การเก็บรักษาพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราในไนโตรเจนเหลวและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

Cryopreservation of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and Detection of Genetic Variation

ทัศนี ขาวเนียม

Tassanee Khawniam

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Doctor of Philosophy in Plant Science
Prince of Songkla University
2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเก็บรักษาพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราในไนโตรเจนเหลวและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ผู้เขียน นางสาวทัศนี ขาวเนียม

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี)

……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)

……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระ เอกสมทราเมษฐ์)

……...กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……

(ศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเก็บรักษาพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราในไนโตรเจนเหลวและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ผู้เขียน นางสาวทัศนี ขาวเนียม

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

การเตรียมเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการต่าง ๆ เพื่ออนุรักษ์พันธุกรรมปาล์มน้ำมันในไนโตรเจนเหลว พบว่า การ preconditioning เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.0874 โมลาร์ เป็นเวลา 9 วัน ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 497.5 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 13.4 เอ็มบริโอต่อแคลลัส ส่วนการปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลวให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 16.67 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสดเฉลี่ย 81.2 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 0.25 เอ็มบริโอต่อแคลลัส การแช่ในสารละลาย vitrification (PVS2) ซึ่งประกอบไปด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ไดเมททิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และเอทธีลีนไกลคอลความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 100 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสดเฉลี่ย 304 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 11.6 เอ็มบริโอต่อแคลลัส การ preconditioning ร่วมกับการแช่ในสารละลาย vitrificaition ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที ก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 66.67 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสดเฉลี่ย 177.5 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 2.33 โซมาติกเอ็มบริโอต่อแคลลัส การหุ้มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยวุ้นแอลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้เม็ดวุ้นที่กลมสวย และให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุด 4.5 เอ็มบริโอต่อหลอด การ preconditioning เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปหุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วแช่ในสารละลาย LS เป็นเวลา 3 วัน ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุด 5.4 เอ็มบริโอต่อขวด ส่วนการ preconditioning เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสก่อนนำไปหุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนต แล้วนำไป dehydration ในตู้ laminar flow เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 8.2 เอ็มบริโอต่อขวด อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านขั้นตอนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้

การปรับเทคนิคโดย dehydration ด้วยซิลิกาเจลในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุด 550.89 มิลลิกรัม การ preconditioning ร่วมกับการ dehydration ด้วยซิลิกาเจลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 44.44 เปอร์เซ็นต์ การ preconditioning บนอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน ตามด้วย 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 4 วัน ก่อนนำไป dehydration ใน desiccator ที่บรรจุซิลิกาเจล เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (water content=17.6 เปอร์เซ็นต์) ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและวางเลี้ยงบนอาหารสูตร ARDA ในสภาพมืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปที่มีแสงอีก 6 สัปดาห์ ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสดเฉลี่ย 782.5 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 8.4 เอ็มบริโอต่อแคลลัส ดังนั้นจากการเตรียมเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยวิธีการข้างต้น เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวของปาล์มน้ำมัน

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการข้างต้นด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ พบว่า ทุกไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันได้ โดยแถบที่ได้ทั้งหมดมีความสม่ำเสมอในลักษณะ monomorphism และเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 8 คู่ พบว่า ไพรเมอร์ทุกคู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ monomorphism แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการดังกล่าว ไม่ก่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม

Thesis Title	Cryopreservation of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and Detection of Genetic Variation
Author	Miss Tassanee Khawniam
Major Program	Plant Science
Academic Year	2011

ABSTRACT

Embryogenic calli (EC) of oil palm were prepared using several methods before storing them in liquid nitrogen (LN) in order to preserve oil palm germplasm by cryopreservation. Preconditioning of EC on Murashige and Skoog medium (MS) in the presence of 0.0874 M sucrose for 9 days gave the highest average fresh weight at 497.5 mg and the average number of somatic embryos (SE) at 13.4 embryos/clumps. EC precultured with 0.25 M sucrose for 7 days and stored in LN gave the highest percentage of SE formation at 16.67, average fresh weight at 81.5 mg and average number SE at 0.25 embryos/clumps. Vitrified EC with modified plant vitrification solution 2 (PVS2) which consisted of 30% glycerol, 15% dimethylsulfoxide (DMSO) and 15% ethyleneglycol (EG) gave the highest percentage of SE formation at 100, average fresh weight and number of SE at 304 mg and at 11.6 embryos/clumps, respectively. Precultured EC subsequent to soaking in modified PVS2 at 0°C for 60 min before storing in LN gave the highest percentage of SE formation at 66.77, average fresh weight at 177.5 mg and average number of SE at 2.33 embryos/clumps. Encapsulation of EC with 3% sodium alginate in the presence of $CaCl_2$ gave a good quality of bead formation and average number of SE at 4.5 embryos/tubes. Moreover, preconditioning EC before encapsulation in combination with soaking it in loading solution (LS) for 3 days or dehydration in laminar flow for 10 h gave an average number of SE at 5.4 and 8.2 embryos/bottles, respectively. However, EC could not develop into SE after storing in LN. To ensure successful cryopreservation of oil palm, dehydration techniques were applied. Desiccation of EC in silica gel for 24 h gave the highest average fresh weight

at 550.89 mg. The preconditioning together with dehydrated EC by silica gel for 24 h followed by storing in LN, gave the highest percentage of SE formation at 44.44. The procedure was improved by applying a preconditioning method to the MS supplemented with stepwise sucrose 0.25 M for 3 days and 0.5 M for 4 days in combination with automate desiccators for 18 h (water content=17.6 %) and plunging into LN. This gave the highest results of 100% in both survival rate and SE formation and average fresh weight and number of SE at 782.5 mg and 8.4 embryos/clumps respectively after thawing and culturing on ARDA medium under darkness for 2 weeks and transferring to light condition for 6 weeks. In short, this protocol is suitable for cryopreservation of oil palm.

Analysis of genetic variation of plantlets derived from cryopreserved EC by RAPD technique using 7 primers revealed that there was a uniformity of DNA profiles. SSR marker also revealed that all primers (8 primers) gave the monomorphism of DNA profiles. The results suggest that cryopreservation using preconditioning and dehydration techniques do not affect genetic stability of oil palm plantlet.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(11)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(14)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	14
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	15
วัสดุ อุปกรณ์	15
วิธีการศึกษา	21
3. ผล	34
4. วิจารณ์	70
5. สรุป	78
เอกสารอ้างอิง	81
ภาคผนวก	92
ประวัติผู้เขียน	109

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พื้นที่ปลูก พื้นที่ให้ผลผลิต ผลผลิตและผลผลิตต่อไร่ปาล์มน้ำมันของไทย	2
2	ตัวอย่างการเก็บรักษาแบบ cryopreservation โดยใช้ embryogenic culture ในพืชยืนต้น	8
3	ไพรเมอร์อาร์เอพีดี ที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	30
4	ไพรเมอร์เอสเอสอาร์ ที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	33
5	ผลของระยะเวลาและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในการ preconditioning ของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อน้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังจากการวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	36
6	ผลของระยะเวลาและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในการ preconditioning ของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อจำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากการวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	37
7	ผลของสารละลาย vitrificaton ต่อน้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 2 เดือน	40
8	ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการแช่สารละลาย vitrification ก่อนและหลังเก็บรักษาไนโตรเจนเหลวต่อน้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน	41
9	ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการแช่สารละลาย vitrification ก่อนและหลังเก็บรักษาไนโตรเจนเหลวต่อจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน	42

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	ผลของความเข้มข้นของวุ้นแอลจิเนตต่อการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว	45
11	ผลของระยะเวลาการแช่ในสารละลาย loading หลังจาก preconditioning และ encapsulation ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 4 สัปดาห์	47
12	ผลของระยะเวลาในการ dehydration หลังจาก preconditioning และ encapsulation ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 4 สัปดาห์	48
13	ผลของระยะเวลาและวิธีการ dehydration ต่อปริมาณน้ำในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 4 สัปดาห์	50
14	ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาของการ dehydration ต่อปริมาณน้ำในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในการแช่ในไนโตรเจนเหลว หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 4 สัปดาห์	53
15	ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาในการ dehydration ใน desiccator และสภาพการวางเลี้ยงต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 2 เดือน	55
16	ชนิดของไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน จากการใช้เทคนิคเอสเอสอาร์	63

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	15
2	โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สอง (ก) และลักษณะต้นปาล์มน้ำมัน (ข) ซึ่งวางเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 5 มิลลิเมตร)	16
3	ลักษณะของเม็ดบีดที่ประกอบด้วยวุ้นแอลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ห่อหุ้มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และแช่ในสารละลาย LS (ก) และเม็ดบีดที่บรรจุในหลอด cryptube ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว (ข) (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	25
4	ผลของระยะเวลาและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในการปรับสภาพของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	35
5	ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากปรับสภาพบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 9 วัน และวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (บาร์ = 5 มิลลิเมตร)	38 39
6	ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากปรับสภาพบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 5 มิลลิเมตร)	43
7	ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการแช่สารละลาย vitrification ก่อนเก็บรักษาไนโตรเจนเหลวต่อเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ ที่วางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 2 เดือน	

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ปรับสภาพบนอาหารเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ร่วมกับการแช่ในสารละลาย vitrificaiton แล้ววางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 2 เดือน (บาร์ = 5 มิลลิลิตร)	44
9	ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในเม็ดบีดซึ่งเติมวุ้นแอลจิเนตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 5 มิลลิเมตร)	46
10	ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในเม็ดบีดที่ไม่ปรับปริมาณน้ำ (ก) และปรับด้วย laminar flow เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (ข) ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	49
11	ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาของการ dehydration ด้วย laminar flow (ก) และซิลิกาเจล (ข) ต่อปริมาณน้ำในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	52
12	ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาในการ dehydration ใน desiccators และสภาพการวางเลี้ยงหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	54
13	ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการ preconditioning บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน และ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำไป dehydration ใน desiccator ที่บรรจุซิลิกาเจล เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ (อาหารสูตร ARDA เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร) วางเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนย้ายไปที่มีแสงอีก 2 สัปดาห์ (ก)	56

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	4 สัปดาห์ (ข) แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมแต่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 1 เดือน (ค) และ 2 เดือน (ง)	56
14	การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว ที่สกัดได้จากการประยุกต์ของ Te-chato (2000) ด้วยวิธีการทางคุณภาพเปรียบเทียบกับ λDNA	57
15	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAB01 (ก) และ OPAB09 (ข)	59
16	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAB14 (ก) และ OPR11 (ข)	60
17	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB08 (ก) และ OPT06 (ข)	61
18	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPT19	62
19	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008	64
20	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคเอสเอสอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0465 (ก) และ EgCIR0337 (ข)	65
21	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคเอสเอสอาร์ เมื่อใช้ไพร เมอร์ EgCIR0781	66
22	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคเอสเอสอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0446 (ก) และ EgCIR0409 (ข)	67
23	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคเอสเอสอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0905	68
24	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคเอสเอสอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR1772	69

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชยืนต้น ใบเลี้ยงเดี่ยวขนาดใหญ่ ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=32 เป็นพืชผสมข้ามประเภทที่มีช่อดอกตัวเมียและดอกตัวผู้อยู่บนต้นเดียวกันแต่ช่วงเวลาการบานของดอกไม่พร้อมกัน และมีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบชายฝั่งทะเลของประเทศกินี พืชชนิดนี้จัดอยู่ในสกุล *Elaeis* สามารถจำแนกสกุลนี้ออกเป็น 3 ชนิดคือ *Elaeis guineensis E. oleifera* และ *E. odora* ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและนิยมปลูกเป็นการค้า คือ *E. guineensis* เมื่อใช้ความแตกต่างของลักษณะความหนาของกะลา การปรากฏของจุดวงแหวนเส้นใยสีน้ำตาล (brown fiber ring) บริเวณเนื้อปาล์มรอบๆ กะลา และความหนาของเนื้อปาล์มสามารถจำแนกพันธุ์ปาล์มชนิดนี้ออกเป็น 3 แบบ คือ ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา (ธีระ, 2554) และเมื่อพิจารณาถึงการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะความหนาของกะลาพบว่า สายพันธุ์ดูรา ผลมีกะลาหนาถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ แบบพิสิเฟอรา ผลไม่มีกะลาถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ และแบบเทเนอราผลมีกะลาบางถูกควบคุมด้วยยีนพันธุ์ทาง 1 คู่ เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่เกิดจากการผสมระหว่างดูราและพิสิเฟอรา มีเปลือกหนาทำให้สามารถอัดน้ำมันได้มากและให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง (บุษบา, 2548)

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในระดับโลก เป็นพืชน้ำมันที่มีศักยภาพในการแข่งขันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ เช่น ถั่วเหลือง เรพซีด ทานตะวัน ฝ้าย ถั่วลิสง เป็นต้น เนื่องจากให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงที่สุด ส่งผลให้มีต้นทุนการผลิตและราคาต่ำกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่นๆ (ธีระ, 2554) เราสามารถใช้ประโยชน์จากปาล์มน้ำมันได้ทุกส่วน โดยผลปาล์มนำมาบริโภคโดยผลิตเป็นน้ำมันพืช เนยเทียม เป็นเครื่องอุปโภคโดยผลิตเป็นสบู่ เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง ผงซักฟอก และอุตสาหกรรมฉาบเหล็กและโลหะต่างๆ (พรชัย, 2523) กะลาของผลปาล์มนำมาทำเป็นอาหารสัตว์และใช้เป็นเชื้อเพลิง ต้นปาล์มแก่ใช้ทำแผ่นไม้สำหรับผนังห้อง เพดาน รวมทั้งทำเชื้อเพลิงอัดเม็ดที่มีค่าซัลเฟอร์ต่ำ นอกจากนี้น้ำมันปาล์มยังใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนภายในประเทศได้

(ธีระ และคณะ, 2548) และยิ่งมีความสำคัญมากขึ้นเมื่อราคาของน้ำมันเชื้อเพลิงในปัจจุบันมีความผันผวน สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร (2555) คาดว่า ความต้องการใช้น้ำมันปาล์มดิบเพื่อการบริโภคมีปริมาณ 960,000 ตัน สำหรับการใช้เพื่อผลิตไบโอดีเซล (B_{100}) กระทรวงพลังงานเพิ่มสัดส่วนการผสมน้ำมันปาล์มในน้ำมันดีเซลจากร้อยละ 4 เป็นร้อยละ 5 โดยประมาณความต้องการใช้ได้ 510,000 ตัน และคาดว่าความต้องการใช้ภายในประเทศมีปริมาณรวมทั้งสิ้น 1.47 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2554 ร้อยละ 14.71 ซึ่งในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา (ปี 2550-2554) ประเทศไทยมีพื้นที่ในการปลูกปาล์มน้ำมันและเก็บเกี่ยวเพิ่มขึ้นถึงอัตราเฉลี่ยต่อปีร้อยละ 7.09 และ 9.37 ตามลำดับ และให้ผลผลิตร้อยละ 7.80 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 พื้นที่ปลูก พื้นที่ให้ผลผลิต ผลผลิตและผลผลิตต่อไร่ปาล์มน้ำมันของไทย

ปี	พื้นที่ปลูก (ล้านไร่)	พื้นที่ให้ผลผลิต (ล้านไร่)	ผลผลิต (ล้านตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กก./ไร่)
2550	3.2	2.66	6.39	2,399
2551	3.68	2.88	9.27	3,214
2552	3.89	3.19	8.16	2,561
2553	4.08	3.55	8.22	2,315
2554*	4.28	3.75	9.88	2,631
อัตราเพิ่ม (ร้อยละ)	**7.09**	**9.37**	**7.80**	**-1.43**
2555*	4.49	3.99	10.94	2,743

หมายเหตุ : * ประมาณการ ณ เดือนกันยายน 2554

ที่มา: สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร (2555)

นอกจากการขยายพื้นที่ในการปลูกปาล์มน้ำมัน ปัจจัยที่ส่งผลต่อศักยภาพการผลิตปาล์มน้ำมันคือ การเลือกใช้ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตทะลายและผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงสุด มีความสามารถในการปรับตัว ทนทานต่อโรคและศัตรูปาล์มน้ำมัน ทั้งนี้ขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการคัดเลือกแบบวงจร (recurrent selection) เพื่อให้ได้มาซึ่งพันธุ์ดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลายาวนานในการปรับปรุงพันธุ์ในแต่ละรอบ เพื่อการผลิตพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา ซึ่งได้จากพ่อพันธุ์พิสิเฟอราและแม่พันธุ์ดูราที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แต่ละกลุ่มประชากรมาแล้ว และข้อจำกัดของการขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ดที่ไม่สามารถเก็บเมล็ดใต้โคนไปขยายต่อได้ ทำให้ราคาต้น

กล้าปาล์มน้ำมันมีราคาสูง จึงส่งผลทำให้เกิดการขาดแคลนต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี แม้จะมีการนำเข้าพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมจากต่างประเทศแต่เป็นพันธุ์ที่ปรับปรุงให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศผู้ผลิตนั้นๆ เมื่อนำมาปลูกในประเทศอาจไม่เหมาะสม สำหรับประเทศไทยมีหน่วยงานจากทางรัฐบาลและมหาวิทยาลัยที่ทำการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อให้เหมาะสมกับพื้นที่เพาะปลูก ประกอบกับการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นการขยายพันธุ์อีกหนึ่งทางเลือกที่สามารถเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ดีได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น แต่ในการทดสอบโคลนในแปลงปลูกต้องใช้ระยะเวลานานประมาณ 7-8 ปี (ธีระ, 2554) ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสังเคราะห์ รวมถึงช่องทางการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่แบบ indirect embryogenesis ต้องผ่านการสร้างแคลลัส จำนวนครั้งในการย้ายเลี้ยง การใช้ฮอร์โมนในความเข้มข้นสูง อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Villalobos *et al*., 1991) Bhatti และคณะ (1997) อ้างโดย Benson (2008) รายงานว่า การย้ายเลี้ยงหลายๆ ครั้งเป็นระยะเวลานาน นอกจากจะสูญเสียค่าใช้จ่าย ยังเพิ่มความเสี่ยงในการสูญเสียความสามารถในการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของชิ้นส่วนพืช เนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ความชำนาญของผู้ปฏิบัติการและการดูแลควบคุมสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นเพื่อป้องกันการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพันธุ์ดีดังกล่าว การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมจึงมีความจำเป็นและควรมีการพัฒนาควบคู่กับการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในระยะยาว (long term storage) สามารถทำได้ทั้งในและนอกหลอดทดลอง ซึ่งการเก็บรักษาในสภาพนอกหลอดทดลองมีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา การเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศ และพื้นที่เก็บรักษาต้องมีขนาดใหญ่ ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) เป็นวิธีการเก็บรักษาในหลอดทดลองอีกหนึ่งวิธีการที่มีประสิทธิภาพไม่มีข้อจำกัดในเรื่องดังกล่าว เสียค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาตัวอย่างเฉลี่ยต่อปีต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บรักษาแบบอื่น (Engelmann, 2000) สามารถใช้ชิ้นส่วนพืชหลากหลายชนิด ได้แก่ เมล็ด แคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ เซลล์ซัสเพนชัน และเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดหรือปลายราก เป็นต้น ซึ่งประสบผลสำเร็จในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วย (Panis *et al.,* 2001) อินทผลัม (Bekheet *et al*., 2007) และข้าว (Benson and Lynch, 1999) สำหรับชิ้นส่วนพืชที่มีความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้สูงของปาล์มน้ำมัน คือ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหรือกลุ่มเซลล์ที่มีองค์ประกอบเป็นเอ็มบริโอเจนิค เนื่องจากเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ แวคิวโอลขนาดเล็กและมีความเข้มข้นของไซโตพลาสซึมสูง และหากมีการนำเทคนิคต่าง ๆ มาเตรียมความพร้อม โดย

วิธีปรับสภาพ (preconditioning) ปรับปริมาณน้ำ (dehydration) หรือการใช้สารป้องกันความเย็น (cryoprotectant หรือ vitrification) และการห่อหุ้ม (encapsulation) เพียงวิธีใดวิธีหนึ่งหรือใช้ร่วมกัน ช่วยให้ชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตสูงและสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ อีกทั้งยังสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุพืชเริ่มต้นเพื่อการขยายและปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. การเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด (cryopreservation)

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในระยะยาวที่มีศักยภาพคือ cryopreservation ซึ่งเป็นการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส อุณหภูมิดังกล่าวหยุดกิจกรรมทุกอย่างของเซลล์ สามารถเก็บรักษาชิ้นส่วนเป็นระยะเวลานานโดยเซลล์ไม่ตายและพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อต้องการที่จะทำให้เซลล์กลับมามีกิจกรรมเหมือนเดิมก็เพิ่มอุณหภูมิให้เซลล์กลับมามีกิจกรรมตามปกติ การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้สามารถรักษาพืชไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์ โดยเฉพาะพืชที่หายากหรือใกล้สูญพันธุ์นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาพันธุกรรมพืชที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ได้เมื่อต้องการ (Bajaj, 1995) นอกจากการอนุรักษ์พันธุกรรมแล้ว ยังสามารถใช้พันธุกรรมพืชที่เก็บรักษาเพื่อการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์หรือเป็นเชื้อพันธุ์เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปด้วย Cornejo และคณะ (1995) นำตัวอย่างที่ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษามาก่อน แล้วมาใช้ประโยชน์ในการปลูกถ่ายยีน โดยปลูกถ่ายยีนให้แคลลัสของข้าวพันธุ์ Taipei 309 ที่ได้จากการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์โดย cryopreservation ซึ่งการเก็บรักษาไม่ทำให้ความสามารถในการปลูกถ่ายยีนหรือการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ลดลง

2. ขั้นตอนในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในไนโตรเจนเหลว

ความสำเร็จในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวจำเป็นต้องมีขั้นตอนที่เหมาะสมในการเก็บรักษา โดยแต่ละขั้นตอนต้องคำนึงถึงความแตกต่างในเรื่องชนิดของชิ้นส่วนและชนิดพืชในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ทั้งนี้ประกอบด้วย

2.1 การเตรียมชิ้นส่วนก่อนการเก็บรักษา

เนื่องจากการเก็บรักษาด้วยวิธีนี้ใช้อุณหภูมิต่ำมาก ในการแช่ชิ้นส่วนลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรงทำให้เซลล์พืชได้รับความเสียหายและตายในที่สุด เนื่องจากการเกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายในและนอกเซลล์ และสาเหตุทางชีวเคมีที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเมแทบอลิซึมในขั้นตอนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่จะนำไปสู่การเกิดสารพิษจำพวกสารอนุมูลอิสระที่สำคัญได้แก่ hydroxyl radical ($^{\circ}OH$) และ superoxide radical (O^{-}_{2}) และสามารถเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) และ singlet oxygen ($^{\circ}O_2$) ได้ โดยสารอนุมูลอิสระจะไปจับรวมกับส่วนประกอบของไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วเปลี่ยนเป็นรูป lipid peroxide มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ และเกิดการสะสมของ aldehydes hydrocarbon และ cross-linked products (Dumet and Benson, 2000) ทั้งนี้สถานะของน้ำและความสมดุลของออสโมติกคัมสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่ของน้ำเข้าออกเซลล์เป็นตัวแปรสำคัญในการประสบความสำเร็จของการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด (Mazur, 2004) การนำและพัฒนาวิธีการต่าง ๆ มาใช้เพื่อให้เซลล์มีการปรับสภาพ โดยการปรับปริมาณน้ำในเซลล์ให้เหมาะสม และสามารถทนต่อสภาพเย็นได้โดยเซลล์ไม่ตายและพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากการเก็บรักษา วิธีการเตรียมชิ้นส่วนก่อนการเก็บรักษานั้นสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

- Preconditioning เป็นการปรับสภาพชิ้นส่วนโดยการปรับปริมาณน้ำภายในเซลล์หรือชิ้นส่วนพืชด้วยการวางเลี้ยงในหรือบนอาหารที่มีการเติมน้ำตาล (ซูโครส กลูโคส) หรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ (ซอร์บิทอล แมนนิทอล) ที่มีความเข้มข้นสูง ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลความเข้มข้นสูงส่งผลต่อแรงดันออสโมติก ทำให้ปริมาณน้ำในเซลล์พืชลดลง จึงเป็นการปกป้องเซลล์ในขณะที่เก็บรักษาในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำ น้ำตาลที่นิยมมากตัวหนึ่งคือ น้ำตาลซูโครส เป็นสารที่หาง่ายและราคาถูก ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและระยะเวลาในการปรับสภาพที่เหมาะสมนั้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด ขนาดของชิ้นส่วนพืช และพันธุกรรมพืช รวมไปถึงสภาพทางสรีรวิทยาของชิ้นส่วนพืชในขณะเก็บรักษา Aronen และคณะ (1999) ปรับสภาพชิ้นส่วนแคลลัสของ *Abies cephalonica* โดยการวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 1 วัน แล้ววางเลี้ยงบนอาหารเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ เป็นเวลาอีก 1 วัน ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ให้การรอดชีวิตของชิ้นส่วน 75 เปอร์เซ็นต์ Bekheet และคณะ (2007) เตรียมชิ้นส่วน nodular callus ของอินทผลัมด้วยการปรับสภาพบนอาหารเติมน้ำตาลซูโครสความ

เข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ให้การรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ 75 เปอร์เซ็นต์

- Dehydration เป็นเทคนิคที่ใช้ในการปรับปริมาณน้ำภายในเซลล์โดยตรง โดยการนำไปผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่มีลมเป่าด้วยความเร็ว 80-90 ฟุตต่อนาที หรือการวางในโถหรือตู้ปรับความชื้น (desicator) ที่บรรจุซิลิกาเจล Kim และคณะ (2006) เก็บรักษาโซมาติกเอ็มบริโอของ *Paeonia lactiflora* Pall. โดยการผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ให้การรอดชีวิต 66 เปอร์เซ็นต์ Bekheet และคณะ (2007) เตรียมชิ้นส่วน nodular callus ของอินทผลัมด้วยการผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 20 นาที ให้การรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ 65 เปอร์เซ็นต์ สำหรับวิธีการนี้ต้องคำนึงถึงปริมาณน้ำหรือความชื้นที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม หากเนื้อเยื่อสูญเสียน้ำมากจนเกินไปอาจส่งผลต่อการรอดชีวิตและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากการเก็บรักษา

- Vitrification เป็นเทคนิคการปรับปริมาณน้ำโดยใช้สารเคมี และสารละลายที่ปกป้องเนื้อเยื่อจากความเย็นในขณะแช่แข็ง ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ ชนิดแรกสามารถซึมผ่านผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ ไดเมททิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide: DMSO) และกลีเซอรอล เป็นต้น ชนิดที่สองไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ กรดอะมิโน (โพรลีน) และน้ำตาลแมนนิทอล และชนิดสุดท้ายไม่สามารถผ่านผนังเซลล์ได้ คือ พอลีแซ็คคาไรด์ โปรตีน เป็นต้น การทำให้เกิดสภาพ vitrification เป็นกระบวนการทางกายภาพที่สามารถหลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็งได้ทั้งในเซลล์และนอกเซลล์ (Bajaj, 1995) โดยการเปลี่ยนแปลงของสารละลายจากสภาพที่เป็นของเหลวให้เป็นของแข็งที่มีสภาพคล้ายกระจกขุ่นหรือกระจกใสรวมถึงการปรับปริมาณน้ำภายในเซลล์ซึ่งมีผลให้ความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น และค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลงไป เป็นการป้องกันการเสื่อมของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้คาดว่าจะมีความดันน้ำต่ำกว่าผลึกที่เป็นน้ำแข็ง เป็นการป้องกันการเสียน้ำ และเนื่องจากภายในเซลล์มีความหนืดสูง มีผลในการหยุดปฏิกิริยาเคมีที่ต้องการการเคลื่อนย้ายของโมเลกุล ทำให้เกิดสภาพพักตัวและมีเสถียรภาพเป็นเวลานาน (Sakai, 2000) ทั้งนี้อาจใช้สารเพียงตัวเดียวหรือใช้ร่วมกัน สารละลายที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ plant vitrification solution (PVS2) ซึ่งประกอบด้วยกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ เอทธีลีนไกลคอล 15 เปอร์เซ็นต์ DMSO 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 0.4 โมลาร์ (Sakai *et al.*,1990) วิธีการนี้ประสบความสำเร็จในกระบวนการเก็บรักษาของพืชหลายชนิด เช่น Takagi และคณะ (1997) แช่ปลายยอดของเผือก เป็นเวลา 20 นาที ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ Panis และคณะ (2001) จุ่มแช่ปลายยอดของกล้วยพันธุ์ต่าง ๆ ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 30-60 นาที ให้อัตรา

รอดชีวิตประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น Wu และคณะ (2007) ศึกษาการเก็บรักษา embryogenic callus (EC) ของมะม่วงที่พัฒนามาจากชิ้นส่วน immature cotyledon ด้วยเทคนิค vitrification โดยการแช่ในสารละลาย PVS3 ประกอบด้วย กลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 50 เปอร์เซ็นต์ (Nishizawa *et al.,* 1993) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนภายหลังการจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลวสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อเก็บรักษา EC ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันคือ exponential stage และ stationary stage ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 20 วัน และ 30 วัน ตามลำดับ ด้วยเทคนิค vitrification พบว่า ชิ้นส่วนพืชที่อยู่ใน exponential stage ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนสูงที่สุด 96.7 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ที่อยู่ในระยะนี้จะมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงและไซโตพลาสซึมเข้มข้น จึงส่งผลให้เซลล์พืชที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีข้างต้นมีความทนทานต่ออุณหภูมิเย็นและมีอัตราการรอดชีวิตสูง (Bajaj, 1995)

- Encapsulation เป็นวิธีการห่อหุ้มเซลล์หรือชิ้นส่วนที่ต้องการเก็บรักษาในตัวกลาง อันเกิดจากการแลกเปลี่ยนประจุกันระหว่างประจุของโซเดียมแอลจิเนตที่เป็นสารเคลือบกับประจุของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ โดยนิยมใช้โซเดียมแอลจิเนตที่ระดับความเข้มข้น 2-6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) สามารถทำให้เกิดเป็นเม็ดบีดที่แข็งแรงและคงทน ซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50-125 มิลลิโมลาร์ และระยะเวลาในการเกิดเม็ดบีดที่เหมาะสม (Pattnaik *et al.,* 1995)

นอกจากนี้มีการผสมผสานวิธีการต่าง ๆ ร่วมกัน เช่น encapsulation-dehydration vitrification-encapsulation preconditioning-dehydration preconditioning-vitrification เป็นต้น ผลสำเร็จจากการใช้วิธีการดังกล่าวมีรายงานในพืชจำนวนมาก (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ Matinez และคณะ (2003) ศึกษาการเก็บรักษากลุ่มของ somatic embryo ของโอ๊คสายพันธุ์ T4-H โดยการ pre-culture บนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นแช่ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารละลาย PVS2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ก่อนจุ่มในไนโตรเจนเหลว ให้อัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 70 เปอร์เซ็นต์ Mubmann และคณะ (2006) ปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชันของ *Clyclamen persicum* Mill. โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.6 โมลาร์ เป็นเวลา 2 วัน ตามด้วยการแช่สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิต 75 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการเก็บรักษาแบบ cryopreservation โดยใช้ embryogenic culture ในพืชยืนต้น

ชนิดพืช	ชนิดของชิ้นส่วน	Preconditioning	Cryoprotectant	การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (%)	เอกสารอ้างอิง
Aesculus hippocastanum	SE (ระยะทอร์ปิโด)	4°C (5d), darkness	2 M glycerol + 0.4 M Sucrose (30min, 25°C); PVS2 (90min, 0°C)	94	Lambardi และคณะ, 2005
Cirtus sinensis	เซลล์ซัสเพนชัน		60% PVS2 (5min, 25°C)+ PVS2 (3min, 0°C)	84	Sakai และคณะ,1990
Magnifera indica 'Zihua'	เซลล์ซัสเพนชัน	0.5 M Sucrose (1d, 25°C)	PVS3 (20min, 25°C)	94	Wu และคณะ, 2003
Olea europaea	EC	4°C (4d),darkness	2 M glycerol + 0.4 M Sucrose (30min, 25°C) + PVS2 (90min, 0°C)	38	Lambardi และคณะ, 2005
Quercus robus	SE (ระยะรูปกลมและหัวใจ)	0.3 M Sucrose (3d)	PVS2 (60min, 25°C)	70	Martinez และคณะ, 2003
Quercus suber	SE (ระยะรูปกลม)	0.3 M Sucrose (3d)	PVS2 (60min, 0°C)	93	Valladares และคณะ, 2004

2.2 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

หลังจากที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการต่าง ๆ นำชิ้นส่วนบรรจุใน cryotube ในสภาพปลอดเชื้อ แล้วใช้ cryocane หรือ cryobox เป็นตัวยึด จากนั้นนำมาเก็บในถังไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ก่อนหน้านี้การเก็บรักษาในระยะแรก (conventional freezing method) จะประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ การลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ (slow cooling) 0.5-1 องศาเซลเซียสต่อนาที จนอุณหภูมิประมาณ -40 องศาเซลเซียส แล้วจึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที (rapid cooling) ซึ่งต้องใช้เครื่องมือควบคุมโปรแกรมการลดอุณหภูมิที่ยุ่งยากและมีราคาแพง (Vicient and Martinez, 1998) สำหรับระยะเวลาในการเก็บรักษานั้นไม่มีผลต่ออัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนหรือการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ Salaj และคณะ (2012) รายงานว่า การเก็บรักษาชิ้นส่วนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ *Pinus nigra* จำนวน 20 สายพันธุ์ ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ปี ไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สอดคล้องกับ การเก็บรักษา embryogenic callus ของ *Abies cephalonica* Loud. เป็นระยะเวลา 6 ปี ที่ไม่ทำให้ความสามารถในการเพิ่มปริมาณและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่เปลี่ยนไป (Krajnakova *et al.*, 2011)

2.3 การละลายน้ำแข็ง (Thawing)

หลังจากการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในไนโตรเจนเหลวแล้วเมื่อต้องการจะนำเอาตัวอย่างมาใช้ ต้องทำการละลายผลึกน้ำแข็งออกอย่างรวดเร็ว เพื่อไม่ให้เซลล์ได้รับอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็ง โดยการหยดตัวอย่างลงในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที หรือการละลายในสารละลายที่ประกอบด้วยอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที (Chen *et al.*, 2011) สำหรับการเตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธี encapsulation บางครั้งอาจต้องการละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 นาที

2.4 การตรวจสอบความมีชีวิตและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

หลังจากที่ละลายน้ำแข็งแล้ว สามารถตรวจสอบความมีชีวิตเบื้องต้นด้วยการย้อมด้วยสาร 2 ชนิดคือ 1) สาร fluorescein diacetate (FDA) โดยเซลล์พืชที่มีชีวิตมีกิจกรรมของเอนไซม์ esterase เอนไซม์ดังกล่าวไปย่อยโมเลกุลของ FDA แล้วให้สารเรืองแสงสีเขียว เมื่อดูภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ (อารีย์, 2541) 2) สาร 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) ซึ่งทำปฏิกิริยารีดักชันกับอนุมูลไฮโดรเจน (H^+) ที่ถูกปลดปล่อยจากการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase ในกระบวนการหายใจของเซลล์ที่มีชีวิต โดยสารนี้จะถูกรีดิวซ์ให้เปลี่ยนเป็นสารชื่อฟอร์มาแซน (formazan) มีสีแดง ไม่ละลายน้ำและไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนบริเวณที่ไม่ติดสีแสดงถึงเซลล์ของเนื้อเยื่อนั้นไม่มีการหายใจหรือไม่มีชีวิต (Whiters, 1985) อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีข้างต้นไม่สามารถบ่งบอกการพัฒนาของชิ้นส่วนที่ตรวจสอบไปเป็นพืชต้นใหม่ต่อไปได้ ดังนั้น จึงต้องมีการตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยดูการเจริญ การสร้างและพัฒนาของเนื้อเยื่ออีกครั้ง

3. การเก็บรักษาปาล์มน้ำมันในไนโตรเจนเหลว

การเก็บรักษาปาล์มน้ำมันในไนโตรเจนเหลวนั้นมีรายงานน้อยมาก เนื่องจากข้อจำกัดของความหลากหลายของชิ้นส่วนที่ใช้เก็บรักษา ทั้งนี้ปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่สามารถขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการ embryogenesis ดังนั้นชิ้นส่วนที่สามารถนำมาเก็บรักษา ได้แก่ เมล็ด แคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอระยะต่าง ๆ เป็นต้น Dumet และคณะ (1993) ปรับสภาพกลุ่มของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันโดยการวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.75 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปปรับความชื้นด้วยซิลิกาเจลเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ให้อัตราการรอดชีวิต 93 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ 20 เปอร์เซ็นต์ Engelmann และคณะ (1995) ทำการเก็บรักษาไซโกติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันในไนโตรเจนด้วยการนำไซโกติกเอ็มบริโอมาดึงน้ำออกโดยการผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีน้ำเป็นองค์ประกอบ 3.1 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนสูงที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์ และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ 65 เปอร์เซ็นต์ Suranthran และคณะ (2012) ทำการเก็บรักษาโพลีเอ็มบริออยด์ (polyembryoid) และเตรียมชิ้นส่วนก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธี vitrification โดยนำชิ้นส่วนปรับสภาพในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วยการแช่ใน loading solution (LS) ที่ประกอบด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 0.7 โมลาร์

เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนมาปรับสภาพในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส หลังจากการวางเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า โพลีเอ็มบริออยด์สามารถให้การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ 45 เปอร์เซ็นต์

4. การตรวจสอบความแปรปรวนโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

จากการเก็บรักษาพันธุ์พืชด้วยวิธี cryopreservation ซึ่งเป็นเทคนิคการเก็บรักษาที่ลดความเสี่ยงของความแปรปรวนทางพันธุกรรม ดังนั้น การตรวจสอบความแปรปรวนของชิ้นส่วนภายหลังการเก็บรักษาจึงมีความจำเป็น ทั้งนี้เพื่อยืนยันว่า วิธีการต่างๆ ที่นำมาใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนหรือขั้นตอนของการเก็บรักษาไม่ทำให้ชิ้นส่วนพืชแปรปรวนไป ซึ่งวิธีการตรวจสอบความแปรปรวน สามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น การดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา เซลล์วิทยา กายวิภาคและสรีรวิทยา ตลอดจนการตรวจสอบระดับโมเลกุล เป็นต้น ในบรรดาวิธีการทั้งหมดที่กล่าวมาการตรวจสอบระดับโมเลกุลให้ผลรวดเร็วและน่าเชื่อถือมากที่สุด การตรวจสอบระดับโมเลกุล คือ ระดับโปรตีน และระดับดีเอ็นเอ การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบระดับโปรตีน เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมีในทุกเซลล์พืชคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง และมีค่าคงที่เฉพาะในสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ ดังนั้น จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในทุกระยะการเจริญเติบโตและสภาพทางสรีรวิทยาโดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบมีหลายเครื่องหมายแตกต่างกัน ซึ่งสำหรับปาล์มน้ำมันมีการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลหลายรูปแบบ ได้แก่ เครื่องหมายเอสเอสอาร์: ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Sanputawong and Te-chato, 2011) เครื่องหมายเอเอฟเอลพี: การจำแนกพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน (Purba *et al*., 2000) เครื่องหมายอาร์เอฟเอลพี: จำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมในปาล์มน้ำมัน (Parani *et al*, 1998; Maizura *et al*., 2006) และเครื่องหมายอาร์เอพีดี: จำแนกพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน (Shah *et al*., 1994) และ ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Rival *et al*., 1998)

4.1 อาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA: RAPD)

อาร์เอพีดี มีหลักการทำงานโดยอาศัยไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม ไพรเมอร์ดังกล่าวมีขนาดสั้นประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ และสามารถแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้ โดยการทำอิเล็กโตรโฟริซิสในตัวกลางวุ้นอะกาโรสเจล และย้อม

แถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (สุรินทร์, 2545) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด อีกทั้งค่าใช้จ่ายไม่สูง วิธีการศึกษาง่ายไม่ซับซ้อน ใช้ดีเอ็นเอน้อยประมาณ 25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา (Winter and Kahl, 1995) มีการนำเครื่องหมายอาร์เอพีดีมาใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบความแปรปรวนของชิ้นส่วนที่ผ่านการเก็บรักษา โดย Jokipii และคณะ (2004) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลูกผสม aspen โดยการใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี จากทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ พบว่า ต้นที่ผ่านการเก็บรักษาไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม Haggman และคณะ (1998) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสน (*Pinus sylvestris* L.) ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยเครื่องหมายเดียวกัน ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมเช่นกัน ส่วน Aronen และคณะ (1999) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ *Abies cephalonica* ที่ผ่านการเก็บรักษา พบว่า มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม ทั้งนี้เนื่องจากการใช้สาร DMSO เป็นสารป้องกันความเย็นในการเตรียมชิ้นส่วน ซึ่งมีความเข้มข้นสูง (มากกว่า 10 %) อาจจะส่งผลให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ สำหรับในปาล์มน้ำมันยังไม่มีรายงานการใช้เครื่องหมายดังกล่าวในการตรวจสอบความแปรปรวนของพืชที่ได้จากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว คงมีเพียงรายงานการศึกษาความแปรปรวนและความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม โดยสายชล (2547) เก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน 151 ต้น จากแหล่งปลูกที่สำคัญในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย มาตรวจสอบโดยใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์จำนวน 160 ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 7 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน คือ OPB08 OPB11 OPT06 OPT19 OPAB01 OPAB09 และ OPAB14 โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 209 แถบ เฉลี่ย 29.85 แถบต่อไพรเมอร์ และเมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอมาสร้างเดนโดรแกรมโดยใช้วิธี UPGAM (Unweighted Pair-group Method Using Arithmetic Average) จากโปรแกรม SPSS พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันได้ 3 กลุ่ม เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 พันธุ์ พบว่า มีค่าตั้งแต่ 0.6 ขึ้นไป แสดงให้เห็นว่า ปาล์มน้ำมันที่ปลูกในภาคใต้ของประเทศไทยมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย Thawaro (2009) ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม (globular stage: GS) และต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยใช้ไพรเมอร์ดังกล่าว พบว่า มีเพียงไพรเมอร์ OPT06 ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและสามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมของคู่ผสมเบอร์ 77 และ 119 โดยให้แถบดีเอ็นเอจำเพาะขนาด 650 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ และเมื่อทำการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันลูกผสม ไม่พบความแปรปรวนของ GS และต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเบอร์ 77 ธนวดี (2551) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่ชักนำจากโซมาติกเอ็มบริโอ

ชุดที่สอง (secondary somatic embryo: SSE) โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ 7 ไพรเมอร์ (OPB08 OPB11 OPT06 OPT19 OPAB01 OPAB09 และ OPAB14) พบว่า มีเพียง 1 ไพรเมอร์ คือ OPAB09 ที่ให้แถบดีเอ็นซัดเจนและไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดังกล่าว

4.2 **เอสเอสอาร์** (Simple sequence repeats: SSR)

เอสเอสอาร์ มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ไมโครแซตเทลไลต์ (microsatellites) หรือ short tandem repeat (STR) เป็นลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม ซึ่งแต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยลำดับเบสสั้นมากเพียง 1-4 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส และมีลักษณะแตกต่างกันในแต่ละสิ่งมีชีวิต โดยลำดับเบสแบบเอสเอสอาร์มีการกระจายไม่สม่ำเสมอ แต่จะพบที่ตำแหน่งเดียวกันในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ในการตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตสามารถตรวจสอบโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction: PCR) ที่ใช้ไพรเมอร์ซึ่งถูกออกแบบจากลำดับเบสที่อยู่รอบ ๆ เบสซ้ำ แล้วตรวจสอบได้ทันทีเมื่อนำมาแยกขนาดได้โดยใช้ตัวกลางที่เป็น denature polycrylamine gel electrophoresis ปัจจุบันนิยมใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ ในการศึกษาแผนที่ของจีโนมและแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545) รวมไปถึงการตรวจสอบความแปรปรวนและการตรวจสอบลูกผสมของพืชหลายชนิด เนื่องจากต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีคุณภาพดีมากนัก ผลการตรวจสอบมีความแม่นยำและให้โพลิมอร์ฟิซึมสูง นอกจากนี้ยังมีการข่มร่วม (codominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ Thawaro (2009) ทดสอบความเป็นลูกผสมของปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ (EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772) พบว่า มี 2 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอซัดเจนและสามารถตรวจสอบลูกผสมได้ โดยไพรเมอร์ EgCIR008 สามารถตรวจสอบลูกผสมเบอร์ 77 118 119 และ 137 ส่วนไพรเมอร์ EgCIR1772 สามารถตรวจสอบลูกผสมเบอร์ 58 และ 130 ได้ และเมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันในระยะรูปกลมและระยะพัฒนาการเป็นต้นกล้าด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์ ไม่พบความแปรปรวนของทุกคู่ผสม สกุลรัตน์ (2553) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3 ระยะ คือ แคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และต้นกล้า โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008 พบว่า ไม่พบความแปรปรวนของลูกผสมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้ง 3 ระยะ อังคณา (2551) ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในประชากรลูกผสม 6 คู่ โดยพิจารณาการกระจายตัวและความถี่ของอัลลีลของไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ (EgCIR0465 EgCIR0304 EgCIR0377 EgCIR0353 EgCIR1772 EgCIR0230 EgCIR0008) พบว่า EgCIR0008 เป็นไพร์เมอร์ที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุดโดยสามารถพิจารณาการกระจายตัวของคู่ผสมตัวเองเบอร์ 20 เบอร์ 17 และคู่ผสมข้ามเบอร์ 32 เบอร์ 62 เบอร์ 63

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการเตรียมชิ้นส่วนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการต่าง ๆ คือ preconditioning dehydration vitrification หรือ encapsulation เพียงวิธีการเดียวหรือร่วมกัน ก่อนนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เพื่อส่งเสริมอัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ภายหลังการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด
2. ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่ชักนำจากกลุ่มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

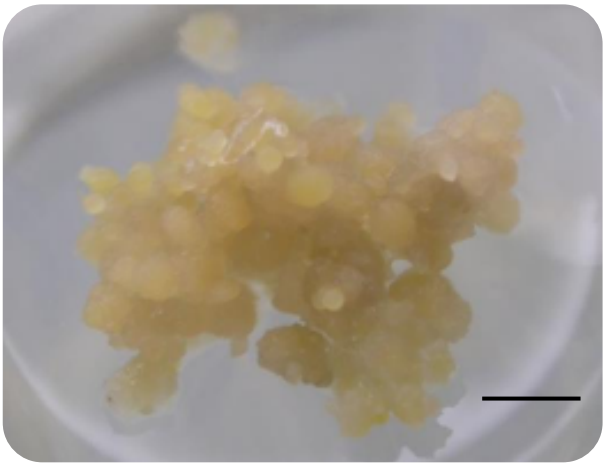
1. วัสดุพืช

1.1 การศึกษาการเตรียมชิ้นส่วนก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจน

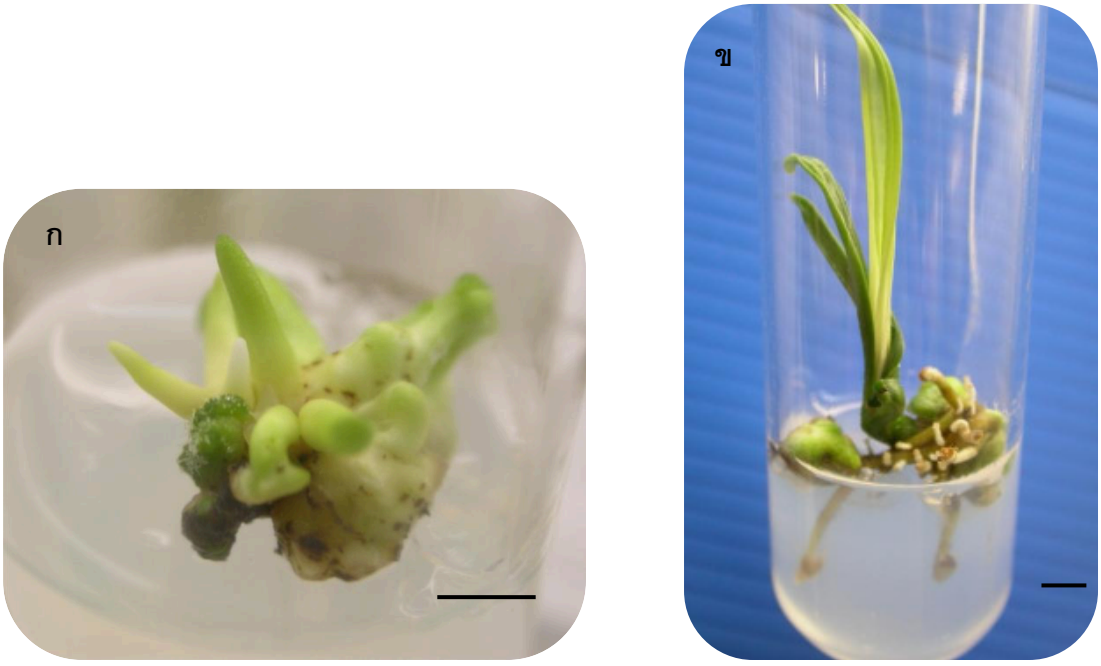
ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา (ภาพที่ 1) ที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีอายุ 10 ปี (จากสถานีวิจัยและฝึกภาคสนามเทพา อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา) บนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หรืออาหารสูตร ARDA (MS และ wood plant medium ที่ลดองค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง) เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ทั้งสองสูตรอาหารวางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส ทำการย้ายเลี้ยงทุก ๆ เดือน

1.2 การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ใช้ใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่พัฒนามาจากโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สอง (secondary somatic embryo: SSE) (ภาพที่ 2ก) ซึ่งพัฒนามาจากชิ้นส่วนที่รอดชีวิตหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษา วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ตามวิธีการที่รายงานโดย Te-chato และ Hilae (2007) เป็นเวลา 3 เดือน แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน SSE จึงงอกเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์



ภาพที่ 1 ลักษณะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1 เดือน (บาร์ = 5 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 2 โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สอง (ก) และลักษณะต้นปาล์มน้ำมัน (ข) ซึ่งวางเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 5 มิลลิเมตร)

2. วัสดุ สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS และ WPM (รายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 1 และ 2)
- น้ำตาลซูโครส และซอร์บิทอล
- กรดแอสคอร์บิค
- สารควบคุมการเจริญเติบโต คือ dicamba
- แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

2.2 สารเคมีป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง และการเก็บรักษา

- กลีเซอรอล
- เอทธีลีนไกลคอล
- DMSO
- แอลจิเนต
- ซิลิกาเจล
- ไนโตรเจนเหลว

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- Ethylenediaminetetraacetic acid
- Disodium ethylenediaminetetraacetic acid
- Sodiumdodisylsulpate
- Tris-HCl
- Ammonium acetate
- Isopropanol
- Ethanol

2.4 สารเคมีสำหรับใช้ทำอิเล็กโตรโฟรีซีส

Agarose gel electrophoresis

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

Denaturing polyacrylamine gel electrophoresis

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

2.5 สารเคมีที่ใช้สำหรับทำพีซีอาร์

- dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- Primer จากบริษัท Operon Tech. (California, USA) (รายละเอียดในตารางที่ 3 และ 4)

- 10X *Taq* buffer (Promega, USA)
- *Taq* DNA Polymerase (Promega, USA)

3 อุปกรณ์

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยง

- เครื่องแก้วประกอบด้วย ฟลาสก์ ปิเปต กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร จานเพาะเลี้ยง ขวดเพาะเลี้ยงและหลอดทดลอง
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ประกอบด้วยปากคีบ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด กระดาษชำระ พาราฟิล์ม
- ตู้ย้ายเลี้ยง ชั้นวางเลี้ยง
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- ตู้อบแห้งและอบฆ่าเชื้อ
- เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
- เครื่องกรองมิลลิพอร์ กระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาดช่อง 0.45 ไมโครเมตร
- เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ
- กล้องถ่ายรูปอิเล็คตรอน
- ไมโครปิเปต
- ตู้อบไมโครเวฟ

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืช

- ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
- cryotube ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
- cryocane
- อ่างควบคุมอุณหภูมิและเทอร์โมมิเตอร์
- desiccator (โถดูดความชื้นและตู้ดูดความชื้น)

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การทำอิเล็กโตรโฟรีซีส การทำอาร์เอพีดี และเอสเอสอาร์

- ตู้แช่แข็ง -20 และ -30 องศาเซลเซียส
- เครื่องไมโครเซ็นตริฟิวก์
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส
- เครื่องพีซีอาร์
- เครื่อง Verity Thermal Cycle (Verity 200-1)
- เครื่องเขย่า (vortex)
- โกร่งบดตัวอย่าง
- microtube
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- micropipet
- กระติกน้ำแข็ง

วิธีการศึกษา

1. การเก็บรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในไนโตรเจนเหลว

1.1 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการ preconditioning ด้วยน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปริมาณ 140-160 มิลลิกรัม (ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร) มาวางเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0.0874 (ชุดควบคุม) 0.10 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 โมลาร์ เป็นเวลา 1 3 5 7 และ 9 วัน ต่อจากนั้นแบ่งชิ้นส่วนจากแต่ละหลอดทดลองออกเป็นสองส่วนเพื่อ (1) ตรวจสอบการรอดชีวิตโดยดูการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ โดยการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (อาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ) (2) นำไปจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลวนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมา ละลายน้ำแข็งโดยนำชิ้นส่วนมาแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นวางเลี้ยงในอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ ดังนี้คือ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ} = \frac{\text{จำนวนหลอดทดลองที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ}}{\text{จำนวนหลอดทดลองทั้งหมด}} \times 100$$

เปรียบเทียบกันในแต่ละปัจจัย โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลใน Completely randomized design (CRD) มี 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส มี 6 ระดับ ระยะเวลาในการปรับสภาพมี 5 ระดับ และการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมี 2 ระดับ และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) แต่ละหน่วยการทดลองทำ 8 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

1.2 การเตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธี vitrification ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

1.2.1 ผลของชนิดของสารละลาย vitrification ต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ปริมาณ 140-160 มิลลิกรัม ที่วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มาแช่ในสารละลาย vitrification 4 ชนิด คือ

1. สารละลายดัดแปลง PVS2 ที่ปราศจากน้ำตาลซูโครส
2. สารละลาย PVS2 ประกอบด้วย กลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เอทธีลีนไกลคอลความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ DMSO ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.4 โมลาร์
3. สารละลาย PVS3 ประกอบด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์
4. สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.4 โมลาร์

โดยแต่ละสารละลายแช่เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาเทสารละลาย vitrification แต่ละชนิดทิ้ง แล้วเติมสารละลายใหม่ลงใน cryotube ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มีชิ้นส่วนบรรจุอยู่ ต่อจากนั้นแบ่งเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากแต่ละหลอดทดลองออกเป็นสองส่วน เพื่อ (1) ตรวจสอบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ โดยการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (2) นำไปจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลวนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมา ละลายน้ำแข็ง หลังจากนั้นเทสารละลาย vitrification ทิ้ง แล้วล้างออกด้วยสารละลายล้าง (rinsing solution) เป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง สารละลายล้างประกอบด้วยอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ หลังจากนั้นวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 2 เดือน แล้วตรวจสอบน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของสาร vitrification โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละหน่วยการทดลองทำ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

1.2.2 ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาและอุณหภูมิในการ vitrification ต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ปริมาณ 140-160 มิลลิกรัม มา preconditioning บน อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษาที่ 1.1 ก่อนนำไปแช่ในสารละลาย vitrification ที่ได้ผลดีที่สุดจากการศึกษาที่ 1.2.1 เป็นเวลาแตกต่างกันคือ 15 30 60 และ 90 นาที ที่อุณหภูมิ 2 ระดับคือ 0 และ 25 องศาเซลเซียส ต่อจากนั้นแบ่งเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากแต่ละหลอดทดลองออกเป็นสองส่วนเพื่อ (1) ตรวจสอบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (2) นำไปจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลวนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาละลายน้ำแข็ง หลังจากนั้นเทสารละลาย vitrification ทิ้ง แล้วล้างออกด้วยสารละลายล้าง เป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง หลังจากนั้นวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 2 เดือน แล้วตรวจสอบน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละปัจจัย โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล ใน CRD มี 3 ปัจจัย คือ ระยะเวลาในการจุ่มแช่ มี 4 ระดับ อุณหภูมิในการจุ่มแช่ 2 ระดับ และการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมี 2 ระดับ และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละหน่วยการทดลองทำ 6 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

1.3 การเตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธี encapsulation ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

1.3.1 ผลของความเข้มข้นของวุ้นแอลจิเนตต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

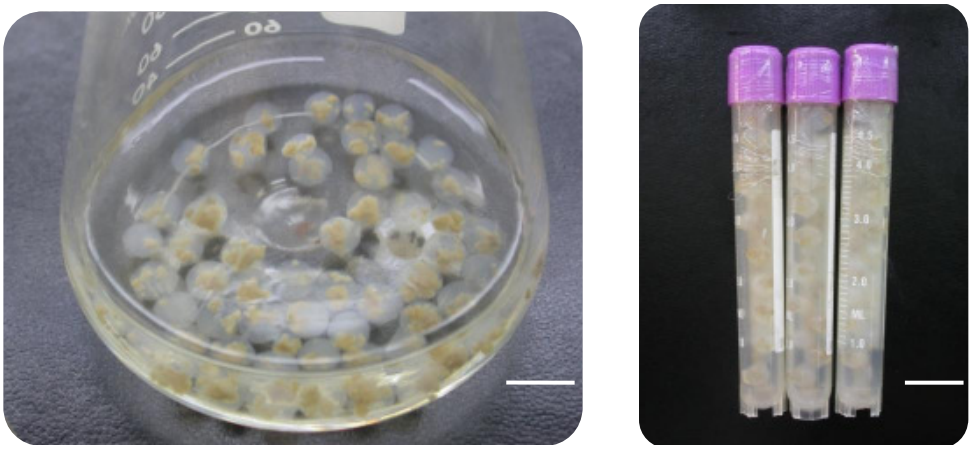
นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ปริมาณ 140-160 มิลลิกรัม (ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร) มาหุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนต 4 ระดับความเข้มข้น คือ 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจาก $CaCl_2$ เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อจากนั้น นำปิเปตปลายตัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และหยดใน

สารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที เพื่อให้มีการสร้างเป็นเม็ดบีดที่สมบูรณ์ แล้วซับด้วยกระดาษชำระ ต่อจากนั้นแบ่งเม็ดบีดจากแต่ละชุดการทดลองออกเป็นสองส่วนเพื่อ (1) ตรวจสอบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ โดยการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (2) นำไปจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลวนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำมาละลายน้ำแข็ง ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้ววางเลี้ยงในอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของวุ้นแอลจิเนต โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละหน่วยการทดลองทำ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 3 หลอด หลอดละ 8 เม็ดบีด

1.3.2 ผลของการ preconditioning encapsulation และระยะเวลาการแช่ในสารละลาย loading ต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ปริมาณ 140-160 มิลลิกรัม ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มา preconditioning บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษาที่ 1.1 ก่อนนำไปหุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนตที่ความเข้มข้นที่ดีที่สุดของการศึกษาที่ 1.3.1 ในอาหารสูตร MS ปราศจาก $CaCl_2$ เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อจากนั้น นำปิเปตปลายตัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดชิ้นส่วน และหยดในสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที หลังจากนั้นแช่ใน loading solution (LS) ประกอบด้วยอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ (ภาพที่ 3ก) โดยวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0 0.5 1 2 3 และ 4 วัน หลังจากนั้นแบ่งเม็ดบีดจากแต่ละชุดการทดลองออกเป็นสองส่วนเพื่อ (1) ตรวจสอบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (2) นำไปใส่ในหลอด cryotube ขนาด 5 มิลลิลิตร (ภาพที่ 3ข) แล้วจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลวนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำมาละลายน้ำแข็งในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้ววางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกัน

ในแต่ละระยะเวลา โดยการวางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละระยะเวลาทำ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ขวดละ 24 เม็ดบีด



ภาพที่ 3 ลักษณะของเม็ดบีดที่ประกอบด้วยวุ้นแอลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ห่อหุ้มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และแช่ในสารละลาย LS (ก) และเม็ดบีดที่บรรจุในหลอด cryotube ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว (ข) (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

1.3.3 ผลของการ preconditioning encapsulation และระยะเวลาในการ dehydration ต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ปริมาณ 140-160 มิลลิกรัม ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มา preconditioning บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษาที่ 1.1 ก่อนนำไปหุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนตที่ความเข้มข้นที่ดีที่สุดของการศึกษาที่ 1.3.1 ในอาหารสูตร MS ปราศจาก $CaCl_2$ เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อจากนั้น นำปิเปตปลายตัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดชิ้นส่วน และหยดในสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที ซับด้วยกระดาษชำระที่นึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำมา dehydration ในตู้ย้ายเลี้ยงที่เปิดลมด้วยความเร็ว 90 ฟุตต่อนาที เป็นเวลา 0-10 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจสอบปริมาณน้ำในเม็ดบีด (water content) (เปอร์เซ็นต์) หลังจากนั้นแบ่งเม็ด

บีดจากแต่ละชุดการทดลองออกเป็นสองส่วนเพื่อ (1) ตรวจสอบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (2) นำไปจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลวนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำมาละลายน้ำแข็งในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้ววางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละระยะเวลา โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละระยะเวลาทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ขวดละ 24 เม็ดบีด

การหาค่า water content ทำได้โดยนำเม็ดบีดมาอบแห้งในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสามารถคำนวณได้ดังนี้ คือ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำในเม็ดบีด} = \frac{\text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักสด}} \times 100$$

1.4 การเตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธี dehydration ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

1.4.1 ผลของระยะเวลาและวิธีการ dehydration ต่อปริมาณน้ำในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ปริมาณ 140-160 มิลลิกรัม ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มาปรับปริมาณน้ำในตู้ย้ายเลี้ยงที่เปิดลมด้วยความเร็ว 90 ฟุตต่อนาที เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง หรือ dehydration ด้วยซิลิกาเจลที่วางในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 6-36 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจสอบปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อพืช (water content) (เปอร์เซ็นต์) ต่อจากนั้นแบ่งเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากแต่ละหลอดการทดลองออกเป็นสองส่วนเพื่อ (1) ตรวจสอบการเกิด โซมาติกเอ็มบริโอ (2) นำไปจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน อย่างน้อย 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาละลายน้ำแข็ง หลังจากการวางเลี้ยงในอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 1 เดือน แล้วตรวจสอบน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละระยะเวลาและชนิดของการ dehydration โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละระยะเวลาทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 หลอด

ปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อพืช ทำได้โดยนำเนื้อเยื่อมาอบแห้งตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสามารถคำนวณได้ดังนี้ คือ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อพืช} = \frac{\text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักสด}} \times 100$$

1.4.2 ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาของการ dehydration ต่อปริมาณน้ำในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (ที่วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาณ 70-80 มิลลิกรัม มา preconditioning บน อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษาที่ 1.1 หลังจากนั้นปรับปริมาณน้ำในตู้ย้ายเลี้ยงที่เปิดลมด้วยความเร็ว 90 ฟุตต่อนาที เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง หรือ dehydration ด้วยซิลิกาเจลปริมาณ 80 กรัม ที่วางในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 6-36 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจสอบปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อพืช (เปอร์เซ็นต์) หลังจากนั้นนำไปจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลวนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาละลายน้ำแข็งในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที หลังจากการวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 1 เดือน แล้วตรวจสอบน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละระยะเวลาและชนิดของการ dehydration โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละระยะเวลาทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 หลอด

1.4.3 ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาในการ dehydration ใน dessiccator และสภาพการวางเลี้ยงต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร ARDA เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณ 300 มิลลิกรัม มา preconditioning บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน และ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 4 วัน ก่อนนำไป dehydration ใน desiccator ที่บรรจุซิลิกาเจลปริมาณ 160 กรัมเป็นเวลา 3-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจสอบ water content (เปอร์เซ็นต์) หลังจากนั้นนำไปจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน อย่างน้อย 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาละลายน้ำแข็ง โดยนำชิ้นส่วนมาแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที หลังจากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร ARDA เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงใน 2 สภาพคือ (1) ที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนย้ายไปที่มีแสงอีก 6 สัปดาห์ (2) ที่มีแสง 8 สัปดาห์ แล้วตรวจสอบน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จำนวน โซมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละระยะเวลา โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละระยะเวลาทำ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

2. การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการต่าง ๆ และต้นที่ไม่มีการเก็บรักษา โดยประยุกต์วิธีการของ Te-chato (2000) นำชิ้นส่วนใบปริมาณ 200 มิลลิกรัม ตัดใส่ในโกร่ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 0.1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร เติมโซเดียมโดดิซิลซัลเฟตความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมแอมโมเนียมอะซิเตตความเข้นข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 110 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสมาใส่ใน microtube หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ เมื่อเห็นสายดีเอ็นเอแล้ววางไว้หรือนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ถึง 1 นาที หรือนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทไอโซโพรพานอลทิ้ง ล้างด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง เทเอธานอลทิ้ง แล้วผึ่งให้แห้งข้ามคืน หลังจากนั้น

ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2.2 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็กโตรโฟริซิสบนอะกาโรส (LE Agarose, Promega, USA) ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ใช้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Glacial acetic acid, Na_2EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 15-20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5-10 นาที แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตความยาวคลื่นแสงที่ 260 นาโนเมตร บันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)

2.3 การตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

ในการศึกษานี้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและไพรเมอร์ที่รายงานโดยสายชล (2547) ว่าให้ polymorphism สูงคือ ไพรเมอร์ OPB08 OPR11 OPT19 OPT06 OPAB01 OPAB09 และ OPAB14 เป็นต้น รายละเอียดของแต่ละไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3 การทำพีซีอาร์ จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTP) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* polymerase 0.9 ยูนิต ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 17.25 ไมโครลิตร และตั้งอุณหภูมิเครื่องพีซีอาร์ดังนี้ คือ

1. Denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
2. Annealing ซึ่งในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
3. Extention ขั้นตอนการเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 1-3 ทำซ้ำทั้งสิ้น 35 รอบ
5. Final-extention ใช้อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 35 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เวลา 7 นาทีอีก 1 รอบ

นำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกขนาดดีเอ็นเอ โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TBE บัฟเฟอร์ (Tris Base ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ Boric acid ความเข้มข้น 0.45 โมลาร์ และ Na_2EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0) นาน 40 นาที นำไปย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 15-20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5-10 นาที แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตความยาวคลื่นแสงที่ 260 นาโนเมตร บันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกันระหว่างต้นกล้าที่ได้จากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวกับที่ไม่เก็บรักษาเพื่อตรวจสอบว่าต้นกล้าที่ได้ตรงตามพันธุ์หรือไม่

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

Primers	Base sequence 5'→3'
OPAB01	CCGTCGGTAG
OPAB09	GGGCGACTAC
OPAB14	AAGTGCGACC
OPB08	GTCCACACGG
OPR11	GTAGCCGTCT
OPT06	CAAGGGCAGA
OPT19	GTCCGTATGG

ที่มา: สายชล (2547)

2.4 การตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์

ทดสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับทำเอสเอสอาร์ในปาล์มน้ำมัน ตามวิธีการของ Thawaro (2009) และ สกุลรัตน์ (2553) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ 8 คู่ คือ EgCIR0008 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 รายละเอียดของแต่ละไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 4 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องพีซีอาร์ จากปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ปริมาตร 1.8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* polymerase 0.9 ยูนิต ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 4.1 ไมโครเมตร และตั้งอุณหภูมิเครื่องพีซีอาร์ ดังนี้คือ

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

หลังเพิ่มปริมาณ นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยจะต้องทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพก่อน เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาในการเสียสภาพธรรมชาติเมื่ออยู่ในเวลาต่างกันในเจล โดยผสมกับฟอร์มาไมด์ 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบใน loading บัฟเฟอร์ก่อนนำไปเพิ่มอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นแช่น้ำแข็งทันที ก่อนนำมาแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยการทำอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิสที่มีความเข้มข้นของเจล 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท โดยนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย fixative (acetic acid ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) นาน 20 นาที เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลานำไปล้างในน้ำกลั่น นาน 20 นาที แล้วเปลี่ยนน้ำล้างใหม่เป็นเวลาต่ออีก 10 นาที ก่อนนำไปย้อมในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นเจลจุ่มน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว เพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออก แล้วนำแผ่นเจลใส่ในสารละลาย developer ประกอบด้วยโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไทโอซัลเฟท

ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเขย่าไปมาเบา ๆ จนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน และหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในสารละลาย acetic acid นาน 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลล้างน้ำกลั่นอีก 10 นาที หลังจากนั้นผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง บันทึกภาพเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ได้จากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและที่ไม่เก็บรักษามาตรวจสอบว่าต้นกล้าที่ได้ตรงตามพันธุ์หรือไม่

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์เอสเอสอาร์ ที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

Primer name	Repeat motif	5'-3' Forward primer	5'-3' Reverse primer
EgCIR0008	$(GA)_{17}$	CGGAAAGAGGGAAGATG	ACCTTGATGATTGATGTGA
EgCIR0337	$(GT)_{6}$	GTCTGCTAAAACATCAACTG	GAGGAGGAGGGGAACGATAA
	$(GC)_{4}$		
EgCIR0409	$(CCG)_{6}$	AGGGAATTGGAAGAAAAGAAAG	TCCTGAGCTGGGGTGGTC
EgCIR0446	$(CCG)_{7}$	CCCCTTCGAATCCACTAT	CAAATCCGACAAATCAAC
EgCIR0465	$(CCG)_{6}$	TCCCCCACGACCCATTC	GGCAGGAGAGGCAGCATTC
EgCIR0781	$(GA)_{17}$	CCCCTCCCTACCACGTTCCA	TGTTTGCTGTTGCTCTTTGATTTTC
EgCIR0905	$(GT)_{14}$	CACCACATGAAGCAAGCAGT	CCTACCACAACCCCAGTCTC
	$(GA)_{11}$		
EgCIR1772	$(GT)_{22}$	CTTCCATTGTCTCATTATTCTCTTA	ACCTTGTATTAGTTTGTCCA

ที่มา : Thawaro (2009)

บทที่ 3

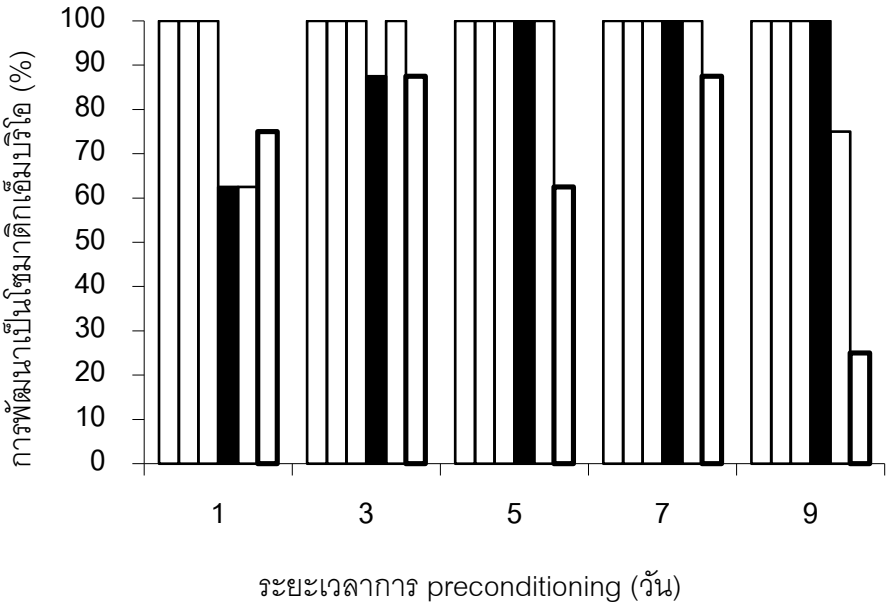
ผล

1. การเก็บรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในไนโตรเจนเหลว

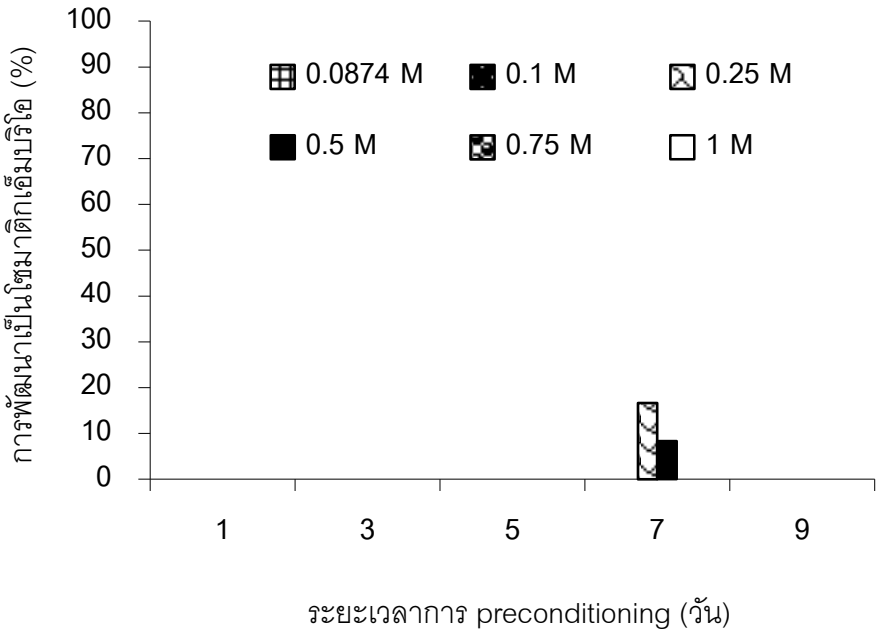
1.1 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการ preconditioning ด้วยน้ำตาลซูโครส ก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลว

การปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า การเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและระยะเวลาในการปรับสภาพส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอลดลง (ภาพที่ 4ก ภาพที่ 5ก-ฉ) อย่างไรก็ตามเมื่อปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส บนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.0874 โมลาร์ เป็นเวลา 9 วัน ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุดคือ 497.5 มิลลิกรัม และ 13.4 เอ็มบริโอต่อแคลลัส ตามลำดับ (ตารางที่ 5, 6) แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับระยะเวลาและระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ในกรณีที่มีการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า การปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ หรือ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ช่วยให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถรอดชีวิตและให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 16.67 และ 8.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4ข) การปรับสภาพบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 81.2 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 0.25 เอ็มบริโอต่อแคลลัส (ภาพที่ 6)

ก



ข



ภาพที่ 4 ผลของระยะเวลาและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในการ preconditioning ของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 4 สัปดาห์
ก. ไม่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ข. เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ตารางที่ 5 ผลของระยะเวลาและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในการ preconditioning ของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อน้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (มิลลิกรัม) หลังจากการวางเลี้ยงบนอาหารซักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น (โมลาร์)	ระยะเวลาการ preconditioning (วัน)										ค่าเฉลี่ย[3] ความเข้มข้น
	1		3		5		7		9		
	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	
0.0874	346.5defgh	70.0q	365.0cdefg	71.4q	360.0cdefg	72.5q	387.5cde	83.8q	497.50a	92.5q	234.64A
0.1	397.5cd	72.5q	307.4ghij	72.5q	462.5ab	76.2q	351.2defgh	72.7q	388.8cde	92.5q	229.38A
0.25	381.2cdef	68.8q	415.0bc	72.5q	411.2bc	87.5q	332.5efghi	81.2q	360.0cdefg	97.3q	230.73A
0.5	323.8fghij	74.4q	411.2bc	71.2q	298.8hijk	75.0q	275.0jkl	72.5q	286.2ijkl	71.9q	196.00B
0.75	272.5jkl	70.6q	272.5jkl	71.9q	205.0mnop	75.0q	235.0lmno	66.2q	260.0klm	73.8q	160.25C
1.0	240.0lmn	75.0q	210.0mnop	68.8q	180.0op	70.0q	190.0nop	65.0q	156.2p	73.1q	132.81D
ค่าเฉลี่ย[1] ระยะเวลา	199.38AB		200.71A		197.81AB		184.39B		204.15A		**
ค่าเฉลี่ย[2] LN	319.33A						75.23B				

C.V. (%) = 25.51

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

[1 2 3] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรตัวพิมพ์ใหญ่) และปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 6 ผลของระยะเวลาและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในการ preconditioning ของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อจำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอ (เอ็มบริโอต่อแคลลัส) หลังจากการวางเลี้ยงบนอาหารซักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

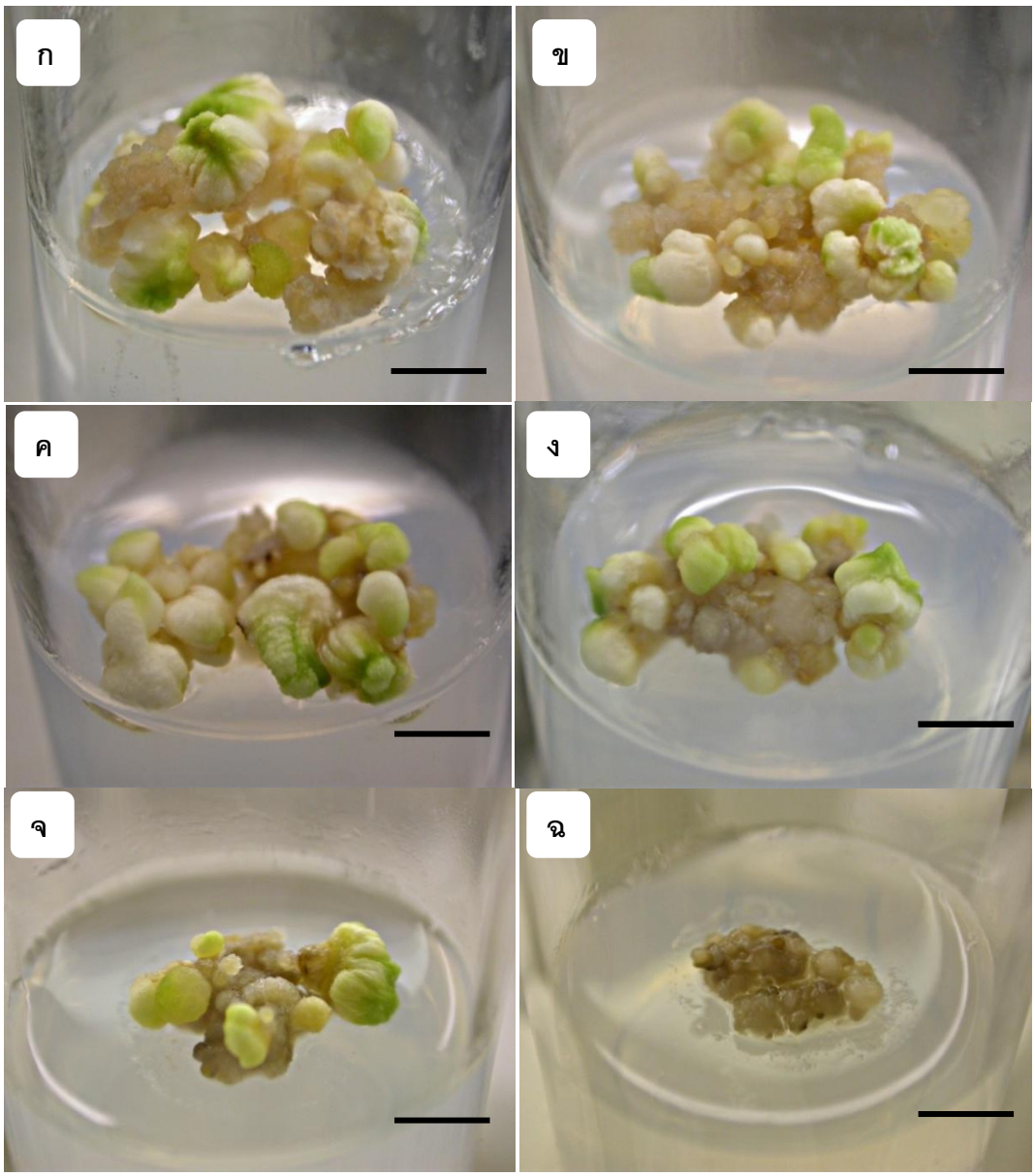
ความเข้มข้น (โมลาร์)	ระยะเวลาการ preconditioning (วัน)										ค่าเฉลี่ย[3] ความเข้มข้น
	1		3		5		7		9		
	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	
0.0874	2.38 jkl	0 l	5.25 efghi	0 l	5.50 defghi	0 l	11.60 ab	0 l	13.40 a	0 l	3.81 AB
0.1	4.25 ghijk	0 l	6.13 defg	0 l	6.38 defg	0 l	13.10 a	0 l	9.38 bc	0 l	3.93 AB
0.25	5.25 efghi	0 l	7.25 cdef	0 l	8.25 cd	0 l	9.75 bc	0.25 l	9.88 bc	0 l	4.06 A
0.5	2.75 ijkl	0 l	8.00 cd	0 l	5.63 defgh	0 l	8.25 cd	0.13 l	7.75 cde	0 l	3.25 B
0.75	2.13 jkl	0 l	4.88 fghij	0 l	4.88 fghij	0 l	6.00 defg	0 l	3.63 ghijk	0 l	2.15 C
1.0	2.38 jkl	0 l	2.25 jkl	0 l	1.63 kl	0 l	2.88 hijkl	0 l	0.25 l	0 l	0.94 D
ค่าเฉลี่ย[1] ระยะเวลา	1.59 C		2.81 B		2.69 B		4.33 A		3.69 A		**
ค่าเฉลี่ย[2] LN	6.03 A						0.012 B				

C.V. (%) = 79.11

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

[1 2 3] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

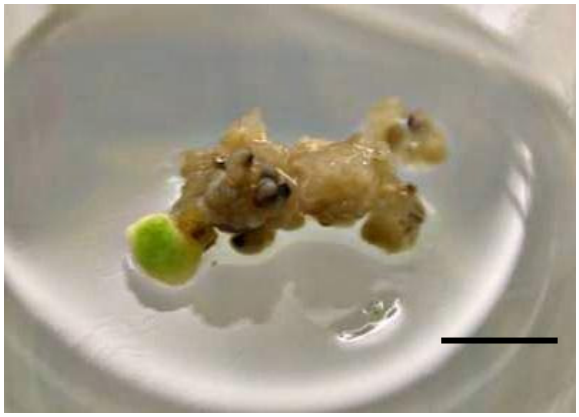
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 5 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากปรับสภาพบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 9 วัน และวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (บาร์ = 5 มิลลิเมตร)

ก. 0.0874 โมลาร์ ข. 0.10 โมลาร์ ค. 0.25 โมลาร์

ง. 0.50 โมลาร์ จ. 0.75 โมลาร์ ฉ. 1.00 โมลาร์



ภาพที่ 6 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากปรับสภาพบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 5 มิลลิเมตร)

1.2 การเตรียมชิ้นส่วนก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธี vitrification

1.2.1 ผลของชนิดของสารละลาย vitrification ต่อการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ

การนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาแช่ในสารละลาย vitrification ที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่า การนำชิ้นส่วนมาแช่ในสารละลาย vitrification ซึ่งประกอบไปด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ DMSO ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และเอทธีลีนไกลคอลความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ให้เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอสูง 100 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสดเฉลี่ย 304 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 11.6 เอ็มบริโอต่อแคลลัส แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการแช่ในสารละลาย vitrification ชนิดอื่น ๆ (ตารางที่ 7) อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านขั้นตอนการจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลว ในทุก ๆ ชุดการทดลอง เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ (ไม่แสดงข้อมูล)

ตารางที่ 7 ผลของสารละลาย vitrification ต่อน้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 2 เดือน

ชนิดของสารละลาย vitrification	น้ำหนักสดเฉลี่ย (มิลลิกรัม)	จำนวนเอ็มบริโอต่อแคลลัส	SE formation (%)
Control	318.45a	6.53b	100.00
30% glycerol+15% DMSO+15% EG	303.80a	11.60a	100.00
30% glycerol+15% DMSO+15% EG +0.4M Sucrose	83.13b	0.23c	23.34
50% Sucrose+50% Glycerol	81.73b	0.05c	5.00
5% DMSO+0.4 M Sucrose	60.25b	0.10c	10.00
F-test	**	**	
C.V. (%)	17.13	22.92	

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

1.2.2 ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาและอุณหภูมิในการ vitrification ต่อการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

การนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาปรับสภาพบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปแช่ในสารละลาย vitrification ซึ่งประกอบด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ DMSO ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และเอทธีลีนไกลคอลความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน (15-90 นาที) และอุณหภูมิ 2 ระดับ คือ 0 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่า การแช่ในสารละลาย vitrification ที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้นส่งผลให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอของชิ้นส่วนหลังจากการวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอลดลง โดยการแช่ที่อุณหภูมิเย็น 0 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอน้อยกว่าอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 7ก) การแช่ในสารละลาย vitrification ที่อุณหภูมิ 25

องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 706.3 มิลลิกรัม แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 12 เอ็มบริโอต่อแคลลัส ไม่แตกต่างทางสถิติกับการแช่ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 8 และ 9 ภาพที่ 8ก)

ตารางที่ 8 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการแช่สารละลาย vitrification ก่อนและหลังเก็บรักษาไนโตรเจนเหลวต่อน้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

เวลาในการแช่สารละลาย vitrification (นาที)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (มิลลิกรัม)				ค่าเฉลี่ย [3] ระยะเวลา
	-LN		+LN		
	อุณหภูมิในการแช่สารละลาย vitrification				
	0ºC	25ºC	0ºC	25ºC	
15	475.00 b	706.33 a	69.50 e	72.33 e	330.79A
30	247.83 cd	460.67 b	72.83 e	74.33 e	213.92B
60	223.17 cd	324.33 c	177.50 de	71.17 e	199.04B
90	87.83 e	175.00 de	75.67 e	78.17 e	104.17C
ค่าเฉลี่ย [1] อุณหภูมิ	178.67B		245.29A		ns
ค่าเฉลี่ย [2] การเก็บรักษา	337.52A		86.44B		

C.V. (%) = 43.21

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

[1, 2, 3] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวนอนและแนวตั้ง (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ในกรณีของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า การแช่ในสารละลาย vitrification ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ เท่ากับ 66.67 (ภาพที่ 7ข) น้ำหนักสดเฉลี่ย 177.5 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 2.33 เอ็มบริโอต่อแคลลัส (ตารางที่ 8 และ 9 ภาพที่ 8ข) ในขณะที่การแช่ที่ระยะเวลาอื่น ๆ ชิ้นส่วนไม่สามารถรอดชีวิตและพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ ซึ่งลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจะมีสีน้ำตาลอ่อนและขาวซีด และเมื่อวางเลี้ยงต่อไปบนอาหารสูตรชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ (เป็นระยะเวลา 3 เดือน) ชิ้นส่วนไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ (ภาพที่ 8ค)

ตารางที่ 9 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการแช่สารละลาย vitrification ก่อนและหลังเก็บรักษาไนโตรเจนเหลวต่อจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

เวลาในการแช่สารละลาย vitrification (นาที)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ				ค่าเฉลี่ย [3] ระยะเวลา
	-LN		+LN		
	อุณหภูมิในการแช่สารละลาย vitrification				
	0ºC	25ºC	0ºC	25ºC	
15	12.83 a	12 a	0 e	0e	6.21A
30	6.50 bc	7.33b	0 e	0e	3.46B
60	3.67 cd	3 de	2.33 de	0e	2.25B
90	0.83 de	1 de	0 e	0e	0.46C
ค่าเฉลี่ย [1] อุณหภูมิ	3.27		2.92		ns
ค่าเฉลี่ย [2] การเก็บรักษา	5.89A		0.29B		

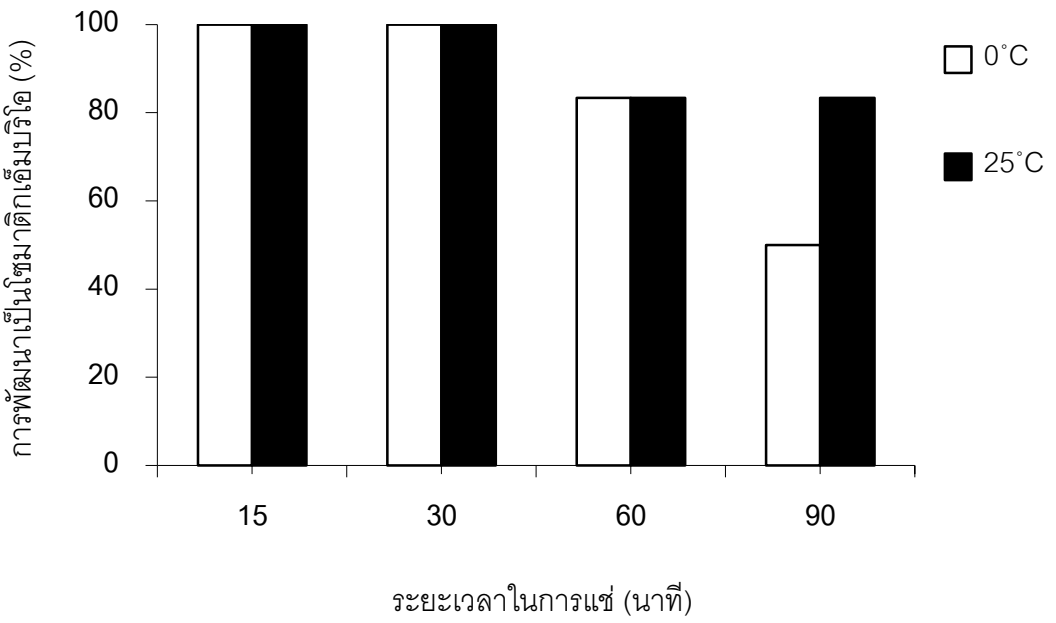
C.V. (%) = 80.69

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

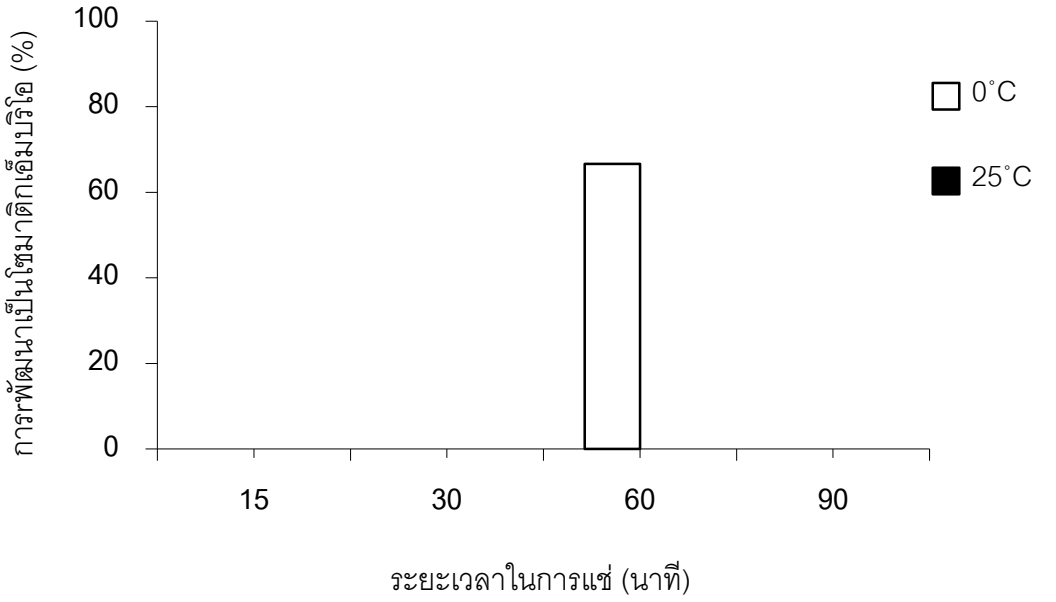
[1, 2, 3] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวนอนและแนวตั้ง (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ก

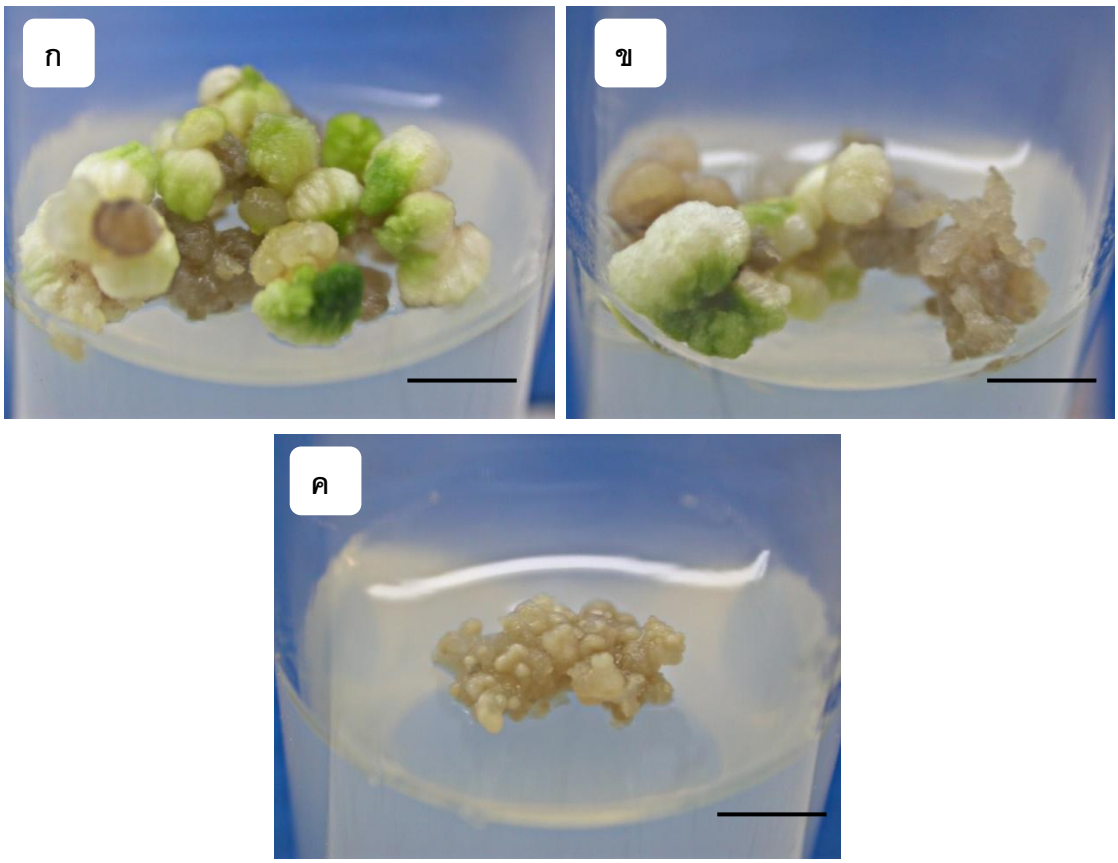


ข



ภาพที่ 7 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการแช่สารละลาย vitrification ก่อนเก็บรักษาไนโตรเจนเหลวต่อเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ ที่วางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 2 เดือน

ก. ไม่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ข. เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 8 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ปรับสภาพบนอาหารเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ร่วมกับการแช่ในสารละลาย vitrification แล้ววางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 2 เดือน (บาร์ = 5 มิลลิเมตร)

ก. แช่ในสารละลาย vitrification ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข. แช่ในสารละลาย vitrification ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ค. แช่ในสารละลาย vitrification ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

1.3 การเตรียมเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโดยใช้วิธี encapsulation ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

1.3.1 ผลของความเข้มข้นของวุ้นแอลจิเนตต่อการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

การหุ้มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยวุ้นแอลจิเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นชิ้นส่วนสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการหุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนตความเข้มข้นของ 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์จะให้เม็ดบีดกลมสวย (ภาพที่ 9ก-ง) โดยความเข้มข้นของวุ้นแอลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุด 4.5 เอ็มบริโอต่อหลอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับระดับความเข้มข้นอื่น ๆ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ (ภาพที่ 9จ)

ตารางที่ 10 ผลของความเข้มข้นของวุ้นแอลจิเนตต่อการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

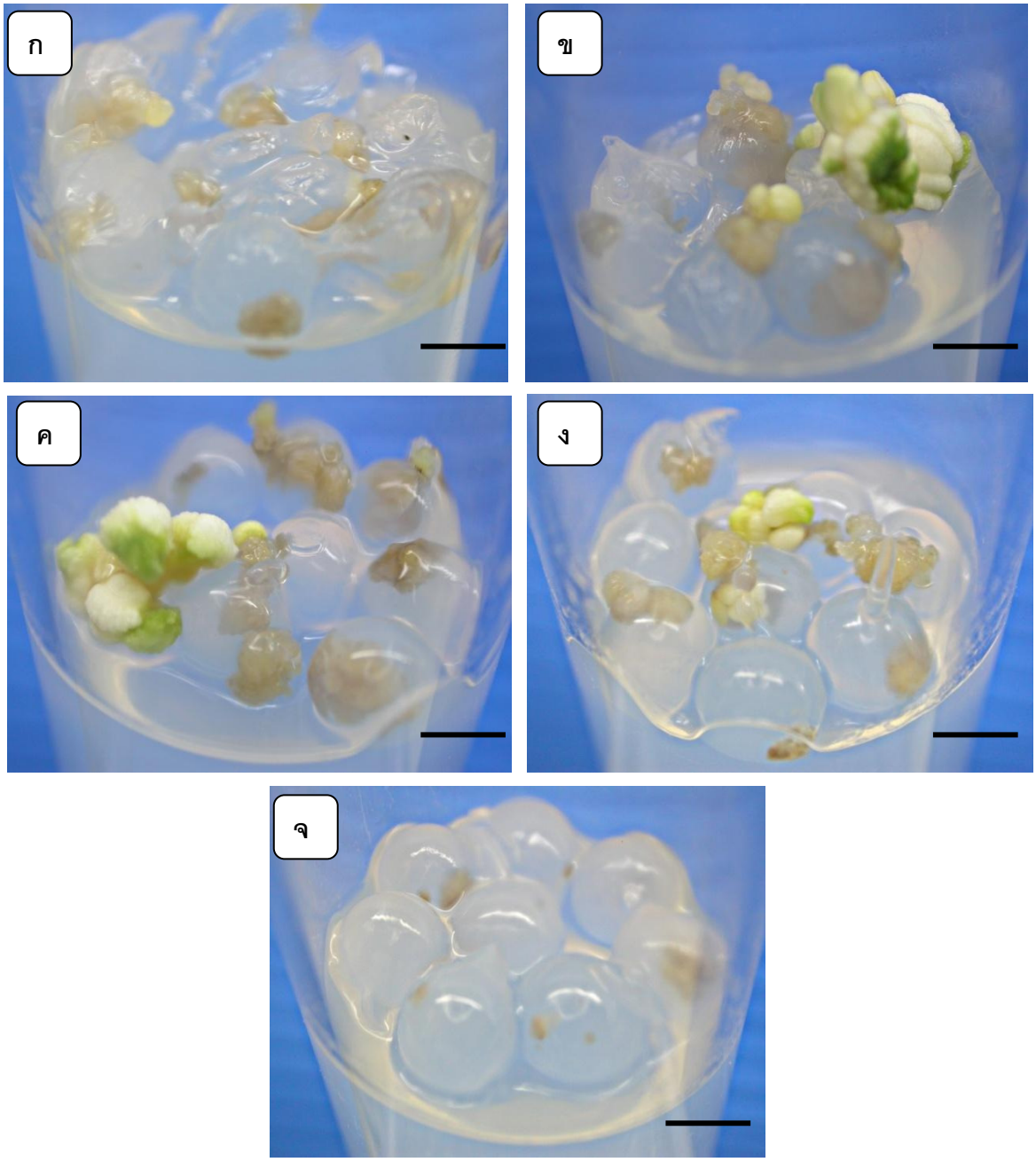
ความเข้มข้นของวุ้นแอลจิเนต (%)	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (%)		จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (เอ็มบริโอต่อหลอด)	
	-LN	+LN	-LN	+LN
1	100	0	1.0 c	0
2	100	0	3.5 b	0
3	100	0	4.5 a	0
4	100	0	3.3 b	0
F-test			**	

C.V. (%) = 23.31

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

- LN: ไม่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว +LN: เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 9 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในเม็ดบีดซึ่งเติมวุ้นแอลจิเนตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 5 มิลลิเมตร)

ก. 1 เปอร์เซ็นต์ ข. 2 เปอร์เซ็นต์ ค. 3 เปอร์เซ็นต์

ง. 4 เปอร์เซ็นต์ จ. หุ้มด้วยวุ้น 3 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

1.3.2 ผลของการ preconditioning encapsulation และระยะเวลาการแช่ในสารละลาย loading ต่อการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

การ preconditioning เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปหุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย LS เป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า การแช่เป็นระยะเวลาที่นานขึ้นส่งเสริมให้พัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 100 เปอร์เซ็นต์ และการแช่เป็นเวลา 3 วัน ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุด 5.4 เอ็มบริโอต่อขวด (ตารางที่ 11) อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านขั้นตอนการแช่ในไนโตรเจนเหลวทุกชุดการทดลองไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้

ตารางที่ 11 ผลของระยะเวลาการแช่ในสารละลาย loading หลังจาก preconditioning และ encapsulation ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ระยะเวลาการใน LS (วัน)	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (%)		จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (เอ็มบริโอต่อขวด)	
	-LN	+LN	-LN	+LN
0	70	0	1.5 c	0
0.5	100	0	2.7 bc	0
1	100	0	3.4 b	0
2	100	0	3.8 b	0
3	100	0	5.4 a	0
4	100	0	2.7 bc	0
F-test			**	

C.V. (%) = 41.79

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

- LN: ไม่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว +LN: เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

1.3.3 ผลของการ preconditioning encapsulation และระยะเวลาในการ dehydration ต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

การ preconditioning เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปห้มด้วยวุ้นแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไป dehydration ในตู้ย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 0-10 ชั่วโมง พบว่า การเพิ่มระยะเวลาในการ dehydration ส่งเสริมให้เกิดจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอมากขึ้น ซึ่งการ dehydration เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (ปริมาณน้ำในเม็ดบีดเท่ากับ 34.5 เปอร์เซ็นต์) ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 8.2 เอ็มบริโอต่อขวด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับระยะเวลาอื่น ๆ อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านขั้นตอนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวทุกระยะเวลาไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ (ตารางที่ 12 ภาพที่ 10)

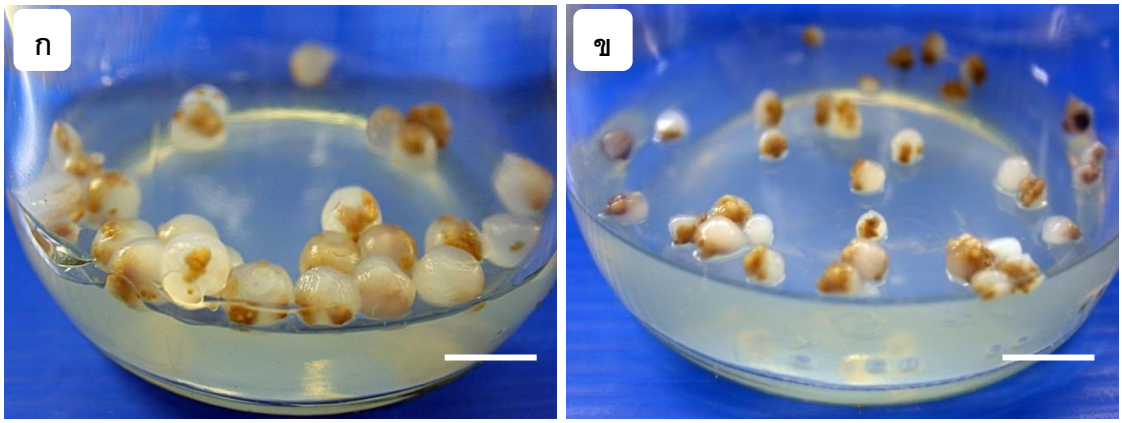
ตารางที่ 12 ผลของระยะเวลาในการ dehydration หลังจาก preconditioning และ encapsulation ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ระยะเวลาการ dehydration (ชั่วโมง)	Water content (%)	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (%)		จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (เอ็มบริโอต่อขวด)	
		-LN	+LN	-LN	+LN
0	93.91	100	0	2.3 c	0
2	91.69	100	0	3.8 bc	0
4	86.66	100	0	4.8 bc	0
6	83.17	100	0	5.0 bc	0
8	60.50	100	0	5.3 b	0
10	34.53	100	0	8.2 a	0
F-test				**	

C.V. (%) = 37.06 ** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

- LN: ไม่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว +LN: เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 10 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในเม็ดบีดที่ไม่ปรับปริมาณน้ำ (ก) และปรับด้วย laminar flow เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (ข) ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

1.4 การเตรียมชิ้นส่วนก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธี dehydration

1.4.1 ผลของระยะเวลาและวิธีการ dehydration ต่อปริมาณน้ำในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

การนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมา dehydration ด้วย 2 วิธี และเป็นเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า การ dehydration เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยการผึ่งลมในตู้ laminar flow เป็นเวลานานขึ้นส่งผลให้มีการสูญเสียความชื้นเพิ่มขึ้น โดยอยู่ในช่วง 86.25-41.46 เปอร์เซ็นต์ และการ dehydration ในโถดูดความชื้นที่บรรจุซิลิกาเจลเป็นเวลา 6-36 ชั่วโมง เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีความชื้นอยู่ในช่วง 90.44-55.83 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้การ dehydration ด้วยซิลิกาเจลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 550.89 มิลลิกรัม ส่วนการผึ่งลมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 8.33 เอ็มบริโอต่อแคลลัส (ตารางที่ 13) อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านขั้นตอนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ไม่พบอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วน นอกจากนี้ยังพบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ (ไม่แสดงข้อมูล)

ตารางที่ 13 ผลของระยะเวลาและวิธีการ dehydration ต่อปริมาณน้ำในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ชนิดของการ dehydration	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	Dehydration-LN		
		Water content (%)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (มิลลิกรัม)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (เอ็มบริโอต่อแคลลัส)
Laminar flow	1	86.25	443.33^{bcd}	3.11^{bc}
	2	83.38	438.89^{bcde}	2.44^{bc}
	3	70.03	392.56^{de}	4.22^{bc}
	4	61.58	361.56^{e}	8.33^{a}
	5	41.46	364.11^{e}	5.31^{b}
ซิลิกาเจล	6	90.44	456.33b^{cde}	2.00^{c}
	12	84.35	413.94^{bcde}	2.22^{c}
	18	79.19	508.00^{ab}	2.39^{bc}
	24	74.04	550.89^{a}	1.72^{c}
	30	64.93	488.39^{abc}	3.56^{bc}
	36	55.83	431.33^{bcde}	3.56^{bc}
F-test			**	**
C.V. (%)			9.24	37.31

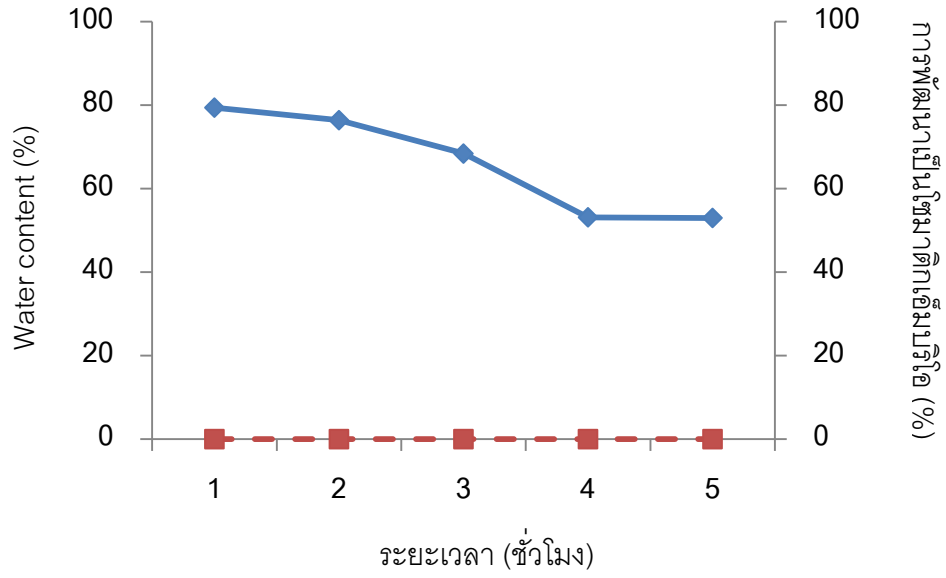
** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

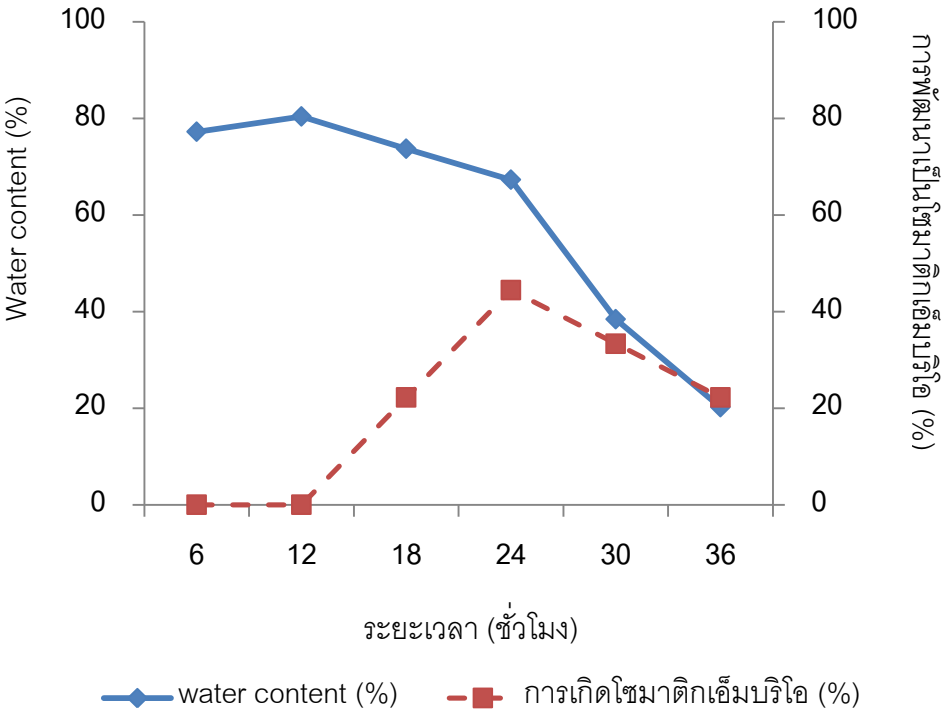
1.4.2 ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาของการ dehydration ต่อปริมาณน้ำในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

การปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารที่เติมซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไป dehydration ด้วย laminar flow หรือโถดูดความชื้นที่บรรจุซิลิกาเจล เป็นเวลาที่แตกต่างกัน ก่อนที่จะเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า การ dehydration ด้วย laminar flow ทำให้ชิ้นส่วนไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ (ภาพที่ 11ก) ในขณะที่การ dehydration ด้วยซิลิกาเจลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีความชื้นลดลงเหลือ 67.31 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุด 44.44 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 36 ชั่วโมง ส่งผลให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอลดลง แต่ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุด 84.56 มิลลิกรัม และ 1.67 เอ็มบริโอต่อแคลลัส ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 14 ภาพที่ 11 ก)

ก



ข



ภาพที่ 11 ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาของการ dehydration ด้วย laminar flow (ก) และซิลิกาเจล (ข) ต่อปริมาณน้ำในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ตารางที่ 14 ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาของการ dehydration ต่อปริมาณน้ำในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในการแช่ในไนโตรเจนเหลว หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ชนิดของการ dehydration	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	Preconditoning+Dehydration+LN	
		น้ำหนักสดเฉลี่ย (มิลลิกรัม)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (เอ็มบริโอต่อแคลลัส)
Laminar flow	1	72.67 bcd	0 b
	2	69.67 cd	0 b
	3	71.78 bcd	0 b
	4	69.00 cd	0 b
	5	68.11 d	0 b
ซิลิกาเจล	6	71.22 bcd	0 b
	12	72.22 bcd	0 b
	18	81.00 abc	0.33 b
	24	82.11 ab	0.67 b
	30	78.78 abcd	0.33 b
	36	84.56 a	1.67 a
F-test		**	*
C.V. (%)		7.15	191.48

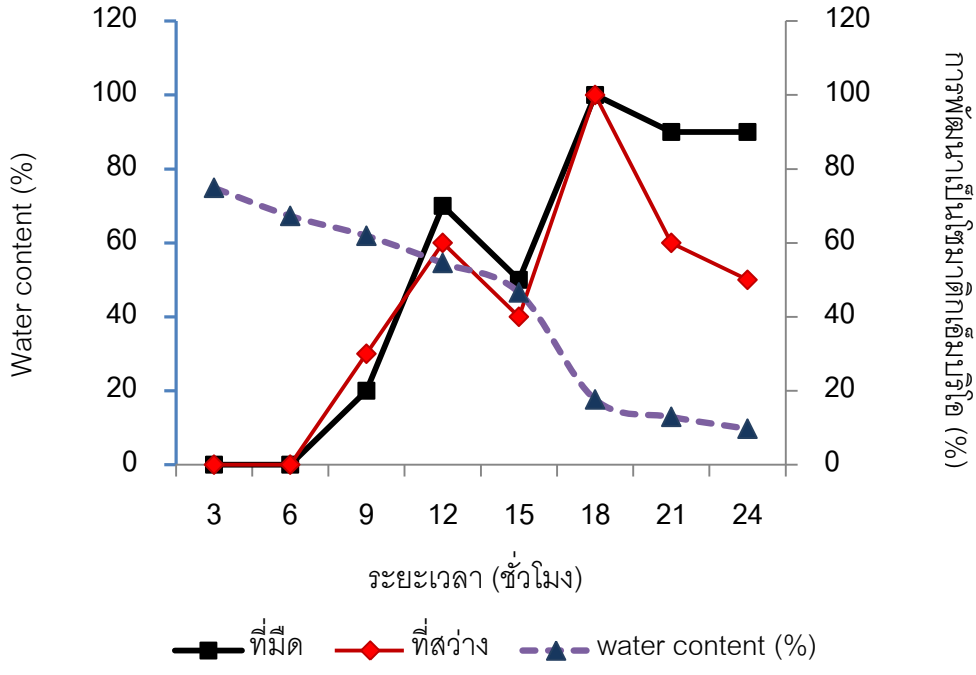
* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

1.4.3 ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาในการ dehydration โดยใช้ desiccator และสภาพการวางเลี้ยงต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

การปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน และ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 4 วัน ก่อนนำไป dehydration ใน desiccator ที่บรรจุซิลิกาเจลปริมาณ 160 กรัม ที่เวลาแตกต่างกัน พบว่า ปริมาณน้ำในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลดลงจาก 74.9 – 9.73 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12) ทั้งนี้การเพิ่มระยะเวลาในการ dehydration ส่งผลต่อการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอของชิ้นส่วนหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอทั้งในที่มืดและที่สว่าง โดยการ dehydration เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และวางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปที่มีแสงอีก 6 สัปดาห์ ให้อัตราการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสดเฉลี่ย 782.5 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 8.4 เอ็มบริโอต่อแคลลัส (ตารางที่ 15)



ภาพที่ 12 ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาในการ dehydration ใน desiccator และสภาพการวางเลี้ยงหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

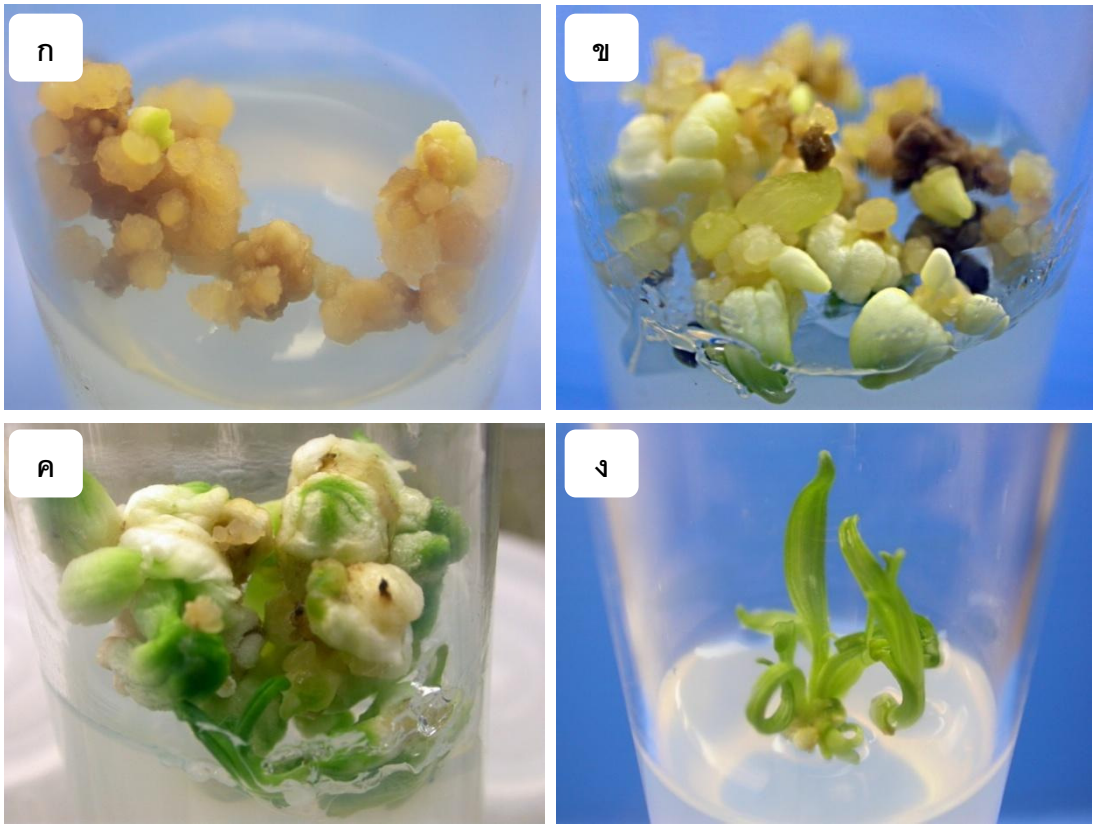
หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนมีการเพิ่มน้ำหนักสดและเริ่มพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ (ภาพที่ 13ก) เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน โซมาติกเอ็มบริโอบางส่วนพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 13ข) และหลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร ARDA เติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน โซมาติกเอ็มบริโอเริ่มงอกเป็นยอด (ภาพที่ 13ค) และให้ยอดที่สมบูรณ์เมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรดังกล่าวอีกเป็นเวลา 1 เดือน (ภาพที่ 13ง)

ตารางที่ 15 ผลของการ preconditioning ร่วมกับระยะเวลาในการ dehydration ใน desiccator และสภาพการวางเลี้ยงต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา เป็นเวลา 2 เดือน

ระยะเวลาการ dehydration (ชั่วโมง)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (มิลลิกรัม)		จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (เอ็มบริโอต่อแคลลัส)	
	ที่มืด	สว่าง	ที่มืด	สว่าง
3	127.5 d	139.5 d	0 f	0 f
6	147.4 d	149.5 d	0 f	0 f
9	182.6 d	169.3 d	0.2 f	0.4 ef
12	151.7 d	203.5 d	1.3 cde	0.8 def
15	172.2 d	213.5 d	0.8 def	0.5 ef
18	782.5 a	493.4 b	8.4 a	4.4 b
21	350.9 c	315.4 c	1.7 cd	1.5 cd
24	321.4 c	295.2 c	1.8 c	0.5 ef
F-test	**		**	
C.V. (%)	31.49		70.06	

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

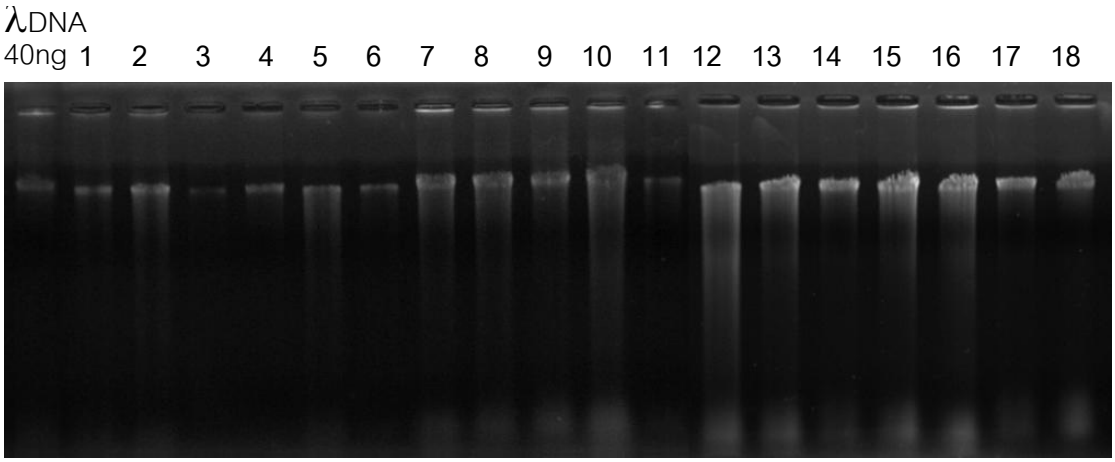


ภาพที่ 13 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากการ preconditioning บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน และ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำไป dehydration ใน desiccator ที่บรรจุซิลิกาเจล เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ (อาหารสูตร ARDA เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร) วางเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนย้ายไปที่มีแสงอีก 2 สัปดาห์ (ก) และ 4 สัปดาห์ (ข) แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมแต่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 1 เดือน (ค) และ 2 เดือน (ง)

2. การตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

2.1 การสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

จากการสกัดใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวโดยประยุกต์วิธีการของ Te-chato (2000) ด้วยการตัดใบอ่อนปริมาณ 200 มิลลิกรัมเป็นชิ้นเล็ก ๆ และบดในโกร่งที่เติมบัฟเฟอร์ TE สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ในปริมาณที่แตกต่างกันประมาณ 30-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ทั้งนี้คุณภาพของดีเอ็นเอค่อนข้างสะอาด สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลต่อไป (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่าน และไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว ที่สกัดได้จากการประยุกต์ของ Te-chato (2000) ด้วยวิธีการทางคุณภาพเปรียบเทียบกับ λDNA

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

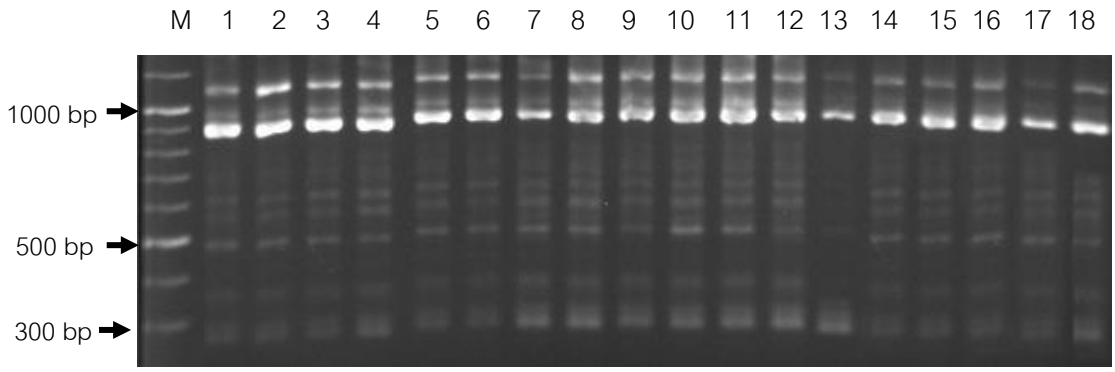
lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane 13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

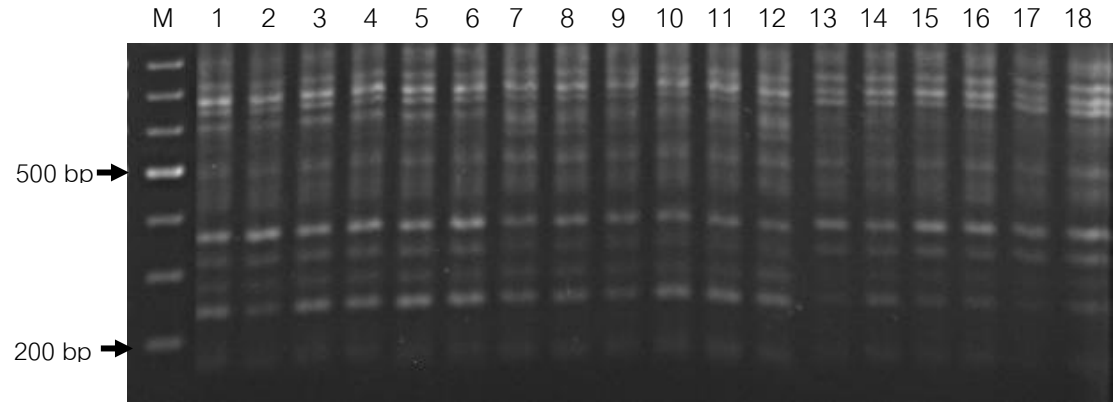
2.2 การตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการ preconditioning และ dehydration ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ คือ OPB08 OPR11 OPT19 OPT06 OPAB01 OPAB09 และ OPAB14 พบว่า ไพรเมอร์ OPAB01 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในช่วงขนาด 250 ถึง 1100 bp แถบที่ได้มีจำนวนทั้งหมด 8 แถบ (ภาพที่ 15ก) ไพรเมอร์ OPAB09 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในช่วงขนาด 250 ถึง 800 bp แถบที่ได้มีทั้งหมด 10 แถบ (ภาพที่ 15ข) OPAB14 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในช่วงขนาด 200 ถึง 1000 bp แถบที่ได้มีทั้งหมด 8 แถบ (ภาพที่ 16ก) OPR11 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในช่วงขนาด 300 ถึง 1000 bp แถบที่ได้มีทั้งหมด 4 แถบ (ภาพที่ 16ข) OPB08 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในช่วงขนาด 200 ถึง 500 bp แถบที่ได้มีทั้งหมด 3 แถบ (ภาพที่ 17ก) OPT06 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในช่วงขนาด 400 ถึง 1200 bp แถบที่ได้มีทั้งหมด 3 แถบ (ภาพที่ 17ข) และ OPT19 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในช่วงขนาด 300 ถึง 1100 bp แถบที่ได้มีทั้งหมด 8 แถบ (ภาพที่ 18) ซึ่งแถบที่ได้ทั้งหมดมีความสม่ำเสมอ และให้แถบดีเอ็นเอในลักษณะ monomorphism ทั้งหมด แสดงว่าต้นที่ได้ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ก



ข



ภาพที่ 15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAB01 (ก) และ OPAB09 (ข)

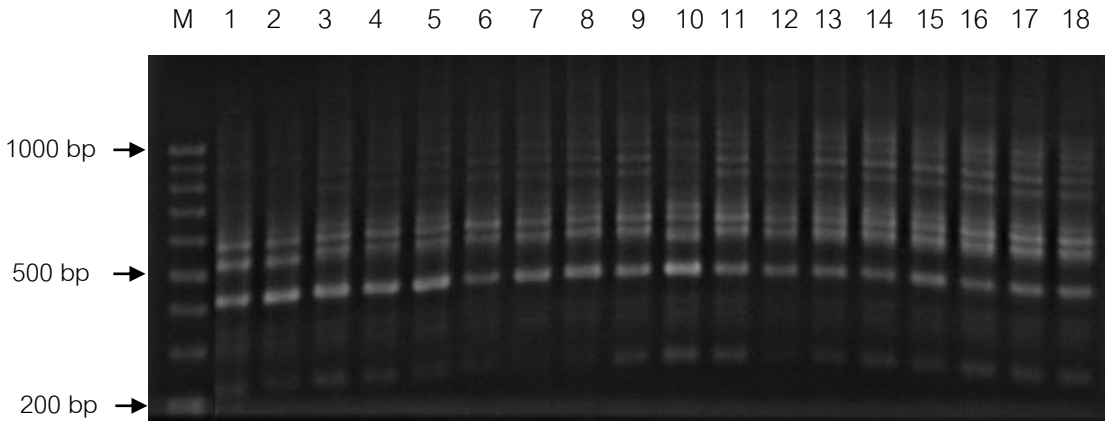
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 เบส

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

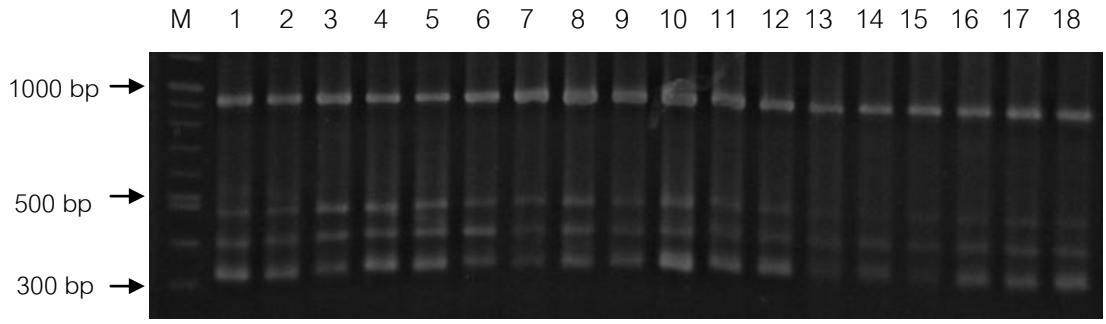
lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane 13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ก



ข



ภาพที่ 16 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAB14 (ก) และ OPR11(ข)

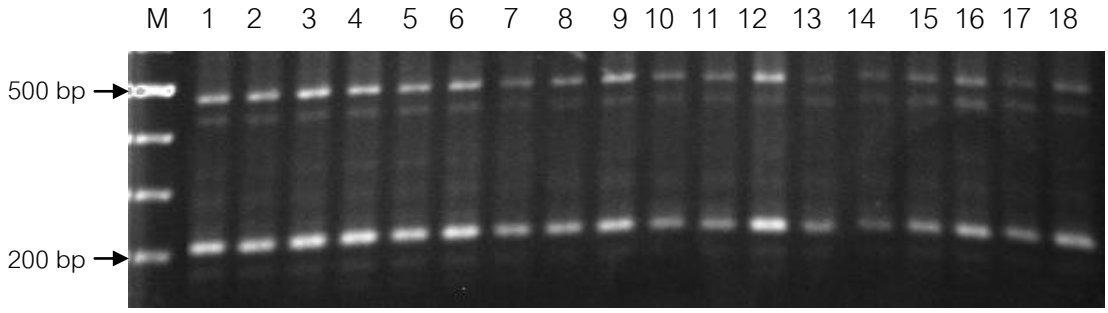
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 เบส

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

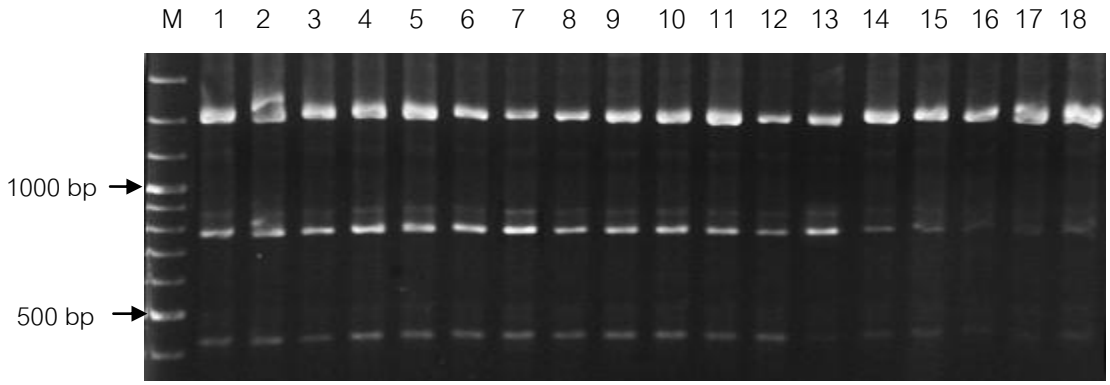
lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ก



ข



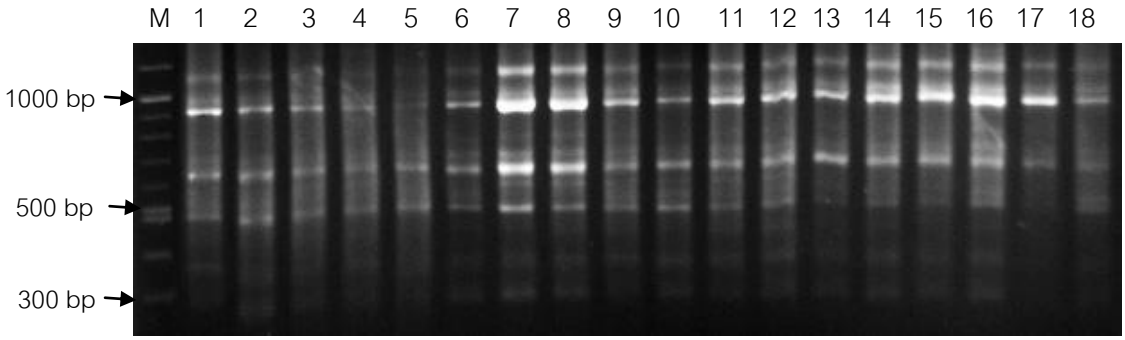
ภาพที่ 17 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB08 (ก) และ OPT06 (ข)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 เบส

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane 13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 18 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPT19

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 เบส

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

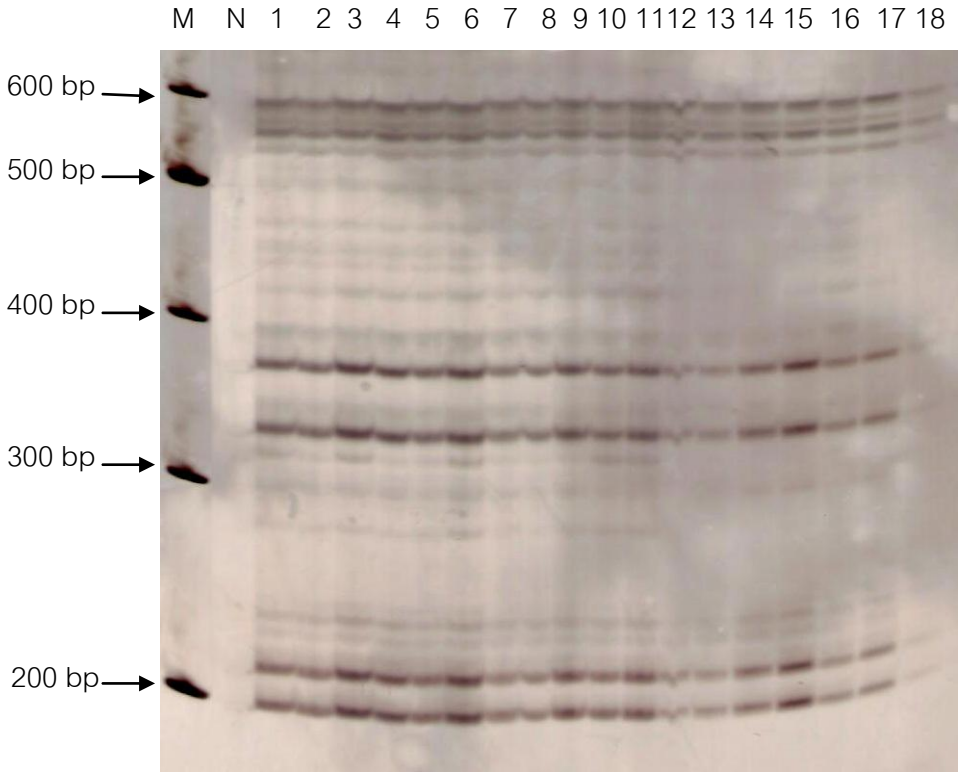
lane13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

2.3 การตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการ preconditioning และ dehydration ด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 8 คู่ คือ EgCIR0008 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 พบว่า ทุกคู่ไพรเมอร์ให้แถบที่มีลักษณะ monomorphism (ตารางที่ 16 ภาพที่ 19-24) แสดงให้เห็นว่า มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์นี้

ตารางที่ 16 ชนิดของไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน จากการใช้เทคนิคเอสเอสอาร์

Primer name	Sequence (5'-3')	Amplified fragment	Monomorphic fragment	Monomorphism (%)
EgCIR0008	(F) CGGAAAGAGGGAAGATG	8	8	100
	(R) ACCTTGATGATTGATGTGA			
EgCIR0337	(F) GTCTGCTAAAACATCAACTG	10	10	100
	(R) GAGGAGGAGGGGAACGATAA			
EgCIR0409	(F) AGGGAATTGGAAGAAAAGAAAG	2	2	100
	(R) TCCTGAGCTGGGGTGGTC			
EgCIR0446	(F) CCCCTTCGAATCCACTAT	8	8	100
	(R) CAAATCCGACAAATCAAC			
EgCIR0465	(F) TCCCCCACGACCCATTC	1	1	100
	(R) GGCAGGAGAGGCAGCATTC			
EgCIR0781	(F) CCCCTCCCTACCACGTTCCA	14	14	100
	(R) TGTTTGCTGTTGCTCTTTGATTTTC			
EgCIR0905	(F) CACCACATGAAGCAAGCAGT	14	14	100
	(R) CCTACCACAACCCCAGTCTC			
EgCIR1772	(F) CTTCCATTGTCTCATTATTCTCTTA	12	12	100
	(R) ACCTTGTATTAGTTTGTCCA			



ภาพที่ 19 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคเอสเอสอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008

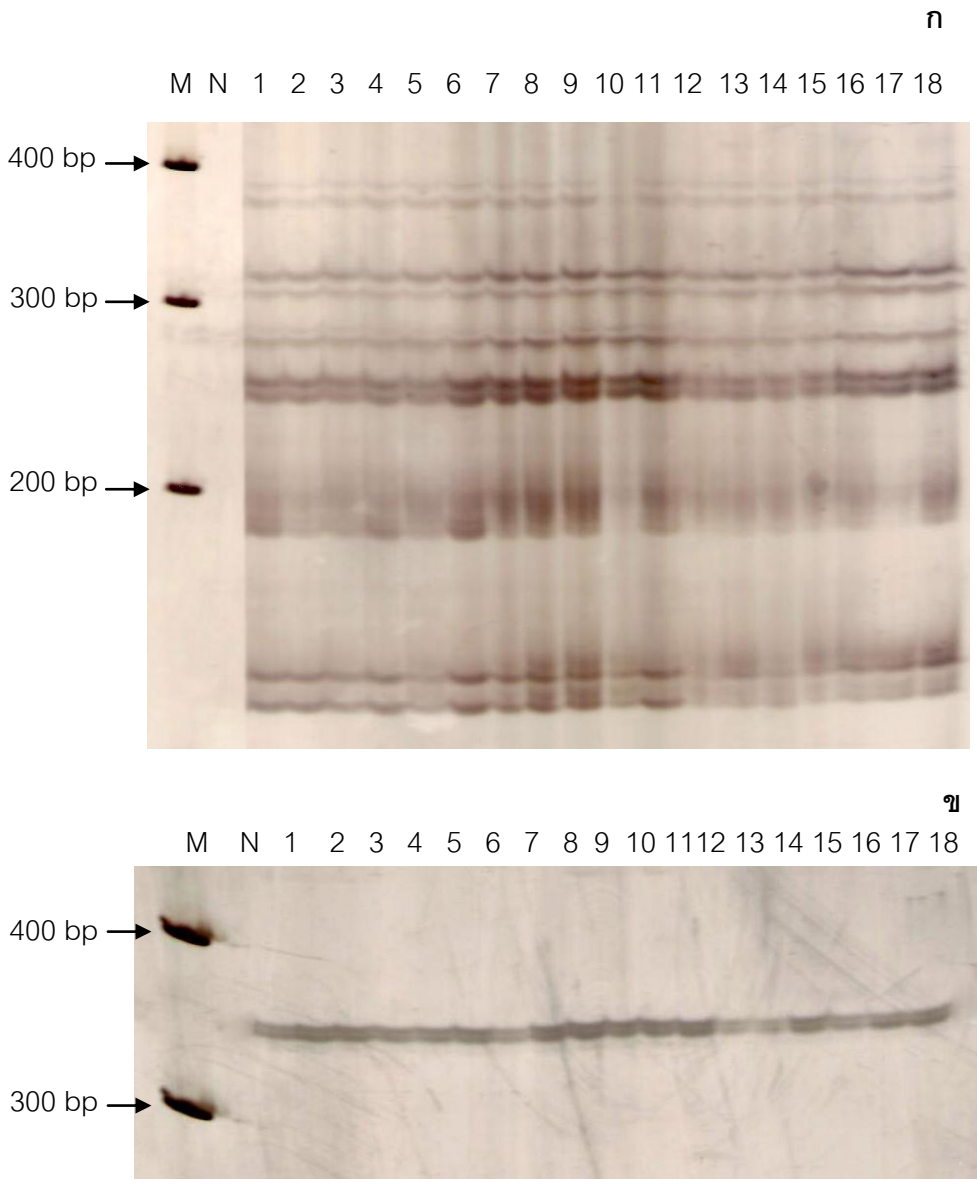
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 เบส

N คือ negative control

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



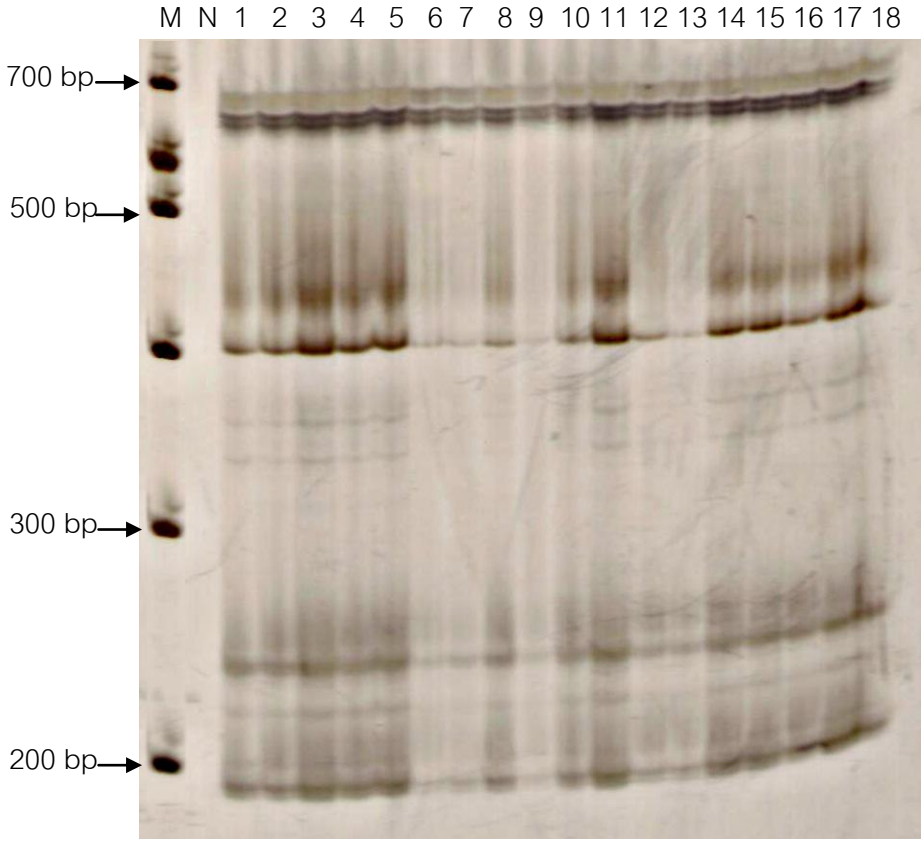
ภาพที่ 20 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคเอสเอสอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0465 (ก) และ EgCIR0337 (ข)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 เบส N คือ negative control

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 21 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคเอสเอสอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0781

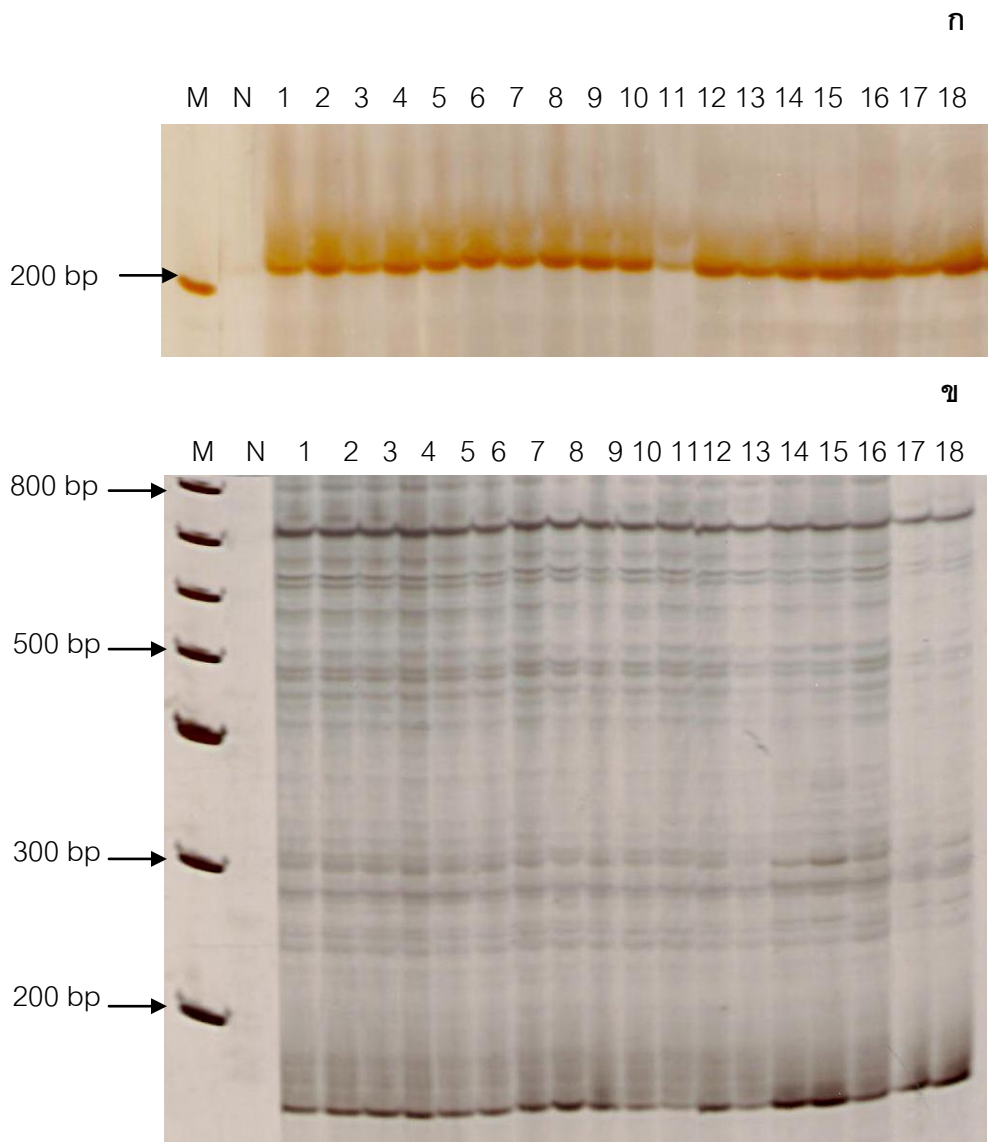
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 เบส

N คือ negative control

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 22 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคเอสเอสอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0446 (ก) และ EgCIR0409 (ข)

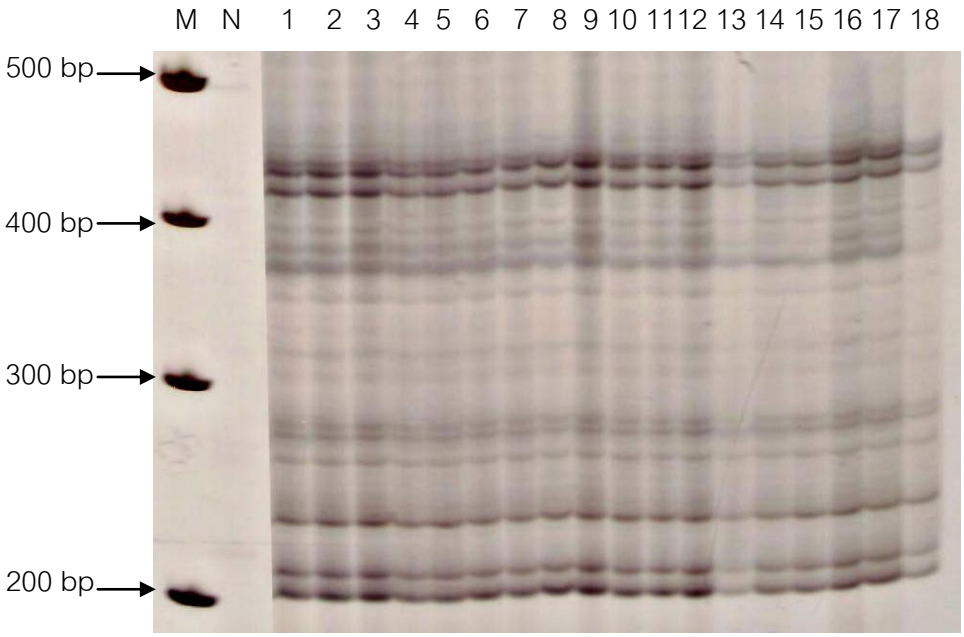
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 เบส

N คือ negative control

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 23 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคเอสเอสอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR0905

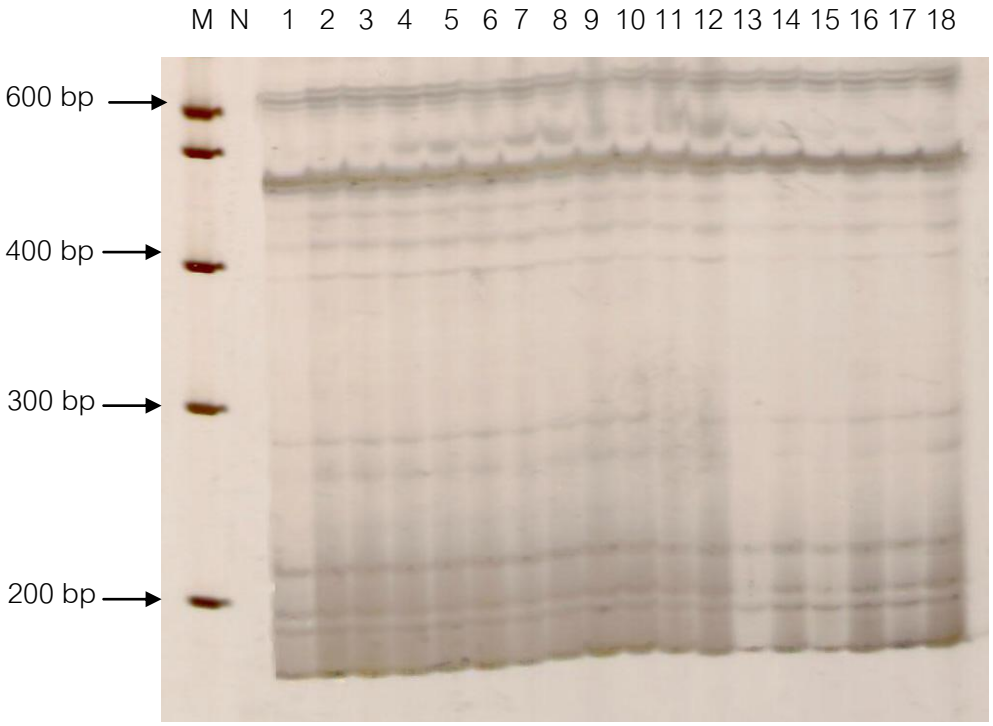
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 เบส

N คือ negative control

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 24 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากเทคนิคเอสเอสอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ EgCIR1772

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 เบส

N คือ negative control

lane 1-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane 7-12 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

lane13-18 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าที่เตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การเก็บรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในไนโตรเจนเหลว

การใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในส่วนของการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช ไม่ว่าจะเป็นการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชหายากหรือการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ การขยายพันธุ์ และการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์เพื่อสร้างการเกษตรที่ยั่งยืนในอนาคต การเลือกใช้วิธีการเก็บรักษาแบบ cryopreservation ซึ่งเป็นการเก็บรักษาพันธุ์พืชได้ระยะยาว อีกทั้งแก้ปัญหาหรือข้อจำกัดในเรื่องความหลากหลายของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการเก็บรักษา เป็นต้น แต่การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่มีประสิทธิภาพต้องคำนึงถึงอันตรายที่จะเกิดขึ้นจากการเก็บรักษาในสภาพเย็นจัด (-196 องศาเซลเซียส) โดยขั้นตอนการเก็บรักษาโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเตรียมชิ้นส่วนพืชที่นำเทคนิคหรือวิธีการต่าง ๆ เข้ามาช่วยเพื่อส่งเสริมให้ชิ้นส่วนสามารถรอดชีวิตและพัฒนาต่อไปได้ ทั้งนี้การเลือกวิธีการใด ๆ ต้องคำนึงถึงความเหมาะสมกับชนิดของชิ้นส่วนและพันธุกรรมของพืช มีรายงานผลสำเร็จในการเก็บรักษาพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในไนโตรเจนเหลว เช่น กล้วย (Panis, 2009) อินทผลัม (Bekheet *et al*.,2007) อ้อย (Gonzalez-Arnao *et al*., 1999) สับปะรด (Gamez-Pastrana, 2004) และกระเทียม (Keller, 2005) เป็นต้น สำหรับปาล์มน้ำมันมีการเก็บรวบรวมพันธุ์ทั้งในและนอกหลอดทดลอง โดยมีหน่วยงานวิจัยเป็นผู้รับผิดชอบในหลาย ๆ ประเทศ เช่น ประเทศแซร์ (Institut National pour l'Etude Agronomicque: INEAC) ประเทศไอวอรีโคสต์ (IRSO) ประเทศมาเลเซีย (MPOB) ประเทศคอสตาริกา (Coto) (ธีระ, 2554) ประเทศไทย (ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี) เป็นต้น และการเก็บรักษาในหลอดทดลองด้วยวิธีการ cryopreservation มีรายงานการใช้เมล็ดและโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันก่อนการเก็บรักษาใช้วิธี dehydration ซึ่งการเก็บรักษาโซมาติกเอ็มบริโอยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกชิ้นส่วนที่มีความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้สูงมาใช้เป็นวัสดุพืชเริ่มต้นในการเก็บรักษาในสภาพดังกล่าว สกุลรัตน์ (2553) และ อาสลัน (2545) รายงานว่า โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยงของปาล์มน้ำมันเป็นระยะที่เหมาะสมต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุด เนื่องจากโซมาติกเอ็มบริโอระยะนี้มีขนาดใหญ่ มีการเก็บสะสมอาหารภายในเซลล์จำนวนมาก อีกทั้งระยะ

พัฒนาการของกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิสมีผลต่อการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว Shimonishi และคณะ (2000) รายงานว่า โซมาติกเอ็มบริโอของ *Cucumis melo* ที่มีขนาดกลางและใหญ่ ให้อัตราการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวสูงกว่าโซมาติกเอ็มบริโอที่มีขนาดเล็ก จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยได้ทำการเก็บรักษาชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยงของปาล์มน้ำมันขนาดประมาณ 7 มิลลิเมตร ซึ่งได้มาจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตรชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 1 เดือน และการเตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ dehydration ใน laminar flow เป็นเวลา 2-10 ชั่วโมง ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว หลังจากการวางเลี้ยงบนอาหารชักนำการงอก เป็นเวลา 1 วัน พบว่า ชิ้นส่วนเริ่มซีดเป็นสีขาว และเมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โซมาติกเอ็มบริโอไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ไม่แสดงข้อมูล) แสดงว่าถึงแม้ว่าการลดความชื้นของโซมาติกเอ็มบริโอระยะนี้บางส่วนจะส่งผลต่อการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ ปริมาณน้ำที่ลดลงอาจยังไม่เพียงพอต่อการป้องกันอันตรายที่เกิดจากการเกิดผลึกน้ำแข็งเมื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว แสดงว่า ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่นำมาเก็บรักษาและระยะเวลาในการ dehydration ยังไม่เหมาะสมกับปาล์มน้ำมัน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เลือกกลุ่มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ซึ่งเป็นแคลลัสที่มีลักษณะร่วนและมีขนาดเล็กประมาณ 1 มิลลิเมตร มาเตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการต่าง ๆ โดยจากการศึกษาพบว่า การเตรียมเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยวิธีการ preconditioning บนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.0874 โมลาร์ เป็นเวลา 9 วัน ให้น้ำหนักเฉลี่ยและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงที่สุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและระยะเวลาในการปรับสภาพ พบว่า การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอลดลง ทั้งนี้การเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงส่งผลต่อการลดลงของค่าออสโมติกของอาหาร การดูดซึมน้ำและสารอาหารของเซลล์ลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า การปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ หรือ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถรอดชีวิตและให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Mubmann และคณะ (2006) ที่ศึกษาการปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชันของ *Cyclamen persicum* Mill. ด้วยน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 2 วัน ให้การฟื้นฟูสภาพหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวถึง 63 เปอร์เซ็นต์ Bekheet และคณะ (2007) เตรียมชิ้นส่วน nodular callus ของอินทผลัมด้วยการปรับสภาพบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ให้การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 75 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการปรับสภาพที่

เหมาะสมของน้ำตาลซูโครสช่วยให้เซลล์ปรับตัวและทนต่อสภาพแข็งตัวในขณะเก็บรักษาได้ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้นสูงส่งผลต่อค่าออสโมติกจึงทำให้เซลล์เกิดการปรับสภาพน้ำภายในเซลล์พืชให้มีปริมาณที่เหมาะสมไม่เกิดผลึกน้ำแข็งจนเป็นอันตรายต่อเซลล์และการสะสมน้ำตาลซูโครสภายในเซลล์ช่วยเพิ่มเสถียรภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ (Crowe *et al.*, 1989)

การเตรียมเซลล์ด้วยวิธีการ vitrification โดยการแช่เซลล์ในสารละลาย cryoprotectant ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิเย็น เป็นเวลา 60 นาที พบว่า การดัดแปลงสารละลาย PVS2 ที่ปราศจากน้ำตาลซูโครส ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงเป็นสองเท่าของชุดที่ไม่มีการแช่สารละลาย vitrification ในขณะที่การแช่ในสารละลาย PVS2 และ PVS3 ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 23.3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และการแช่ในสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง 0.4 โมลาร์ ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 10 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าสารละลาย vitrification ชนิดที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบส่งผลให้การพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลดลง ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบอาจยังไม่เหมาะสม จึงทำให้เกิดความเป็นพิษของสารป้องกันความเย็นหรือการ desiccation ที่มากเกินไป (Touchell *et al.*, 2002) เป็นไปในทำนองเดียวกับการศึกษาของลัดดาวัลย์ (2552) โดยการนำปลายยอดหญ้าแฝกแช่ในสารละลาย vitrification ชนิดที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบ คือ PVS2 และ PVS3 ก่อนวางเลี้ยงในอาหารชักนำยอด พบว่า ชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตต่ำคือ 46.67 และ 38.09 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่า การแช่ในสารละลาย vitrification เพียงวิธีการเดียวร่วมกับการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่สามารถรอดชีวิตและพัฒนาต่อได้ แต่เมื่อนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาปรับสภาพในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน แล้วแช่ในสารละลายดัดแปลง PVS2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ก่อนนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ถึง 66.7 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 2.33 เอ็มบริโอต่อแคลลัส สอดคล้องกับ Panis (2009) ซึ่งประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยที่ชักนำมาจากดอกตัวผู้ด้วยการ preconditioning ในอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร (0.53 โมลาร์) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแช่ในสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาทีก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวให้การพัฒนาของชิ้นส่วนได้สูง อย่างไรก็ตามมีบาง

การศึกษาที่ใช้สารละลาย LS ที่ประกอบด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 2 โมลาร์ ร่วมกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ก่อนการแช่ในสารละลาย vitrification เช่น Sen-Rong และ Ming-Hua (2012) เก็บรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำมาจากเมล็ดของ *Anemarrhena asphodeloides* โดยการ preculture ในอาหารเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำไปแช่ในสารละลาย LS เป็นเวลา 30 นาที แล้วแช่ในสารละลาย PVS2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว หลังจากการเก็บรักษาแล้ววางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ 63.8 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเก็บรักษาปาล์มน้ำมันนั้น Suranthran และคณะ (2012) นำโพลีเอ็มบริออยด์มา preconditioning ในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วยการแช่ในสารละลาย LS ที่ประกอบด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส หลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวแล้ววางเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า โพลีเอ็มบริออยด์สามารถให้การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ 45 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant แล้วแช่ที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมกับชิ้นส่วนพืชส่งผลต่อความสำเร็จในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และการนำเทคนิค preconditioning มาใช้สามารถช่วยลดความเป็นพิษที่อาจเกิดจากสารและการเปลี่ยนแปลงออสโมติกได้ เนื่องจากเซลล์มีการปรับตัวด้วยการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ แวคิวโอล และผนังเซลล์ (Takagi *et al*., 1997) รวมไปถึงการที่เซลล์มีการสะสมระดับของ abscisic acid (ABA) และโปรตีน (Reinhoud *et al.,* 2000) การทั้งนี้การเกิดสภาพ vitrification เป็นการเปลี่ยนสภาพจากของเหลวโดยเฉพาะน้ำภายในเซลล์พืชไปเป็นของแข็งที่ปราศจากการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ที่เรียกว่า glassy state การใช้ cryoprotectant ส่งผลให้สารบางชนิดไปแทนที่น้ำภายในเซลล์ทำให้เซลล์มีความหนืดมากขึ้นจึงเป็นการลดการเกิดผลึกน้ำแข็ง ทั้งนี้การแช่สารละลายที่อุณหภูมิเย็น (0 องศาเซลเซียส) ช่วยในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารละลายให้ซึมผ่านได้ดียิ่งขึ้น (Benson, 2008) อย่างไรก็ตามสำหรับวิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดอยู่ในการเก็บรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน เนื่องจากเมื่อทำการทดลองซ้ำโดยใช้ผลการศึกษาที่ดีที่สุด พบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่สามารถพัฒนาต่อเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ ทั้งนี้เพราะคุณภาพของเอ็มบริโอเจนิคที่ใช้ในการศึกษาอาจไม่เหมือนเดิม แสดงให้เห็นว่าชนิดของสารละลายและระยะเวลาที่ใช้ในวิธีการ vitrification อาจยังไม่เหมาะสมกับคุณภาพของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวของปาล์มน้ำมัน

การเตรียมเซลล์ด้วยวิธีการ encapsulation โดยการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาหุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วหยดในสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ แล้วทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที สามารถสร้างเป็นเม็ดวุ้นที่กลมสวย และให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเทคนิคอื่น ๆ มาช่วย คือ นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมา preconditioning บนอาหารเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 2 วัน ก่อนหุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนต แล้วแช่ในสารละลาย LS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 1-4 วัน หรือการ dehydration เม็ดบีดในตู้ laminar flow เป็นเวลาตั้งแต่ 2-10 ชั่วโมง ซึ่งให้ปริมาณน้ำในเม็ดบีดอยู่ระหว่าง 92-34.5 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ 100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านขั้นตอนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่สามารถพัฒนาต่อได้ ในขณะที่ Sharaf และคณะ (2012) เก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดของ *Artemisia herba-alba* โดยการหุ้มชิ้นส่วนด้วยวุ้นแอลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำมาแช่ในสารละลาย LS ที่ประกอบด้วยอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ให้อัตราการรอดชีวิต 40 เปอร์เซ็นต์ และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ 6 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเม็ดบีดที่ผ่านการแช่ในสารละลาย LS ดังกล่าวแล้วมา dehydration ในตู้ laminar flow เป็นเวลาตั้งแต่ 2-6 ชั่วโมง (ปรับความชื้นภายในบีดให้อยู่ในช่วง 12.6-3.74 เปอร์เซ็นต์) ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ชิ้นส่วนปลายยอดมีอัตราการรอดชีวิตลดลงจนถึง 0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ใช้วิธี encapsulation-vitrification โดยการนำเม็ดบีดมาแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ให้อัตราการรอดชีวิต 68 เปอร์เซ็นต์ และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ 12 เปอร์เซ็นต์ Gonzalez-Benito และคณะ (2009) เก็บรักษาเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชันของ Spanish grapevine ด้วยวิธีการ encapsulation-dehydration โดยการหุ้มชิ้นส่วนด้วยวุ้นแอลจิแนต 3 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปแช่ในสารละลาย LS ประกอบด้วยอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 4 วัน แล้ว dehydration ในตู้ laminar flow เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ปรับความชื้นภายในบีดเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์) ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ให้อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ และการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย LS และระยะเวลาในการ dehydration มีความสำคัญต่อการปรับปริมาณน้ำในเม็ดบีดซึ่งส่งผลต่อการรอดชีวิตของชิ้นส่วนภายหลังการเก็บรักษา ดังนั้น ในการศึกษาการเก็บรักษาปาล์มน้ำมันในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการนี้ครั้งต่อไปน่าจะเพิ่มระยะเวลาในการ

dehydration หรือการนำเทคนิค vitrification เข้ามาช่วยในการเตรียมชิ้นส่วนก่อนทำการเก็บรักษา

การเตรียมเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยวิธีการ dehydration โดยการวางในตู้ laminar flow ที่ความเร็วลม 90 ฟุตต่อนาที หรือซิลิกาเจลเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการ dehydration ปริมาณน้ำในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลดลง โดยการ dehydration ด้วยซิลิกาเจลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 550.89 มิลลิกรัม ส่วนการผึ่งลมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 8.33 เอ็มบริโอต่อแคลลัส ซึ่งการเตรียมเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยวิธี dehydration เพียงอย่างเดียวก่อนนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ ในขณะที่การปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารที่เติมซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำไป dehydration ด้วยซิลิกาเจลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถรอดชีวิตและพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ถึง 44 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการปรับสภาพน้ำด้วย laminar flow เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่สามารถพัฒนาต่อได้ แสดงให้เห็นว่า การปรับสภาพน้ำด้วยซิลิกาเจลมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ลมเป่าจาก laminar flow เนื่องจากการใช้ซิลิกาเจลทำให้เนื้อเยื่อค่อย ๆ สูญเสียความชื้น และลดความชื้นได้ทั้งเซลล์รอบนอกและเซลล์ภายใน ในขณะที่การปรับสภาพน้ำออกด้วยลมเป่าด้วย laminar flow ชิ้นส่วนสูญเสียน้ำอย่างรวดเร็วและลดความชื้นของเนื้อเยื่อได้เฉพาะเซลล์รอบนอก สอดคล้องกับ Panis (1996) ซึ่งรายงานว่าการลดความชื้นของชิ้นส่วนปลายยอดของกล้วยด้วยลมเป่าในตู้ laminar flow ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ชิ้นส่วนไม่สามารถรอดชีวิตได้เลย ทั้งนี้การปรับสภาพน้ำด้วยซิลิกาเจลทำให้เนื้อเยื่อทนทานต่อความเครียดน้ำที่เกิดขึ้น ภายหลังจากการฟื้นฟูสภาพชิ้นส่วนจึงมีการรอดชีวิตและสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ นอกจากนี้ยังพบว่า การปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารที่เพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสโดยวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเดียวกันเติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.5 โมลาร์อีกครั้ง เป็นเวลา 4 วัน ก่อนลดความชื้นด้วยซิลิกาเจลปริมาณ 160 กรัม ในตู้ดูดความชื้น เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ความชื้นภายในเนื้อเยื่อเท่ากับ 17.6 เปอร์เซ็นต์) จากการเตรียมเซลล์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการข้างต้นแล้วนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถรอดชีวิตและให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุด 782.5 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 8.4 เอ็มบริโอต่อแคลลัส หลังจากเก็บรักษาแล้ววางเลี้ยงในที่มืด 2 สัปดาห์ แล้ว

วางเลี้ยงในที่มีแสงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าขั้นตอนของการปรับสภาพด้วยน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มระดับความเข้มข้น และความชื้นในเนื้อเยื่อมีผลต่อการรอดชีวิตและพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ การปรับสภาพในอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้มีการสะสมของแข็งที่ละลายน้ำได้ภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น (Crowe *et al*., 1989) อีกทั้งโมเลกุลของน้ำตาลซูโครสมีผลในการลดการเคลื่อนย้ายและการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ในชั้นไขมันเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีเสถียรภาพมากขึ้น (Singh *et al*., 2008) การเกิดสภาวะ electrolyte leakage หลังจากการเก็บรักษาและวางเลี้ยงบนอาหารชักนำของพืชจึงน้อยลง ส่งผลให้เนื้อเยื่อมีชีวิตและสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่สูง

2. การตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

การสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเก็บและไม่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยประยุกต์วิธีการของ Te-chato (2000) สามารถให้ดีเอ็นเอคุณภาพที่ดีสะอาด และปริมาณมากเพียงพอ ซึ่งการบดใบอ่อนปาล์มน้ำมันใน microtube ด้วย TE buffer ค่อนข้างยาก จึงประยุกต์วิธีการโดยการบดในโกร่งที่เย็น ประกอบกับใบปาล์มน้ำมันที่นำมาบดเป็นใบปาล์มอ่อนที่ได้จากหลอดทดลองจึงไม่มีปัญหาของใบแก่ซึ่งมีปริมาณเส้นใยสูง หากเป็นใบแก่ต้องเลือกการสกัดโดยใช้ไนโตรเจนเหลวร่วมกับ CTAB buffer (Doyle and Doyle, 1990) และต้องเติมสาร PVP เพื่อลดการเกิดสีน้ำตาลจากปฏิกิริยา oxidation ระหว่างการสกัด ทำให้คุณภาพดีเอ็นเอที่ได้ไม่ดีมากนัก ทั้งนี้คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความคมชัดของแถบดีเอ็นเอหลังการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์

เครื่องหมายโมเลกุลเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาทางด้านพันธุกรรมพืช เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้กับพืชทุกชนิด ไม่มีอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมเกี่ยวข้องและตรวจสอบได้กับทุกระยะของการทดลอง ตั้งแต่แคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และต้นกล้าของพืช อีกทั้งเป็นการวิเคราะห์จากจีโนมโดยตรง (Barcelos *et al.,* 2002) เทคนิคอาร์เอพีดี เป็นอีกเทคนิคหนึ่งในเครื่องหมายโมเลกุลที่มีผู้นิยมใช้อย่างแพร่หลาย เพราะให้แถบดีเอ็นเอซึ่งได้จากการจับแบบสุ่มของไพรเมอร์บนจีโนมจำนวนมาก และการตรวจสอบความแตกต่างที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ซับซ้อนและให้ผลรวดเร็ว และผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือเพียงพอสำหรับใช้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวของ *Prunus* (Helliot *et al.,* 2002) องุ่นและกีวี (Zhai *et al*., 2003) hops (*Humulus lupulus* L.) (Peredo *et al*., 2008) เป็นต้น จากการตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ 7 ชนิด ในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน พบว่า ทั้ง 7 ชนิด

สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ได้เป็นแบบ monomorphism และไม่พบความแตกต่างระหว่างต้นควบคุม (ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติ: ตัวอย่าง 1-6) ต้นที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยการเตรียมเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยวิธี preconditioning (ตัวอย่าง 7-12) และต้นที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและเตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration (ตัวอย่าง 13-18) (ภาพที่ 15-18) จากผลดังกล่าวทำให้ยืนยันได้ว่าการเตรียมเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยวิธีการข้างต้นก่อนเก็บรักษาไม่ทำให้พันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันเปลี่ยนแปลงไป สอดคล้องกับ Salaj และคณะ (2012) ตรวจสอบความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ conifer 7 สายพันธุ์ ที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวซึ่งเตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ pretreatment ในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสและมอลโตส โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ 10 ชนิด ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม สำหรับการใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพสูงเพียงพอในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมพืช โดยปาล์มน้ำมันมีการใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ในการศึกษาด้านต่าง ๆ เช่น การตรวจสอบความเป็นลูกผสมเทเนอรา (Thawaro and Te-chato, 2010) การตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (สกุลรัตน์, 2553) และการทำแผนที่ยีน (Billotte *et al*., 2005; Singh *et al*., 2007) เป็นต้น ส่วนการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมีรายงานใน *Robus* (Castillo *et al.,* 2010) *Solanum* (Harding and Benson, 2001) จากการศึกษาการตรวจสอบความแปรปรวนของปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ด้วยไพรเมอร์ 8 คู่ พบว่า ไพรเมอร์ทุกคู่ให้แถบดีเอ็นเอแบบ monomorphism ทั้งนี้การเตรียมเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยวิธีการ preconditioning-dehydration ใช้เฉพาะน้ำตาลซูโครสที่ไม่ก่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม Sanchez และคณะ (2008) รายงานว่า การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวไม่มีผลต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรมถึงแม้ว่าการเก็บรักษาแบบ cryopreservation จะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พืชเครียดจากสภาพเย็นยิ่งยวดก็ตาม (Harding, 2004) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความแม่นยำและให้ครอบคลุมทั้งจีโนม ในการศึกษาครั้งต่อไปน่าจะเพิ่มจำนวนซ้ำและตัวอย่างในการศึกษา รวมไปถึงจำนวนของไพรเมอร์ทั้งสองเทคนิคให้มากขึ้น

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีผลสำเร็จจากการอนุรักษ์พันธุกรรมปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองที่ได้ผล 100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีการที่ง่าย ไม่ซับซ้อน อีกทั้งไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ดังนั้นการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกและมีประโยชน์อย่างมากต่อการอนุรักษ์พันธุกรรมปาล์มน้ำมัน เพื่อการขยายโคลนพันธุ์ดีและการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันในอนาคตต่อไป

บทที่ 5

สรุป

1. การเก็บรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในไนโตรเจนเหลว

1.1 การ preconditioning เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.0874 โมลาร์ เป็นเวลา 9 วัน ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 497.5 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 13.4 เอ็มบริโอต่อแคลลัส ในกรณีที่มีการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า การปรับสภาพบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 16.67 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสดเฉลี่ย 81.2 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 0.25 เอ็มบริโอต่อแคลลัส

1.2 การนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาแช่ในสารละลาย vitrification ซึ่งประกอบไปด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ DMSO ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และเอทธีลีนไกลคอลความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 100 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสดเฉลี่ย 304 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 11.6 เอ็มบริโอต่อแคลลัส อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านขั้นตอนการจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลว ชิ้นส่วนไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้

1.3 การ preconditioning เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ร่วมกับการแช่ในสารละลาย vitrification ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที ให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 706.3 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 12 โซมาติกเอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน ในขณะที่การแช่ในสารละลาย vitrification ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที ก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 66.67 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสดเฉลี่ย 177.5 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 2.33 เอ็มบริโอต่อแคลลัส

1.4 การหุ้มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยวุ้นแอลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้เม็ดวุ้นที่กลมสวย และให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุด 4.5 เอ็มบริโอต่อหลอด อย่างไรก็ตามเมื่อทำการแช่ในไนโตรเจนเหลว ชิ้นส่วนไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้

1.5 การ preconditioning เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปหุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วแช่ในสารละลาย LS เป็นเวลา 3 วัน ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 100

เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุด 5.4 เอ็มบริโอต่อขวด ส่วนการ preconditioning เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปหุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไป dehydration ในตู้ laminar flow เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 8.2 เอ็มบริโอต่อขวด อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านขั้นตอนการแช่ในไนโตรเจนเหลว เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้

1.6 การ dehydration เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยซิลิกาเจลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุด 550.89 มิลลิกรัม ขณะที่การผึ่งลมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำให้ชิ้นส่วนพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 8.33 เอ็มบริโอต่อแคลลัส อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านขั้นตอนการแช่ในไนโตรเจนเหลวทุกระยะเวลาไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้

1.7 การ preconditioning เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ร่วมกับการ dehydration ด้วยซิลิกาเจลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชิ้นส่วนมีความชื้นลดลงเหลือ 67.31 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 44.44 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การ dehydration เป็น 36 ชั่วโมง ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุด 84.56 มิลลิกรัม และ 1.67 เอ็มบริโอต่อแคลลัส ตามลำดับ

1.8 การ preconditioning เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน และ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 4 วัน ก่อนนำไป dehydration ใน desicator ที่บรรจุซิลิกาเจล เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (water content=17.6 เปอร์เซ็นต์) ก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว และวางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปที่มีแสงอีก 6 สัปดาห์ ให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอสูงที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสดเฉลี่ย 782.5 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 8.4 เอ็มบริโอต่อแคลลัส ดังนั้นจากการเตรียมเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยวิธีการข้างต้น เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

2. การตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

2.1 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการ preconditioning และ dehydration ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ พบว่า ทุกไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันได้ โดยแถบที่ได้ทั้งหมดมีความสม่ำเสมอในลักษณะ monomorphism แสดงว่าต้นที่ได้ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม

2.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการ preconditioning และ dehydration ด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 8 คู่ พบว่า ไพรเมอร์ทุกคู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ monomorphism แสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม

เอกสารอ้างอิง

ธนวดี พรหมจันทร์. 2551. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต้นปาล์มน้ำมันที่พัฒนาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

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

บุษบา ล้อประเสริฐ. 2548. ปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพ ฯ: ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตร.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2523. ปาล์มน้ำมัน. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ลัดดาวัลย์ มูสิกาปาละ. 2552. เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกสงขลา 3 (*Vetiveria zizanioides* Nash.) ในไนโตรเจนเหลว. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์. 2553. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2555. กรุงเทพ ฯ: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอแอฟแอลพี. กรุงเทพ ฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อังคณา โชติวัฒนศักดิ์. 2551. ลักษณะทางการเกษตรในประชากรชั่วที่ 2 และการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพ ฯ: อติสรรค์.

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Aronen, T., Krajnakova, J., Haggman, H. and Ryynanen, L. 1999. Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. Plant Science 142: 163-172.

Bajaj, Y.P.S. 1995. Cryopreservation of plant cell, tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry (ed. Y.P.S. Bajaj) Vol. 32, pp. 3-18. Heidelberg: Springer-Verlag.

Barcelos, E., Amblard, P., Berthaud, J. and Sequin, M. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular marker. Pesquisa Agropecuaria Barsileira, Brasilia 37: 1105-1114.

Bhatti, M.H., Percival, T., Davey, C.D.M., Henshaw, G.G. and Blakesley, D. 1997. Cryopreservation of embryogenic tissue of a range of genotypes of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) using an encapsulation protocol. Plant Cell Reports 16: 802–806.

Bekheet, S.A., Taha, H.S., Saker, M.M. and Solliman, M.E. 2007. Application of cryopreservation technique for *in vitro* grown date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultures. Journal of Applied Sciences Research 3: 859-866.

Benson, E.E. 2008. Cryopreservation theory. *In* Plant Cryopreservation: A Practical Guide (ed. E.E. Benson) Vol. 1, pp. 15-30. Corvallis Oregon: Springer.

Benson, E.E. and Lynch, P.T. 1999. Cryopreservation of rice tissue cultures. *In* Plant Cell Culture Protocol (ed. R.D. Hall) Vol. 111, pp. 83-94. Wageningen: Springer Protocols.

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

Castillo, N.R.F., Bassil, N.V., Wada, S. and Reed, B.M. 2010. Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 46: 246–256.

Chen, X.L., Li, J.H., Xin, X., Zhang, Z.E., Xin, P.P. and Lu, X.X. 2011. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. South African Journal of Botany 77: 397–403.

Cornejo, M.J., Wong, V.L. and Blechi, A.E. 1995. Cryopreservation callus: a source of protoplast for rice transformation. Plant Cell Reports 14: 210-214.

Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Rudolph, A.S., Wistrom, C.A., Spargo, B.J. and Anchordoguy, T.J. 1989. Interactions of sugars with membranes. Biochimica et Biophysica Acta 947: 367–384.

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

Dumet, D. and Benson, E.E. 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. *In* Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application (eds. F. Engelmann and H. Takagi) Vol. 8, pp. 43-56. Rome: Japanese International Research Center for Agricultural Sciences and IPGRI, IPGRI.

Dumet, D., Engelmann, F., Chabrillange, N. and Duval, Y. 1993. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. Plant Cell Reports 12: 352-355.

Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resource. *In* Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Progress and Applications (eds. F. Engelmann and H. Takagi) Vol. 8, pp. 8-20. Rome: Japanese International Research Center for Agricultural Sciences and IPGRI, IPGRI.

Engelmann, F., Dumet, D., Chabrillange, N., Abdelnour-Esquivel, A., Assy-Bah, B., Dereuddre, J. and Duval, Y. 1995. Cryopreservation of zygotic and somatic embryos from recalcitrant and intermediate-seed species. Plant Genetic Resources Newsletter 103: 27-31.

Gamez-Pastrana, R., Martinez-Ocampo, Y., Beristain, C.I. and Gonzalez-Arnao, M. 2004. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification. CryoLetters 25: 405–414.

Gonzalez-Arnao, M.T., Urra, C., Engelmann, F., Ortiz, R. and de la Fe, C. 1999. Cryopreservation of encapsulated sugarcane apices: Effect of storage temperature and storage duration. CryoLetters 20: 347–352.

Gonzalez-Benito, M.E., Martin, C. and Vidal, J.R. 2009. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of the Spanish grapevine cultivars 'Albarino' and 'Tempranillo'. Vitis 48: 131–136.

Haggman, H., Ryynanen, L., Aronen, T. and Krajnakova, J. 1998. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. Plant Cell, Tissue and Organ Cultures 54: 45–53.

Harding, K. 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. CryoLetters 25: 3–22.

Harding, K. and Benson, B.B. 2001. The use of microsatellite analysis in *Solanum tuberosum* L. *in vitro* plantlets derived from cryopreserved germplasm. CryoLetters 22: 199-208.

Helliot, B., Madur, D., Dirlewanger, E., and de Boucaud, M.T. 2002. Evaluation of genetic stability in cryopreserved Prunus. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 38: 493–500.

Jokipii, S., Ryynanen, L., Kallio, P. T., Aronen, T. and Haggman, H. 2004. A cryopreservation method maintaining the genetic fidelity of a model forest tree (*Populus tremula* L.× *Populus tremuloides* Michx.). Plant Science 166: 799–806.

Keller, E.R.J. 2005. Improvement of cryopreservation results in garlic using low temperature preculture and high-quality *in vitro* plantlets. CryoLetters 26: 357–366.

Kim, H.M., Shin, J.H. and Sohn, J.K. 2006. Cryopreservation of somatic embryos of the herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by air drying. Cryobiology 53: 69-74.

Krajnakova, J., Sutela, S., Aronen, T., Gomory, D., Vianello, A. and Haggman, H. 2011. Long-term cryopreservation of Greek fir embryogenic cell lines: recovery, maturation and genetic fidelity. Cryobiology 63: 17-25.

Lambardi, M., de Carlo, A. and Capuana, M. 2005. Cryopreservation of embryogenic callus of *Aesculus hippocastanum* L. by vitrification/one-step freezing. CryoLetters 26: 185–192.

Maizura, I., Rajanaidu, N., Zakri, A.H. and Cheah, S.C. 2006. Assessment of genetic diversity in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Genetic Resources and Crop Evolution 53: 187–195.

Martinez, M.T., Ballester, A. and Vieitez, A.M. 2003. Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* using desiccation and vitrification procedures. Cryobiology 46: 182–189.

Mazur, P. 2004. Principles of cryobiology. *In* Life in the Frozen State (eds. B.J. Fuller, N. Lane and E.E. Benson) pp. 5–55. London: CRC Press.

Mubmann, V., Serek, M. and Winkelmann, T. 2006. Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Clyclamen persicum* Mill. *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding (eds. M.G. Fari, I. Holb and D. Gy) Vol. 725, pp. 391-394. Bisztray: Acta Horticulturae.

Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, A.Y. and Matsuzawa, T. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification method. Plant Science 91: 67–73.

Panis B. 2009. Cryopreservation of *Musa* germplasm. *In* Technical Guidelines No. 9 (eds. F. Engelmann and E. Benson) pp.1-51. Montpellier: Bioversity International.

Panis, B., Thinh, N.T., Escalant, J.V. and Sharrock, S. 2001. Cryopreservation of Musa germplasm. Montpellier: International Network for the Improvement of Banana and Plantain, INIBP.

Parani, M., Lakshmi, M., Senthilkumar, P., Ram, N. and Parida, A. 1998. Molecular phylogeny of mangroves V. Analysis of genome relationships in mangrove species using RAPD and RFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 97: 617-625.

Pattnaik, S.K., Saboo, Y. and Chand, P.K. 1995. Efficient plant retrieval from alginate encapsulated vegetative buds of mature mulberry trees. Scientia Horticulturae 61: 227-239.

Peredo, E.L., Arroyo-Garcia, R., Reed, B.M. and Revilla, M.A. 2008. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). Cryobiology 57: 234–241.

Purba, A.R., Noyer, J.L., Baudouin, L., Perrier, X., Hamon, S. and Lagoda, P.J.L. 2000. A new aspect of genetic diversity of Indonesian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) revealed by isoenzyme and AFLP markers and its consequences for breeding. Theoretical and Applied Genetics 10: 956–961.

Rival, A., Bertrand, 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.

Reinhoud, P.J., Van Iren, F. and Kijne, J.W. 2000. Cryopreservation of differentiated plant cells. *In* Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application (eds. F. Engelmann and H. Takagi) pp. 91–102. Rome: Japan International Research Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba/ International Plant Genetic Resources Institute.

Salaj, T. Matusikova, I. Swennen, R., Panis, B. and Salaj, J. 2012. Long-term maintenance of *Pinus nigra* embryogenic cultures through cryopreservation. Acta Physiologiae Plantarum 34: 227–233.

Sakai, A. 2000. Development of cryopreservation technology. *In* Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Progress and Applications. (eds. F. Engelmann and H. Takagi) Vol. 8, pp. 1-7. Rome: Japanese International Research Center for Agricultural Sciences and IPGRI, IPGRI.

Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports 9: 30-33.

Sanchez, C., Martinez, M.T. Vida, N. San-Jose, M.C., Valladares, S. and Vieitez, A.M. 2008. Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from mature trees and RAPD analysis of genetic stability. CryoLetters 29: 493–504.

Sanputawong, S. and Te-chato, S. 2011. Analysis of somaclonal variation of callus, somatic embryo and plant regeneration of *in vitro* oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Journal of Agricultural Technology 7: 531-545.

Sen-Rong, H. and Ming-Hua, Y. 2012. A simple and efficient protocol for cryopreservation of embryogenic calli of the medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* Bunge by vitrification. Plant Cell, Tissue and Organ Cultures 109: 287–296.

Shah, F.H., Rashid, O., Simons, A.J. and Dunsdon, A. 1994. The utility of RAPD markers for the determination of genetic variation in oil palm *(Elaeis guineensis*). Theoretical and Applied Genetics 89: 713-718.

Sharaf, S.A., Shibli, .A., Kasrawi, M.A. and Baghdadi S.H. 2012. Cryopreservation of wild Shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) shoot-tips by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. Plant Cell, Tissue and Organ Cultures 108: 437–444.

Shimonishi, K., Ishikawa, M., Suzuki, S. and Oosawa, K. 2000. Cryopreservation of melon somatic embryos by desiccation method. *In* Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm (eds. F. Engelmann and H. Takagi) Vol.8, pp. 167-171. Rome: International Plant Genetic Resources Institute.

Singh, A., Kumar, J. and Kumar, P. 2008. Effects of plant growth regulators and sucrose on post harvest physiology, membrane stability and vase life of cut spikes of gladiolus. Plant Growth Regulation 55: 221–229.

Singh, R., Nagappan, J., Tan, S.G., Panandam, J.M. and Cheah, S.C. 2007. Development of simple sequence repeat (SSR) markers 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.

Suranthran, P., Gantait, S., Sinniah, U.R., Subramaniam, S. Alwee, S.S.R.S. and Roowi, S.H. 2012. Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids. Plant Growth Regulatory 66: 101–109.

Takagi, H., Tien-Thinh, N., Islam, O., Senboku, M. and Sakai, A. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schoot] by vitrification: Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. Plant Cell Reports 16: 594-599.

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

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

Touchell, D.H., Chiang, V.L. and Tsai, C.J. 2002. Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. Plant Cell Reports 21:118–124.

Valladares, S., Toribio, M., Celestino, C. and Vieitez, A.M. 2004. Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. Cryoletters 25: 177–186.

Vicient, C.M. and Martinez, F.X. 1998. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. Revista Bralilensileira de Fisiologia Vegetal 10: 1-12.

Villalobos, V.M., Ferreira, P.M. and Mora, A. 1991. The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. Biotechnology Advances 9: 197-215.

Whiters, L.A. 1985. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. *In* Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Cell Growth, Nutrition, Cytodifferentiation and Cryopreservation (ed. J.K. Vasil) Vol. 2, pp. 253-316. Florida: Orlando, Academic Press Inc.

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

Wu, Y.J., Huang, X.L., Chen, Q.Z., Li, X.J. and Engelmann, F. 2007. Induction and cryopreservation of embryogenic cultures from nucelli and immature cotyledon cuts of mango (*Mangifera indica* L. *var* Zihua). Plant Cell Reports 26: 161–168.

Wu, Y.J., Huang, X.L., Xiao, J.N., Li, X.J., Zhou, M.D. and Engelmann, F. 2003. Cryopreservation of mango (*Mangifera indica* L.) embryogenic cultures. CryoLetters 24: 303–314.

Zhai, Z., Wu, Y., Engelmann, F., Chen, R. and Zhao, Y. 2003. Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved *in vitro* cultured grape and kiwi shoot tips using RAPD. CryoLetters 24: 315–322.

ภาคผนวก

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Te-chato (2000)

1. TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

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

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. SDS ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

SDS	5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. Ammonium acetate ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ammonium acetate	38.54	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยมิลลิพอร์

สารเคมีที่ใช้ในการทำ Agarose gel electrophoresis

1. TAE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	121.1	กรัม
Acetic acid	28.5	มิลลิลิตร
0.5M Na_2EDTA (pH 8.0)	50.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

2. TBE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	216.0	กรัม
Boric acid	110.0	กรัม
0.5M Na_2EDTA (pH 8.0)	80.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 4 ลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า และนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้

3. DNA sample buffer

Bromophenol blue	125.0	มิลลิกรัม
Xylene cyanol FF	125.0	มิลลิกรัม

Glycerol	15.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

4. Ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรต่อ Ethidium bromide 1 กรัม

สารเคมีที่ใช้ในการทำ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

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

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

3. TBE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tris Base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5M Na_2EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้ เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า

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

Ammonium persulfate	1.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

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

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

ควรแบ่งสารละลายใส่หลอดเล็ก แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. Bind silane สำหรับทากระจกแผ่นหลังที่ติดกับเจล

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

สารเคมีที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอด้วย Silver nitrate

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

Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. 0.2% Silver nitrate เตรียมปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Silver nitrate	2.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. Develop solution เตรียมปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Sodium carbonate	25.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขณะใช้ให้เติม 40% Formaldehyde 500 ไมโครลิตร และ Sodium thiosulfate เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1650.00
KNO_3	1900.00
KH_2PO_4	170.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
ธาตุเหล็ก	
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10
Glycine	2.00
Sucrose	30,000.00
วุ้น	7,500.00
pH 5.7	

ตารางภาคผนวกที่ 2 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร wood plant medium (WPM)

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	400.00
KH_2PO_4	170.00
K_2SO_4	990.00
$CaCl_2.2H_2O$	96.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
$Ca(N0_3)_24H_2O$	556.00
ธาตุอาหารรอง	
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60
$CuSO_4.5H_2O$	6.25
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
ธาตุเหล็ก	
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	1.00
Glycine	2.00
Sucrose	30,000.00
วุ้น	7,500.00
pH 5.7	

ตารางภาคผนวกที่ 3 ความแปรปรวนของน้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังจาก preconditioning บนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 6 ระดับ (CON) คือ 0.0874 (ชุดควบคุม) 0.10 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 5 ระดับ (TIM) คือ 1 3 5 7 และ 9 วัน แล้วเก็บหรือไม่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (LN) ก่อนการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	7	32455.18	4636.45	1.83ns	0.0799
LN	1	7147492.35	7147492.35	2822.21**	0.0001
TIM	4	22098.60	5524.65	2.18ns	0.0799
LNxTIM	4	20360.05	5090.01	2.01ns	0.0923
CON	5	725917.39	145183.48	57.33**	0.0001
LNxCON	5	600118.32	120023.65	47.39**	0.0001
TIMxCON	20	209984.88	10499.24	4.15**	0.0001
LNxTIMxCON	20	177706.19	8885.31	3.51**	0.0001
Error	413	1045960.00	2532.59		
Total	479	9982092.978			

C.V. = 25.51%

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 4 ความแปรปรวนของจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจาก preconditioning บนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 6 ระดับ (CON) คือ 0.0874 (ชุดควบคุม) 0.10 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 5 ระดับ (TIM) คือ 1 3 5 7 และ 9 วัน แล้วเก็บหรือไม่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (LN) ก่อนการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	7	51.86	7.41	1.30ns	0.2509
LN	1	4350.05	4350.05	760.61**	0.0001
TIM	4	418.38	104.60	18.29**	0.0001
LNxTIM	4	402.96	100.74	17.61**	0.0001
CON	5	614.43	122.89	21.49**	0.0001
LNxCON	5	605.38	121.08	21.17**	0.0001
TIMxCON	20	324.24	16.21	2.83 **	0.0001
LNxTIMxCON	20	329.42	16.47	2.88 **	0.0001
Error	413	2362.01	5.719		
Total	479	9458.75			

C.V. = 79.11%

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 5 ความแปรปรวนของน้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังจากแช่ในสารละลาย vitrification ชนิดต่าง ๆ (TRT) เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ก่อนการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	4	3798.29	949.57	1.13ns	0.3790
TRT	4	336606.67	84151.67	99.80**	0.0001
Error	16	13491.80	843.24		
Total	24	353896.76			

C.V. = 17.13 %

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 6 ความแปรปรวนของจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากแช่ในสารละลาย vitrification ชนิดต่าง ๆ (TRT) เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ก่อนการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	4	7.58	1.896	2.63ns	0.0732
TRT	4	543.69	135.922	188.58**	0.0001
Error	16	11.53	0.721		
Total	24	562.81			

C.V. = 22.92%

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 7 ความแปรปรวนของน้ำหนักสดเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังจาก preconditioning และแช่ในสารละลายดัดแปลง PVS2 เป็นเวลา 4 ระดับ (T) คือ ที่อุณหภูมิ 2 (N) คือ และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 2 ระดับ (M) ก่อนการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	5	69193.70833	13838.742	1.65ns	0.1575
M	1	1513028.16667	1513028.167	180.32**	0.0001
N	1	106533.37500	106533.375	12.70**	0.0006
MxN	1	200934.00000	200934.000	23.95**	0.0001
T	3	621865.87500	207288.625	24.70**	0.0001
MxT	3	732228.41667	244076.139	29.09**	0.0001
NxT	3	56726.04167	18908.681	2.25ns	0.0890
MxNxT	3	19714.08333	6571.361	0.78ns	0.5070
Error	75	629308.29	8390.777		
Total	95	3949531.958			

C.V. = 43.21%

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 8 ความแปรปรวนของจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจาก preconditioning และแช่ในสารละลายดัดแปลง PVS2 เป็นเวลา 4 ระดับ (T) คือ ที่อุณหภูมิ 2 (N) คือ และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 2 ระดับ (M) ก่อนการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	5	13.72	2.74	0.44ns	0.8190
M	1	753.76	753.76	120.94**	0.0001
N	1	3.01	3.01	0.48ns	0.4892
MxN	1	1.26	1.26	0.20ns	0.6542
T	3	419.78	139.93	22.45**	0.0001
MxT	3	491.53	163.84	26.29**	0.0001
NxT	3	12.61	4.20	0.67ns	0.5703
MxNxT	3	5.03	1.68	0.27ns	0.8475
Error	75	467.44	6.23		
Total	95	2168.16			

C.V. = 80.69 %

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 9 ความแปรปรวนของจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากหุ้มด้วยวุ้นแอลจิแนตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (TRT) คือ 1 2 3 และ 4 % ก่อนการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	5	2.83	0.57	1.13ns	0.3852
TRT	3	336606.67	13.17	26.33**	0.0001
Error	15	39.50	0.5		
Total	23	49.83			

C.V. = 22.93 %

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 10 ความแปรปรวนของจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจาก preconditioning แล้วหุ้มด้วยวุ้นแอลจิแนตที่ความเข้มข้น 3 % ก่อนแช่ในสารละลาย LS เป็นระยะเวลา 6 ระดับ (TRT) คือ 0 ½ 1 2 3 และ 4 วัน ก่อนนำไปวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	9	13.52	1.50	0.81ns	0.6090
TRT	5	88.08	17.61	9.50**	0.0001
Error	45	83.40	1.85		
Total	59	185.00			

C.V. = 41.79 %

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 11 ความแปรปรวนของจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจาก preconditioning แล้วหุ้มด้วยวุ้นแอลจิแนตที่ความเข้มข้น 3 % ก่อน dehydration ด้วยลมในตู้ laminar flow เป็นระยะเวลา 6 ระดับ (TRT) คือ 0 2 4 6 8 และ 10 ชั่วโมง ก่อนนำไปวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	3	18.79166667	6.26388889	1.92ns	0.1699
TRT	5	78.87500000	15.77500000	4.83**	0.0078
Error	15	48.96	3.26		
Total	23	146.62			

C.V. = 37.06 %

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 12 ความแปรปรวนของน้ำหนักเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังจาก dehydration ด้วยลมในตู้ laminar flow เป็นระยะเวลา 5 ระดับ และซิลิกาเจล เป็นระยะเวลา 6 ระดับ (TRT) ก่อนนำไปวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	2	4399.19	2199.59	1.32 ns	0.2883
TRT	10	103352.00	10335.20	6.22**	0.0003
Error	20	33217.90	1660.89		
Total	32	140969.08			

C.V. = 9.24%

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 13 ความแปรปรวนของจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจาก dehydration ด้วยลมในตู้ laminar flow เป็นระยะเวลา 5 ระดับและซิลิกาเจล เป็นระยะเวลา 6 ระดับ (TRT) ก่อนนำไปวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	2	0.68	0.34	0.20ns	0.8229
TRT	10	109.23	10.92	6.30**	0.0002
Error	20	34.65	1.73		
Total	32	144.56			

C.V. = 37.31%

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 14 ความแปรปรวนของน้ำหนักเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังจาก preconditioning บนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อน dehydration ด้วยลมในตู้ laminar flow เป็นระยะเวลา 5 ระดับ และซิลิกาเจล เป็นระยะเวลา 6 ระดับ (TRT) ก่อนนำไปวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	2	23.72	11.86	0.42ns	0.6654
TRT	10	1021.47	102.15	3.58**	0.0073
Error	20	570.57	28.53		
Total	32	1615.76			

C.V. = 7.15%

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

**: แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 15 ความแปรปรวนของจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอหลังจาก preconditioning บนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อน dehydration ด้วยลมในตู้ laminar flow เป็นระยะเวลา 5 ระดับ และซิลิกาเจล เป็นระยะเวลา 6 ระดับ (TRT) ก่อนนำไปวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	2	0.50	0.25	0.92ns	0.4151
TRT	10	7.88	0.79	2.87*	0.0215
Error	20	5.49	0.27		
Total	32	13.88			

C.V. = 192.19% ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ 16 ความแปรปรวนของน้ำหนักเฉลี่ยของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังจาก preconditioning บนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน และ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 4 วัน ก่อน dehydration ด้วยซิลิกาเจล เป็นระยะเวลา 6 ระดับ (TRT) คือ 3 6 9 12 15 18 21 และ 24 วันก่อนนำไปวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	9	78336.406	8704.045	1.29ns	0.2497
TRT	15	4396052.544	293070.170	43.32**	0.0001
Error	135	913244.89	6764.78		
Total	159	5387633.84			

C.V. = 31.22% ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

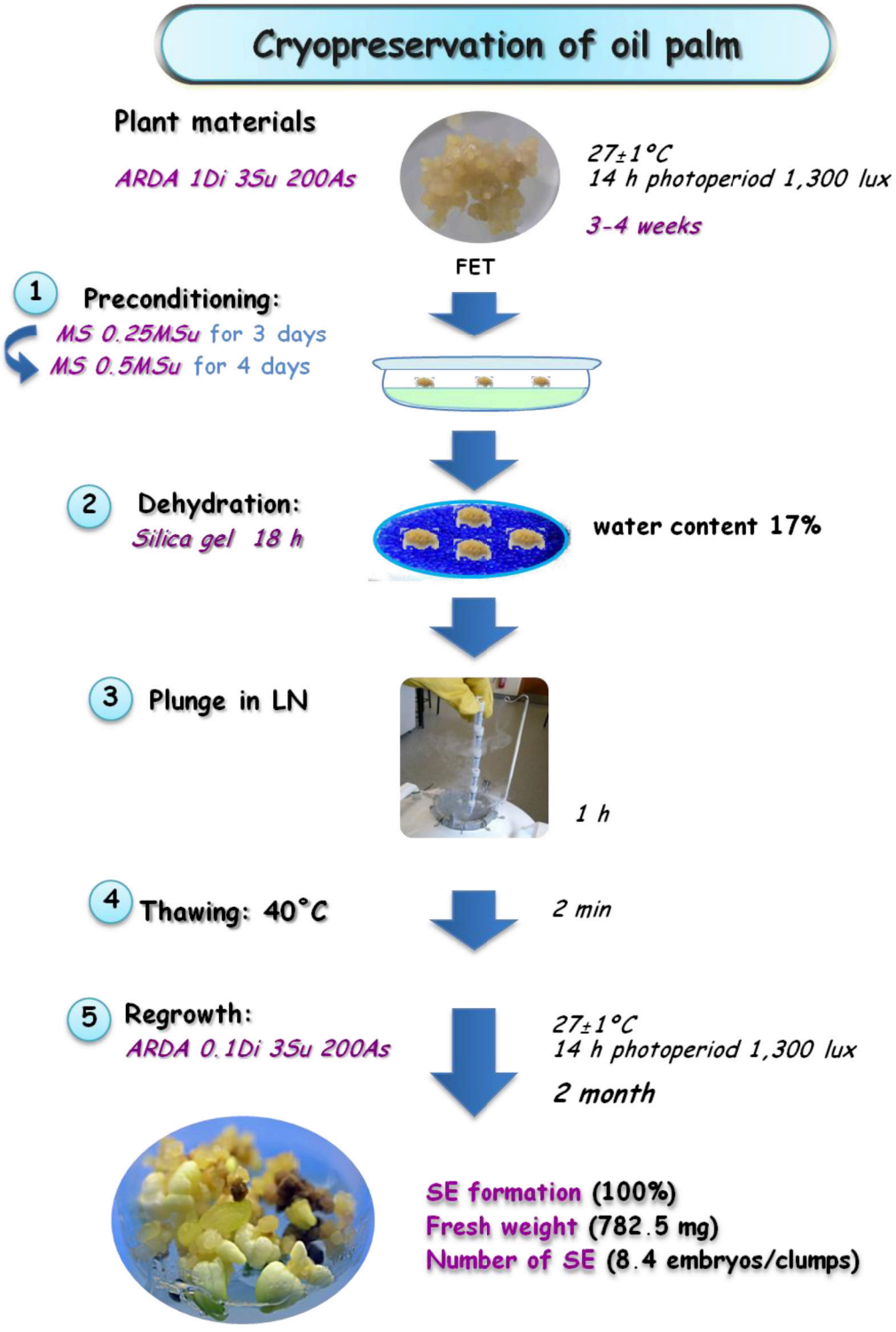
ตารางภาคผนวกที่ 17 ความแปรปรวนของจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจาก preconditioning บนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน และ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 4 วัน ก่อน dehydration ด้วยซิลิกาเจล เป็นระยะเวลา 6 ระดับ (TRT) คือ 3 6 9 12 15 18 21 และ 24 วันก่อนนำไปวางเลี้ยงในอาหารสูตร ARDA เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F Value	Pr > F
REP	9	10.8812500	1.2090278	1.29ns	0.2473
TRT	15	708.8937500	47.2595833	50.47**	0.0001
Error	135	126.42	0.94		
Total	159	846.19			

C.V. = 69.43%

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**: แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)



ภาพภาคผนวกที่ 1 ขั้นตอนการเก็บรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวทัศนี ขาวเนียม

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010630003

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2548

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนบัณฑิตสงขลานครินทร์ แบบ 2 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์ สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ

ทุนภายใต้ความร่วมมือ (MOU) ระหว่างคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กับมหาวิทยาลัยมิยาซากิ ประเทศญี่ปุ่น สนับสนุนเงินทุนจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ทัศนี ขาวเนียม และสมปอง เตชะโต. 2552. ผลของระยะเวลาการปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยน้ำตาลซูโครสต่อการเก็บรักษาไนโตรเจนเหลวของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา. วิทยาศาสตร์เกษตร 40: 222-225.

Khawnium, T. and, Te-chato, S. 2011. Simple vitrification protocol for cryopreservation of oil palm using embryogenic culture. Journal of Agricultural Technology 7(2): 519-529.

Khawniam, T. and, Te-chato, S. 2012. Cryopreservation of Embryogenic Callus of Hybrid Tenera Oil Palm by Vitrification and Dehydration Technique and Evaluation of Somaclonal Variation by SSR Marker. Journal of Agricultural Technology. (อยู่ในระหว่างการดำเนินการ)