การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทอเนอราโดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและการตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

Propagation of Hybrid Tenera of Oil Palm by Embryogenic Cell Suspension Culture and Evaluation of Genetic Variation by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker

ทรรศณีย์ นิยะกิจ

Tassanee Niyakid

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
2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทอเนอราโดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและการตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

ผู้เขียน นางสาวทรรศณีย์ นิยะกิจ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

…….. ……ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

……กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทอเนอราโดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและการตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

ผู้เขียน นางสาวทรรศณีย์ นิยะกิจ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 ±2 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักสดแคลลัส 315 มิลลิกรัม และให้จำนวนเอ็มบริโอสูงสุด 13.2 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง เป็นเวลา 1 เดือน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นได้ โดยย้ายลงในอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.41 มิลลิลิตร เมื่อพิจารณาถึงแหล่งคาร์บอนที่เติมในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า น้ำตาลซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo: SE) สูงสุด 5.6 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ หลังจากนั้นนำแคลลัสเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการทดลองเบื้องต้น มาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) พบว่า ไพรเมอร์ OPT-06 OPAB-01 OPAB-09 และ OPAB-14 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน และมีความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอสูง โดยลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นลักษณะ monomorphism ทั้งหมด ไม่พบความแปรปรวนของแถบดีเอ็นเอดังกล่าว ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน รวมทั้งสามารถนำ

เทคนิคทางชีวโมเลกุลนี้ไปใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันต่อไปได้

Thesis Title	Propagation of Hybrid Tenera of Oil Palm by Embryogenic Cell Suspension Culture and Evaluation of Genetic Variation by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker
Author	Miss Tassanee Niyakid
Major Program	Plant Science
Academic Year	2011

ABSTRACT

Propagation of hybrid tenera of oil palm through embryogenic callus (EC) on solidified Murashige and Skoog (MS) medium, supplemented with different concentrations of plant growth regulators (PGRs), found that 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) at concentration of 0.3 mg/l and 200 mg/l ascorbic acid under 14 h photoperiod at 28 ± 2°C gave the highest callus fresh weight, at 315 mg. The number of somatic embryos (SE) in embryogenic callus obtained in this medium was 13.2 SEs/culture after one month of culture. Embryogenic cell suspension was successfully established by transferring embryogenic callus maintained on the same culture medium to the liquidified MS medium supplemented with dicamba at concentration of 0.3 mg/l and 200 mg/l ascorbic acid. The highest increment of packed cell volume (PCV) of embryogenic cell suspension was 2.41 ml after one month of culture. In the case of carbon source, 0.2 M sorbitol gave the highest number of somatic embryo at 5.6 SEs/cultured flask after one month of culture. Evaluation of somaclonal variation of the callus cell suspension and SE by random amplified polymorphic DNA (RAPD) techniques revealed that primer OPT-06 OPAB-01 OPAB-09 and OPAB-14 provided clear DNA patterns and was classified as monomorphism. This result suggests that no somaclonal variations occur in either callus or SEs. The present study guarantees that our protocol could be applied for propagation of oil palm, and this marker could also be used for evaluation of somaclonal variations in the future.

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(6)
สารบาญ	(7)
รายการตาราง	(8)
รายการภาพประกอบ	(9)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(10)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	11
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	12
วัสดุ	12
อุปกรณ์	14
วิธีการ	16
3 ผล	20
4 วิจารณ์	29
5 สรุป	34
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	44
ประวัติผู้เขียน	49

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	24
2	ความเหมาะสมของไพรเมอร์ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ บนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์	27

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพาะ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 0.17 โมลาร์ และกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร	12
2	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน	21
3	แคลลัสที่ชักนำได้จากอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกันหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา1 เดือน (บาร์ 3 มิลลิเมตร)	22
4	ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ในอาหารเหลวสูตร MS และ Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 0.17 โมลาร์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	23
5	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 0.17 โมลาร์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)	23
6	โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)	25
7	การประเมินปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนแคลลัสเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันที่สกัดตามวิธีการของ Te-chato (2000) เปรียบเทียบกับ ς DNA	26
8	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อทำการแยกขนาดด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) OPT - 06 (ข) OPAB - 01 (ค) OPAB - 09 และ (ง) OPAB - 14	28

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดยืนต้น เป็นพืชผสมข้ามที่มีช่อดอกตัวเมียและตัวผู้อยู่บนต้นเดียวกัน แต่ช่วงเวลาการออกดอก หรือการบานไม่พร้อมกัน และเป็นพืชดิพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=32 ปาล์มน้ำมันมีถิ่นกำเนิดในทวีปอัฟริกา แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ *Elaeis guineensis Elaeis oleifera* และ *Elaeis odora* ทั้งนี้ปาล์มน้ำมันชนิด *E. guineensis* สามารถจำแนกได้ 3 แบบ (types) คือ ดูรา (Dura) ผลมีกะลาหนาถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ พิสิเฟอรา (Pisifera) ผลไม่มีกะลาถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ และเทเนอรา (Tenera) ผลมีกะลาบางถูกควบคุมด้วยยีนพันธุ์ทาง 1 คู่ เกิดจากการผสมระหว่างดูรากับพิสิเฟอรา มีเปลือกสำหรับอัดน้ำมันมาก และให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง เป็นชนิดที่มีความสำคัญพืชทางเศรษฐกิจ (บุษบา, 2548) สภาพอากาศร้อนชื้น ใกล้เส้นศูนย์สูตร ดังนั้นปาล์มน้ำมันจึงเจริญเติบโตได้ดีในภาคใต้ของประเทศ พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่บริเวณจังหวัดกระบี่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี สตูลและตรัง (สุรกิตติ, 2532) เป็นพืชชนิดเดียวที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยปลูกพื้นที่สูงกว่าพืชน้ำมันอื่น ๆ ทุกชนิด ซึ่งให้ผลผลิตน้ำมันดิบเฉลี่ย 4-5 ตันต่อเฮกตาร์ และอาจเพิ่มสูงถึง 7-8 ตันต่อเฮกตาร์ (Biofuel, 2007) แหล่งผลิตปาล์มน้ำมันหลักของโลกคือ ประเทศมาเลเซีย คิดเป็นประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ ของการผลิตทั่วโลก ผลผลิตปาล์มน้ำมันเฉลี่ยอยู่ที่ 3.75 ตันต่อเฮกตาร์ต่อปี ซึ่งสูงกว่าพืชตระกูลกระหล่ำ 2.5 เท่า และสูงกว่าถั่วเหลือง 7 เท่า ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ได้รับการส่งเสริมให้ปลูกเป็นการค้าโดยเฉพาะในภาคใต้ มีเนื้อที่ปลูกปาล์มน้ำมันที่สามารถให้ผลผลิตแล้ว 833,000 ล้านไร่ ในปี พ.ศ. 2536 เพิ่มขึ้นเป็น 1.6 ล้านไร่ ในปี พ.ศ. 2545 มีมูลค่าที่เกษตรกรขายได้ 9,202 ล้านบาท และมีปริมาณการส่งออกที่สูงขึ้นถึง 177,417 ตัน คิดเป็นมูลค่า 4,202 ล้านบาท (พรชัย, 2549) ในปี พ.ศ. 2547 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 1,935,000 ไร่ ให้ผลผลิต 2,6782 กิโลกรัมต่อไร่ จัดเป็นอันดับ 4 ของโลก รองจากมาเลเซีย อินโดนีเซีย และไนจีเรีย ประเทศไทยผลิตน้ำมันปาล์ม ในปี 2548 ได้ 685,000 ตัน จัดเป็นลำดับ 6 ของโลก รองจากมาเลเซีย อินโดนีเซีย ไนจีเรีย โคลัมเบีย และโกตดิวัวร์ (เปรมปรี, 2549) สำหรับอนาคตปาล์มน้ำมันมีบทบาทที่สำคัญ คือการผลิตไบโอดีเซล เนื่องมาจากสภาพวิกฤตด้านพลังงานที่มีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่ปี 2547 เป็นต้นมา ทำให้รัฐบาลต้องหันมาให้ความสำคัญใน

การผลิตปาล์มน้ำมัน เพื่อผลิตพลังงานทดแทนน้ำมันที่เรียกว่า “ไบโอดีเซล” ซึ่งนับเป็น 1 ในยุทธศาสตร์การแก้ไขปัญหาด้านพลังงานของประเทศ

แต่ละปีประเทศไทยต้องเสียงบประมาณนำเข้าน้ำมันไม่ต่ำกว่า 500,000 ล้านบาท และในปี 2555 รัฐบาลกำหนดเป้าหมายส่งเสริมการผลิตและการใช้ไบโอดีเซลให้ได้ร้อยละ 10 ของการใช้น้ำมันดีเซลทั้งหมดหรือจำนวน 8.5 ล้านลิตรต่อวัน และเป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืน (กระทรวงพลังงาน, 2549) ทั้งนี้การผลิตไบโอดีเซลมีความจำเป็นต้องใช้ปาล์มน้ำมันปริมาณมาก แต่ผลผลิตที่ได้ในแต่ละปีกลับไม่สม่ำเสมอ อีกทั้งพื้นที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันมีจำกัด รัฐบาลได้กำหนดยุทธศาสตร์การพัฒนาปาล์มน้ำมันเพื่อผลิตไบโอดีเซลปี 2549-2552 มีเป้าหมายเพื่อเพิ่มพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันจากเดิม 2.04 ล้านไร่ (กระทรวงพลังงาน, 2548) เป็น 6 ล้านไร่ และเพิ่มเป็น 10 ล้านไร่ในปี 2572 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) ทำให้ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่มีผู้ให้ความสนใจมากที่สุดในตอนนี้ นอกจากนำมาทำเป็นพลังงานทดแทนแล้วยังสามารถแยกให้บริสุทธิ์ เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด เช่น เนยเทียม ครีมเทียม นมข้นหวาน เครื่องอุปโภค เช่น สบู่ ผงซักฟอก เครื่องสำอาง น้ำมันหล่อลื่น พลาสติก บะหมี่สำเร็จรูป (อำพล, 2544) และอุตสาหกรรมโอเลโอเคมีคอล ซึ่งรวมถึงการผลิตเชื้อเพลิง (เมทานอล) เพื่อใช้กับเครื่องยนต์ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2540) ทำให้อุตสาหกรรมการแปรรูปปาล์มน้ำมันขยายตัวอย่างรวดเร็ว พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่เกษตรกรปลูกต้องเป็นพันธุ์ลูกผสม (ธีระ และคณะ , 2543) มีการพัฒนาความรู้ในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการต่างๆ ตั้งแต่การใช้เมล็ดหรือเอ็มบริโอ (เปรมปรี, 2549) อย่างไรก็ตาม การถ่ายทอดลักษณะของพันธุ์ดูราและพิสิเฟอราเป็นลักษณะข่มไม่สมบูรณ์ ทำให้เมล็ดจากโคนต้นปาล์ม มีความแปรปรวนสูง โดยเฉพาะลักษณะของผลปาล์ม ซึ่งมีการกระจายตัวของลูกผสมในชั่วที่ 2 จากการผสมตัวเองในต้นพันธุ์เทเนอราได้พันธุ์ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา ในอัตราส่วน 1:2:1 ตามลำดับ จึงไม่สามารถนำมาขยายพันธุ์ได้ จำเป็นต้องผลิตเมล็ดพันธุ์เทเนอราอยู่ตลอดเวลา ต้นพันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ต้องผ่านกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ ที่สามารถยืนยันได้ว่าให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูง และสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในแหล่งปลูกได้ดี รวมทั้งมีลักษณะทางการเกษตรอื่น ๆ ที่เหมาะสม เช่น มีการเจริญเติบโตด้านความสูงช้า ความยาวทางใบไม่สั้นหรือยาวเกินไป ลำต้นอวบสมบูรณ์ เป็นต้น การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยการเพาะเมล็ดมีวิธีการทำลายการพักตัวของเมล็ดที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 50-90 วัน และเก็บรักษาเมล็ดที่อุณหภูมิ 20-22 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน ก่อนที่จะแช่น้ำประมาณ 7 วัน จึงลงเพาะได้ (ธีระ และคณะ, 2548) และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ไปขยายต่อจะเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ส่งผลให้ผลผลิตต่อต้นไม่สม่ำเสมอ (ธีระ และคณะ,

2543) จากปัจจัยทั้งทางกายภาพ และเคมีที่ไม่เหมาะสมต่อการรงอกของเมล็ดซึ่งใช้เวลาค่อนข้างนาน และปาล์มน้ำมันมีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเท่านั้น ไม่มีการแตกหน่อ ทำให้ได้จำนวนต้นที่จำกัด (Rajesh *et al*., 2003) ดังนั้นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาใช้เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว

การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงเป็นอีกแนวทางหนึ่ง ในการเพิ่มผลผลิตปาล์มน้ำมัน แต่เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีมาตรฐานใช้ระยะเวลายาวนานหลายปี (สุจินต์และคณะ, 2530) ดังนั้นแนวทางในการขยายพันธุ์ หรือเพิ่มปริมาณปาล์มน้ำมันให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และต้นที่มีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการ เช่น ผลผลิตต่อไร่ เปอร์เซ็นต์น้ำมัน เป็นต้น (สมปอง, 2539) จึงได้การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาช่วยในการขยายพันธุ์ โดยใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ เช่น คัพภะ (Te-chato, 1998a) ราก (Wooi, 1995) ช่อดอก (Teixeira, *et al*., 1994) และใบอ่อน (สมปองและคณะ, 2547) เป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว ปัจจุบันการขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้เป็นที่ยอมรับจากเกษตรกรเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามสำหรับในประเทศไทยมีรายงานการเพาะปลูกต้นปาล์มน้ำมันที่ได้ จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนโดย Te-chato (1998a) ผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำนวนมาก จากการเพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทอเนอราผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส (embryogenesis) และเมื่อนำไปปลูกในแปลงพบว่า ให้ผลผลิตทะลายสูง มีจำนวนช่อดอกตัวเมียสูง 8-12 ช่อต่อปี ภายใต้การปลูกที่ไม่มีการให้และปุ๋ย และไม่พบอาการผิดปกติเกิดขึ้น Te-chato และคณะ (2002) สามารถร่นระยะเวลาในการชักนำแคลลัสเริ่มต้น (primary callus: PC) และชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (embryogenic callus: EC) จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมเทอเนอราต้นโตที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งสามารถชักนำต้นกล้าได้ภายในเวลา 1 ปี 6 เดือน ถึง 1 ปี 8 เดือน และเมื่อนำไปปลูกในแปลงพบว่าเหมือนต้นแม่ทุกประการ การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันโดยใช้ dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid) ความเข้มข้นต่ำ (0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถร่นระยะเวลาการเพาะเลี้ยงลง 6-9 เดือน (อาสลัน และสมปอง, 2545) การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo: SE) ได้ และสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ (embryoid) และส่งเสริมให้พัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ และช่วยให้ขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น (de Touchet *et al*., 1991) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น โดยใช้สูตรอาหารร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้ได้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น ตอบสนองต่อการขยายพื้นที่ปลูกที่กำลังเพิ่มขึ้นใน

ปัจจุบัน นอกจากนี้ได้ตรวจสอบความแปรปรวนของเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในระยะแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Random amplified polymorphic DNA (RAPD) เพื่อยืนยันว่าต้นใหม่ของปาล์มน้ำมันที่ได้มีลักษณะตรงตามพันธุ์ที่ต้องการ (true-to-type)

ตรวจเอกสาร

ปาล์มน้ำมันแบ่งออกเป็น 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ดูรา มีลักษณะกะลาหนาและไม่มีวงเส้นใยรอบเมล็ด พันธุ์พิสิเฟอราลักษณะไม่มีกะลาแต่มีวงเส้นใยรอบเมล็ด พันธุ์เทอเนอราเป็นพันธุ์ผสมระหว่างพันธุ์ดูราและพันธุ์พิสิเฟอรา มีลักษณะกะลาหนาและมีวงเส้นใยรอบเมล็ด ปาล์มน้ำมันสามารถขยายพันธุ์ได้ 2 วิธี คือแบบอาศัยเพศ (sexual propagation) โดยใช้เมล็ด และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual propagation) เนื่องจากปาล์มน้ำมันมีเจริญเติบโตจากเยื่อเจริญปลายยอด และไม่มีการแตกหน่อ จึงต้องขยายพันธุ์โดยใช้วิธีการทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (นภาพร, 2548) ทั้งนี้เพราะปาล์มน้ำมันไม่มีการแตกหน่อเหมือนปาล์มชนิดอื่น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

กระบวนการสร้างพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 2 กระบวนการ คือ เอ็มบริโอเจนีซีสและออร์แกโนเจนีซีส ซึ่งพืชต้นใหม่ที่เกิดขึ้นอาจเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง หรือเกิดจากแคลลัส กระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสทำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่โดยการพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ เหมือนกับเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมพันธุ์ด้วยวิธีปกติ เรียกเอ็มบริโอที่มีพัฒนาการมาจากเซลล์ร่างกายว่าโซมาติกเอ็มบริโอ หรือ เอ็มบริออยด์ แต่กระบวนการออร์แกโนเจนีซีสมีการสร้างยอด หรือราก หรือทั้งยอดทั้งรากพร้อมกัน แต่ไม่มีการเชื่อมต่อกันของท่อน้ำ และท่ออาหารระหว่างยอด และราก (นิจวรรณ, 2545) Rabechault และ Cas (1974) ตัดแยกเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Heller เติมน้ำตาลแซคคาโรสเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้นแบคโตเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพการให้ความเข้มแสง 6,000 ลักซ์ เป็นเวลา 10 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า น้ำตาลแซคคาโรสส่งเสริมการงอกของเอ็มบริโอ Staritsky (1970) รายงานผลความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดของปาล์มน้ำมันอายุ 2-6 ปี บนอาหาร 3 สูตร คือ Heller Linamaier และ Skoog และ Miller ในสภาพให้แสงระยะเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่า หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือนบนอาหารสูตร Miller สามารถสร้างใบขนาดเล็ก แต่

ไม่มีการสร้างราก Kanchanapoom และ Domyoas (1999) ศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาการเกิดแคลลัสและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยง 1 เดือน มีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณถัดจากเนื้อเยื่อชั้นนอกเข้าไป (subepidermis) ได้เซลล์ที่มีขนาดเล็ก ไซโทพลาสซึมหนาแน่น และนิวเคลียสติดสีเข้ม หลังจากเพาะเลี้ยง 2 เดือน พบกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง การแบ่งเซลล์ครั้งแรกมีทิศทางที่ไม่แน่นอนและค่อย ๆ เพิ่มปริมาณจาก 2 เซลล์เป็น 4 เซลล์ ต่อมาสร้างเป็นกลุ่มของเซลล์ proembryo ประกอบด้วย 8-10 เซลล์ เริ่มมีการยืดยาวและเปลี่ยนแปลงเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากเพาะเลี้ยง 3 เดือน จากนั้นแบ่งเซลล์เป็นต้นอ่อนระยะรูปกลม ระยะรูปหัวใจ และระยะทอร์ปิโด ลักษณะต้นอ่อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสเหมือนกับต้นอ่อนที่เกิดจากไซโกติกเอ็มบริโอทุกประการ Wang และคณะ (2003) เพาะเลี้ยงคัพภะของหมากจากผลระยะสุกแก่บนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยง 2 เดือน พบการสร้างแคลลัส เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสบนอาหารเดิมทุก 2 เดือน เป็นเวลา 4 เดือน แคลลัสมีการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ และโซมาติกเอ็มบริโองอกเป็นต้นสมบูรณ์ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยง 2-3 เดือน จากนั้นจึงย้ายปลูกอนุบาลในโรงเรือน พบอัตราการรอดชีวิต 24 เปอร์เซ็นต์

1. การชักนำแคลลัส

แคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) เพียงชนิดเดียว ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก (รังสฤษดิ์, 2541) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในประเทศไทยโดยใช้ใบอ่อนมีรายงานของ Rohani และคณะ (2001) รายงานชนิดของแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแบบหลวม ๆ (friable callus) และแคลลัสที่เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มก้อน (nodular compact callus) นอกจากนี้แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้ เมื่อวางเลี้ยงลงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สมปอง และคณะ (2530) ทำการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นกล้า บนสูตรอาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นที่ให้ผลผลิตแล้วบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D และ NAA (ζ-

naphthalene acetic acid) ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 10 20 30 40 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นกล้าบนอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสปฐมภูมิในอัตราสูงกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นที่ให้ผลผลิตแล้วบนอาหารที่เติม 2,4-D และ NAA เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มที่จะชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าในต้นพันธุ์ที่มีอายุต่างกันตอบสนองความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง และชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันออกไป Chehmalee และ Te-chato (2008) สามารถเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำมาจากเอ็มบริโอได้มากกว่า 10 เท่า หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน อาสลัน (2545) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันจากต้นที่ให้ผลผลิตแล้ว 10 ปี บนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิด คือ NAA dicamba และ 2,4-D ในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 26 ± 4 และ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส ใบอ่อนเริ่มสร้างแคลลัสหลังจากวางเลี้ยง 2-3 เดือน แคลลัสมีลักษณะเป็นปมสีเหลืองอ่อนเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดและผิวของชิ้นส่วน การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนสูตรอาหาร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ทั้งสองอุณหภูมิ โดยมีการสร้างแคลลัส 5.55 และ 7.93 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างแคลลัสได้ 2.78 เปอร์เซ็นต์ เฉพาะที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส เท่านั้น สำหรับการเติม NAA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างแคลลัสได้ 1.67 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 26 ± 4 องศาเซลเซียสเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบการสร้างแคลลัสระหว่างต้นที่มีอายุ 1 10 และ 20 ปี พบว่า ต้นกล้าอายุ 1 ปีสามารถสร้างแคลลัสได้เร็วกว่า (หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน) โดยสร้างแคลลัสได้ 12.5 ± 5.00 เปอร์เซ็นต์ Te-chato (1998b) ผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำนวนมาก จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันที่เก็บเกี่ยวจากต้นแม่เทอเนอรา ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส โดยต้นกล้าที่ใช้ในการศึกษาได้รับการชักนำ และดูแลในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับต่ำ คือ ระยะชักนำแคลลัสเพาะเลี้ยงใบอ่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นย้ายลงอาหารสูตร MS ที่เติม เคซีนไฮโดรไลเซส เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D หรือ dicamba เข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสงความเข้ม 2,500 ลักซ์ เป็นเวลา 10 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 3-6 เดือน แคลลัสพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอและย้ายลงอาหารเหลวสูตร ½

MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA (6-benzyladenine) เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร จนกระทั่งพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (ใบเลี้ยง) (haustorium embryo; HE) สมปอง และคณะ (2547) รายงานการชักนำแคลลัสในอาหารสูตร MS โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ dicamba หรือ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1 2.5 5 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยง 3 เดือน พบว่า dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 15 เปอร์เซ็นต์ ส่วน 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัส 2.78 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ NAA มีประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสต่ำสุดเพียง 1.67 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น นอกจากนี้ยังศึกษาผลของความเข้มข้นของ dicamba ต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมหรือไม่เติม เคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยง 3 เดือน พบว่า dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเสท ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ อาหารเติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีเคซีนไฮโดรไลเสทให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 56.41 เปอร์เซ็นต์

2. การชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น

การขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น เริ่มต้นจากการย้ายแคลลัสที่มีโครงสร้างเกาะกันแบบหลวม ๆ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเขย่าเลี้ยงอยู่ตลอดเวลา ทำให้เซลล์แยกออกเป็นอิสระจากกลุ่มเซลล์เริ่มต้น แพร่กระจายอยู่ในอาหารเหลวแล้วมีการแบ่งเซลล์ใหม่เพิ่มปริมาณกลุ่มเซลล์จำนวนมาก อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน กรดอะมิโน สารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาล และน้ำ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (เพ็ญติมาส, 2552) แคลลัสเริ่มแรกที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นสามารถชักนำได้จากชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ช่อดอก (Teixeira *et al*., 1994) ใบอ่อนจากต้นกล้า (Te-chato, 1998b) และใบอ่อนจากต้นโตที่ให้ผลผลิตแล้ว (de Touchet *et al*., 1991) ระหว่างแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนใบกับช่อดอก แคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนใบให้อัตราการเพิ่มปริมาณของแคลลัสมากกว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากการดูการจัดขอบข้างเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่น จึงเป็นทางเลือกที่ดีที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น Duval (1995) อ้างโดย Rohani และคณะ (2001) รายงานการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันสามารถผลิตพืชต้นใหม่ได้ 45,000 ต้นต่อซัสเพนชั่น 1 ลิตรต่อเดือน de Touchet

และคณะ (1991) ชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นโดยใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ มีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร ซึ่งชักนำได้จากชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตแล้ว มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลง เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ adenine sulfate เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นมากที่สุด เมื่อย้ายเซลล์ซัสเพนชั่นจากอาหารเหลวสูตรเดิมวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า เอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นยอด 18.1 เปอร์เซ็นต์ Kanchanapoom และ Tinnongjig (2001) เพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร Y_3 (Eeuwens, 1976; 1978) เติม ไกลซีนเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ และชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร Y_3 ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตได้สำเร็จ Teixeira และคณะ (1995) นำแคลลัสปาล์มน้ำมันเริ่มต้นที่มีลักษณะกลม ซึ่งชักนำได้จากต้นอ่อนในเมล็ดมาใช้ในการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร Y_3 เติม 2,4-D เข้มข้น 2.2 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 250 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน เซลล์ซัสเพนชั่นสามารถเพิ่มปริมาณได้ และเมื่อย้ายเซลล์ซัสเพนชั่นที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารชักนำเอ็มบริโอสูตร Y_3 เติม NAA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ และกรดแอสคอร์บิค 2 ไมโครโมลาร์ พบว่า แคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอได้ภายใน 4-6 สัปดาห์ การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นสามารถเพิ่มปริมาณได้ในช่วงระยะเวลาที่แน่นอนภายใต้สภาพแวดล้อมการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม การเจริญของเซลล์ซัสเพนชั่นเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็ง และสามารถเพิ่มปริมาณพืชต้นใหม่ได้อย่างรวดเร็ว (นภาพร, 2548)

3. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

การขยายพันธุ์ด้วยโซมาติกเอ็มบริโอเป็นการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศที่มีความสำคัญในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชที่การขยายพันธุ์โดยวิธีปกติทำได้ยากโดยเฉพาะในสน (Stasolla and Yeung, 2003) พืชที่สามารถขยายพันธุ์ด้วยโซมาติกเอ็มบริโอได้ เช่น ปาล์มน้ำมัน (อาสลัน และสมปอง 2545) มะพร้าว (Chan *et al.,* 1998) และอินทผลัม (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2001) เป็นต้น ซึ่งโซมาติกเอ็มบริโอดังกล่าวมีระยะการพัฒนาแบ่งได้ 4 ระยะ คือ รูปกลม รูปหัวใจ ทอร์ปิโด และสร้างใบเลี้ยง (สมปอง, 2539) อย่างไรก็ตามโซมาติกเอ็มบริโอดังกล่าวจะพัฒนาให้พืชต้นใหม่ได้นั้นสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือต้องอาศัยปัจจัยต่าง

ๆ ในการชักนำการงอก Krajnakova และคณะ (2009) ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ร่วมกับการเติมผงถ่านต่อการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอใน *Abies cepphalonica* พบว่า อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 87.6 มิลลิโมลาร์ ส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ 66.8 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การลดองค์ประกอบของธาตุอาหาร สามารถชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอในพืชได้ เช่น *Panax quinquefolius* วางเลี้ยงลงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (Feeney and Punja, 2003) Kramut และ Techato (2010) ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน โดยเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้ 20 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ และศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 15 วัน สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้ 11.33 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์

4. การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เครื่องหมาย RAPD

เครื่องหมายทางชีวโมเลกุล (molecular marker) นำมาเพื่อใช้จำแนกหรือตรวจสอบพันธุ์พืชมีหลายชนิด เช่น Random amplified polymorphic DNA (RAPD) Simple sequence repeat (SSR) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ Amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นต้น อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีผู้นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการเพิ่มขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการทำงานของพีซีอาร์ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ Denaturation ดีเอ็นเอเป้าหมายสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว ขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส จากนั้น Annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันกับดีเอ็นเอเป้าหมาย เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่แยกเป็นสายเดี่ยว ใช้อุณหภูมิประมาณ 35-65 องศาเซลเซียส ขั้นตอนสุดท้ายคือ Extention เป็นขั้นตอนที่เอ็นไซม์ DNA polymerase สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ที่เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายจนกระทั่งได้ดีเอ็นเอคู่ใหม่ ในขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส (สุรินทร์ 2552)

สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดสั้นประมาณ 10 เบส เพียงชนิดเดียวที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (Random primer) ซึ่งไม่จำเพาะเจาะจงกับยีนใด แล้วมาทำการแยกขนาดโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เทคนิคอาร์เอพีดีทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ดีเอ็นเอน้อยประมาณ 25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

(Winter and Kahl, 1995) แต่มีข้อจำกัดในการทดลองทำซ้ำ ซึ่งบางครั้งได้ผลที่แตกต่างไปจากเดิม (Cipriani *et al*., 1996) เนื่องจากอาร์เอพีดีมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ สูงจึงต้องควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ และอาร์เอพีดียังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ สายชล (2547) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันทั้ง 3 แบบในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย คือ ดูรา ฟิสิเฟอรา และเทเนอรา ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 160 ชนิด พบ ไพรเมอร์ 7 ชนิดที่สามารถแยกแถบดีเอ็นได้ คือ OPB-08 OPR-11 OPT-06 0PT-19 0PAB-01 OPAB-09 และ OPAB-14 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพันธุ์และให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 209 แถบ เฉลี่ย 29.85 แถบต่อไพรเมอร์ ซึ่งเมื่อนำมาสร้างเดนโดรแกรมเพื่อหาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic average) จากโปรแกรม SPSS พบว่าปาล์มน้ำมันที่ปลูกในแถบภาคใต้ของประเทศไทยมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย Moretzsohn (2000) ได้รายงานว่าการแยกหมวดหมู่พันธุ์ปาล์มน้ำมัน คือ ดูรา ฟิสิเฟอรา และเทเนอรา ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีให้พันธุกรรมปาล์มน้ำมันมีความใกล้เคียงกันและสามารถแยกทั้ง 3 แบบ (ดูรา ฟิสิเฟอรา และเทเนอรา) ออกจากกันได้ Rival และคณะ (1998) ได้ใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบ somaclonal variants ในปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะเป็นแมนเทิ้ลจากต้นแม่ และต้นลูกที่ได้จากกระบวนการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน Toruan-Mathius และคณะ (2001) ได้ทำการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างต้นปกติกับต้นที่มีความผิดปกติของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าไพรเมอร์ OPC-07 OPC-09 OPW-19 และ SC10-19 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นจาก 16 สายพันธุ์ได้ 0.47-0.96 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะโคลน MK176 มีการตอบสนองคงที่ในขณะที่ไม่มีรูปแบบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อการตรวจสอบลักษณะความผิดปกติได้

Thawaro และ Techato (2008) ทำการตรวจสอบความแปรปรวนของปาล์มน้ำมันลูกผสมระหว่างพันธุ์ฟิสิเฟอรา และดูราจากการเพาะเลี้ยงคัพภะสุกแก่ โดยใช้เครื่องหมาย RAPD พบว่าไพรเมอร์ OPT-06 จากคู่ผสม 865 (D) Δ 206 (P) ให้ลักษณะของแถบดีเอ็นเอเป็นลักษณะ polymorphic สูงถึง 87.5 เปอร์เซนต์ มีขนาดดีเอ็นเอ 290-1100 คู่เบส ธนวดี (2551) ตรวจสอบความแปรปรวนต้นกล้าปาล์มน้ำมันชักนำได้จากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าไพรเมอร์ OPAB-09 มีความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอค่อนข้างสูง ลักษณะของแถบดีเอ็นเอเป็นลักษณะ monomorphism ทั้งหมด ซึ่งไม่เกิดความแปรปรวน สามารถนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอจากต้นกล้าที่มีความผิดปกติหรือเกิดความแปรปรวนได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และโซมาติกเอ็มบริโอในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน
2. เพื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในการเพาะเลี้ยงซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน
3. เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระยะแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน โดยใช้เครื่องหมาย RAPD

บทที่ 2

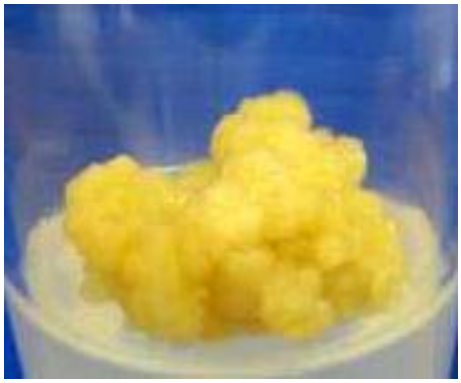
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ และอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 ซึ่งให้ผลผลิตสูงจากสวนปาล์มน้ำมันของคุณอเนก ลิ่มศรีวิไล จังหวัดกระบี่ แคลลัสดังกล่าวอายุ 4 ปีตั้งแต่เริ่มย้ายเลี้ยงทุกเดือนในอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้การให้แสง ความเข้ม 1,300 ลักซ์ อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 1) ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา



ภาพที่ 1 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดี เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 วัสดุสารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

- สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสูตร MS และ Y_3 (รายละเอียดดังตารางภาคผนวกที่ 1และ 2)
- สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ประกอบด้วย แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- น้ำตาลซอร์บิทอล แมนนิทอล
- กรดแอสคอร์บิค
- สารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba

1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- กรดเอธิลินไดอะมินเทตราอะซิติค
- โซเดียมเอธิลินไดอะมินเทตราอะซิเทต
- ทริส-ไฮโครคลอริค
- ไอโซโพรพานอล
- เอธานอล
- คลอโรฟอร์ม
- โซเดียมโดดิซิลซัลเฟต
- โซเดียมคลอไรด์
- แอมโมเนียมอะซิเตต

1.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับทำอิเลคโทรโฟรีซีส

- อะกาโรสเจล
- กรดอะซิติค
- กรดบอริค
- ทริสเบส

- เอธิเดียมโบรไมด์
- Loading buffer
- แลมด้าดีเอ็นเอ
- 100 bp DNA Ladder (Operon, USA)

1.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับทำพีซีอาร์

- dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- Primer (รายละเอียดแสดงดังตารางผนวกที่ 3)
- แมกนีเซียมคลอไรด์
- 10X Taq buffer (Promega, USA)
- *Taq* DNA Polymerase B (Promega, USA)

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องคนสารละลายพร้อมแท่งแม่เหล็ก
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
- ตู้อบไมโครเวฟ
- เครื่องแก้วประกอบด้วย จานเพาะเชื้อ ฟลาสก์ บีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร
- ตู้เย็นและตู้แช่
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องกรองมิลลิพอร์
- กระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาดช่อง 0.45 ไมโครเมตร
- กระดาษทิชชู

- ตู้อบแห้งและอบฆ่าเชื้อ
- จานเพาะเลี้ยง ขวดเพาะเลี้ยง หลอดทดลอง
- ไมโครปิเปต ปากคีบ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด พาราฟิล์ม

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยง

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- เครื่องเขย่าเลี้ยง
- ชุดเครื่องมือย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วย ปากคีบ และมีดผ่าตัด
- ปิเปตปลายตัดขนาด 5 มิลลิลิตร
- หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- กล้องถ่ายรูป

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การทำอิเลคโทรโฟรีซีส และการทำพีซีอาร์

- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
- เครื่องไมโครเซ็นตริฟิวจ์
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
- เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ
- เครื่องปั่นผสมสารละลาย
- แท่งแม่เหล็ก
- ปิเปตปรับปริมาตร
- เครื่องเขย่า
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องอิเลคโตรโฟริซีส (LE Agarose, Promega, USA)

- เครื่อง XP Thermal Cycler บริษัท Bioer Technology จำกัด (รุ่น TC-XP ประเทศญี่ปุ่น)
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
- ตู้ไมโครเวฟ
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- ไมโครปิเปต
- น้ำแข็งและกระติกน้ำแข็ง
- แท่งแก้วสำหรับบดตัวอย่าง
- เครื่องแก้ว กระบอกตวง และขวดต่าง ๆ
- เครื่องเขย่า (vortex)

วิธีการวิจัย

1. **ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส**

นำแคลลัสปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือน หนัก 0.1 กรัม จากอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25Δ150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D หรือ dicamba เข้มข้น 0.1 0.3 0.5 0.7 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดด่าง 5.7 และ เติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการทดลอง 5 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 10 ซ้ำ ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกน้ำหนักสดแคลลัสและจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังจากการเพาะเลี้ยงในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (completely ramdomized design) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (duncan's multiple range test)

2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำและการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้ำหนัก 0.25 กรัม จากอาหารที่ให้ผลดีสุดของการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2 สูตร คือ MS หรือ Y_3 แต่ละสูตรเติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ทำการเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ฟลาสก์ ปรับ ความเป็นกรดด่าง 5.7 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกอัตราการเจริญเติบโตจากการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์ (packed cell volume : PCV) ทุก ๆ 3 วัน และเปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD (least significant difference)

3. ศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น

นำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร จากอาหารที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอลหรือน้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ และกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ฟลาสก์ ปรับ ความเป็นกรดด่าง 5.7 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์ทุก 3 วัน และเปรียบเทียบจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อฟลาสก์ จากน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

4. ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย RAPD

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนแคลลัส (การทดลองที่ 1) เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น (การทดลองที่ 2) และโซมาติกเอ็มบริโอ (การทดลองที่ 3) ตามวิธีการของ Te-chato (2000) เก็บตัวอย่างแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และโซมาติกเอ็มบริโอหนัก 50 กรัม ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เติม TE บัฟเฟอร์ (Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0 และ EDTA 0.1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติมโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมแอมโมเนียมอะซิเตต 5 โมลาร์ ปริมาตร 110 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารตัวอย่างบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ หลังจากนั้นเทไอโซโพรพานอลทิ้ง ล้างด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 2 ครั้ง เทเอธานอลทิ้ง นำไปผึ่งให้แห้ง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

4.2 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมด้าดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็คโตรโฟรีซิสบนแผ่นอะกาโรส (LE Agarose, Promega, USA) ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Glacial acetic acid, Na_2EDTA 0.5 โมลาร์, ความเป็นกรดด่าง 8.0) เป็นเวลาประมาณ 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลาประมาณ 15-20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 5-10 นาที แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation

4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่แยกได้จากหัวข้อ 4.1 ตามวิธีการของสายชล (2548) ด้วยปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ 7 ชนิด คือ OPB-08 OPR-11 OPT-06 0PT-19 OPAB-01 OPAB-09 และ OPAB-14 จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ บัฟเฟอร์เข้มข้น 10 เท่า แมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTP) เข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ *Taq* polymerase 1.5 ยูนิต ตั้งอุณภูมิเครื่องพีซีอาร์เป็น 3 ระดับ คือ อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวนทั้งสิ้น 39 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที 35 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เวลา 7 นาทีอีก 1 รอบ

4.4 การตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอ

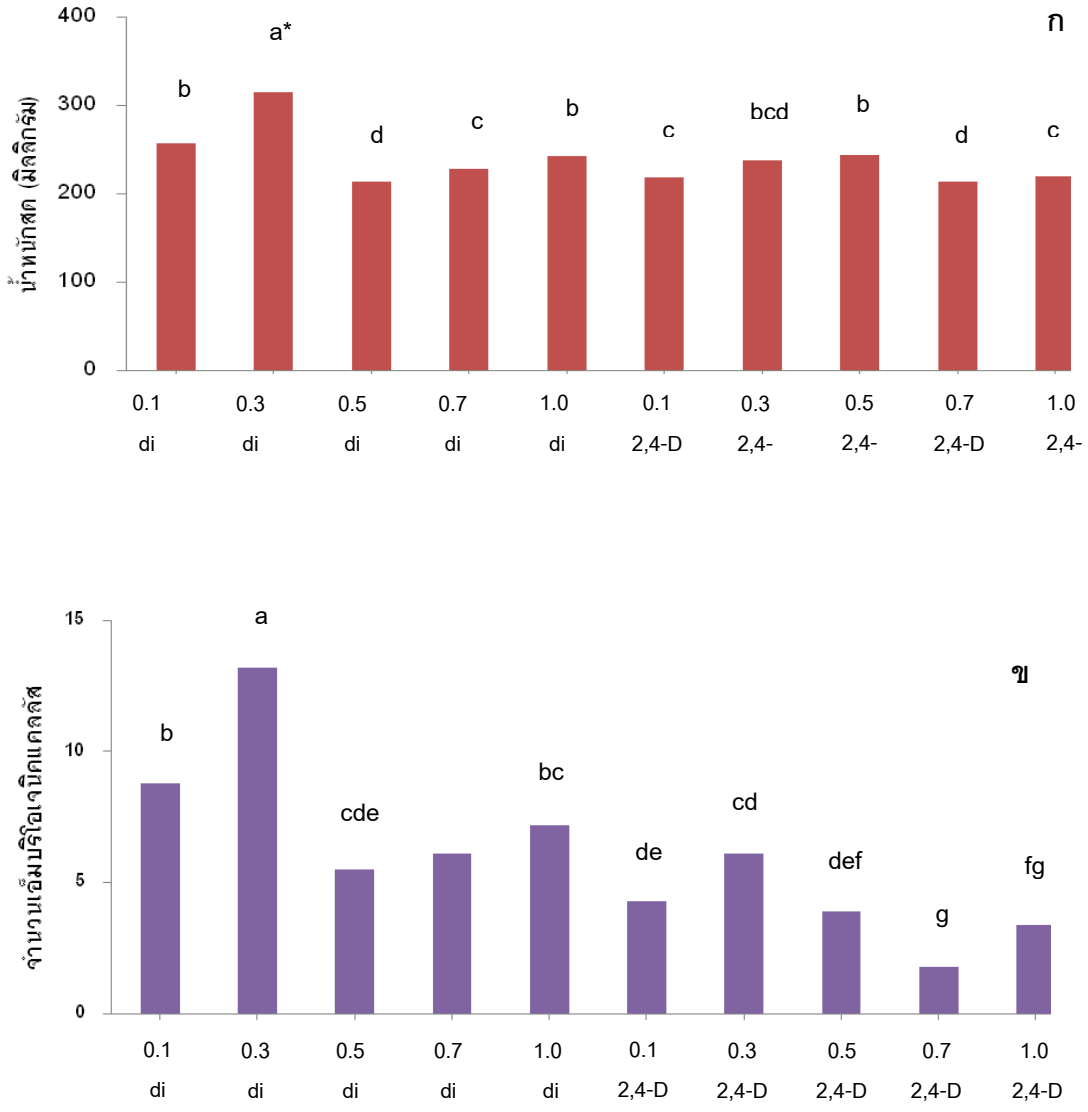
นำผลผลิตจาก RAPD มาแยกแถบดีอ็นเอ ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนตัวกลางที่เป็นวุ้นอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE บัพเฟอร์ (Tris Base, 0.45 โมลาร์ Boric acid, 10 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0) เป็นเวลา 40 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต บันทึกภาพ เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และโซมาติกเอ็มบริโอ

บทที่ 3

ผล

1. ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

จากการเปรียบเทียบชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ต่อการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัส พบว่า dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้การตอบสนองน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 315 มิลลิกรัม รองลงมาคือ dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัส 257 มิลลิกรัม มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 243.6 มิลลิกรัม และความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสต่ำสุด 214.3 มิลลิกรัม มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 2ก) สำหรับแคลลัสที่เกาะกันหลวม ๆ สร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย พบว่า dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 13.2 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง รองลงมาคือ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย 8.8 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 2ข) ในขณะที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดที่ 6.1 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง และความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยต่ำสุดที่ 1.8 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะโครงสร้างกลมขนาดเล็กเกาะกันอย่างหลวม ๆ และมีสีเหลือง (ภาพที่ 3ก) แต่สำหรับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D มีลักษณะโครงสร้างกลม มีสีเหลืองเข้ม และมีอาการฉ่ำน้ำบริเวณผิว (ภาพที่ 3ข)

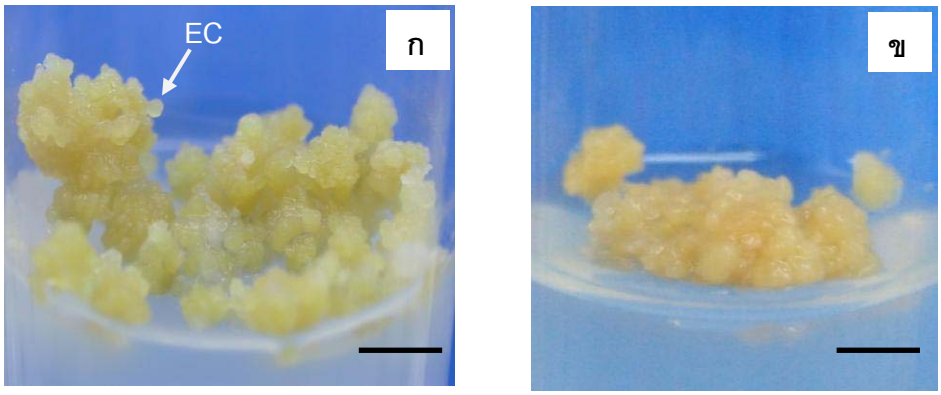


ภาพที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน

ก. น้ำหนักสดของแคลลัส (มิลลิกรัม)

ข. จำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่อหลอดทดลอง

*ค่าเฉลี่ยที่กำกับบนแท่งด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดย DMRT



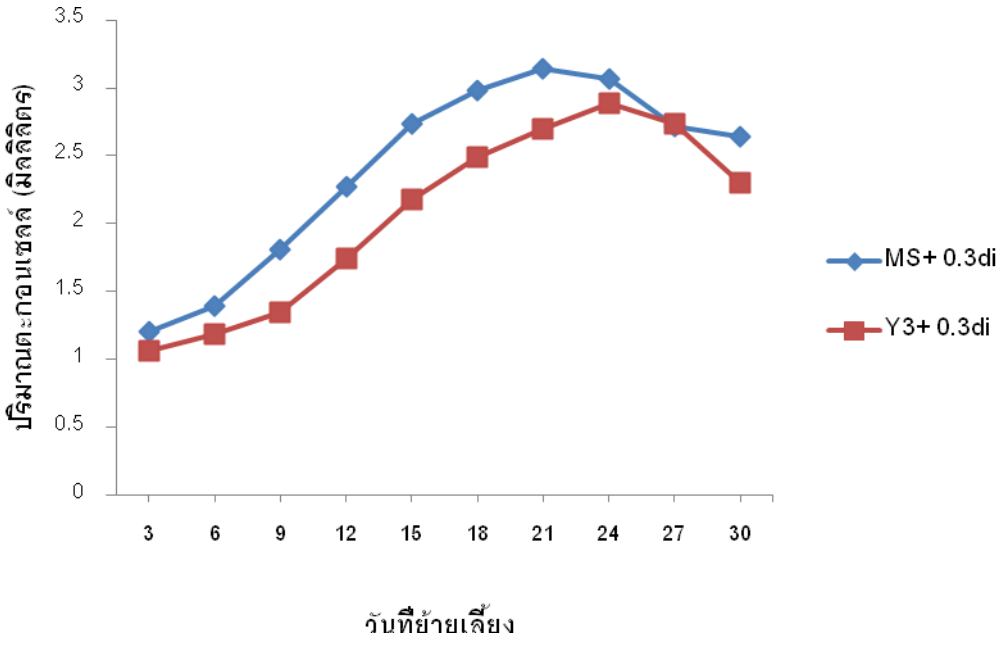
ภาพที่ 3 แคลลัสที่ชักนำได้จากอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 3 มิลลิเมตร)

ก. dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

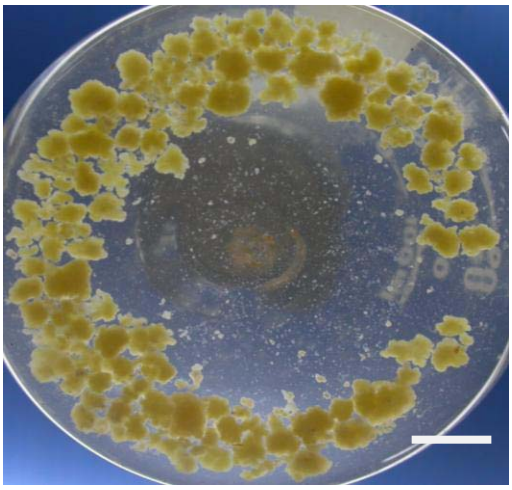
ข. 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำและการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิเซลล์ซัสเพนชั่น

หลังจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารเหลว 2 สูตร คือ MS และ Y_3 โดยเติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าอาหารเหลวสูตร MS ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.41 มิลลิลิตร ซึ่งมีอัตราการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้ดีกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 ที่ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.06 มิลลิลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ในการทดลองนี้มีการเจริญเติบโตแบ่งได้ 4 ระยะ คือ ระยะ lag log stationary และ death เป็นระยะที่เซลล์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ระยะ log เป็นระยะที่เซลล์มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ในช่วงวันที่ 12 หลังการเพาะเลี้ยง และในช่วงวันที่ 18 พบปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มปรากฏสีน้ำตาลซึ่งอยู่ในระยะ stationary สำหรับอาหารเหลวสูตร Y_3 เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ในช่วงวันที่ 20 และพบปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มปรากฏสีน้ำตาลในช่วงวันที่ 24 หลังการย้ายเลี้ยง (ภาพที่ 4) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ เป็นกลุ่มเล็ก ๆ หลายกลุ่ม (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ในอาหารเหลวสูตร MS และ Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



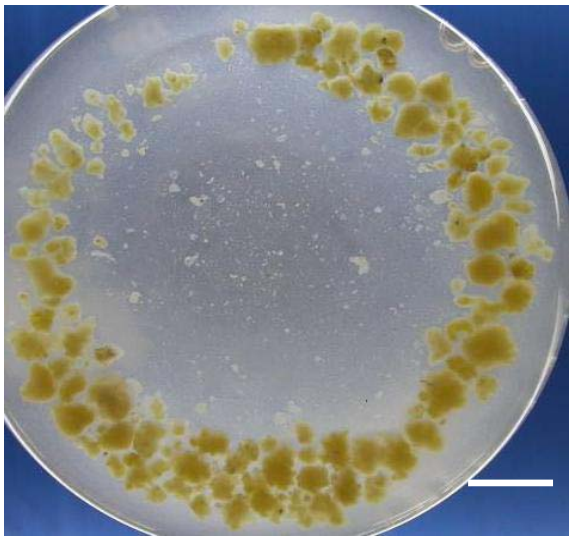
ภาพที่ 5 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)

3. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น

หลังจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นบนอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน 2 แหล่ง คือ น้ำตาลซอร์บิทอล และแมนนิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ต่อการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการสร้างจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยที่มีขนาด 2 มิลลิเมตร ได้สูงสุด 5.6 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 95$ เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 1) ซึ่งโซมาติกเอ็มบริโอที่เจริญบนอาหารที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล มีลักษณะกลมและมีสีเหลือง (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

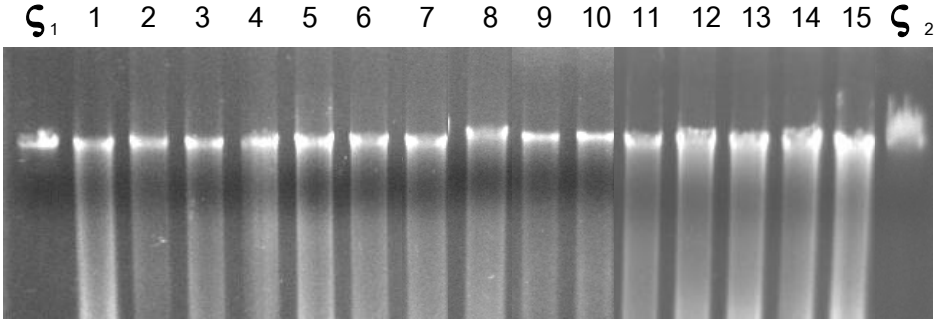
แหล่งคาร์บอน (M)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ
ซอร์บิทอล	5.6
แมนนิทอล	2
$LSD_{.05}$	1.65
C.V. (%)	33.80



ภาพที่ 6 โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ 5 มิลลิเมตร)

4. การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิค RAPD

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ และโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ได้จากการทดลองข้างต้น ตามวิธีของ Te-chato (2000) พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณสูงมาก มีความสะอาด และมีคุณภาพเพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RAPD ดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอ มีปริมาณสูงสุดมากกว่า 80 นาโนกรัม สำหรับเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และแคลลัส มีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า 40 นาโนกรัม แต่ไม่เกิน 80 นาโนกรัม เมื่อเทียบกับแลมด้าดีเอ็นเอ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การประเมินปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วน แคลลัส เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันที่สกัดตามวิธีการของ Te-chato (2000) เมื่อเปรียบเทียบกับ ς DNA ς_1 = 40 ng และ ς_2 = 80 ng

lane 1-5 คือ จากแคลลัส

lane 6-10 คือ จากเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น

lane 11-15 คือ จากโซมาติกเอ็มบริโอ

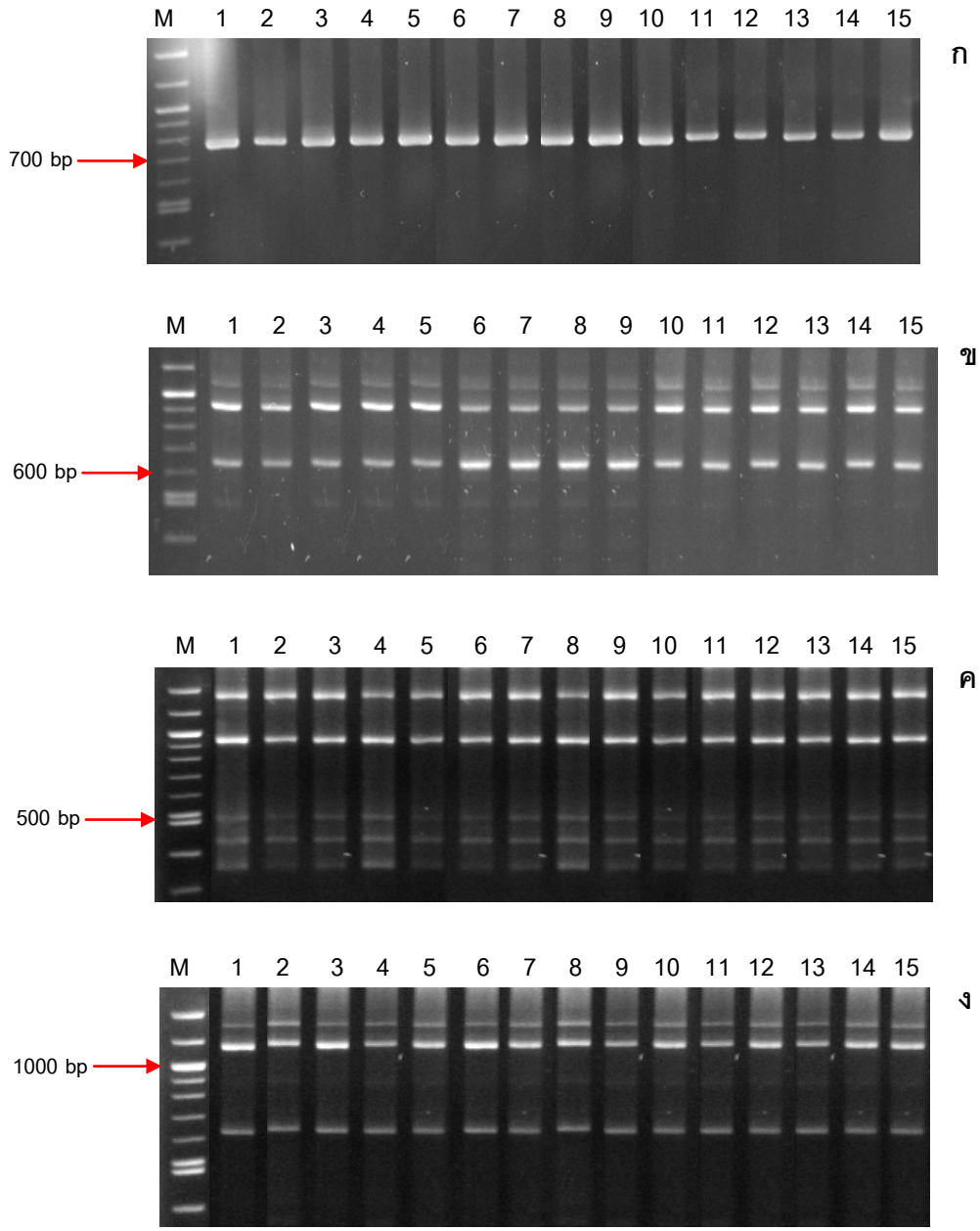
ผลการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันลูกผสมที่สกัดดีเอ็นเอได้จากแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และโซมาติกเอ็มบริโอ โดยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ คือ OPB-08 OPR-11 OPT-06 OPT-19 OPAB-01 OPAB-09 และ OPAB-14 พบว่า ไพรเมอร์ OPT-06 OPAB-01 OPAB-09 และ OPAB-14 ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน สามารถนำมาใช้ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนปาล์มน้ำมันที่เป็นผลจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความเหมาะสมของไพรเมอร์ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ บนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5' ⟶ 3'	ความเหมาะสม
OPAB-09	GGGCGACTAC	++++
OPAB-01	CCGTCGGTAG	++++
OPT-06	CAAGGGCAGA	++++
OPAB-14	AAGTGCGACC	++++
OPR-11	GTAGCCGTCT	++
OPB-08	GTCCACACGG	+
OPA-19	GTCCGTATGG	- - - -

+ + + + สามารถเพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง ให้แถบชัดเจน
+ + + - สามารถเพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง ให้แถบไม่ชัดเจน
+ + - - ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้บางตัวอย่าง ให้แถบชัดเจน
+ - - - ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้บางตัวอย่าง ให้แถบไม่ชัดเจน
- - - - ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ เขียนเครื่องหมายให้ชัดเจน

จากการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันลูกผสมจากทั้ง 3 แหล่ง ด้วยเครื่องหมาย RAPD พบว่า ไพรเมอร์ OPT-06 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงขนาด 700 ถึง 800 คู่เบส แถบที่ได้มี 1 แถบ (ภาพที่ 8ก) ไพรเมอร์ OPAB-01 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงขนาด 600 ถึง 1100 คู่เบส แถบที่ได้มี 3 แถบ (ภาพที่ 8ข) OPAB-09 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงขนาด 300 ถึง 12000 คู่เบส แถบที่ได้มี 5 แถบ (ภาพที่ 8ค) และ OPAB-14 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงขนาด 600 ถึง 12,000 คู่เบส แถบที่ได้มี 3 แถบ (ภาพที่ 8ง) ซึ่งแถบที่ได้ทั้งหมดมีความสม่ำเสมอเป็นลักษณะ monomorphism และไม่มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ



ภาพที่ 8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อทำการแยกขนาดด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) OPT - 06 (ข) OPAB - 01 (ค) OPAB - 09 และ (ง) OPAB - 14 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 1-5 คือ ดีเอ็นเอจากแคลลัส

lane 6-10 คือ ดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น

lane 11-15 คือ ดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอ

บทที่ 4

วิจารณ์

ปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอคือ ฮอร์โมนหรือสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเฉพาะในกลุ่มออกซินที่แตกต่างกันให้ลักษณะแคลลัสที่แตกต่างกัน จากการเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมัน พบว่า dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ โดยสังเกตได้จากอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัส (315 มิลลิกรัม) และมีจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย (13.2 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง) ได้สูงสุด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน สอดคล้องกับสกุลรัตน์ (2553) ที่รายงานการชักนำแคลลัสปาล์มน้ำมัน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ย 458.76 มิลลิกรัม และให้จำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย 28 เอ็มบริโอต่อแคลลัส สูงกว่าอาหารที่เติม 2,4-D ซึ่งให้น้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ย 434.77 มิลลิกรัม และให้จำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย 25.59 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง Chehmalee และ Te-chato (2008) รายงานการส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด บนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับ Kramut และ Te-chato (2010) ที่สามารถส่งเสริมการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด 16.88 เอ็มบริโอต่อหลอด บนอาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Rakshit และคณะ (2010) รายงานการชักนำแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์แท้ในประเทศอินเดีย บนอาหารที่เติม dicamba และ 2,4-D พบว่าอาหารที่เติม dicamba ให้การสร้างแคลลัสได้ดีกว่าอาหารที่เติม 2,4-D ในขณะที่ de Touchet และคณะ (1991) สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันในอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม 2,4-D ความเข้มข้นสูง ส่งเสริมให้เซลล์พืชสร้างสารประกอบฟีนอล (Zaid, 1987; de Touchet *et al*., 1991) และอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่นเดียวกับรายงานของ Teixeira และคณะ (1995) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อการเจริญพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมัน พบว่า 2,4-D ความเข้มข้นสูงให้ต้นที่มีลักษณะผิดปกติ Te-chato และ Hilae (2007) รายงานการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาหลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ของแคลลัสปาล์ม

น้ำมันเพื่อดูกำเนิดของเซลล์ที่สร้างปม พบว่า dicamba ส่งเสริมกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงในชั้นอิพิเดอร์มิส พาเรนไคมา และชั้นเนื้อเยื่อมัดท่อน้ำท่ออาหาร ในขณะที่ 2,4-D ส่งเสริมกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงในชั้นอิพิเดอร์มิสเท่านั้น นอกจากนี้ต้นอ่อนที่เกิดขึ้นบนอาหารที่เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การพัฒนาเข้าสู่ระยะสุกแก่ หรือระยะสร้างจาวได้เร็วขึ้น (Te-chato, 1998b) ซึ่งการใช้ dicamba สามารถร่นระยะเวลาในการชักนำแคลลัส และการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอให้เป็นพืชต้นใหม่ได้ภายในระยะเวลา 18 เดือน ดังนั้นผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า dicamba เป็นออกซินตัวใหม่ที่มีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการสร้างแคลลัส การพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ในปาล์มน้ำมัน เช่นเดียวกับรายงานของสมปอง และคณะ (2547) อาสลัน และสมปอง (2545) สกุลรัตน์ และสมปอง (2552)

สูตรอาหารมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากอาหารแต่ละสูตรมีองค์ประกอบของธาตุอาหารที่แตกต่างกันไป ดังนั้นต้องเลือกอาหารที่ใช้ให้เหมาะสมกับชนิดและชิ้นส่วนพืช จากการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารเหลวสูตร MS และ Y_3 (อาหารแต่ละสูตรเติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 30 วัน แล้วตรวจสอบการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น พบว่า อาหารเหลวสูตร MS สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 สอดคล้องกับ Kramut และ Te-chato (2010) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตร MS สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 เนื่องจากอาหารเหลวสูตร MS มีองค์ประกอบของไนโตรเจนสูง ซึ่งส่งเสริมการพัฒนาของเซลล์พืช ทำนองเดียวกับ Thiruvengadam และคณะ (2006) รายงานอิทธิพลของระดับไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ว่ามีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ สำหรับอาหารเหลวสูตร MS มีระดับไนโตรเจนสูงกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 จึงส่งผลให้อาหารเหลวสูตร MS สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 ในขณะที่ Sogeke (1996) รายงานการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ จากการเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตรดัดแปลง Y_3 ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพียง 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าอาหารสูตร MS ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารสูตร MS มีสารเคมีเป็นองค์ประกอบมากกว่าอาหารสูตร Y_3 อีกทั้งสูตรอาหาร Y_3 ไม่มีสารเคมีในกลุ่มวิตามิน โดยเฉพาะวิตามินบี 1 หรือ thiamine-HCl ที่ช่วยให้พืชมีการพัฒนาไปตามปกติ นอกจากนี้อาหารเหลวสูตร MS ส่งเสริมการสร้างสารประกอบฟีนอลเร็วกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น เนื่องมาจากอาหารเหลวสูตร MS มีส่วนประกอบของกรดอะมิโนสูงกว่าอาหารเหลวสูตร

Y_3 ซึ่งกรดอะมิโนมีผลต่อการผลิตสารประกอบฟีนอลภายในเซลล์พืช เช่นเดียวกับ Zaid (1987) รายงานว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง และความสมดุลขององค์ประกอบของธาตุอาหาร เป็นปัจจัยหลักในการส่งเสริมการสร้างสารประกอบฟีนอลในอินทผลัม ในขณะที่ Teixeira และคณะ (1995) รายงานว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 ให้ผลตอบสนองที่ดีต่อกระบวนการพัฒนาของเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งนี้การตอบสนองที่แตกต่างกันของพืชต่ออาหารที่เพาะเลี้ยงจากรายงานข้างต้นอาจเป็นผลจากแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกัน อรดี (2526) รายงานว่าอาหารสูตร Y_3 เหมาะสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงใบอ่อนหรือช่อดอกของมะพร้าวและพืชสกุลอื่น ๆ อย่างไรก็ตาม Kanchanapoom และ Domyoas (1999) รายงานผลสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร Y_3 แต่ไม่มีรายงานการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

น้ำตาลจัดเป็นแหล่งของคาร์บอนที่สำคัญ ในการชักนำกระบวนการสุกแก่และการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ (Corrdoira *et al.,* 2003) ชนิดของน้ำตาลที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส นอกจากนี้ยังใช้น้ำตาลในรูปของแอลกอฮอล์ ได้แก่ ซอร์บิทอล และแมนนิทอล (Nakagawa *et al.,* 2001; Paiva and Otoni, 2003) แม้มีรายงานการใช้น้ำตาลหลายชนิด เพื่อชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอในพืชต่าง ๆ เช่น Mamiya และ Sakamoto (2000) รายงานการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของหน่อไม้ฝรั่งบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ Lou และ Kako (1995) รายงานการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของแตงกวา จากการวางเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำจากใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ร่วมกับแมนนิทอลและกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่สูงขึ้นส่งเสริมให้จำนวนและเปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเพิ่มขึ้น David และ Wayne (2001) รายงานการชักนำการงอกของถั่วลิสงบนอาหารที่เติมซอร์บิทอล ส่งเสริมการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในขณะที่อาหารที่เติมแมนนิทอลเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ อย่างไรก็ตามการเติมน้ำตาลลงในอาหารร่วมกับการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน ในอาหารชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมติกโพเทนเชียลของอาหาร การเติมน้ำตาลความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของแรงดันออสโมติก ซึ่ง Mamiya และ Sakamoto (2000) รายงานว่าแรงดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นส่งผลยับยั้งการเจริญของยอดแต่ไม่มีผลต่อการเจริญของราก ดังนั้นการเติมน้ำตาลความเข้มข้นสูงขึ้นอาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์พืช ซึ่งส่งผลต่อความสำเร็จในการชักนำการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อชักนำการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน จากแหล่ง

คาร์บอน 2 แหล่งคือ น้ำตาลซอร์บิทอล และน้ำตาลแมนนิทอล ต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าน้ำตาล ซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ ได้สูงกว่าน้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สอดคล้องกับการรายงานของ Hilae และ Te-chato (2005) สามารถชักนำการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอได้ดี บนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เนื่องจากน้ำตาลซอร์บิทอลเป็นสาเหตุหลักของการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนภายในเซลล์ส่งผลให้เซลล์พืชเกิดสภาวะเครียดน้ำ จึงช่วยเร่งกระบวนการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในการเพาะเลี้ยงแคลลัสปาล์มน้ำมัน (de Touchet *et al*., 1991) เช่นเดียวกับ Mark และคณะ (2005) รายงานการใช้น้ำตาลซอร์บิทอล เพื่อส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง พบว่า ซอร์บิทอลมีประสิทธิภาพในการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลืองมากกว่าแมนนิทอล สอดคล้องกับการศึกษานี้ พบว่า น้ำตาลซอร์บิทอล ส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน สำหรับแมนนิทอลเป็นน้ำตาลที่ไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ เนื่องจากชิ้นส่วนพืชมีการพัฒนาน้อยมาก ทั้ง ๆ ที่โครงสร้างของน้ำตาลซอร์บิทอลและแมนนิทอลแตกต่างกันไม่มาก อาสลัน (2551) สันนิษฐานว่าในปาล์มน้ำมันอาจไม่มีเอนไซมม์ที่ทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลแมนนิทอลไปใช้ประโยชน์ได้

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้ามโดยดอกเพศผู้ และดอกเพศตัวเมียอยู่ภายในต้นเดียวกัน แต่มีช่วงการบานของดอกไม่พร้อมกัน จึงทำให้มีโอกาสที่จะผสมตัวเองได้ ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจสอบเมล็ดที่ได้ว่าเป็นเมล็ดลูกผสม ที่ไม่ได้เกิดจากการผสมตัวเอง เพราะจะทำให้สูญเสียเวลา และค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นเครื่องหมายชีวโมเลกุลนับว่าเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพสูง ในการศึกษาพันธุกรรมพืชเนื่องจากไม่มีอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมสามารถตรวจสอบได้กับพืชทุกชนิด และตรวจสอบได้ทุกส่วนของพืชแม้ในระยะต้นกล้า ทั้งนี้เพราะเป็นการวิเคราะห์จีโนมโดยตรง เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเครื่องหมายโมเลกุลหนึ่งที่มีผู้นิยมใช้อย่างแพร่หลาย เพราะให้แถบดีเอ็นเอซึ่งได้จากการจับแบบสุ่มของไพรเมอร์บนจีโนมจำนวนมาก และสามารถทำซ้ำโดยได้ผลเหมือนเดิม ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือเพียงพอสำหรับใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Chan *et al*., 1998) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่ผ่านมามีรายงานการกลายพันธุ์หลายรูปแบบ คือ การแตกกอ การพัฒนาของดอกที่ยอด การผลิตเฉพาะดอกเพศผู้ การผลิตดอกกระเทย และลักษณะของผลที่เป็นแบบเมนเทิ้ล (สมปอง, 2544) หากพิจารณาสาเหตุการกลายพันธุ์ที่สำคัญ พบว่า เกิดจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต

ความเข้มข้นสูงในช่วงของการชักนำการสร้างแคลลัส เซลล์ซัสเพนชั่น และโซมาติกเอ็มบริโอ ซึ่งมีรายงานการใช้ 2,4-D เข้มข้นสูง 50-150 มิลลิกรัมต่อลิตร (Teixeria *et al.,* 1993; Aberlence-Bertossi *et al.,* 1999) และในขั้นตอนการชักนำการงอกของเอ็มบริโอซึ่งต้องใช้ GA_3 (Gibberellic acid) เข้มข้นสูงในช่วง 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ต้นกล้าที่ได้มีลักษณะผิดปกติ ใบเรียวเล็ก (สมปอง, 2544) ส่วนการใช้ dicamba เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำให้มีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมัน และส่งเสริมการงอกในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้นยังไม่มีรายงานการกลายพันธุ์เกิดขึ้น สอด คล้องกับการศึกษานี้ โดยศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรของปาล์มน้ำมันโดยใช้แคลลัส เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และโซมาติกเอ็มบริโอ นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้สารสะลาย SDS (Te-chato, 2000) เป็นวิธีที่บดตัวอย่างในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ด้วยแท่งแก้ว การบดให้ละเอียดทำง่าย ทำให้ได้ดีเอ็นเอจำนวนมากและคุณภาพดีพอสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากการรายงานของสายชล (2547) ซึ่งพบว่า ไพรเมอร์ OPT-06 OPAB - 01 OPAB - 09 และ OPAB - 14 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด และมีความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอมากกว่าไพรเมอร์อื่น ๆ แสดงว่าพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่มีการกลายพันธุ์ สอดคล้องกับการรายงานของ Thawaro และ Techato (2008) ที่ทำการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน จากการเพาะเลี้ยงคัพภะสุกแก่ พบว่า ไพรเมอร์ OPT-06 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูง และมีความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอมากกว่าไพรเมอร์ชนิดอื่น ๆ ธนวดี (2551) รายงานการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ชักนำได้จากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวโดยเทคนิค RAPD จำนวน 7 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ OPAB-09 เท่านั้น ที่มีความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอค่อนข้างสูง ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบส ลักษณะของแถบดีเอ็นเอเป็น monomorphism ทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม

บทที่ 5

สรุป

1. ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

อาหารแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 315 มิลลิกรัม และส่งเสริมการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยได้สูงสุด 13.2 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำและการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

อาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.17 โมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้ 2.41 มิลลิลิตรสูงกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 ซึ่งให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.06 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

3. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น

จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นบนอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยได้สูงสุด 5.6 เอ็มบริโอต่อฟลาสก์ และโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้มีขนาด 2 มิลลิเมตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

4. **ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย** RAPD

ดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และโซมาติกเอ็มบริโอมีปริมาณสูง และมีความสะอาด เมื่อนำไปตรวจสอบความแปรปรวนทางความพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD พบว่า ไพรเมอร์ OPT-06 OPAB-01 OPAB-09 และ OPAB-14 ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน มีความสม่ำเสมอ และไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม แถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็น monomorphism ทั้งหมด ดังนั้นไพรเมอร์ชนิดนี้สามารถที่จะนำมาใช้ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนปาล์มน้ำมันในแต่ละระยะของการพัฒนาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพลังงาน. 2548. วิจัยสู้วิกฤติพลังงาน ‘ปาล์มน้ำมัน’ ไม่ใช่แค่ ‘ไบโอดีเซล’. หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ ปีที่ 28 ฉบับที่ 20430 หน้า 27.

กระทรวงพลังงาน. 2549. “ไบโอดีเซล” จากพืชสวนสู่พลังงานชาติ. หนังสือพิมพ์ข่าวสด ปีที่ 16 ฉบับที่ 5774 หน้า 33.

ธนวดี พรหมจันทร์. 2551. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต้นปาล์มน้ำมันที่พัฒนาโดยเครื่องหมายอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำ และสมเกียจ สีสนอง. 2548. เส้นทางสู่ความสำเร็จการผลิตปาล์มน้ำมัน. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

นภาพร นาคอุดม. 2548. การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

บุษบา ล้อประเสริฐ. 2548. คู่มือการปลูกปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ: ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตร.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2549. ผู้ยิ่งใหญ่แห่งปาล์มน้ำมัน. วารสารเคหะการเกษตร 30: 76-98.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. คัมภีร์ปาล์มน้ำมันพืชเศรษฐกิจเพื่อบริโภคและอุปโภค. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มติชน.

เพ็ญติมาส กระมุท. 2552. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิเซลล์ซัสเพนชั่นและการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์. 2553. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทอเนอราจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อน และการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. ดุษฎีนิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์ และสมปอง เตชะโต. 2552. ผลของคู่ผสมปาล์มน้ำมันต่อการสร้างแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 40 (พิเศษ): 226-229.

สายชล จันมาก. 2547. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแหล่งเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) โดยเทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุจินต์ จินายน, ประเสริฐ ชิตพงศ์, พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และสมปอง เตชะโต. 2530. ภาวะปัญหาและแนวทางแก้ไขการขาดแคลนต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีในประเทศไทย. วารสารสงขลานครินทร์ 9: 105-110.

สุรกิตติ ศรีกุล. 2532. การปลูกในปาล์มน้ำมัน. โครงการวิจัยและพัฒนาปาล์มน้ำมัน. ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี. หน้า 16-20.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

สมปอง เตชะโต, พรชัย เหลืองอาภาพงศ์,จรัสศรี นวลศรี และ วันทนา เอ้งย่อง. 2530. การชักนำให้เกิดแคลลัสปฐมภูมิในปาล์มน้ำมัน โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบอ่อน. วารสารสงขลานครินทร์ 9: 1-6.

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

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2540. แนวทางการพัฒนาปาล์มน้ำมันในแผนฯ 8 (2540-2544) ปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์ม. สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร. หน้า 3-19.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2548. แผนยุทธศาสตร์ปาล์มน้ำมัน. การประชุมสัมมนาวิชาการปาล์มน้ำมัน: เส้นทางสู่ความสำเร็จของเกษตรกร ณ โรงแรมมารีไทม์ปาร์ค แอนด์ สปารีสอร์ท จังหวัดกระบี่ ระหว่างวันที่ 8-9 กันยายน 2548.

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อาสลัน หิเล. 2551. การเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี. ดุษฎีนิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลา นครินทร์.

อาสลัน หิเล และสมปอง เตชะโต. 2545. การปรับปรุงวิธีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน. การประชุมเสนอผล งานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาของประเทศไทย ครั้งที่ 3 วันที่ 18-19 กรกฎาคม 2545 ณ มหาวิทยาลัยทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา.

อำพล เสนาณรงค์. 2544. พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวกับการพัฒนาน้ำมันดีเซลจากน้ำมันปาล์ม. วารสารเกษตรก้าวหน้า 4: 9-15.

อรดี สหวัชรินทร์. 2526. อาหารวิทยาศาสตร์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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.

Biofuel. 2007. Journey to forever -how to make your own clean burning biofuel, biodisel from cooking oil, fuel alcohol, renewable energy, glycine, soap making [Online]. Available: http:// journeytoforever.org/biofuel.html. (Access on June 12, 2007)

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.

Chehmalee, S. and Te-chato, S. 2008. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. Journal of Agricultural Technology 4: 137-146.

Cipriani, G., Bella, R. D. and Testolin, R. 1996. Screening RAPD primer for molecular taxonomy and cultivar fingerprint in the genus *Actinidia*. Euphytica 113: 245-249.

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

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

de Touchet, B., Duval, Y., and Pannetier, C. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Plant Cell Reports 10: 529-532.

Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus intiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum 36: 8-23.

Eeuwens, C. J. 1978. Effects of organic nutrient and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum 15: 97-473.

Feeney, M. and Punja, Z. K. 2003. Production of somatic embryos of American Ginseng in suspension culture and regeneration of plantlets. Acta Horticulturae 625: 225-231.

Hilae, A. and Te-chato, Y. 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: 629-635.

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

Kanchanapoom, K. and Tinnongjig, S. 2001. Histology of embryoid development in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cell suspension culture. Songklanakarin Journal of Science and Technology 23: 643-648.

Krajnakova, J., Hely, H. and Dusan, G. 2009. Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 96: 251-262.

Kramut, P. and Te-chato, S. 2010. Effect of culture media, plant growth regulators and carbon sources on establishment of somatic embryo in suspension culture of oil palm. Journal of Agricultural Technology 6: 149-170.

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

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

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

Moretzsohn, M. C., Nunes, C. D. M., Ferreira, M. E. and Grattapaglia, D. 2000. RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theoretical and Applied Genetics 100: 63–70.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

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

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

Rabechault, H. and Cas, S. 1974. Recherches sur la culture *in vitro* des embryons de palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq var. *dura* Becc.). Oleagineaux 29:73-79.

Rajesh, M. K., Radha, E., Karun, A. and Parthasarathy, V. A. 2003. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm – the effect of exogenous polyamines. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 41-47.

Rakshit, S., Zerka, R.,Sekha, J. C., Fatma, T. and Sain, D. 2010. Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 100: 31-37.

Rival A., Bertrand L., Beulé T., Combes M.C., Trouslot P. and Lashermes P. 1998. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Plant Breeding 117: 73-76.

Rohani, O., Sharifah, S. A., Mohd, R. Y., Ong, M., Tarmizi, A. H. and Zamzuri, I. 2001. Tissue culture of oil palm. *In* Advances in Oil Palm Research. (ed. B. Yusof, B. S. Jalani and K. W. Chan) Vol.I, pp. 238-283. Perpustakaan Negara: SMART Print and Stationer Sdn. Bhd.

Sogeke, A. K. 1996. Rapid callus proliferation, somatic embryogenesis and organogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Elaeis 8: 92-103.

Starisky, G. 1970. Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. Euphytica 19: 288-292.

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

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. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) makers for genetic analysis in somaclones of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Thai Journal Agricultural Science 33: 137-145.

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

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

Teixeira, J. B., Sondahl, M. R. Nakamura, T. and Kirby, E. G. 1993. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34: 227-233.

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

Thawaro, S. and Te-chato, S. 2008. RAPD (random amplified polymorphic DNA) marker as a tool for hybrid oil palm verification from half mature zygotic embryo culture. Journal of Agricultural Technology 4: 165-176.

Thiruvengadam, M., Mohamed, V. S., Yang, V. H. and Jayabalan, N. 2006. Development of an embryogenic suspension culture of bitter melon (*Momordica charantia* L.). Scientia Horticulturae 109: 123-129.

Toruan-Mathius, N., Bangun, S. I. I. and Maria-Bintang. 2001. Analysis abnormalities of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from tissue culture by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Menara Perkebunan 69: 58-70.

Wang, H. C., Chen, J. T., Wu, S. P., Lin, M. C. and Chang, W. C. 2003. Plant regeneration through somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived callus of *Areca catechu* L. (Arecaceae). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 39: 34–36.

Winter, P. and Kahl, G.1995. Molecular marker technologies for plant improvement. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11: 438-448.

Wooi, K. C. 1995. Oil palm tissue culture – current practice and constraints. *In* Recent Developments in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology (eds. V. Rao, I. E. Henson and N. Rajanaidu) pp. 21-32. Bangi: Malaysian Palm Oil Board.

Zaid, A. 1987. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures. Acta Horticulturae 212: 561-566.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ และสารละลายอื่น ๆ

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Te-chato และ คณะ (2000)

1. TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

20 mM Tris-HCl (ความเป็นกรดด่าง 8.0)	500	ไมโครลิตร
0.1M EDTA (ความเป็นกรดด่าง 8.0)	200	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. SDS ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

SDS	5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. Ammonium acetate ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ammonium acetate	38.54	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยมิลลิพอร์

4. Ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ethidium bromide	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS)

องค์ประกอบ	ปริมาณสารที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
KH_2PO_4	170
$CaCl_2 2H_2O$	440
$MgSO_4 7H_2O$	370
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
ธาตุเหล็ก	
$FeSO_4 7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
PyridoxineHCl(B6)	0.50
ThiamineHCl(B1)	0.10
Glycine	2.00
Sucrose	30,000
Agar	7,500

ความเป็นกรดด่าง 5.7

ตารางภาคผนวกที่ 2 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Y_3

องค์ประกอบ	ปริมาณสารที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4Cl	535
KNO_3	2,020
KCl	1,492
ธาตุอาหารรอง	
$NH_2PO_4.1H_2O$	370
KI	0.83
H_3BO_3	3.10
$CaCl_2 2H_2O$	294
$MnSO_4.H_2O$	11.20
$ZnSO_4.7H_2O$	7.20
$CuSO_4.5H_2O$	0.16
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.24
$CoCl_2.6H_2O$	0.24
Nicotinic acid	0.024
$MgSO_4 7H_2O$	247
ธาตุเหล็ก	
$FeSO_4 7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
Sucrose	30,000
Agar	7,500

ความเป็นกรดด่าง 5.7

ตารางภาคผนวกที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ ที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของดีเอ็นเอจากการเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมัน โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

ไพรเมอร์	**ลำดับเบส** 5' ⟶ 3'
OPB-08	GTCCACACGG
OPR-11	GTAGCCGTCT
OPT-06	CAAGGGCAGA
OPA-19	GTCCGTATGG
OPAB-01	CCGTCGGTAG
OPAB-09	GGGCGACTAC
OPAB-14	AAGTGCGACC

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล **นางสาวทรรศณีย์ นิยะกิจ**

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210620020

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์ สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ทรรศณีย์ นิยะกิจ และสมปองเตชะโต. 2554. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทอเนอราโดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และการตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. วารสารเกษตร (อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์)

ทรรศณีย์ นิยะกิจ และสมปองเตชะโต. 2554. การตรวจสอบความแปรปรวนของกล้าปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 10 วันที่ 18-20 พฤษภาคม 2554 ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดกรุงเทพ ฯ.