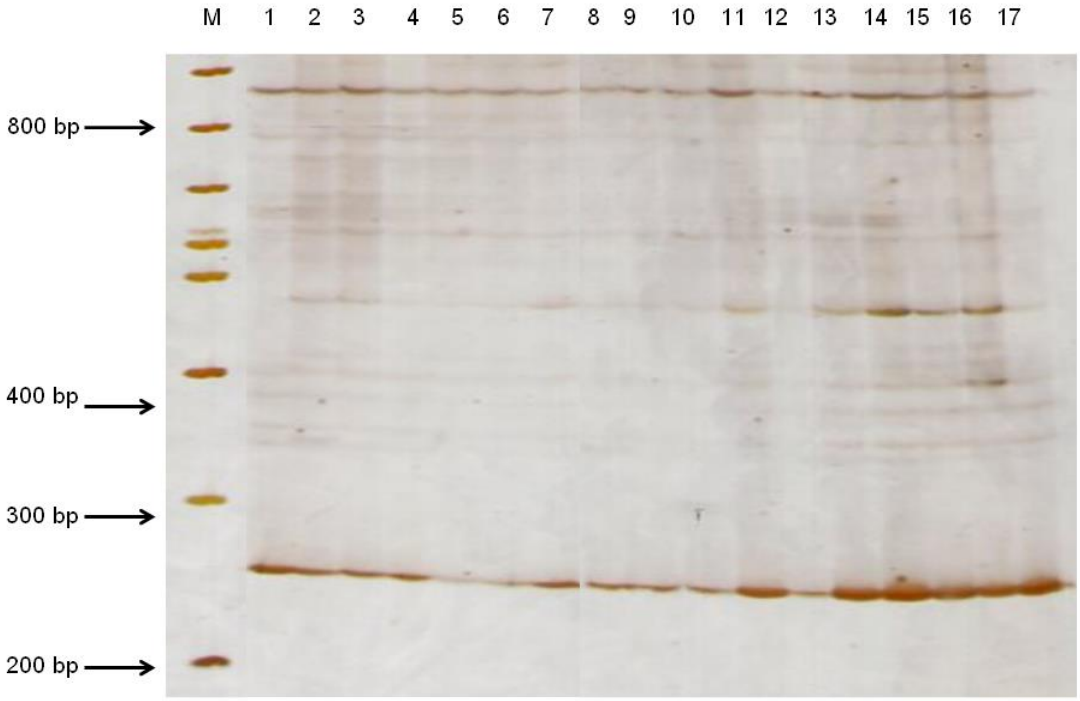
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 6-7 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 8-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 13-17 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 20 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0409

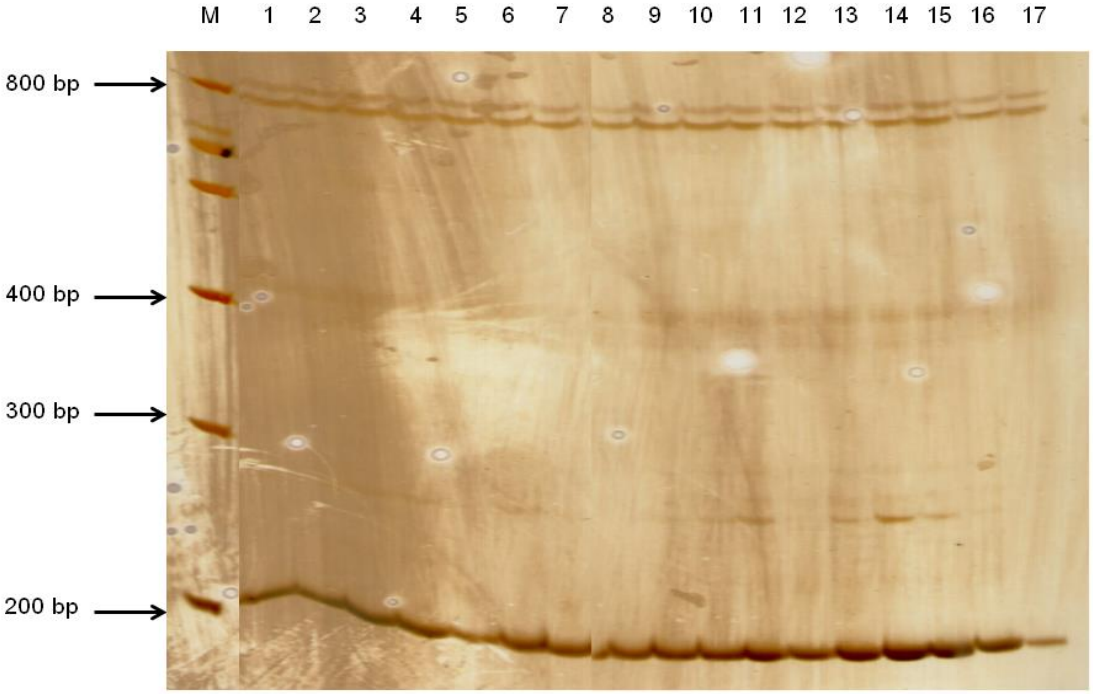
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 6-7 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 8-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 13-17 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 21 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0446

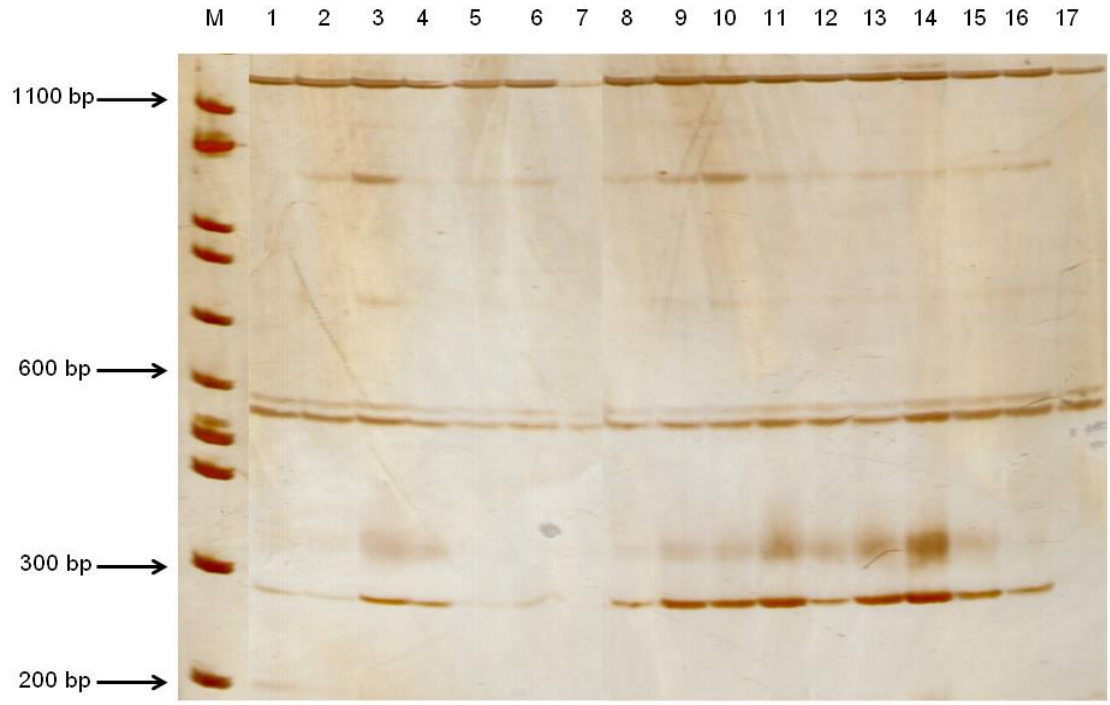
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 6-7 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 8-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 13-17 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 22 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0781

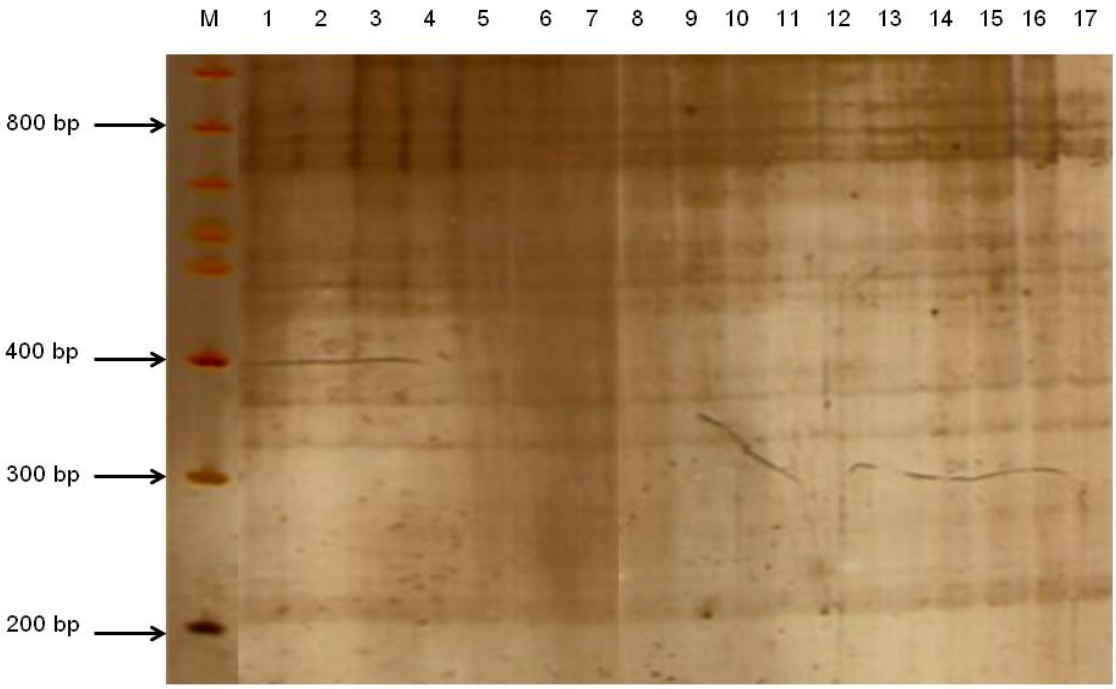
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 6-7 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 8-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 13-17 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 23 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0905

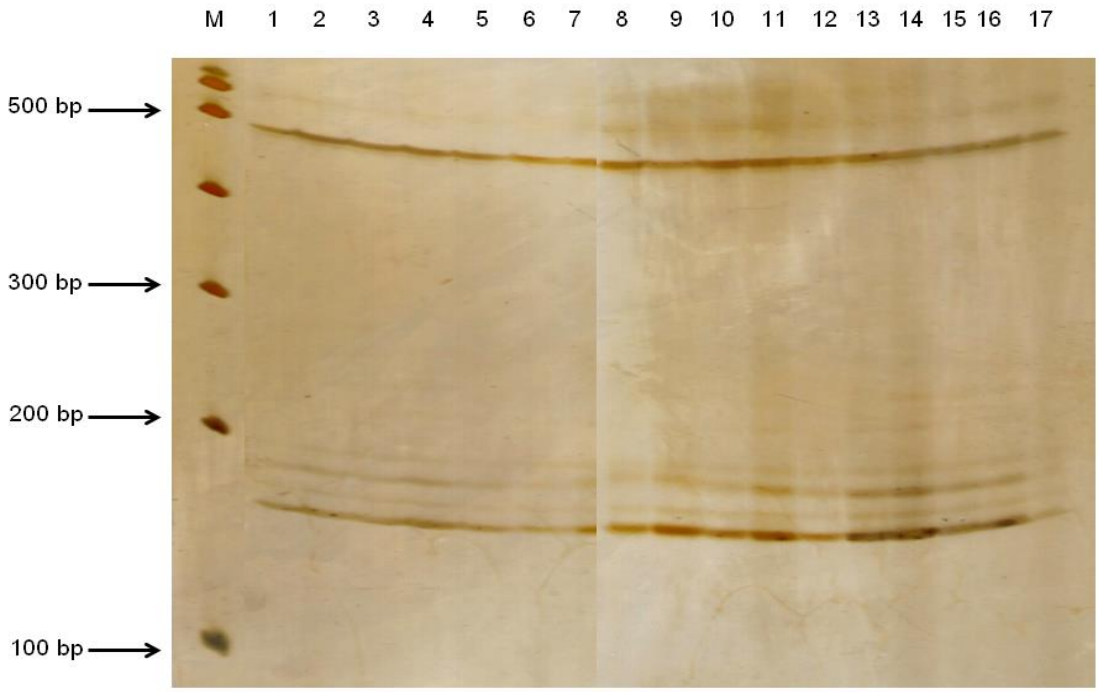
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 6-7 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 8-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 13-17 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 24 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้งที่ไม่หั่นและหั่นแล้วผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR1772

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 6-7 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 8-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

lane 13-17 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอก โดยพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการตามปกตินั้นทำได้ยาก จึงได้มีการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านการกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอ แล้วจึงชักนำการเกิดเป็นต้นใหม่ต่อไป การสร้างบาดแผลให้กับชิ้นส่วนพืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชมีการสร้างและพัฒนาเกิดเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ Park และคณะ (1988) และ รังสฤษดิ์ (2540) รายงานว่า การสร้างบาดแผลเป็นการช่วยส่งเสริมให้ฮอร์โมนพืชจากตำแหน่งอื่นย้ายมายังตำแหน่งที่เกิดบาดแผล และยังเป็นการเพิ่มช่องทางในการดูดอาหารของชิ้นส่วนพืช ชิ้นส่วนพืชจะสามารถดูดซับน้ำและอาหารได้โดยตรงผ่านทางบาดแผลมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นการกระตุ้นการพัฒนาส่วนต่างๆ ในบริเวณนี้ จากการศึกษานี้จะเห็นว่า การหั่นชิ้นส่วนพืช ทั้งที่เป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอเป็นชิ้นเล็กๆ ซึ่งเป็นการสร้างบาดแผลให้ชิ้นส่วนพืช ส่งเสริมให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้มากกว่าชิ้นส่วนที่ไม่มีการสร้างบาดแผล สอดคล้องกับการศึกษาของกาญจนี (2553) ที่ได้ทำการสร้างบาดแผลให้กับโนดูลาแคลลัสของปาล์มน้ำมันโดยใช้ใบมีด พบว่าการสร้างบาดแผลส่งผลให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพิ่มปริมาณได้มากกว่าแคลลัสที่ไม่มีการสร้างบาดแผล Othmani และคณะ (2009) ศึกษาผลของการสร้างบาดแผลแคลลัสของอินทผาลัมด้วยใบมีดโกน แล้ววางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด 3.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้สร้างบาดแผล และยังสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุดเฉลี่ย 51 เอ็มบริโอ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 55 วัน ซึ่งโซมาติกเอ็มบริโอสามารถเจริญเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้ และจากการศึกษาของ Santarem และคณะ (1997) พบว่าการสร้างบาดแผลด้วยใบมีดผ่าตัดให้กับชิ้นส่วนใบเลี้ยงของถั่วเหลืองสามารถส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (36 เอ็มบริโอ) ซึ่งมากกว่าชิ้นส่วนที่ไม่มีการสร้างบาดแผล นอกจากนี้ผลการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าโซมาติกเอ็มบริโอที่มีการหั่นสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอใหม่ได้จำนวนมากกว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีการหั่น แสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนพืชต่างกัน ส่งผลต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอแตกต่างกันด้วย ชนิดของชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงมีผลต่อการเจริญและพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอด้วย เช่น Naderi และคณะ (2012) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชต่างกัน ได้แก่ ใบ และก้านใบของไซคลาเมน

พบว่าชิ้นส่วนใบมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่าชิ้นส่วนก้านใบ โดยสามารถสร้างโซมาติกเอ็มบริโอได้ 7.2 เอ็มบริโอ ซึ่งมากกว่าชิ้นส่วนก้านใบที่สร้างได้ 5.7 เอ็มบริโอ Te-chato และคณะ (2006) ได้เพาะเลี้ยงใบ ข้อ และตาของหน้าวัว พบว่าแต่ละชิ้นส่วนให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่แตกต่างกัน โดยชิ้นส่วนข้อให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด รองลงมา คือ ชิ้นส่วนใบ และตา ตามลำดับ

แสงก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ จากการศึกษานี้ พบว่า ชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้ววางเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอใหม่ได้สูงกว่าการวางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 วัน ก่อนการนำไปเลี้ยงในสภาพแสงปกติ สอดคล้องกับการศึกษาของ ธนวดี (2551) ซึ่งพบว่าการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่างสามารถส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่าสภาพมืด อย่างไรก็ตาม อาจมีพืชบางชนิดที่ไม่ต้องการแสงต่อการเจริญและพัฒนา เช่น คาวทอง (*Houttuynia cordata* Thunb.) โดย Xu และคณะ (2011) รายงานว่า การนำใบคาวทองมาสร้างบาดแผลแล้วเพาะเลี้ยงในที่มืด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและตุ่มตามากกว่าชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงในที่สว่าง และยังพบว่าการเพาะเลี้ยงในที่มืดมีเปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาลน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในที่สว่างด้วย

2. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสาร EMS

จากการศึกษาการใช้สาร EMS ซึ่งเป็นสารเคมีก่อการกลายพันธุ์ในพืช โดยการนำชิ้นส่วน SE ทั้งที่ไม่หั่นและหั่นมาจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ นั้น ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วน SE ที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ทุกความเข้มข้นให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Muthusamy และ Jayabalan (2011) ที่ทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในฝ้าย โดยนำออวุลของฝ้ายมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ทุกความเข้มข้นของสารละลาย EMS ให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาของ Naik และคณะ (2012) นำชิ้นส่วนของใบ *Bacopo monnieri* (L.) มาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS พบว่าทุกทรีตเมนต์ให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน อย่างไรก็ตามการหั่น SE ก่อนแล้วมาจุ่มแช่สารละลาย EMS ในระดับความเข้มข้นเดียวกันนั้นให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนต่ำกว่า รังสฤษฎ์ (2540) รายงานว่า การสร้างบาดแผลเป็นการเพิ่มช่องทางในการดูดอาหารของชิ้นส่วนพืช ชิ้นส่วนพืชจะสามารถดูดซับน้ำและอาหารได้โดยตรงผ่านทางบาดแผลมากยิ่งขึ้น ดังนั้นการ

สร้างบาดแผลจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่จะทำให้ชิ้นส่วน SE สามารถดูดซึมสารละลาย EMS และโดนสาร EMS เข้าทำลายเนื้อเยื่อได้มากกว่าชิ้นส่วน SE ที่ไม่มีการสร้างบาดแผล จึงทำให้ชิ้นส่วน SE ที่หั่นและจุ่มแช่สารละลาย EMS มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำกว่าชิ้นส่วน SE ที่ไม่หั่นและจุ่มแช่สารละลาย EMS เมื่อเปรียบเทียบในระดับความเข้มข้นของ EMS เดียวกัน

เมื่อพิจารณาถึงค่า LD_{50} ซึ่ง สมปอง (2541) ได้รายงานว่า ความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้จำนวนครึ่งหนึ่งหรือ 50 เปอร์เซ็นต์ ถือเป็นค่าในการประเมินความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นดังกล่าวสร้างความเสียหาย และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับหน่วยพันธุกรรมอย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ โดยพืชแต่ละชนิดมีค่า LD_{50} แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนและอายุของชิ้นส่วนพืชที่นำมาจุ่มแช่ ระยะเวลาในการจุ่มแช่ และความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ (สิรนุช, 2540) โดยพืชบางชนิดมีค่า LD_{50} สูง เช่น การศึกษาของปวีณา (2541) ที่ได้นำชิ้นส่วนใบของคำฝอยจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.2-1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า สามารถหาค่า LD_{50} ได้ คือ 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาของยุพาภรณ์และสมปอง (2551) พบว่า การนำชิ้นใบของกล๊อกซิเนียมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0-1 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที สามารถหาค่า LD_{50} ได้ คือ 0.73 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาของ Latado และคณะ (2004) ได้นำก้านช่อดอกของเบญจมาศจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 45 นาที พบว่ามีค่า LD_{50} คือ 0.82 เปอร์เซ็นต์

พืชบางชนิดมีค่า LD_{50} ต่ำ เช่น การศึกษาของ Sadat และ Hoveize (2012) ได้นำแคลลัสอ้อยจุ่มแช่ในสารสะลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ 4 ชั่วโมง พบว่าค่า LD_{50} คือ 32.25 มิลลิโมลาร์ การศึกษาของ Devi และ Mullainathan (2012) ได้นำเมล็ดพริกจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ นาน 4 ชั่วโมง พบว่ามีค่า LD_{50} คือ 30 มิลลิโมลาร์ และการศึกษาของ Berenschot และคณะ (2008) พบว่าการจุ่มแช่เมล็ดพิทูเนียในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถหาค่า LD_{50} ได้ คือ 0.11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ การนำ SE ที่มีการหั่นและผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 90 นาที นั้น พบว่า ความเข้มข้นที่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชลดลงครึ่งหนึ่ง คือ 0.81 เปอร์เซ็นต์ นั่นคือ มีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.81 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือเป็นความเข้มข้นค่อนข้างสูง ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นหากจุ่มแช่ SE ปาล์มน้ำมันที่มีการหั่นในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.81 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ชิ้นส่วนที่รอดชีวิตมีแนวโน้มว่าจะได้ต้นปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะกลายพันธุ์ไปจากเดิม

เมื่อนำชิ้นส่วน SE ที่รอดชีวิตมาเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่าชิ้นส่วน SE ที่รอดชีวิตมีการเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไป โดยบางชิ้นส่วนพัฒนาเกิดเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีสีเหลืองเพียงอย่างเดียว และบางชิ้นส่วนพัฒนาเกิดเป็น SE ที่มีสีเขียวร่วมกับการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วย ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นของ EMS ให้ผลที่แตกต่างกัน โดยที่ EMS เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการเกิด SE ร่วมกับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 77.78 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Qin และคณะ (2011) นำเอ็มบริโอที่เจริญมาจากอับละอองเกสรของโลควอตมาทรีตในสารละลาย EMS พบว่า EMS เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เอ็มบริโอที่รอดชีวิตเกิดการสร้างเอ็มบริโอใหม่สูงสุดคือ 46.8 เปอร์เซ็นต์และมีการพัฒนาต่อไป และจากการศึกษาของปวีณา (2541) นำชิ้นส่วนใบของคำฝอยจุ่มแช่ในสารละลาย EMS พบว่า EMS เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อสูง แต่ก็สามารถเกิดแคลลัสได้มาก และแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นยอดต่อไป

สำหรับการศึกษานี้เมื่อแยก SE มาเพาะเลี้ยงต่อไปนั้นพบว่า ในกรณีของ SE ที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS นั้น SE ไม่สามารถพัฒนาการเกิด SSE เลย แต่สำหรับในกรณีของ SE ที่เจริญมาจากชิ้นส่วน SE ที่มีการหั่นและผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS นั้น มีเพียงความเข้มข้นของ EMS 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการสร้าง SSE สอดคล้องกับการศึกษาของ Qin และคณะ (2011) ทรีตเอ็มบริโอที่เจริญมาจากอับละอองเกสรของโลควอตในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าการจุ่มแช่ด้วย EMS เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที ส่งผลให้เอ็มบริโอที่รอดชีวิตสามารถสร้างเอ็มบริโอใหม่ชุดที่สองได้จำนวน 5.05 เอ็มบริโอและมีการพัฒนาต่อไป สำหรับ SE ปาล์มน้ำมันที่ไม่มีการสร้าง SSE แต่จะมีการสร้างยอดขึ้นมา โดยในกรณีของ SE ที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS นั้น ความเข้มข้นของ EMS ที่มีการส่งเสริมให้ SE เกิดการสร้างยอดเป็นจำนวนมากที่สุด คือ 0.25 เปอร์เซ็นต์ โดยเกิดยอดจำนวน 3.58 ยอดต่อชิ้นส่วน สำหรับในกรณีของ SE ที่มีการหั่นแล้วจุ่มแช่สารละลาย EMS นั้น พบว่า SE ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร EMS มีการเกิดยอดสูงสุดจำนวน 2.33 ยอด และที่ระดับความเข้มข้นของ EMS สูงขึ้นส่งผลให้ชิ้นส่วน SE มีการสร้างยอดที่น้อยลง สอดคล้องกับการศึกษาของปวีณา (2541) พบว่าแคลลัสคำฝอยที่เกิดจากการจุ่มแช่ชิ้นส่วนใบในสารละลาย EMS ความเข้มข้นสูงขึ้น ส่งผลให้แคลลัสจะมีการพัฒนาไปเป็นยอดได้น้อยลง และนอกจากนี้ในการทดลองทั้งสองกรณี และยังพบอีกว่า SE บางชิ้นส่วนจะมีลักษณะผิดปกติ โดยบางชิ้นส่วนมีการสร้างรากเพียงอย่างเดียว บางชิ้นส่วนมีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไป และมีสีน้ำตาลหรือดำ ไม่สามารถพัฒนาเจริญเป็นต้นกล้าได้ต่อไปได้ โดย SE ที่ผิดปกติจะมีจำนวนมากขึ้นตามความเข้มข้นของ EMS ที่สูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็น

เพราะชิ้นส่วนพืชได้รับสาร EMS ความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูงจนเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืช ถ้าใช้ความเข้มข้นของสารเคมีและระยะเวลาที่ชิ้นส่วนพืชได้รับสารไม่เหมาะสม อาจทำให้พืชไม่พัฒนาและตายได้ สอดคล้องกับการรายงานของ McManus และคณะ (2007) ที่ได้นำละอองเรณูของยูคาลิปตัสมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่งผลให้มีอัตราการงอกของละอองเรณูเพียง 6.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับส่วนที่เหลือไม่เกิดการพัฒนาต่อไป และตายในที่สุด และจากการศึกษาของยุพาภรณ์และสมปอง (2551) พบว่าแคลลัสที่ได้รับสาร EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่สูง ส่งผลให้แคลลัสไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ เกิดเป็นกลุ่มเซลล์สีน้ำตาลหรือดำ และมีการปล่อยสารประกอบฟีนอลออกมา

3. การตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าในหลอดทดลอง

สำหรับผลของ EMS ต่อลักษณะทางสัณฐานของต้นปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง พบว่า ต้นกล้าที่พัฒนามาจาก SE ที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ทุกความเข้มข้นมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นในชุดควบคุม โดยเฉพาะที่ EMS ความเข้มข้นสูง ส่งผลให้ต้นกล้ามีความสูงลดน้อยลง สอดคล้องกับการศึกษาของ Dhakshanamoorthy และคณะ (2010) พบว่า ต้นสบู่ดำที่เจริญมาจากเมล็ดที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS มีความสูงของต้นน้อยกว่าต้นในชุดควบคุม โดยเมื่อความเข้มข้นของ EMS สูงขึ้น ส่งผลให้ต้นกล้าสบู่ดำมีความสูงของต้นที่น้อยลงเช่นกัน นอกจากความสูงของต้นกล้าแล้ว ยังพบอีกว่าใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่เจริญมาจาก SE ที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS มีลักษณะที่แตกต่างไปจากต้นในชุดควบคุม โดยใบของต้นกล้าที่เจริญมาจาก SE ที่ไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS มีขนาดเล็ก แต่ใบของต้นที่พัฒนามาจาก SE ที่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สาร EMS มีขนาดของใบที่ใหญ่ มีสีเขียวเข้ม หยิก และหนามากกว่าต้นในชุดควบคุม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะต้นที่เจริญมาจาก SE ที่หั่น ได้รับสาร EMS ผ่านทางบาดแผลในปริมาณที่มากกว่า SE ที่ไม่หั่น จึงทำให้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงส่วนต่างๆ ของต้นได้มากกว่าต้นที่เจริญมาจาก SE ที่ไม่มีการหั่น และในทั้งสองกรณีพบว่า ต้นกล้าในทุกความเข้มข้นของ EMS มีจำนวนใบมากกว่าต้นในชุดควบคุมโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของ EMS สูง สอดคล้องกับการศึกษาของ ปวีณา (2541) ที่ได้ศึกษาความแปรปรวนของต้นคำฝอยเจริญมาจากแคลลัสที่เกิดจากการจุ่มแช่ชิ้นส่วนใบสารละลาย EMS ในช่วงความเข้มข้น 0.2-1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ต้นคำฝอยที่พัฒนามาจากแคลลัสที่เกิดจากการจุ่มแช่ชิ้นส่วนใบสารละลาย EMS มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างไปจากต้นปกติ ได้แก่ ลำต้นเตี้ย ใบอวบน้ำ รูปร่างใบบิดเบี้ยวและกลมมน

มากขึ้น มีความกว้างของใบลดลง โดยลักษณะความแปรปรวนที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสาร EMS ที่เพิ่มสูงขึ้น

นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจาก SE ที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ทุกความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25–1 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างช่อดอก รวมถึงต้นที่ไม่ได้รับสาร EMS ก็มีการสร้างช่อดอกด้วยเช่นกัน แต่มีจำนวนน้อยกว่า ซึ่งการออกดอกในหลอดทดลองนั้นถือเป็นความแปรปรวนที่เกิดขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (somaclonal variation) (Larkin and Scowcroft, 1981) โดยมีสาเหตุสำคัญมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Bonnet-Masimbert and Zaerr, 1987) หรือสารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงพืช (Bernier *et al*., 1993) โดย Nizam และ Te-Chato (2012) รายงานว่าการออกดอกของต้นปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองนั้น เป็นวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นใหม่ สามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปได้ ซึ่งกรณีในการทดลองนี้อาจมีผลมาจากอิทธิพลของ EMS ร่วมด้วย โดยพบว่า ที่ความเข้มข้นของ EMS สูง ได้แก่ 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้ต้นกล้าเกิดช่อดอกมากที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Dhakshanamoorthy และคณะ (2010) ที่พบว่าความเข้มข้นของ EMS 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ต้นสบู่ดำมีการสร้างดอกสูงสุดเฉลี่ย 232.66 ดอกต่อช่อดอก และจากการศึกษาของปวีณา (2541) พบว่าต้นคำฝอยที่เจริญจากแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบที่ผ่านการจุ่มแช่สาร EMS สามารถออกดอกในหลอดทดลองได้ โดยเมื่อนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำรากเป็นเวลา 40-42 วัน ต้นคำฝอยจะเริ่มทยอยออกดอก โดยในระยะแรกดอกอ่อนมีสีเหลือง และเมื่อดอกแก่จะเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง โดย Tisserat และ Galletta (1993) รายงานว่า การออกดอกถือเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนควบคุมโดยการรวมกันของปัจจัยทั้งด้านสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม ดังนั้นเพื่อให้เกิดความแม่นยำในการตรวจสอบความแปรปรวนที่เกิดจากการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สาร EMS จึงได้นำเครื่องหมาย SSR มาใช้เพื่อตรวจสอบผลของ EMS ต่อการแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้รับสาร EMS เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสาร EMS ทั้งต้นที่มีและไม่มีการสร้างช่อดอก

เครื่องหมาย SSR เป็นเครื่องหมายที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด เนื่องจากไม่มีอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องและสามารถตรวจสอบลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนด้อยหรือลักษณะที่ไม่สามารถตรวจสอบโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานภายนอกได้ ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เพื่อระบุเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพืชในหลากหลายชนิดเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังนำมาเป็นฐานข้อมูลสำคัญเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงนำมาใช้เพื่อการจดทะเบียนพันธุ์พืชและใช้ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในปาล์มน้ำมันมีการใช้เครื่องหมาย

SSR ในการศึกษาด้านต่างๆ เช่น การตรวจสอบการเป็นลูกผสมเทเนอรา (Thawaro and Techato, 2010) การตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (สกุลรัตน์, 2553) และการทำแผนที่ยีน (Billotte *et al*., 2005) เป็นต้น สำหรับการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ผ่านการทรีตสาร EMS นั้น ส่วนใหญ่มีรายงานการตรวจสอบโดยการใช้เครื่องหมาย RAPD ในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง (Hofmann *et al*., 2004) สบู่ดำ (Dhakshanamoorthy *et al*., 2010) กล้วย (Bidabadi *et al*., 2012) และโลควอต (Qin *et al*., 2011) เป็นต้น และการตรวจสอบโดยการใช้เครื่องหมาย SSR เช่น กล้วย (Sadat and Hoveize, 2012) และข้าวสาลี (Javed *et al*., 2012) แต่ยังไม่มีรายงานการตรวจสอบปาล์มน้ำมันที่ผ่านการทรีตสาร EMS

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านการทรีตสาร EMS โดยใช้เครื่องหมาย SSR ด้วยไพรเมอร์ 9 คู่ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 ให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของแต่ละไพรเมอร์ยังไม่ค่อยคมชัด อาจเป็นเพราะดีเอ็นที่สกัดได้ไม่สะอาด และพบว่ามีเพียงไพรเมอร์ EgCIR0465 เท่านั้นที่ให้แถบดีเอ็นเอเป็นแบบ polymorphism ในขณะที่ไพรเมอร์อื่นๆ ที่เหลือ ให้แถบดีเอ็นเอเป็นแบบ monomorphism สอดคล้องกับการศึกษาของ Sodat และ Hoveize (2012) พบว่าการใช้ไพรเมอร์ mSSCIR47 และ SMC222CG สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์กลาย (mutant line) ที่เกิดจากการได้รับสาร EMS ของกล้วยพันธุ์ CP48-103 และ CP57-614 ได้ Ansari และคณะ (2012) พบว่ามีหลายไพรเมอร์ที่สามารถใช้ตรวจสอบ mutant line ของข้าวสาลี ที่เกิดจากการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ได้ โดยไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแบบ polymorphism ได้แก่ Xbarc37 Xbarc113 Xcfd62 Xcfa2170 Xgwm135 และ Xwmc470 และจากการศึกษาของนฤมล และมณฑิรา (2552) ได้ตรวจสอบรูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นข้าวที่ได้รับสาร EMS โดยใช้ ไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 40 ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียง 2 ไพรเมอร์ คือ S36 และ S38 ที่ให้แถบดีเอ็นเอเป็นแบบ polymorphism

จากการศึกษาแถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่างจากแถบดีเอ็นของตัวอย่างอื่นๆ นั้น เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นปาล์มน้ำมันที่มีการสร้างช่อดอกในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นต้นที่เจริญมาจาก SE ทั้งที่หั่นและไม่หั่นแล้วจุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าเป็นความเข้มข้นที่สูง จึงส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ ซึ่งจากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 9 คู่ ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านการจุ่มแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ นั้น มีเพียงไพรเมอร์ 1 คู่

เท่านั้นที่สามารถแยกความแตกต่างของต้นปาล์มน้ำมันที่มีพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปในลักษณะการออกดอกในหลอดทดลองจากการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากสาร EMS ได้ ดังนั้นในขั้นต้นสามารถที่จะใช้ไพรเมอร์นี้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบความผิดปกติของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อนอนุบาลลงดินปลูกเพื่อป้องกันความเสียหายจากการปลูกสร้างสวนปาล์มน้ำมันได้ และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบสายพันธุ์กลายในลักษณะนี้และลักษณะอื่นๆ ควรมีการหาไพรเมอร์อื่นมาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนให้มากขึ้น เพื่อบ่งบอกลักษณะที่แปรปรวนที่เกิดจากการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สาร EMS ได้ชัดเจนมากขึ้น

บทที่ 5

สรุป

1. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน

การนำโซมาติกเอ็มบริโอมาสร้างบาดแผล โดยการหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 2.35 เอ็มบริโอต่อหลอด

2. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสาร EMS

การนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่มีการหั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0-1 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถหาค่า LD_{50} ได้ แต่ต้นกล้ามีลักษณะทางสัณฐานที่ต่างจากต้นในชุดควบคุมคือ มีจำนวนใบที่มากกว่าต้นในชุดควบคุม แต่มีขนาดของใบที่เล็กและมีการเจริญเติบโตของต้นที่ช้ากว่าต้นควบคุม และพบว่าที่ EMS เข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้มีการสร้างช่อดอกในหลอดทดลอง โดยที่ EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ให้การสร้างช่อดอกมากที่สุด 40 เปอร์เซ็นต์

การนำโซมาติกเอ็มบริโอที่มีการหั่นและผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS สามารถหาค่า LD_{50} ได้ คือ 0.81 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งชิ้นส่วนที่รอดชีวิตมีการพัฒนาเป็นทั้งแคลลัสและเกิดเป็นโซมาติกเอ็มบริโอใหม่ โดยที่ EMS เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการเกิด SE ร่วมกับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมากที่สุด คือ 77.78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเจริญเป็นต้นกล้ามีลักษณะทางสัณฐานที่ต่างจากต้นในชุดควบคุมคือ มีลักษณะใบที่หนา หยิก มีสีเขียวเข้ม มีจำนวนใบที่มากและขนาดใหญ่กว่าต้นในชุดควบคุม มีการเจริญเติบโตของต้นที่ช้ากว่าต้นในชุดควบคุม และยังพบว่าต้นมีการสร้างช่อดอกในทุกความเข้มข้นของ EMS โดยที่ EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์มีการสร้างช่อดอกมากที่สุด คือ 50 เปอร์เซ็นต์

3. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าในหลอดทดลอง

การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่เจริญจาก SE ที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่ พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ EgCIR0465 ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphism ที่จำเพาะขนาด 275 bp โดยเป็นดีเอ็นเอของต้นกล้าที่มีการสร้างช่อดอกที่เจริญจาก SE ทั้งที่มีการหั่นและไม่หั่นและผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

กนกพร บุญศิริชัย กาญจนา กล้าแข็ง วไลลักษณ์ แพทย์วิบูลย์ ศิริลักษณ์ ชูแก้ว และวรารัตน์ คาหวาน. 2553. การตอบสนองต่อช่วงแสงและพันธุศาสตร์ของข้าวหอมสายพันธุ์กลายออกรวงเร็วจากการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยอนุภาคนิวตรอนเร็ว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41 (พิเศษ): 241-244.

กาญจนี ทองเทพ. 2553. ปัจจัยทางกายภาพและเคมีต่อการเจริญและพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ขวัญใจ พิพัฒน์เจริญวงศ์ วิภาวี ชั้นโรจน์ สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2552. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSRs ของปาล์มน้ำมันจากเหมืองข้อมูล ESTs. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี.

จรัสศรี นวลศรี. 2548. การปรับปรุงพันธุ์พืชสวน. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธนวดี พรหมจันทร์. 2551. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต้นปาล์มน้ำมันที่พัฒนาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2554. การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ ชัยรัตน์ นิลนนท์ ธีระพงศ์ จันทรนิยม ประกิจ ทองคำ และหะสัน กือมะ. 2543. เอกสารประกอบการฝึกอบรม การจัดการสวนปาล์มน้ำมัน. สงขลา: คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธัญญาพร สุสานนท์. 2548. การกลายพันธุ์ของดอกหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโนที่ผ่านการชักนำด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต. วารสารสงขลานครินทร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 27: 675-682.

นฤมล ประครองรักษ์ และมณฑิรา มณฑาทอง. 2552. ผลของ EMS ต่อการตอบสนองต่อความเครียดเกลือของข้าวขาวดอกมะลิ 105. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 12-13 กุมภาพันธ์ 2552 หน้า 1545-1552.

นพพร สายมพล. 2543. เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปวีณา นวมเจริญ. 2541. ความแปรปรวนที่ได้จากการชักนำด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคำฝอย *carthamus tinctorius*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2549. ผู้ยิ่งใหญ่แห่งปาล์มน้ำมัน. วารสารเคหการเกษตร 11: 76-98.

พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์ และศุกระกาญจน์ ศรีบุญ. 2553. การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดของไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์. รายงานผลการวิจัย. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ยุพาภรณ์ ศิริโสม และสมปอง เตชะโต. 2551. ผลของเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ต่ออัตราการรอดชีวิต และการสร้างยอดรวมของกล็อกซิเนีย (*Sinningia speciosa*) ในหลอดทดลอง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 39 (พิเศษ): 223-226.

ยุวดี มานะ และศุจิรัตน์ สงวนศิริกุล. 2553. พันธุ์ สารออกฤทธิ์สำคัญ และผลของสารสำคัญในกวาวเครือขาว.รายงานการวิจัย. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุนย์วิจัยกสิกรไทย. 2556. ทิศทางอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มโลกกับความท้าทายที่ผู้ผลิตหลักในอาเซียนต้องเร่งปรับตัว. เข้าถึงได้จาก http://www.thanonline.com/index.php?option=com_ content&view=article&id=181896&catid=176&Itemid=524#. U2szC_ mSw6A (เข้าถึงเมื่อ 8 พฤษภาคม 2557).

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์. 2553. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

สมปอง เตชะโต. 2541. การชักนำการกลายพันธุ์ในมังคุด: การตรวจสอบความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อความสามารถในการสร้างแคลลัส. วารสารแก่นเกษตร 26: 184-194.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5: 37-58.

อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ และธีระพงษ์ บุญปรก. 2554. การคัดเลือกพันธุ์สบู่ดำเพื่อเพิ่มผลผลิตโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้วยสาร Ethyl Methane Sulfonate. วารสารแก่นเกษตร 39 (พิเศษ): 334-338.

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.

Ansari, M. J., Kumar, R., Singh, K. and Dhaliwal, H. S. 2012. Characterization and molecular mapping of EMS-induced brittle culm mutants of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). Euphytica 186: 165–176.

Balzon, T. A., Luis, Z. G. and Scherwinski-Pereira, J. E. 2013. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant 49: 41–50.

Berenschot, A. S., Zucchi, M. I., Neto, A. T. and Quecini, V. 2008. Mutagenesis in *Petunia x hybrida* Vilm. and isolation of a novel morphological mutant. Brazilian Journal of Plant Physiology 20: 95-103.

Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean , A. and Lejeune, P. 1993. Physiological signals that induce flowering. Plant Cell 5: 1147–1155.

Bidabadi, S. S., Meon, S. Wahab, Z., Subramaniam, S. and Mahmood, M. 2012. Induced mutations for enhancing variability of banana (*Musa* spp.) shoot tip cultures using ethyl methanesulphonate (EMS). Australian Journal of Crop Science 6: 391-401.

Billotte, N., Marseillac, N., Risterucci, A. M., Adon, B., Brottier, P., Baurens, F. C., Singh, R., Herra, A., Asmady, H., Billot, C., Amblard, P., Durand-Gasselin, T., Courtois, B., Asmono, D., Cheah, S. C., Rohde, W., Ritter, E. and Charrier, A. 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Theoretical and Applied Genetics 110: 754-765.

Bonnet-Masimbert, M. and Zaerr, J. B. 1987. The role of plant growth regulators in promotion of flowering. Plant Growth Regulation 6: 13-35.

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 Reports 17: 515-521.

Devi, A. S. and Mullainathan, L. 2012. The use of ethyl methanesulfonate to study the flower development in *Capsicum annuum* L. mutants. Botany Research International 5: 4-9.

Dhakshanamoorthy, D., Selvaraj, R. and Chidambaram, A. 2010. Physical and chemical mutagenesis in *Jatropha curcas* to induce variability in seed germination, growth and yield traits. Romanian Journal of Biology Plant biology 55: 113–125.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N. and Rival, A. 2003. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. Plant Cell Reports 21: 517-524.

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 guineensis* Jacq.). Songklanakarin Journal of Science and Technology 27: 630-635.

Hofmann, N. E., Raja, R., Nelson, R. L. and Korban, S. S. 2004. Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers. Biologia Plantarum 48: 173-177.

Hohmann, U., Jacobs, G. and Jung, C. 2005. An EMS mutagenesis protocol for sugar beet and isolation of non-bolting mutants. Plant Breeding 124: 317-321.

IAEA. 1977. Manual on mutation breeding. Technical reports speries no. 119. 2nd edition. Joint FAO/IAEA division of Atomic Energy in Food and Agriculture. Vienna, Austria.

Ince, A. G., Karaca, M. and Onus, A. N. 2009. Polymorphic microsatellite markers transferable across *Capsicum* species. Plant Molecular Biology Reporter 28: 285-291.

Kanchanapoom, K. and Domyoas, P. 1999. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. Science Asia 25: 193-200.

Konan, E. E., Durand, G. T., Kouadio, J. Y., Flori, A. and Rival, A. 2006. A modeling approach of the *in vitro* conversion of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryo. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 99-112.

Kumar, K., Gill, M. I. S., Kaur, H., Choudhary, O. P. and Gosal, S. S. 2010. *In vitro* mutagenesis and somaclonal variation assisted salt tolerance in 'Rough Lemon' (*Citrus jambhiri* Lush.). European Journal of Horticultural Science 75: 233–238.

Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics 60: 197-214.

Latado, R. R., Adames, A. H. and Neto, A. T. 2004. *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethane sulphonate (EMS) in immature floral pedicels. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 103–106.

Luan, Y., Zhang, J., Gao, X. and An, L. 2007. Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 88:77–81.

Malik, A. A., Cui, L., Zhang, S. and Chen, J. 2011. Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. Scientia Horticulturae 38: 27–34.

Manoj, K. R., Phulwaria, M., Gupta, A. K., Shekhawat, N. S. and Jaiswal, U. 2012. Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 111: 259–264.

Muthusamy, A. and Jayabalan, N. 2011. *In vitro* induction of mutation in cotton (Gossypium hirsutum L.) and isolation of mutants with improved yield and fiber characters. Acta Physiologiae Plantarum 33: 1793–1801.

McManus, L. J., Sasse, J., Blomstedt, C. K. and Bossinger, G. 2007. The effects of ethyl methanesulfonate treatment on *Eucalyptus* pollen behaviour *in vitro*. Trees 21: 379–383.

Muthusamy, A. and Jayabalan, N. 2011. *In vitro* induction of mutation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and isolation of mutants with improved yield and fiber characters. Acta Physiologiae Plantarum 33: 1793–1801.

Naderi, R., Jalali, N., Babalar, M., Mirmasoumi, M. 2012. Estimate of callus induction and somatic embryogenesis in cyclamen. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 4: 699-702.

Naik, P. M., Praveen, N., Manohar, S. H. and Murthy, H. N. 2012. Effect of mutagens on the *in vitro* adventitious shoot growth and bacoside A accumulation in *Bacopa monnieri* (L.). International Journal of Pharma and Bio Sciences 3: 848 – 855.

Nizam, K. and Te-Chato, S. 2012. *In vitro* flowering and fruit setting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Journal of Agricultural Technology 8: 1079-1088.

Osorio, J., Fermandez- Martinez, J. and Mancha, G. 1995. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. Crop Science 35: 739-742.

Osorio, M., Gámez, E., Molina, S. and Infante, D. 2012. Evaluation of cassava plants generated by somatic embryogenesis in different stages of development using molecular markers. Electronic Journal of Biotechnology 4: 1-11.

Othmani, A., Bayoudh, C., Drira, N., Marrakchi, M. and Trifi, M. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm, *Phoenix dactylifera* L. cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryo callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 97: 71-79.

Powell, W., Machray, C. and Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeat. Trends in Plant Science 1: 215-222.

Qin, H. M., Wang, Y. Q. and Hou, C. X. 2011. Effect of ethyl methanesulfonate (EMS) in *in vitro* mutation on anther-derived embryos in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). African Journal of Agricultural Research 6: 2450-2455.

Sadat, S. and Hoveize, M. S. 2012. Mutation induction using ethyl methanesulfonate (EMS) in regenerated plantlets of two varieties of sugarcane CP48-103 and CP57-614. African Journal of Agricultural Research 7: 1282-1288.

Santarem, E. R., Pelissier, B. and Finer, J. J. 1997. Effect of explants orientation, pH solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology Plant 33: 13-19.

Singh, K. P., Singh, B., Raghava, S. P. S. and Kalia, C. S. 2000. Induced flower colour mutations in carnation through *in vitro* application of chemical mutagen. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 60: 535-539.

Sung, Z. R. 1976. Mutagenesis of culture plant cells. Genetics 8: 51-57.

Te-chato, S. 1998a. Callus induction from cultured zygotic embryo of oil palm subsequent to plantlet regeneration. Songklanakarin Journal of Science and Technology 20: 1-6.

Te-chato, S. 1998b. Fertile plant from young leaves-derived somatic embryo of oil palm. Songklanakarin Journal of Science and Technology 20: 7-13.

Te-chato, S. 2002. Improve callus induction and embryogenic callus formation from cultured young leaves of oil palm seedling. Thai Journal Agricultural Science 35: 407-413.

Te-chato, S., Susanon, T. and Sontikun, Y. 2006. Cultivar, explant type and culture medium influencing embryogenesis and organogenegenesis in *Anthurium* spp. Songklanakarin Journal of Science and Technology 28: 717-122.

Thawaro, S. and Te-chato, S. 2010. Verification of legitimate tenera oil palm hybrids using SSR and propagation of hybrids by somatic embryogenesis. Songklanakarin Journal of Science and Technology 32: 1-8.

Tisserat, B. and Galleta, P. D. 1993. Flower organ culture. In: J. W. Pollard and J. M. Walker (eds.), Method in molecular biology vi. Human, New, 1990: 113-120.

Vagera, J., Novotný, J. and Ohnoutková, L. 2004. Induced androgenesis *in vitro* in mutated populations of barley, *Hordeum Vulgare.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 55–61.

Venkataiah, P., Christopher, T. and Karampuri, S. 2005. Selection of atrazine-resistant plants by *in vitro* mutagenesis in pepper (*Capsicum annuum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 75–82.

Xu, Y. W., Zeng, J. W., Zou, Y. T., Husaini, A. M., Yao, R. Y., Wu, D. G. and Wu, W. 2011. Combined effect of dark and wounding on regeneration potential of *Houttuynia cordata* Thunb. leaves. Indian Journal of Experimental Biology 49: 540-546.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	สูตร MS	สูตร OPCM
ธาตุอาหารหลัก		
NH_4NO_3	1,650.000	1,025.000
KNO_3	1,900.000	800.000
KH_2PO_4	170.000	170.000
$CaCl_2.2H_2O$	440.000	
$MgSO_4.7H_2O$	370.000	
ธาตุอาหารรอง		
KI	0.830	0.415
K_2SO_4		495.000
H_3BO_3	6.200	6.2000
$MnSO_4.H_2O$	16.900	16.900
$ZnSO_4.7H_2O$	10.600	9.600
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	3.138
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250	0.250
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.0125
$FeSO_4.7H_2O$	27.800	27.800
Na_2EDTA	37.300	37.300
สารอินทรีย์		
Myo-inositol	100.000	100.000
Nicotinic acid	0.500	0.500
Pyridoxine HCl	0.500	0.500
Thaiamine HCl	0.100	0.550
Glycine	2.000	2.000
Sucrose (กรัม)	30.000	30.000
วุ้น(กรัม)	7.500	7.500
pH	5.700	5.700

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ และสารละลายอื่น ๆ

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) และการทำ Agarose gel electrophoresis

1. TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	500	ไมโครลิตร
0.1 EDTA (pH 8.0)	200	ไมโครลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	500	มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. SDS ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

SDS	5	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	50	มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. Ammonium acetate ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ammonium acetate	38.54	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ก่อนนำไปกรองด้วยมิลลิพอร์

4. Ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ethidium bromide	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

5. TAE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	121.1	กรัม
Acetic acid	28.5	มิลลิลิตร
0.5 M Na_2 EDTA (pH 8.0)	50	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

6. TBE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	54	กรัม
Boric acid	27.5	มิลลิลิตร
0.5 M Na_2 EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	1000	มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

7. DNA sample buffer

Bromophenol blue	125	มิลลิกรัมกรัม
Xylene cyaol FF	125	มิลลิกรัมกรัม
Glycerol	15.0	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	50	มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สารเคมีที่ใช้ในการทำ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

1. 30% Acrylamide Bis-Acrylamide solution ที่ผสมแล้วในอัตราส่วน 29:1 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. 6% polyacrylamine gel (Acrylamide : Bis-Acrylamide = 29:1) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

30% Acrylamide Bis-Acrylamide solution (29:1)	60	มิลลิลิตร
5x TBE	60	มิลลิลิตร
Urea	135	กรัม
น้ำกลั่น	105	มิลลิลิตร

3. TBE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tri Base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 M Na2EDTA (pH 8.0)	20	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า

4. 10% (w/v) Ammonium persulfate (APS) เตรียมปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Ammonium persulfate	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	10	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. 6x gel loading buffer (สำหรับ denaturing polyacrylamide gel) เตรียมปริมาตร 1มิลลิลิตร

Formamide	950	ไมโครลิตร
5% Bromophenol blue	10	ไมโครลิตร
5% Xylene cyanol	10	ไมโครลิตร
1 M EDTA	20	ไมโครลิตร

ควรแบ่งสารละลายใส่หลอดเล็ก แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. Bind silane สำหรับทากระจกแผ่นหลังติดกับเจล

Bind silane	1.0	ไมโครลิตร
Glacial acetic acid	2.5	ไมโครลิตร
95% Ethanol	500	ไมโครลิตร

สารเคมีที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอด้วย Silver nitrate

1. Fixative และ Stop solution (10% Acetic acid) เตรียมปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1,000	มิลลิลิตร

2. 0.2% Silver nitrate เตรียมปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Silver nitrate	2.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. Develop solution เตรียมปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Sodium carbonate	25.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขณะใช้ให้เติม 40% Fomaldehyde 500 ไมโครลิตร และ Sodium thiosulfate เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 2 ไพรเมอร์ SSR ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

Primer name	5’ → 3’ Forward primer	5’ → 3’ Reveres primer
EgCIR0008	CGGAAAGAGGGAAGATG	ACCTTGATGATTGATGTGA
EgCIR0243	TGGAACTCCTATTTACTGA	GCCTCGTAATCCTTGTCA
EgCIR0337	GTCTGCTAAAACATCAACTG	GAGGAGGAGGGGAACGATAA
EgCIR0409	AGGGAATTGGAAGAAAAGAAAG	TCCTGAGCTGGGGTGGTC
EgCIR0446	CCCCTTCGAATCCACTAT	CAAATCCGACAAATCAAC
EgCIR0465	TCCCCCACGACCCATTC	GGCAGGAGAGGCAGCATTC
EgCIR0781	CCCCTCCCTACCACGTTCCA	TGTTTGCTGTTGCTCTTTGATTTTC
EgCIR0905	CACCACATGAAGCAAGCAGT	CCTACCACAACCCCAGTCTC
EgCIR1172	CTTCCATTGTCTCATTATTCTCTTA	ACCTTGTATTAGTTTGTCCA

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวชญานีย์ สังวาลย์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5510620006

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) เกียรตินิยมอันดับสอง	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2553

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

1. ทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
2. ทุนสนับสนุนการผลิตบัณฑิต สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. ทุนสนับสนุนสถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ
4. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
5. ทุนภายใต้ความร่วมมือ (MOU) ระหว่างคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์กับมหาวิทยาลัยมิยาซากิ ประเทศญี่ปุ่น

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ชญานีย์ สังวาลย์ และสมปอง เตชะโต. 2557. ผลของเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ต่ออัตราการรอดชีวิตของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวและการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1: 14-20.

ชญานีย์ สังวาลย์ และสมปอง เตชะโต. 2557. การพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน หลังการทรีตด้วยเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS). วารสารแก่นเกษตร. 42(3) (พิเศษ): 397-402.

ชญานีย์ สังวาลย์ และสมปอง เตชะโต. 2558. การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการทรีตด้วยเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ด้วยเครื่องหมาย SSR. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ (อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์).