การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD และ SSR

Verification of Somaclonal Variation of Oil Palm Embryogenic Callus on Solid and Liquid Medium by RAPD and SSR Techniques

อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์

Anchalee Arthipatjaporn

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 การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD และ SSR

ผู้เขียน นางสาวอัญชลี อาธิปัจจาภรณ์

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	**คณะกรรมการสอบ**
……..	……ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)	(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 การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD และ SSR

ผู้เขียน นางสาวอัญชลี อาธิปัจจาภรณ์

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของอาหารต่อความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็ง หรือในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน โดยย้ายเลี้ยงทุก ๆ เดือน เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า อาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งเฉลี่ยสูงสุด 0.333 กรัม และในอาหารเหลว 1.191 กรัม เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหาร MS กับ N_6 เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารแข็ง และอาหารเหลว เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารแข็งสูตร N_6 ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 0.391 กรัม สูงกว่าสูตร MS (0.318 กรัม) ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทั้งสูตร MS และ N_6 ให้น้ำหนักสดของเซลล์ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาแหล่งของไนโตรเจน พบว่า อาหารเข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเปปโตน 0.1 กรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยง 1 เดือน สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุดโดยให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.386 กรัม และเซลล์มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี ในส่วนของการตอบสนองต่อแหล่งคาร์บอน พบว่า อาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลเด็กซ์โตส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุดเฉลี่ย 0.334 กรัม และเซลล์มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี นอกจากนี้พบว่า อาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 0.393 กรัม แคลลัสมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี ลักษณะเป็นปมเกาะกันแน่น สีเหลือง เมื่อนำเอ็มโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากอาหารทั้งสองชนิดมาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD และ SSR พบว่า จากไพรเมอร์ RAPD ทั้งหมด 8 ไพรเมอร์ มี 6 ไพรเมอร์ คือ OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPR-11 OPT-06 และ OPA-03 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน ไม่มีความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ส่วนไพรเมอร์ SSR ทั้ง 9 ไพรเมอร์ ก็ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน และไม่มีความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จากการ

ตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยเทคนิค RAPD และ SSR ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นจากระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Thesis Title	Verification of Somaclonal Variation of Oil Palm Embryogenic Callus on Solid and Liquid Medium by RAPD and SSR Techniques
Author	Miss Anchalee Arthipatjaporn
Major Program	Plant Science
Academic Year	2011

ABSTRACT

The effects of mediums on somaclonal variation of the embryogenic callus of oil palm were investigated. The calli were cultured either on solidified or in liquidified MS medium supplemented with dicamba at different concentrations and subcultured at monthly intervals for three months. The results showed that the maximum growth of the calli at 0.333 gram fresh weight (gFW) and cells in suspension at 1.191 gFW were obtained from the solidified and liquidified mediums containing 0.1 mg/l dicamba, respectively. The solidified N_6 medium gave calli FW at 0.391 g higher than that of the MS solidified one (0.318 gFW). However, liquidifaction of both media gave different, non significant results. Among sources of nitrogen tested, solidified MS medium containing 0.1 mg/l dicamba in combination with 0.1 g/l peptone gave the best response in FW of embryogenic callus (0.386 g) and good quality calli were obtained. The response to carbon source indicated that embryogenic callus on solidified MS medium containing 0.1 mg/l dicamba in combination with 3% dextrose gave the highest average calli FW at 0.334 g. Moreover, embryogenic calli on solidified MS medium containing 0.1 mg/l dicamba in combination with 1 mg/l BA gave the best response in average calli FW at 0.393 g after one month of culture, and good quality of compact callus was obtained. Verification of somaclonal variation was detected by RAPD and SSR techniques. DNA from embryogenic callus on the solidified and liquidified media were isolated and detected by RAPD using eight RAPD primers and nine SSR primers. The RAPD technique revealed that six primers namely OPAB-01, OPAB-09, OPAB-14,

OPR-11, OPT-06 and OPA-03 shown clearly DNA patterns with monomorphism bands. In the case of SSR primers, all of them provided clear DNA patterns and high uniformity without somaclonal variation of embyogenic callus. The results obtained from these studies suggest that there are no somaclonal variations in cultured calli, using both solidified and liquidified media.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(13)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	12
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	13
วัสดุ อุปกรณ์	13
วิธีการวิจัย	17
3 ผล	23
4 วิจารณ์	46
5 สรุป	53
เอกสารอ้างอิง	54
ภาคผนวก	62
ประวัติผู้เขียน	68

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาในอาหารสูตร MS ต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	24
2	ผลของชนิด และสูตรอาหาร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	29
3	ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาต่อชนิดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N_6 ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	31
4	ผลของแหล่งไนโตรเจน ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	33
5	ผลของชนิดและความเข้มข้นของไซโตไคนิน ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	35
6	ความเหมาะสมของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวด้วยเทคนิค RAPD	38

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะแคลลัสที่ชักนำได้จากคัพภะปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ อายุ 4 ปี หลังย้ายเลี้ยงทุก ๆ เดือน	13
2	ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	25
3	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และไดแคมบาความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	26
4	ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	27
5	การเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	27
6	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	28
7	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในชนิดอาหาร และสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	30

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	ชนิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N_6 ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และไดแคมบาระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน	32
9	ผลของแหล่งคาร์บอน ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	34
10	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 1 เดือน	36
11	ดีเอ็นเอที่สกัดจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจาการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (lane 1 - 6) และในอาหารเหลว (lane 7 - 12)	37
12	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (lane 1 - 8) และในอาหารเหลว (lane 9 - 16) เมื่อตรวจสอบความแปรปวนด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPAB-01 (ก) OPAB-09 (ข) OPAB-14 (ค)	39
13	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (lane 1 - 8) และในอาหารเหลว (lane 9 - 16) เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPR-11 (ก) OPT-06 (ข) OPA-03 (ค)	40
14	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (lane 1 - 5) และในอาหารเหลว (lane 6 - 10) เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008 (ก) EgCIR0409 (ข) EgCIR0446 (ค)	42

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (lane 1 - 5) และในอาหารเหลว (lane 6 - 10) เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0905 (ก) EgCIR0243 (ข) EgCIR0781 (ค)	43
16	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (lane 1 - 5) และในอาหารเหลว (lane 6 - 10) เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0337 (ก) EgCIR1172 (ข) EgCIR0465 (ค)	44
17	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (ก) และในอาหารเหลว (ข) ด้วยเทคนิค SSR เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008 ตรวจสอบ	45

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชน้ำมันอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในระดับโลก เนื่องจากให้ผลผลิตน้ำมันดิบต่อหน่วยพื้นที่มากกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น (ธีระ และคณะ 2548) เป็นพืชที่มีศักยภาพในการแข่งขันสูงทั้งด้านการผลิต และการตลาด มีการผลิตน้ำมันปาล์มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว ประเทศมาเลเซียเป็นแหล่งผลิตปาล์มน้ำมันหลักของโลก รองลงมา คือ อินโดนีเซีย สำหรับในประเทศไทยจังหวัดกระบี่มีพื้นที่ปลูกปาล์มมากที่สุด ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชยืนต้นขนาดใหญ่ ให้ผลผลิตหลังปลูกแล้วประมาณ 3 ปี และให้ผลผลิตตลอดจนถึงอายุประมาณ 25 ปี น้ำมันที่ได้มีคุณภาพสูงสามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อการอุปโภคและบริโภคกว่า 2,300 ชนิด (พรชัย, 2549) แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ประกอบอาหาร และใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ในอนาคตปาล์มน้ำมันจะมีบทบาทสำคัญ คือ การผลิตไบโอดีเซล (เปรมปรี, 2549) จึงจำเป็นต้องมีการขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนปาล์มน้ำมันอย่างต่อเนื่อง โดยทั่วไปปาล์มน้ำมันใช้เมล็ดในการขยายพันธุ์ จึงจำเป็นต้องผลิตเมล็ดพันธุ์เทเนอราตลอดเวลา (บุษบา, 2548) การปลูกเมล็ดจากโคนต้นมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง โดยเฉพาะลักษณะของผลปาล์ม ให้ผลผลิตทะลายสดต่อไร่ต่อปีต่ำกว่าการปลูกปาล์มพันธุ์ดี ส่งผลเสียหายต่อเศรษฐกิจโดยรวม ในส่วนของต้นพันธุ์ที่นำมาใช้เป็นพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ต้องผ่านกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ที่สามารถยืนยันได้ว่าให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่ต่อหน่วยระยะเวลาสูง และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในแหล่งปลูกได้ดี จึงสามารถนำมาปลูกขยายพันธุ์ต่อไปได้ (Rajesh *et al*., 2003) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เพื่อการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอกับความต้องการ ในการเพาะเลี้ยงต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความแตกต่างของชนิดหรือสายพันธุ์ ชิ้นส่วน อายุพืช วัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง และสภาพของอาหาร (นิตย์ศรี, 2541) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเดียวกันบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว การเปลี่ยนแปลงที่ได้อาจต่างกัน (ประศาสตร์, 2538) อย่างไรก็ตามทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลวสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันได้สำเร็จ โซมาติกเอ็มบริโอพัฒนาผ่านกระบวนการโซมาติก

เอ็มบริโอเจนีซิสมีทั้งยอดและรากเกิดขึ้นพร้อมกัน (สมปอง, 2539ข) และชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมเรียกว่า somaclonal variation โดยมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ชิ้นส่วนพืช สภาพแวดล้อม และสารควบคุมการเจริญเติบโต (Matsumoto *et al*., 2006) การพัฒนาผ่านกระบวนการนี้สามารถนำมาใช้เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชได้ต่อไปในอนาคต มีรายงานความผิดปกติด้านสรีรวิทยาจากการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนีซิส เกิดผลแบบแมนเทิ้ล (Corley *et al*., 1986) ซึ่งเกิดจากส่วนของเกสรตัวผู้พัฒนาเข้าไปในส่วนของเกสรตัวเมีย พบลักษณะนี้ในต้นปาล์มน้ำมันขณะออกดอกอายุประมาณ 2-3 ปี หลังปลูกลงแปลง ทำให้ไม่มีการพัฒนาของผล แต่บางกรณีพบดอกตัวเมียมีเกสรตัวเมียมากกว่า 1 อัน และพัฒนารวมกัน ความผิดปกติของผลแบบแมนเทิ้ลนี้มักเกิดจากใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเร่งพัฒนาการของแคลลัส และเมื่อชักนำเป็นพืชต้นใหม่ แล้วนำไปปลูกลงแปลงต้นที่ได้เกิดลักษณะแมนเทิ้ล 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การปล่อยให้แคลลัสพัฒนาเป็น compact nodular callus ต้นที่ได้เกิดลักษณะผิดปกติเพียงเล็กน้อย นอกจากลักษณะผลผิดปกติแบบแมนเทิ้ลแล้ว ยังพบลักษณะผิดปกติอื่น ๆ ที่เป็นผลมาจากความแปรปรวนทางพันธุกรรม เช่น การแตกกอ การพัฒนาของดอกที่ยอด การผลิตเฉพาะดอกตัวผู้ หรือดอกกระเทย (สมปอง, 2544) จึงมีการนำเอาเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลมาตรวจสอบความแปรปรวนที่เกิดขึ้น เทคนิคที่นิยมใช้ เช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD) amplified fragment of polymorphic DNA (AFLP) และ simple sequence repeat (SSR) (Mohan, 2001) มีรายงานการตรวจสอบความแปรปรวนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระยะโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน โดยไม่ต้องรอให้มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ อีกทั้งยังสามารถจำแนกแหล่งพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในพื้นที่ภาคใต้ด้วย (สายชล, 2547) ซึ่งสามารถช่วยร่นระยะเวลาในการคัดเลือกพันธุ์ได้ ในการศึกษานี้จึงนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยในการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวน และใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมาประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว เพื่อเป็นการยืนยันและรับรองพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมที่ผลิตได้ว่าตรงตามพันธุ์ และไม่เกิดการกลายพันธุ์จากระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การตรวจเอกสาร

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในตระกูล Palmae หรือ Arecaceae เช่นเดียวกับ มะพร้าว จาก อิทผลัม และตาลโตนด มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา เริ่มเข้าสู่ประเทศไทยโดยพระยาประดิพัทธ์ภูบาลเป็นผู้นำเข้ามาเป็นครั้งแรก ปาล์มน้ำมันจัดอยู่ในสกุล *Elaeis* แบ่งได้ 3 ชนิด ได้แก่ *Elaeis guineensis E. oleifera* และ *E. odora* (พรชัย, 2532) *E. guineensis* เป็นชนิดที่ปลูกในปัจจุบัน มี 3 พันธุ์ คือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ส่วนพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า คือ พันธุ์เทเนอราซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ดูรากับพิสิเฟอรา มีเปลือกผลสำหรับอัดน้ำมันมาก ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง มีกะลาบาง (0.5 - 4 มิลลิเมตร) มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบประมาณ 22 - 25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักทะลายสด มีทะลายดกกว่าพันธุ์ดูรา (ศักดิ์ศิลป์ และคณะ, 2541) การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันสามารถทำได้ 2 วิธีการ คือ แบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศ เนื่องจากปาล์มน้ำมันมีการเจริญเติบโตจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ไม่แตกหน่อหรือกิ่งแขนง จึงไม่สามารถขยายพันธุ์โดยวิธีไม่อาศัยเพศโดยทั่วไป เช่น การปักชำตอนกิ่ง และติดตา ดังนั้นการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีไม่อาศัยเพศที่สามารถทำได้ คือ การขยายพันธุ์โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถชักนำเป็นพืชต้นใหม่ได้โดยตรงจากการเพาะเลี้ยงคัพภะ (Te-chato, 1998) หรือชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสจากการวางชิ้นส่วนต่าง ๆ เช่น ช่อดอก (Teixeira *et al.,* 1994) ใบอ่อนจากต้นกล้า ใบอ่อนจากต้นโตที่ให้ผลผลิตแล้ว (สมปอง และคณะ, 2547) ปลายยอด และปลายราก (Teixeira *et al*., 1993) จากการชักนำแคลลัสชิ้นส่วนเหล่านี้สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ นับว่าเป็นความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน สำหรับการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 2 ช่องทาง คือ organogenesis หลังจากวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชสามารถพัฒนาเป็นส่วนของยอด หรือรากได้ ส่วน embryogenesis ทำให้เกิดพืชต้นใหม่โดยผ่านการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ เหมือนกับการสร้างเอ็มบริโอจากการผสมพันธุ์ เรียกเอ็มบริโอที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่างกายว่า โซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) หรือ embryoid ซึ่งเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ พืชทั่วไปมีระยะการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 4 ระยะ คือ เอ็มบริโอระยะรูปกลม รูปหัวใจ รูปทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง แต่ในปาล์มน้ำมันที่ขยายพันธุ์ด้วยกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนีซิสนั้นเห็นพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอเพียง 2 ระยะที่ชัดเจน คือ ระยะรูปกลม และระยะสร้างจาวที่เรียกว่า haustorium ส่วนคัพภะเกิดจากการผสม

ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อและแม่ เป็นการรวมกันของยีนทั้งที่เป็นการรวมแบบปกติและที่นอกเหนือจากปกติ

สูตรอาหารที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิดทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิด พันธุ์ของพืช ตลอดจนชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยง ขั้นตอนแรกของการเพาะเลี้ยงเป็นการชักนำแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปเป็นอวัยวะใด ๆ สำหรับปาล์มน้ำมันนั้นสูตรอาหารที่นิยมใช้มี 2 สูตรคือ Murashige และ Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) และ Euwenes (Y3) (Eeuwens, 1978) ในพืชเกือบทุกชนิดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ การเลือกใช้ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงอาจส่งผลให้เกิดความแปรปรวน ในปาล์มน้ำมันนั้นชิ้นส่วนที่มีศักยภาพพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่มี 3 ชิ้นส่วน คือ ใบอ่อน ราก และช่อดอก ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงแล้วให้ต้นที่ตรงตามพันธุ์มากที่สุด คือ ใบอ่อน อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต อาจส่งเสริมความแปรปรวนให้มีมากยิ่งขึ้น (สมปอง, 2539ก) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในอาหารชักนำแคลลัสเริ่มต้นที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้นสูง 100 - 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อให้เกิดลักษณะผิดปกติของต้นที่ชักนำได้ในลักษณะแมนเทิ้ลเฉลี่ย 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะส่งผลเสียหายต่อธุรกิจการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงต้องมีการควบคุมการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตให้น้อยที่สุดที่จะไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ร่วมกับการตรวจสอบความผิดปกติที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล (Jaligot *et al.,* 2000)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็ง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็ง ใช้วุ้นเพื่อปรับสารละลายอาหารให้มีสภาพเป็นของแข็งมากขึ้น การใช้วุ้นปริมาณมากเกินไปอาจยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ ดังนั้นความเข้มข้นของวุ้นที่เหมาะสมสำหรับอาหารแต่ละชนิดต้องมีการทดสอบก่อน อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่ใช้กันแพร่หลาย และได้ผลดีเพื่อบรรลุวัตถุประสงค์ส่วนใหญ่ คือ 0.8 เปอร์เซ็นต์ และมีการใช้สารสังเคราะห์พวก gelatin และ silica gel นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการพัฒนาสารประกอบพวก acrylamide gels เช่นเดียวกับ starch co-polymers แทนวุ้น ซึ่งการใช้สารเหล่านี้แทนวุ้นมีข้อดี คือ ไม่จำเป็นต้องต้มให้เดือดก็สามารถละลายน้ำได้ แต่ยังมีปัญหาในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เหมาะสมต่อการเจริญ และพัฒนาการของเนื้อเยื่อ การวางเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนและเกาะติดกันเป็นก้อนเรียกว่า แคลลัส ซึ่งพัฒนาต่อไปเป็นต้นกล้า ยิ่งมีการพัฒนาเป็นต้นกล้าได้เร็วเป็นการลดอัตราการกลายพันธุ์ของพืช

ได้ (กฤษฎา, 2544) Teixeira และคณะ (1993) วางเลี้ยงคัพภะอายุ 193 วันหลังการผสมเกสร บนอาหารดัดแปลงสูตร Y3 ส่งเสริมการสร้างแคลลัส 93 เปอร์เซ็นต์ และจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อน (immature zygotic embryo) ของปาล์มน้ำมันทั้งหมด 16 คู่ผสม บนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 27 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน ทำการย้ายเลี้ยงทุกเดือน พบว่า 4 - 5 สัปดาห์แรก เอ็มบริโอเริ่มมีการสร้างแคลลัส และเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน สร้างแคลลัสได้ 4 รูปแบบ คือ friable compact nodular และ root-like โดยคู่ผสมที่ 7 เอ็มบริโอสร้างแคลลัสได้สูงสุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ และให้ลักษณะแคลลัสแบบ nodular สูงสุด 42.94 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสเริ่มต้นบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอได้ (Sanputawong and Te-chato, 2008)

Thuzar และคณะ (2011) รายงานการวางเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมันลูกผสมบนอาหารแข็งสูตร MS และ N_6 เติม picroram หรือไดแคมบา หรือ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า อาหารสูตร N_6 เติม 2,4-D สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด 32 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร putrescine เข้มข้น 0.16 กรัมต่อลิตร casein amino acids เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร และผงถ่าน 2.0 กรัมต่อลิตร วางเลี้ยงเป็นเวลา 3 - 5 เดือน สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลมได้ Kanchanapoom และ Domyoas (1999) เพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารแข็งสูตร Y3 เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ gelrite 0.15 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 15 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส สามารถชักนำแคลลัสได้ 29.36 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 8 สัปดาห์ จากนั้นย้ายเลี้ยงแคลลัสเริ่มต้นบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้ 8.33 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาย้ายเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำพืชต้นใหม่ได้สำเร็จ Rajesh และคณะ (2003) รายงานการชักนำแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 113.12 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2-iP เข้มข้น 14.76 ไมโครโมลาร์ วางเลี้ยง 4 - 5 สัปดาห์ และเมื่อย้ายแคลลัสดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารสูตร Blaydes เติม 2,4-D เข้มข้น 0.045 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ zeatin riboside เข้มข้น 2.85 ไมโครโมลาร์ putrescine เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ spermine เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์การสร้าง

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การวางเลี้ยงบนอาหารเติม TDZ สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอในระยะรูปกลมได้สูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ Chehmalee และ Te-chato (2008) รายงานการวางเลี้ยง คัพภะของปาล์มน้ำมันทั้งหมด 3 คู่ผสม บนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส พบว่า คู่ผสม D865 x P110 สร้างแคลลัสแบบ nodular ได้สูงสุด 31.98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0 0.10 0.25 0.50 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงนาน 3 เดือน พบว่าไดแคมบาเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การตอบสนองต่อการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดได้สูงสุด และเมื่อลดความเข้มข้นของไดแคมบาเหลือ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวได้จำนวนมาก

นอกจากการเพาะเลี้ยงคัพภะแล้ว ใบอ่อนทางใบที่ 6 - 8 จากปลายยอดที่ยังไม่คลี่มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงสามารถพัฒนาให้แคลลัสได้ Te-chato (1998) ย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนบนอาหารสูตร MS เติมเคซีนไฮโดรไลเซทเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D หรือไดแคมบาเข้มข้น 0.1 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสงความเข้ม 2500 ลักซ์ 10 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 3 - 6 เดือน ทำการย้ายเลี้ยงทุกเดือน สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ อาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวได้ อาสลัน และสมปอง (2545) ชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบา หรือ 2,4-D หลังวางเลี้ยง 2 - 3 เดือน ให้แคลลัสลักษณะเป็นปมสีเหลืองอ่อน จากนั้นย้ายเลี้ยงแคลลัสเริ่มแรกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเซทเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงถึง 56.14 เปอร์เซ็นต์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในอาหารเหลว

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว เรียกว่า เซลล์ซัสเพนชั่นหรือเซลล์แขวนลอย เป็นการเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาพการเขย่าเลี้ยง ทำให้เซลล์ได้รับธาตุอาหาร และอากาศเพียงพอสม่ำเสมอ (สมปอง, 2539ข) เนื้อเยื่อที่เหมาะสมแก่การนำมาเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น คือ แคลลัสซึ่งเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ (friable callus) ง่ายต่อการแยกหรือการกระจายเซลล์ (ประศาสตร์,

2538) แคลลัสสามารถชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบอ่อน (Te-chato *et al.,* 2002) ช่อดอก (Teixeira *et al*., 2004) ใบอ่อนจากต้นกล้า (Te-chato, 1998) คัพภะ (Kanchanapoom and Tinnongjig, 2001) เป็นต้น de Touchet และคณะ (1991) ชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นโดยใช้แคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแบบหลวม ๆ อาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลงเติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ adenine sulfate เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ วางเลี้ยงให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 27 ± 1 องศาเซลเซียส เขย่า 90 รอบต่อนาที พบว่า 2,4-D เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นมากที่สุด ให้การเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดได้สูงถึง 4 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น น้ำหนักสดแคลลัสเริ่มต้นที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงอยู่ในช่วง 0.1 - 0.3 กรัม และเมื่อย้ายเซลล์ซัสเพนชั่นจากอาหารสูตรนี้ไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า เกิดการพัฒนาของเอ็มบริโอไปเป็นยอด 18.1 เปอร์เซ็นต์ และพัฒนาเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้ Aberlenc-Bertossi และคณะ (1999) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในอาหารเหลว โดยเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ในอาหารที่ไม่เติม BA แต่มีพัฒนาการต่ำ เมื่อสังเกตสัณฐานวิทยา พบว่า เกิดยอดน้อย เนื่องจากไม่มีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด แต่เมื่อเติม BA เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ในอาหารสูตร MS เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ และชักนำให้เกิดยอดได้ Kanchanapoom และ Tinnongjig (2001) ย้ายเลี้ยงแคลลัสอายุ 8 สัปดาห์ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะไปยังอาหารเหลวสูตรดัดแปลง Y3 เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไกลซีนเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เขย่า 100 รอบต่อนาที สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นได้ และสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตได้สำเร็จ เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา พบว่า เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นเกิดจากเซลล์เมอริสเต็มที่มีไซโตพลาสซึมเข้มข้นเป็นกลุ่มอยู่ในแคลลัส คมกฤษณ์ และ สมปอง (2552) รายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น 1.5 มิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส หรือ adenine sulfate ความเข้มข้นต่าง ๆ วางเลี้ยงให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เขย่า 110 รอบต่อนาที พบว่า ในอาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์สูงที่สุด 3.8

มิลลิลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ลักษณะของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส 7 และ 9 เปอร์เซ็นต์ มีการสะสมเม็ดแป้งภายในเซลล์แตกต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีการสะสมเม็ดแป้ง ในกรณีของ adenine sulfate พบว่าอาหารสูตร MS เติม adenine sulfate เข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงที่สุด 5.53 มิลลิลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ลักษณะของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่เติม adenine sulfate ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่แตกต่างกัน

การตรวจสอบความแปรปรวนโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช หรืออาจใช้เพื่อจำแนกและตรวจสอบพันธุ์พืช ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นทำได้โดยการสังเกตจากลักษณะภายนอก หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ความสูง ลักษณะทรงพุ่ม สีของลำต้น ขนาด รูปร่าง และสีของเมล็ด อายุวันออกดอก และวันเก็บเกี่ยว อย่างไรก็ตามลักษณะดังกล่าวมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (Powell *et al*., 1996) ซึ่งถือว่าเป็นเครื่องหมายดั้งเดิมที่ใช้ในอดีต อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดหลายประการ เนื่องจากพืชบางชนิดมีลักษณะต่าง ๆ ใกล้เคียงกันมาก ไม่สามารถแยกความแตกต่างด้วยสายตาได้ จึงนำเอาเทคนิคทางโมเลกุลมาตรวจสอบความแปรปรวนที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถทำได้ตั้งแต่ระดับเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ถือเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูง สามารถบอกถึงลักษณะ หรือเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความเฉพาะเจาะจงที่นำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรม และสามารถถ่ายทอดลักษณะนั้น ๆ ไปยังรุ่นลูกได้ (สุรีพร, 2546)

การตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแบ่งออกเป็น 2 ระดับด้วยกัน คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนต่าง ๆ การใช้เทคนิคไอโซไซม์ ซึ่งเครื่องหมายที่สร้างขึ้นจากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ เช่น เปอร์ออกซิเดส เอสเตอเรส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส เป็นต้น ในกรณีของปาล์มน้ำมันมีการใช้วิธีการนี้ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมัน (อาสลัน, 2551) และ กล้วย (Bhat *et al*., 1992) หากรูปแบบของเอนไซม์ หรือไอโซ-ไซม์ที่ได้เหมือนกันแสดงว่า ไม่มีความแปรปรวนในรูปแบบของเอนไซม์ที่ทดสอบ การตรวจสอบอีกระดับหนึ่ง คือ ระดับดีเอ็นเอ เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของระดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ซึ่งมีข้อดีกว่าการตรวจสอบระดับโปรตีน หรือเอนไซม์ เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมี

ความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานานได้ และดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน และคงที่ จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในทุกระยะการเจริญเติบโต และสภาพทางสรีรวิทยา โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ในทางเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมนำเครื่องหมายทางดีเอ็นเอมาใช้ในการจำแนกความแปรปรวนของแคลลัสโดยตรง ไม่ต้องรอให้แคลลัสพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ หรืออาจตรวจสอบลักษณะที่จำเพาะที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยง เช่น ลักษณะผลผิดปกติแบบแมนเทิ้ลของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งให้ผลถูกต้องและแม่นยำ (Matthes *et al.,* 2001; Jaligot *et al*., 2002; Rival *et al.,* 1998) เทคนิคทางด้านดีเอ็นเอดังกล่าวมีหลายเทคนิค แต่ที่นำมาใช้ตรวจสอบความแปรปรวนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในการศึกษานี้มี 2 ชนิด คือ RAPD และ SSR

1. **เทคนิค** random amplified polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการทำงานของ polymerase chain reaction (PCR) เพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นประมาณ 10 เบส เพียงชนิดเดียวที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม ซึ่งไม่จำเพาะเจาะจงกับยีนใด จากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอมาแยกขนาดโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Williams *et al*., 1990) เทคนิค RAPD ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ดีเอ็นเอน้อยประมาณ 20 - 100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา (Winter and Kahl, 1995) แต่มีข้อจำกัดในการทดลองซ้ำ ซึ่งบางครั้งได้ผลที่แตกต่างไปจากเดิม เนื่องจาก RAPD มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ สูง จึงต้องควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ และเทคนิคนี้แสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์แท้ และพันธุ์ทางได้ (Cipriani *et al.,* 1996) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD มีข้อได้เปรียบกว่าการวิเคราะห์ไอโซไซม์ และโปรตีน คือ สามารถตรวจสอบได้จากทุกส่วนของพืช ไม่ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยตรง (สมศักดิ์ และคณะ, 2538) สำหรับปฏิกิริยา PCR ของ RAPD ในแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

1.1 Denaturation ดีเอ็นเอเป้าหมายสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว ขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 90 - 95 องศาเซลเซียส

1.2 Annealing ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันกับดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่แยกเป็นสายเดี่ยว ใช้อุณหภูมิประมาณ 40 - 60 องศาเซลเซียส

1.3 Extention เอ็นไซม์ DNA polymerase สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ที่เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย จนกระทั่งได้ดีเอ็นเอคู่ใหม่ ในขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส

Rival และคณะ (1998) ใช้เทคนิค RAPD ตรวจสอบความแปรปรวนของปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีลักษณะผลแบบแมนเทิ้ลจากต้นแม่ และต้นลูกที่นำมาตรวจสอบได้จากการชักนำผ่านกระบวนการ somatic embryogenesis ในการตรวจสอบใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 259 ไพรเมอร์ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างต้นแม่ และต้นลูก Toruan-Mathius และคณะ (2001) ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างต้นปกติ และต้นผิดปกติของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า ไพรเมอร์ OPC-07 OPC-09 OPW-19 และ SC10-19 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นจาก 16 สายพันธุ์ได้ 0.47 - 0.96 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะโคลน MK179 มีการตอบสนองคงที่ ในขณะเดียวกันไม่พบรูปแบบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อการตรวจสอบลักษณะความผิดปกติ สายชล (2547) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันทั้ง 3 แบบในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย คือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPB-08 OPR-11 OPT-06 0PT-19 0PAB-01 OPAB-09 และ OPAB-14 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพันธุ์ และแถบดีเอ็นเอชัดเจน โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 209 แถบ เฉลี่ย 29.85 แถบต่อไพรเมอร์ และเมื่อนำมาสร้างเดนโดรแกรมเพื่อหาความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) จากโปรแกรม SPSS พบว่าปาล์มน้ำมันที่ปลูกในแถบภาคใต้ของประเทศไทยมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย ธนวดี และคณะ (2552) ใช้เทคนิค RAPD ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้ไพรเมอร์ OPAB-01 และ OPAB-09 เนื่องจากมีความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอค่อนข้างสูง ให้ลักษณะของแถบดีเอ็นเอเป็น monomorphism จึงนำมาใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าทั้งใน และนอกหลอดทดลอง ไม่พบความแปรปรวนเกิดขึ้นกับต้นปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชยืนต้นหลายชนิดเช่น ส้ม (Machado *et al.,* 1996) กาแฟ (Lashermes *et al.,* 1999) อินทผลัม (Sedra *et al.,* 1998) และมะพร้าว (Ashburner *et al.,* 1997) เป็นต้น

2. **เทคนิค** simple sequence repeat (SSR)

SSR หรือไมโครแซทเทลไลท์ เป็นลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงต่อเนื่องกันที่ลำดับหนึ่ง ๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำสั้นมาก 1 - 4 คู่เบส ไม่เกิน 10 คู่เบส SSR เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยปฏิกิริยา PCR เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่มีในไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่งเดียวกันในตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างที่ไม่เท่ากัน จะตรวจสอบได้ทันทีเมื่อนำมาแยกขนาดโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (จรัสศรี, 2548) จากเอกลักษณ์ และคุณสมบัติเด่นเฉพาะตัวของ SSR ทำให้มีผู้นิยมใช้ในการคัดเลือก และตรวจสอบความคงที่ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์พืชอย่างแพร่หลาย การพัฒนาเครื่องหมาย SSR มีวิธีที่ยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายสูง แต่หลังจากพัฒนาเครื่องหมาย SSR ได้แล้ว สามารถนำไปใช้ได้ง่าย เนื่องจากเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้การเพิ่มปริมาณโดย PCR จึงต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมีขนาดเล็ก ไม่จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีคุณภาพดีมากนัก ผลการตรวจสอบมีความแม่นยำ สามารถส่งข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ เพื่อนำไปใช้ที่ห้องปฏิบัติการใดก็ได้ มีโพลิมอร์ฟิซึมสูง เพราะเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดซ้ำง่าย นอกจากนี้มีการแสดงออกแบบข่มร่วม (co-dominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ มีการกระจายตัวทั้งจีโนม เหมาะสำหรับใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ อีกมาก Garland และคณะ (1999) ใช้เครื่องหมาย SSR ตรวจสอบความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมข้าวในประเทศออสเตรเลีย Rajob และคณะ (2006) ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพด และ Wilhelm และคณะ (2006) ใช้ตรวจสอบลักษณะตรงตามพันธุ์ของโอ๊ค นอกจากนี้มีการนำเครื่องหมาย SSR มาใช้ประโยชน์ในด้านการตรวจสอบความแปรปรวนของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Singh และคณะ (2007) รายงานการใช้เครื่องหมาย SSR ในการทำแผนที่พันธุกรรม และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับต้นเทเนอราที่ให้ผลผลิตดี คือ T128 จาก Malaysian Palm Oil Board และ UP1026 จาก Colombia โดยกำหนดให้ปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอราจากแหล่งทั่วไป คือ ortet และต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ ramet จากการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ PCT1 และ PCT4 แยกความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง ortet และ ramet ได้ และเมื่อนำโคลน ramet กลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ พบว่า ต้นใหม่ที่ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งภายในแถวและระหว่างแถว แสดงให้เห็นว่า โคลนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม Thawaro (2009) ตรวจสอบพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราระหว่างพันธุ์พ่อพิสิ-

เฟอรากับพันธุ์แม่ดูรา ด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ พบว่ามี 2 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและสามารถตรวจสอบลูกผสมได้ โดยไพรเมอร์ EgCIR0008 สามารถตรวจสอบลูกผสมเบอร์ 77 118 119 และ 137 ส่วนไพรเมอร์ EgCIR1772 สามารถตรวจสอบลูกผสมเบอร์ 58 และ 130 ได้ และตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม และต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมด้วยเทคนิค SSR ไม่พบความแปรปรวนของโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม และต้นกล้าปาล์มน้ำมันทุกคู่ผสม สกุลรัตน์ (2553) รายงานการตรวจสอบความเป็นลูกผสม และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันลูกผสมในระยะแคลลัสเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว และต้นกล้า ด้วยเทคนิค SSR พบว่าไพรเมอร์ EgCIR0008 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ และพันธุ์แม่ของลูกผสมได้ แสดงว่า แคลลัสนั้นเป็นลูกผสมที่แท้จริง สามารถนำมาใช้ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวน โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของอาหารและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณ และลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7
2. เพื่อศึกษาผลของชนิดอาหารในการเพาะเลี้ยงต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 ด้วยเทคนิค RAPD และ SSR

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ใช้แคลลัสชักนำจากคัพภะปาล์มน้ำมันลูกผสมคู่ที่ 7 ที่ให้ผลผลิตสูงจากบริษัทโกลเด้นเทอเนร่า จำกัด จังหวัดกระบี่ แคลลัสดังกล่าวดูแลบนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา แคลลัสดังกล่าวมีอายุ 4 ปี ทำการย้ายเลี้ยงทุก ๆ เดือน (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 ลักษณะแคลลัสที่ชักนำได้จากคัพภะปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ อายุ 4 ปี หลังย้ายเลี้ยงทุก ๆ เดือน

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS และ N_6 (รายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 1)
- กรดแอสคอร์บิค
- น้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโทส เด็กซ์โตรส แลคโตส และน้ำตาลแอลกอฮอล์ 2 ชนิด คือ แมนนิทอล และซอร์บิทอล
- เปปโตน เคซีนไฮโดรไลเซท และ กลูตามีน
- สารควบคุมการเจริญเติบโตไดแคมบา และสารกลุ่มไซโตไคนิน
- แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- กรดโซเดียมเอธิลีนไดอะมินเทตราอะซิติก
- คลอโรฟอร์ม
- โซเดียมคลอไรด์
- โซเดียมไดดิซิลซัลเฟต
- ทริส-กรดไฮโดรคลอริค
- พอลีไวนิลไพโรลิโดน 40 (PVP-40)
- เมอร์แคบโตเอธานอล
- เอธานอล
- แอมโมเนียมอะซิเตต
- ไอโซโพรพานอล
- เฮกซะเดคิลไตรเมธิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB)

1.2.3 สารเคมีสำหรับใช้ทำอิเลคโทรโฟรีซิส

- 100 bp DNA Ladder (Operon, USA)
- Loading buffer
- กรดบอริค
- กรดอะซิติก

- ซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$)
- โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
- โซเดียมไทโอซัลเฟท ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)
- ทริสเบส
- เทมเมด (N,N,N',N'-tetramethyethyenediamine)
- ไบนด์ไซเลน
- โพลีอะคริลาไมด์ : bis-acrylamide solution (29:1)
- โพลีอะคริลาไมด์เจล
- ฟอร์มาไมด์
- ฟอร์มาลดีไฮด์
- ยูเรีย
- เรเพล
- แลมด้าดีเอ็นเอ (λ DNA)
- อะกาโรสเจล
- เอธิเดียมโบรไมด์
- แอมโมเนียมเพอซัลเฟท

1.2.4 **สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์**

- dNTP (dATP dTTP dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- Primer RAPD จากบริษัท Operon Tech. (USA)
  (รายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 2)
- Primer SSR จากบริษัท Operon Tech. (USA)
  (รายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 3)
- แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)
- 10X *Taq* buffer (Promega, USA)
- *Taq* DNA Polymerase (Promega, USA)

2. อุปกรณ์การทดลอง

2.1 อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องแก้ว ประกอบด้วย กระบอกตวง ปิเปต บีกเกอร์ จานเพาะเลี้ยง ขวดปรับปริมาตร ขวดเพาะเลี้ยง ขวดรูปชมพู่ และหลอดทดลอง
- เครื่องกรองจุลินทรีย์
- กระดาษกรองจุลินทรีย์ขนาดช่อง 0.45 ไมโครเมตร
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องคนสารละลายพร้อมแท่งแม่เหล็ก
- ตู้อบฆ่าเชื้อ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้อบแห้ง ไมโครเวฟ และตู้เย็น
- ไมโครปิเปต กระดาษชำระ

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยง

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ปากคีบ ใบมีดผ่าตัดพร้อมด้าม
- ปิเปตปลายตัดขนาด 5 มิลลิลิตร
- เครื่องเขย่า ชั้นวางเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิ
- กล้องถ่ายรูปดิจิตอล

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การทำอิเลคโทรโฟรีซิส และการทำพีซีอาร์

- ตู้เย็น และตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส
- เครื่องไมโครเซ็นตริฟิวจ์
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องคนละลายสารอัตโนมัติ
- เครื่องปั่นผสมสาร
- ปิเปตปรับปริมาตร
- เครื่องเขย่า (vortex)

- เครื่อง XP Thermal Cycler บริษัท Bioer Technology จำกัด รุ่น TC-XP ประเทศญี่ปุ่น)
- เครื่องอิเลคโทรโฟรีซิส
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- ตู้อบไมโครเวฟ
- หลอดเอฟเพนดอร์ฟขนาด 15 มิลลลิตร
- ไมโครปิเปต และทิป
- น้ำแข็ง และกระติกน้ำแข็ง
- แท่งแก้วสำหรับบดตัวอย่าง เครื่องแก้ว กระบอกตวง และขวดต่าง ๆ

วิธีการวิจัย

1. ศึกษาความเข้มข้นของไดแคมบาในอาหารแข็งและอาหารเหลว ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่น

นำแคลลัสอายุ 1 เดือน หลังย้ายเลี้ยงน้ำหนักสด 0.1 กรัม มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็ง และน้ำหนัก 0.25 กรัม มาวางเลี้ยงในอาหารเหลว อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมไดแคมบาเข้มข้น 0 0.1 0.3 0.5 0.7 0.9 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 อาหารแข็งเติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ การวางเลี้ยงบนอาหารแข็งใช้หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร บรรจุอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอด สำหรับการวางเลี้ยงในอาหารเหลวใช้ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที สภาพการวางเลี้ยงเช่นเดียวกับอาหารแข็ง ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ฟลาสก์ ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณหลังจากการวางเลี้ยงทุก ๆ เดือน ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น และลักษณะของแคลลัส ในอาหารแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นของไดแคมบาต่าง ๆ ใช้แผนการทดลองแบบ completely ramdomized design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

2. ศึกษาชนิดอาหาร และสูตรอาหาร ต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่น

นำแคลลัสน้ำหนักสด 0.1 กรัม มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็ง และ น้ำหนัก 0.25 กรัม มาวางเลี้ยงในอาหารเหลว อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง 2 สูตร คือ MS และ N_6 โดยอาหารแต่ละชนิดและแต่ละสูตร เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 อาหารแข็งเติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที วางเลี้ยง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอด ในส่วนของการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ฟลาสก์ เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังการวางเลี้ยง 1 เดือน บันทึกน้ำหนักสด และลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว ใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี least significant difference (LSD)

3. ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้ำหนักสด 0.1 กรัม มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเปปโตน เคซีนไฮโดรไลเซท และ กลูตามีน ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร โดยมีอาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนข้างต้นเป็นชุดควบคุม อาหารที่ใช้ในการทดลองทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เพาะเลี้ยงทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอด ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยง 1 เดือนบันทึกน้ำหนักสด เปรียบเทียบกันในแต่ละทรีตเมนต์ ใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4. ศึกษาแหล่งของคาร์บอนต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้ำหนักสด 0.1 กรัม มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ

น้ำตาล 7 ชนิด คือ กลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส เด็กซ์โตรส และ แลคโตส และน้ำตาลแอลกอฮอล์ 2 ชนิด คือ แมนนิทอล และซอร์บิทอล น้ำตาลทั้ง 7 ชนิด ใช้ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เพาะเลี้ยงทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอด ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยง 1 เดือน บันทึกน้ำหนักสด เปรียบเทียบกันในแต่ละทรีตเมนต์ ใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

5. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของไซโตไคนินต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้ำหนักสด 0.1 กรัม มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไซโตไคนิน 3 ชนิด ได้แก่ ไคเนติน (KN) เบนซิลอะดีนีน (BA) และ ไทเดียซูรอน (TDZ) ความเข้มข้น 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้อาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ปราศจากไซโตไคนินเป็นชุดควบคุม อาหารที่ใช้ในการทดลองทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เพาะเลี้ยงทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอด ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยง 1 เดือน บันทึกน้ำหนักสด เปรียบเทียบกันในแต่ละทรีตเมนต์ ใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

6. การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD และ SSR

6.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Te-chato (2000) โดยเก็บตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 50 มิลลิกรัมน้ำหนักสด ใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม TE บัฟเฟอร์ (Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 และ EDTA 0.1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และโซเดียมไดดิซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 20 ไมโครลิตร บดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว นำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 110 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เมื่อเห็นสายดีเอ็นเอแล้ววางไว้หรือนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0.5 - 1 นาที จากนั้นเทไอโซโพรพา-นอลทิ้ง ล้างด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 2 ครั้ง เทเอธานอลทิ้ง ผึ่งให้แห้ง หลังจากนั้นเติม TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

6.2 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) เป็นเวลาประมาณ 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 - 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 - 10 นาที นำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation

6.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เทคนิค RAPD เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากหัวข้อ 6.1 โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการที่รายงานโดยสายชล (2548) ปฏิกิริยาดังกล่าวประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ จำนวน 8 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPR-11 OPT-06 OPA-03 OPB-08 และ OPA-19 แต่ละไพรเมอร์ใช้ความเข้มข้นละ 0.3 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.50 ไมโครลิตร 10X บัฟเฟอร์ร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.50 ไมโครลิตร ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTP) เข้มข้นชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Tag* polymerase เข้มข้น 1.5 ยูนิต ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 17.75 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร

ตั้งอุณหภูมิเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

1. Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
2. Denaturation ใช้อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4. Extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 2 - 4 ทำซ้ำ 39 รอบ
5. Final-Extention ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 37 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อีก 1 รอบ

ในกรณีของเทคนิค SSR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามรายงานของ Thawaro (2009) และสกุลรัตน์ (2553) ด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ ที่เป็น forward และ reverse ทั้งหมด 9 คู่ไพรเมอร์ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 ปฏิกิริยาดังกล่าวประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 20 นาโนกรัม ปริมาตร 1.8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละคู่เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10X บัฟเฟอร์ร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เข้มข้น 0.5 ยูนิต ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 4.1 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

1. Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
2. Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing ใช้อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4. Extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำ 35 รอบ
5. Final-Extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที

6.4 การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

6.4.1 เทคนิค RAPD

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มาแยกขนาดดีเอ็นเอ โดยการทำอิเลคโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจลอะกาโรส เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE บัฟเฟอร์ (Tris Base 0.45 โมลาร์ Boric acid 10 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0) แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ นำแผ่นเจลตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation บันทึกภาพเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏระหว่างดีเอ็นเอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว เพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม

6.4.2 เทคนิค SSR

หลังเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ นำดีเอ็นเอปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอ โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่จะนำไปวิเคราะห์มาทำให้เสียสภาพก่อน เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการเสียสภาพธรรมชาติในเวลาต่างกันเมื่ออยู่ในเจล โดยผสมกับฟอร์มาไมด์ 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบใน loading buffer นำไปเพิ่มปริมาณที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยการทำอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส ใช้เจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมแถบดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต โดยนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย fixative (acetic acid 10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 20 นาที เขย่าเบา ๆ ล้างในน้ำกลั่น 20 นาที เปลี่ยนน้ำล้างใหม่แล้วล้างต่ออีก 10 นาที นำแผ่นเจลมาย้อมในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ ก่อนนำแผ่นเจลจุ่มน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว (5 วินาที) เพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรตที่มากเกินพอออก แล้วนำแผ่นเจลใส่ในสารละลาย developer (sodium carbonate 25 เปอร์เซ็นต์ แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส formaldehyde 40 เปอร์เซ็นต์ sodium thiosulfate 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เขย่าความเร็วสม่ำเสมอ จนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยแช่แผ่นเจลในสารละลายกรดอะซิติก (stop solution) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม

บทที่ 3

ผล

1. ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาในอาหารแข็งและอาหารเหลว ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่น

น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพิ่มขึ้น ตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมหรือเติมไดแคมบาที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 เดือน ในเดือนแรกของการเลี้ยงพบว่า การเจริญของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสทุกหน่วยทดลองใกล้เคียงกัน การเจริญเริ่มมีความแตกต่างกันหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนขึ้นไป (ภาพที่ 2) เมื่อย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน บนอาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การตอบสนองต่อการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 0.333 กรัม รองลงมา คือ ไดแคมบาเข้มข้น 0.5 0.3 0 1.0 0.9 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย 0.303 0.295 0.279 0.262 0.261 และ 0.258 กรัม ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตารางที่ 1) แคลลัสที่ชักนำได้บนอาหารแข็งที่เติมสารไดแคมบามีลักษณะเป็นปมขนาดเล็ก เกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองถึงเหลืองเข้ม (ภาพที่ 3) ในขณะที่การวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 1.191 กรัม รองลงมา คือ ไดแคมบาเข้มข้น 0.3 0.5 0.7 0.9 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติม ให้การเพิ่มน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย 0.946 0.885 0.848 0.776 0.764 และ 0.718 กรัม ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 1 ภาพที่ 4) สำหรับการเลี้ยงในอาหารเหลวทำการวัดการเจริญเติบโตทุก ๆ 5 วัน พบว่า ปริมาตรตะกอนเซลล์ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารที่เติมไดแคมบาความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถเพิ่มปริมาณได้ตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้น อาหารเติมไดแคมบาความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้ดีที่สุด ในช่วงวันที่ 15 - 30 วันหลังการเลี้ยง โดยมีปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 3.4 มิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (ภาพที่ 5) แคลลัสที่ชักนำได้มีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็ก เกาะกันแน่น แต่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่เติมไดแคมบา หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบางส่วนตาย เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือสีดำ ไม่สามารถเจริญเติบโตเพื่อเพิ่ม

ปริมาณต่อไปได้ (ภาพที่ 6) และเกิดลักษณะเช่นนี้กับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ไม่เติมไดแคมบา หลังวางเลี้ยงเป็นเวลามากกว่า 3 เดือน

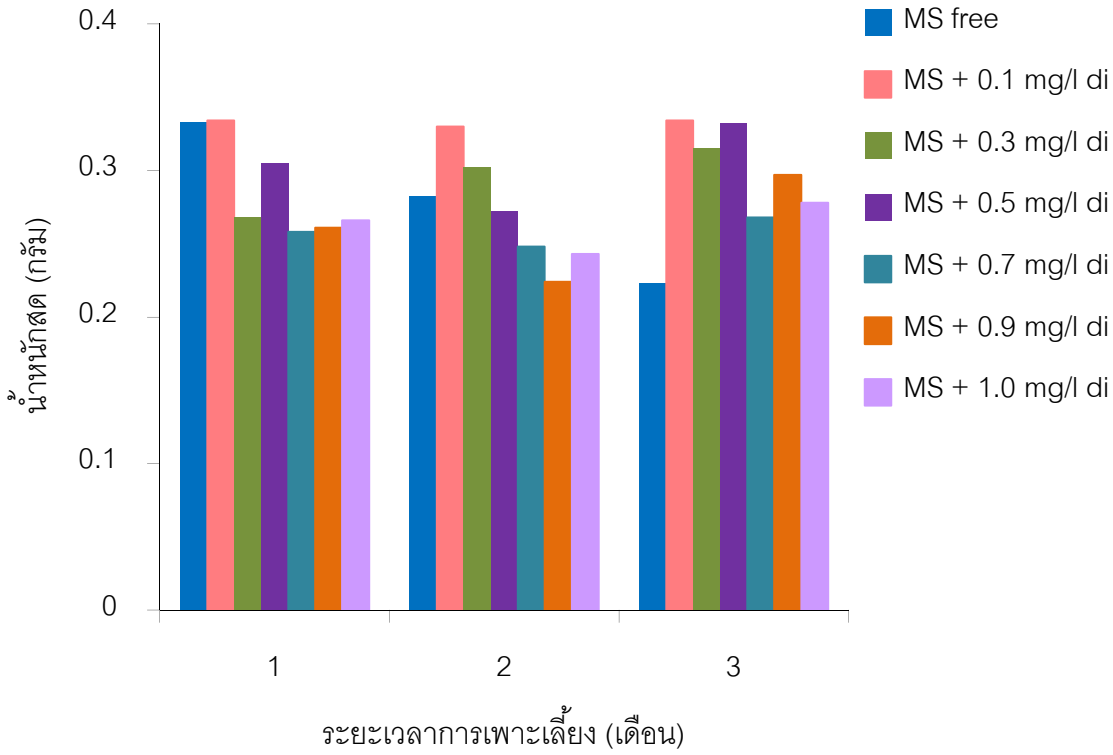
ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาในอาหารสูตร MS ต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

ความเข้มข้นของไดแคมบา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสด (กรัม)	
	อาหารแข็ง	อาหารเหลว
0	0.279[ab]	0.718
0.1	0.333[a]	1.191
0.3	0.295[ab]	0.946
0.5	0.303[ab]	0.885
0.7	0.258[b]	0.848
0.9	0.261[b]	0.776
1.0	0.262[b]	0.764
F-test	*	ns
C.V. (%)	10.53	36.17

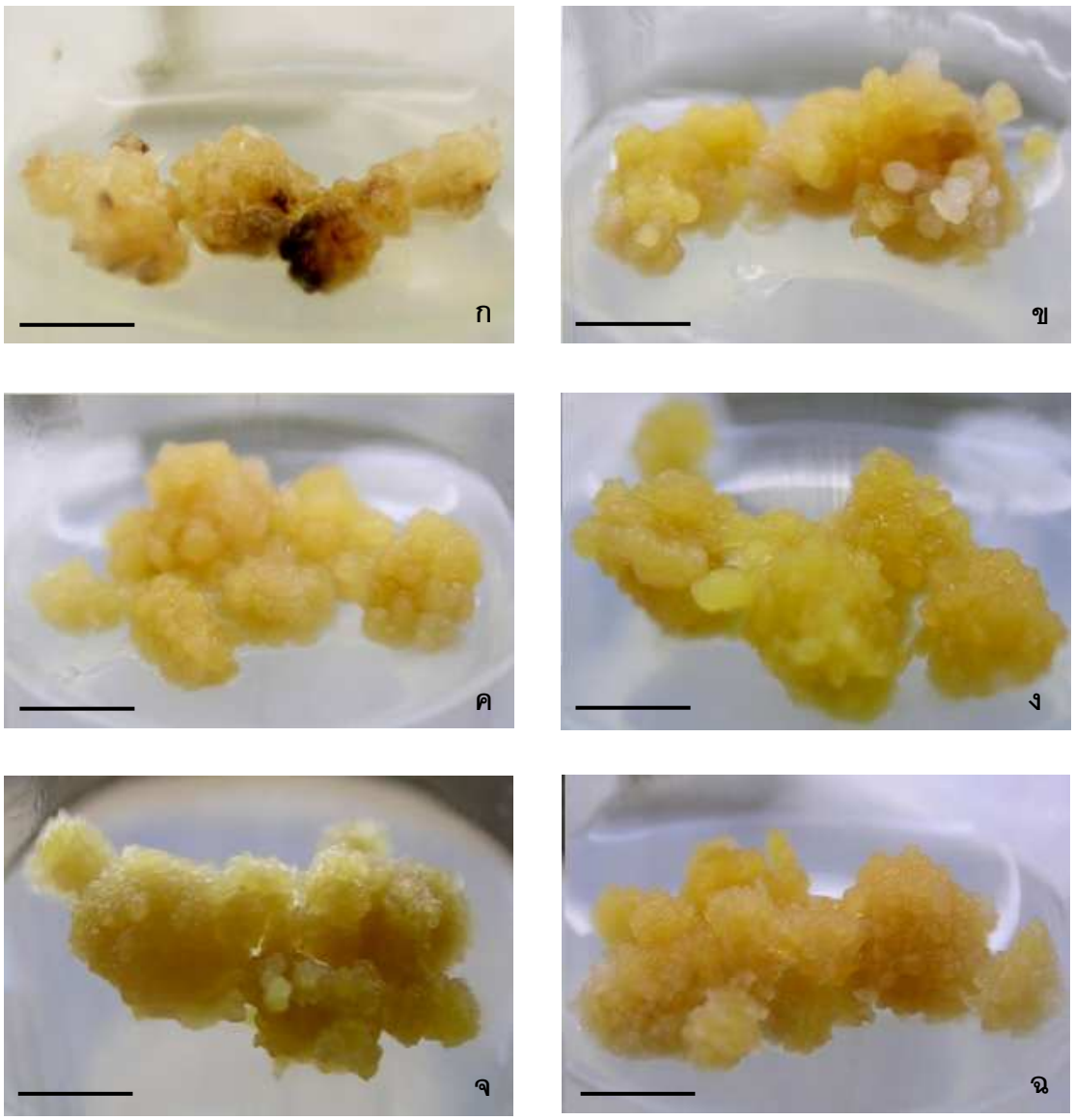
ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



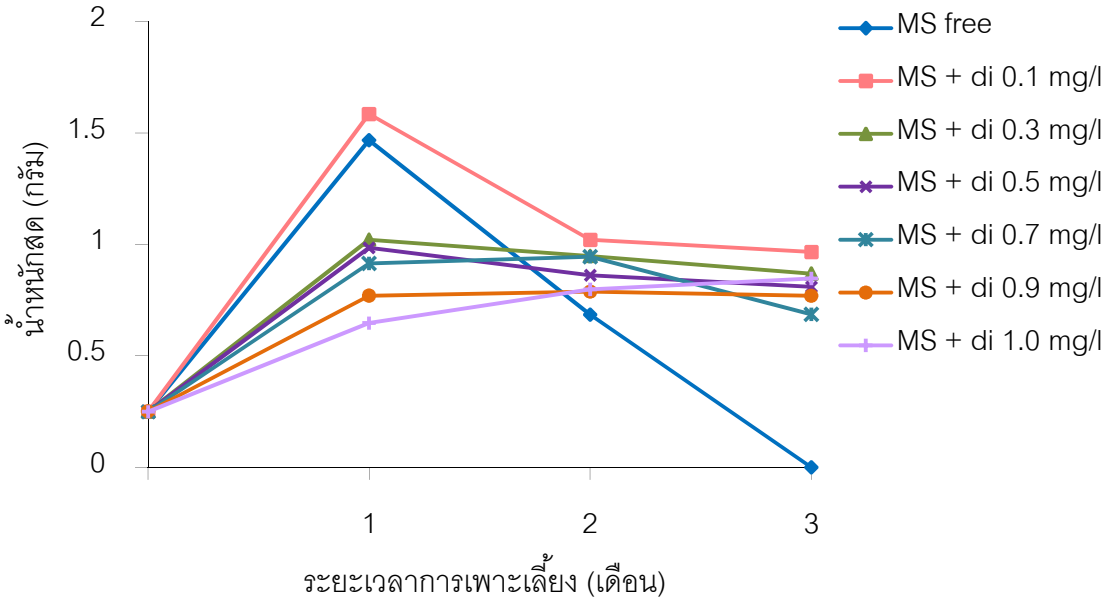
ภาพที่ 2 ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน



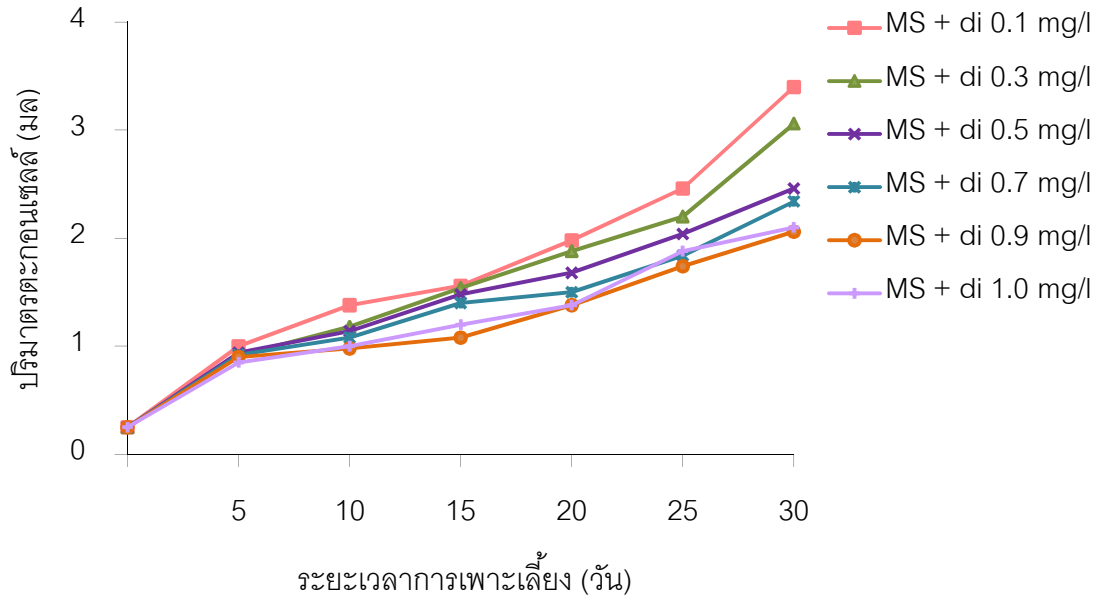
ภาพที่ 3 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และไดแคมบาความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (บาร์ = 0.5 ซม.)

ก ไม่เติมไดแคมบา ข ไดแคมบา 0.1 มก/ล ค ไดแคมบา 0.3 มก/ล

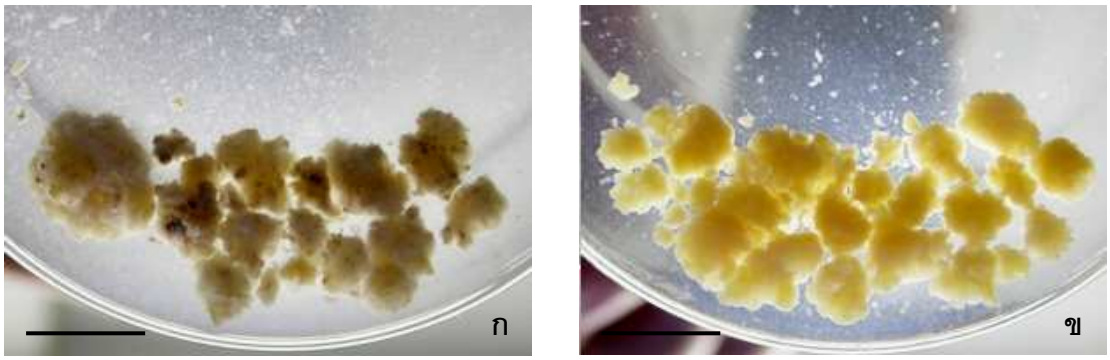
ง ไดแคมบา 0.5 มก/ล จ ไดแคมบา 0.7 มก/ล ฉ ไดแคมบา 1.0 มก/ล



ภาพที่ 4 ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 6 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (บาร์ = 1 ซม.)

ก ไม่เติมไดแคมบา ข เติมไดแคมบา 0.1 มก/ล

2. ผลของชนิดอาหาร และสูตรอาหาร ต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่น

2.1 การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

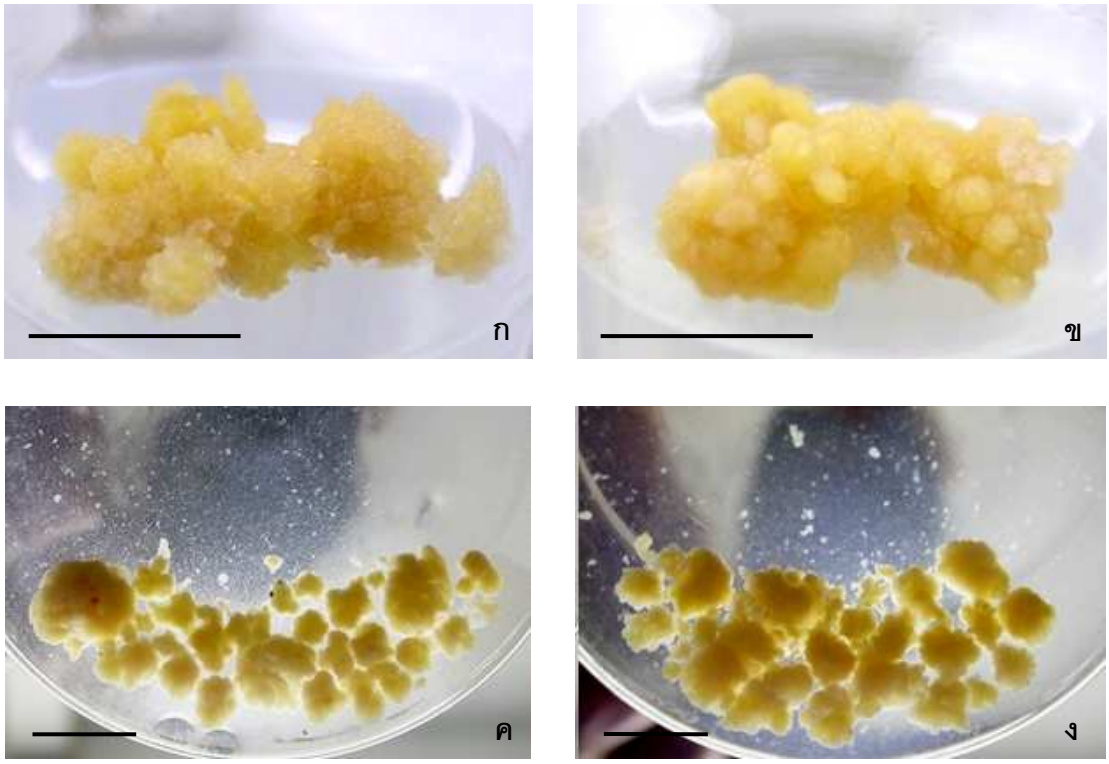
การเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน โดยที่ชนิด และสูตรอาหารแตกต่างกัน พบว่า อาหารแข็งสูตร N_6 สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสให้น้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุด 0.391 กรัม สูงกว่าอาหารแข็งสูตร MS (0.318 กรัม) แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในขณะที่การวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ให้การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 1.496 กรัม สูงกว่าอาหารสูตร N_6 (1.468 กรัม) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 7)

ตารางที่ 2 ผลของชนิด และสูตรอาหาร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ชนิดอาหาร	สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม)
อาหารแข็ง	MS	0.318[b]
	N_6	0.391[a]
$LSD_{.05}$		0.034
C.V.(%)		5.60
อาหารเหลว	MS	1.496
	N_6	1.468
$LSD_{.05}$		0.435
C.V.(%)		14.99

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี LSD



ภาพที่ 7 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในชนิดอาหาร และสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 1 ซม.)

ก อาหารแข็งสูตร MS ข อาหารแข็งสูตร N_6

ค อาหารเหลวสูตร MS ง อาหารเหลวสูตร N_6

2.2 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

หลังเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร N_6 เติมไดแคมบาที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0.1 0.3 0.5 0.7 0.9 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ไดแคมบาแต่ละความเข้มข้นให้การตอบสนองต่อการสร้างแคลลัสที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 8) แคลลัสที่ชักนำได้มี 4 ชนิด คือ friable compact nodular และ root-like โดยที่ friable มีลักษณะเปราะร่วน สีเหลืองอ่อน compact ลักษณะเนื้อเยื่อเกาะกันแน่น สีเหลือง nodular ลักษณะเป็นปมเกาะกันแน่น สีเหลืองเข้ม และ root-like ลักษณะคล้ายราก ปลายแหลมยาว สีเหลืองใส ระดับความเข้มข้นของ ไดแคมบาส่งผลต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในลักษณะต่าง ๆ การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งที่ปราศจากสาร

ควบคุมการเจริญเติบโต ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ เนื้อเยื่อบางส่วนตาย มีสีน้ำตาลหรือสีดำ ในส่วนของการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.9 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสแบบ compact สูงสุด 66 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การวางเลี้ยงบนอาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัสแบบ nodular สูงสุด 54 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสที่มีลักษณะคล้ายราก 4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาต่อชนิดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N_6 ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ความเข้มข้นของไดแคมบา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ชนิดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)			
	friable	compact	nodular	root-like
0.1	8	44	48	0
0.3	0	52	48	0
0.5	14	32	54	0
0.7	2	42	52	4
0.9	0	66	34	0
1.0	0	66	34	0

ภาพที่ 8 ชนิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N_6 ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และไดแคมบาระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 0.5 ซม.)

ก friable callus ข compact callus

ค nodular callus ง root-like callus

3. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

การเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บนอาหารแข็งสูตร MS เติม เปปโตน เคซีนไฮโครไลเซท และ กลูตามีน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0.1 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร) โดยใช้อาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุม พบว่า กลูตามีนเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ให้การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุดโดยให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.396 กรัม แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่เนื้อเยื่อบางส่วนตายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 11.11 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปปโตนเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ให้การ

เพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสรองลงมาโดยให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.386 กรัม เซลล์มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของแหล่งไนโตรเจน ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

แหล่งของไนโตรเจน	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักสด (กรัม)	การเกิดสีน้ำตาลของแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	0	0.318[b]	0
เปปโตน	0.1	0.386[a]	0
	0.5	0.334[b]	11.11
	1.0	0.350[b]	42.00
เคซีนไฮโครไลเซท	0.1	0.351[b]	4.00
	0.5	0.331[b]	30.00
	1.0	0.348[b]	62.00
กลูตามีน	0.1	0.396[a]	11.11
	0.5	0.396[c]	76.44
	1.0	-	100
F-test		*	
C.V (%)		6.90	

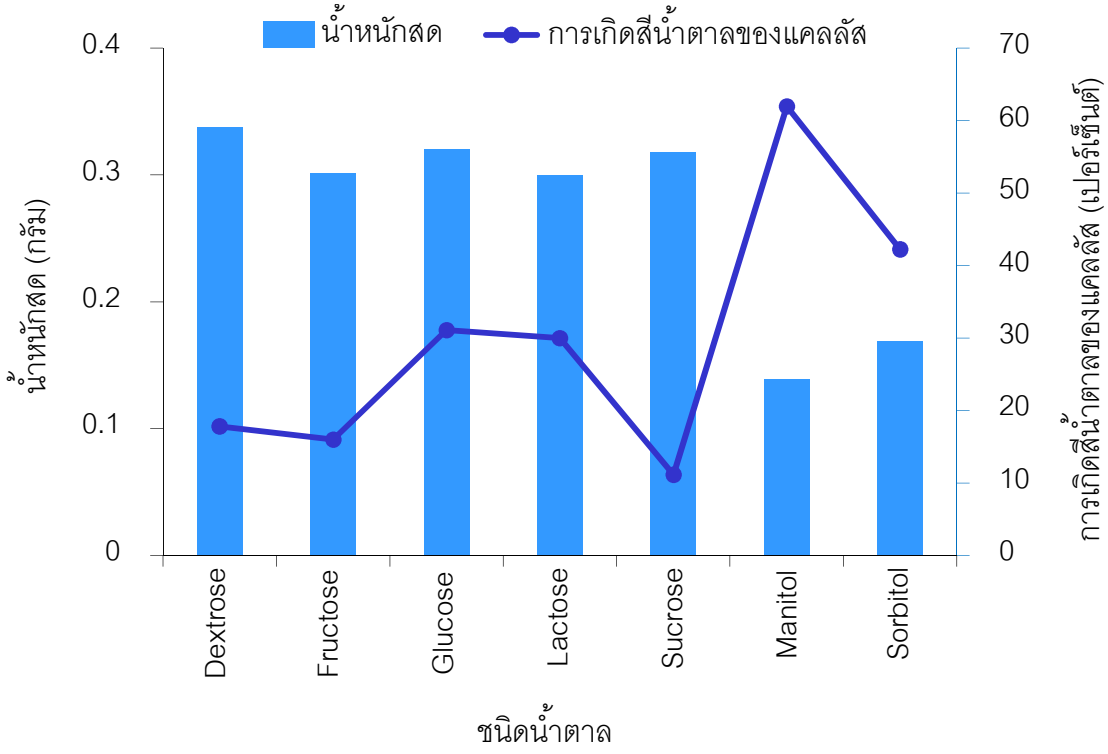
ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

4. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

การเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับแหล่งของคาร์บอนแตกต่างกัน 7 ชนิด คือ เด็กซ์โตรส ฟรุกโทส กลูโคส แลคโตส ซูโครส แมนนิทอล และ ซอร์บิทอล พบว่าน้ำตาลเด็กซ์โตรส ให้การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุดโดยให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.334 กรัม เซลล์มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี เนื้อเยื่อบางส่วนตายหรือเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 17.78 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ น้ำตาลซูโครสให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.318 กรัม แต่เซลล์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 11.11 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำตาลแอลกอฮอล์ 2 ชนิด คือ แมนนิทอล และซอร์บิทอล เพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้น้อยสุด และเนื้อเยื่อตายสูงสุด (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ผลของแหล่งคาร์บอน ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับบนกราฟแท่งด้วยตัวอักษรแตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

5. ผลของชนิดและความเข้มข้นของไซโตไคนินต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

การเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน 3 ชนิด คือ ไคเนติน เบนซิลอะดีนีน และ ไทเดียซูรอน ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุดโดยให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.393 กรัม แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตารางที่ 5) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี ลักษณะเป็นปมเกาะกันแน่น สีเหลือง (ภาพที่ 10)

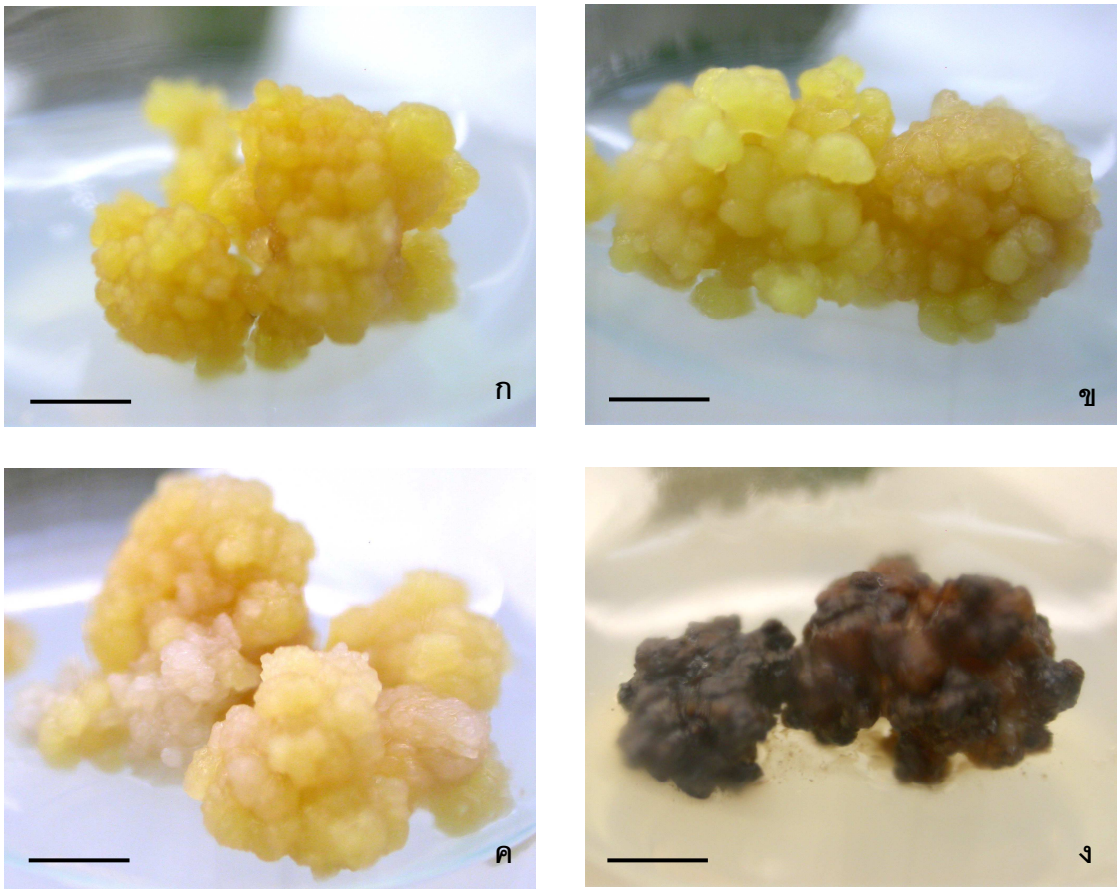
ตารางที่ 5 ผลของชนิดและความเข้มข้นของไซโตไคนิน ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ไซโตไคนิน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำหนักสด (กรัม)	การเกิดสีน้ำตาลของแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	0	0.318^{cd}	0
KN	1	0.374^{ab}	0
	2	0.345^{abc}	0
	4	0.338^{bc}	0
BA	1	0.393^{a}	0
	2	0.284^{de}	0
	4	0.277^{de}	0
TDZ	1	0.255^{e}	20
	2	0.249^{e}	20
	4	-	100
F-test		*	
C.V. (%)		10.02	

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



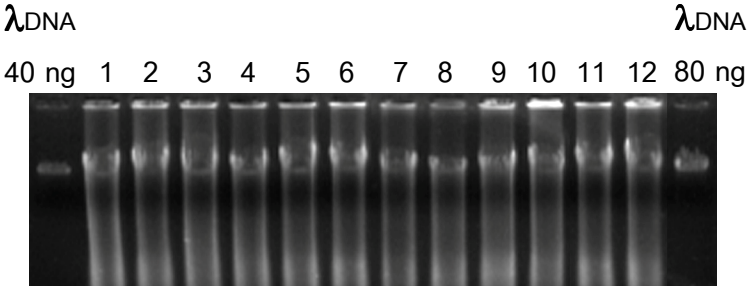
ภาพที่ 10 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 0.5 ซม.)

ก ชุดควบคุม
ข KN 1.0 มล/ล
ค BA 1.0 มล/ล
ง TDZ 4.0 มล/ล

6. การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD และ SSR

6.1 การสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการทดลองข้างต้น ตามวิธีของ Te-chato (2000) พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ครั้งละประมาณ 80 - 160 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 11) ดีเอ็นเอที่สกัดได้นี้สามารถนำไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้



ภาพที่ 11 ดีเอ็นเอที่สกัดจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจาการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (lane 1 - 6) และในอาหารเหลว (lane 7 - 12)

6.2 การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RAPD

จากการใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 เบส จำนวน 8 ไพรเมอร์ คือ OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPR-11 OPT-06 OPA-03 OPB-08 และ OPA-19 พบว่า มี 6 ไพรเมอร์ คือ OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPR-11 OPT-06 และ OPA-03 เพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง และให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน สามารถนำไปใช้ประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวได้ โดยที่แถบดีเอ็นเอของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิด มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน (monomorphism) สำหรับไพรเมอร์ OPB-08 และ OPA-19 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณจากทุกตัวอย่างได้ จึงไม่นำมาใช้เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม (ตารางที่ 6) การตรวจสอบโดยใช้เทคนิค RAPD ไม่พบความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันจากวิธีการหรือขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการศึกษานี้ (ภาพที่ 12 และ 13)

ตารางที่ 6 ความเหมาะสมของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวด้วยเทคนิค RAPD

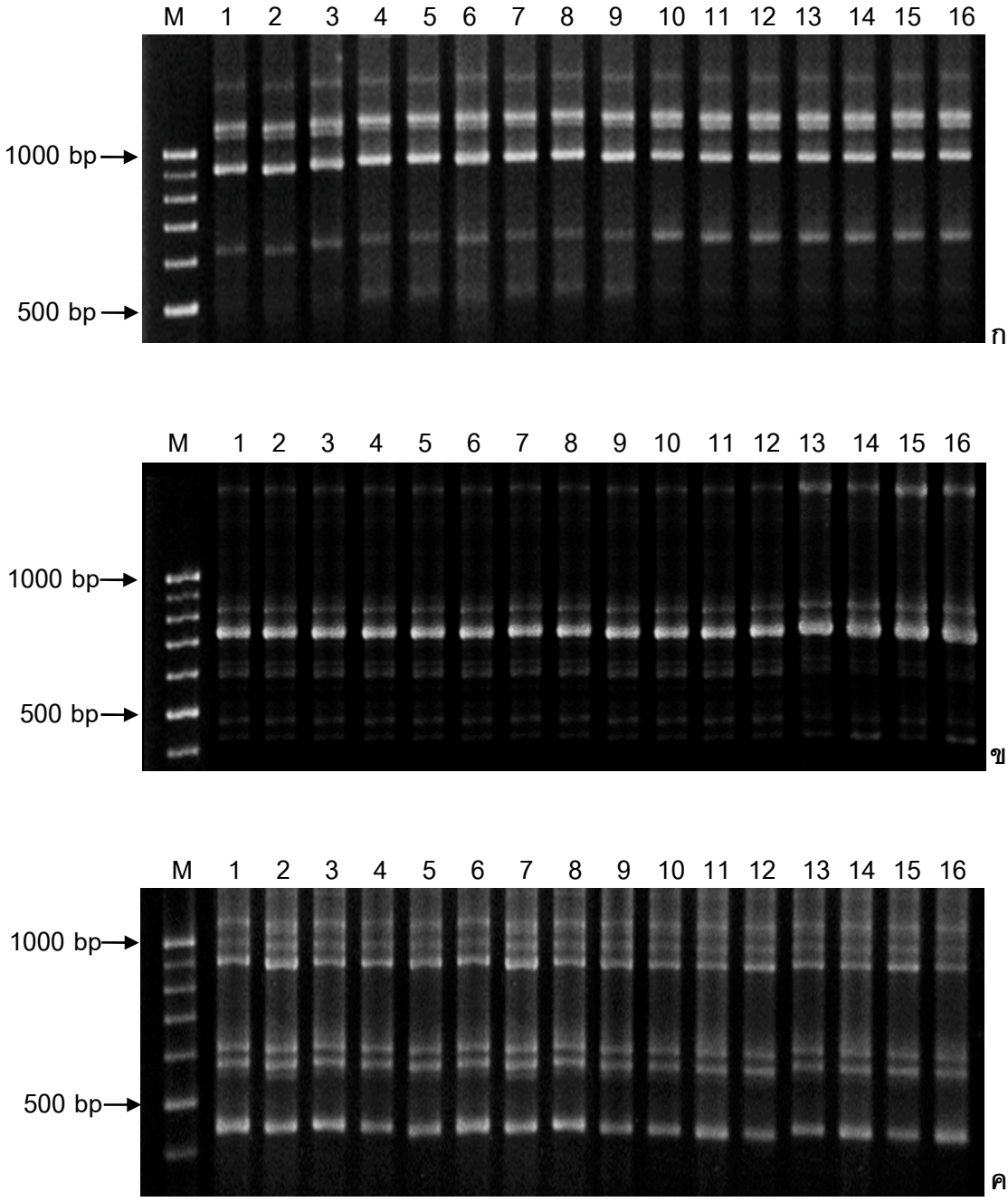
ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5' →3'	ความชัดเจน
OPAB-01	GGGCGACTAC	+ + + +
OPAB-09	CCGTCGGTAG	+ + + +
OPAB-14	CAAGGGCAGA	+ + + +
OPR-11	AAGTGCGACC	+ + + +
OPT-06	GTAGCCGTCT	+ + + +
OPA-03	AGTCAGCCAC	+ + + +
OPB-08	GTCCGTATGG	+
OPA-19	GTCCACACGG	+

+ + + + เพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง ให้แถบชัดเจน

+ + + เพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง ให้แถบไม่ชัดเจน

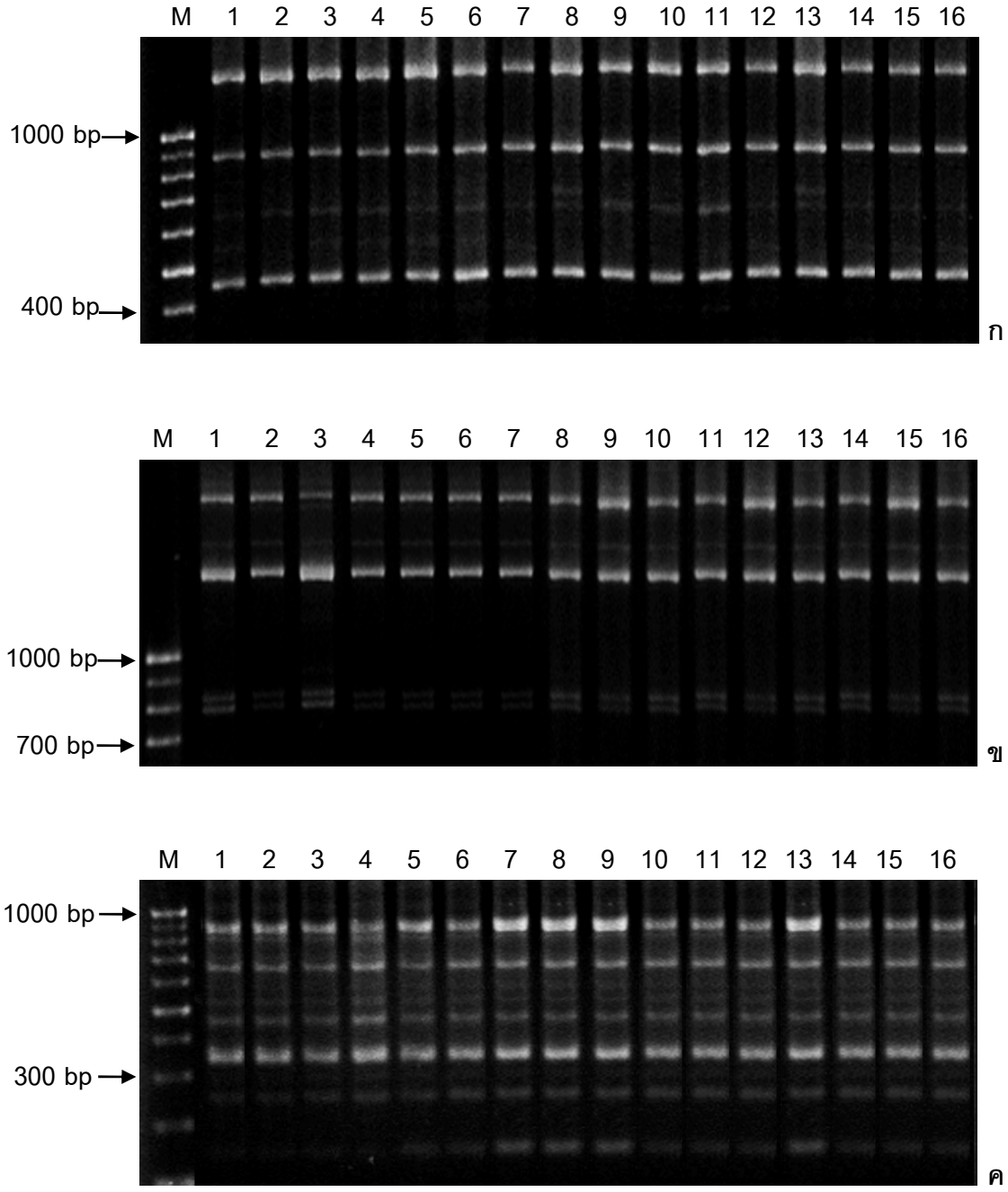
+ + ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้บางตัวอย่าง ให้แถบชัดเจน

+ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้บางตัวอย่าง ให้แถบไม่ชัดเจน



ภาพที่ 12 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (lane 1 - 8) และในอาหารเหลว (lane 9 - 16) เมื่อตรวจสอบความแปรปวนด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPAB-01 (ก) OPAB-09 (ข) OPAB-14 (ค)

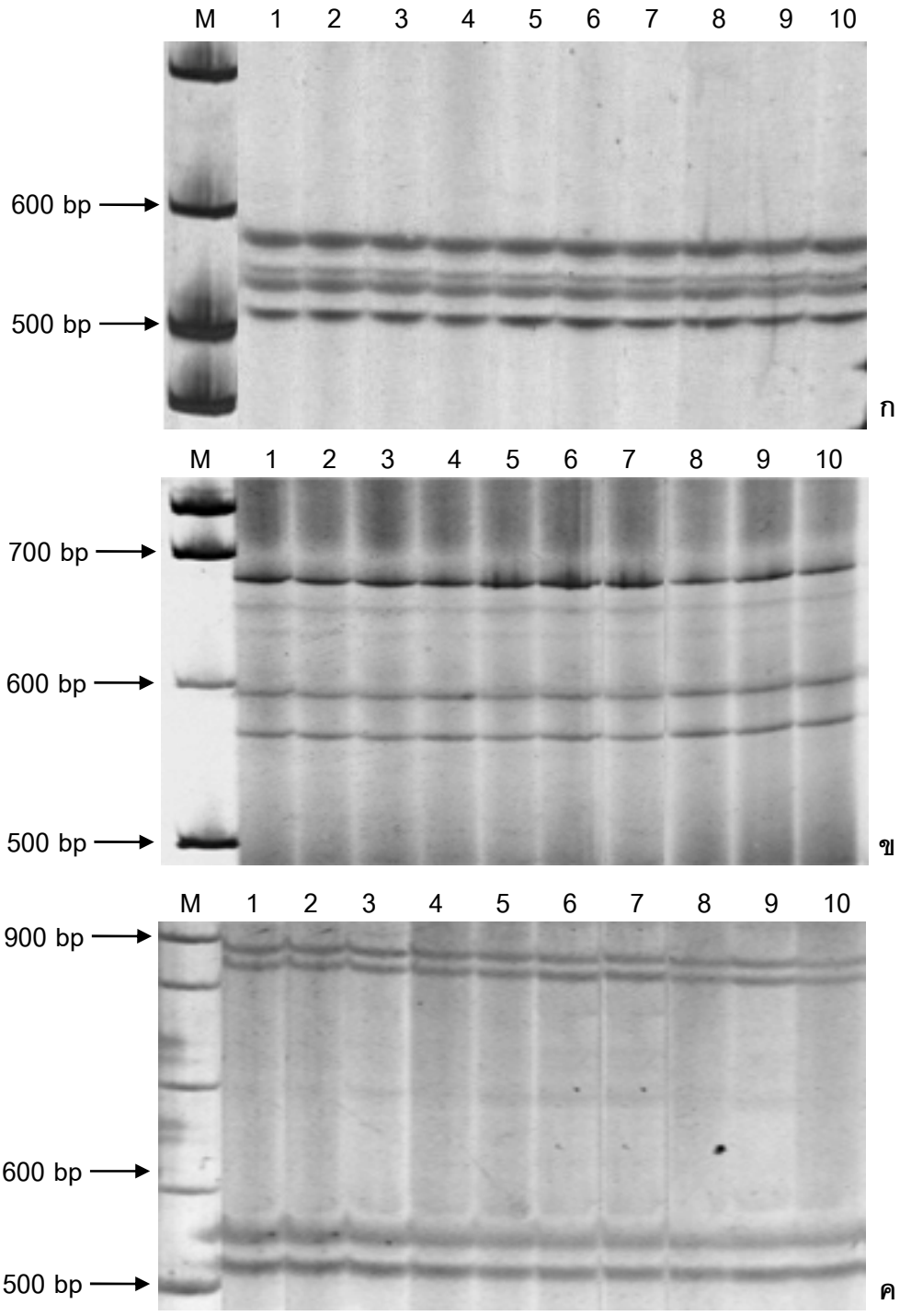
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส



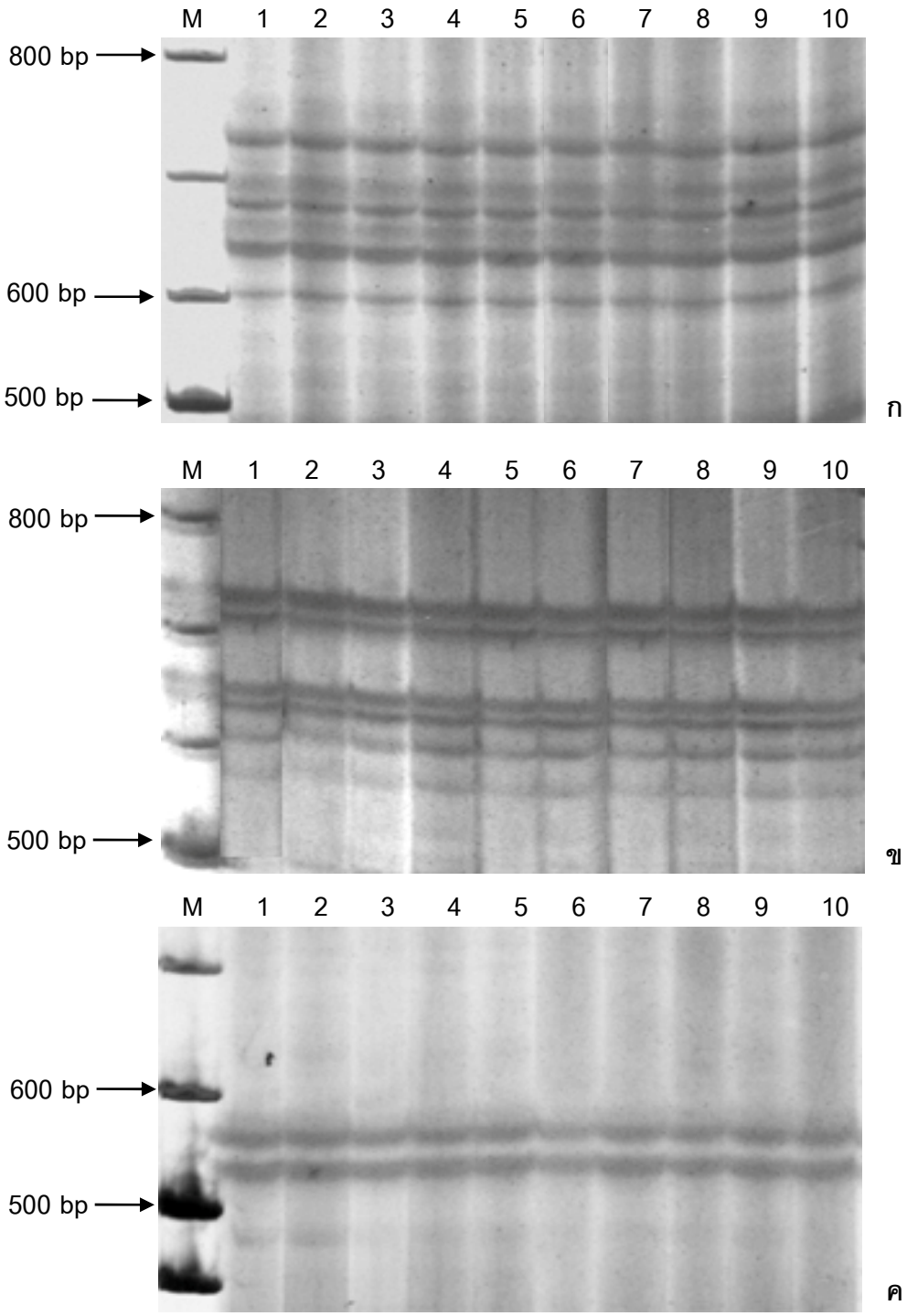
ภาพที่ 13 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (lane 1 - 8) และในอาหารเหลว (lane 9 - 16) เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPR-11 (ก) OPT-06 (ข) OPA-03 (ค)
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

6.3 การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิค SSR

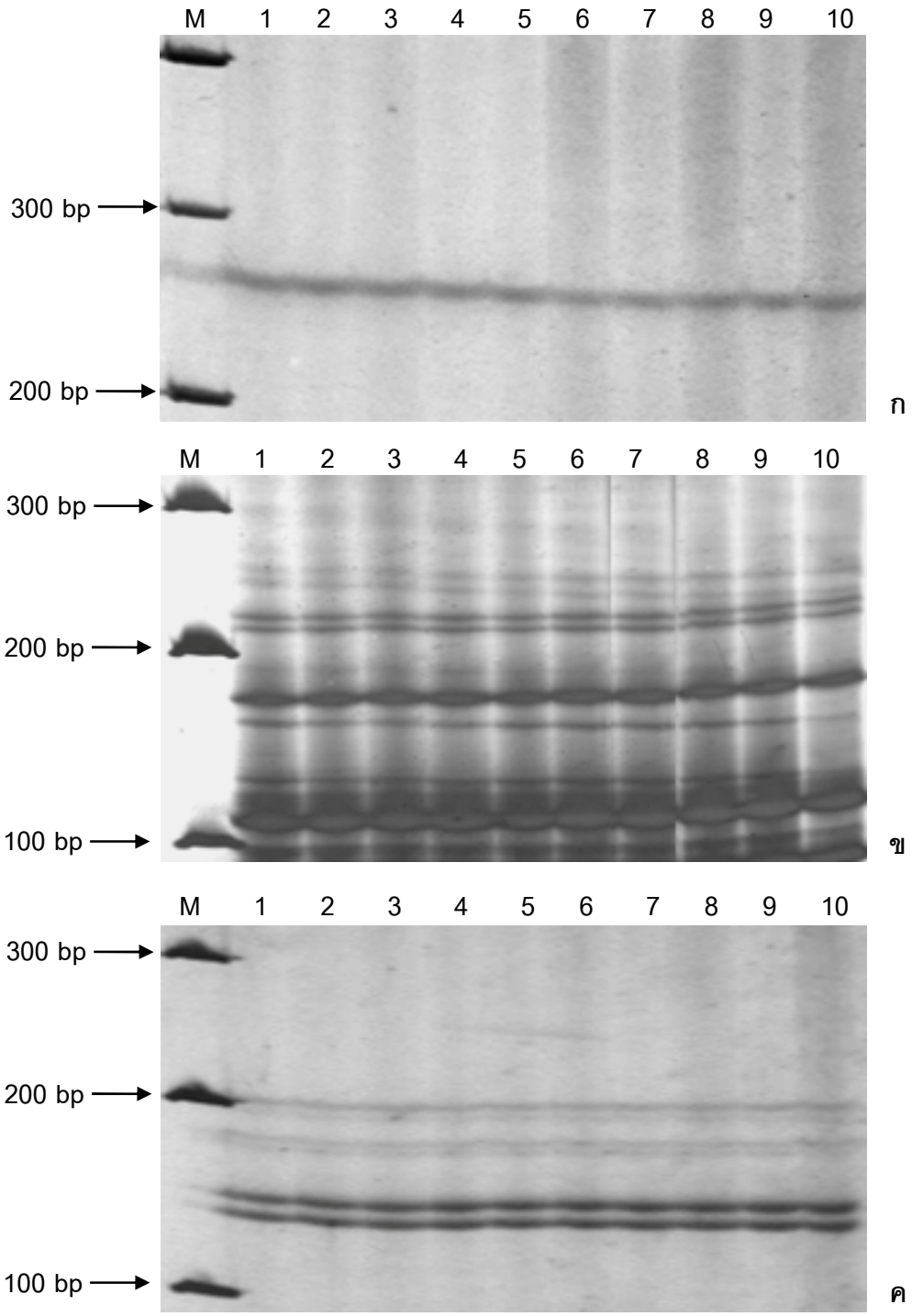
จากการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค SSR ใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ คือ EgCIR0008 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0905 EgCIR0243 EgCIR0781 EgCIR0337 EgCIR1172 และ EgCIR0465 หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ นำมาตรวจสอบบนอะคริละไมด์เจลอิเลคโทรโฟลิซิสแนวดิ่ง พบว่า ทุกไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง และให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน แถบดีเอ็นเอมีลักษณะ monomorphism (ภาพที่ 14 15 และ 16) สามารถนำมาใช้ประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวได้ โดยที่ไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้แถบดีเอ็นเอจำเพาะขนาด 500 - 600 คู่เบส (ภาพที่ 14ก) ซึ่งปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของต้นแม่ขนาด 560 และ 600 คู่เบส และต้นพ่อขนาด 550 คู่เบส (สกุลรัตน์, 2010) จากการตรวจสอบความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น



ภาพที่ 14 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (lane 1 - 5) และในอาหารเหลว (lane 6 - 10) เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008 (ก) EgCIR0409 (ข) EgCIR0446 (ค) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

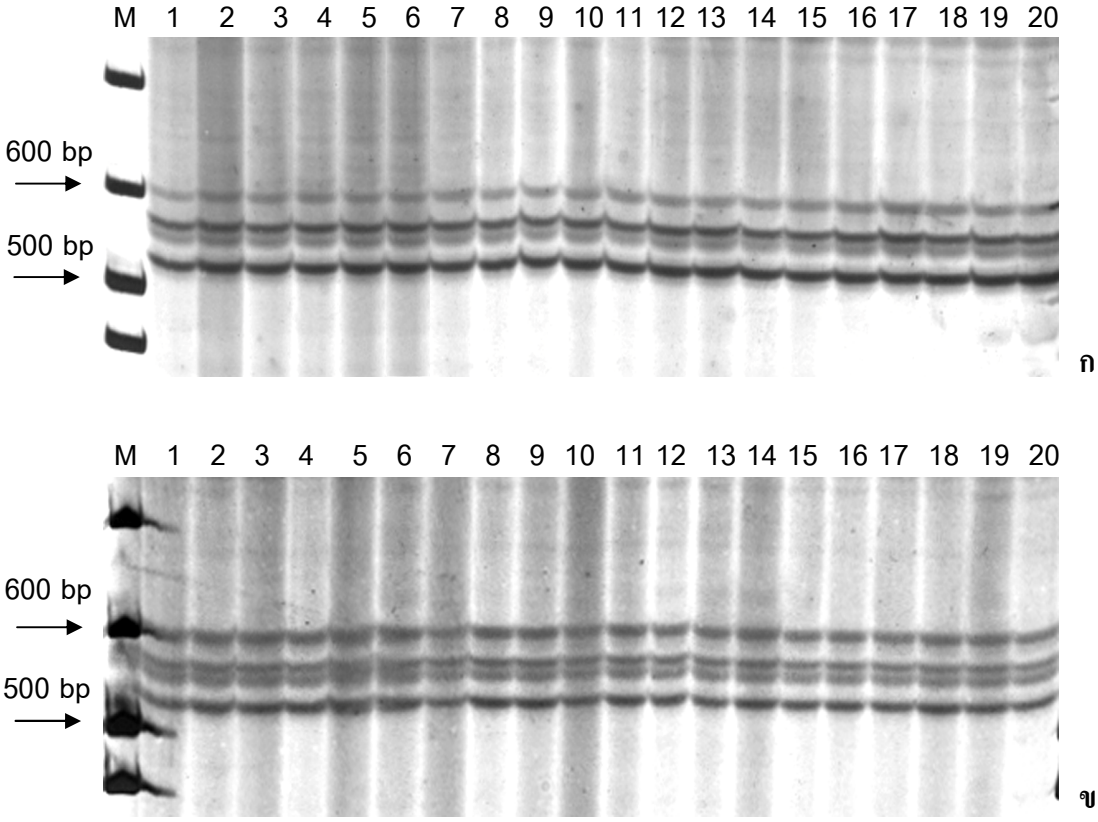


ภาพที่ 15 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (lane 1 - 5) และในอาหารเหลว (lane 6 - 10) เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0905 (ก) EgCIR0243 (ข) EgCIR0781 (ค) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส



ภาพที่ 16 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (lane 1 - 5) และในอาหารเหลว (lane 6 - 10) เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0337 (ก) EgCIR1172 (ข) EgCIR0465 (ค) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

การสุ่มตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งและอาหารเหลวมาประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSR ข้างต้น พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด และสามารถบอกความเป็นคู่ผสมที่ 7 ได้ชัดเจน จึงนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาตรวจสอบซ้ำอีกครั้ง โดยสุ่มตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิด ชนิดละ 20 ตัวอย่าง ผลการประเมินไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม แถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็น monomorphism มีลำดับเบสจำเพาะขนาด 500 - 600 คู่เบส (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (ก) และในอาหารเหลว (ข) ด้วยเทคนิค SSR เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008 ตรวจสอบ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

บทที่ 4

วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยใช้ชนิดของอาหาร และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกัน ทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการตอบสนองที่แตกต่างกัน จากการศึกษาครั้งนี้ได้รับผลสำเร็จสามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 ได้ โดยให้การตอบสนองต่อการเพิ่มน้ำหนักสดได้ดีในอาหารที่เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว โดยที่อาหารแข็งสูตร MS สามารถเพิ่มน้ำหนักสดได้ 3.3 เท่า สอดคล้องกับรายงานของเพ็ญติมาส (2552) สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สูงสุด 3.36 เท่า และสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวได้ 6 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง เช่นเดียวกับการรายงานของสกุลรัตน์ (2553) ที่สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 ได้สูงถึง 3.16 เท่า บนอาหารสูตรแข็ง MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่แคลลัสมีลักษณะเป็นปมสีเหลืองถึงเหลืองเข้ม ในขณะที่ซูไฮมิน (2551) รายงานการชักนำแคลลัสปาล์มน้ำมัน บนอาหารแข็งเติมไดแคมบาส่งเสริมการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัส และจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีกว่าอาหารที่เติม 2,4-D และ NAA และจากการศึกษานี้ พบว่า การวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันสามารถเพิ่มน้ำหนักสดได้ 4.764 เท่า เช่นเดียวกับการทดลองของเพ็ญติมาส (2552) ชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยง 15 วัน สามารถเพิ่มปริมาณตะกอนเซลล์ได้เป็น 2 เท่า และให้กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยจำนวนกลุ่มเซลล์มากกว่า 10 เซลล์ ซึ่งในอาหารเหลวนี้มีการเขย่าตลอดเวลา เพื่อให้มีการแลกเปลี่ยนอากาศ หรือเป็นการเพิ่มออกซิเจนแก่เนื้อเยื่อพืช ช่วยกระตุ้นให้เนื้อเยื่อดูดซึมสารอาหาร และฮอร์โมนที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่า แต่เมื่อวางเลี้ยงไปได้ระยะหนึ่ง จำเป็นต้องย้ายเลี้ยง เนื่องจากสารอาหารลดน้อยลง อีกทั้งมีการถ่ายของเสียจากเนื้อเยื่อพืชออกมาด้วย ซึ่งอาจส่งผลให้เนื้อเยื่อตายได้ ทั้งนี้ในการทดลองใช้แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น ซึ่งแคลลัสเหล่านี้เป็นกลุ่มเซลล์ที่มีการเกาะตัวกันหลวมๆ ง่ายต่อการกระจายออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ จึงเหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้เพิ่มปริมาณ เมื่อพิจารณาถึงการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิดไดแคมบาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว พบว่า

ไดแคมบาที่ความเข้มข้นต่ำ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ สอดคล้องกับการรายงานของ Chehmalee และ Te-chato (2008) ที่สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันได้สูง เมื่อใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากไดแคมบาจะช่วยส่งเสริมกิจกรรมการแบ่งเซลล์ได้ดีในชั้น epidermis และ subepidermis และบนอาหารที่เติมไดแคมบา 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคเอซีนไฮโดรไลเซทเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสให้เข้าสู่ระยะสุกแก่ได้เร็ว (Te-chato, 1998) นอกจากนี้พบว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 3 เดือน ส่งผลให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบางส่วนตาย เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม หรือสีดำ อาจเนื่องมาจากแคลลัสสร้างสารประกอบฟีนอล ส่งผลให้แคลลัสหยุดการพัฒนา ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณต่อไปได้ ในขณะที่การวางเลี้ยงในอาหารที่เติมไดแคมบาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพิ่มปริมาณได้ดี มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี จากผลนี้แสดงให้เห็นว่าไดแคมบามีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และเป็นออกซินที่มีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการชักนำแคลลัส การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัส และพัฒนาการในระยะต่าง ๆ ของปาล์มน้ำมัน

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็ง 2 สูตร คือ MS และ N_6 โดยแต่ละสูตรเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารแข็งสูตร N_6 ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ประมาณ 4 เท่า สูงกว่าสูตร MS (3.18 เท่า) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารทั้งสองสูตรนี้มีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน (ตารางภาคผนวกที่ 1) จึงส่งผลให้ผลที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่อาหารสูตร N_6 จะมีองค์ประกอบของไนโตรเจนบางชนิด (KNO_3 และ KH_2PO_4) สูงกว่าในอาหารสูตร MS ประมาณ 2 เท่า ไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของเซลล์พืช สอดคล้องกับ Thuzar และคณะ (2011) ที่รายงานการเพาะเลี้ยงไซโกติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตร MS และ N_6 ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า อาหารสูตรแข็ง N_6 สร้างแคลลัสได้สูง 75.2 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Abdullah และคณะ (2005) รายงานการวางเลี้ยงไซโกติกเอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่บนอาหารแข็งสูตร N_6 ร่วมกับ 2,4-D ว่าสามารถสร้างแคลลัสได้สูงสุด 79.8 เปอร์เซ็นต์ และในการศึกษานี้เปรียบเทียบอาหารทั้ง 2 สูตร โดยใช้อาหารเหลวในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส พบว่าอาหารเหลวทั้งสูตร MS และ N_6 ให้การเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่คล้ายคลึงกัน ร่วมกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดเวลา เนื้อเยื่อจึงดูด

ซึมสารอาหารได้ดี ทำให้การเพิ่มปริมาณไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับ Teixeira และคณะ (1995) รายงานว่าอาหารเหลวสูตร Y3 สามารถส่งเสริมกระบวนการพัฒนาของเอ็มบริโอได้ดี ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีในอาหารสูตร Y3 คล้ายคลึงกับสูตร N_6 ผลที่ได้ในอาหารเหลวสูตร Y3 และสูตร N_6 ที่ใช้ในการศึกษา จึงไปในทำนองเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MS ส่งเสริมการสร้างสารประกอบฟีนอลได้เร็วกว่าสูตร N_6 อาจเนื่องมาจากอาหารสูตร MS มีกรดอะมิโนชนิด Myo-inositol เป็นองค์ประกอบ และกรดอะมิโนชนิดนี้มีผลต่อการผลิตสารประกอบฟีนอลในเซลล์พืช สอดคล้องกับการศึกษาของ Zaid (1987) ที่รายงานว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง และความสมดุลขององค์ประกอบของธาตุอาหารเป็นปัจจัยหลักในการส่งเสริมให้พืชผลิตสารประกอบฟีนอลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอินทผลัม ดังนั้นจากผลการศึกษาทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นว่าสูตรอาหารและชนิดของอาหาร มีผลต่อการสร้างและการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

จากการศึกษาแหล่งของไนโตรเจน ต่อการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคบนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า การเติมเปปโตนเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเพิ่มน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดี (0.396 กรัม) เซลล์มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี ไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และที่ความเข้มข้นเดียวกันของเคซีนไฮโครไลเซท กลูตามีน สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดได้ดีเช่นกัน แต่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาลมากกว่า และเมื่อใช้ไนโตรเจนทุกชนิดที่ความสูง 1.0 กรัมต่อลิตร ชักนำการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดได้น้อย และเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลสูงกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานศึกษาที่ผ่านมามีการใช้เปป-โตนในการชักนำยอด และรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออะโวคาโด (Nhut, *et al.,* 2007) และชักนำรากในโสมได้สำเร็จ (Sivakumar, *et al.,* 2005) โดยปกติไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารสูตร MS ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักที่พืช หรือเนื้อเยื่อต้องการในปริมาณมาก แต่ในทางกลับกันเมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนมากเกินพออาจมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการดูดซึมธาตุอาหารอื่น ๆ ทำให้พืช หรือเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตต่ำ จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต แต่การใช้ไนโตรเจนในการศึกษานี้ไม่เพียงพอต่อความสามารถในการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ หรือต้นอ่อนได้

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคบนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า น้ำตาลเด็กซ์โตรสเพิ่มปริมาณน้ำหนักสด

ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด 0.334 กรัม น้ำตาลชนิดนี้โดยทั่วไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับ ซูโครส กลูโคส และ ฟรุกโทส ในขณะที่น้ำตาลแอลกอฮอล์สองชนิด คือ ซอร์บิทอล และ แมนนิทอล เพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้น้อยสุด และส่งเสริมให้เซลล์ตายสูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลซอร์บิทอลเป็นสาเหตุหลักของการเปลี่ยนแปลงออสโมติคัมของเซลล์ และระดับโปรตีนภายในเซลล์ส่งผลให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดน้ำ ในทางตรงข้ามน้ำตาลดังกล่าวช่วยเร่งระยะการพัฒนาของเซลล์ไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในการเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมันได้ดี (de Touchet, *et al.,* 1991) Hilae และ Te-chato (2005) รายงานการชักนำการงอกโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวของปาล์มน้ำมันได้ 40 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล 0.2 โมลาร์ แต่การใช้น้ำตาลทั้งสอง การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในการศึกษานี้ไม่เหมาะสม เซลล์จึงซีดและตาย อาสลัน (2551) สันนิษฐานว่าการใช้น้ำแมนนิทอลในการเพาะเลี้ยงนั้นพืชอาจจะไม่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยน้ำตาลชนิดนี้ และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ จึงทำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพิ่มจำนวนได้น้อย และเกิดการตายสูง

นอกจากนี้พบว่า ชนิดและความเข้มข้นของไซโคไคนินมีผลต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการศึกษานี้พบว่า การเติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมากที่สุด เนื่องจากให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 0.401 กรัม เซลล์มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี เกาะกันเป็นปมสีเหลือง ทั้งนี้เนื่องจาก BA มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืช นอกจากนี้ BA ยังควบคุมกระบวนการที่สำคัญต่าง ๆ ในการเจริญเติบโต และการพัฒนาของพืช สอดคล้องกับ Arnold และ Tillberg (1987) ที่รายงานว่า BA ความเข้มข้นสูงชักนำให้เกิดตายอดได้ดีใน *Picea abies* Aberlenc-Bertossi และคณะ (1999) เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ทำให้พัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ และยอดได้ ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเติม BA เป็นเวลานานกระตุ้นการสร้างยอดได้ดี และมีรายงานการใช้ BA เพื่อชักนำให้โซมาติกเอ็มบริโอของกล้วยพัฒนาเป็นยอด (Dhed'a, *et al.,* 1991) Verdeil และคณะ (1994) รายงานว่า BA สามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนีซิสในมะพร้าวได้สำเร็จ และมีการใช้ BA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา จากทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าพืชแต่ละชนิดให้การตอบสนองต่อ BA ที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดการพัฒนาที่ต่างกัน แต่จากการศึกษาครั้งนี้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ อาจเนื่องจากสูตรอาหาร และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เหมาะสม

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านมามีรายงานการกลายพันธุ์หลายรูปแบบ เช่น การแตกกอ การพัฒนาของดอกที่ยอด การผลิตเฉพาะดอกเพศผู้ การผลิตเฉพาะดอกกระเทย และลักษณะของผลผิดปกติแบบแมนเทิ้ล หากพิจารณาถึงสาเหตุการกลายพันธุ์ที่สำคัญ พบว่า เกิดจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นสูงในช่วงของการชักนำการสร้างแคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่น นอกจากนี้มีรายงานการใช้ GA_3 ความเข้มข้นสูงในช่วง 50 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงชักนำการงอกของเอ็มบริโอทำให้ต้นกล้าที่ได้มีลักษณะผิดปกติ ใบเรียวเล็ก (สมปอง, 2544) Nwanko และ Krikorian (1983) อ้างโดย สมปอง (2544) รายงานว่า การใช้ GA_3 เพียง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงพอต่อการส่งเสริมให้เกิดอาการใบม้วนและยับยั้งการสร้างราก ดังนั้น ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และการกลายพันธุ์นั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเพาะเลี้ยงด้วย Konan และคณะ (2010) ประเมินอัตราการรอดชีวิตของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันย้ายเลี้ยงนานเป็นเวลา 9 ปี พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตเพียง 41 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อประเมินความแปรปรวนหลังปลูกในแปลง 2 - 3 ปี พบลักษณะผิดปกติต่าง ๆ เช่น แผ่นใบขรุขระติดกัน ใบแข็งตั้งตรง เกิดช่อดอกบริเวณปลายยอด และลักษณะผลผิดปกติแบบแมนเทิ้ล อาจเป็นผลของการแสดงออกของยีนบางตัวจากกระบวนการ methylation ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นมีปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งเสริมให้เกิดความผิดปกติในลักษณะผลแบบแมนเทิ้ล แต่ลักษณะนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกิดจากสาเหตุใด ระหว่างช่วงของระยะเวลาที่ยาวนานในการย้ายเลี้ยง กับการพัฒนาของต้นปาล์มน้ำมันหลังจากปลูกในแปลง ปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้ามที่มีช่อดอกตัวผู้และตัวตัวเมีย แยกกันอยู่ภายในต้นเดียวกัน จัดเป็นพืชผสมข้าม แต่ช่วงเวลาการบานของดอกไม่พร้อมกัน มีโอกาสที่จะเกิดการผสมตัวเอง จำเป็นต้องมีการทดสอบว่าเมล็ดพันธุ์ที่ได้เป็นลูกผสม ไม่ได้เกิดจากผสมตัวเอง เพื่อให้แน่ใจว่าต้นปาล์มลูกผสมที่ได้นั้นเป็นปาล์มพันธุ์ดี ให้ผลผลิตดี จึงจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพ และลดต้นทุนในการผลิต ในปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในทางเกษตรเป็นจำนวนมาก เพื่อระบุถึงเอกลักษณ์ทางพันธุ-กรรมของพืชและสัตว์หลากหลายชนิด นำมาเป็นฐานข้อมูลสำคัญเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงนำมาเพื่อจดทะเบียนพันธุ์ในพืชและสัตว์ และใช้เครื่องหมายโมเลกุลนี้ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม ดังนั้นการศึกษานี้จึงนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันคู่ผสมที่ 7 ที่ผ่านการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยสกุลรัตน์ (2007) และผ่านการย้ายเลี้ยงมาเป็นเวลานาน 4 ปี นำมาเพิ่มปริมาณโดยการเพาะเลี้ยงในชนิดอาหาร และความเข้มข้นของไดแคมบาที่แตกต่างกัน แล้วตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยเทคนิค RAPD และ SSR จากการใช้ 8 ไพรเมอร์สำหรับ RAPD ที่ได้ทำการตรวจสอบ และคัดเลือกจากไพร

เมอร์จำนวน 160 ไพรเมอร์ ว่ามีประสิทธิภาพดีเหมาะสมที่จะใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของปาล์มน้ำมัน (สายชล, 2547) จากการตรวจสอบความแปรปรวน พบว่า ไพรเมอร์ OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPR-11 OPT-06 และ OPA-03 ให้ผลชัดเจนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏสม่ำเสมอ และไม่มีแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าชนิดอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันในการศึกษานี้ ไม่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในระดับดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์เพียง 8 ไพรเมอร์ อาจไม่เพียงพอต่อการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากเทคนิค RAPD เป็นการจับกันของดีเอ็นเอแบบสุ่ม จึงขึ้นอยู่ว่าไพรเมอร์นั้น ๆ จะไปจับตรงตำแหน่งใดของจีโนม ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ไพรเมอร์ไปจับอาจแตกต่างกัน แต่ให้ผลเหมือนกัน ดังนั้นการใช้ไพรเมอร์มากขึ้นทำให้เกิดการสุ่มจับดีเอ็นเอตรงตำแหน่งต่างๆ ได้มากขึ้น (ธีระชัย และนฤมล, 2543) ธนวดี และคณะ (2552) ได้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค RAPD ซึ่งพบว่า ไพรเมอร์ OPAB-01 และ OPAR-09 ให้ความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอสูง และแถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็น monomorphism จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคดังกล่าวไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม ดังนั้นการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ได้ สอดคล้องกับ Rival และคณะ (1998) ใช้เทคนิค RAPD ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในลักษณะผลผิดปกติแบบแมนเทิ้ลของต้นแม่ และต้นลูกที่ชักนำผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนีซิสของปาล์มน้ำมัน เพื่อสร้างความมั่นใจก่อนปลูกลงแปลง พบว่า จากไพรเมอร์ทั้งหมด 259 ไพรเมอร์ ได้แถบดีเอ็นเอชนิด monomorphism เฉลี่ย 5.4 แถบต่อไพรเมอร์ และไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม Thawaro และ Te-chato (2009) ใช้เทคนิคนี้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มโอในระยะรูปกลมเพื่อดูความแปรปรวนทางพันธุกรรม พบว่า ไพรเมอร์ OPT-06 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดขึ้น จากการใช้เทคนิค RAPD ตรวจสอบความแปรวนทางพันธุกรรมของเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในระยะต่าง ๆ ที่ผ่านมา ไม่พบความแปรปรวนเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามหากชิ้นส่วนหรือแคลลัสต้องอยู่ในอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นสูงเป็นเวลานาน อาจส่งเสริมให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ จากทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค RAPD มีประสิทธิภาพเพียงพอในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่เพื่อความมั่นใจและยืนยันผลดังกล่าว จึงทำการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากแหล่งเดียวกัน ตรวจสอบด้วย 9 ไพรเมอร์ การศึกษานี้ไม่พบ

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมเช่นกัน ไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด ลักษณะแถบดีเอ็นเอเป็นแบบ monomorphism สอดคล้องกับ สกุลรัตน์ (2553) ซึ่งรายงานการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อน และการตรวจสอบความสม่ำเสมอของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันลูกผสมในระยะต่างๆ คือ แคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และ ต้นอ่อนด้วยเทคนิค SSR พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในทุกระยะพัฒนาการ ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ดังนั้นขั้นตอนการเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชั่นในการศึกษานี้สามาถนำมาใช้ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวน ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปได้ Singh และคณะ (2006; 2007) รายงานว่าเทคนิค SSR สามารถแยกต้น ramet ที่ปะปนหรือเป็นพันธุ์ปลอมได้ เมื่อนำต้น ramet มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม พบว่า ให้รูปแบบดีเอ็นเอเหมือนเดิม บ่งบอกได้ว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม Thawaro และ Te-chato (2009) ใช้เทคนิค SSR ตรวจสอบความสม่ำเสมอของแคลลัสจากลูกผสมของปาล์มน้ำมันคู่ผสม 336(D) x 72(P) พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR1172 สามารถบ่งชี้ได้ว่าไม่มีความแปรปรวนในแคลลัส และมีการรายงานการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของฝ้าย (Dongre and Parkhi, 2005) ชา (Borchetia, 2009) และข้าว (Sundaram, *et al.,* 2008) พบว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถแยกความแปรปรวนที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ นอกจากนี้มีการใช้ไพรเมอร์อื่น ๆ ด้วยเทคนิค SSR ตรวจสอบความเป็นลูกผสมในข้าว

จากการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD และ SSR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันลูกผสมคู่ที่ 7 ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยวิธีการย้ายเลี้ยงเป็นเวลานาน แล้วนำมาเพิ่มปริมาณบนอาหารที่แตกต่างกันสองชนิด พบว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น เนื่องจากให้รูปแบบของดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับการตรวจสอบความเป็นลูกผสม และความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงลูกผสมซึ่งรายงานโดยสกุลรัตน์ (2553) ว่าแคลลัสเหล่านั้นสามารถนำไปขยายพันธุ์ และชักนำให้เป็นพืชต้นใหม่ได้ต่อไปโดยไม่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอ การตรวจสอบในระดับเนื้อเยื่อนี้ได้ผลดี และมีประสิทธิภาพเพียงพอ ช่วยร่นระยะเวลาในการคัดเลือกพันธุ์ได้ จากผลทั้งหมดนี้สามารถยืนยันได้ว่า ชนิดอาหาร และระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงที่นานขึ้นไม่ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต (ไดแคมบา) ในระดับความเข้มข้นต่ำ จึงไม่ส่งเสริมให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม

บทที่ 5

สรุป

อาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวได้เฉลี่ยสูงสุด 0.333 กรัม และ 1.191 กรัม ตามลำดับ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน อาหารทั้งสองชนิดให้ลักษณะแคลลัสเป็นปมเกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองถึงเหลืองเข้ม

อาหารแข็งสูตร N_6 สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.391 กรัม สูงกว่าสูตร MS (0.318 กรัม) ในขณะที่การวางเลี้ยงในอาหารเหลวสองสูตร MS และ N_6 ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่แตกต่างกัน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารแข็งให้แคลลัส 4 ลักษณะ คือ friable compact nodular และ root-like หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

อาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเปปโตน 0.1 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุดให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.386 กรัม เซลล์ที่ชักนำได้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี อาหารที่เติมน้ำตาลเด็กซ์โตรส 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุดให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.334 กรัม เซลล์ที่ชักนำได้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี และอาหารที่เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุดให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.393 กรัม แคลลัสมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี ลักษณะเกาะกันเป็นปม สีเหลือง หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระยะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงคัพภะคู่ผสมที่ 7 และผ่านการย้ายเลี้ยงมาเป็นเวลานาน 4 ปี แล้วนำมาเพิ่มปริมาณในอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันสองชนิด จากการประเมินด้วยเทคนิค RAPD พบว่า ไพรเมอร์ OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPR-11 OPT-06 และ OPA-03 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน ไม่มีความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอทั้งหมดมีลักษณะ monomorphism และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SSR พบว่า ไพรเมอร์ ทั้ง 9 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน ไม่มีความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แต่ไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด การตรวจสอบความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยเทคนิคทั้งสอง ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นจากระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายบัพเฟอร์ และสารละลายอื่น ๆ

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Te-chato และคณะ (2000)

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

สารเคมีที่ใช้ในการทำ denaturing electrophoresis

1. 6% polyacrylamide gel (Acrylamide : Bisacrylamide = 29:1) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

30 % Acrylamide Bis-acrylamide solution (29:1)	60	มิลลิลิตร
5X TBE	60	มิลลิลิตร
Urea	35	กรัม
น้ำกลั่น	105	มิลลิลิตร

2. 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

3. 10% (W/V) Ammonium persulfate (APS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Ammonium persulfate	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 6X loading buffer (สำหรับ denaturing polyacrylamide gel) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

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

แบ่งสารละลายใส่หลอดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. Bind silane สำหรับทากระจกแผ่นหลังที่ติดกับเจล

Bind silane	1	ไมโครลิตร
Glacial acetic acid	2.5	ไมโครลิตร
95% ethanol	500	ไมโครลิตร

สารเคมีที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอด้วย Silver nitrate

1. Fixation และ Stop solution (10% Acetic acid) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

2. 0.2% silver nitrate ปริมาตร 1,000 มิลลิตร

silver nitrate	2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. Develop solution ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Sodium carbonate	25	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้เย็นจัดก่อนนำมาใช้ ขณะใช้เติม Formaldehyde เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ Sodium thiosulfate เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) และ N_6

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	MS	N_6
ธาตุอาหารหลัก		
NH_4NO_3	1,650.000	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	463.000
KNO_3	1,900.000	2,830.000
KH_2PO_4	170.000	400.000
$CaCl_2.2H_2O$	440.000	166.000
$MgSO_4.7H_2O$	370.000	185.000
ธาตุอาหารรอง		
KI	0.830	0.8
H_3BO_3	6.200	1.6
$MnSO_4.H_2O$	16.900	4.4
$ZnSO_4.7H_2O$	10.600	1.5
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	-
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250	-
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	-
$FeSO_4.7H_2O$	27.800	27.800
Na_2EDTA	37.300	37.200
สารอินทรีย์		
Myo-inositol	100.000	-
Nicotinic acid	0.500	0.500
Pyridoxine HCl	0.500	0.500
Thaiamine HCl	0.100	1.000
Glycine	2.000	2.000
Sucrose (กรัม)	30.000	30.000
วุ้น(กรัม)	7.500	7.500

ตารางภาคผนวกที่ 2 ไพรเมอร์ RAPD ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

Primer name	ลำดับเบส 5'→ 3'
OPAB-01	GGGCGACTAC
OPAB-09	CCGTCGGTAG
OPAB-14	CAAGGGCAGA
OPR-11	AAGTGCGACC
OPT-06	GTAGCCGTCT
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPB-08	GTCCGTATGG
OPA-19	GTCCACACGG

ตารางภาคผนวกที่ 3 ไพรเมอร์ SSR ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

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 นางสาวอัญชลี อาธิปัจจาภรณ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210620031

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์ สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์ และสมปอง เตชะโต. 2554. การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) 42: 159-162.

อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์ และสมปอง เตชะโต. 2554. การประเมินความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองด้วยเทคนิค SSR. การนำเสนอผลงานในกิจกรรมโครงการ “Innovation Day ครั้งที่ 1” วันที่ 10 ตุลาคม 2554 ณ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. และได้รับรางวัลรองชนะเลิศอันดับ 1 การนำเสนอภาคโปสเตอร์

เอกสารอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2544. ปรับปรุงพันธุ์พืช: ความหลากหลายของแนวคิด. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คมกฤษณ์ อินเปื่อย และสมปอง เตชะโต. 2553. ผลของความเข้มข้นของซูโครสและ adenine sulfate ต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) 41: 229-232.

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

ซูไฮมิน เจ๊ะมาลี. 2551. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทอเนอราโดยการเพาะเลี้ยงคัพภะ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธนวดี พรหมจันทร์ อาสลัน หิเล และสมปอง เตชะโต. 2552. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน. วารสารเกษตร 25: 211-218.

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

ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. 2543. เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์พริก. วาสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1:6-10.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2541. พันธุศาสตร์พืช. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.

บุษบา ล้อประเสริฐ. 2548. คู่มือการปลูกปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ: ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตร.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

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

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2532. ปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ: ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.

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

เพ็ญติมาส กระมุท. 2552. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศักดิ์ศิลป์ โชติสกุล วินาภรณ์ กุฎีรัตน์ และกิจจารักษ์ วงษ์กุดเลาะ. 2541. ปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ: กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร.

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

สมปอง เตชะโต. 2539 ข. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันขยายพันธุ์ได้จริงหรือ: กรณีวิจัยที่ผ่านมา. วารสารสงขลานครินทร์ (ฉบับพิเศษ). ปาล์มน้ำมัน. 23: 754-761.

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

สมศักดิ์ อภิสิทธิวานิช สุมน มาสุธน ประดิษฐ์ พงค์ทองคำ เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2538. การตรวจหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวในสกุล *Oryza* โดยเทคนิค RAPD. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ (สาขาวิทยาศาสตร์) 29: 454-461.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงศ์. 2553. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

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

อาสลัน หิเล. 2551. การเพิ่มประสิทธิภาพของการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

Abdullah, R., Zainal, A., Heng, W. Y., Li, L. C., Beng, Y. C., Phing, L. M., Sirajuddin, S. A., Ping, W. Y. S., Joseph, J. L., Jusoh, S. A., Muad, M. R. and Huey, Y. L. (2005) Immature embryo: A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. Electronic Journal of Biotechnology 8(1) (ISSN: 0717-3458)

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

Arnold, S. V. and Tillberg, E. 1987. The influence of cytokinin pulse treatments on adventitious bud formation on vegetative buds of *Picea abies*. Plant Cell Tissue Organ Culture 9: 253-261.

Ashburner, G. R. and Thompson, W. K. 1997. RAPD analysis of south pacific coconut palm populations. Crop Science 37: 992-997.

Bhat, K. V., Bhat, S. R. and Chandel, K. P. S. 1992. Survey of isozyme polymorphism for clonal identification in *Musa*. L. I. Peroxidase, superoxide dismutase, shikimate dehydrogenase and malate dehydrogenase. Horticultural Science 67: 44-49.

Borchetia, S., Das, S. C., Handique, P. J. and Das, S. 2009. High multiplication frequency and genetic stability for commercialization of the three varieties of micropropagated tea plants (*Camellia* sp.). Scientia Horticulturae 120: 544-550.

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. and Testolin, R. 1996. Screening RAPD primer for molecular taxonomy and cultivar fingerprinting in genus *Actinidia*. Euphytica 90: 169-174.

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

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

Dhed'a, D., Dumortier, F., Panis, B., Vuylsteke, D. and De Langhe, E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* spp. ABB group). Fruits 46: 125–135.

Dongre, A. and Parkhi, V. 2005. Identification of Cotton Hybrid through the Combination of PCR Based RAPD, ISSR and Microsatellite Markers. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 14: 53-55.

Eeuwens, C. J. 1978. Effect of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera* L.) and culture *in vitro*. Physiologia Plantarum 3: 23-28.

Garland, S., Lewin, H. L., Abedinia, M., Henry, R. and Blakeney, A. 1999. The use of microsatellite polymorphisms for the identification of Australian breeding lines of rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica 108: 53-63.

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 Technology 27: 629-635.

Jaligot, E., Beule, T. and Rival, A. 2002. Methylation-sensitive RFLPs: characterization of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. Theoretical and Applied Genetics 104: 1263-1269.

Jaligot, E., Rival, A., Beule, T., Dussert, S. and Verdeil, J. L. 2000. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) : the DNA methylation hypothesis. Plant Cell Reports 19: 684-690.

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 Technology 23: 643-648.

Konan, K. E., Durand-Gasselin, T., Kouadio, Y. J., Flori, A., Alain, R., Duval, Y. and Pannetier, C. 2010. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. Plant Cell Reports 29: 1-13.

Lashermes, P., Combes, M. C., Robert, J., Trouslot, P., Hont, A. D., Anthony, F. and Charrier, A. 1999. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. Molecular and General Genetics 26: 259-266.

Machado, M. A., Coletta, H. D., Filho, M. L., Targon, P. N. and Pompeu, Jr. J. 1996. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. Euphytica 92: 321-326.

Matsumoto, Y., Patrick, M., Makoto, K., Hiroshi, F. and Hiriko, M. 2006. RAPD polymorphism of the white-flower gourd *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. landraces and its wild relatives in Kenya. Genetic Resources and Crop Evolution 53: 963-974.

Matthes, M., Singh, R., Cheah, S. C. and Karp, A. 2001. Variation in oil plam (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. Theoretical and Applied Genetics 102: 971-979.

Mohan, J. S. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118: 153-166.

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

Nhut, D. T., Thi, N. N., Khiet, B. L. T. and Luan, V. Q. 2007. Peptone stimulates *in vitro* shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). Scientia Horticulturae 115: 124-128.

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

Rajesh, M., Radha, K., Karun, E., 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.

Rajob, C., Abdolahadi, H., Mohammad, R. G., Marilyn, L. W., Ali, R. T. and Sayyed, A. M. 2006. Use of SSR data to determine relationships and potential heterotic groupings within medium to late maturing Iranian maize inbred lines. Field Crops Research 95: 212-222.

Rival, A., Bertrandt, L., Beule, 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.

Sanputawong, S. and Te-chato, S. 2008. Effect of genotypes of oil palm as indicator for speed of callus and embryogenic callus formation. Journal of Agricultural Technology 4: 147-156.

Sedra, H. My., Lashermes, P., Trouslot, P. and Combes, M. C. 1998. Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers. Euphytica 103: 75-82.

Singh, R., Jayanthi, N., Soon-Guan, T., Jothi, M. P. and Suan-Choo, C. 2007. Development of simple sequence repeat (SSR) marker for oil palm and their application in genetic mapping and fingerprinting of tissue culture clones. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 15: 121-131.

Singh, R., Rahimah, A. R., Leslie, O. C. L. and Cheah, S. C. 2006. Microsatellite probes for fingerprinting oil palm clones. *In* Malaysian Palm Oil Board.Vol. 305, pp. 312-314. Kuala Lumpur : Ministry of plantation Industries and Commodities.

Sivakumar, G., Yu, K. W., Hahn, E. J., Paek, K. Y., 2005. Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. Current Science 89: 641–649.

Sundaram, S., Senthikumar, P., Kumaraver, A. and Manoharan, N. 2008. Flank wear monitoring in coated carbide tool using AE signal analysis, cutting force, motor current and acceleration due to tool vibration. International Journal of Systems Signal Control and Engineering Application 1: 159-162.

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

Te-chato, S. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in somaclones of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Thai Journal of Agricultural Science 33: 137-145.

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

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. and Kirby, E. G. 1994. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. Plant Cell Reports 13: 247-250.

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.

Teixeira, J. B., Sondahl, M. R. and Kirby, E. G. 2004. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 13: 247-250.

Thawaro, S. 2009. Screening and detection of hybrid oil palms by DNA markers and theirs propagation. Ph.D Dissertation. Prince of Songkla University.

Thawaro, S. and Te-chato, S. 2009. Application of molecular markers in the hybrid verification and assessment of somaclonal variation from oil palm propagated *in vitro*. ScienceAsia 35: 142-149.

Thuzar, M., Vanavichit, A., Tragoonrung, A. and Jantasuriyarat, C. 2011. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. Acta Physiolgiae Plantarum 33: 23–128.

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

Verdeil, J. L., Huet, C., Grosdemange, F. and Buffard-Morel, J. 1994. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 13: 218–221.

Wilhelm, E., Hristoforoglu, K., Fluch, S. and Burg, K. 2006. Detection of microsatellite instability during somatic embryogenesis of oak (*Quercus robur* L.). Plant Cell Reports 23: 790-795.

Williams, J. G. K., Kubelik, R. A., Livak, J. K., Rafalski, A. J. and Tingey, V. S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

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

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

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายบัพเฟอร์ และสารละลายอื่น ๆ

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Te-chato และคณะ (2000)

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

สารเคมีที่ใช้ในการทำ denaturing electrophoresis

1. 6% polyacrylamide gel (Acrylamide : Bisacrylamide = 29:1) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

30 % Acrylamide Bis-acrylamide solution (29:1)	60	มิลลิลิตร
5X TBE	60	มิลลิลิตร
Urea	35	กรัม
น้ำกลั่น	105	มิลลิลิตร

2. 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

3. 10% (W/V) Ammonium persulfate (APS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Ammonium persulfate	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 6X loading buffer (สำหรับ denaturing polyacrylamide gel) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

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

แบ่งสารละลายใส่หลอดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. Bind silane สำหรับทากระจกแผ่นหลังที่ติดกับเจล

Bind silane	1	ไมโครลิตร
Glacial acetic acid	2.5	ไมโครลิตร
95% ethanol	500	ไมโครลิตร

สารเคมีที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอด้วย Silver nitrate

1. Fixation และ Stop solution (10% Acetic acid) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

2. 0.2% silver nitrate ปริมาตร 1,000 มิลลิตร

silver nitrate	2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. Develop solution ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Sodium carbonate	25	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้เย็นจัดก่อนนำมาใช้ ขณะใช้เติม Formaldehyde เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ Sodium thiosulfate เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) และ N_6

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	MS	N_6
ธาตุอาหารหลัก		
NH_4NO_3	1,650.000	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	463.000
KNO_3	1,900.000	2,830.000
KH_2PO_4	170.000	400.000
$CaCl_2.2H_2O$	440.000	166.000
$MgSO_4.7H_2O$	370.000	185.000
ธาตุอาหารรอง		
KI	0.830	0.8
H_3BO_3	6.200	1.6
$MnSO_4.H_2O$	16.900	4.4
$ZnSO_4.7H_2O$	10.600	1.5
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	-
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250	-
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	-
$FeSO_4.7H_2O$	27.800	27.800
Na_2EDTA	37.300	37.200
สารอินทรีย์		
Myo-inositol	100.000	-
Nicotinic acid	0.500	0.500
Pyridoxine HCl	0.500	0.500
Thaiamine HCl	0.100	1.000
Glycine	2.000	2.000
Sucrose (กรัม)	30.000	30.000
วุ้น(กรัม)	7.500	7.500

ตารางภาคผนวกที่ 2 ไพรเมอร์ RAPD ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

Primer name	ลำดับเบส 5'→ 3'
OPAB-01	GGGCGACTAC
OPAB-09	CCGTCGGTAG
OPAB-14	CAAGGGCAGA
OPR-11	AAGTGCGACC
OPT-06	GTAGCCGTCT
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPB-08	GTCCGTATGG
OPA-19	GTCCACACGG

ตารางภาคผนวกที่ 3 ไพรเมอร์ SSR ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

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 นางสาวอัญชลี อาธิปัจจาภรณ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210620031

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์ สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์ และสมปอง เตชะโต. 2554. การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) 42: 159-162.

อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์ และสมปอง เตชะโต. 2554. การประเมินความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองด้วยเทคนิค SSR. การนำเสนอผลงานในกิจกรรมโครงการ “Innovation Day ครั้งที่ 1” วันที่ 10 ตุลาคม 2554 ณ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. และได้รับรางวัลรองชนะเลิศอันดับ 1 การนำเสนอภาคโปสเตอร์