การใช้เครื่องหมายโมเลกุลและเทคนิคโฟลไซโทเมทรีในการตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง

Molecular Markers and Flow Cytometry for Identification of Abnormal Oil Palm Plantlet *In Vitro*

วราภรณ์ หีดฉิม

Waraporn Heedchim

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลและเทคนิคโฟลไซโทเมทรีในการตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นางสาววราภรณ์ หีดฉิม

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

…….....ประธานกรรมการ

(ดร.สุภาวดี รามสูตร)

…..…… .....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

…..…….....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ธีระ เอกสมทราเมษฐ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……..……

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

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

ลงชื่อ.....
(นางสาววราภรณ์ หีดฉิม)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาววราภรณ์ หีดฉิม)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลและเทคนิคโฟลไซโทเมทรีในการตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นางสาววราภรณ์ หีดฉิม

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลและเทคนิคโฟลไซโทเมทรีในการตรวจสอบต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ลูกผสมเทเนอรา C3/77(25) ที่ผิดปกติในรูปแบบของการเกิดดอก ในหลอดทดลอง 5 ลักษณะ จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ลักษณะมีความกว้างและความสูงของดอกใกล้เคียงกัน แต่มีลักษณะดอกแตกต่างกันอย่างชัดเจน การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย โมเลกุลได้ดำเนินการตรวจสอบทั้งเครื่องหมายอาร์เอพีดี (Random Amplification of Polymorphic DNA; RAPD) และเอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat; SSR) สำหรับเครื่องหมายอาร์เอพีดี ใช้ไพรเมอร์จำนวน 11 ไพรเมอร์ คือ OPAB01 OPAB09 OPAB14 OPB08 OPT06 OPR11 OPJ04 OPN15 OPA03 OPB04 และ OPB18 พบว่า มี 3 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในต้นกล้าปาล์มน้ำมันดังกล่าวได้ โดยไพรเมอร์ OPAB14 ให้อัตราโพลีมอร์ฟิซึมสูงสุด 60 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเครื่องหมายเอสเอสอาร์ได้ดำเนินการตรวจสอบทั้งบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ และเจลโพลีอะคลิลาไมด์ ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 9 คู่ไพรเมอร์ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 การตรวจสอบบนเจลอะกาโรส พบว่า มี 5 คู่ไพรเมอร์ที่ สามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอได้ โดย ไพรเมอร์ EgCIR0905 ให้อัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึม สูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 520 และ 700 คู่เบส และไพรเมอร์ EgCIR1772 ให้อัตราการเกิดโพลีมอร์-ฟิซึมสูงสุดที่ 75 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 370 380 และ 400 คู่เบส หลังจากตรวจสอบบนแผ่นเจลโพลีอะคลิลาไมด์ และการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรีในต้นกล้า ปาล์มน้ำมัน โคลนกระบี่ พบว่ าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกมีปริมาณดีเอ็นเอ 3.54 พิโคกรัม ซึ่งน้อยกว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 3.69 พิโคกรัม ให้ผลสอดคล้องกับเครื่องหมายเอสเอสอาร์ที่พบว่าแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่

ออกดอกในหลอดทดลองขาดหายไปเมื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ หลังจากตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0243 การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า การใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้ผลดีกว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดี และการใช้เจลอะกาโรส เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวกลางแยกแถบดีเอ็นเอ ช่วยประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย ขั้นตอนในการดำเนินการ และลดความเสี่ยงในการเตรียมสารเคมีอันตรายต่างๆ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันในอนาคต

Thesis Title	Molecular Markers and Flow Cytometry for Identification of Abnormal Oil Palm Plantlet *In Vitro*
Author	Miss Waraporn Heedchim
Major Program	Plant Science
Academic Year	2014

ABSTRACT

Abnormal plantlets of oil palm hybrid tenera C3/77(25) in form of *in vitro* flowering (IVF) were investigated using molecular markers and flow cytometry. For morphological characteristic of IVF, the result showed that each abnormal traits of oil palm plantlets was different in width and height of flowers. For molecular markers both random amplified of polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) analysis were carried out. For RAPD marker, 11 primers; OPAB01, OPAB09, OPAB14, OPB08, OPT06, OPR11, OPJ04, OPN15, OPA03, OPB04 and OPB18 were used. The results showed that OPAB14 gave the highest polymorphisms of DNA banding at 60%. In case of SSR marker, 2.5% agarose gel and polyacrylamide gel electrophoresis were carried out together with 9 primers including; EgCIR0008, EgCIR0243, EgCIR0337, EgCIR0409, EgCIR0446, EgCIR0465, EgCIR00781, EgCIR0905 and EgCIR1772. The results showed that EgCIR0905 gave the highest polymorphisms of DNA banding at 50% and gave specific band at 520 and 700 bp by using 2.5% agarose gel electrophoresis, whereas, EgCIR1772 gave polymorphisms of DNA banding at 75% and gave specific band at 370 380 and 400 bp by using polyacrylamide gel electrophoresis. In case of flow cytometry investigation, hybrid tenera from Krabi clone which produce flower *in vitro* had DNA content at 3.54 picrogram less than that of non-flowering one which had DNA content at 3.69 picrogram, The result is consistent with SSR marker which showed that DNA patterns from IVF were less than normal plant after analysis with EgCIR0243. Therefore, with the present study it can be concluded that RAPD and SSR marker can be used to identify abnormal oil palm plantlet *in vitro* but SSR marker is

better than RAPD marker. Agarose gel electrophoresis is superior than acrylamide gel electrophoresis due to its simple step by step method of preparation which saves time and money and low risk of chemical contamination. This present study will be useful for micropropagation and breeding program of oil palm in the future.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักเป็นอย่างสูง ที่ คอยอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ ความเข้าใจ และแนวทางในการปฏิบัติการด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การทำวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณดร. สุภาวดี รามสูตร ประธานกรรมการ สอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ในการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำต่างๆ รวมถึงการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องภายในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องชาย รวมทั้งญาติพี่น้องทุกท่าน ที่คอยอบรบสั่งสอน ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน และเลี้ยงดูตลอดจนการให้ทุนการศึกษาและให้กำลังใจจนข้าพเจ้าได้เรียนจนจบระดับปริญญาโท

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ให้ความรู้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ชาวพืชศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ร่วมทำกิจกรรมและให้การพึ่งพาอาศัยกันจนสำเร็จการศึกษา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ และสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน ระยะที่สอง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูกทุกท่านที่คอยเป็นกำลังใจ โดยเฉพาะนางสาวชญานีย์ สังวาลย์ ที่เป็นทั้งพี่ ทั้งเพื่อน คอยให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาในทุกๆ ด้าน ทั้งในด้านงานวิจัยและการดำเนินชีวิต รวมทั้งเพื่อนๆ คนอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวถึง ที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำในการดำเนินชีวิตและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมาตลอดจนทุกสิ่งทุกอย่างที่ดลบันดาลให้ข้าพเจ้าได้ทำงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

วราภรณ์ หีดฉิม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(13)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(17)
บทที่	
1.บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	17
2.วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	18
วัสดุ อุปกรณ์	18
วิธีการศึกษา	24
3.ผล	33
4.วิจารณ์	78
5.สรุป	84
เอกสารอ้างอิง	86
ภาคผนวก	95
ประวัติผู้เขียน	101

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณน้ำมันที่ได้จากปาล์มน้ำมันและพืชน้ำมันอื่น ๆ	5
2	พืชสวนที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	6
3	ความแตกต่างในจำนวนอัลลีล และ Diversity indices ในพืชสำคัญ 6 ชนิด ที่ตรวจพบโดยไมโครแซทเทลไลท์	13
4	เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช	14
5	ชนิดและลำดับเบสของไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง	27
6	ชนิดและลำดับเบสของไพรเมอร์เอสเอสอาร์ที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง	29
7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	34
8	ชนิดไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และ อัตราการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี	39
9	ชนิดไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ และแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละลักษณะหลังตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี	46
10	ชนิดไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และอัตราการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจากการตรวจสอบด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลอะกาโรส 2.5 เปอร์เซ็นต์	49
11	ชนิดไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ และแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละลักษณะหลังตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์	55
12	ชนิดไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และอัตราการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลโพลีอะคลิลาไมด์	58

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	ชนิดไพรเมอร์ และขนาดของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ ทั้ง 6 ลักษณะ ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลโพลีอะคลิลาไมด์	68
14	ขนาดจีโนมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลอง	70
15	ปริมาณดีเอ็นเอและค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอของใบต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่สกัดได้	73
16	ชนิดไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และอัตราการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ที่ได้จากการตรวจสอบปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ ด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์	74

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของผลปาล์มน้ำมันแบบต่าง ๆ และการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของผลปาล์มน้ำมันระหว่างดูรา x พิสิเฟอรา	3
2	ภาพผลตัดขวางแสดงลักษณะชั้นเส้นใยของผลปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา	4
3	การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพืช A และ พืช B ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี	8
4	แผนภาพระบบการทำงานของเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์	16
5	การเตรียมวัสดุพืชสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี	17
6	กระบวนการในการชักนำเป็นพืชต้นใหม่ของปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อนชุดที่สอง	19
7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลอง หลังจากวางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร	30
8	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 เดือน	35
9	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลองจากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ	36
10	แถบดีเอ็นเอที่สกัดจากชิ้นส่วนใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลองลักษณะต่าง ๆ ด้วยวิธีการทางคุณภาพเปรียบเทียบกับ λDNA	37
11	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPAB01 และ OPAB09	40
12	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPAB14 และ OPB08	41

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPJ04 และ OPT06	42
14	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPR11 และ OPN15	43
15	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPA03 และ OPB04	44
16	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPB18	45
17	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008 และ EgCIR0243	50
18	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0337 และ EgCIR0409	51
19	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0446 และ EgCIR0465	52
20	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0781 และ EgCIR0905	53

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR1772	54
22	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008	59
23	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0243	60
24	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0337	61
25	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0409	62
26	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0446	63
27	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0465	64
28	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0781	65
29	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0905	66

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
30	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR1772	67
31	ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นข้าวญี่ปุ่นสายพันธุ์ Nipponbare เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน	70
32	ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันใบปาล์มน้ำมันที่ออกดอกในหลอดทดลอง	71
33	ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันใบปาล์มน้ำมันที่ไม่ออกดอกในหลอดทดลอง	72
34	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) EgCIR0008 (ข) EgCIR0243 (ค) EgCIR0337	75
35	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) EgCIR0409 (ข) EgCIR0446 (ค) EgCIR0465	76
36	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) EgCIR0781 (ข) EgCIR0905 (ค) EgCIR1772	77

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

APS = Ammonium persulfate

BA = 6-benzyladenine

Bp = Base pair

CRD = completely random design

CTAB = Hexadecyltrimethylammonium bromide

DMRT = Duncan's multiple range test

DNA = Deoxyribonucleic acid

dNTP = Deoxynucleotide triphosphate

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid

HCl = Hydrochloric acid

IVF = *In vitro* flowering

M = DNA ladder 100 bps

N = Negative control

ng = Nanogram

nm = Nanometer

ns = Non significant

MS = Murashige and Skoog (medium)

$NaCl_2$ = Sodium chloride

Na_2EDTA = Sodium ethylenediaminetetraacetate

OPCM = Oil palm culture medium

PCR = Polymarese chain reaction

pg = Picogram

PI = Propidium iodine

PIC = Polymorphic information content

PLB = Protocorm-like-body

pSE = Primary somatic embryo

PVP = Polyvinyl pyrrolidone

RAPD = Random amplified polomorphic DNA

SD = Standard deviation

SSR = Simple Sequence Repeats

TE = Tris EDTA

TAE = Tris-acetic acid-disodium ethylenediaminetetraacetic acid

TBE = Tris-boric acid- disodium ethylenediaminetetraacetic acid

TEMMED = N,N,N',N'-tetramethyethyenediamine

Tris = Tris (hydroxymethyl) aminomethane

UPGMA = Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

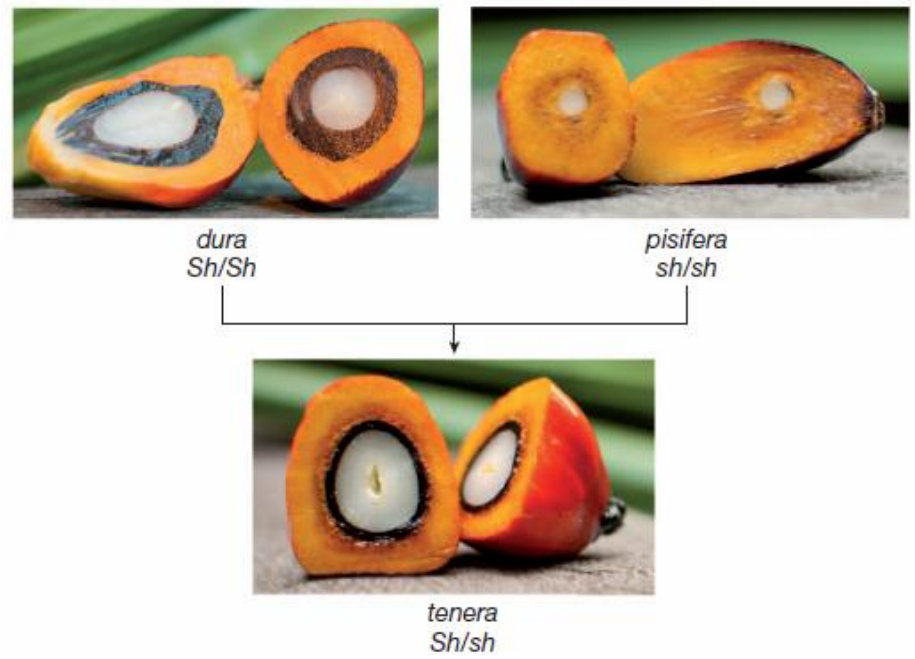
ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของไทย เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ผสมข้ามเนื่องจากมีช่อดอกตัวเมีย และดอกตัวผู้แยกกันอยู่คนละดอกบนต้นเดียวกัน (monoecious) แต่ช่วงระยะเวลาการบานของดอกไม่พร้อมกัน โดยปาล์มน้ำมันที่นิยมปลูกในปัจจุบันเป็นที่รู้จักกันดีคือ ลูกผสมเทเนอรา (tenera) (กะลาปาล์มบาง มีจุดเส้นใยรอบกะลา) ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมทางการค้าที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างต้นแม่ดูรา (dura) (กะลาปาล์มหนา ไม่มีจุดเส้นใยรอบกะลา) และต้นพ่อพิสิเฟอรา (pisifera) (กะลาปาล์มเป็นเยื่อบาง ๆ หุ้มเมล็ดใน มีจุดเส้นใยรอบกะลาที่บาง) (ธีระ และคณะ, 2545) ปัจจุบันการปลูกปาล์มน้ำมันได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ประโยชน์ในด้านของพลังงานทดแทนจากน้ำมันปาล์ม หรือที่รู้จักกัน คือ ไบโอดีเซล จากการที่ประชากรทั่วโลกเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้มีความต้องการใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน แต่เนื่องจากพลังงานที่มีอยู่นั้นมีปริมาณจำกัด จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาแหล่งพลังงานไบโอดีเซลทดแทน ปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งของพลังงานไบโอดีเซลที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากเนื่องจากสามารถให้ผลผลิตและปริมาณน้ำมันสูงเมื่อเทียบกับน้ำมันที่ได้จากพืชอื่น ๆ เช่น ถั่วเหลือง ทานตะวัน คำฝอย หรือ ละหุ่ง เป็นต้น ซึ่งให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงสุด ดังนั้นเมื่อมีความต้องการทางด้านพลังงานเพิ่มมากขึ้น จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการผลิตปาล์มน้ำมันเพิ่มมากขึ้นเพื่อตอบสนองความต้องการใช้ประโยชน์ทั้งในปัจจุบันและอนาคต ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 4.5 ล้านไร่ และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ในอนาคตตามนโยบายส่งเสริมพลังงานทดแทนของรัฐบาลเพื่อลดภาระการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงจากต่างประเทศและสร้างความมั่นคงด้านพลังงานจากทรัพยากรและวัตถุดิบที่มีอยู่ภายในประเทศ น้ำมันปาล์มจึงทวีบทบาทและความสำคัญในฐานะพืชเพียงชนิดเดียวที่ยังคงมีปริมาณคงเหลือจากการบริโภคและสามารถนำมาแปรรูปเป็นพลังงานทดแทนได้ (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาระบบนิเวศเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2556)

โดยธรรมชาติแล้วปาล์มน้ำมันสามารถขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด (ธีระ และคณะ, 2545) แต่วิธีการดังกล่าวมีข้อเสีย คือ ต้องใช้ระยะเวลานาน เทคนิคหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้ได้ปริมาณมากและใช้ระยะเวลาสั้น คือ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตาม ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีโอกาสเสี่ยงต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) เนื่องมาจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเข้มข้นสูงและการย้ายเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลานาน เป็นต้น ส่งผลให้ต้นกล้าปาล์มที่ได้มีลักษณะผิดปกติไปจากเดิม เช่น การออกดอกในหลอดทดลอง นอกจากนี้ การปลูกปาล์มน้ำมันประสบกับปัญหาในเรื่องของพันธุ์ปลอมปนเป็นอย่างมาก ซึ่งเกษตรกรจะต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 3 ปี จึงจะรู้ว่าปาล์มน้ำมันที่ปลูกนั้นเป็นพันธุ์ดีหรือพันธุ์ปลอม ทำให้เสียเวลาและมีค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากได้ผลิตน้อย มีผลผลิตทะลายสด/ไร่/ปี ต่ำกว่าการปลูกปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์แล้ว ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในส่วนของการดูแลเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ ดังนั้นหากมีการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมก่อนที่จะปลูกลงแปลงก็จะช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ เทคนิคที่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้แก่ เทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular technique) และเทคนิคโฟลไซโทเมทรี (flow cytometry) ซึ่งทั้งสองเทคนิคนี้มีข้อดีที่แตกต่างกัน เทคนิคทางชีวโมเลกุลเป็นเทคนิคเฉพาะ แม่นยำสูง ตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Kate-ngam, 2003) ในขณะที่เทคนิคโฟลไซโทเมทรีทำได้ง่าย รวดเร็ว เหมาะสำหรับตรวจสอบกับพืชที่ต้องการวิเคราะห์หลาย ๆ ตัวอย่าง ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลและเทคนิคโฟลไซโทเมทรี เพื่อตรวจสอบความผิดปกติและคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันก่อนปลูกลงแปลงซึ่งสามารถช่วยลดความสูญเสียและค่าใช้จ่ายให้กับเกษตรกรผู้ปลูกสวนปาล์ม

การตรวจเอกสาร

พันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันที่นิยมปลูกในปัจจุบัน คือ ลูกผสมเทเนอรา ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมทางการค้าที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างต้นแม่ดูราและต้นพ่อพิสิเฟอรา (ภาพที่ 1) มีลักษณะเด่น คือ มีกะลาบาง (ประมาณ 0.5 ถึง 4 มิลลิเมตร) มีปริมาณของเส้นใย (Mesocarp) 60 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผลผลผลิตต่อทะลายสูง (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 ลักษณะของผลปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา และการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของผลปาล์มน้ำมันระหว่างดูรา x พิสิเฟอรา

ที่มา: Singh และคณะ (2013)

ภาพที่ 2 ผลตัดขวางแสดงลักษณะชั้นเส้นใยของผลปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา
ที่มา: Taksinpalm (2013)

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันชนิดเดียวที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่มากกว่าพืชน้ำมันอื่น ๆ ทุกชนิด (ตารางที่ 1) และสามารถผลิตได้เฉพาะในเขตพื้นที่ปลูกจำกัดประเภทร้อนชื้นเท่านั้น ซึ่งมีเพียง 42 ประเทศ จาก 223 ประเทศทั่วโลกที่สามารถปลูกได้ ในจำนวนนี้มีเพียงไม่กี่ประเทศที่สามารถปลูกปาล์มน้ำมันได้ผลดี เช่น มาเลเซีย โคลัมเบีย ไทย และอินโดนีเซีย (ธีระและคณะ, 2548) จากการที่ประชากรทั่วโลกเพิ่มขึ้นทำให้ปาล์มน้ำมันได้มีการขยายพื้นที่ปลูกไปทั่วทุกภาคของประเทศ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นพืชน้ำมันที่ให้คุณประโยชน์มากมายทั้งด้านอาหารและพลังงาน ผลตอบแทนของการปลูกปาล์มน้ำมันดีกว่าการปลูกพืชชนิดอื่น เช่น ยางพารา ข้าว เป็นต้น และการดูแลรักษาง่ายกว่า จึงเป็นแรงจูงใจให้เกษตรกรขยายพื้นที่ปลูกประกอบกับมีโครงการเปลี่ยนพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน (ในพื้นที่รกร้าง) เพื่อเพิ่มการผลิตน้ำมันปาล์มดิบให้เพียงพอกับการบริโภค และนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตไบโอดีเซล ลดการนำเข้าพลังงานน้ำมันของประเทศ การขยายพื้นที่ปลูกทั่วทุกภูมิภาคทำให้ผลผลิตปาล์มน้ำมันของไทยเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับในอดีต แม้ว่าผลผลิตปาล์มน้ำมันจะมากขึ้นแต่ก็ยังไม่เพียงพอกับความต้องการใช้ทางด้านอาหารและพลังงานที่มีความจำเป็นมากขึ้นในการดำรงชีวิตทั้งในปัจจุบันและอนาคต นอกจากนี้ยังพบว่าการปลูกปาล์มน้ำมันที่ผ่านมาของเกษตรกรนั้นประสบกับปัญหาภัยพิบัติทางธรรมชาติ เช่น ภัยแล้ง น้ำท่วม เป็นต้น ส่งผลให้ปาล์มน้ำมันขาดตลาด

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำมันที่ได้จากปาล์มน้ำมันและพืชน้ำมันอื่น ๆ

Plant species	Oil yield (kg/ha)
Palm	4000-5000
Rapeseed	1000
Groundnut	890
Sunflower	800
Soybean	375
Coconut	395
Cotton seed	173
Sesame seed	159

ที่มา: Sheil และคณะ (2009)

ความสำคัญของการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชยืนต้นผสมข้าม ปกติใช้เมล็ดในการขยายพันธุ์ สามารถให้ผลผลิตทะลายสดได้ตลอดทั้งปีและมีอายุการเก็บเกี่ยวผลผลิตได้นานมากกว่า 25 ปีขึ้นไป ดังนั้นพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่เกษตรกรนำมาปลูกจึงต้องเป็นพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ดี จึงจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพและลดต้นทุนในการผลิตตลอดอายุการเก็บเกี่ยวของปาล์มน้ำมันได้ (ธีระและคณะ, 2545) ในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันในแปลงปลูกของเกษตรกรใช้เวลา 14 เดือน ตั้งแต่เริ่มเพาะเมล็ดจนกระทั่งพัฒนากลายเป็นต้นกล้าที่พร้อมจะออกปลูกได้ (ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี, 2553) ในขณะที่ต้นกล้าจากการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส (indirect embryogenesis) ใช้ระยะเวลาเพียงแค่ 6-8 เดือน ก็สามารถนำไปอนุบาลเพื่อย้ายออกปลูกลงแปลงต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากต้นกล้าปาล์มหนึ่งต้นพัฒนามาจากเซลล์เพียงแค่หนึ่งเซลล์ จึงเป็นข้อได้เปรียบอย่างหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการขยายพันธุ์โดยเมล็ดที่ต้นกล้าปาล์มหนึ่งต้นได้มาจากหนึ่งเมล็ด แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีข้อดีอยู่มาก แต่ก็ยังคงมีข้อเสียเช่นเดียวกันในเรื่องของความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยเฉพาะรูปแบบของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการขยายพันธุ์แบบ indirect embryogenesis ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นนั้นอาจเกิดมาจากหลายสาเหตุ เช่น การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นสูงและการย้ายเลี้ยงเป็นเวลานาน ซึ่งพืชที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ได้จาก

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายชนิด ได้แก่ พืชตระกูลไม้ประดับ (ornamental) ไม้ผล (fruit) และพืชตระกูลผัก (vegetable) เป็นต้น (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 พืชสวนที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Crop	Source
Ornamental	
Eustoma grandiflorum	Griesbach and Semenniuk (1987); Griesbach *et al*. (1988)
Hemerocallis Yellow Tinkerbell	Griesbach (1989)
Paulownia tomentosa	
Somaclonal Snowstorm	Marcotrigiano and Jagannathan (1988)
Pelargonium Velvet Rose	Skirvin and Janick (1976b)
Torenia UConn White	Brand and Bridgen (1989)
Fruit	
Robus Lincoln Logan	Hall *et al*. (1986b), (1986c)
Vegetable	
Apium UC-T3 Somaclone	Heath-Pagliuso *et al*. (1989)
Ipomoea batatas Scarlet	Moyer and Collins (1983)

ที่มา: Skirvin และคณะ (1994)

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

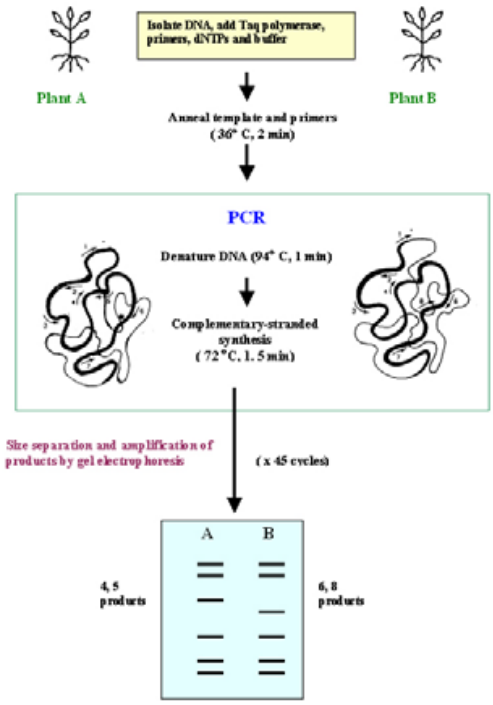
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม เนื่องจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเข้มข้นสูง การย้ายเลี้ยงเป็นเวลานาน พันธุกรรมของพืช ชนิดของชิ้นส่วนพืช เป็นต้น การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้แน่ใจว่าพืชที่จะนำไปปลูกในแปลงนั้นไม่มีความผิดปกติไปจากเดิม เพราะหากมีการนำพืชที่มีความผิดปกติไปปลูกลงแปลงแล้ว ก็จะสร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรได้ โดยเฉพาะพืชที่มีอายุหลายปีกว่าจะให้ผลผลิต เช่น ปาล์มน้ำมัน ยางพารา เป็นต้น ก็จะยิ่งสร้างความเสียหายมากขึ้นเพราะต้องใช้ระยะเวลานานจึงจะสามารถรู้ได้ว่าพืชที่เพาะปลูกนั้นมีความ

ผิดปกติเกิดขึ้นหลังจากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยสายตา ในขณะที่เกษตรกรยังใช้ต้นทุนในการผลิตเท่าเดิมหรือมากกว่าเดิมในกรณีที่ผลผลิตไม่ได้เป็นไปตามมาตรฐานที่ตั้งไว้ อย่างไรก็ตามพบว่าลักษณะดังกล่าวมักผันแปรไปตามการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการจัดจำแนกสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้การเปรียบเทียบลักษณะภายนอกยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ สำหรับการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชมีหลายวิธี เช่น การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เซลล์วิทยา (cytology) สรีรวิทยา (physiology) และการตรวจสอบระดับโมเลกุล (molecular markers) แต่การตรวจสอบระดับเซลล์และโมเลกุลเป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และลดข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลา เพราะสามารถตรวจสอบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช ในที่นี้จะเน้นเครื่องหมายอาร์เอพีดีและเอสเอสอาร์ ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตโดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซมในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือ ออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ โดยพืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี่เองที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกันและสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบรูปแบบของดีเอ็นเอ (DNA pattern) ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้น หมายถึง แบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ นั่นเอง จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตหรือสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้ (Kate-ngam, 2003)

1. เครื่องหมายทางชีวโมเลกุลในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช

1.1 อาร์เอพีดี เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต พืชแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำมาตรวจสอบโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวแบบสุ่มหรือเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า “พีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR)” โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม หากอาร์เอพีดีไพรเมอร์นั้นมีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอของพืชที่นำมาตรวจสอบจะเกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอต้นแบบขึ้น ดังนั้นถ้าสายพันธุ์พืชตัวอย่างที่นำตรวจสอบมีความแตกต่างของสารพันธุกรรมหรือเป็นคนละชนิดกัน ความสามารถในการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะแตกต่างกัน ทำให้ได้จำนวนและชิ้นของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน และสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการบ่งบอกชนิดของสายพันธุ์ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพืช A และ พืช B ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

ที่มา: Kate-ngam (2003)

เครื่องหมายอาร์เอพีดีถูกนำมาใช้งานปรับปรุงพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากวิธีการไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ๆ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นไม่เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนโครโมโซมของพืชที่ต้องการตรวจสอบ ดังนั้นอาร์เอพีดีจึงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ไม่เฉพาะเจาะจงที่ตำแหน่งยีนเหมือนอาร์เอฟแอลพี และความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมของอาร์เอพีดี มักเกิดในลักษณะมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ Salehian และคณะ (2013) ทำการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ คือ RAD1 RAD3 RAD5 RAD7 OPH01 OPH04 OPH05 OPH15 OPH20 และ OPC08 พบว่าไพรเมอร์เหล่านี้ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันขนาด 300 – 1500 คู่เบส และอัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมที่ 33.44 เปอร์เซ็นต์ Munir และคณะ (2011) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแคลลัสมันฝรั่งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog; MS) ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ใช้ไพรเมอร์ในการตรวจสอบทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ คือ OPC1-OPC10 พบว่า ไพรเมอร์เหล่านี้สามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแคลลัสมันฝรั่งได้ โดยให้อัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมที่ 30 เปอร์เซ็นต์ Khoddamzadeh และคณะ (2010) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ protocorm-like-body (PLB) เริ่มต้น PLB อายุ 3 เดือน และ PLB อายุ 6 เดือน ของกล้วยไม้ฟาแลนน๊อฟซิส ที่ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนสูตรอาหาร 1/2MS เปรียบเทียบความแตกต่างกับต้นแม่ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 8 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPU08 OPU10 OPU12 OPU13 OPU16 P12 P14 และ P16 พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมใน PLB อายุ 6 เดือน ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโพลี-มอร์ฟิซึมของรูปแบบดีเอ็นเอเท่ากับ 10.46 Ghartavol และคณะ (2010) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ พบว่า มี 3 ไพรเมอร์ คือ OPC-09 OPR-12 และ OPA-10 ที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ Xing และคณะ (2010) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือม่วงโดยใช้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงจนพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี พบว่าต้นมะเขือที่ได้จากการเพาะเลี้ยงดังกล่าวไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม Martin และคณะ (2002) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเบญจมาศที่ได้

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 4 สายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์มีอัตราการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมแตกต่างกัน

ในปาล์มน้ำมันก็พบว่าได้มีการนำเครื่องหมายอาร์เอพีดีมาใช้เช่นเดียวกันทั้งในด้านการตรวจสอบความเป็นลูกผสม โดย Sathish และ Mohankumar (2007) ได้ใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีในการตรวจสอบพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้งพันธุ์พ่อพิสิเฟอรา แม่ดูรา และลูกเทเนอรา ใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวนถึง 26 ไพรเมอร์ สามารถแยกความแตกต่างของปาล์มน้ำมันทั้งสามลักษณะได้ ธนวดี และคณะ (2552) ได้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 7 ไพรเมอร์ พบว่ามี 3 ไพรเมอร์ที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้และให้แถบดีเอ็นเอที่สม่ำเสมอ

1.2 เอสเอสอาร์ หรือ ไมโครแซทเทลไลท์ หมายถึง ลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ในจีโนม แต่ละชุดประกอบด้วยเบส 1-6 เบส พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด แต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ บางบริเวณก็พบมาก บางบริเวณก็พบน้อยกว่าตามแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์, 2552) ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของ ไมโครแซทเทลไลท์ในโลกัสหนึ่งๆ โดยทั่วไป ไมโครแซทเทลไลท์ประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) ตั้งแต่ 1-6 เบส ตัวอย่างเช่น เบสซ้ำหนึ่งเบสเรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น (A)n เบสซ้ำสองเบส เรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น (CA)n เบสซ้ำสามเบส เรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น (TAA)n และเบสซ้ำสี่เบส เรียกว่า tetra-nucleotide repeat เช่น (GATA)n โดยที่ n เป็นจำนวนครั้งของเบสซ้ำ (Powell *et al*., 1996) ดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่มีโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs จะถูกเพิ่มปริมาณ (amplification) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กที่เรียกว่า primers ซึ่งมีลำดับเบสคู่สม (complementary sequences) ที่สามารถจับคู่กับลำดับเบสที่ขนาบหัวท้ายตำแหน่งของ SSRs เป็นตัวช่วยในการเริ่มต้นการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่ต้องการ (Cobelli *et al*., 2009) โดยนำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายเริ่มต้นปริมาณมากเกินพอ และเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (DNA polymerase) มาใส่ในหลอดทดลองเดียวกัน เมื่อให้ความร้อนสูงขึ้น ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณซึ่งเป็นเกลียวคู่จะแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว แล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว จะทำให้สายเริ่มต้นซึ่งมีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลาย 3’ ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าไปจับกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวได้อย่างถูกต้อง เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของ

เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เอนไซม์ดังกล่าวจะทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของสายเริ่มต้น โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นแม่แบบ ก็จะทำให้ได้โมเลกุลดีเอ็นเอเกลียวคู่เกิดขึ้น กระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นซ้ำแล้วซ้ำอีกหลายๆ รอบ ทุกๆ รอบที่เกิดปฏิกิริยาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของที่มีอยู่เดิม เมื่อทำซ้ำกันหลายรอบ ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้นเป็น 2n เมื่อ n คือ จำนวนรอบที่ทำซ้ำ ด้วยปริมาณดีเอ็นเอขนาดนี้ง่ายต่อการที่จะตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรฟอรีซิสหรือนำมาวิเคราะห์หาลำดับของนิวคลีโอไทด์ต่อไป (ประดิษฐ์, 2550)

มีรายงานการใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิด เช่น Xing และคณะ (2010) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นมะเขือม่วงที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ใบเลี้ยงด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์พบว่าต้นมะเขือม่วงดังกล่าวไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม Malik และคณะ (2011) ได้เพาะเลี้ยงรังไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมของแคนตาลูปจนได้เป็นต้นกล้าและตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ พบว่าต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้ผ่านการผสมมีลักษณะเป็นโฮโมไซกัส (homozygous) ซึ่งแตกต่างจากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ได้จากการผสมที่มีลักษณะเป็นเฮเทโรไซกัส (heterozygous) Siripin และ Jindasing (2012) ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองฝักสด 18 พันธุ์โดยใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ด้วยไพรเมอร์ 95 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์มากถึง 90 ชนิดที่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองได้ Lakote และคณะ (2013) ได้ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไมโครแซทเทลไลท์ของสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) ในพืชภายในสกุล *Jatropha* และ พืชต่างสกุลในวงศ์ *Euphobiaceae* จากการทดสอบไพรเมอร์ จำนวน 17 คู่ พบว่า มีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพืชภายในสกุล *Jatropha* ได้แก่ *J. gossypifolia J. integerrima*, *J. multifida* และ *J. podagica* ได้จำนวน 15 12 11 และ 11 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 88.2 70.6 6.74 และ 64.7 เปอร์เซ็นต์ ของไพรเมอร์ทั้งหมด ตามลำดับ และมีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพืชต่างสกุล ได้แก่ มันสำปะหลัง ยางพารา และละหุ่ง จำนวน 8 5 และ 2 คู่ ไพรเมอร์ คิดเป็น 41.1 29.4 และ 11.8 เปอร์เซ็นต์ ของไพรเมอร์ทั้งหมด ตามลำดับ และพบว่าไพรเมอร์ JCT16 และ JCT27 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในทุกพืชที่ทดสอบ Siripin and Ittirote (2013) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ยาสูบ 39 พันธุ์ โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล คือ เครื่องหมายเอสเอสอาร์ จำนวนไพรเมอร์ที่เลือกใช้ทั้งหมด 20 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์มากถึง 13 ชนิด ที่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมบนชุดโครโมโซมยาสูบทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 65 โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 60 polymorphic alleles และพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์

ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของพันธุ์ยาสูบที่ศึกษาทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.057 ถึง 0.857 วิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA แล้วเขียนแผนภูมิ Dendrogram ด้วยวิธีการของ SAHN ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มพันธุ์ยาสูบออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ Ruttawat และคณะ (2011) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจำนวน 8 พันธุ์โดยใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้คัดแยกลำดับเบสแบบซ้ำ จำนวน 17 คู่ สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังได้ทั้ง 8 พันธุ์ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 96 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 100 ถึง 380 คู่เบส แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน (polymorphic DNA) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.36 ค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.54 ถึง 0.83 และค่า polymorphic information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.66 ถึง 0.90 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วย UPGMA โดยใช้ค่าดัชนีความเหมือนสามารถจัดมันสำปะหลังออกเป็น 3 กลุ่ม

ในปาล์มน้ำมัน มีรายงานการใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ในด้านต่าง ๆ เช่น อัญชลีและสมปอง (2555) ได้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลวด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 9 ไพรเมอร์ พบว่าทั้ง 9 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและไม่พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ Thawaro and Te-chato (2009) ได้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมเทเนอราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 8 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดและสามารถใช้ในการตรวจสอบลูกผสม 366 (D) x 172 (P) Sanputawong and Te-chato (2011) ได้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันลูกผสมที่ขยายพันธุ์ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระยะแคลลัสโซมาติกเอ็มบริโอ และต้นกล้าด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 8 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด สามารถใช้ตรวจสอบความเป็นลูกผสมและความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลูกผสมได้ Inpuay และคณะ (2012) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลานานผ่านโซมาติกเอ็มบริโอระยะที่สองด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 9 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็นโมโนมอร์ฟิซึม แสดงว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันดังกล่าวไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในพืชอีกหลายชนิด (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความแตกต่างในจำนวนอัลลีล และ Diversity indices ในพืชสำคัญ 6 ชนิด ที่ตรวจพบโดยไมโครแซทเทลไลท์

พืช	จำนวนอัลลีล	Diversity indices
มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculenta*)	1-5	Unavailable
ถั่วเหลือง (*Glycine max* and *G. soja*)	11-26	0.71-0.95
ข้าว (*Oryza sativa*)	5-11	0.64-0.90
ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*)	3-37	0.46-0.93
ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*)	2-7	0.29-0.79
ข้าวโพด (*Zea mays*)	2-11	0.40-0.89

หมายเหตุ :

Diversity index = 1 - $\sum p_i^2$, ซึ่ง p_i = allele frequency of the 1st allele

ที่มา: Powell และคณะ (1996)

ข้อดีของการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช

ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการบ่งชี้ความแตกต่างหรือความหลากหลาย (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นลักษณะทางด้านปริมาณ (quantitative traits) หรือลักษณะทางด้านคุณภาพ (qualitative traits) เครื่องหมายดีเอ็นเอนับได้ว่าเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าระหว่างหรือภายในชนิด (species) ประชากร (populations) พันธุ์ (varieties) และสายพันธุ์ (breeding lines) ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำกว่าการใช้ลักษณะรูปร่างหรือสัณฐานของพืช (morphological marker) ที่มักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม (Kate-ngam, 2003) เครื่องหมายเอสเอสอาร์ได้ถูกมาใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์อย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (Marker-Assisted Selection; MAS) การวางตำแหน่งยีน (QTL mapping) และการสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) ในการทำแผนที่โครโมโซม การศึกษาวิวัฒนาการและ

ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต (Kate-ngam, 2003) เนื่องจากใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย มีความน่าเชื่อถือ ถูกต้องและแม่นยำกว่าเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลอื่น ๆ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

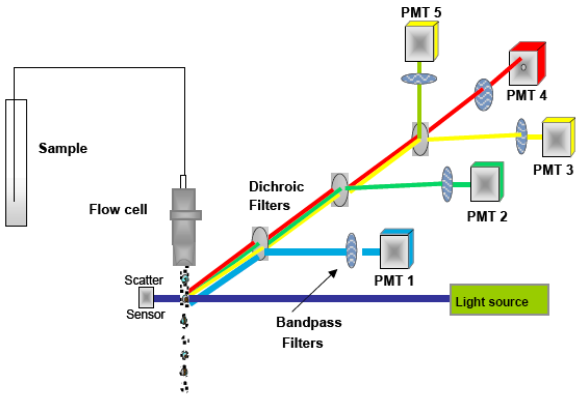
S.N.	Feature	RFLP	RAPD	AFLP	SSRs	SNPs
1	DNA Require (µg)	10	.02	.5-1.0	.05	.05
2	DNA quality	High	High	Moderate	Moderate	High
3	PCR based	No	Yes	Yes	Yes	Yes
4	No. of Polymorph loci analyzed	1-3	1.5-50	20-100	1-3	1
5	Ease of use	Not Easy	Easy	Easy	Easy	Easy
6	Amenable to automation	Low	Moderate	Moderate	High	High
7	Reproducibility	High	Unreliable	High	High	High
8	Development Cost	Low	Low	Moderate	High	High
9	Cost per analysis	High	Low	Moderate	Low	Low

ที่มา: Kumar และคณะ (2009)

2. เทคนิคโฟลไซโทเมทรี

โฟลไซโทเมทรีเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์ขนาดของนิวเคลียสหรือปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบในนิวเคลียสด้วยการฉายแสงเลเซอร์ผ่านเซลล์แล้ววัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้นตามหลักฟิสิกส์ แปรผลออกมาในรูปปริมาณดีเอ็นเอที่ปรากฏในเซลล์หรือกลุ่มเซลล์นั้น ๆ ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในการประเมินปริมาณดีเอ็นเอเนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็วและแม่นยำเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาภายใต้กล้องซึ่งต้องใช้เวลานานและมีความยากในการนับโดยเฉพาะพืชที่มีโครโมโซมจำนวนมาก

เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์เปรียบเสมือนกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของอนุภาคหรือเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในของเหลว โดยใช้แสงยูวีหรือแสงเลเซอร์ในการตรวจจับ ใช้กระจกเป็นตัวกรองแสง แล้วเปลี่ยนสัญญาณแสงเป็นตัวเลข ซึ่งก็คือเซลล์ที่นับได้ ในรูปของฮิสโทแกรมผ่านเครื่องคอมพิวเตอร์ (ภาพที่ 4) ดังนั้น เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญ คือ ของเหลว เลนส์หรือแสง และอิเล็กทรอนิกส์ (Ochatt, 2006) ปัจจุบันเทคนิคนี้เป็นที่นิยมมากขึ้น โดยถูกนำมาประยุกต์ใช้กับพืชมากขึ้นจากที่เริ่มต้นนิยมใช้ในทางการแพทย์ ดังการศึกษาของ Thiem และ Sliwinska (2003) ที่ใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรีในการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของ Cloudberry ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองโดยใช้ชิ้นส่วนยอดที่แตกต่างกัน (ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยอดที่ได้จากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ และยอดที่ได้จากการทำเมล็ดเทียม) และ แคลลัส พบว่า ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน (2C = 8x = 56) แต่แคลลัสที่ชักนำจากคัพภะ พบว่ามีลักษณะเป็น mixoploid (2C, 4C and 8C) และพบว่าขนาดจีโนมของ Cloudberry คือ 2C = 2.46 ± 0.05 พิโคกรัม



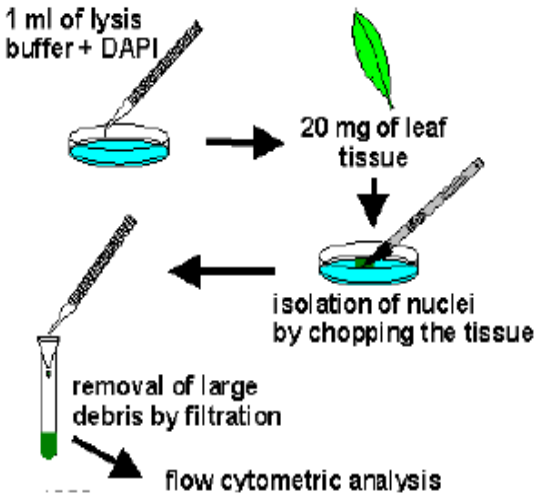
ภาพที่ 4 แผนภาพระบบการทำงานของเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์

ที่มา: Ochatt (2006)

การประยุกต์ใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรีในพืชนั้นส่วนใหญ่พบว่ามักจะใช้ในการตรวจสอบพืชที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซม ดังเช่น การศึกษาของ Rodrigues และคณะ (2011) ใช้ colchicine และ amiprophos-methyl (APM) ในการเพิ่มชุดโครโมโซมในกล้วย แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี พบว่าสามารถชักนำกล้วยได้เป็น mixoploid (2C, 4C and 8C) และ tetraploid (4C) Dutt และคณะ (2010) ทำการศึกษาโดยใช้ colchicine ในการเพิ่มชุดโครโมโซมในส้มโชกุน แล้วใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรีในการตรวจสอบ พบว่าส้มโชกุนที่ชักนำได้มีลักษณะเป็น tetraploid (4C)

ข้อดีของเทคนิคโฟลไซโทเมทรี

เทคนิคโฟลไซโทเมทรีเป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็วและแม่นยำ ในการประเมินปริมาณดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตและกลายเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการประเมินขนาดจีโนมในพืช (Jedrzejczyk and Sliwinska, 2010) เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวมีขั้นตอนไม่ยุ่งยากเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาภายใต้กล้องพบว่าต้องใช้เวลานานและมีความยากในการนับโดยเฉพาะพืชที่มีโครโมโซมจำนวนมาก (ภาพที่ 5) นอกจากใช้ประโยชน์ในการประเมินปริมาณดีเอ็นเอแล้วยังสามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบวัฏจักรของเซลล์ในระดับกลุ่มประชากรของสิ่งมีชีวิตได้ (Dolezzel and Bartos, 2005) ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 5 การเตรียมวัสดุพืชสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี

ที่มา: Ochatt (2006)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง
2. เพื่อเปรียบเทียบเทคนิคในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน
3. เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันก่อนปลูกลงแปลง

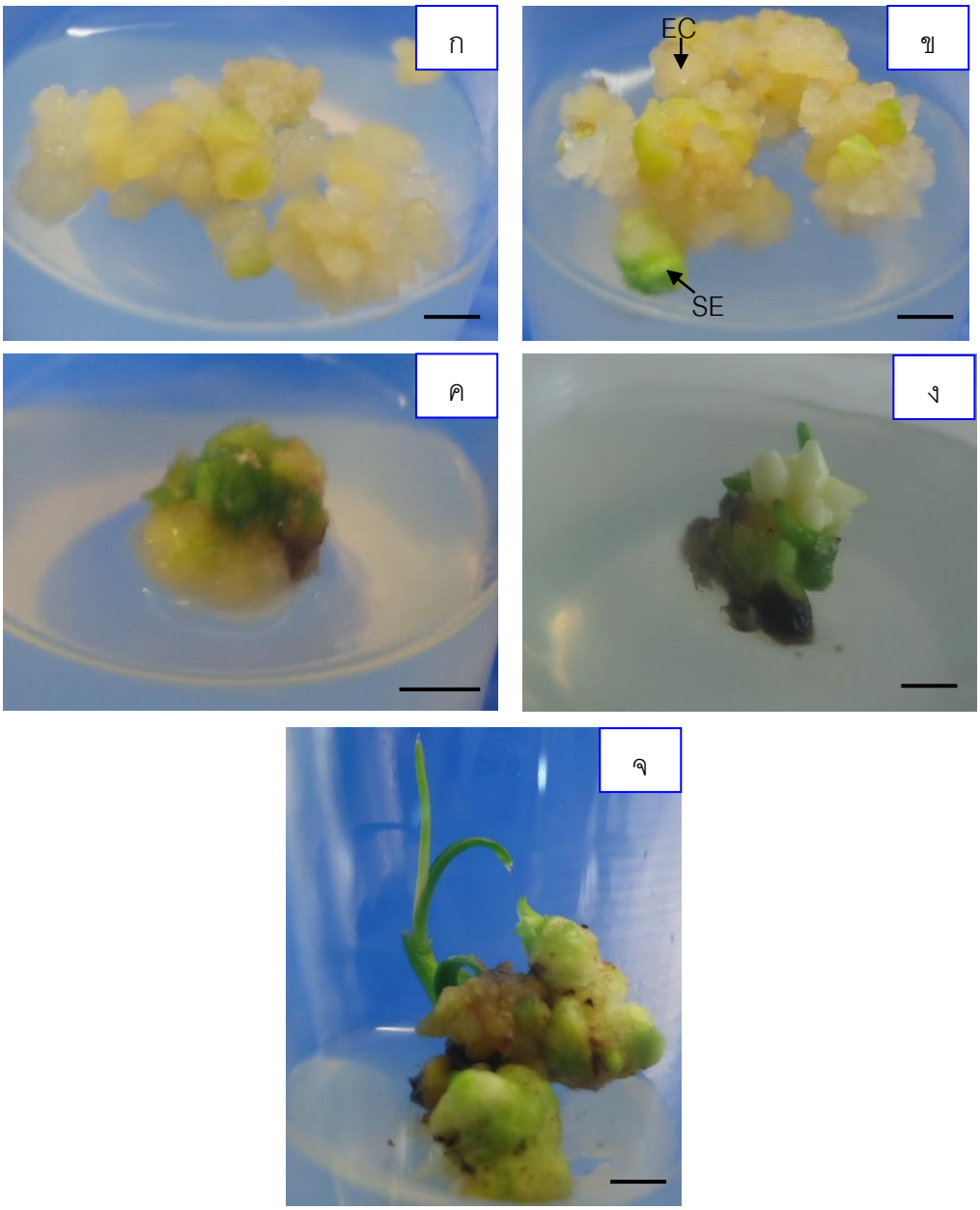
บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1.วัสดุพืช

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนสูตรอาหารเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมัน (oil palm culture medium; OPCM) ร่วมกับการเติมไดแคมบา ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็น 5.7 เติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวันเพื่อเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 1 เดือน แล้วแยกโซมาติกเอ็มบริโอไปวางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซอร์บิทอล ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์จนกระทั่งพัฒนาเป็นต้นกล้า (ภาพที่ 6) จากนั้นย้ายต้นกล้าไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ พีเอชเป็น 5.7 เติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงภายใต้สภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน วางเลี้ยงจนกระทั่งเกิดดอกหรือลักษณะผิดปกติในหลอดทดลอง



ภาพที่ 6 กระบวนการในการชักนำเป็นพืชต้นใหม่ของปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อนชุดที่สอง

ก. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ข.เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (EC) และโซมาติกเอ็มบริโอ (SE)

ค. โซมาติกเอ็มบริโอ ง. โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สอง

จ. การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของปาล์มน้ำมันจากต้นอ่อนชุดที่สอง (บาร์ = 0.5 ซม.)

2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องคนสารละลายพร้อมแท่งแม่เหล็ก (DiLigent)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ตู้อบไมโครเวฟ (SANYO, 800w)
- หม้อนึ่งความดันไอ (SANYO LABOAUTOCLAVE)
- เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง เช่น หลอดทดลอง จานเพาะเลี้ยงฟลาสก์ บีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร
- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี

- ผ้ากรอง 20 ไมโครเมตร
- จานเพาะเลี้ยง
- หลอดทดลองขนาดเล็ก
- เครื่องเขย่าเลี้ยง
- เครื่อง FACS Calibur cytometer

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสและการทำพีซีอาร์

- ตู้เย็น และตู้แช่แข็ง - 30 องศาเซลเซียส
- เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์
- เครื่องเขย่า
- เครื่องคนสารละลาย พร้อมแท่งแม่เหล็ก

- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (ซินโดม อิเล็คทรอนิคส์ อินดัสทรี)
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีสหรือมัลตินา (COSMO Bio, MyRun)
- เครื่องพีซีอาร์ (Lio Lab Internation, XP cycler)
- เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์หรือนาโนดรอป
- UV transilluminator (เดลตา แล็บบอราตอรี่, VilBER LOURMAT)
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- ตู้ไมโครเวฟ
- ตู้ดูดควัน
- โกร่งบดตัวอย่าง
- ปิเปตปรับปริมาตร
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
- อุปกรณ์อื่นๆ เช่น กระติกน้ำแข็ง กระบอกตวงและขวดต่างๆ

3. วัสดุ สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS และ OPCM (รายละเอียดแสดงในตารางภาคผนวก)
- กรดแอสคอร์บิค
- น้ำตาลซูโครส
- วุ้น

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี

- สารละลายบัฟเฟอร์โพลีไวนิลไพโรลิโดน (PVP solution)
- โพลีไวนิลไพโรลิโดน(polyvinylpyrrolidone polyvinylpyrrolidone: PVP)
- สีย้อมโพรพิเดียมไอโอไดด์ (propidium iodine: PI)

3.3 **สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ**

- กรดเอธิลีนไดอะมินเทตราอะซิติค
- โซเดียมเอธิลีนไดอะมินเทตราอะซิเตต
- ทริส-ไฮโดรคลอริค
- ไอโซโพรพานอล
- เอธานอล
- คลอโรฟอร์ม
- โซเดียมโดดิซิลซัลเฟต
- โซเดียมคลอไรด์
- แอมโมเนียมอะซิเตต
- โพลีไวนิลไพโรลิโดน 40
- เฮกซะเดคิลไตรเมธิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB)
- เมอร์แคบโทเอธานอล

3.4 **สารเคมีสำหรับการทำ**PCR

- SSR Primers ประกอบด้วย EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR00781 EgCIR0905 และ EgCIR1772
- Ampli Tag Gold 360 (Promega, USA)
- *Taq* DNA polymerase

3.5 **สารเคมีสำหรับใช้ทำอิเล็คโตรฟอริซีส**

เจลอะกาโรสอิเลคโตรฟอริซีส (agarose gel electrophoresis)

- วุ้นอะกาโรส
- กรดอะซิติค
- กรดบอริค
- ทริสเบส

- เอธิเดียมโบรไมด์
- Loading buffer
- แลมดาดีเอ็นเอ (Operon, USA)
- ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp Ladder (Operon, USA)

เจลโพลีอะคลิลาไมด์อิเลคโตรฟอริซีส (denaturing polyacrylamine gel electrophoresis)

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

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ใช้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผิดปกติรูปแบบต่าง ๆ 5 ลักษณะ โดยต้นกล้าปาล์มน้ำมันลักษณะที่ 1 มีลักษณะคล้ายช่อดอก มีสีขาวอมเขียว ต้นกล้าปาล์มน้ำมันลักษณะที่ 2 มีลักษณะคล้ายช่อดอก ซึ่งปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว ต้นกล้าปาล์มน้ำมันลักษณะที่ 3 ปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว ต้นกล้าปาล์มน้ำมันลักษณะที่ 4 มีลักษณะคล้ายช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม และต้นกล้าปาล์มน้ำมันลักษณะที่ 5 ช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง ซึ่งวางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 5.7 ภายใต้สภาพแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-4 เดือน บันทึกความกว้าง ความสูงของดอก และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดดอกในหลอดทดลอง แต่ละลักษณะดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดดอก} = \frac{\text{จำนวนดอกที่เกิดแต่ละลักษณะ}}{\text{จำนวนต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งหมด}} \times 100$$

เปรียบเทียบกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละหน่วยการทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 2 ขวด

2. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนใบจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสม C3/77(25) ที่ออกดอกในหลอดทดลอง ลักษณะต่าง ๆ 5 ลักษณะสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้สารละลาย CTAB (hexadecyl trimethyl amoniumbromide) ซึ่งดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1990) ใช้ตัวอย่าง 200 มิลลิกรัมน้ำหนักสด บดใน CTAB บัฟเฟอร์ ร่วมกับ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร (ก่อนใช้บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) ให้ละเอียด จากนั้นใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายที่แยกชั้นใสดูดสารละลายส่วนใสตอนบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นเทไอโซโพรพานอลทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอลที่ผ่านการแช่เย็น เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ๆ ละ 750 ไมโครลิตร ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (หากไม่เห็นตะกอนดีเอ็นเอวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียสประมาณ 30 นาทีนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10นาที) เทส่วนใสทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE บัฟเฟอร์ [Tris-HCl (pH 7.5) 10 มิลลิโมลาร์และ Na_2EDTA (pH 7.0) 1 มิลลิโมลาร์] 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอขนาด 40 และ 80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) โดยการทำอิเล็คโตรฟอริซิสบนเจลอะกาโรส เข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0) เป็นเวลาประมาณ 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสารเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Gel documentation เพื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่แยกได้

2.2 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

ใช้ไพรเมอร์จำนวน 11 ไพรเมอร์ ที่มีรายงานการใช้ตรวจสอบในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน คือ OPAB01 OPAB09 OPAB14 OPB08 OPT06 OPR11 OPJ04 OPN15 OPA03 OPB04 และ OPB18 (ตารางที่ 5) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร 10X *Taq* บัฟเฟอร์ ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร dNTP เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เข้มข้น 1.5 ยูนิต ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิเครื่องพีซีอาร์ ดังนี้

1. Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
2. Denaturation ใช้อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
3. Annealing ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
4. Extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำ 35 รอบ
5. Final-Extention ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 35 องศาเซลเซียส 1 นาที

นำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาณ 10 ไมโครลิตรมาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็คโตรฟอริซีสบนแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน TBE บัฟเฟอร์ (Tris-Base, Boric acid, Na_2EDTA 0.5 โมลาร์; pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 100 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 20 นาที ล้างน้ำ 5 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation เปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกแต่ละลักษณะ เพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ตารางที่ 5 ชนิดและลำดับเบสของไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง

Primer name	Base sequence 5'→3'
OPAB01	CCGTCGGTAG
OPAB09	GGGCGACTAC
OPAB14	AAGTGCGACC
OPB08	GTCCACACGG
OPJ04	CCGAACACGG
OPT06	CAAGGGCAGA
OPR11	GTAGCCGTCT
OPN15	CAGCGACTGT
OPA03	AGTCAGCCAC
OPB04	GGACTGGAGT
OPB18	GGGAATTCGG

2.3 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์

2.3.1 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลอะกาโรส

ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามรายงานของ Thawaro (2009) Sanputawong (2011) และ Inpuay (2012) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็น forward และ reverse จำนวน 9 คู่ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 (ตารางที่ 6) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR จากปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 20 นาโนกรัม ไพรเมอร์แต่ละชนิดเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10x บัฟเฟอร์ร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เข้มข้น 0.7 ยูนิต ปริมาตร 0.1 ไมโครโมลาร์ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 4.1 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

1. Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
2. Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing ใช้อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4. Extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ
5. Final-extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 8 นาทีจากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโตรฟอริ-ซีสบนแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน TBE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Boric acid, Na_2EDTA 0.5 โมลาร์; pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 20 นาที ล้างน้ำ 5 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation เปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติแต่ละลักษณะ เพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม

2.3.2 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมบนแผ่นเจลโพลีอะคลิลาไมด์

ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามวิธีการข้างต้น จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่จะวิเคราะห์มาทำให้เสียสภาพก่อน เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการเสียสภาพธรรมชาติในเวลาต่างกันเมื่ออยู่ในเจล โดยผสม loading buffer นำไปเพิ่มอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในตัวกลางอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอริซีส ที่มีความเข้มข้นของเจล 6 เปอร์เซ็นต์ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 600 โวลต์ กระแสไฟฟ้า 55 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมงและย้อมแถบดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท โดยนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย fixative (acetic acid เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) นาน 20 นาที เขย่าเบาๆ เมื่อครบเวลานำไปล้างในน้ำกลั่น 10 นาที นำแผ่นเจลใส่ลงในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์เพื่อย้อมเจลเป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ หลังจากนั้นนำแผ่นเจลจุ่มแช่น้ำกลั่นนาน 5 วินาที แล้วนำแผ่นเจลใส่ในสารละลาย developer (sodium carbonate 25 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde 40 เปอร์เซ็นต์ sodium thiosulfate 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เขย่าสม่ำเสมอ จนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุด

ปฏิกิริยาโดยแช่สารละลาย fixative นาน 20 นาที นำแผ่นเจลมาจุ่มลงในน้ำกลั่น 10 นาที แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติกับปกติในหลอดทดลอง

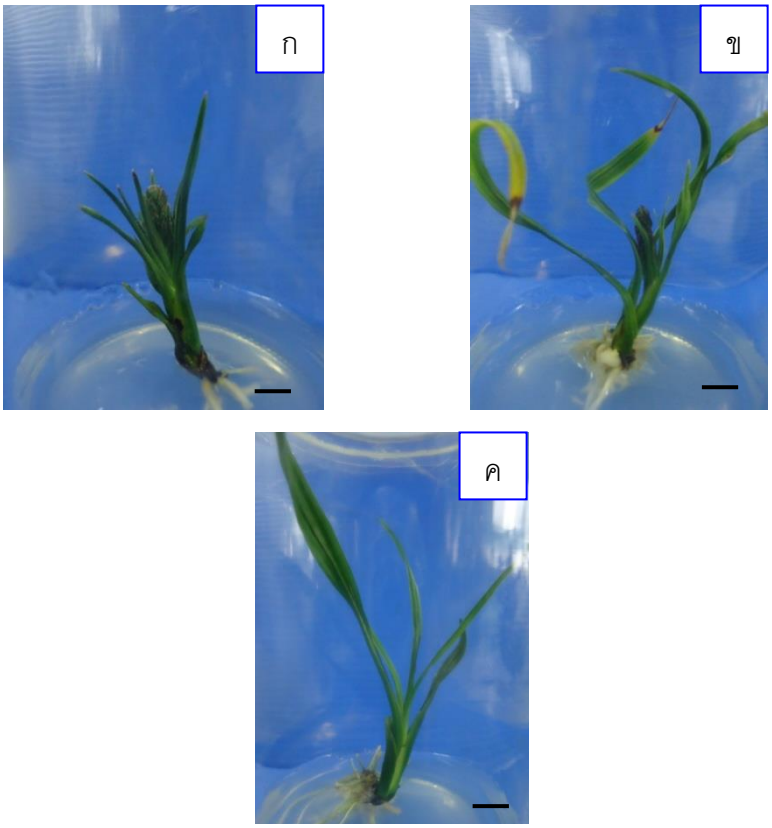
ตารางที่ 6 ชนิดและลำดับเบสของไพรเมอร์เอสเอสอาร์ที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง

Primer name	5'-3' Forward primer	5'-3' Reverse primer
EgCIR0008	CGGAAAGAGGGAAGATG	ACCTTGATGATTGATGTGA
EgCIR0243	TGGAACTCCTATTTTACTGA	GCCTCGTAATCCTTGTCA
EgCIR0337	GTCTGCTAAAACATCAACTG	GAGGAGGAGGGGAACGATAA
EgCIR0409	AGGGAATTGGAAGAAAAGAAAG	TCCTGAGCTGGGGTGGTC
EgCIR0446	CCCCTTCGAATCCACTAT	CAAATCCGACAAATCAAC
EgCIR0465	TCCCCCACGACCCATTC	GGCAGGAGAGGCAGCATTC
EgCIR0781	CCCCTCCCTACCACGTTCCA	TGTTTGCTGTTGCTCTTTGATTTTC
EgCIR0905	CACCACATGAAGCAAGCAGT	CCTACCACAACCCCAGTCTC
EgCIR1772	CTTCCATTGTCTCATTATTCTCTTA	ACCTTGTATTAGTTTGTCCA

3. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันโคลนกระบี่ในหลอดทดลองด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรีและเครื่องหมายเอสเอสอาร์

3.1 วัสดุพืช

ในการศึกษานี้ใช้ใบจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันโคลนกระบี่ที่ชักนำจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันโคลนกระบี่ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 5.7 ภายใต้สภาพแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส วางเลี้ยงจนกระทั่งเกิดดอกในหลอดทดลอง (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลอง หลังจากวางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 5 มม.) (ก-ข) ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกในหลอดทดลอง (ค) ต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ (ชุดควบคุม)

3.2 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคโฟลไซโทมิเตอร์ ตามวิธีการของ Galbraith และคณะ (1983) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ตัดใบอ่อนของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองที่ออกดอกหรือไม่ออกดอกลงในจานเพาะเลี้ยง เติมสารละลายบัฟเฟอร์โพลีไวนิลไพโรลิโดน ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้ละเอียดด้วยใบมีดผ่าตัด กรองสารละลายด้วยผ้ากรองขนาดช่อง 20 ไมโครเมตร ใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก เพื่อแยกเอาเศษเซลล์ออก จากนั้นเติมสีย้อมโพรพิเดียมไอโอไดด์ (PI) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซเมทรี เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันรวมทั้งขนาดของจีโนมด้วยเครื่อง FACS Calibur cytometer โดยใช้ดีเอ็นเอของข้าวญี่ปุ่นสายพันธุ์ Nipponbare ซึ่งทราบขนาดจีโนมแน่นอนแล้วเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน คำนวณปริมาณดีเอ็นเอดังสมการต่อไปนี้

$$\text{DNA Content} = \frac{\text{Sample G1mean Fluorescence}}{\text{Reference standard G1mean Fluorescence}} \times \text{DNA content of reference standard}$$

เปรียบเทียบกันระหว่างต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอก โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละหน่วยการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด

3.3 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับวิธีการหน้า 25 ใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็น forward และ reverse จำนวน 9 คู่ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR จากปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 0.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละชนิดเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ampli *Taq* 360 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (เอ็นไซม์ *Taq* polymerase ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (dNTP) บัฟเฟอร์) และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิของปฏิกิริยาดังนี้

1. Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
2. Denaturation ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing ใช้อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
4. Extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ
5. Final-extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ย้อมด้วยสี SYBR green (1: 100) และแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องแยกขนาดแถบดีเอ็นเออัตโนมัติ (มัลตินา) นาน 2 ชั่วโมง

บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง 5 ลักษณะ เมื่อพิจารณาจากความกว้างและความสูงของดอก พบว่า ต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ลักษณะ มีความกว้างและความสูงของดอกใกล้เคียงกัน ต้นกล้าปาล์มน้ำมันลักษณะที่ 2 ให้ความกว้างและความสูงของดอกสูงสุดที่ 1.13 และ 1.90 เซนติเมตร อย่างไรก็ตาม ต้นกล้าปาล์มน้ำมันลักษณะที่ 1 มีอัตราการเกิดดอกสูงสุดที่ 17.07 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่เกิดดอกลักษณะอื่น ๆ (ตารางที่ 7) แต่เมื่อพิจารณาในส่วนของลักษณะอื่น ๆ เช่น ลักษณะดอก สีของดอก จะพบว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันดังกล่าวมีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพที่ 8 และภาพที่ 9)

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

ลักษณะของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน	ความกว้างของดอก (ซม.)	ความสูงของดอก (ซม.)	การเกิดดอกในหลอดทดลอง (%)
T1	0.53bc	1.40a	17.07
T2	1.13a	1.90a	9.75
T3	0.50bcd	1.20a	7.31
T4	0.93ab	1.43a	7.31
T5	0.40cd	1.63a	7.31
control	0d	0b	0
F-test	**	**	
C.V. (%)	33.56	20.89	

หมายเหตุ; T1 มีลักษณะคล้ายช่อดอก มีสีขาวอมเขียว

T2 มีลักษณะคล้ายช่อดอก ซึ่งปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว

T3 ปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว

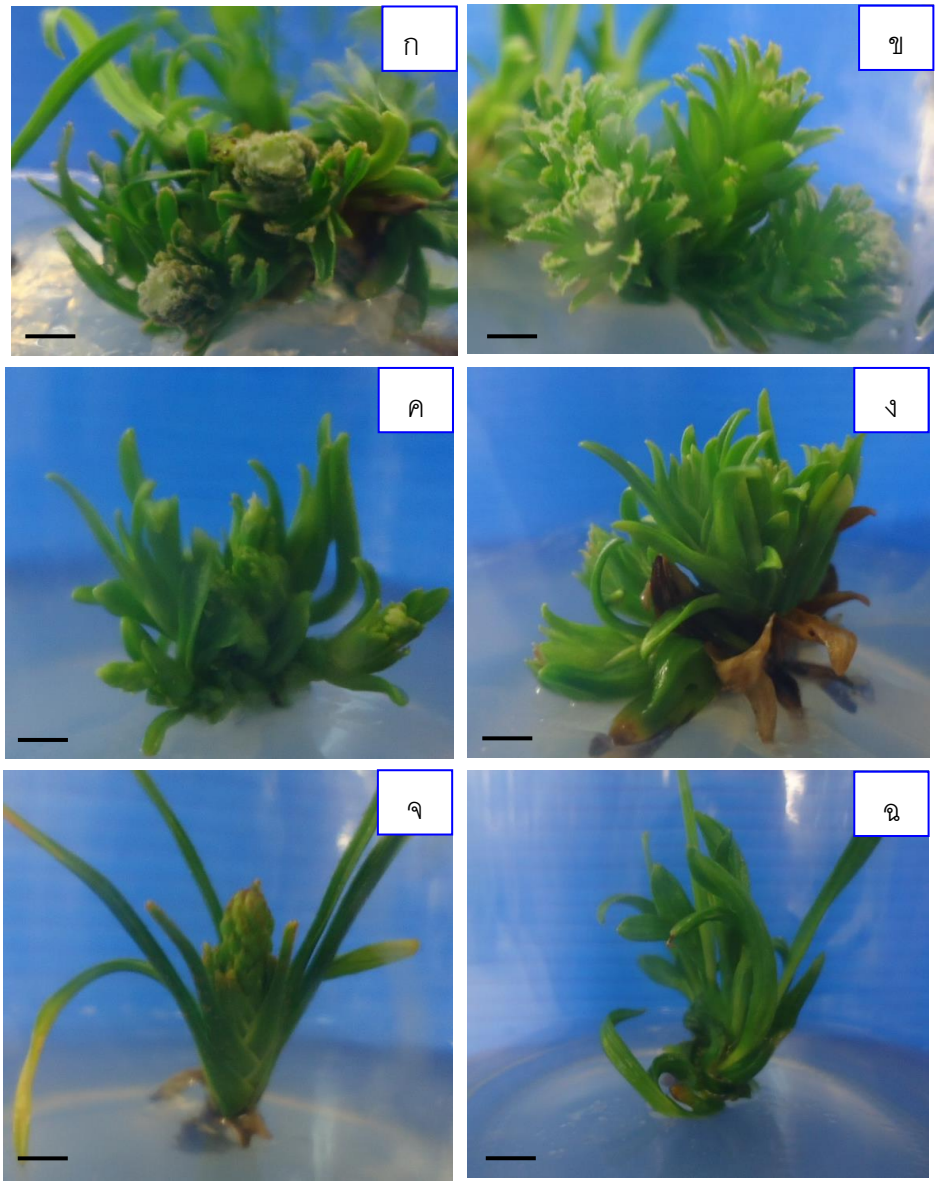
T4 มีลักษณะคล้ายช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม

T5 ช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง

T6 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ (ชุดควบคุม)

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



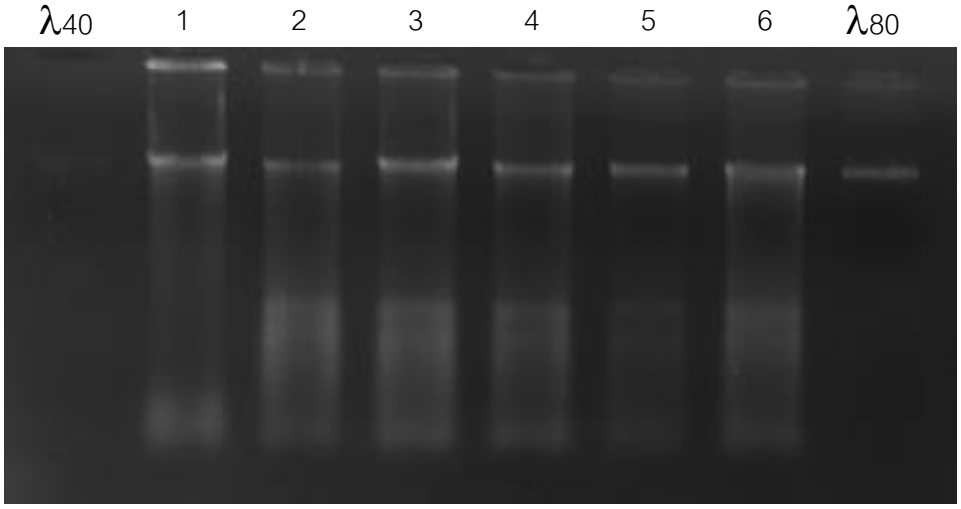
ภาพที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 เดือน (บาร์ = 0.5 ซม.) (ก) มีลักษณะคล้ายช่อดอก มีสีขาวอมเขียว (ข) มีลักษณะคล้ายช่อดอก ซึ่งปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว (ค) ปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว (ง) มีลักษณะคล้ายช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม (จ) ช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง (ฉ) ต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ (ชุดควบคุม)

ภาพที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลองจากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (บาร์ = 2 มม.) (ก) มีลักษณะคล้ายช่อดอก มีสีขาวอมเขียว (ข) มีลักษณะคล้ายช่อดอก ซึ่งปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว (ค) ปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว (ง) มีลักษณะคล้ายช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม (จ) ช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง

2. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอจากปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ลูกผสม C3/77(25) ที่ออกดอกในหลอดทดลองลักษณะต่าง ๆ พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณ 40-80 นาโนกรัมต่อน้ำหนักสดใบ 200 มิลลิกรัม (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 แถบดีเอ็นเอที่สกัดจากชิ้นส่วนใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลองลักษณะต่าง ๆ ด้วยวิธีการทางคุณภาพเปรียบเทียบกับ λDNA

Lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลองลักษณะต่างๆ

Lane 6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติในหลอดทดลอง (ชุดควบคุม)

2.2 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

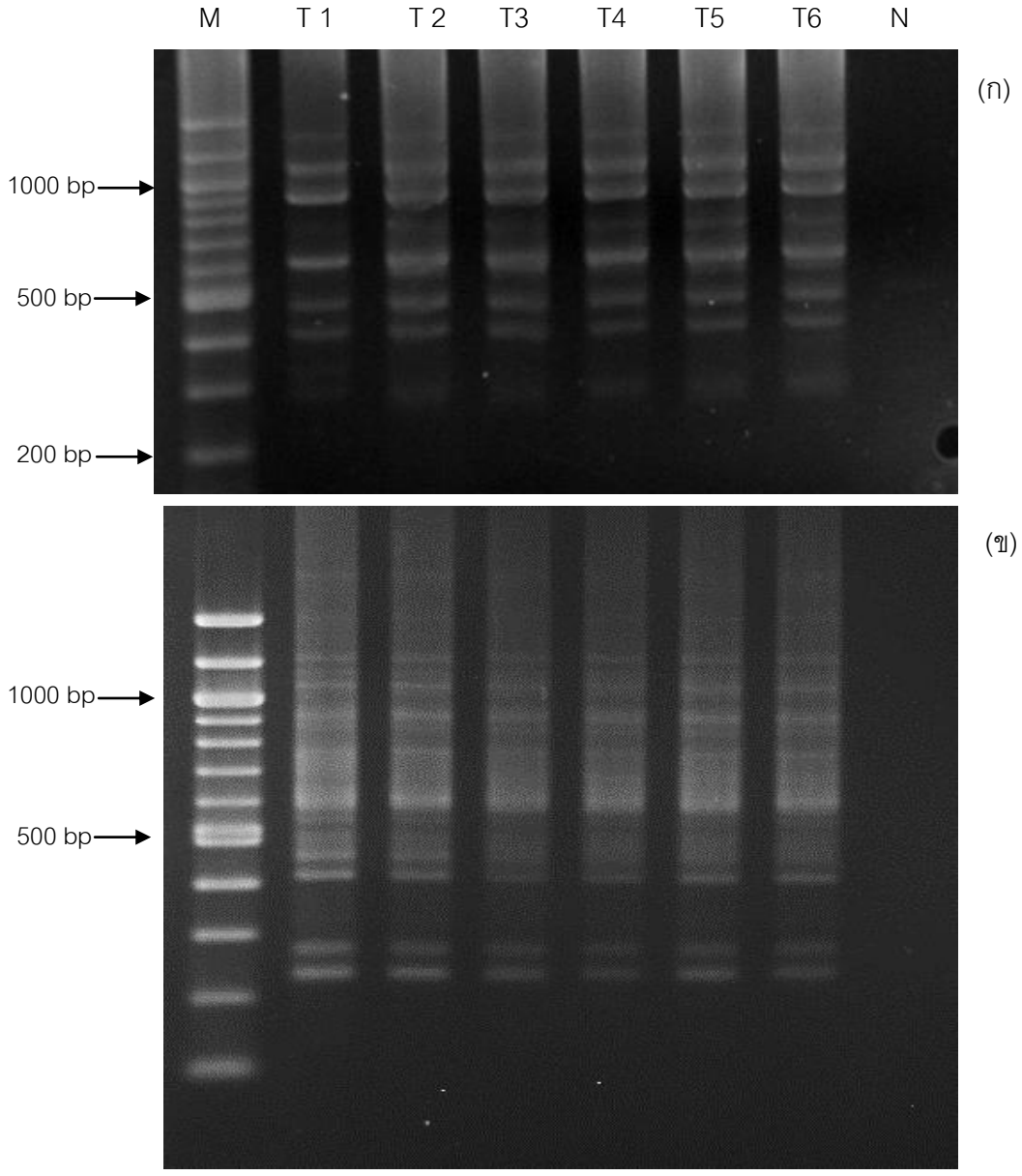
จากการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 11 ไพรเมอร์ คือ OPAB01 OPAB09 OPAB14 OPB08 OPT06 OPR11 OPJ04 OPN15 OPA03 OPB04 และ OPB18 พบว่า มี 3 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ โดยไพรเมอร์ OPAB14 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลี-

มอร์ฟิซึมสูงที่สุด รองลงมาคือ OPA03 และ OPR11 ตามลำดับ ซึ่งไพรเมอร์ดังกล่าวให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลีมอร์ฟิซึมที่ 60 50 และ 14.28 ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

เมื่อพิจารณาผลในแต่ละไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ OPAB01ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 300 400 500 600 900 1,100 และ 1,300 คู่เบส ไพรเมอร์ OPAB09 ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 240 280 400 450 และ 600 คู่เบส (ภาพที่ 11) ไพรเมอร์ OPAB14 ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 450 600 900 1,000 และ 1,100 คู่เบส ไพรเมอร์ OPB08 ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 480 700 750 และ 1,000 คู่เบส (ภาพที่ 12) ไพรเมอร์ OPJ04 ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 500 580 780 1,000 และ 1,200 คู่เบส ไพรเมอร์ OPT06 ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 100 200 310 400 600 และ 780 คู่เบส (ภาพที่ 13) ไพรเมอร์ OPR11 ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 330 400 480 700 900 1,400 และ 1,517 คู่เบส ไพรเมอร์ OPN15 ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 300 480 550 และ 750 คู่เบส (ภาพที่ 14) ไพรเมอร์ OPA03 ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 700 1,300 1,400 และ 1,517 คู่เบส ไพรเมอร์ OPB04 ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 300 450 900 และ 1,300 คู่เบส (ภาพที่ 15) และไพรเมอร์ OPB18 ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 400 650 1,100 และ 1,200 คู่เบส (ภาพที่ 16) (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 ชนิดไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และ อัตราการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

Primer type	Sequence (5'-3')	Amplified fragment	Polymorphic fragment	Polymorphism (%)
OPAB01	CCGTCGGTAG	7	0	0
OPAB09	GGGCGACTAC	5	0	0
OPAB14	AAGTGCGACC	5	3	60
OPB08	GTCCACACGG	4	0	0
OPJ04	CCGAACACGG	5	0	0
OPT06	CAAGGGCAGA	6	0	0
OPR11	GTAGCCGTCT	7	1	14.28
OPN15	CAGCGACTGT	4	0	0
OPA03	AGTCAGCCAC	4	2	50
OPB04	GGACTGGAGT	4	0	0
OPB18	GGGAATTCGG	4	0	0



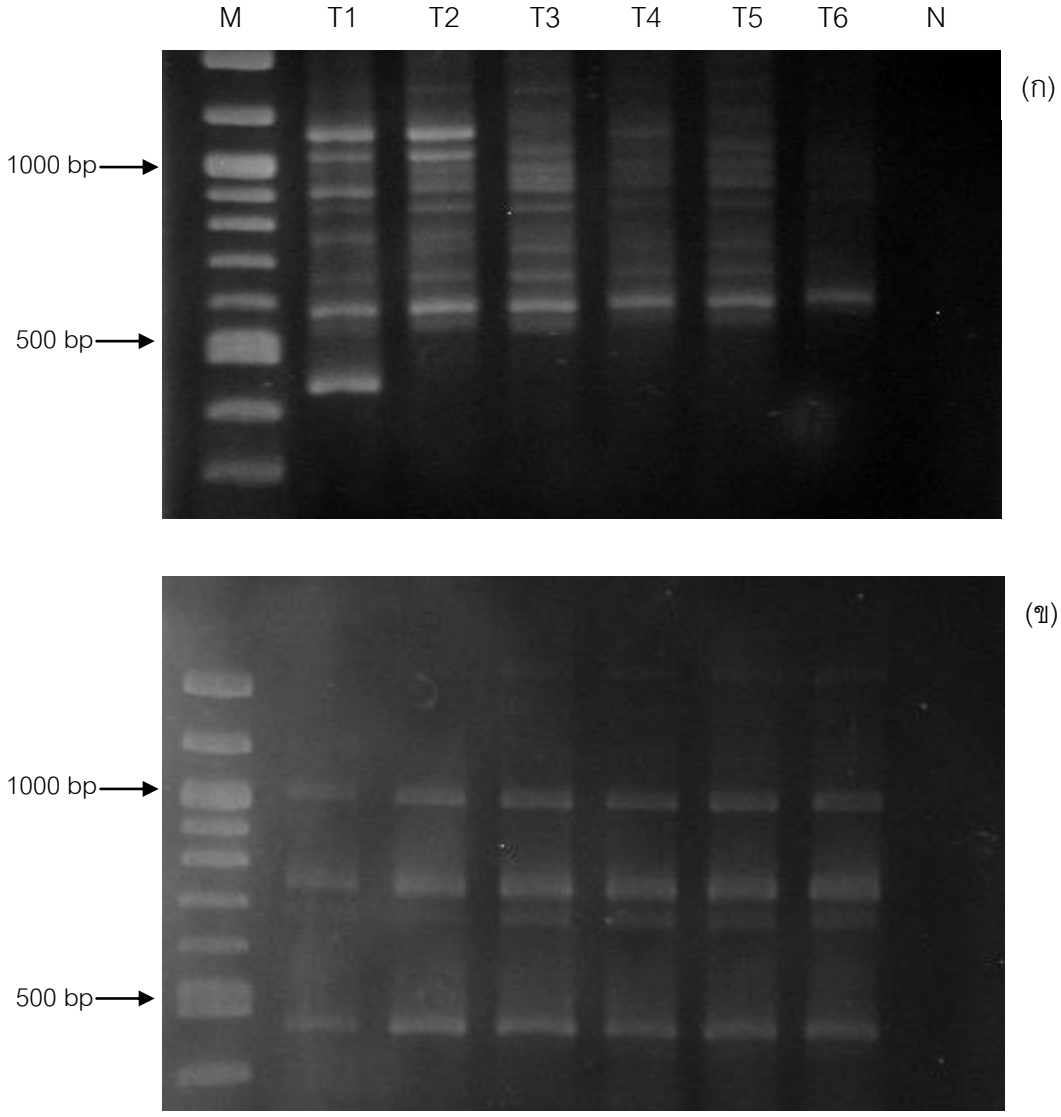
ภาพที่ 11 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) OPAB01 และ (ข) OPAB09

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

Lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง

Lane 6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปกติในหลอดทดลอง

N คือ Negative control



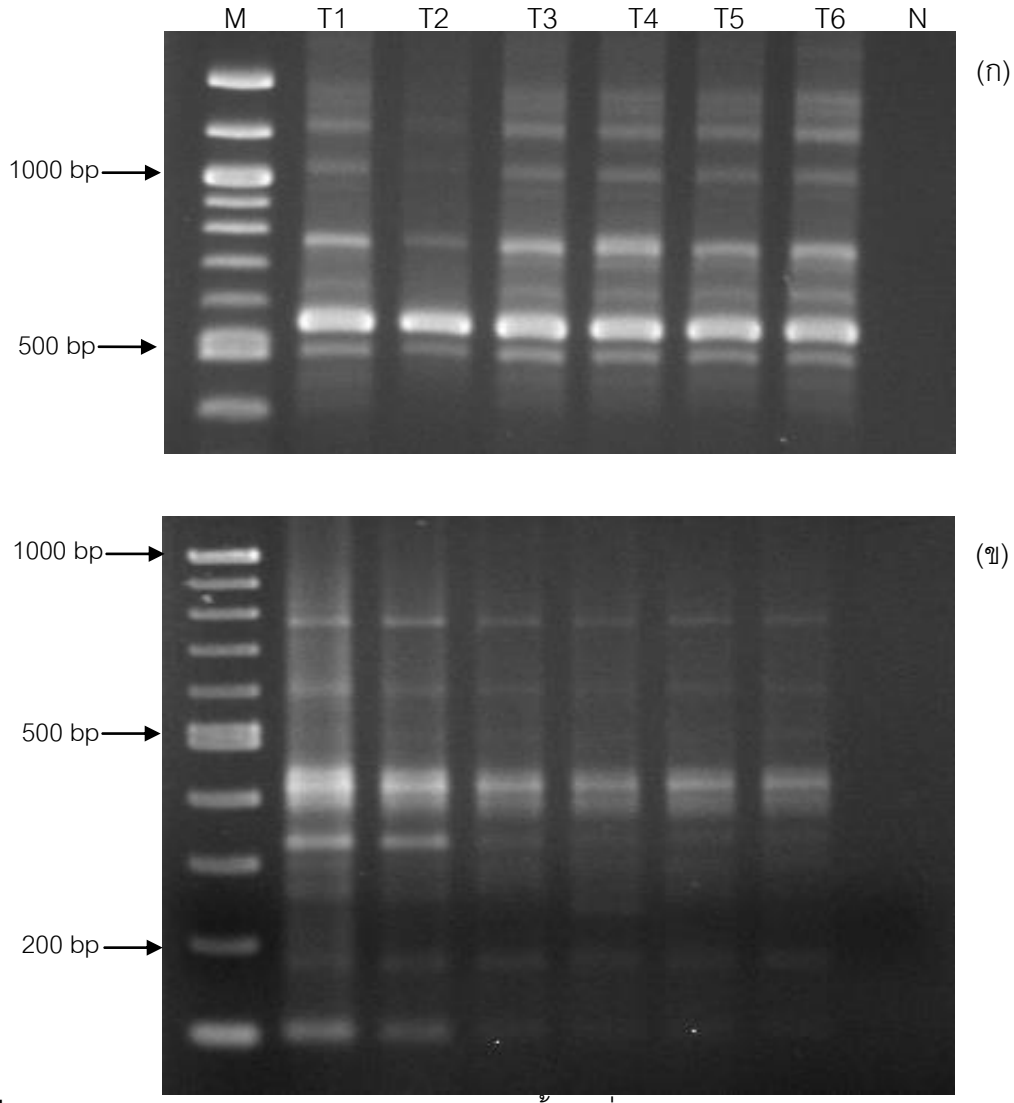
ภาพที่ 12 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) OPAB14 และ (ข) OPB08

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

Lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง

Lane 6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปกติในหลอดทดลอง

N คือ Negative control



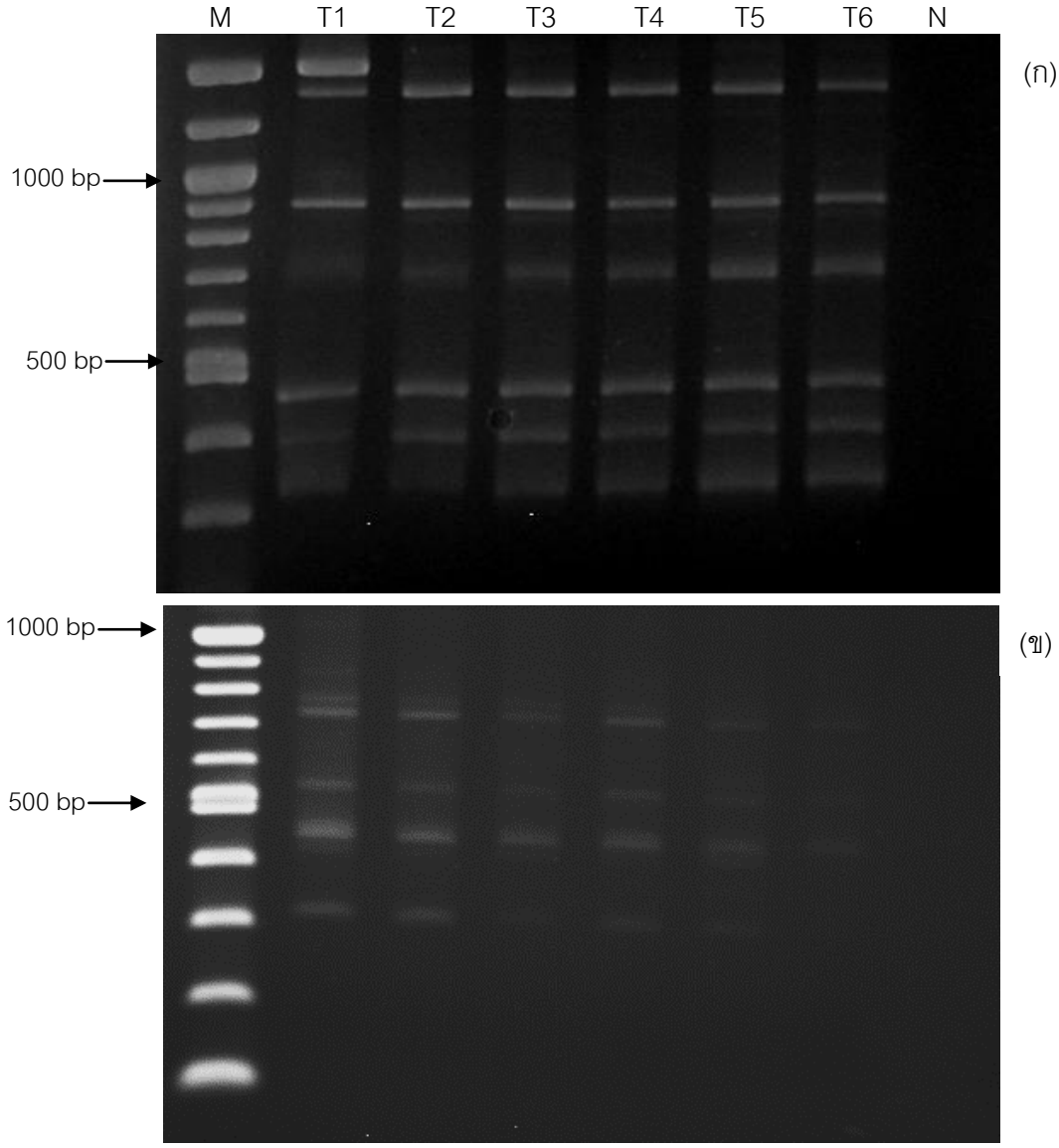
ภาพที่ 13 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) OPJ04 และ (ข) OPT06

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

Lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง

Lane 6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปกติในหลอดทดลอง

N คือ Negative control



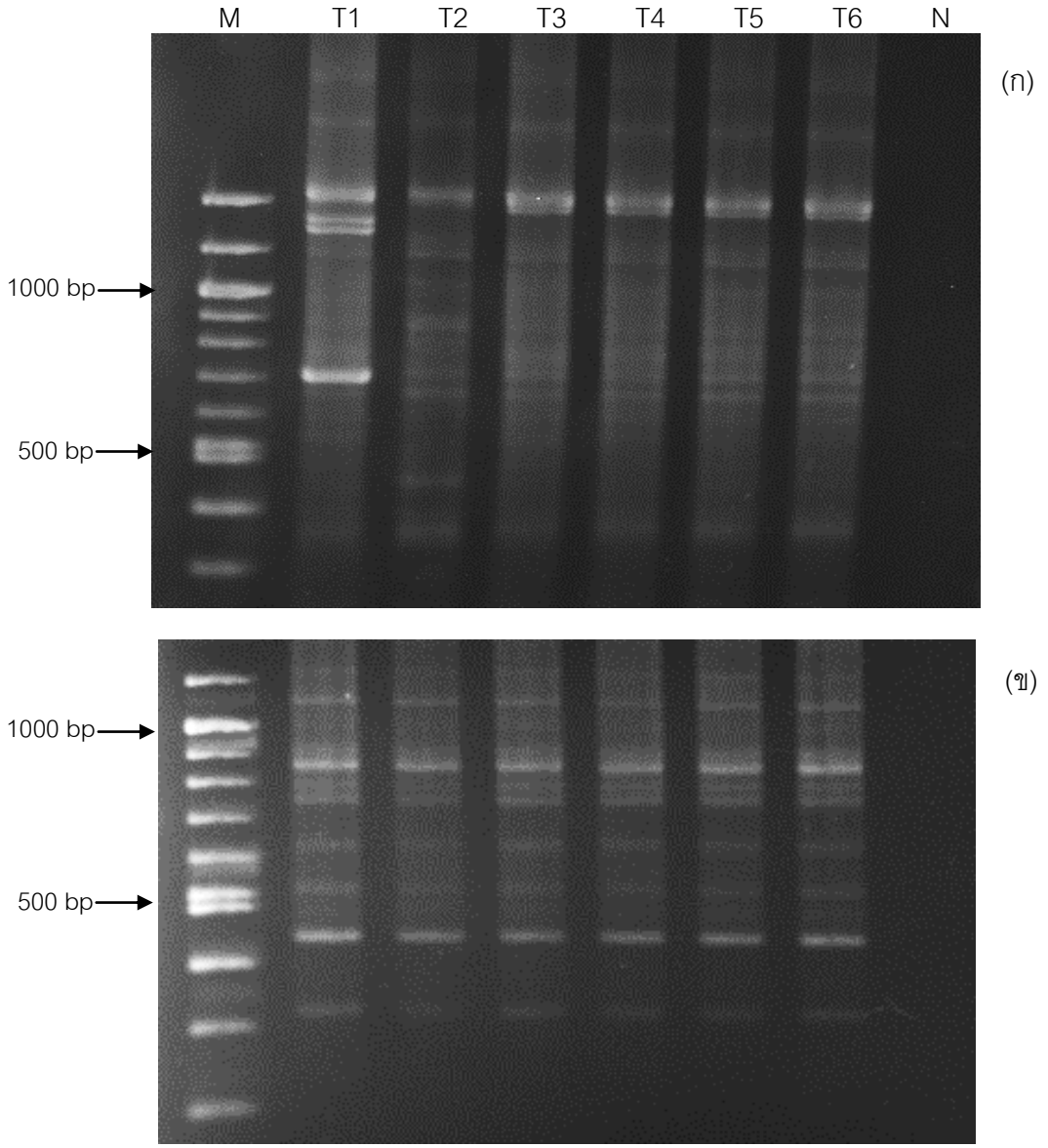
ภาพที่ 14 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) OPR11 และ (ข) OPN15

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

Lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง

Lane 6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปกติในหลอดทดลอง

N คือ Negative control



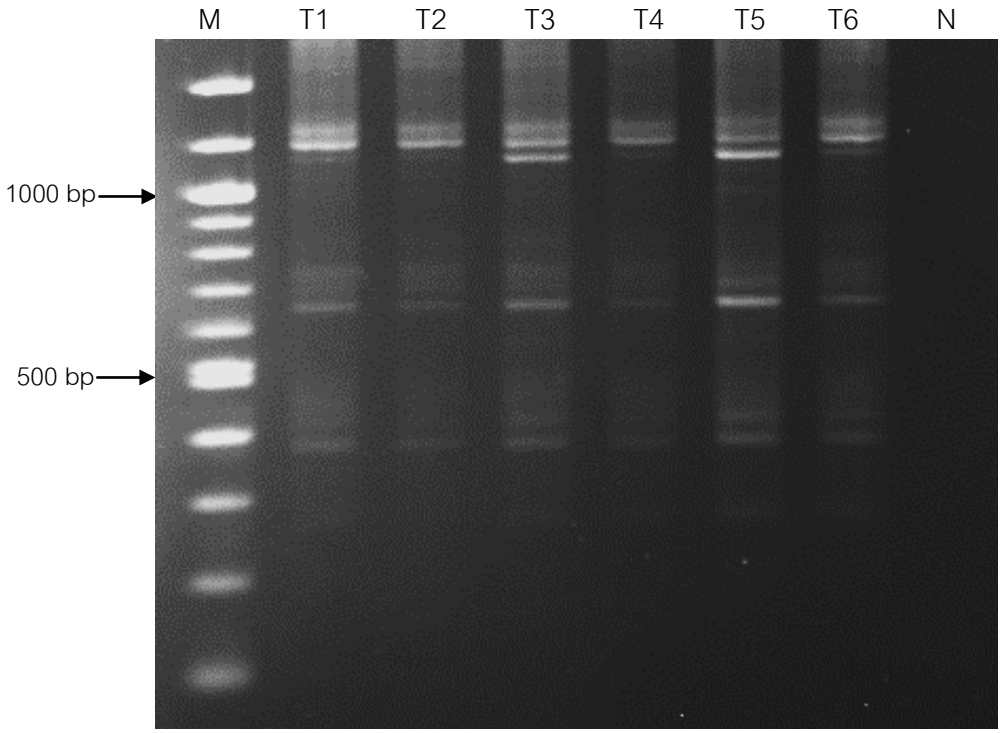
ภาพที่ 15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) OPA03 และ (ข) OPB04

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

Lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง

Lane 6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปกติในหลอดทดลอง

N คือ Negative control



ภาพที่ 16 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPB18

M	คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส
Lane 1-5	คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง
Lane 6	คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปกติในหลอดทดลอง
N	คือ Negative control

ตารางที่ 9 ชนิดไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ และแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละลักษณะหลังตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

Primer name	Size of amplified fragments (bp)	DNA pattern					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
OPAB01	300	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+
	500	+	+	+	+	+	+
	600	+	+	+	+	+	+
	900	+	+	+	+	+	+
	1100	+	+	+	+	+	+
	1300	+	+	+	+	+	+
OPAB09	240	+	+	+	+	+	+
	280	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+
	450	+	+	+	+	+	+
	600	+	+	+	+	+	+
OPAB14	450	+	-	-	-	-	-
	600	+	+	+	+	+	+
	900	+	+	+	+	+	+
	1000	+	+	+	+	-	-
	1100	+	+	+	+	-	-
OPB08	480	+	+	+	+	+	+
	700	+	+	+	+	+	+
	750	+	+	+	+	+	+
	1000	+	+	+	+	+	+
OPJ04	500	+	+	+	+	+	+
	580	+	+	+	+	+	+
	780	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 9 ชนิดไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ และแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละลักษณะหลังตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี (ต่อ)

Primer name	Size of amplified fragments (bp)	DNA pattern					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
OPJ04	1000	+	+	+	+	+	+
	1200	+	+	+	+	+	+
OPT06	100	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+
	310	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+
	600	+	+	+	+	+	+
	780	+	+	+	+	+	+
OPR11	330	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+
	480	+	+	+	+	+	+
	700	+	+	+	+	+	+
	900	+	+	+	+	+	+
	1400	+	+	+	+	+	+
	1517	+	-	-	-	-	-
OPN15	300	+	+	+	+	+	+
	480	+	+	+	+	+	+
	550	+	+	+	+	+	+
	750	+	+	+	+	+	+
OPA03	700	+	+	+	+	+	+
	1300	+	-	-	-	-	-
	1400	+	-	-	-	-	-
	1517	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 9 ชนิดไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ และแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละลักษณะหลังตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี (ต่อ)

Primer name	Size of amplified fragments (bp)	DNA pattern					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
OPB04	300	+	+	+	+	+	+
	450	+	+	+	+	+	+
	900	+	+	+	+	+	+
	1300	+	+	+	+	+	+
OPB18	400	+	+	+	+	+	+
	650	+	+	+	+	+	+
	1100	+	+	+	+	+	+
	1200	+	+	+	+	+	+

2.3 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์

2.3.1 อะกาโรสเจลอิเลคโตรฟอริซิส

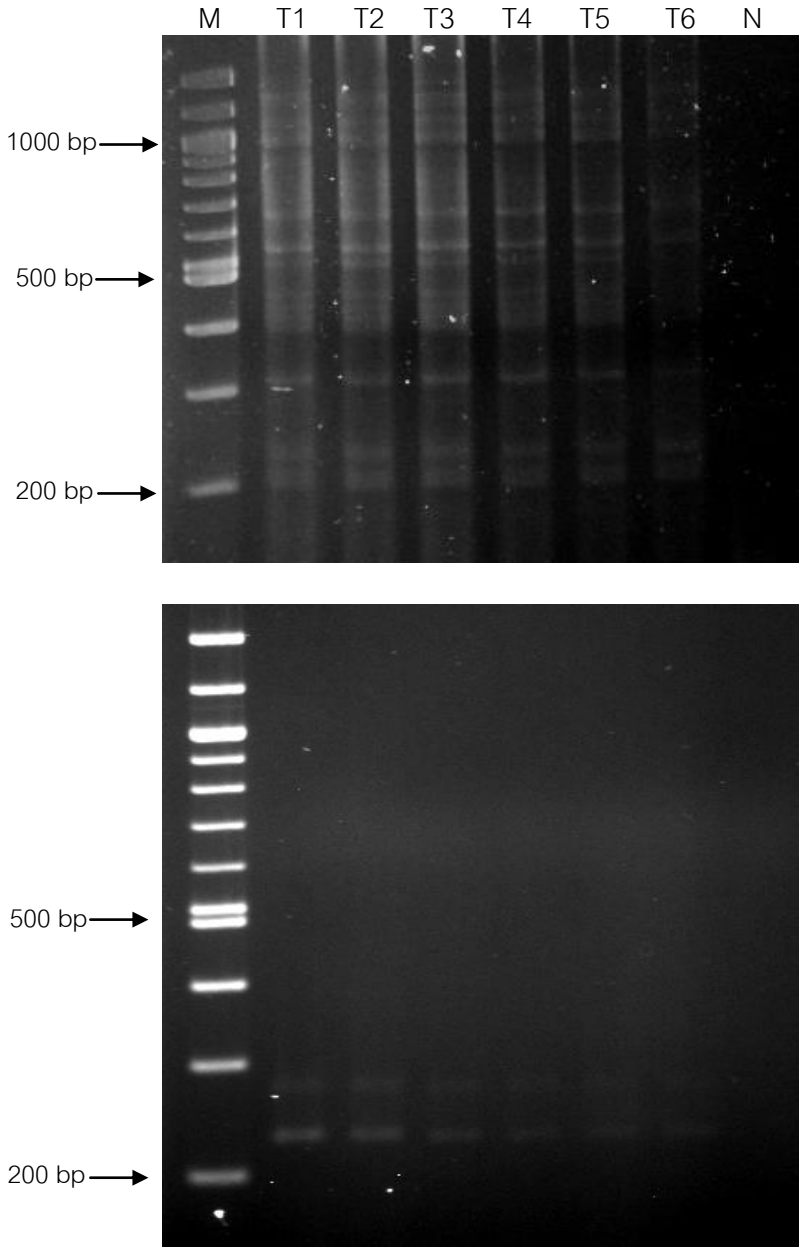
การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองของต้นที่ผิดปกติลักษณะต่าง ๆ ด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่ คือ EgCIR0008 EgCIR024 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 พบว่า มีหลายคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในต้นกล้าปาล์มน้ำมันแต่ละลักษณะ โดย EgCIR0905 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลีมอร์ฟิซึมสูงที่สุด รองลงมาคือ EgCIR0337 EgCIR0781 EgCIR0008 และ EgCIR0446 ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลีมอร์ฟิซึมเท่ากับ 75 33.33 33.33 16.67 และ 14.29 ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

เมื่อพิจารณาผลในแต่ละไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 200 230 300 517 550 และ 650 คู่เบส ไพรเมอร์ EgCIR0243 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 240 และ 280 คู่เบส (ภาพที่ 17) ไพรเมอร์ EgCIR0337 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 150

260 280 300 480 และ 510 คู่เบส ไพรเมอร์ EgCIR0409 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 260 310 400 480 และ 900 คู่เบส (ภาพที่ 18) ไพรเมอร์ EgCIR0446 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 200 290 300 517 950 1,517 และ 1,600 คู่เบส ไพรเมอร์ EgCIR0465 ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 130 150 200 280 400 และ 700 คู่เบส (ภาพที่ 19) ไพรเมอร์ EgCIR0781 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 200 320 และ 400 คู่เบส ไพรเมอร์ EgCIR0905 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 150 400 600 และ 750 คู่เบส (ภาพที่ 20) และ ไพรเมอร์ EgCIR1772 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 180 คู่เบส (ภาพที่ 21) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 ชนิดไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และอัตราการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลอะกาโรส 2.5 เปอร์เซ็นต์

Primer type	Sequence (5'-3')	Amplified fragment	Polymorphic fragment	Polymorphism (%)
EgCIR0008	(F) GGAAAGAGGGAAGATG	6	1	16.67
	(R) CCTTGATGATTGATGTGA			
EgCIR0243	(F) TGGAACTCCTATTTTACTGA	2	0	0
	(R) GCCTCGTAATCCTTGTCA			
EgCIR0337	(F) GTCTGCTAAAACATCAACTG	6	2	33.33
	(R) GAGGAGGAGGGGAACGATAA			
EgCIR0409	(F) GGGAATTGGAAGAAAAGAAAG	5	0	0
	(R) TCCTGAGCTGGGGTGGTC			
EgCIR0446	(F) CCCCTTCGAATCCACTAT	7	1	14.29
	(R) CAAATCCGACAAATCAAC			
EgCIR0465	(F) TCCCCCACGACCCATTC	6	0	0
	(R) GGCAGGAGAGGCAGCATTC			
EgCIR0781	(F) CCCCTCCCTACCACGTTCCA	3	1	33.33
	(R) GTTTGCTGTTGCTCTTTGATTTTC			
EgCIR0905	(F) CACCACATGAAGCAAGCAGT	4	2	50
	(R) CCTACCACAACCCCAGTCTC			
EgCIR1772	(F)CTTCCATTGTCTCATTATTCTCTTA	1	0	0
	(R) ACCTTGTATTAGTTTGTCCA			



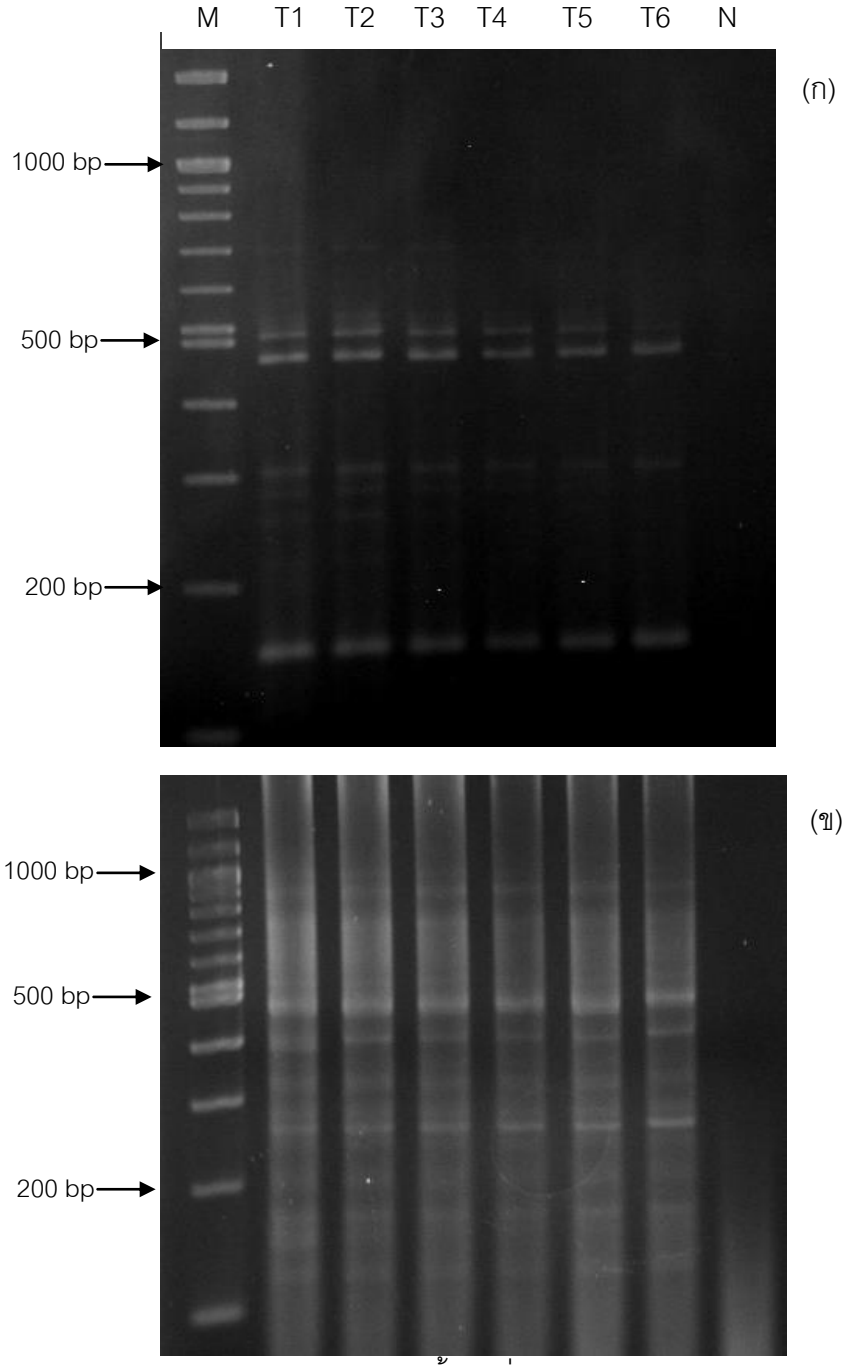
ภาพที่ 17 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) EgCIR0008 และ (ข) EgCIR0243

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

Lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง

Lane 6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปกติในหลอดทดลอง

N คือ Negative control

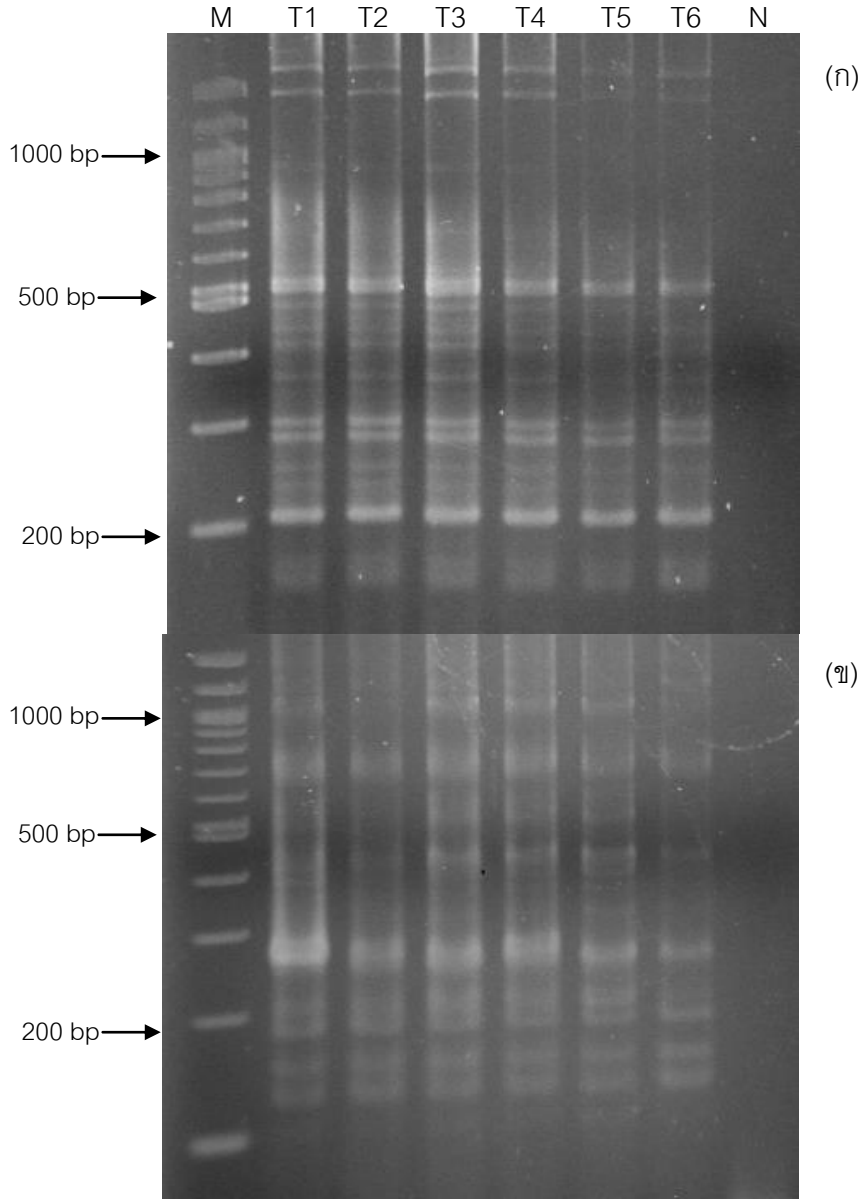


ภาพที่ 18 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) EgCIR0337 และ (ข) EgCIR0409 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

Lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง

Lane 6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปกติในหลอดทดลอง

N คือ Negative control

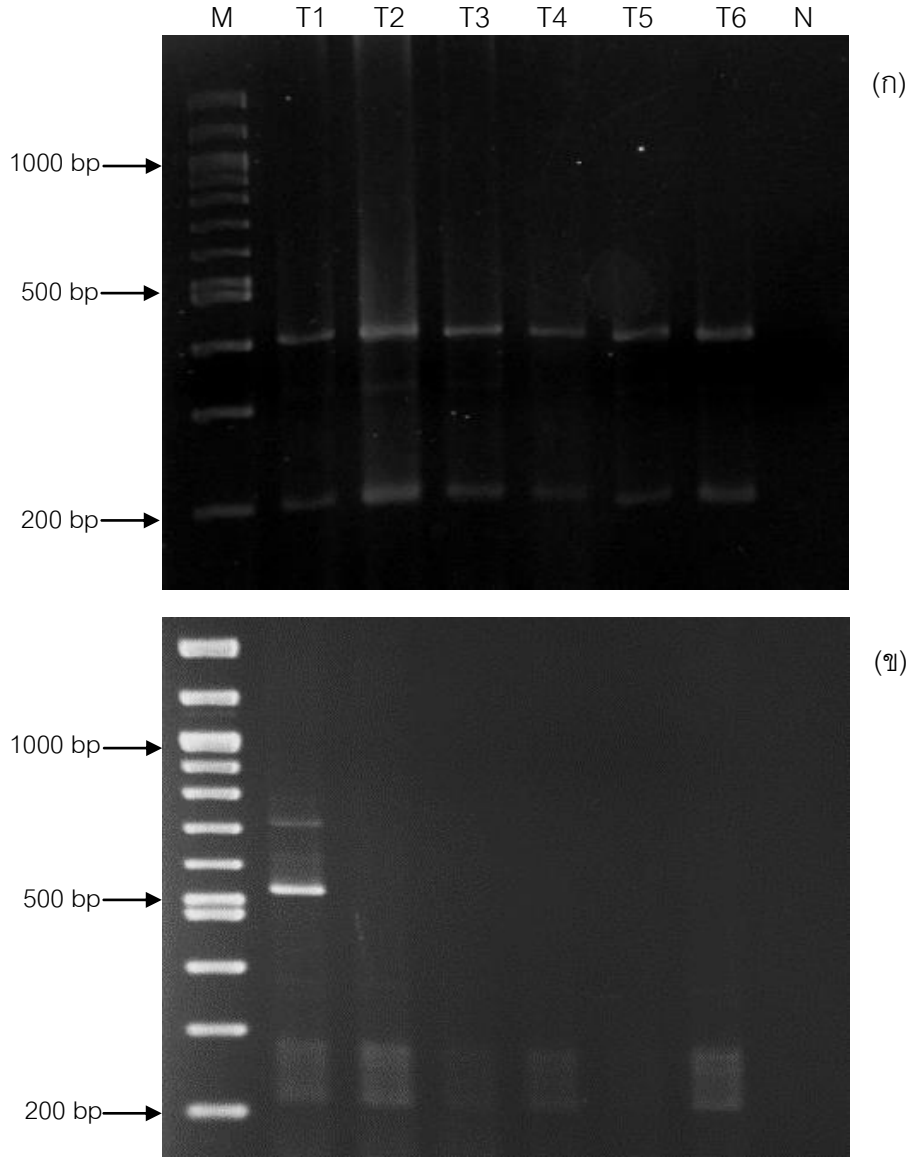


ภาพที่ 19 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) EgCIR0446 และ (ข) EgCIR0465 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

Lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง

Lane 6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปกติในหลอดทดลอง

N คือ Negative control



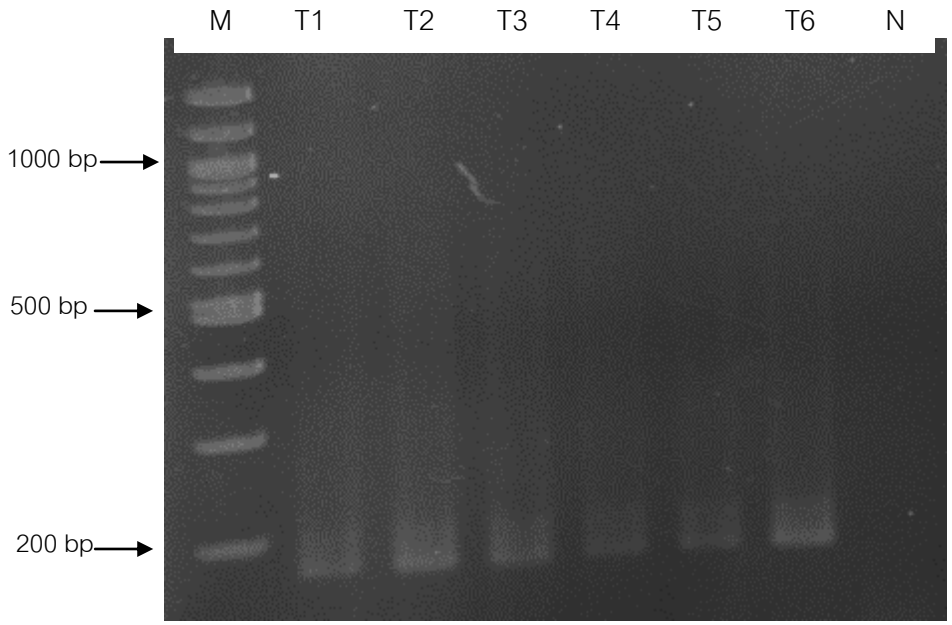
ภาพที่ 20 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) EgCIR0781 และ (ข) EgCIR0905

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

Lane 1-5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง

Lane 6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปกติในหลอดทดลอง

N คือ Negative control



ภาพที่ 21 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR1772

M	คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส
Lane 1-5	คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในหลอดทดลอง
Lane 6	คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปกติในหลอดทดลอง
N	คือ Negative control

ตารางที่ 11 ชนิดไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ และแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละลักษณะหลังตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ บนแผ่นเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์

Primer name	Size of amplified fragments (bp)	DNA pattern					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
EgCIR0008	200	+	+	+	+	+	+
	230	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	+	+	+
	517	+	+	+	+	+	-
	530	+	+	+	+	+	+
	650	+	+	+	+	+	+
EgCIR0243	240	+	+	+	+	+	+
	280	+	+	+	+	+	+
EgCIR0337	150	+	+	+	+	+	+
	270	+	+	+	-	-	-
	280	+	+	+	+	+	-
	300	+	+	+	+	+	+
	480	+	+	+	+	+	+
	500	+	+	+	+	+	+
EgCIR0409	250	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+
	480	+	+	+	+	+	+
EgCIR0446	200	+	+	+	+	+	+
	280	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	+	+	+
	500	+	+	+	+	+	+
	900	+	+	+	+	-	-

ตารางที่ 11 ชนิดไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ และแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละลักษณะหลังตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ บนแผ่นเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ต่อ)

Primer name	Size of amplified fragments (bp)	DNA pattern					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
EgCIR0465	130	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+
	180	+	+	+	+	+	+
	210	+	+	+	+	+	+
	280	+	+	+	+	+	+
	450	+	+	+	+	+	+
EgCIR0781	200	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	-	-	-
	400	+	+	+	+	+	+
EgCIR0905	210	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	+	+	+
	520	+	-	-	-	-	-
	700	+	-	-	-	-	-
EgCIR1772	180	+	+	+	+	+	+

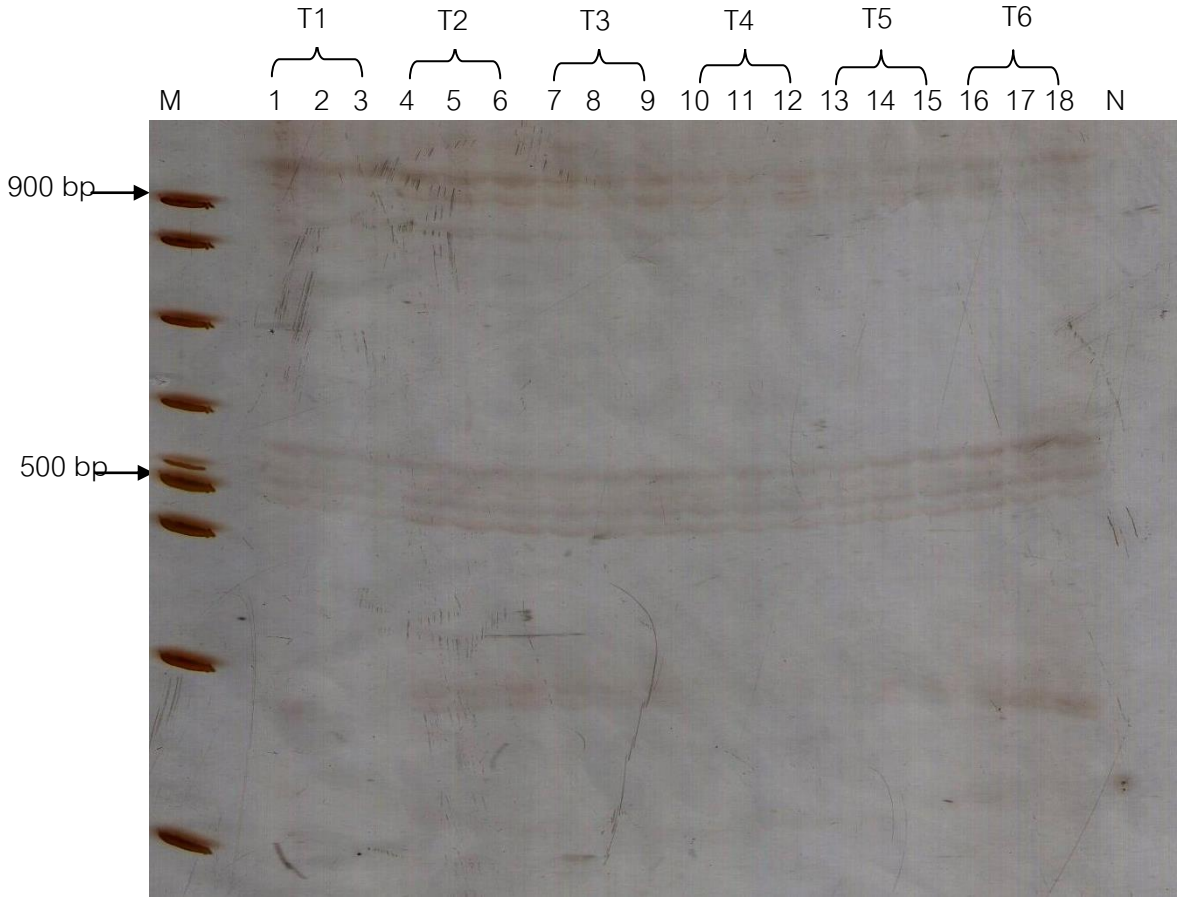
2.3.2 โพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเลคโตรฟอริซิส

จากการศึกษาด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ บนแผ่นเจลโพลีอะคลิลาไมด์ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวนถึง 5 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอของลักษณะต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติแต่ละลักษณะได้ โดยไพรเมอร์ EgCIR1772 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลีมอร์ฟิซึมสูงสุดที่ 75 รองลงมาคือ EgCIR0008 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR0465 ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลีมอฟิซึมที่ 33.33 33.33 25 และ 20 ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

เมื่อพิจารณาแต่ละไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ EgCIR1772 ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอขนาด 350 370 380 และ 400 คู่เบส ไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอขนาด 280 500 510 และ 560 คู่เบส ไพรเมอร์ EgCIR0781 ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอขนาด 100 300 และ 500 คู่เบส ไพรเมอร์ EgCIR0905 ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอขนาด 500 550 580 และ 610 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ EgCIR0465 ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอขนาด 120 130 160 170 และ 180 คู่เบส (ภาพที่ 22-30; ตารางที่ 13)

ตารางที่ 12 ชนิดไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และอัตราการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์

Primer type	Sequence (5'------>3')	Amplified fragment	Polymorphic fragment	Polymorphism (%)
EgCIR0008	(F) GGAAAGAGGGAAGATG	3	1	33.33
	(R) CCTTGATGATTGATGTGA			
EgCIR0243	(F) TGGAACTCCTATTTTACTGA	3	0	0
	(R) GCCTCGTAATCCTTGTCA			
EgCIR0337	(F) GTCTGCTAAAACATCAACTG	2	0	0
	(R) GAGGAGGAGGGGAACGATAA			
EgCIR0409	(F) GGGAATTGGAAGAAAAGAAAG	4	0	0
	(R) TCCTGAGCTGGGGTGGTC			
EgCIR0446	(F) CCCCTTCGAATCCACTAT	5	0	0
	(R) CAAATCCGACAAATCAAC			
EgCIR0465	(F) TCCCCCACGACCCATTC	5	1	20
	(R) GGCAGGAGAGGCAGCATTC			
EgCIR0781	(F) CCCCTCCCTACCACGTTCCA	3	1	33.33
	(R) GTTTGCTGTTGCTCTTTGATTTTC			
EgCIR0905	(F) CACCACATGAAGCAAGCAGT	4	1	25
	(R) CCTACCACAACCCCAGTCTC			
EgCIR1772	(F)CTTCCATTGTCTCATTATTCTCTTA	4	3	75
	(R) ACCTTGTATTAGTTTGTCCA			



ภาพที่ 22 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

T1 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ช่อดอก มีสีขาวอมเขียว

T2 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว

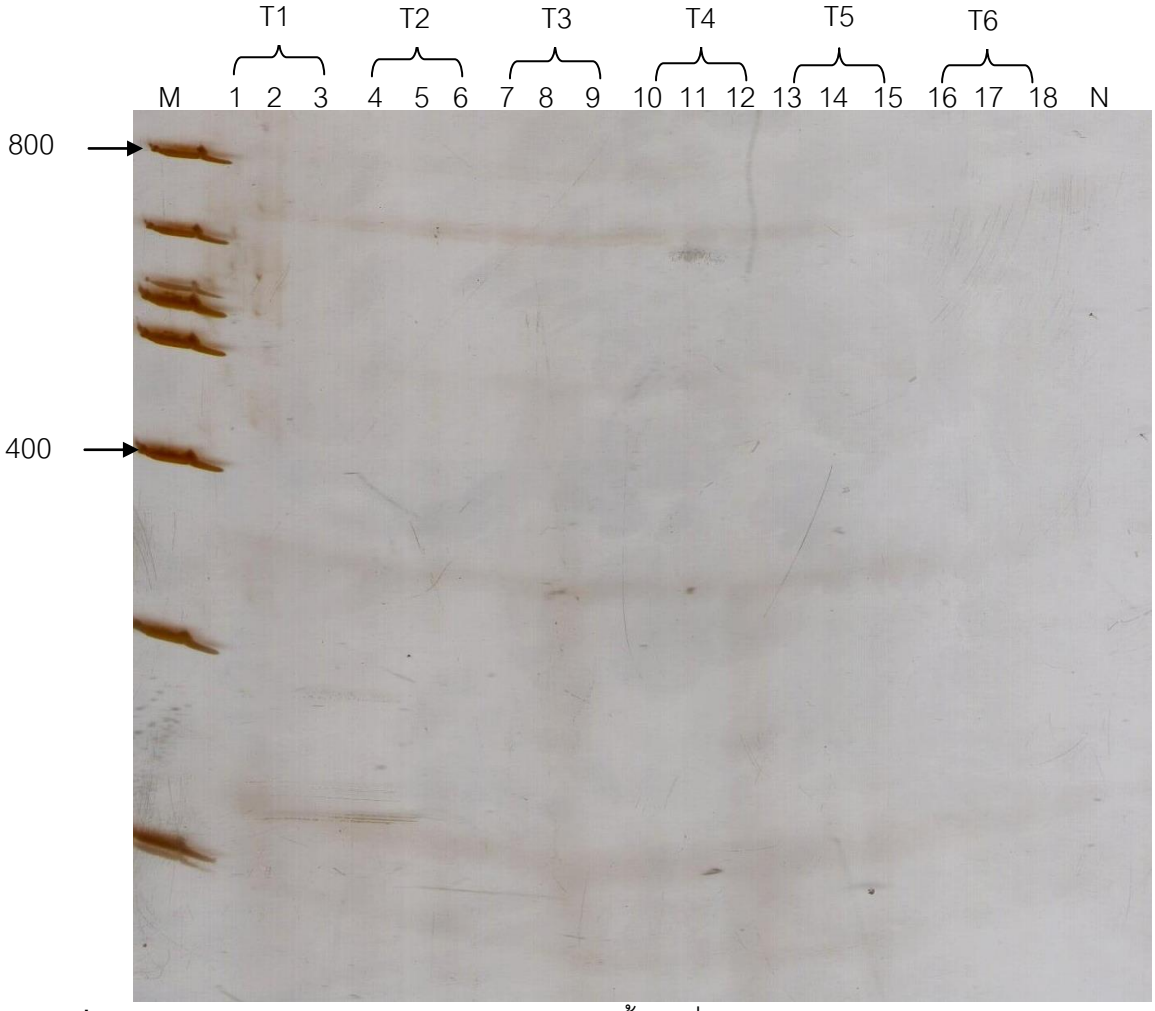
T3 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว

T4 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม

T5 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง

T6 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ (ชุดควบคุม)

N คือ Negative control



ภาพที่ 23 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0243

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

T1 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ช่อดอก มีสีขาวอมเขียว

T2 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว

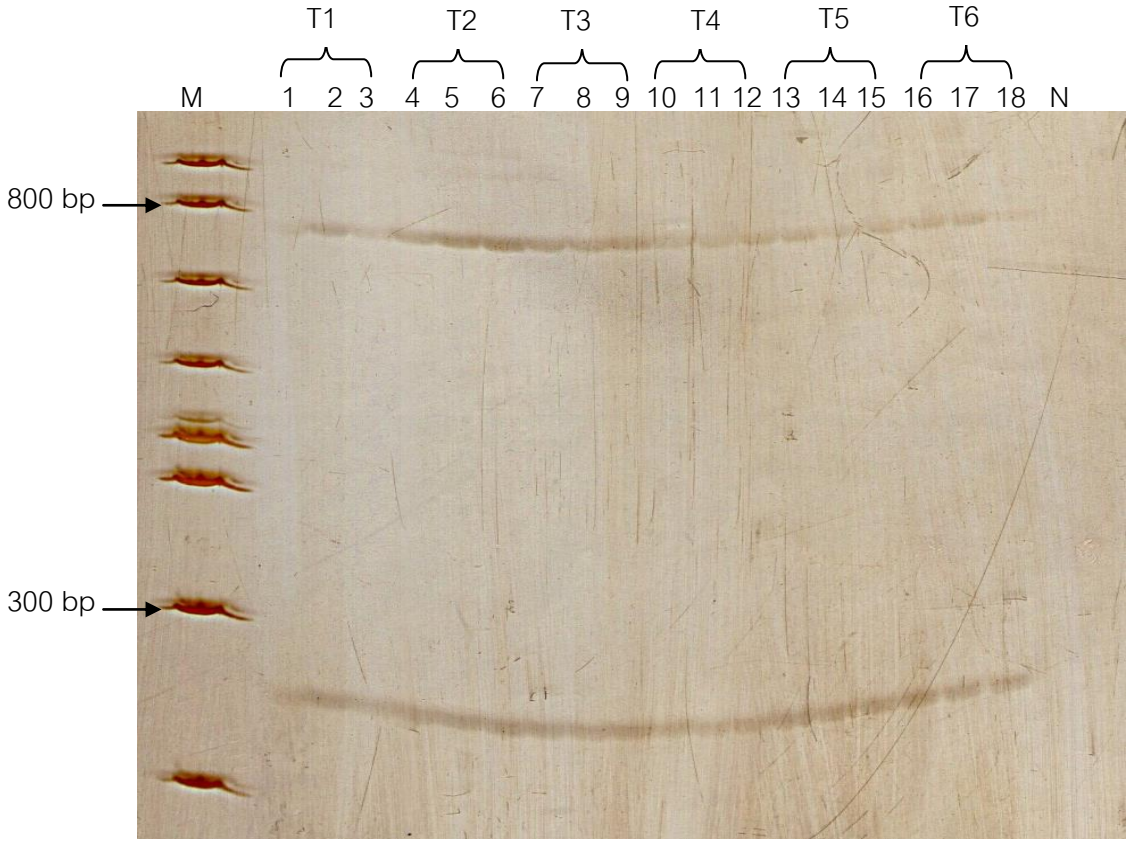
T3 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว

T4 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม

T5 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง

T6 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ (ชุดควบคุม)

N คือ Negative control



ภาพที่ 24 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0337

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

T1 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ช่อดอก มีสีขาวอมเขียว

T2 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว

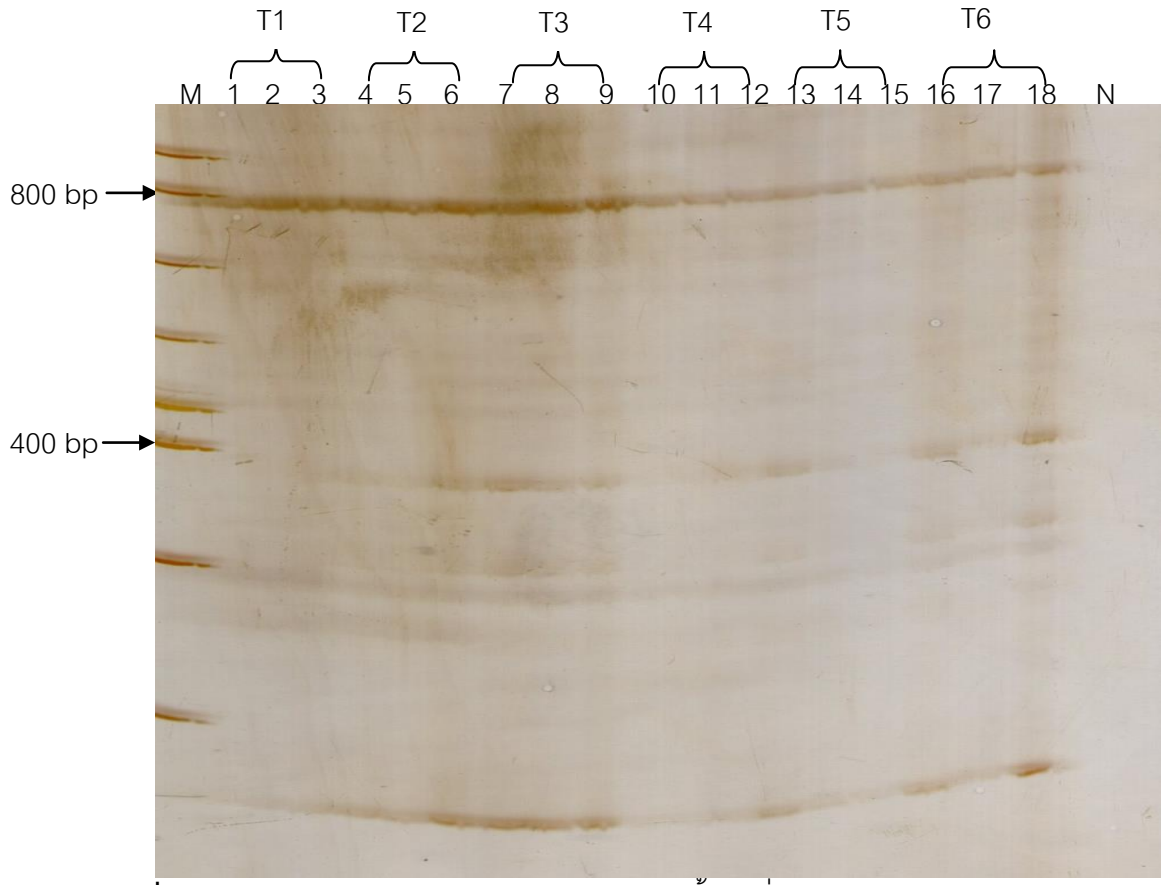
T3 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว

T4 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม

T5 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง

T6 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ (ชุดควบคุม)

N คือ Negative control



ภาพที่ 25 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0409

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

T1 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ช่อดอก มีสีขาวอมเขียว

T2 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว

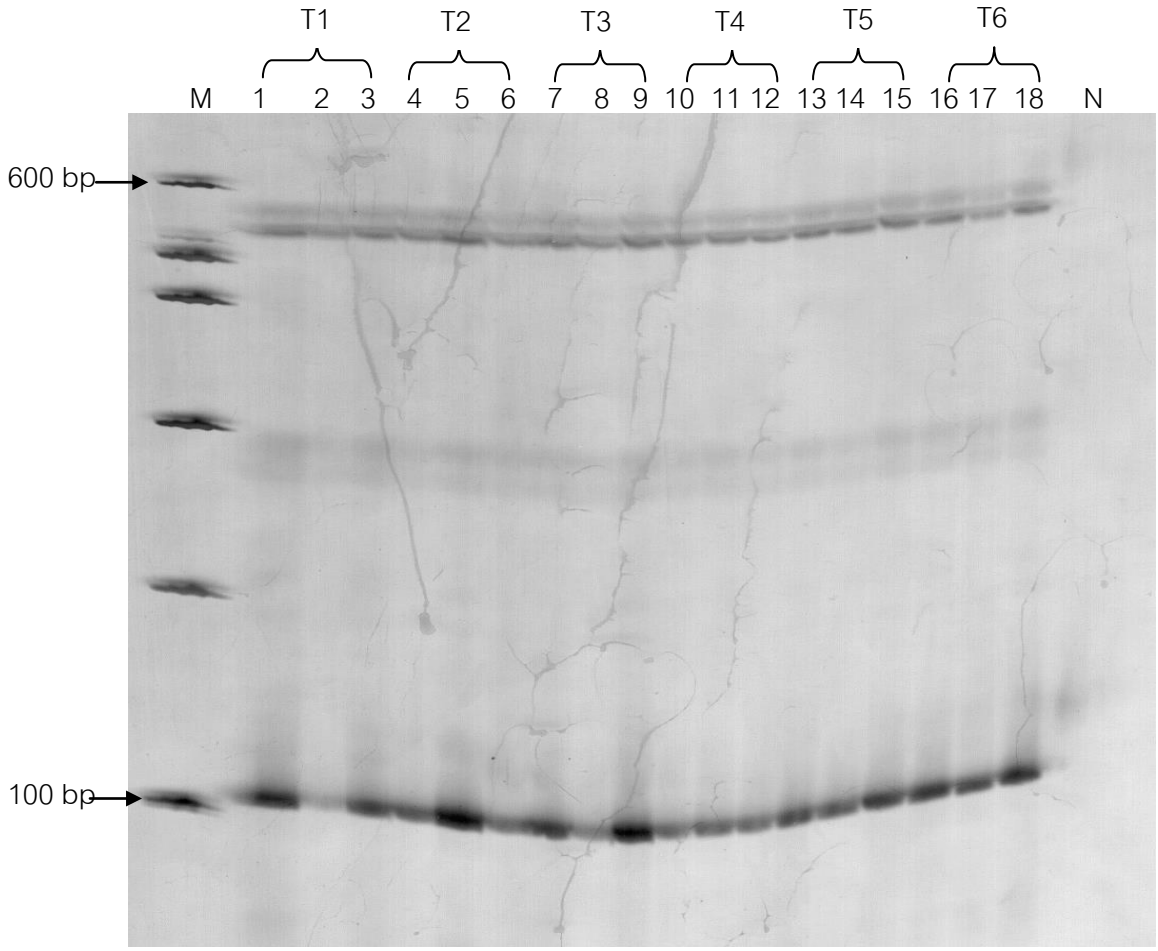
T3 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว

T4 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม

T5 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง

T6 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ (ชุดควบคุม)

N คือ Negative control



ภาพที่ 26 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0446

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

T1 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ช่อดอก มีสีขาวอมเขียว

T2 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว

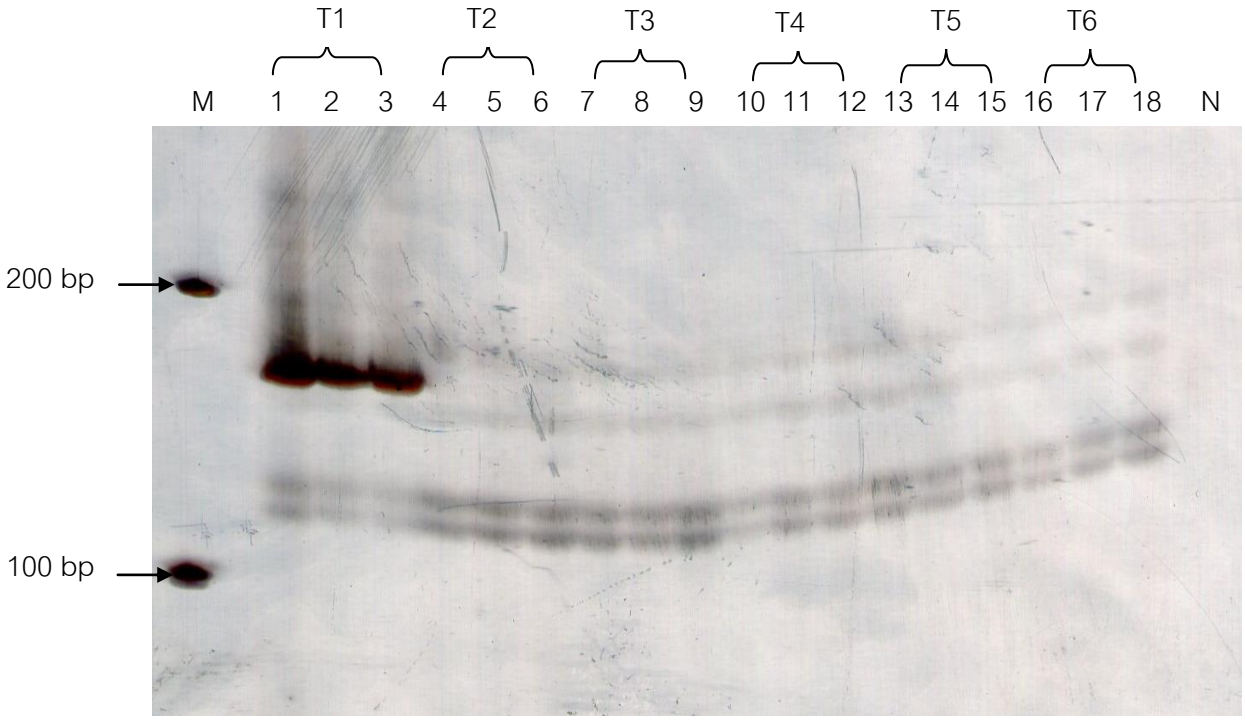
T3 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว

T4 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม

T5 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง

T6 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ (ชุดควบคุม)

N คือ Negative control



ภาพที่ 27 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0465

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

T1 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ช่อดอก มีสีขาวอมเขียว

T2 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว

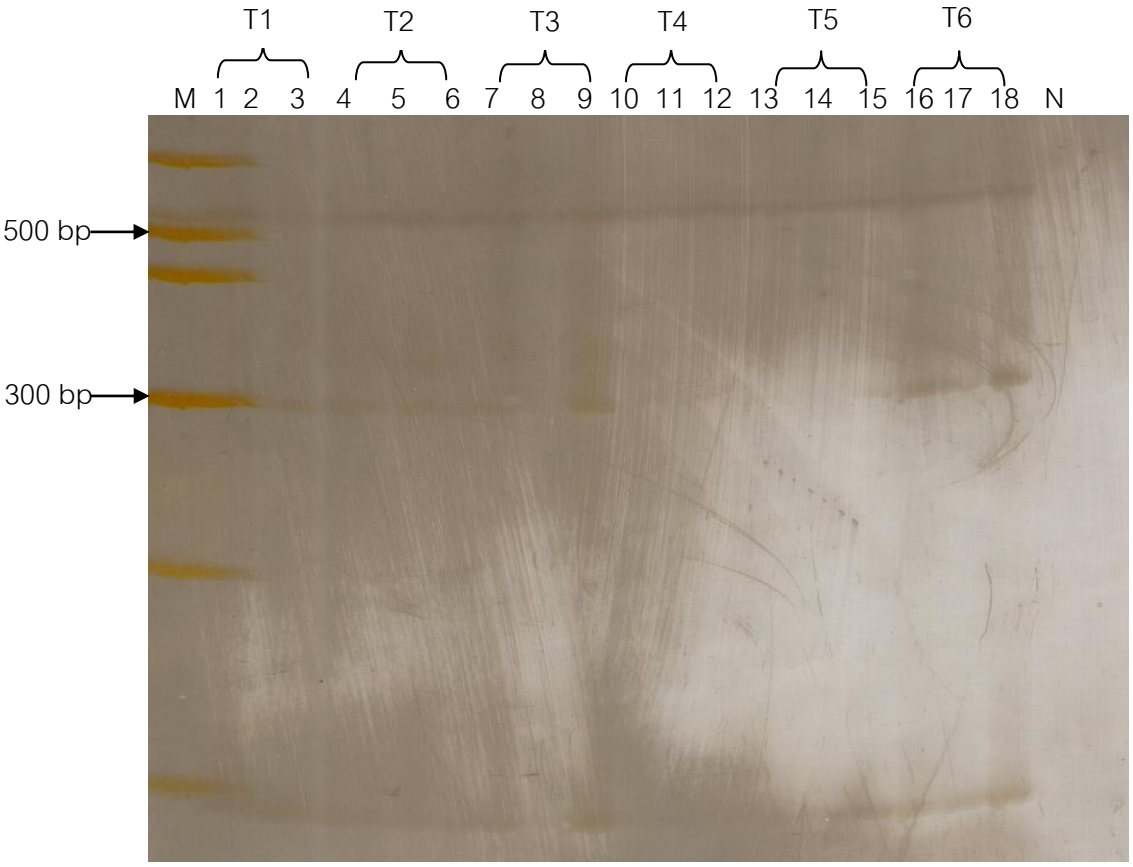
T3 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว

T4 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม

T5 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง

T6 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ (ชุดควบคุม)

N คือ Negative control



ภาพที่ 28 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0781

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

T1 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ช่อดอก มีสีขาวอมเขียว

T2 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว

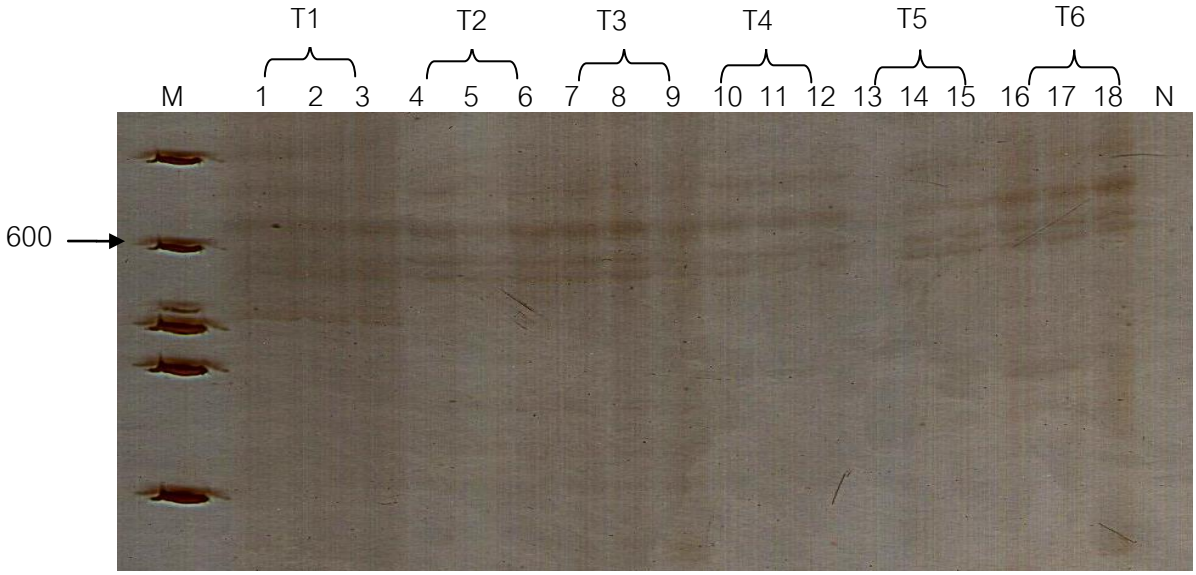
T3 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว

T4 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม

T5 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง

T6 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ (ชุดควบคุม)

N คือ Negative control



ภาพที่ 29 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0905

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

T1 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ช่อดอก มีสีขาวอมเขียว

T2 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว

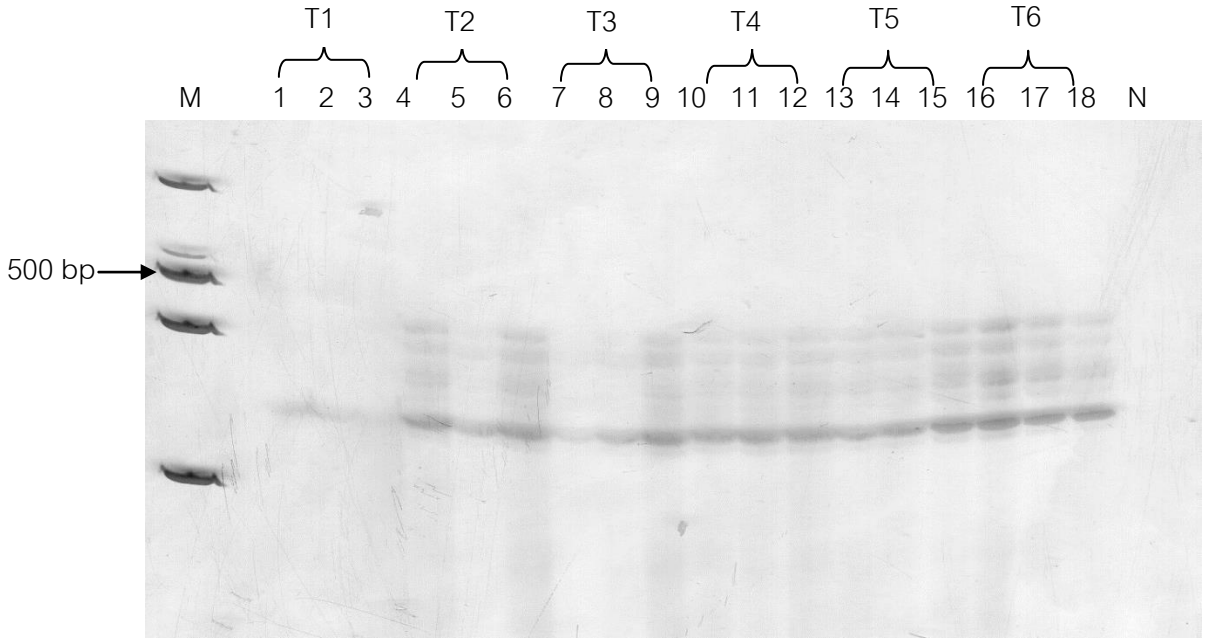
T3 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว

T4 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม

T5 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง

T6 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ (ชุดควบคุม)

N คือ Negative control



ภาพที่ 30 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR1772

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

T1 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ช่อดอก มีสีขาวอมเขียว

T2 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายกลีบของช่อดอกมีลายด่างสีขาว

T3 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปลายช่อดอกมีสีขาวอมเขียว

T4 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอก มีสีเขียว ส่วนปลายของกลีบมีสีเหลืองอมส้ม

T5 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งช่อดอกมีลักษณะรียาว ดอกมีสีเขียวอมเหลือง

T6 คือ ดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ (ชุดควบคุม)

N คือ Negative control

ตารางที่ 13 ชนิดไพรเมอร์ และขนาดของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ ทั้ง 6 ลักษณะ ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลโพลีอะคลิลาไมด์

Primer name	Size of amplified fragments (bp)	DNA pattern					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
EgCIR0008	280	-	+	+	+	+	+
	500	+	+	+	+	+	+
	510	+	+	+	+	+	+
	560	+	+	+	+	+	+
EgCIR0243	230	+	+	+	+	+	+
	370	+	+	+	+	+	+
	750	+	+	+	+	+	+
EgCIR0337	260	+	+	+	+	+	+
	780	+	+	+	+	+	+
EgCIR0409	150	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+
	800	+	+	+	+	+	+
EgCIR0446	100	+	+	+	+	+	+
	270	+	+	+	+	+	+
	280	+	+	+	+	+	+
	550	+	+	+	+	+	+
	580	+	+	+	+	+	+
EgCIR0465	120	+	+	+	+	+	+
	130	+	+	+	+	+	+
	160	+	+	+	+	+	+
	170	+	-	-	-	-	-

ตารางที่ 13 ชนิดไพรเมอร์ และขนาดของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ ทั้ง 6 ลักษณะ ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลโพลีอะคลิลาไมด์ (ต่อ)

Primer name	Size of amplified fragments (bp)	DNA pattern					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
EgCIR0465	180	+	+	+	+	+	+
EgCIR0781	100	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	+	-	+
	500	+	+	+	+	+	+
EgCIR0905	500	+	-	-	-	-	-
	550	+	+	+	+	+	+
	580	+	+	+	+	+	+
	610	+	+	+	+	+	+
EgCIR1772	350	+	+	+	+	+	+
	370	-	+	+	+	+	+
	380	-	+	+	+	+	+
	400	-	+	+	+	+	+

3. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันโคลนกระบี่ในหลอดทดลองด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรีและเครื่องหมายเอสเอสอาร์

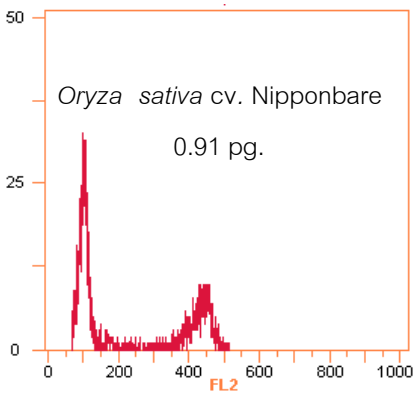
3.1 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี

จากการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลองด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลองมีค่าเท่ากับ 3.54 และ 3.69 พิโคกรัม ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 14 ภาพที่ 32-33)

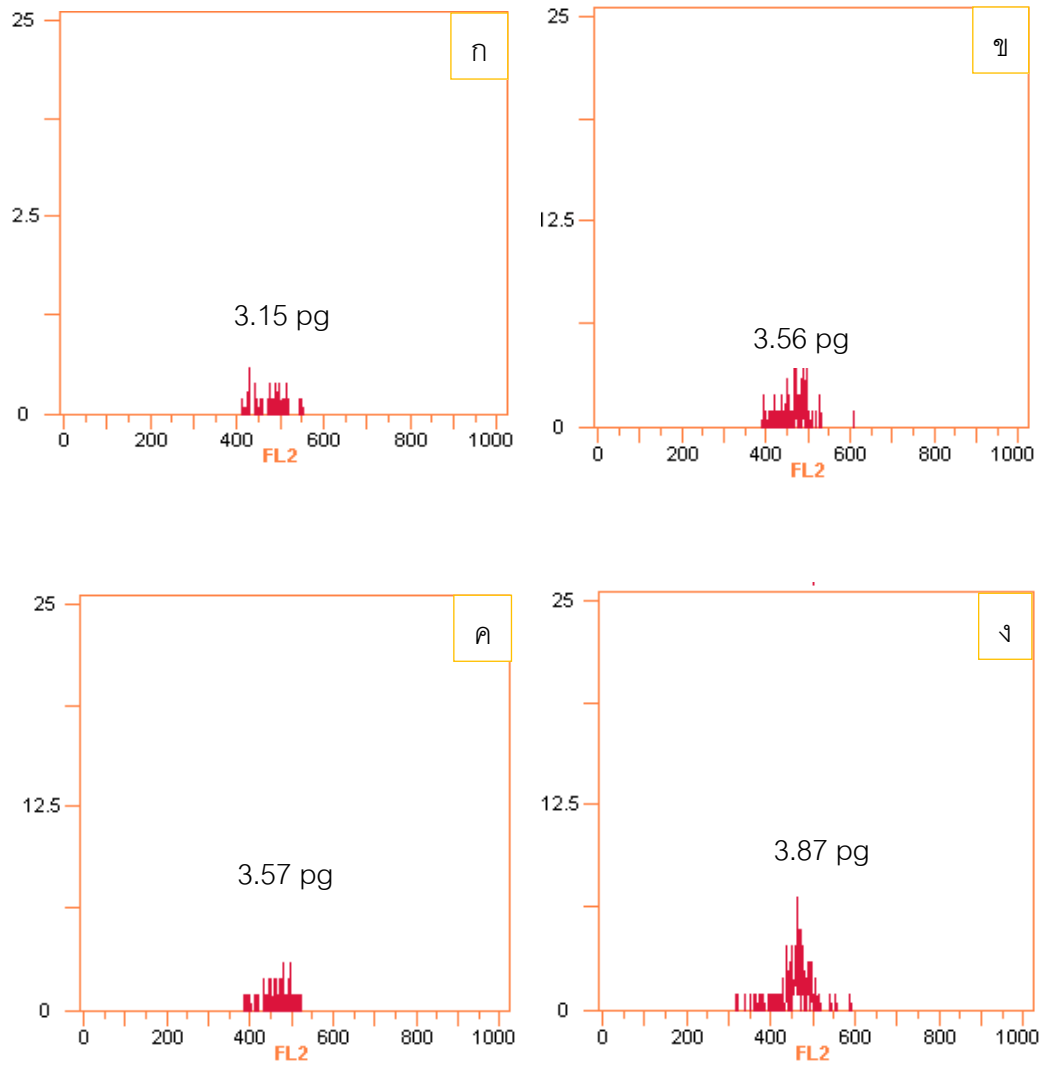
ตารางที่ 14 ขนาดจีโนมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลอง

Oil palm	*Oryza sativa* Fluorescent Intensity	Oil palm Fluorescent Intensity	Genome size (pg)
Flowering	117.47	454.98	3.54
Non-flowering	116.04	471.33	3.69
F-test	Ns	ns	ns
C.V.(%)	5.51	2.5	6.06

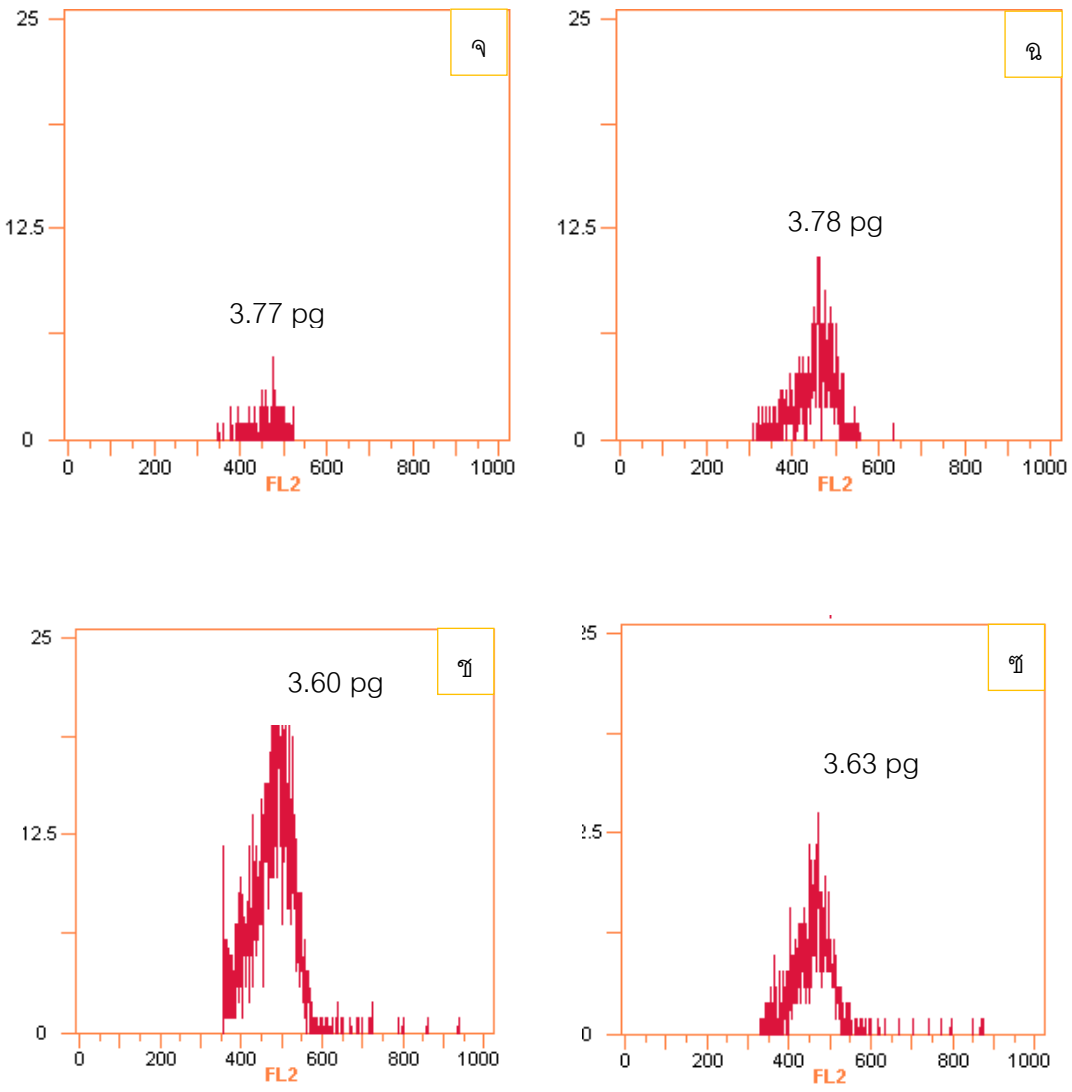
ns คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 31 ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นข้าวญี่ปุ่นสายพันธุ์ Nipponbare เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน



ภาพที่ 32 ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันใบปาล์มน้ำมันที่ออกดอกในหลอดทดลอง (ก – ง)



ภาพที่ 33 ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันใบปาล์มน้ำมันที่ไม่ออกดอกในหลอดทดลอง (จ – ช)

3.2 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์

จากการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลองด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (นาโนดร็อป) พบว่าตัวอย่างดีเอ็นที่สกัดได้จากใบปาล์มน้ำมันทั้งสองแบบมีปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียงกัน โดยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบปาล์มน้ำมันที่ออกดอกมีปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย 1,872.65 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับตัวอย่างดีเอ็นเอ

ที่สกัดได้จากใบปาล์มน้ำมันที่ไม่ออกดอก มีปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย 2,057.44 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ปริมาณดีเอ็นเอและค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอของใบต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่สกัดได้

Oil palm	Mean conc. of DNA (ng/µl)	260/280 nm
Flowering	1,872.65	1.96
Non-flowering	2,057.44	2.00
F-test	ns	ns
C.V. (%)	43.75	5.01

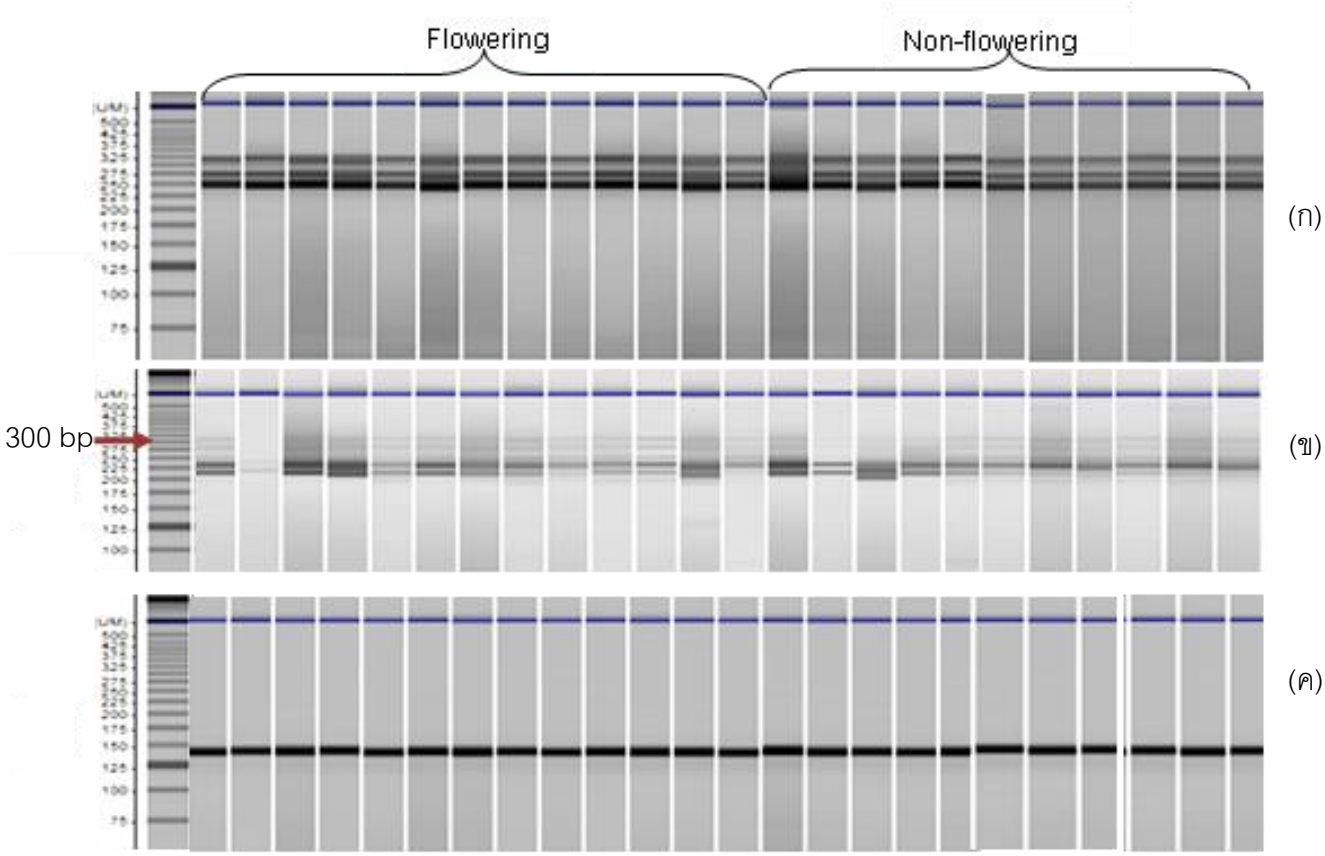
ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลองด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 9 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามี 3 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้รูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างกันในตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งสองลักษณะ คือ ไพรเมอร์ EgCIR0446 EgCIR0243 และ EgCIR0409 ซึ่งไพรเมอร์ดังกล่าวให้อัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึม 75 66.67 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 16)

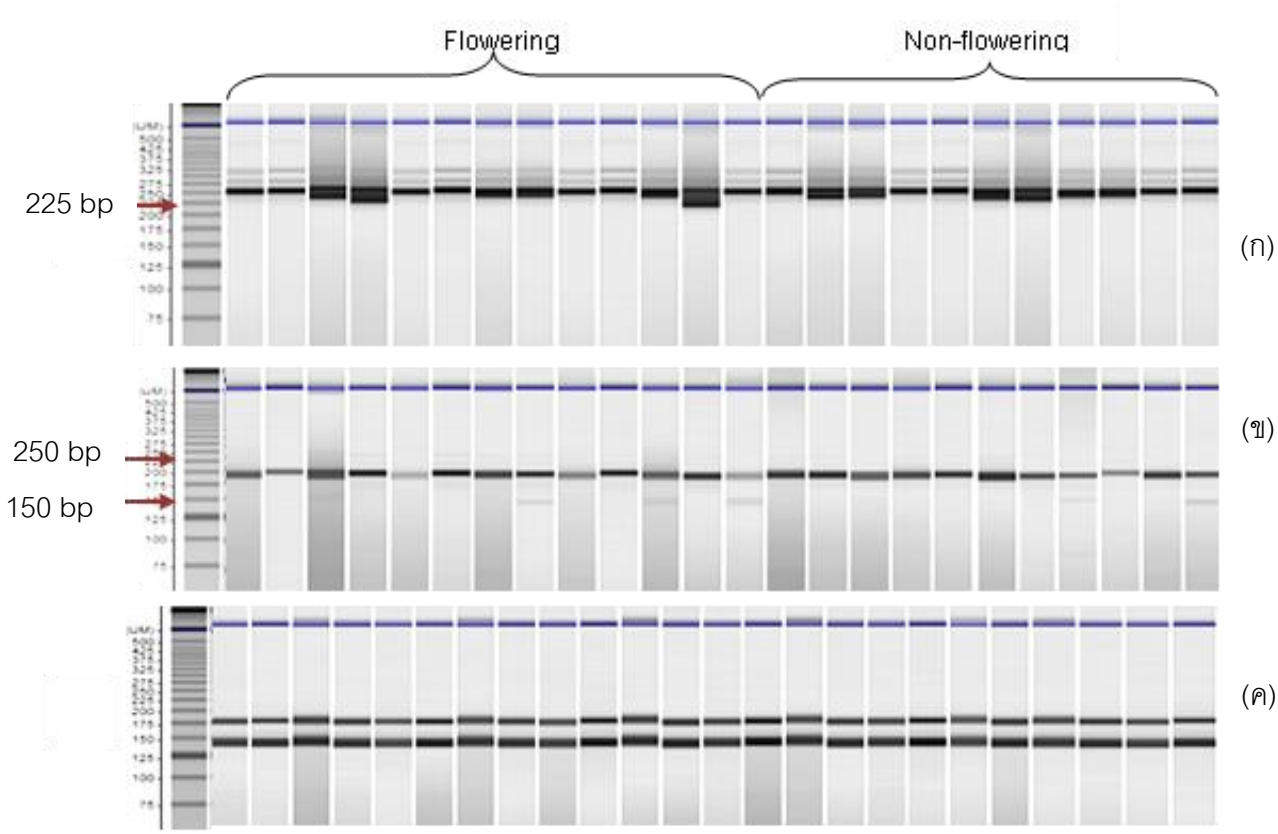
เมื่อพิจารณาไพรเมอร์แต่ละชนิด พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR0446 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 150 200 220 และ 250 คู่เบส (ภาพที่ 35ข) ไพรเมอร์ EgCIR0243 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 215 225 230 250 300 และ 325 คู่เบส (ภาพที่ 34ข) และไพรเมอร์ EgCIR0409 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 225 250 275 และ 325 คู่เบส (ภาพที่ 35ก) ไพรเมอร์ EgCIR0781 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 140 150 175 และ 200 คู่เบส ไพรเมอร์ EgCIR0905 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 220 225 300 และ 325 คู่เบส ไพรเมอร์ EgCIR1772 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 150 160 และ 180 คู่เบส (ภาพที่ 36)

ตารางที่ 16 ชนิดไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และอัตราการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ที่ได้จากการตรวจสอบปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ ด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์

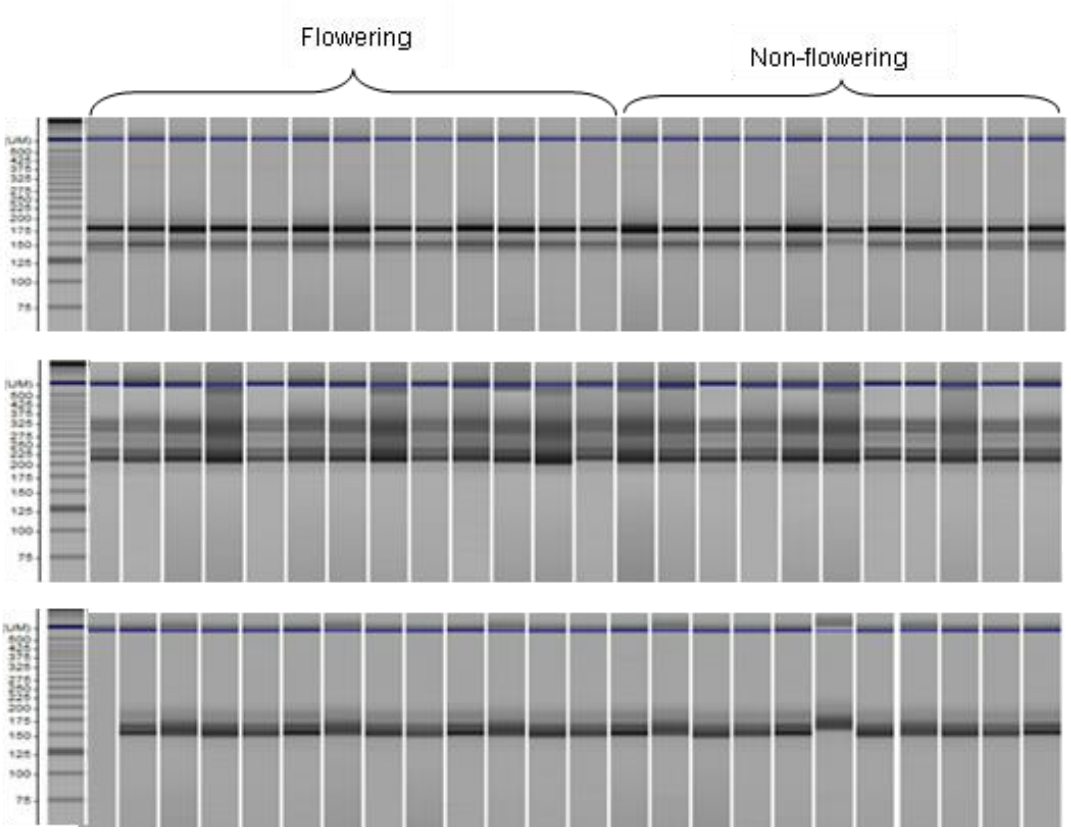
Primer type	Sequence (5'--->3')	Amplified fragment	Polymorphic fragment	Polymorphism (%)
EgCIR0008	(F) GGAAAGAGGGAAGATG	3	0	0
	(R) CCTTGATGATTGATGTGA			
EgCIR0243	(F) TGGAACTCCTATTTTACTGA	6	4	66.67
	(R) GCCTCGTAATCCTTGTCA			
EgCIR0337	(F) GTCTGCTAAAACATCAACTG	1	0	0
	(R) GAGGAGGAGGGGAACGATAA			
EgCIR0409	(F) GGGAATTGGAAGAAAAGAAAG	4	1	25
	(R) TCCTGAGCTGGGGTGGTC			
EgCIR0446	(F) CCCCTTCGAATCCACTAT	4	3	75
	(R) CAAATCCGACAAATCAAC			
EgCIR0465	(F) TCCCCCACGACCCATTC	3	0	0
	(R) GGCAGGAGAGGCAGCATTC			
EgCIR0781	(F) CCCCTCCCTACCACGTTCCA	4	0	0
	(R) GTTTGCTGTTGCTCTTTGATTTTC			
EgCIR0905	(F) CACCACATGAAGCAAGCAGT	4	0	0
	(R) CCTACCACAACCCCAGTCTC			
EgCIR1772	(F) CTTCCATTGTCTCATTATTCTCTTA	3	0	0
	(R) ACCTTGTATTAGTTTGTCCA			



ภาพที่ 34 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) EgCIR0008 (ข) EgCIR0243 (ค) EgCIR0337



ภาพที่ 35 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) EgCIR0409 (ข) EgCIR0446 (ค) EgCIR0465



ภาพที่ 36 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ (ก) EgCIR0781 (ข) EgCIR0905 (ค) EgCIR1772

บทที่ 4

วิจารณ์

ลักษณะความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่เกิดขึ้นในหลอดทดลองเป็นรูปแบบหนึ่งของความแปรปรวนของเซลล์ร่างกาย (somaclonal variation) ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของเซลล์ร่างกายจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจเนื่องมาจากพันธุกรรมหรือจีโนไทป์ของพืช สารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง จำนวนครั้งและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น

พันธุกรรมของพืชส่งผลให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม กล่าวคือ พืชที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันจะมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมไม่เท่ากัน โดยเฉพาะกล้วย พบว่าชนิดและความถี่ของความแปรปรวนทางพันธุกรรมขึ้นอยู่กับพันธุกรรม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยพันธุ์ “NewGuinea Cavendish’ มีความแปรปรวนสูงกว่าพันธุ์ ‘Williams”(กิตติ และคณะ, 2555) สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งชนิดและความเข้มข้นมีผลต่อการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินความเข้มข้นสูงส่งผลให้เกิดการเพิ่มปริมาณของกล้วยอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะนำไปสู่ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Sahijram *et al*., 2003) BA ความเข้มข้นสูง (30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งเสริมให้เกิดการแปรปรวนของแคลลัสข้าวมากกว่าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (กิตติ และคณะ, 2555) ชนิดของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยแรกที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับสาเหตุการกลายพันธุ์เนื่องจากองค์ประกอบของเซลล์ภายในชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน เช่น การใช้ส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดหรือตาข้างเมื่อทำการเพาะเลี้ยงก็มักจะได้ต้นพืชที่ลักษณะเหมือนเดิม แต่หากนำส่วนอื่นมาเพาะเลี้ยงและชักนำให้มีการพัฒนาไปเป็นยอดรวมหรือยอดแขนงหรือเกิดเป็นโซมาติกเอ็มบริโอแล้วจึงพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ซึ่งจะต้องมีกระบวนการพัฒนาหลายขั้นตอนจึงมีโอกาสเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวนครั้งและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ส่งผลต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกาแฟ (*Coffea arabica*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น โดยพบว่าเมื่ออายุของเซลล์ซัสเพนชั่นมากขึ้น ส่งผลให้ต้นกาแฟมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพิ่มมากขึ้นด้วย (Etienne and Bertrand, 2003) เพราะฉะนั้นความแปรปรวนทางพันธุกรรมจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อจำนวนครั้งในการย้ายเลี้ยงเพิ่มขึ้น

เช่นเดียวกับต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกในหลอดทดลองในลักษณะต่างๆ ซึ่งเป็นความผิดปกติหนึ่งที่อาจเกิดจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากสาเหตุข้างต้น โดยเฉพาะในขั้นตอนของการชักนำเป็นต้นอ่อนชุดที่ 1 (primary somatic embryo; pSE) จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส บางชิ้นส่วนสามารถเกิด pSE ได้ง่ายและเร็ว บางชิ้นส่วนต้องย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่จึงจะเกิด นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาในการเกิด pSE ไม่พร้อมกัน ขึ้นอยู่กับศักยภาพความพร้อมของเซลล์ในการพัฒนาเพื่อเกิดเป็นพืชต้นใหม่ ลักษณะผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ลักษณะเมื่อพิจารณาทางสัณฐานวิทยา พบว่าต้นกล้ามีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจนทั้งที่ต้นกล้าปาล์มน้ำมันดังกล่าวไม่ได้ผ่านการทรีตด้วยสารเคมีใดๆ นั่นก็แสดงว่า ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติดังกล่าวอาจจะเกิดจากการย้ายเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลานาน ทำให้เกิดการจัดระบบใหม่ของสารพันธุกรรม สอดคล้องกับการศึกษาของ Sheidai และคณะ (2008) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า ต้นกล้วยที่ย้ายเลี้ยงเป็นเวลานานจะเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพิ่มมากขึ้น แม้ว่าพืชบางลักษณะสามารถตรวจสอบความแปรปรวนได้จากลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยสายตา แต่บางครั้งการตรวจสอบด้วยสายตาอาจเกิดความผิดพลาดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากย้ายต้นกล้าลงแปลงปลูกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชอาจเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม ทำให้เกิดความผิดพลาดในการจัดจำแนกสายพันธุ์ได้ ดังนั้นการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่ เทคนิคทางชีวโมเลกุลและเทคนิคโฟลไซโทเมทรี เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่นิยมใช้ส่วนใหญ่คือเครื่องหมายอาร์เอพีดีและเอสเอสอาร์

เครื่องหมายอาร์เอพีดีสามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ จากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 11 ไพรเมอร์ พบว่ามี 3 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะของการเกิดดอกในหลอดทดลองกับต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติได้ โดยดูจากอัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึม ซึ่งไพรเมอร์ OPAB14 ให้อัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมสูงสุดที่ 60 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ OPA03 และ OPR11 ให้อัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมที่ 50 และ 14.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การตรวจสอบต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ลักษณะ ด้วยไพรเมอร์ OPAB14 พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในต้นกล้าปาล์มน้ำมันลักษณะที่ 1-5 เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม สำหรับไพรเมอร์ OPA03 และ OPR11 พบว่ามีเพียงต้นกล้าปาล์มน้ำมันลักษณะที่ 1 เท่านั้นที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hu และคณะ (2008) พบว่าต้นบุก (*Amorphophallus albus*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมหลังจากตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

อย่างไรก็ตาม ธนวดี และคณะ (2552) รายงานการใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ ในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน พบว่าไพรเมอร์ OPAB09 และ OPAB01 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด แต่ไพรเมอร์ดังกล่าวให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นโมโนมอร์ฟิซึม ในกรณีของหน่อไม้ฝรั่งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็พบว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมหลังจากตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี (Raimondi *et al*., 2001)

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองของต้นที่ผิดปกติลักษณะต่าง ๆ ด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่ พบว่า มีหลายคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในต้นกล้าปาล์มน้ำมันแต่ละลักษณะ โดยไพรเมอร์ EgCIR0905 ให้อัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมสูงสุด รองลงมาคือ ไพรเมอร์ EgCIR0337 EgCIR0781 EgCIR0008 และ EgCIR0446 ให้อัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึม 75 33.33 33.33 16.67 และ 14.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จากการศึกษาพบว่ามีเพียงไพรเมอร์เดียว คือ EgCIR0008 ที่สามารถตรวจสอบได้ว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ลักษณะมีรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากต้นกล้าปาล์มชุดควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาของ Kumbhar และคณะ (2013) ที่ใช้เจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ในการตรวจสอบสายพันธุ์ข้าวด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ ในขณะที่ Bickel และคณะ (2011) รายงานการใช้เจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในการพัฒนาเครื่องหมายเอสเอสอาร์เพื่อใช้ประโยชน์ในการทำแผนที่ยีนในพืชสกุล *Linum* sp. โดยความเข้มข้นของเจลอะกาโรสที่ใช้จะขึ้นอยู่กับขนาดชิ้นของดีเอ็นเอที่สนใจ เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดระหว่าง 200-1500 คู่เบส (Barril and Nates, 2012) ซึ่งดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันก็มีขนาดอยู่ในช่วงนี้ คือ 100-250 คู่เบส (Thawaro and Te-chato, 2009) 500-600 คู่เบส (อัญชลี และสมปอง, 2555; Sanputawong and Te-chato, 2011)

สำหรับการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลโพลีอะคลิลาไมด์ พบว่า มีไพรเมอร์จำนวนถึง 5 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอของลักษณะต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติแต่ละลักษณะได้ โดยไพรเมอร์ EgCIR1772 ให้อัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมสูงสุดที่ 75 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ไพรเมอร์ EgCIR0008 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR0465 ให้อัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมที่ 33.33 33.33 25 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไพรเมอร์ดังกล่าวให้ผลการตรวจสอบที่เหมือนกันคือมีเพียงต้นกล้าปาล์มน้ำมันลักษณะที่ 1 เท่านั้นที่มีรูปแบบดีเอ็นเอ

แตกต่างจากต้นควบคุม ยกเว้นไพรเมอร์ EgCIR0781 ที่ให้ผลการตรวจสอบแตกต่างกันคือ มีเพียงต้นกล้าปาล์มน้ำมันลักษณะที่ 5 เท่านั้นที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอแตกต่างจากต้นควบคุม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sales และ Butardo (2014) ที่สามารถใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วยที่ผ่านการย้ายเลี้ยงที่ระยะเวลาแตกต่างกันได้ Singh และคณะ (2007) รายงานว่าเครื่องหมายเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมในการตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอภายในและระหว่างพันธุ์พืชได้ สอดคล้องกับ Arias และคณะ (2012) ที่รายงานว่าสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ได้ วิธีการระหว่างการตรวจสอบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ และเจลอะคลิลาไมด์ พบว่า การตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรสนั้น บางไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบบนเจลโพลีอะคลิลาไมด์ทำให้ยากต่อการวิเคราะห์ แต่วิธีการเตรียมเจลอะกาโรสทำได้ง่าย และรวดเร็วในขณะที่การเตรียมเจลโพลีอะคลิลาไมด์ยุ่งยากและใช้เวลาค่อนข้างนาน นอกจากนี้ยังสามารถแยกดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ได้ดี หลังจากเปรียบเทียบทั้งสองวิธีแล้ว พบว่ามีเพียง 3 ไพรเมอร์เท่านั้นที่ให้ผลการตรวจสอบที่ตรงกัน คือ ไพรเมอร์ EgCIR0243 EgCIR0409 และ EgCIR0905 และให้ผลตรงกับการศึกษาของ Singh และคณะ (2010) ที่พบว่าการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมบนแผ่นเจลอะกาโรสสามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในข้าวได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ก็แสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์บนแผ่นเจลอะกาโรสได้ ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอน ระยะเวลา รวมทั้งค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบลงได้เมื่อเปรียบเทียบกับการดำเนินการบนแผ่นเจลโพลีอะคลิลาไมด์ โดยทั่วไป การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเพียงชนิดเดียวอาจไม่ประสบความสำเร็จหรือไม่เพียงพอที่จะระบุได้ว่าพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม จึงมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มมากขึ้นในพืชหลายชนิด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Demir และคณะ (2010) ที่พบว่าการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของมะเขือ (*Solanum melongena*) ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดีให้ระดับความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ต่ำกว่าเครื่องหมายเอสเอสอาร์ ต้นกล้าอัลมอนด์ (*Prunus dulcis*) ที่ได้หลังจากการเพาะเลี้ยงตาข้างมีการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดีและยืนยันด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์อีกครั้ง (Sarmento *et al*., 2005) และงานวิจัยของ Palombi และ Damiano (2002) ที่รายงานว่าเครื่องหมายเอสเอสอาร์สามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกีวีฟรุ๊ต (*Actinidia deliciosa* A. Chev) ได้ดีกว่าเครื่องหมาย

อาร์เอพีดี อย่างไรก็ตามตัวอย่างและไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ยังน้อยเกินไปที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม เนื่องจากบางไพรเมอร์ยังให้ความแตกต่างที่ไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงควรเพิ่มตัวอย่างปาล์มน้ำมัน และไพรเมอร์ให้มากขึ้น เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของข้อมูล

ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์พบว่า บางไพรเมอร์ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นแตกต่างกันในต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะความผิดปกติเหมือนกัน แต่ได้มาจากต้นที่แตกต่างกัน และบางไพรเมอร์พบว่าสามารถตรวจสอบความผิดปกติของรูปแบบแถบดีเอ็นเอในต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ออกดอกได้ด้วย ซึ่งต้นกล้าปาล์มที่ผิดปกติเหล่านี้ก็อาจจะเกิดมาจากการย้ายเลี้ยงเป็นเวลานานกว่าจะชักนำให้เป็นพืชต้นใหม่ทำให้เซลล์เกิดความเครียดในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งผลจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้น จะนำไปสู่ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเซลล์ร่างกายตั้งแต่ระดับโมเลกุล โครโมโซม ไซโทพลาซึม เซลล์ เนื้อเยื่อ และการเกิดสัณฐานของพืชในที่สุด (กิตติ และคณะ, 2555) เครื่องหมายเอสเอสอาร์นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช เนื่องจากมีความถูกต้องและแม่นยำสูง และพบว่ามีการใช้อย่างแพร่หลายในพืชหลาย ๆ ชนิด เช่น พืชตระกูลกะหล่ำ (Von *et al*., 2007) แคนตาลูป (Malik *et al*., 2011) ปาล์มน้ำมัน (Sanputawong and Te-chato, 2011)

เทคนิคโฟลไซโทเมทรีเป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในปาล์มน้ำมันเนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ หลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ ชนิดของชิ้นส่วน อายุของชิ้นส่วน เป็นต้น จากการประเมินปริมาณดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองที่ออกดอกและไม่ออกดอก พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกมีปริมาณดีเอ็นเอ 3.54 พิโคกรัม น้อยกว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ออกดอกในหลอดทดลอง ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอ 3.69 พิโคกรัม สอดคล้องกับการศึกษาในเครื่องหมายเอสเอสอาร์ที่พบว่าแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกในหลอดทดลองขาดหายไปเมื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ หลังจากตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0243 ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Srisawat และคณะ (2012) ที่ได้รายงานปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราว่ามีปริมาณดีเอ็นเอ 3.7 พิโคกรัม เช่นเดียวกับใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันดังกล่าวมีค่าประมาณ 3.7 พิโคกรัม ในขณะที่ปริมาณดีเอ็นเอของต้นแม่ดูรา มีค่า 6.3 – 7.6 พิโคกรัมและต้นพ่อพิสิเฟอรามีปริมาณ 5.3 – 6.1 พิโคกรัม สอดคล้องกับงานทดลองของ Thiem และ Sliwinska (2003) ที่ได้วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของยอด cloudberry (*Rubus*

chamaemorus L.) ในหลอดทดลอง ที่ระยะต่าง ๆ ด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของพืชดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกัน เช่นเดียวกับ Purwantoro และคณะ (1999) ได้รายงานว่าต้นลิลลี่ (*Lilium longiflorum* Thunb.) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมหลังจากตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี Gantait และ Sinniah (2011) ได้รายงานว่าต้นหน้าวัว *(Anthurium andreanum* Lind. cv. CanCan) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมหลังจากตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลไซโมเมทรี และเช่นเดียวกับงานวิจัยในพืชอื่น ๆ เช่น ชิงชัน (Contim *et al*., 2005) โอ๊ค (Loureiro *et al*., 2005) เป็นต้น นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบว่าสามารถใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ดีกว่าเทคนิคโฟลไซโทเมทรีเช่นเดียวกับการศึกษาของ Viehmannova และคณะ (2014) ที่ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นบัวหิมะ (*Smallanthus sonchifolius*) ที่ชักนำจากโซมาติกเอ็มบริโอด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์และเทคนิคโฟลไซโทเมทรีพบว่าเทคนิคโฟลไซโทเมทรีไม่สามารถตรวจสอบความผิดปกติของพืชดังกล่าวได้

บทที่ 5

สรุป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ทำให้เกิดต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติในลักษณะของการเกิดดอกในหลอดทดลองทั้งหมด 5 ลักษณะ เมื่อนำต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้ดังกล่าวตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม พบว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ลักษณะ มีรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

1.การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

เครื่องหมายอาร์เอพีดีโดยไพรเมอร์มี 3 ไพรเมอร์สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติกับปกติได้

2. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์

เครื่องหมายเอสเอสอาร์ทั้งบนแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์และเจลโพลีอะคลิลาไมด์สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองของต้นที่ผิดปกติที่เกิดดอกในหลอดทดลองลักษณะต่าง ๆ ได้ สำหรับวิธีการตรวจสอบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอระหว่างเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์และเจลอะคลิลาไมด์ พบว่า การตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรสนั้น บางไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบบนเจลโพลีอะคลิลาไมด์ทำให้ยากต่อการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามวิธีการเตรียมเจลอะกาโรสง่ายและรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับเจลอะคลิ-ลาไมด์

3. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี พบว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกมีปริมาณดีเอ็นเอ 3.54 พิโคกรัมซึ่งน้อยกว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 3.69 พิโคกรัม ให้ผลตรงกับการศึกษาในเครื่องหมายเอสเอสอาร์ที่พบว่าแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกในหลอดทดลองขาดหายไปเมื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติ หลังจากตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ EgCIR0243 อย่างไรก็ตาม ปริมาณดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งสองลักษณะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองได้ทั้งเครื่องหมายอาร์เอพีดีและเอสเอสอาร์ แต่เครื่องหมายเอสเอสอาร์จะให้ผลที่น่าเชื่อถือกว่า และสามารถตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ได้ ซึ่งจะช่วยประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย ลดขั้นตอนในการดำเนินการ และลดความเสี่ยงในการเตรียมสารเคมีอันตรายต่างๆ อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลในพืชนั้นควรใช้มากกว่าหนึ่งเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อประสิทธิภาพในการตรวจสอบและความน่าเชื่อถือของข้อมูล ผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันในอนาคต นอกจากนี้ยังพบว่าควรเพิ่มไพรเมอร์ทั้งเครื่องหมายอาร์เอพีดีและเอสเอสอาร์ในการตรวจสอบมากกว่านี้เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการตรวจสอบมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กิตติ โพธิปัทมะ สุริยา ฤธาทิพย์ และ กรวิศฎ์ ณ ถลาง. 2555. การแปรผันและการกลายของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 22: 225- 231.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2550. โพลีเมอเรส เชน รีแอคชัน. *ใน* พันธุศาสตร์. หน้า 382-383. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ นิทัศน์ สองศรี ธีระพงศ์ จันทรนิยม ประกิจ ทองคำ และชัยรัตน์ นิลนนท์. 2545. ผลของการปลูกปาล์มน้ำมันที่เก็บจากโคนต้น (พันธุ์ปลอม): ความเสียหายต่อเกษตรกรและเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ. จดหมายข่าวปาล์มน้ำมัน 3 วันที่ กันยายน – พฤศจิกายน 2545: หน้า 2- 5.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ ชัยรัตน์ นิลนนท์ ธีระพงศ์ จันทรนิยม ประกิจ ทองคำ และสมเกียรติ สีสนอง. 2548. ภาพรวมของอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมัน *ใน* เส้นทางสู่ความสำเร็จการผลิตปาล์มน้ำมัน. หน้า 24. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาระบบนิเวศเกษตร. 2556. โครงการวิจัยการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่า DXP. เข้าถึงจาก http://www.rdi.ku.ac.th (เข้าถึงเมื่อ 3 มกราคม 2556).

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. ใน เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. หน้า 79-80. กรุงเทพฯ:

ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี. 2553. วิชาการปาล์มน้ำมัน. เข้าถึงจาก http://www.doa.go.th/palm/linkTechnical/nursery%20seedling.html (เข้าถึงเมื่อ 3 มกราคม 2556)

อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์ และสมปอง เตชะโต. 2555. การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD และ SSR. วารสารแก่นเกษตร 40: 157-166..

Arias, D., Montoya, C., Rey, L. and Romero, H. 2012. Genetic similarity among commercial oil palm materials based on microsatellite markers. Agronomía Colombiana 30: 188-195.

Barril, P. and Nates, S. 2012. Introduction to agarose and polyacrylamide gel electrophoresis matrices with respect to their detection sensitivities. Gel Electrophoresis - Principles and Basics.1-14.

Bickel, C., Gadani, S., Lukacs, M. and Cullis, C. A. 2011. SSR markers developed for genetic mapping in flax (*Linum usitatissimum* L.). Research and Reports in Biology 2: 23–29.

Cobelli, P., Chamarerk, V., Mekwatanakarn, P., Leelagud, P. and Sansen, K. 2009. Development of Method for Rice Varietal Purity Test by using Molecular Markers. [Online]Availablehttp://brrd.in.th/main/index.php?option=com_content&view=article&id=65:purity-test-of-rice-varietiesy&catid=29:-2552&Itemid=37

Contim, L. A. S., Carvalho, C. R., Martins, F. A. and Freitas, D. V. 2005. Nuclear DNA content and karyotype of rosewood (*Aniba rosaeodora*). Genetics and Molecular Biology 28: 754-757.

Demir, K., Bakır, m., Sarıkamis, G. and Acunalp, S. 2010. Genetic diversity of eggplant (*Solanum melongena*) germplasm from Turkey assessed by SSR and RAPD markers. Genetics and Molecular Research 9: 1568-1576.

Dolezzel, J. and Bartos, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Annals of Botany 95: 99–110.

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

Dutt, M., Vasconcellos, M., Song, K. J., Gmitter, F. G. and Grosser, J. W. 2010. *In vitro* production of autotetraploid ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. Euphytica 173: 235–242.

Etienne, H. and Bertrand, B. 2003. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. Tree Physiology 23: 419–426.

Galbraith, D. W, Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P. and Firoozabady, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cellcycle in intact plant-tissues. Science 220: 1049–1051.

Gantait, S. and Sinniah, U. R. 2011. Morphology, flow cytometry and molecular assessment of *ex-vitro* grown micropropagated anthurium in comparison with seed germinated plants. African Journal of Biotechnology 10: 13991-13998.

Ghartavol, N. S., Khaniki, G. V. and Karimi, F. 2010. Evaluation of somaclonal variation during repetitious subcultures of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) callus. Iranian Journal of Plant Physiology 1: 69 –72.

Hu, J., Gao, X., Liu, J., Xie, C. and Li, J. 2008. Plant regeneration from petiole callus of *Amorphophallus albus* and analysis of somaclonal variation of regenerated plants by RAPD and ISSR markers. Botanical Studies 49: 189-197.

Inpuay, K., Arthipatjaporn, A. and Te-chato, S. 2012. Assessment genetic instability of regenerated plantlets from long-term culture of oil palm through SSE formation by SSR marker. Journal of Agricultural Technology 8: 585-595.

Jedrzejczyk, I. and Sliwinska, E. 2010. Leaves and seeds as materials for flow cytometric estimation of the genome size of 11 rosaceae woody species containing DNA-saining Inhibitors. Journal of Botany 1: 1-9.

Kate-ngam, S. 2003. DNA markers in plant breeding. Journal of ubon ratchathani university 5: 37-58.

Khoddamzadeh, A. A., Sinniah, U. R., Kadir, M. A., Kadzimin, S. B., Mahmood, M. and Sreeramanan, S. 2010. Detection of somaclonal variation by random amplified polymorphic DNA analysis during micropropagation of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. African Journal of Biotechnology 9: 6632-6639.

Kumar,P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R. and Pandey, B. K. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. Plant Omics Journal 2: 141-162.

Kumbhar, S. D., Kulwal, P. L., Patil, J. V., Gaikwad, A. P. and Jadhav, A. S. 2013. Inheritance of blast resistance and identification of SSR marker associated with it in rice cultivar RDN 98-2. Journal of Genetics 92: 317-321.

Lakote, P., Jantasuriyarat, C. and Kate-ngam, S. 2013. Cross transferability of *Jatropha curcas* derived microsatellite to intra generic and inter generic species. KHON KAEN AGR. J. 41 SUPPL. 1: 636-642.

Loureiro, J., Pinto, G., Lopes, T., Dolezel, J. and Santos, C. 2005. Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. Planta 221: 815-822.

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

Martin, C., Uberhuaga, E. and Perez, C. 2002. Application of RAPD markers in the characterisation of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. Euphytica 127: 247–253.

Munir, F., Naqvi, S. M. S. and Mahmood, T. 2011. *In vitro* culturing and assessment of somaclonal variation of *Solanum tuberosum* var. desiree. Turkish Journal of Biochemistry 36: 296–302.

Ochatt, S. J. 2006. Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus). *In* Medicago truncatula Handbook: 13: http://www.google.co.th/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDAQFjAA&url=htth%3A%2F%2Fwww.noble.org. Accessed 3/1/2013.

Palombi, M. A. and Damiano, C. 2002. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). Plant Cell Reports 20: 1061-1066.

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

Purwantoro, A., Supaibulwatana, K., Mii, M. and Koba, T. 1999. Cytological and RAPD (Random amplIfied polymorphlc DNA) analyses of somaclonal variation in easter lily (*Lilium longiiflorum* Thunb.). Plant Biotechnology 16: 247- 250.

Raimondi, J. P., Masuelli, R. W. and Camadro, E. L. 2001. Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses. Scientia Horticulturae 90: 19-29.

Rodrigues, F. A., Soares, J. D. R., Santos, R. R. D., Pasqual, M. and Silva, S. D. O. 2011. Colchicine and amiprophos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. African Journal of Biotechnology 10: 13476-13481.

Ruttawat, B., Wangsomnuk, P. P. and Wangsomnuk, P. 2011. Genetic studies of selected thai cassava by SSR markers. 12th Graduate research conference. Khon kaen university, Thailand, *12*-13 February 2009, pp. 564-571.

Sahijram, L., Soneji, J. R. and Bollamma, K. T. 2003. Invited review: analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa spp*). *In Vitro* Cellular & Developmental Biology—Plant 39: 551–556.

Salehian, H., Babaeian, N. A., Ranjbar, G. A., Bagheri, N. A., Sedaghati, B. and Banaei, F. 2013. Investigation of somaclonal variation in rice plants derived from embryo culture in the numbers of Tarom-Jelodar and Neda variety by using RAPD markers. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 6: 938-943.

Sales, E. K. and Butardo, N. G. 2014. Molecular analysis of somaclonal variation in tissue culture derived bananas using MSAP and SSR Markers. International Science Index 8: 572-579.

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.

Sarmento, D., Martins, M. and Oliveira, M. M. 2005. Evaluation of somaclonal variation in almond using RAPD and ISSR markers. Options Méditerranéennes 63: 391- 395.

Sathish, D. K. and Mohankumar, C. 2007. RAPD markers for identifying oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) parental varieties (dura & pisifera) and the hybrid tenera. Indian Journal of Biotechnology 6: 354-358.

Sheidai, M., Aminpoor, H., Noormohammadi, Z. and Farahani, F. 2008. RAPD analysis of somaclonal variation in banana (*Musa acuminate* L.) cultivar valery. Acta Biologica Szegediensis 52: 307-311.

Sheil, D., Casson, A., Meijaard, E., Noordwijk, M. V., Gaskell, J., Sunderland-Groves, J., Wertz, K. and Kanninen, M. 2009. The impacts and opportunities of oil palm in Southeast Asia. Occasional 51: 1-67.

Singh, H., Deshmukh, R. K., Singh, A., Singh, A. K., Gaikwad, K., Sharma, T. R., Mohapatra, T. and Singh, N. K. 2010. Highly variable SSR markers suitable for rice genotyping using agarose gels. Molecular Breeding 25: 359–364.

Singh, R., Low, E. T., Ooi, L. C., Abdullah, M. O., Ting, N. C., Nagappan, J., Nookiah, R., Amiruddin, M. D., Rosli, R., Manaf, M. A. A., Chan, K. L., Halim, M. A., Azizi, N., Lakey, N., Smith, S. W., Budiman, M. A., Hogan, M., Bacher, B., Brunt, A. V., Wang, C., Ordway, J. M., Sambanthamurthi, R. and Martienssen, R. A. 2013. The oil palm *SHELL* gene controls oil yield and encodes a homologue of seedstick. Nature: 1-5.

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.

Siripin, S. and Jindasing, M. 2012. Genetics diversity in vegetable soybean cultivars by SSR markers. Agricultural Science 43: 525-528.

Siripin, S. and Ittirote, P. 2013. Genetic diversity of tobacco cultivars identified by SSR marker technique. Agricultural Sci. J. 44(2)(Suppl.): 357-360.

Skirvin, R. M., McPheeters, K. D. and Norton, M. 1994. Sources and frequency of somaclonal variation. HortScience 29: 1232-1237.

Srisawat, T., Pattanapanyasat, K. and Dolezel, J. 2012. Flow cytometric classification of oil palm cultivars. African Journal of Biotechnology 11: 3714-3724.

Taksinpalm. 2013. พันธุ์ปาล์มน้ำมัน. เข้าถึงจาก http://www. taksinpalm.com.php/component/k2/item/32 (เข้าถึงเมื่อ 3 มกราคม 2556).

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

Thiem, B. and Sliwinska, E. 2003. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures. Plant Science 164: 129-134.

Viehmannova, I., Bortlova, Z., Vitamvas, J., Cepkova, P. H., Eliasova, K., Svobodova, E. and Travnickova, M. 2014. Assessment of somaclonal variation in somatic embryo-derived plants of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson] using inter simple sequence repeat analysis and flow cytometry. Electronic Journal of Biotechnology 17: 102-106.

Von, M. V., Cruz, V. M. V., Luhman, R., Marek, L. F., Rife, C. L., Shoemaker, R. C., Brummer, E. C. and Gardner, C. A. C. 2007. Characterization of flowering time and SSR marker analysis of spring and winter type *Brassica napus* L. germplasm. Euphytica 153: 43–57.

Xing, Y., Yu, Y., Luo, X., Zhang, J. N., Zhao, B. and Gao, Y. D. 2010. High efficiency organogenesis and analysis of genetic stability of the regenerants in *Solanum melongena*. Biologia Plantalum 54: 231-236.

.

ภาคผนวก

1.สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990)

1.1 สารละลาย CTABปริมาตร 100 มิลลิลิตร

PVP-40	1.00	กรัม
NaCl	8.12	กรัม
0.5 M Na2EDTA (pH 8.0)	4.00	มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCl	10.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม CTAB ปริมาณ 2 กรัม บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าสารละลายได้หมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

หมายเหตุ; ก่อนนำมาใช้เติม 2% β-mercaptoethanol

1.2 TE บัฟเฟอร์

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

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. สารเคมีในการทำ agarose gel electrophoresis

2.1 TAE บัฟเฟอร์ เข้มข้น 50เท่า

Tris-base	121.1 กรัม
Acetic acid	28.5 มิลลิลิตร
0.5 M Na2EDTA (pH 8.0)	50 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

2.2 TBE บัฟเฟอร์ เข้มข้น 5 เท่า

Tris-base	5.4	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 M Na2EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาใช้เจือจางเป็น 0.5 เท่า โดยใช้ TBE (5 เท่า) 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2.3 เอทธิเดียมโบรไมด์(EtBr) เข้มข้น0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

ใช้ EtBr 60 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร

3. สารเคมีในการทำ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

3.1 6% polyacrylamide gel

30% acrylamide gel	60.00	มิลลิลิตร
5x TBE	60.00	มิลลิลิตร
Urea	135.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	105.00	มิลลิลิตร

3.2 การเตรียม polyacrylamide gel ก่อนนำมาใช้

6% polyacrylamide gel	25.00	มิลลิลิตร
10% APS	500.00	ไมโครลิตร
TEMMED	14.00	ไมโครลิตร

3.3 10% (w/v) (Ammonium persulfate; APS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

APS	1.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 Bind silaneสำหรับทากระจกแผ่นหลังที่ติดกับเจล

Bind silane	1.00	ไมโครลิตร
Glacial acetic acid	500.00	ไมโครลิตร

4. สารเคมีที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต($AgNO_3$)

4.1 Fixative (10% acetic acid) เตรียม 1,000 มิลลิลิตร

Glacial acetic acid	100.00	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

4.2 0.2% $AgNO_3$เตรียม 1,000 มิลลิลิตร

$AgNO_3$	2.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3 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 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตรMurashige and Skoog(MS)

องค์ประกอบ	**ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)**
ธาตุอาหารหลัก	
NH4NO3	1,650.000
KNO3	1,900.000
KH2PO4	170.000
CaCl2.2H2O	440.000
MgSO4.7H2O	370.000
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.830
H3BO3	6.200
MnSO4.H2O	16.900
ZnSO4.7H2O	10.600
CuSO4.5H2O	0.025
Na2MoO4.2H2O	0.250
CoCl2.6H2O	0.025
FeSO4.7H2O	27.800
Na2EDTA	37.300
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.000
Nicotinic acid	0.500
Pyridoxine HCl	0.500
ThaiamineHCl	0.100
Glycine	2.000
Sucrose (g)	30.000
Agar (g)	7.500
pH 5.7	pH 5.7

ตารางภาคผนวกที่ 2องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร Oil Palm Culture Medium (OPCM)

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1,025.000
KNO_3	800.000
KH_2PO_4	170.000
$CaCl_2.2H_2O$	
$MgSO_4.7H_2O$	
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.415
K_2SO_4	495.000
H_3BO_3	6.200
$MnSO_4.H_2O$	16.900
$ZnSO_4.7H_2O$	9.600
$CuSO_4.5H_2O$	3.138
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250
$CoCl_2.6H_2O$	0.0125
$FeSO_4.7H_2O$	27.800
Na_2EDTA	37.300
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.000
Nicotinic acid	0.500
Pyridoxine HCl	0.500
ThaiamineHCl	0.550
Glycine	2.000
Sucrose (g)	30.000
Agar (g)	7.500
pH 5.7	5.7

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาววราภรณ์ หีดฉิม

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5510620032

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ผลิตกรรมชีวภาพ) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2554

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ
2. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. ทุนสนับสนุนสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ
4. ทุนสนับสนุนการผลิตบัณฑิตสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมันระยะที่สอง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
5. ทุนภายใต้ความร่วมมือ (MOU) ระหว่างคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กับมหาวิทยาลัยมิยาซากิ ประเทศญี่ปุ่น สนับสนุนเงินทุนจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

1. วราภรณ์หีดฉิมและสมปองเตชะโต . 2557. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง . วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1: 21-27.
2. วราภรณ์หีดฉิมและสมปองเตชะโต . 2557. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรีและเครื่องหมายเอส-เอสอาร์. วารสารแก่นเกษตร 42 (พิเศษ): 403-408.
3. วราภรณ์หีดฉิมและสมปองเตชะโต . 2558. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย อาร์เอพีดีกับการตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง . วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)