ผลของสูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และแหล่งไนโตรเจนต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. และการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายเอสเอสอาร์

Influences of Culture Media, Plant Growth Regulators and Nitrogen Sources on Somatic Embryo Induction in Oil Palm SUP-PSU and Analysis of Genetic Variation by SSR Marker

ชาคริยา นิหะ

Chakriya Niha

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
2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผลของสูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และแหล่งไนโตรเจนต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. และการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายเอสเอสอาร์

Influences of Culture Media, Plant Growth Regulators and Nitrogen Sources on Somatic Embryo Induction in Oil Palm SUP-PSU and Analysis of Genetic Variation by SSR Marker

ชาคริยา นิหะ

Chakriya Niha

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
2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และแหล่งไนโตรเจนต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. และการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายเอสเอสอาร์

ผู้เขียน นางสาวชาคริยา นิหะ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี รามสูตร)

.....กรรมการ

(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ

(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวชาคริยา นิหะ)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวชาคริยา นิหะ)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และแหล่งไนโตรเจนต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. และการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายเอสเอสอาร์

ผู้เขียน นางสาวชาคริยา นิหะ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอโดยวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตรต่าง ๆ เติม dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic-acid) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 468 มิลลิกรัม เมื่อพิจารณาสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า 2-iP [N^6-(2-isopentenyl) adenine] ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด 42.95 เอ็มบริโอต่อหลอด หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ดังนั้นอาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอด้วยเทคนิค Simple sequence repeat (SSR) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ คือ EgClR0008 EgClR0243 EgClR0337 EgClR0409 EgClR0446 EgClR0465 EgClR0781 EgClR0905 และ EgClR1772 พบว่า 8 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความแตกต่างกัน (monomorphism) คิดเป็นอัตราการเกิด monomorphism ได้ 97.73 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียงไพร์เมอร์ EgClR0446 ที่สามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอได้ คิดเป็นอัตราการเกิด polymorphism ได้ 2.27 เปอร์เซ็นต์

Thesis Title	Influences of Culture Media, Plant Growth Regulators and Nitrogen Sources on Somatic Embryo Induction in Oil Palm SUP-PSU and Analysis of Genetic Variation by SSR Marker
Author	Miss Chakriya Niha
Major Program	Plant Science
Academic Year	2016

Abstract

The influences of culture media and plant growth regulators (PGRs) on embryogenic callus (EC) proliferation and HE (haustorium embryo) formation were investigated. EC was cultured on different culture media with 0.1 mg/L dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic-acid) for 3 weeks. The results revealed that the MS medium gave the highest fresh weight of embryogenic callus at 468 mg. In case of PGRs, replacement of dicamba with 2-iP at concentration of 0.3 mg/L gave the highest frequency of somatic embryogenesis at 100% and mean number of SEs at 42.95 SEs/tube after culture for 3 weeks. Accordingly, Y_3 medium with 0.3 mg/L 2-iP was suitable for somatic embryo induction in oil palm SUP-PSU.

Analysis of genetic fidelity of somatic embryo using 9 primers of SSR marker including; EgClR0008 EgClR0243 EgClR0337 EgClR0409 EgClR0446 EgClR0465 EgClR0781 EgClR0905 and EgClR1772. The results revealed that 8 primers gave monomorphism at 97.73% and only one primer (EgClR0446) gave the polymorphism of DNA banding at 2.27%.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร. สุรีรัตน์ เย็นช้อน และ ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมเป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้ความเมตตา ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำในการทำวิจัย การปฏิบัติงานทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเก็บรวบรวมข้อมูล การตรวจสอบเนื้อหาและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาวดี รามสูตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. ทัศนี ขาวเนียม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของการเขียนรูปเล่มวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอาใจใส่ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ จ.ส.อ. ชาคริต นิหะ บิดา นาง ทิพย์ นิหะ มารดา ร.ต. นัททที นิหะ พี่ชาย และญาติพี่น้องทุกคน ที่คอยเป็นกำลังใจที่ดีที่สุด เป็นที่ปรึกษาเมื่อยามเกิดความท้อถอยให้กลับมามีแรงต่อสู้กับอุปสรรคต่าง ๆ อีกครั้ง คอยสั่งสอน อบรม ช่วยเหลือทุนการศึกษา และให้ความสนับสนุนเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่ได้กรุณาอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ ทั้งทางด้านวิชาการและคุณธรรม ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ จนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากสถานความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีทางชีวภาพของพืชปลูกทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือซึ่งกันและกัน ให้กำลังใจในทุกครั้งที่เกิดปัญหาและท้อถอย คอยสนับสนุนให้ปฏิบัติตัวไปในทางที่ดี คอยตักเตือนเมื่อทำผิดพลาด และเป็นที่ปรึกษาในทุกเรื่องทั้งด้านการทำวิจัยและการดำเนินชีวิต จนข้าพเจ้าทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ชาคริยา นิหะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
หนังสือตอบรับตีพิมพ์	(13)
สรุปเนื้อหา	
บทที่	
บทที่ 1 บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	7
บทที่ 2 การทดลอง	
การทดลองที่ 1 ผลของสูตรอาหาร $AgNO_3$ และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.	8
การทดลองที่ 2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.	25
การทดลองที่ 3 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวโดยใช้เครื่องหมาย SSR	37
บทที่ 3 สรุป	51
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	60
ผลงานตีพิมพ์	64
ประวัติผู้เขียน	71

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ผลของสูตรอาหารต่ออัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ บนอาหารแข็งเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	13
1.2	ผลของระดับความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	15
1.3	ผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ $AgNO_3$ ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ บนอาหารสูตร Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	17
1.4	ผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ dicamba และ 2-iP ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ บนอาหารสูตร Y_3 ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	20
2.1	ผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ glutamine และ arginine ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y_3 ร่วมกับ 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	30
2.2	การชักนำพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่มีการสร้างรากจากอาหารสูตร Y_3 บนอาหารแข็งสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	33
3.1	ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSR	44

รายการภาพ

ภาพ		หน้า
1.1	ลักษณะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ลูกผสมเทเนอรา เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังย้ายเลี้ยงทุก ๆ เดือน เป็นเวลา 3 เดือน	10
1.2	ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอ (ลูกศร) ที่เกิดจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตรต่าง Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	16
1.3	ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอ (ลูกศร) ที่เกิดจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร Y_3 เติม $AgNO_3$ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	18
1.4	ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำบนอาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	21
2.1	ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอ (ลูกศร) ที่เกิดจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ glutamine เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	31
2.2	ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	34

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
3.1	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0337	45
3.2	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0465	45
3.3	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0243	46
3.4	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0905	46
3.5	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008	47
3.6	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR1772	47
3.7	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0446	48
3.8	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0409	48
3.9	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0781	49

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

MS	=	Murashige and Skoog medium
OPCM	=	Oil palm culture medium
WPM	=	Woody plant medium
Y_3	=	Eeuwens medium
2-iP	=	N^6-(2-isopentenyl) adenine
dicamba	=	3, 6-dichloro-2-methoxybenzoic acid
SE	=	Somatic embryo
HE	=	Haustorium embryo
SSE	=	Secondary somatic embryo
SSR	=	Simple sequence repeats
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan's multiple range test
LSD	=	Least significant difference
EC	=	Embryogenic callus
GE	=	Globular embryo
$AgNO_3$	=	Silver nitrate
SSE	=	Secondary somatic embryo
2, 4-D	=	2, 4-dichlorophenoxyacetic acid
ns	=	Non significant
PCR	=	Polymerase chain reaction
NAA	=	α-naphthaleneacetic acid
PGR	=	Plant growth regulator
DNA	=	Deoxyribonucleic acid

หนังสือตอบรับตีพิมพ์

หนังสือตอบรับตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

วันที่ 1 ธันวาคม 2559

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาตีพิมพ์บทความวิจัย
เรียน ผู้แต่ง (ชาคริยา นิหะ, สุรีรัตน์ เย็นช้อน และสมปอง เตชะโต)

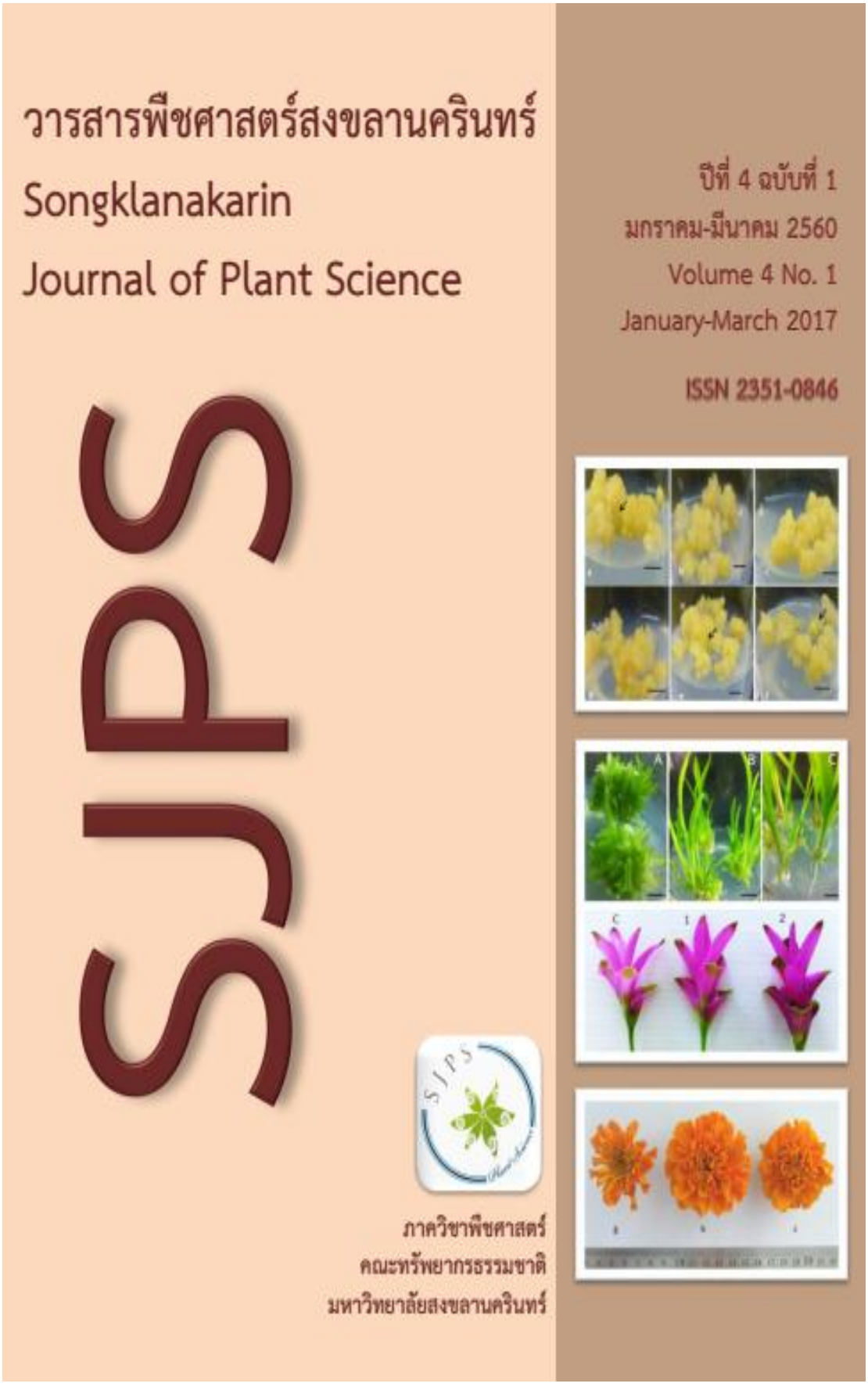
ตามที่ท่านได้ส่งบทความวิจัยเพื่อนำเสนอในงานประชุมวิชาการพืชสวนครั้งที่ 15 เมื่อวันที่ 9-12 พฤศจิกายน 2559 ในหัวข้อเรื่อง **ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.** ทั้งนี้บทความวิจัยดังกล่าวได้ผ่านการตรวจสอบความมีมาตรฐานทางวิชาการจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิแล้วนั้น จึงตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 4 ฉบับที่ 1 (มกราคม-มีนาคม 2560) ทั้งนี้กองบรรณาธิการฯ จะเผยแพร่ผลงานในรูปแบบ e-journal ซึ่งท่านสามารถดาวน์โหลดบทความต้นฉบับได้จากเว็บไซต์ของวารสารฯ หรือกด http://natres.psu.ac.th/Department/PlantScience/sjps/

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)
บรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

กองบรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์
ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
โทร. 074-286138-39


วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์
Songklanakarin
Journal of Plant Science
SJPS
ปีที่ 4 ฉบับที่ 1
มกราคม-มีนาคม 2560
Volume 4 No. 1
January-March 2017
ISSN 2351-0846
ภาควิชาพืชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทที่ 1

บทนำต้นเรื่อง

ปัญหามลพิษทางด้านสิ่งแวดล้อมและการลดปริมาณลงของแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิล ประกอบกับการเพิ่มขึ้นของราคาน้ำมันดิบเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่การคิดค้นพัฒนาและผลิตพลังงานจากแหล่งพลังงานทางเลือกแทนการผลิตจากแหล่งฟอสซิล เพื่อตอบสนองความต้องการใช้พลังงานที่เพิ่มมากขึ้น (Chew and Bhatia, 2008) ส่งผลให้ปัจจุบันหลายรัฐบาลทั่วโลกมีการส่งเสริมให้ใช้พลังงานจากเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) ได้แก่ เอทานอลที่ได้จากพืชประเภทแป้งและน้ำตาล และไบโอดีเซลที่ได้จากพืชน้ำมันและไขมันสัตว์ (Mukherjee and Sovacool, 2014) ถึงแม้ว่าประเทศในยุโรปจะเป็นผู้นำในการผลิตไบโอดีเซลโดยประเทศเยอรมันเป็นประเทศแรกที่ทำการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งน้ำมันที่นำมาใช้ได้แก่ น้ำมันเรพซีด น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันดอกทานตะวัน แต่สำหรับประเทศในเขตร้อน เช่น ไทย มาเลเซีย และโคลัมเบีย ใช้น้ำมันจากปาล์มน้ำมันมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล (Gutierrez *et al*., 2009) ประกอบกับปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันชนิดเดียวของโลกที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันอื่นทุกชนิด ซึ่งให้ผลผลิตน้ำมันดิบเฉลี่ย 4-5 ตันต่อเฮกตาร์ (Biofuel, 2007 อ้างโดย กาญจนี, 2553) จึงทำให้ปาล์มน้ำมันกลายเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่มีการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ทั้งทางด้านอาหาร เครื่องสำอางและเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล ปริมาณความต้องการใช้น้ำมันปาล์มที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้มีการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มมากขึ้นซึ่งส่งผลต่อความต้องการกล้าปาล์มน้ำมันที่เพิ่มมากขึ้นด้วย

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้น อยู่ในวงศ์ Arecaceae สกุล *Elaeis* แบ่งเป็น 3 ชนิด (species) คือ *Elaeis guineensis E. oleifera* และ *E. odora* โดยทั่วไปปาล์มน้ำมันที่เป็นพันธุ์ปลูก คือ *E. guineensis* แบ่งเป็น 3 แบบ ตามลักษณะของกะลาปาล์ม คือ ดูรา เทเนอรา และฟิสิเฟอรา ปาล์มน้ำมันมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในป่าเขตร้อนชื้นของประเทศต่าง ๆ ที่อยู่บริเวณชายฝั่งตะวันตกของทวีปแอฟริกา (ธีระ, 2554) เนื่องจากปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชยืนต้น มีการผสมพันธุ์แบบผสมข้ามต้น และจัดเป็นพืชที่สามารถให้ผลผลิตทะลายได้ตลอดทั้งปี โดยมีอายุเก็บเกี่ยวผลผลิตได้นานกว่า 25 ปีขึ้นไป ดังนั้นพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่เกษตรกรเลือกนำมาปลูกต้องเป็นพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ดีจึงจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพและลดต้นทุนในการผลิตตลอดอายุการเก็บเกี่ยวของปาล์มน้ำมันได้ (ธีระ, 2554) การที่ปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้ามซึ่งปกติมีการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ทำให้พันธุกรรมของชั่วรุ่นลูกที่ได้ไม่มีความสม่ำเสมอ จึงมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์ต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี ซึ่งปัจจุบันมีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันโดยใช้ชิ้นส่วนราก ใบอ่อน คัพภะ ซึ่งสามารถชักนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ แม้จะสามารถ

ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้จำนวนมาก แต่เปอร์เซ็นต์การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอยังต่ำอยู่ (กาญจนี, 2553) ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงทำการศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหารสารควบคุมการเจริญเติบโตและแหล่งของไนโตรเจนที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตลอดจนตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวโดยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ เพื่อเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การตรวจเอกสาร

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะพืช มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น แสง และ ปริมาณและการถ่ายเทก๊าซ (กรมวิชาการเกษตร, 2546) เพื่อส่งเสริมให้ชิ้นส่วนดังกล่าวพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการนี้สามารถเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์พืชได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้ามซึ่งปกติมีการขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ดพันธุ์ เนื่องจากพืชชนิดนี้ไม่แตกกอและมีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเพียงอันเดียว จึงไม่สามารถขยายพันธุ์ด้วยวิธีไม่อาศัยเพศทั่วไป เช่น การปักชำ การตอน การติดตา หรือ การแยกหน่อ จึงมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อประโยชน์ทางด้านการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันมีรายงานการใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ เช่น ชิ้นส่วนคัพภะ (Kanchanapoom and Domyoas, 1999; Suranthran, *et al*., 2011; Balzon *et. al*., 2013; Silva, *et al*., 2014; Romyanon *et al*., 2015) และ ใบอ่อน (Te-chato *et. al*., 2004; Constantin, *et al*., 2015) โดยในประเทศไทยเริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528 และประสบความสำเร็จในการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของต้นกล้าในปี พ.ศ. 2530 และในปี พ.ศ. 2535 สามารถชักนำเป็นพืชต้นใหม่ได้ (ธีระ, 2554)

ปัจจุบันสามารถเพาะเลี้ยงส่วนของคัพภะ และใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน ซึ่งสามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้จำนวนมาก เช่น รายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะของปาล์มน้ำมัน เจริญ (2532) ตัดแยกคัพภะปาล์มน้ำมันวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำการงอกของคัพภะได้ 98.5 เปอร์เซ็นต์

Teixeira และ คณะ (1993) ใช้ชิ้นส่วนของคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมัน หลังการผสมเกสร 77 91 100 114 128 140 และ 193 วัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 (Eeuwens, 1978) พบว่า อายุของคัพภะที่แตกต่างกันส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส และลักษณะแคลลัสที่แตกต่างกัน โดยคัพภะอายุ 193 วันให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 93 เปอร์เซ็นต์ Suranthran และ คณะ (2011) วางเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร MS เติม NAA (α-naphthaleneacetic acid) BAP (6-benzyadenine purine) และ GA_3 (gibberellic acid) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้สูงสุด 97 เปอร์เซ็นต์ ความสูงต้นสูงสุด 9.4 เซนติเมตร ความยาวรากสูงสุด 4.4 เซนติเมตร การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบอ่อน จากรายงานของ สมปอง และคณะ (2530) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนของปาล์มน้ำมันจากต้นกล้าอายุ 195 วัน บนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นที่ให้ผลผลิตแล้วบนอาหารเติม 2, 4-D และ NAA ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มที่จะชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสได้ดี Karun และ Sajini (1996) ชักนำแคลลัสโดยเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันจากต้นกล้าพันธุ์เทเนอราและดูราอายุ 6 และ 18 เดือน บนอาหารสูตร ½ MS เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ระยะเวลาและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสแตกต่างกัน สำหรับพันธุ์เทเนอรามีการสร้างแคลลัส 7 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยง 150-180 วัน และพันธุ์ดูรามีการสร้างแคลลัส 10 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยง 100-120 วัน อาสลัน (2545) เพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นกล้าอายุ 1 ปี บนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 11.2 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเสท ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร Te-chato และคณะ (2004) เพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีจากสถานีวิจัยเทพา จังหวัดสงขลา อายุ 10 ปี บนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน สามารถสร้างแคลลัสเริ่มแรกได้สูงสุด 15 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีลักษณะเป็นปมสีเหลืองอ่อนเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดและผิวของชิ้นส่วน

การชักนำและการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ได้โดยผ่าน 2 กระบวนการ คือ ออกาโนเจนีซิส (organogenesis) และ เอ็มบริโอเจนีซิส (embryogenesis) (ปิยะดา และ อารีย์, 2551) โดยกระบวนการออกาโนเจนีซิสเป็นการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อในทิศทางเดียว (unipolar) ได้แก่ การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ปลายราก หรือการพัฒนาของเซลล์เป็นส่วนของต้นพืช (shoot) หรือเป็นส่วนราก (root) เป็นการพัฒนาที่แยกจากกัน ส่วนกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซิสเป็นการเจริญและพัฒนาของเซลล์ไปในสองทิศทาง (bipolar) พร้อม ๆ กัน (สิรนุช, 2540) ให้พืชต้นใหม่ที่มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะต่าง ๆ เหมือนกับต้นอ่อนที่ได้จากการผสมพันธุ์ เรียกเอ็มบริโอที่มีพัฒนาการมาจากเซลล์ร่างกายว่า โซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo: SE) หรือเอ็มบริออยด์ การขยายพันธุ์ด้วยโซมาติกเอ็มบริโอเป็นการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศที่มีความสำคัญในพืชหลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีตามปกติที่ทำได้ยาก เช่น ปาล์มน้ำมัน (Hilae and Te-chato, 2005) มะพร้าว (Chan *et al*., 1998) และอินทผลัม (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2001) เป็นต้น ซึ่งพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 4 ระยะ คือ เอ็มบริโอระยะรูปกลม รูปหัวใจ รูปทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง (สมปอง, 2539) โดยโซมาติกเอ็มบริโอจะพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้นั้นสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือต้องอาศัยปัจจัยต่าง ๆ ในการชักนำการงอกและการพัฒนา เช่น องค์ประกอบของอาหาร แสง อุณหภูมิ ลักษณะทางพันธุกรรม และชิ้นส่วนพืช (Fuentes *et al*., 2000) โดยพืชแต่ละชนิดต้องการปัจจัยที่แตกต่างกันออกไป

ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันมีหลายปัจจัย เช่น แสง อุณหภูมิ ภาชนะที่เพาะเลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโต อาสลัน (2545) รายงานว่า ภาชนะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอคือหลอดทดลอง โดยพบว่าให้จำนวนการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวสูงสุด 5.37 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน และการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้การพัฒนาของต้นอ่อนชุดที่สอง (secondary somatic embryo: SSE) สูงสุด 77.92 เปอร์เซ็นต์ และ SSE สามารถพัฒนาให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์สูงสุด 35.72 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

นอกจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชแล้วซิลเวอร์ไอออนในรูปของไนเตรต เช่น ซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate: $AgNO_3$) มีผลต่อกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนนิซิส

การชักนำยอดและราก (Kumar *et al*., 2009) จึงเป็นสารเคมีอีกชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ซึ่งพบว่าการเติม $AgNO_3$ ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงพืชสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำพืชต้นใหม่ในพืชหลาย ๆ ชนิด เช่น Aboshama (2011) นำเมล็ดพริกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม $AgNO_3$ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวมีอัตราการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้ 88.6 เปอร์เซ็นต์ Fuentes และคณะ (2000) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบกาแฟโรบัสต้าบนอาหารเติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 30-60 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสและการพัฒนาของแคลลัสได้ Steinmacher และคณะ (2007) รายงานการเพาะเลี้ยงคัพภะของ peach palm บนอาหารสูตร MS เติม picloram เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ $AgNO_3$ เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 27 เปอร์เซ็นต์ และมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอจำนวน 14 เอ็มบริโอ หลังจากการเพาะเลี้ยง 20 สัปดาห์

กรดอะมิโนเป็นแหล่งของไนโตรเจนและเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง มีผลช่วยส่งเสริมการชักนำ การเพิ่มปริมาณ การสุกแก่และการพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอเป็นพืชต้นใหม่ ชนิดและความเข้มข้นของกรดอะมิโนมีบทบาทสำคัญในแต่ละระยะของกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส โดยทั่วไปการเติมสารอินทรีย์ไนโตรเจนลงในอาหารที่เพาะเลี้ยง มีผลด้านบวกต่อการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส (Zouine and Hadrami, 2007) แหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงส่วนหนึ่งมาจากกรดอะมิโนที่เติมในอาหาร ได้แก่ glutamine asparagine adenine glycine และ casein hydrolysate เป็นต้น (ประศาสตร์, 2538) โดยไนเตรตและแอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจนในรูปอนินทรีย์สารที่นิยมใช้เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Murashige and Skoog, 1962; Niedz, 1994) Kumar และคณะ (2015) รายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ *Pelargonium sidoides* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญในแถบแอฟริกาใต้ บนอาหารสูตร MS เติม picloram เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ glutamine เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสร้าง โซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 25.89 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน หลังจากการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีโอกาสเกิดขึ้นได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น วิธีการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง กระบวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยผ่านแคลลัส ความแปรปรวนที่เกิดจากชิ้นส่วนพืช อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีคุณสมบัติเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ การตอบสนองของจีโนมพืชต่อความเครียดต่าง ๆ ในสภาพการเพาะเลี้ยง เป็นต้น วิธีการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชจึงมีความสำคัญมากสำหรับการคัดเลือกต้นที่ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพื่อประโยชน์ทางด้านการขยายพันธุ์พืช หรือเพื่อคัดเลือกต้นที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพื่อประโยชน์ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา การใช้ไอโซไซม์ และการใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ตัวอย่างเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของพืช เช่น เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD marker) (Verma *et al*., 2009) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) (Singh *et al*., 1999) เครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSR marker) (Lokko, *et al*., 2006) การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็วในการตรวจสอบเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางสัณฐานวิทยา

การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมเป็นการประโยชน์จากดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid: DNA) เป็นสารพันธุกรรมที่กำหนดรหัสชีวิตของสิ่งมีชีวิต ความแตกต่างของการจัดเรียงตัวของเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ได้แก่ อะดีนีน (adenine) ควอนีน (quanine) ไซโตซีน (cytosine) และไทมีน (thymine) จึงทำให้เกิดความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต พืชแต่ละชนิดหรือแต่ละสายพันธ์จะมีรหัสพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์ ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างชนิดหรือสายพันธุ์ได้ การใชดีเอ็นเอเปนเครื่องหมายในการบงบอกความแตกตางของสิ่งมีชีวิตสามารถทำไดโดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ โดยเทคนิคทางอณูวิทยา ซึ่งเปนที่รูจักกันโดยทั่วไปวา “ลายพิมพดีเอ็นเอ” (DNA Fingerprinting) ซึ่งความแตกตางที่เกิดขึ้น หมายถึง แบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ สามารถนำมาตรวจสอบความแตกตางหรือโพลีมอรฟซึม (polymorphisms) ของสิ่งมีชีวิตหรือสายพันธุพืชที่ตองการตรวจสอบได้ (สุรีพร, 2546)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.
2. เพื่อศึกษาผลของซิลเวอร์ไนเตรต สารควบคุมการเจริญเติบโต และแหล่งของไนโตรเจนบางชนิดต่อการชักนำและพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.
3. เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ในหลอดทดลองโดยใช้เทคนิค SSR

บทที่ 2

การทดลองที่ 1
ผลของสูตรอาหาร $AgNO_3$ และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

Influences of Culture Media, $AgNO_3$ and Plant Growth Regulators on Embryogenic Callus Proliferation and Somatic Embryo Induction in Oil Palm SUP-PSU

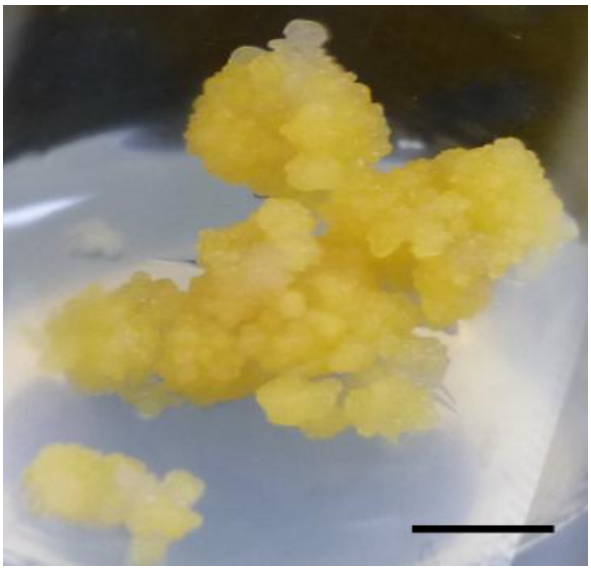
บทนำ

เนื่องจากปาล์มน้ำมันไม่แตกกอและมีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเพียงอันเดียว จึงไม่สามารถขยายพันธุ์ด้วยวิธีไม่อาศัยเพศทั่วไป เช่น การปักชำ การตอน การติดตา หรือ การแยกหน่อ จึงมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ได้โดยผ่าน 2 กระบวนการ คือ ออกาโนเจนีซิส และเอ็มบริโอเจนีซิส วิธีการแรกมีข้อเสียคือ หาชิ้นส่วนและวิธีการที่เหมาะสมได้ยาก ส่วนวิธีการที่สองเป็นที่นิยมมากกว่าเนื่องจากกระบวนการพัฒนาของชิ้นส่วนมีสองขั้วคือขั้วยอดและขั้วราก ซึ่งพร้อมจะพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ โดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซิสเป็นการขยายพันธุ์ด้วยโซมาติกเอ็มบริโอ วิธีนี้เป็นการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศที่มีความสำคัญในพืชหลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีตามปกติที่ทำได้ยาก เช่น ปาล์มน้ำมัน (Hilae and Te-chato, 2005) มะพร้าว (Chan e*t al*., 1998) และอินทผลัม (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2001) เป็นต้น กระบวนการนี้เป็นผลมาจากพันธุกรรม ได้แก่ พันธุ์พืช ชิ้นส่วนที่เลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหาร ซึ่งพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 4 ระยะ คือ เอ็มบริโอระยะรูปกลม (globular-shaped embryo) รูปหัวใจ (heart-shaped embryo) รูปทอร์ปิโด (torpedo-shaped embryo) และระยะสร้างใบเลี้ยง (cotyledonary stage) (สมปอง, 2539) โดยพืชแต่ละชนิดต้องการปัจจัยที่แตกต่างกันออกไป สำหรับปาล์มน้ำมันมีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อการขยายพันธุ์โดยใช้โซมาติกเอ็มบริโอ เช่น ชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาสภาพที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงพืชที่เราต้องการเพื่อบรรลุวัตถุประสงค์ของงานวิจัย ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของสูตรอาหาร $AgNO_3$ และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. เพื่อประโยชน์ทางด้านการขยายพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีโดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่ของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ลูกผสมเทเนอราเบอร์ 77 ที่เกิดจากการผสมระหว่างดูรา (366) กับฟิสิเฟอรา (172) จากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร OPCM#1 (oil palm culture medium #1) เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน จะได้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (ภาพที่ 1.1) เป็นวัสดุเริ่มต้นเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 1.1 ลักษณะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ลูกผสมเทเนอรา เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังย้ายเลี้ยงทุก ๆ เดือน เป็นเวลา 3 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

วิธีการศึกษา

1. การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

1.1 ศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหาร 4 สูตร คือ OPCM#1 WPM MS และ Y_3 (ตารางภาคผนวกที่ 1) ทุกสูตรอาหารเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25x150 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารแข็งปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์เป็นเวลา 9 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD (Least significant difference) แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 25 หลอด

1.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการชักนำโซมาติกอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหาร 6 สูตร คือ Y_3 ½ Y_3 MS ½ MS OPCM#1 และ OPCM#2 ทุกสูตรอาหารเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25x150 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารแข็งปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส อัตราการเกิดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan’s multiple range test) แต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

2. ศึกษาผลของความเข้มข้นของ $AgNO_3$ ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.2 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25x150 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารแข็งปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ $AgNO_3$ วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด

3. ศึกษาผลของ dicamba และ 2-iP ต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.2 เติมหรือไม่เติม dicamba หรือ 2-iP เข้มข้น 0.1 0.3 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25x150 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารแข็งปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

ผลการศึกษา

1. การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

1.1 ผลของสูตรอาหารต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร Y_3 ให้การตอบสนองดีที่สุด คือให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 49.51 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคืออาหารสูตร WPM MS และ OPCM#1 ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 16.00 8.54 และ 5.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อีกทั้งอาหารสูตร Y_3 ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 1.49 เอ็มบริโอต่อหลอด แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 1.1)

ตารางที่ 1.1 ผลของสูตรอาหารต่ออัตราการเกิดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารแข็งเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

สูตรอาหาร	อัตราการเกิด SE (เปอร์เซ็นต์)	จำนวน SE เฉลี่ยต่อหลอด
OPCM#1	5.53^{b}	0.44^{c}
WPM	16.00^{b}	0.84^{b}
MS	8.54^{b}	0.75^{bc}
Y_3	49.51^{a}	1.49^{a}
F-test	**	**
C.V. (%)	27.24	16.86

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี LSD

1.2 ผลของความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า การเพิ่มน้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยบนอาหารสูตร MS สูงสุด 468 มิลลิกรัม รองลงมาคือ อาหารสูตร OPCM#1 OPCM#2 Y_3 ½ Y_3 และ ½ MS ซึ่งให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 466 442 440 416 และ 416 มิลลิกรัม ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) เมื่อพิจารณาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า อาหารสูตร Y_3 ให้การตอบสนองดีที่สุด คือให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 12 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคืออาหาร สูตร OPCM#1 OPCM#2 MS ½ Y_3 และ ½ MS ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 10 5 4 4 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และอาหารสูตร Y_3 ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 1.33 เอ็มบริโอต่อหลอด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 1.2) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำบนอาหารสูตรต่าง ๆ มีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน คือ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ มีสีเหลือง โซมาติกเอ็มบริโอที่ได้เป็นโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (ภาพที่ 1.2)

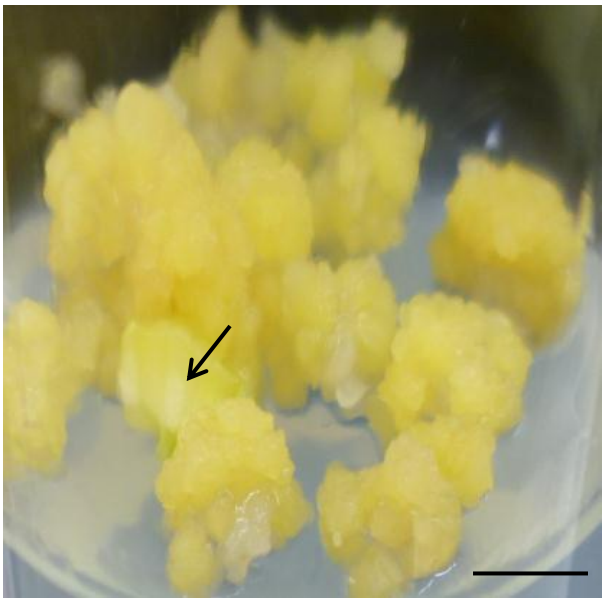
ตารางที่ 1.2 ผลของระดับความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

สูตรอาหาร	น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ย (มิลลิกรัม)	อัตราการเกิด SE (เปอร์เซ็นต์)	จำนวน SE เฉลี่ยต่อหลอด
OPCM#1	466.00^{a}	10.00^{ab}	1.00
OPCM#2	442.00^{ab}	5.00^{b}	1.00
MS	468.00^{a}	4.00^{bc}	1.00
½ MS	416.00^{b}	0.00^{c}	0.00
Y_3	440.00^{ab}	12.00^{a}	1.33
½ Y_3	416.00^{b}	4.00^{bc}	1.00
F-test	**	**	ns
C.V. (%)	5.69	57.50	47.14

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 1.2 ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอ (ลูกศร) ที่เกิดจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตรต่าง Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

2. ผลของ $AgNO_3$ ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร Y_3 เติม $AgNO_3$ ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่ไม่เติม $AgNO_3$ ให้การตอบสนองดีที่สุด คือให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 31.39 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 2 1 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 20.56 18.06 16.33 และ 3.13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอด พบว่า อาหารที่เติม $AgNO_3$ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การตอบสนองดีที่สุด คือให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดสูงสุด 1.83 เอ็มบริโอ (ภาพที่ 1.3) รองลงมาคือ $AgNO_3$ เข้มข้น 1 0 2 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอด 1.43 1.33 1.29 และ 1.00 เอ็มบริโอต่อหลอดตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 1.3)

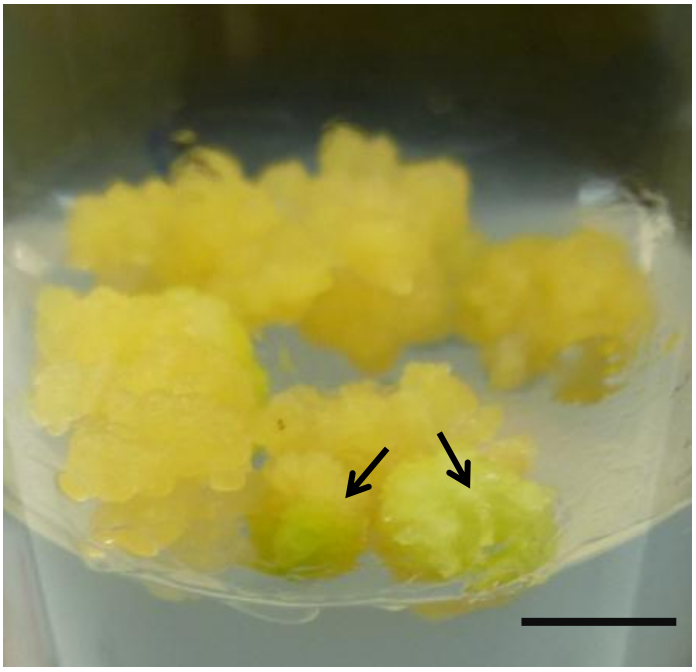
ตารางที่ 1.3 ผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ $AgNO_3$ ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

$AgNO_3$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อัตราการเกิด SE (เปอร์เซ็นต์)	จำนวน SE เฉลี่ย ต่อหลอด
0	31.39[a]	1.33
0.1	16.33[ab]	1.83
0.5	3.13[b]	1.00
1	18.06[a]	1.43
2	20.56[a]	1.29
F-test	*	ns
C.V. (%)	52.05	47.18

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 1.3 ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอ (ลูกศร) ที่เกิดจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร Y_3 เติม $AgNO_3$ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

3. ผลของ dicamba และ 2-iP ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร Y_3 ไม่เติม dicamba หรือ 2-iP หรือเติมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติม 2-iP ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอาหารที่เติม dicamba และพบว่า 2-iP ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด 42.95 เอ็มบริโอต่อหลอด รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 1 0.1 2 0.5 และไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 36.47 32.40 31.36 22.47 และ 17.30 เอ็มบริโอต่อหลอดตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 1.4) และเมื่อศึกษาระยะการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า 2-iP ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม (globular embryo: GE) (ภาพที่ 1.4ก) เฉลี่ยสูงสุด 36.05 เอ็มบริโอต่อหลอด 2-iP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว (haustorium embryo : HE) เฉลี่ยสูงสุด 7.71 เอ็มบริโอต่อหลอด 2-iP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่มีการสร้างราก (ภาพที่ 1.4ข) เฉลี่ยสูงสุด 3.5 เอ็มบริโอต่อหลอด

ตารางที่ 1.4 ผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ dicamba และ 2-iP ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ บนอาหารสูตร Y_3 ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (เปอร์เซ็นต์)	จำนวน SE เฉลี่ย แต่ละระยะต่อหลอด			จำนวน SE เฉลี่ยต่อหลอด
dicamba	2-iP		GE	HE	HE + root	
0	0	100.00^{a}	14.95^{bcd}	3.25^{bc}	1.33	17.30^{d}
0.1	0	46.00^{bc}	2.40^{cd}	1.43^{c}	0.00	2.20^{e}
0.3	0	73.00^{ab}	1.91^{cd}	1.00^{c}	0.00	1.87^{e}
0.5	0	52.00^{bc}	2.43^{cd}	1.33^{c}	0.00	2.27^{e}
1	0	64.33^{bc}	3.27^{cd}	1.13^{c}	0.00	3.46^{e}
2	0	37.33^{c}	0.00^{d}	1.00^{c}	0.00	1.00^{e}
0	0.1	100.00^{a}	25.15^{ab}	6.60^{ab}	2.17	32.40^{abc}
0	0.3	100.00^{a}	36.05^{a}	6.53^{ab}	1.75	42.95^{a}
0	0.5	100.00^{a}	17.76^{bc}	4.40^{abc}	3.50	22.47^{cd}
0	1	100.00^{a}	28.06^{ab}	7.71^{a}	2.40	36.47^{ab}
0	2	100.00^{a}	24.57^{ab}	4.71^{abc}	2.90	31.36^{bc}
F - test		**	**	**	ns	**
C.V. (%)		19.73	51.06	62.34	93.38	45.24

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

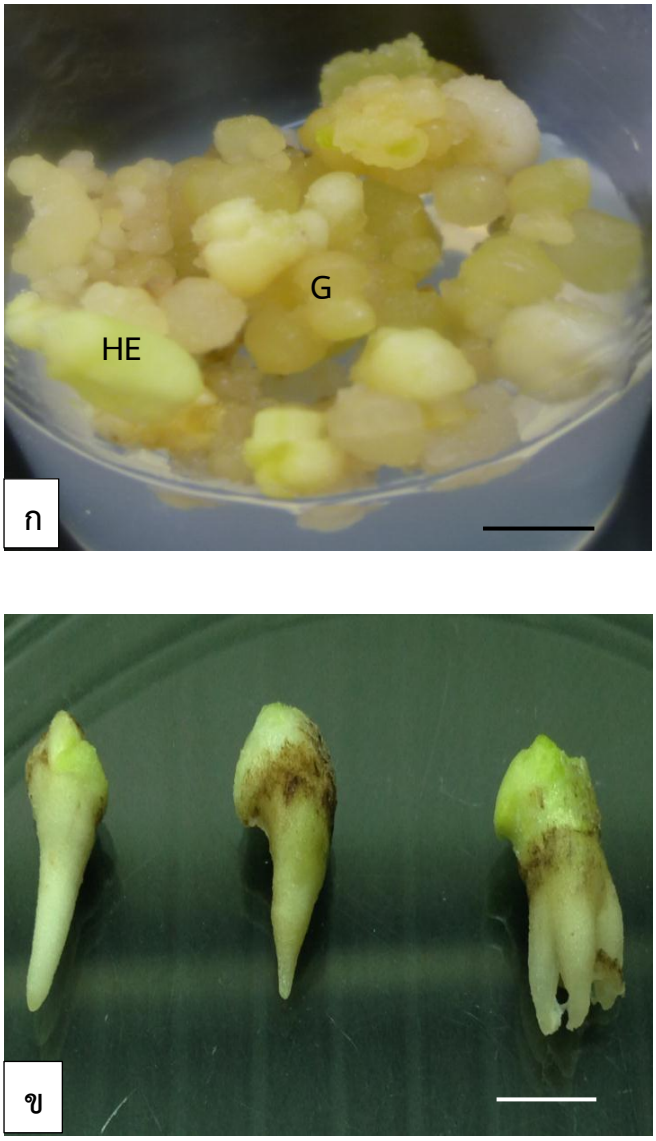
** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

GE (globular embryo) หมายถึง โซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม

HE (haustorium embryo) หมายถึง โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว

HE + root หมายถึง โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่มีการสร้างราก



ภาพที่ 1.4 ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำบนอาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก. ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม (GE) และระยะสร้างจาว (HE) บนอาหาร เติม 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอในระยะสร้างจาวที่มีการสร้างปลายราก บนอาหาร เติม 2-iP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิจารณ์ผลการทดลอง

ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งสูตรอาหารเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากการเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติของพืช พืชจะได้แร่ธาตุจากดินและน้ำ แต่ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิธีการที่นำชิ้นส่วนพืชขนาดเล็กมาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ พืชจึงจำเป็นต้องได้รับน้ำและแร่ธาตุต่าง ๆ จากอาหารสังเคราะห์ ซึ่งพืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสูตรอาหารที่แตกต่างกัน สูตรอาหารแต่ละชนิดมีองค์ประกอบของธาตุอาหารหรือปริมาณแกลือแร่ที่แตกต่างกันออกไปซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของพืชเพาะเลี้ยง สำหรับการศึกษาในครั้งนี้สูตรอาหาร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การตอบสนองดีที่สุดในการเพิ่มน้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เนื่องจากสูตรอาหาร MS มีปริมาณเกลือแร่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร Y_3 เช่น ปริมาณแอมโมเนียมซึ่งในระยะแรกของการแบ่งเซลล์เพิ่มปริมาณนั้นไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมมีความจำเป็น ต่อมาเมื่อต้องการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต้องลดความเข้มข้นของแอมโมเนียม (สมปอง, 2539) และนอกจากนี้สูตรอาหาร MS ที่มีปริมาณเกลือแร่มากกว่าจึงทำให้มีธาตุอาหารมากพอสำหรับเซลล์ทำให้เซลล์สามารถดูดไปใช้ได้เร็วที่สุด เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือแร่ในอาหารสังเคราะห์เมื่อเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการนำธาตุอาหารเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี active uptake ซึ่งเป็นการดูดธาตุอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต สอดคล้องกับการรายงานของสกุลรัตน์ (2553) ที่สามารถเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัสของปาล์มน้ำมันได้สูงสุด 316.39 มิลลิกรัม บนอาหารสูตร MS หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน และจากการศึกษาของเพ็ญติมาส (2552) พบว่าอาหารเหลวสูตร MS สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมันได้สูงกว่าอาหารเหลวสูตร Y_3 อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ระหว่างอาหารสูตร MS และ Y_3 พบว่า อาหารสูตร Y_3 ให้อัตราการเกิดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดสูงกว่าอาหารสูตร MS สอดคล้องกับรายงานของ Luis และ Scherwinski-Pereira (2014) ซึ่งรายงานว่าการวางเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะของ macaw palm เป็นเวลา 90 วัน ในอาหารสูตร Y_3 ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 7.0 เอ็มบริโอ สูงกว่าอาหารสูตร MS (ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 2.5 เอ็มบริโอ) จากรายงานของ Eeuwen (1976) อ้างโดย Luis และ Scherwinski-Pereira (2014) พบว่าอาหารสูตร Y_3 เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงมะพร้าวในหลอดทดลองมากกว่ากว่าสูตรอาหาร MS อาจเนื่องมาจากพืชกลุ่มนี้ต้องการระดับของไอโอดีนและโพแทสเซียมสูงแต่ต้องการระดับของไนโตรเจนน้อย อาหารสูตร Y_3 จึงเหมาะสมสำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

ในพืชตระกูลปาล์ม รวมถึงปาล์มน้ำมัน ในการศึกษานี้ก็ให้การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3

เนื่องจากการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลองเป็นสภาพแวดล้อมแบบปิด จึงทำให้เกิดการสะสมเอทิลีนที่พืชปลอดปล่อยออกมาหรือจากการเผาไหม้ระหว่างการลนปากขวดหรือหลอดทดลอง เอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่งที่อยู่ในสถานะก๊าซ แต่มีผลมากมายต่อการเจริญเติบโตของพืชทั้งด้านการส่งเสริมและยับยั้งการเจริญเติบโต สำหรับพืชในหลอดทดลองก๊าซเอทิลีนมีผลยับยั้งต่อหลายกระบวนการเช่น กระบวนการสร้างแคลลัส กระบวนการเอ็มบริโอเจนิซีส กระบวนการออกาโนเจนิซีส การสร้างราก การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (Kumar *et al.,* 2009) จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารยับยั้งเอทิลีนเพื่อประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลอง สารที่เติมร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงแล้วสามารถยับยั้งการทำงานของเอทิลีนได้มีหลายชนิด เช่น AVG (aminoethoxyvinylglycine) (Naik and Chand, 2003) $CoCl_2$ (Tamimi, 2015) $AgNO_3$ (Sgamma *et al*., 2015) เมื่อสารเหล่านี้ไปยับยั้งการทำงานของเอทิลีนจึงทำให้พืชในหลอดทดลองสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนต่อไปได้ โดยเฉพาะ $AgNO_3$ มีการศึกษาในพืชหลายชนิดว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอทิลีนและส่งเสริมการสร้างหรือเพิ่มปริมาณยอดได้ จากรายงานของ Fuentes และคณะ (2000) พบว่าการเติม $AgNO_3$ ลงในการเพาะเลี้ยงสามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสมดุลของไอออนต่าง ๆ จากการทดลองครั้งนี้อาหารที่เติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด สอดคล้องกับการทดลองของ Tamimi (2015) ที่สามารถชักนำยอดใหม่ได้สูงสุด 6.68 ยอดต่อชิ้นส่วน เมื่อวางเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยบนอาหารเติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ Naik และ Chand (2003) สามารถชักนำยอดได้สูงสุด 57 เปอร์เซ็นต์ จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง (hypocotyl) ของทับทิม บนอาหารเติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

นอกจากสูตรอาหารและสารยับยั้งเอทิลีนแล้วสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยเพิ่มความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออีกด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนเป็นปัจจัยภายในพืชที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ฮอร์โมนสองกลุ่ม คือ ออกซิน (dicamba) และไซโตไคนิน (2-iP) ออกซินและไซโตไคนินเป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ ส่งผลต่อการเพิ่มขนาดของเซลล์ ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตของพืชจะกระตุ้นการแบ่งเซลล์ซึ่งมีการกระตุ้นให้สังเคราะห์กรดนิวคลิอิกและโปรตีน (ชวนพิศ, 2544) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นไซโตไคนินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์และส่งเสริมการเกิดและเพิ่มปริมาณยอด สอดคล้องกับรายงานของ Mazri (2015) ที่พบว่า ไซโตไคนินมีความสำคัญในการกระตุ้นการเกิดและเพิ่มปริมาณยอด เนื่องจากชิ้นส่วน

ปลายยอดอินทผาลัมที่วางเลี้ยงบนอาหารปราศจากไซโตไคนินให้อัตราการเกิดยอดต่ำที่สุด สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ 2-iP ให้ผลดีกว่า dicamba คือให้อัตราการเกิดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดสูงกว่าซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Banerjee (2013) ที่รายงานว่า 2-iP เป็นปัจจัยสำคัญต่อการชักนำตายอดในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงของ *Bauhinia variegata* และพบว่าอาหารเหลวสูตร MS เติม 2-iP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนตายอด (shoot bud) สูงสุด 212.2 ยอด หลังวางเลี้ยง 60 วัน Jana และคณะ (2013) รายงานว่า การวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของ *Sophora tonkinensis* บนอาหาร MS เติม 2-iP เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ให้อัตราการชักนำยอดสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน 5.0 ยอด Heikrujam และคณะ (2014) รายงานว่า หลังเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องของ *Callian tweedii* บนอาหารสูตร MS เติม 2-iP เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 16 สัปดาห์ สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดแรก (primary somatic embryo: SE) ได้ 65 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำ SSE ได้ 19.44 เอ็มบริโอ หลังวางเลี้ยง SE เป็นเวลา 6 สัปดาห์ Romyanon และคณะ (2015) สามารถชักนำยอดรวมจากชิ้นส่วนยอดของปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร ½ MS เติม 2-iP ความเข้มข้น 9.8 ไมโครโมลาร์ ให้อัตราการสร้างยอด 54.2 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด 5 ยอด หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

การทดลองที่ 2

ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

Influence of Nitrogen Sources on Somatic Embryo Induction and Plant Regeneration from Haustorium Embryo in Oil Palm SUP-PSU

บทนำ

ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนอกจากปัจจัยเรื่องสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้ว พบว่าสารอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถช่วยส่งเสริมให้ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงได้อีกด้วย เช่น การเติมกรดอะมิโนลงในอาหารเพาะเลี้ยง กรดอะมิโนเป็นแหล่งของไนโตรเจนและเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง มีผลช่วยส่งเสริมการชักนำ การเพิ่มปริมาณ การสุกแก่และการพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอเป็นพืชต้นใหม่ ชนิดและความเข้มข้นของกรดอะมิโนมีบทบาทสำคัญในแต่ละระยะของกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส โดยทั่วไปการเติมสารอินทรีย์ไนโตรเจนลงในอาหารที่เพาะเลี้ยง มีผลด้านบวกต่อการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส (Zouine and Hadrami, 2007) โดยไนเตรตและแอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจนในรูปอนินทรีย์สารที่นิยมใช้เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Murashige and Skoog, 1962; Niedz, 1994) แหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงส่วนหนึ่งมาจากกรดอะมิโนที่เติมในอาหาร ได้แก่ glutamine asparagine adenine glycine และ casein hydrolysate เป็นต้น (ประศาสตร์, 2538) กรดอะมิโนถูกใช้เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลองหลายชนิด เช่น อ้อย (Asad *et al*., 2009) ถั่วลิสง (Vasanth *et al*., 2006) โสมอินเดีย (*Withania somnifera*) (Sivanandhan *et al*., 2015) แตงกวา (Vasudevan *et al*., 2004) รวมถึงปาล์มน้ำมัน (Morcillo *et al*., 1999; Rajesh *et al*., 2003) โดยในแต่ละพืชพบว่ามีการใช้กรดอะมิโนต่างชนิดกันออกไป อย่างไรก็ตามจากรายงานของ Morcillo และคณะ (1999) พบว่า โกลบูลิน 7S เป็นโปรตีนสำคัญที่สะสมในคัพภะของปาล์มน้ำมัน และถูกใช้เป็นตัวชี้วัดในการตรวจสอบทางชีวเคมีของการสุกแก่ของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนโกลบูลิน 7S พบว่ามี glutamine ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และมี arginine ประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ากรดอะมิโนเหล่านี้เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของการสังเคราะห์โกลบูลิน 7S ซึ่งอาจมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาเจริญเติบโตของโซมาติกเอ็มบริโอในปาล์มน้ำมัน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทดลองผลของ glutamine และ arginine ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

กระบวนการเอ็มบริโอเจเนซีสนอกจากขั้นตอนของการชักนำและเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอแล้ว ขั้นตอนการชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญ โดยโซมาติกเอ็มบริโอจะพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้นั้นสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือต้องอาศัยปัจจัยต่าง ๆ ในการชักนำ การงอก และการพัฒนา เช่น องค์ประกอบของอาหาร แสง อุณหภูมิ ลักษณะทางพันธุกรรม และชิ้นส่วนพืช (Fuentes *et al*., 2000)

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

1. การเตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับการทดลองที่ 1

ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่ของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ลูกผสมเทเนอราเบอร์ 77 ที่เกิดจากการผสมระหว่างดูรา (366) กับฟิสิเฟอรา (172) จากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน จะได้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นวัสดุเริ่มต้นเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การเตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับการทดลองที่ 2

ใช้โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่มีการสร้างขั้วรากที่ชักนำบนอาหารสูตร Y_3 ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตและจากอาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP เข้มข้น 0.1 0.3 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาผลของ glutamine และ arginine ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 เติมหรือไม่เติม glutamine หรือ arginine เข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25x150 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารแข็งปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

2. การชักนำพืชต้นใหม่

นำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่ชักนำบนอาหารสูตร Y_3 ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตและจากอาหารสูตร Y3 เติม 2-iP ความเข้มข้น 0.1 0.3 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25x150 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารแข็งปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาทีหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกอัตราการเกิดยอด จำนวนยอด ความยาวยอด อัตราการพัฒนาราก จำนวนราก และความยาวราก โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 1 หลอด

ผลการศึกษา

1. ผลของ glutamine และ arginine ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ glutamine หรือ arginine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า อาหารเติม 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ glutamine เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 24 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า อาหารเติม 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ glutamine ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด 1.5 เอ็มบริโอต่อหลอด (ตารางที่ 2.1) ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอเป็นระยะสร้างจาวทั้งหมด (ภาพที่ 2.1)

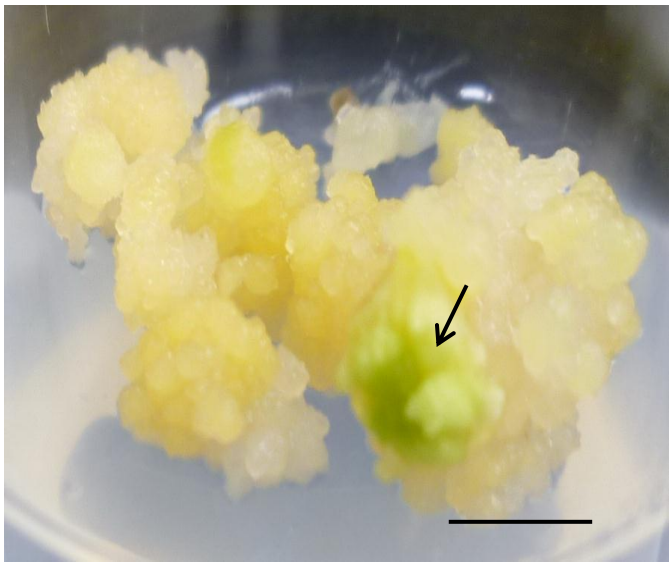
ตารางที่ 2.1 ผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ arginine และ glutamine ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y_3 ร่วมกับ 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		อัตราการเกิด SE (เปอร์เซ็นต์)	จำนวน SE เฉลี่ย ต่อหลอด
arginine	0.1	9.00[b]	1.00
	0.5	22.00[a]	1.00
	1	20.00[a]	1.20
	2	5.00[b]	1.00
glutamine	0.1	9.00[b]	1.50
	0.5	6.67[b]	1.00
	1	24.00[a]	1.33
	2	4.00[b]	1.00
F-test		**	ns
C.V. (%)		32.73	47.34

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.1 ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอ (ลูกศร) ที่เกิดจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ glutamine เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

2. การชักนำเป็นพืชต้นใหม่

จากการทดลองนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่มีการสร้างขั้วรากที่ชักนำได้บนอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือเติม 2-iP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่มีการสร้างขั้วรากที่ชักนำได้จากอาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการสร้างยอดและจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์ และ 1.33 ยอด ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่า โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่มีการสร้างรากชักนำได้บนอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ กล่าวคือมีทั้งยอดและราก (ภาพที่ 2.2) ให้อัตราการสร้างยอด 25 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 1 ยอด ความยาวยอด 4.3 เซนติเมตร อัตราการพัฒนาราก 25 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากเฉลี่ย 1 ราก และความยาวรากเฉลี่ย 2.8 เซนติเมตร (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 การชักนำพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่มีการสร้างรากจากอาหารสูตร Y_3 บนอาหารแข็งสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

อาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อัตราการเกิดยอด (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน (ยอด)	ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)	อัตราการการพัฒนาราก (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนรากเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน (ราก)	ความยาวรากเฉลี่ย (เซนติเมตร)
0	25.00	1.00	4.30	25.00	1.00	2.80
0.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.3	25.00	1.00	3.00	0.00	0.00	0.00
0.5	75.00	1.33	2.30	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	25.00	1.00	4.60	0.00	0.00	0.00
F-test	**	ns	ns	**	**	**
C.V. (%)	49.89	65.98	22.17	69.28	50.00	27.40

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ภาพที่ 2.2 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

วิจารณ์ผลการทดลอง

นอกจากปัจจัยเรื่องสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้ว กรดอะมิโนที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงถือเป็นปัจจัยที่สำคัญเช่นกัน กรดอะมิโนเป็นแหล่งของไนโตรเจนอินทรีย์และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง มีผลช่วยส่งเสริมการชักนำ การเพิ่มปริมาณ การสุกแก่และการพัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอเป็นพืชต้นใหม่ ชนิดและความเข้มข้นของกรดอะมิโนมีบทบาทสำคัญในแต่ละระยะของกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส โดยทั่วไปแล้วการเติมสารอินทรีย์ไนโตรเจนลงในอาหารที่เพาะเลี้ยง มีผลด้านบวกต่อการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส (Zouine and Hadrami, 2007) สอดคล้องกับรายงานของ Kumar และคณะ (2015) สามารถเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอได้เมื่อเติม glutamine ลงในอาหารเพาะเลี้ยง โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ *Pelargonium sidoides* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญในแทบแอฟริกาใต้ บนอาหารสูตร MS เติม piclolam เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ glutamine เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 25.89 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน หลังจากการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ แต่จากการศึกษานี้พบว่า อาหารที่เติม glutamine ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดเพียง 1.5 เอ็มบริโอ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกัน (อาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร) แต่ไม่มีการเติม glutamine ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 42.95 เอ็มบริโอต่อหลอด

การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส เป็นการเจริญและพัฒนาของเซลล์ไปในสองทิศทาง (bipolar) คือขั้วยอดและขั้วรากพร้อม ๆ กัน (สิรนุช, 2540) ให้พืชต้นใหม่ที่มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะต่าง ๆ เหมือนกับต้นอ่อนที่ได้จากการผสมพันธุ์ เรียกเอ็มบริโอที่มีพัฒนาการมาจากเซลล์ร่างกายว่า โซมาติกเอ็มบริโอ โดยโซมาติกเอ็มบริโอจะพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้นั้นสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามพืชบางชนิดต้องอาศัยปัจจัยต่าง ๆ ในการชักนำการงอกและการพัฒนา เช่น องค์ประกอบของสูตรอาหาร แสง และอุณหภูมิ (Fuentes *et al*., 2000) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อย้ายโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่มีการสร้างขั้วรากไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 3 เดือน ให้อัตราการสร้างยอดสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้อัตราการพัฒนาของรากสูงสุดเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันต้องอาศัยปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการชักนำยอดหรือรากเพื่อให้ได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ เช่น การศึกษาของ Te-chato และ Muangkaewngam (1992) สามารถชักนำรากจากการวางเลี้ยงกลุ่มต้นกล้าของปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของสารลงครึ่งหนึ่งร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในสภาพนิ่ง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ให้อัตราการสร้างรากสูงสุด 73 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาของยอดและรากของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวโดยผ่านการขั้นตอนของการชักนำต้นอ่อนชุดที่สอง (SSE) เพื่อร่นระยะเวลาในกระบวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ หรือนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวมาชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ตามวิธีของ อาสลัน (2545) โดยการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้การพัฒนาของต้นอ่อนชุดที่สอง สูงสุด 77.92 เปอร์เซ็นต์ และ SSE สามารถพัฒนาให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์สูงสุด 35.72 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อประโยชน์ทางด้านการพัฒนาและเพิ่มปริมาณของพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส

การทดลองที่ 3

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว โดยใช้เครื่องหมาย SSR

Analysis of Somaclonal Variation of Haustorium Embryo Using SSR Marker

บทนำ

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา การใช้ไอโซไซม์ และการใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ปัจจุบันเทคนิคทางด้านดีเอ็นเอหรือการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมมีบทบาทสำคัญในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช เนื่องจากวิธีนี้สามารถทำได้รวดเร็ว มีความแม่นยำสูง ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมไม่มีผลเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตัวอย่างเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของพืช เช่น เครื่องหมายอาร์เอพีดี เครื่องหมายเอเอฟแอลพี เครื่องหมายเอสเอสอาร์ เป็นต้น โดยเทคนิคเอสเอสอาร์ได้รับความนิยม เนื่องจากเทคนิคนี้มีข้อดี คือ ปริมาณดีเอ็นเอใช้เพียงเล็กน้อยและไม่จำเป็นต้องมีบริสุทธิ์สูงมาก ให้ความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอมากและมีการกระจายทั่วทั้งจีโนม การแปลผลทำได้ง่าย ให้ผลแน่นอนไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีการทำซ้ำ (จรัสศรี, 2548)

SSR (simple sequence repeat) หรือ microsatellite DNA คือ ลำดับเบสที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำสั้น ๆ ความยาว 1-6 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส เรียงตัวต่อกันในทิศทางเดียวกัน ส่วนใหญ่จะเป็นชุดซ้ำ2 คู่เบส (dinucleotide) แต่บางครั้งอาจพบชุดซ้ำที่เป็น 3 (trinucleotide) ถึง 4 (tetranucleotide) คู่เบสก็ได้มีการกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน (non-coding region) โดยลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ มักเป็นลำดับเบสจำเพาะมีเพียงชุดเดียวในจีโนม ดังนั้นเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว และเนื่องจากส่วนไมโครแซทเทลไลท์เป็นส่วนที่มีการกลายพันธุ์โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย จึงมีโอกาสได้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากัน การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จึงพบ polymorphism ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (co-dominant) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous และ heterozygous ได้ เทคนิค SSR นั้นมีประโยชน์อย่างมากในการใช้เพื่อการศึกษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การศึกษาด้านจีโนม การสร้างแผนที่จีโนม จึงสามารถใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายได้เป็นอย่างดีในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์, 2552)

มีรายงานการใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ในการตรวจสอบความแปรปรวนของปาล์มน้ำมัน เช่น วราภรณ์ (2557) ใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลอง ใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ พบว่า มี 3 คู่ไพรเมอร์ ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้ง 2 ลักษณะ คือ ไพรเมอร์ EgClR0446 EgClR0243 และ EgClR0409 ชญานีย์ (2557) ชักนำการกลายพันธุ์ให้ปาล์มน้ำมันออกดอกในหลอดทดลองด้วยการจุ่มโซมาติกเอ็มบริโอในสารละลาย EMS (ethylenediaminetetraacetic acid) แล้วตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม พบว่าไพรเมอร์ EgClR0465 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น polymorphism Arthipatjaporn และ Te-chato (2012) ตรวจสอบความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลว ใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและไม่มีความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทั้งสองชนิด

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

ใช้โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่ชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS WPM Y_3 และ OPCM#1 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ จะได้โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวสำหรับตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

วิธีการศึกษา

1. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวโดยใช้เครื่องหมาย SSR

1.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่พัฒนาจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ โดยใช้ DNeasy Plant Kit (Qiagen) มีขั้นตอนการสกัดดังนี้ นำ HE ขนาด 0.5 x 0.5 ซม. ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปริมาตร 2 มิลลิลิตรภายในบรรจุลูกเหล็กอะลูมิเนียมทรงกลมอยู่ หลังจากนั้นนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนไปบดด้วยเครื่องบดเนื้อเยื่อ (TissueLyser) ที่ความถี่ในการเขย่า 30 Hz เป็นเวลา 30 วินาที นำตัวอย่างที่ผ่านการบดแล้วเติมสารละลาย AP1 400 ไมโครลิตร ร่วมกับ RNase 40 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (Vortex) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที กลับหลอดไปมาทุก 3 นาที เติมบัฟเฟอร์ AP2 130 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาให้สารละลายเข้ากัน บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ย้ายสารละลายปริมาตร 400-450 ไมโครลิตรใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปริมาตร 2 มิลลิลิตรที่มีแผ่นกรองอยู่ภายใน (QIAsherdder Mini spin column) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เอาแผ่นกรองทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ AP3 ปริมาตร 1.5 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปต ย้ายสารละลายปริมาตร 650 ไมโครลิตรใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์มีแผ่นกรองอยู่ภายใน (DNeasy Mini spin column) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลาย ย้ายแผ่นกรอง DNeasy Mini spin column ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ AW 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลาย ย้ายแผ่นกรอง DNeasy Mini spin column ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ AW 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ย้ายแผ่นกรอง DNeasy Mini spin column ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ AE 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ได้ดีเอ็นเอสำหรับตรวจสอบปริมาณและเพิ่มจำนวนในขั้นตอนต่อไป

1.2 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Nano-Drop รุ่น ND-1000) ใช้โปรแกรม ND-1000 V 3.8.0 ในการวิเคราะห์ ใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง ปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้แสดงบนหน้าจอคอมพิวเตอร์

1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ซึ่งเป็น forward และ reverse ทั้งหมด 9 คู่ไพรเมอร์ (EgCIR0008, EgCIR0243, EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772) รายละเอียดของไพรเมอร์แสดงในตารางภาคผนวกที่ 2 ปฏิกิริยาดังกล่าวประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 1 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละชนิดเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ Ampli *Taq* Gold 360 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 3 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

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

หลังจากทำพีซีอาร์ นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตรมาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส โดยใส่ภายในเครื่อง Multina ผลจากการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างแสดงบนหน้าจอคอมพิวเตอร์

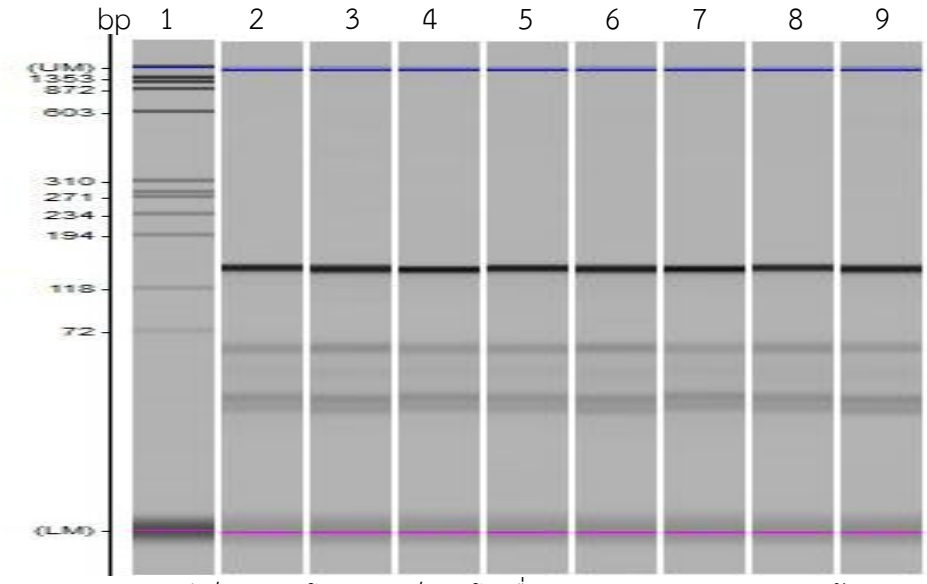
ผลการศึกษา

1. ผลการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวโดยใช้เครื่องหมาย SSR

จากการนำดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่พัฒนาจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ มาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ คือ EgClR0008 EgClR0243 EgClR0337 EgClR0409 EgClR0446 EgClR0465 EgClR0781 EgClR0905 และ EgClR1172 หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วนำมาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่อง Multina พบว่าจากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว พบไพรเมอร์ 8 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความแตกต่างกัน (monomorphism) คิดเป็นอัตราการเกิด monomorphism ได้ 97.73 เปอร์เซ็นต์ มีเพียงไพรเมอร์เดียวที่ให้แถบดีเอ็นเอเป็น polymorphism ได้แก่ EgClR0446 คิดเป็นอัตราการเกิด polymorphism ได้ 2.27 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.1) สำหรับไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอเป็น monomorphism ได้แก่ EgClR0337 EgClR0465 EgClR0243 EgClR0008 EgClR1772 EgClR0781 EgClR0905 และ EgCIR0409 (ภาพที่ 3.1-3.9)

ตารางที่ 3.1 ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSR

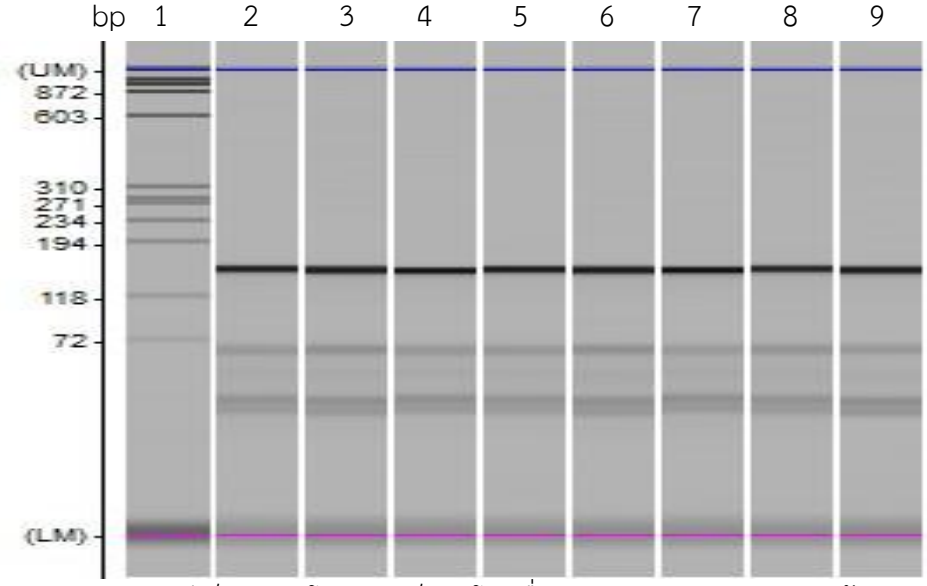
ไพรเมอร์	จำนวนแถบทั้งหมด	จำนวนแถบแบบ Monomorphic	อัตราการเกิด Monomorphism (%)
EgCIR0337	5	5	100.00
EgCIR0465	4	4	100.00
EgCIR0243	6	6	100.00
EgCIR0905	7	7	100.00
EgCIR0008	6	6	100.00
EgCIR1772	5	5	100.00
EgCIR0446	4	3	75.00
EgCIR0409	3	3	100.00
EgCIR0781	4	4	100.00
จำนวนแถบทั้งหมด	44	43	97.73



ภาพที่ 3.1 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0337

lane 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

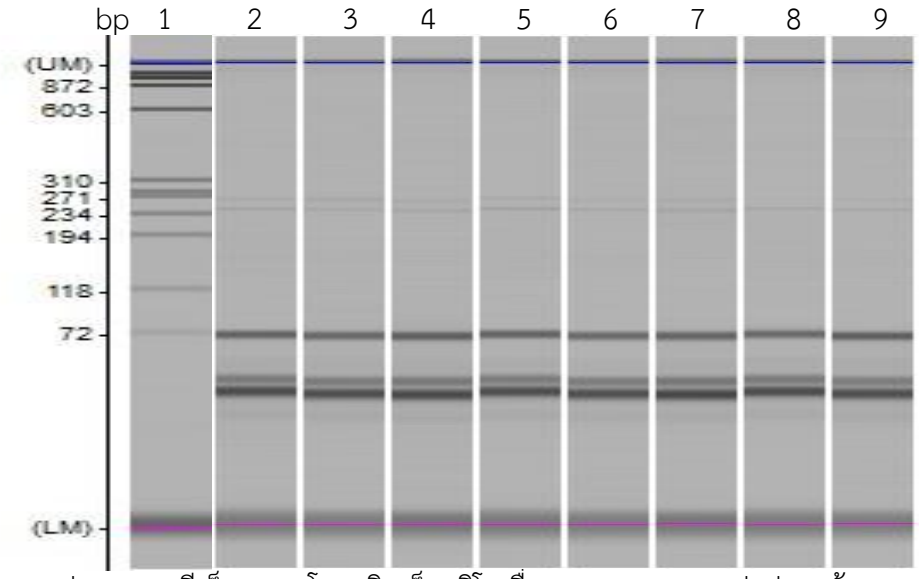
lane 2-9 คือดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอ



ภาพที่ 3.2 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0465

lane 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

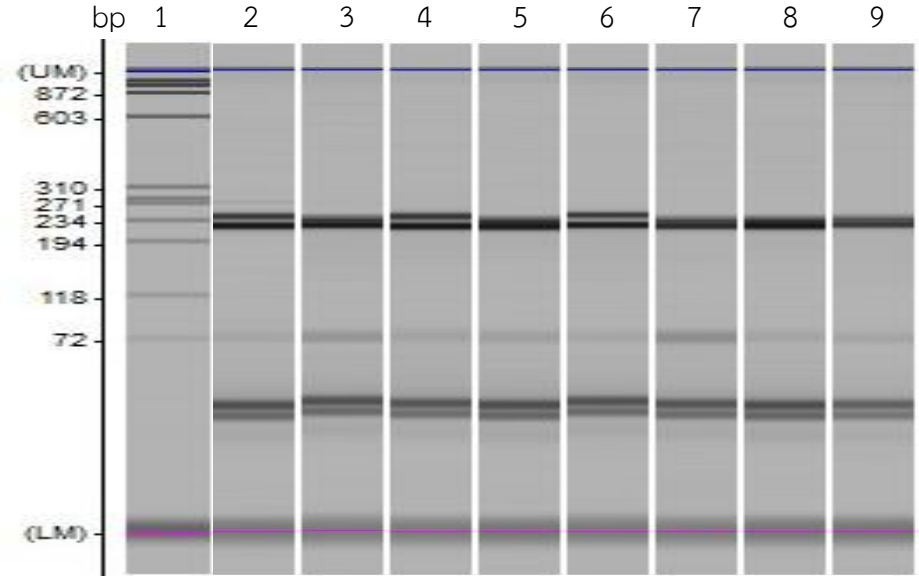
lane 2-9 คือดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอ



ภาพที่ 3.3 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0243

lane 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

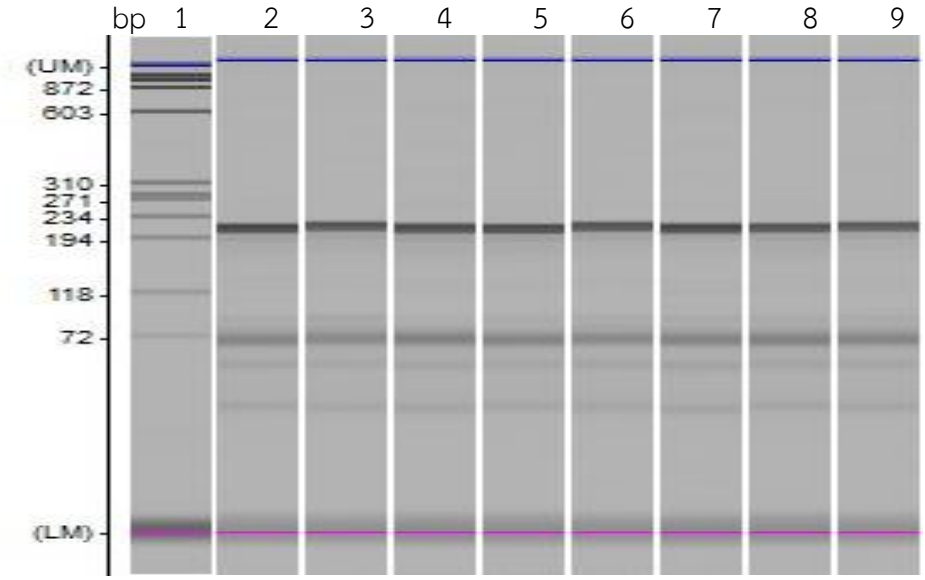
lane 2-9 คือดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอ



ภาพที่ 3.4 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0905

lane 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

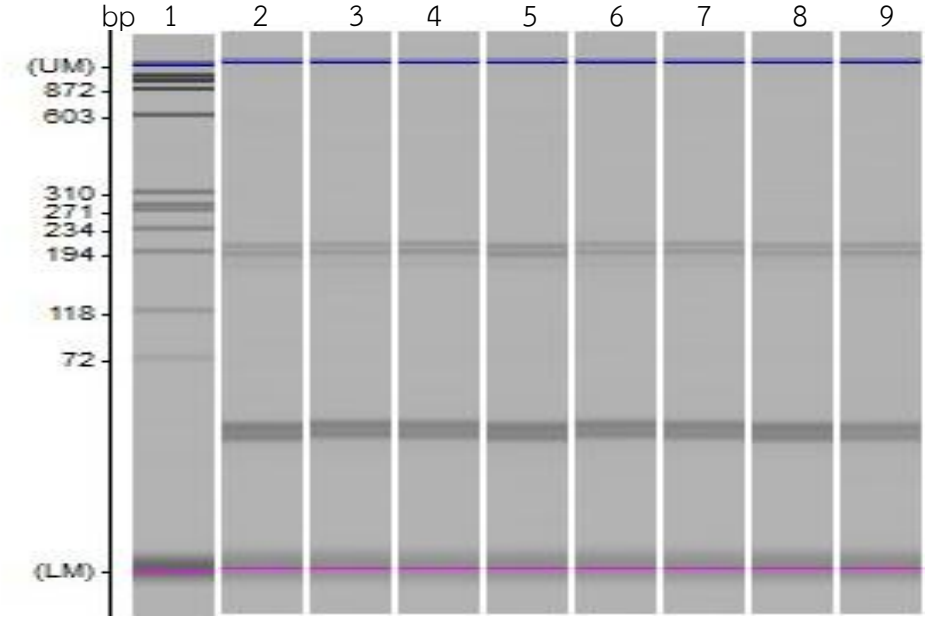
lane 2-9 คือดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอ



ภาพที่ 3.5 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0008

lane 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

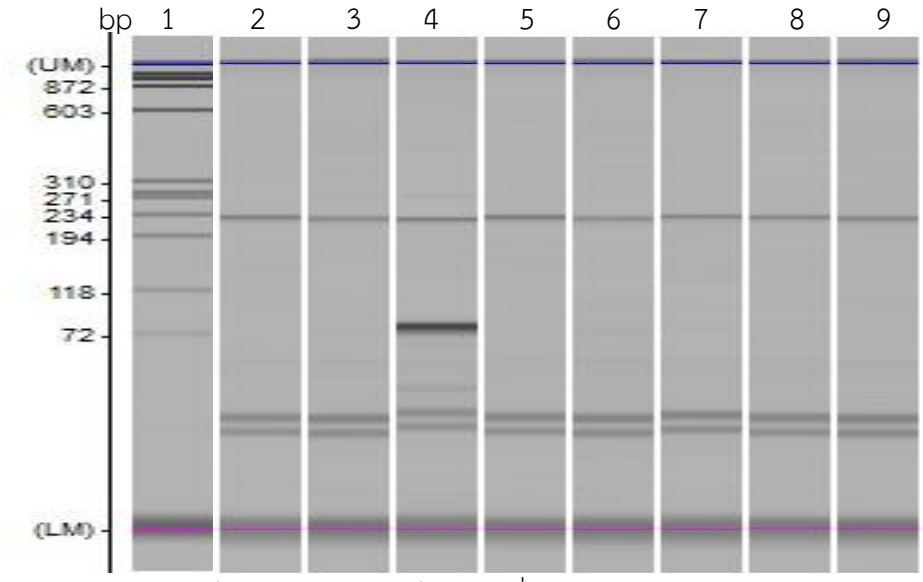
lane 2-9 คือดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอ



ภาพที่ 3.6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR1772

lane 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

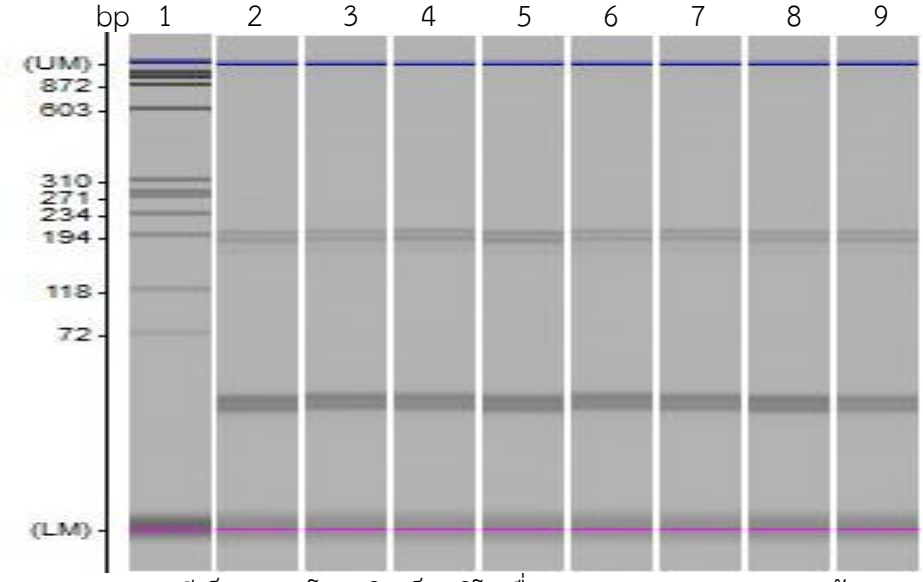
lane 2-9 คือดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอ



ภาพที่ 3.7 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0446

lane 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

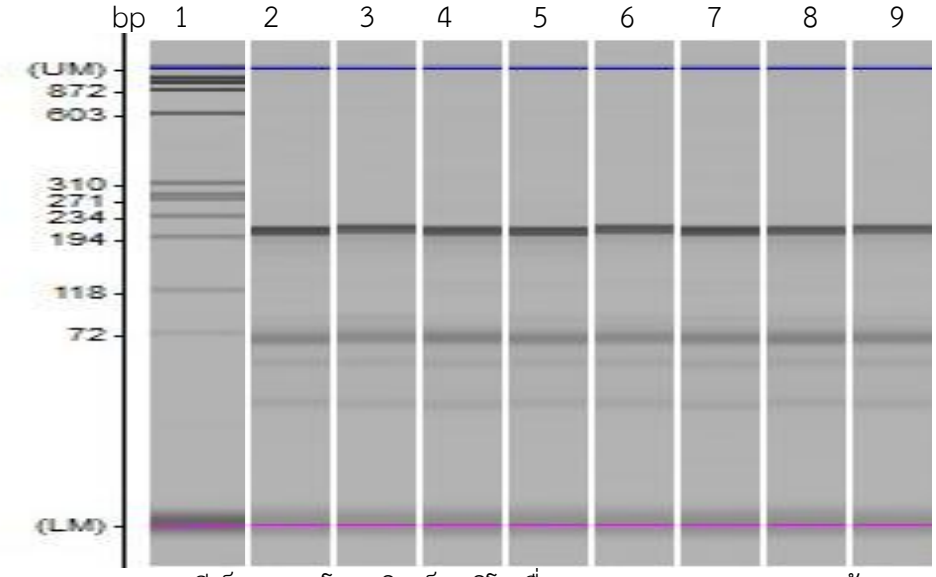
lane 2-9 คือดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอ



ภาพที่ 3.8 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0409

lane 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 2-9 คือดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอ



ภาพที่ 3.9 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค SSR จากการใช้ไพรเมอร์ EgCIR0781

lane 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

lane 2-9 คือดีเอ็นเอจากโซมาติกเอ็มบริโอ

วิจารณ์ผลการทดลอง

การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSR ในระยะโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันที่ชักนำจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะลูกผสมเทเนอรา ที่ผ่านการย้ายเลี้ยงมาเป็นเวลานาน 6 ปี แล้วนำมาเพิ่มย้ายเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน 4 ชนิด พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ EgCIR0446 แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphism คิดเป็น 2.27 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิค SSR และ ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ ดังกล่าวข้างต้นสามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองได้ สอดคล้องกับรายงาน วราภรณ์ (2557) ใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลองได้ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพเมอร์ พบว่า มี 3 คู่ไพรเมอร์ ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้ง 2 ลักษณะ คือ ไพรเมอร์ EgClR0446 EgClR0243 และ EgClR0409 ชญาณีย์ (2557) ชักนำการกลายพันธุ์ให้ปาล์มน้ำมันออกดอกในหลอดทดลองด้วยการจุ่มโซมาติกเอ็มบริโอในสารละลาย EMS แล้วตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม พบว่า ไพรเมอร์ EgClR0465 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น polymorphism จากการศึกษาครั้งนี้พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพียง 2.27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไม่ส่งผลต่อความแปรปรวนที่เกิดขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากอาหารแต่ละสูตรไม่มีองค์ประกอบของสารก่อกลายพันธุ์ประกอบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นต่ำ สาเหตุการเกิดความแปรวนทางพันธุกรรมอาจเกิดขึ้นจากระยะเวลาในการย้ายเลี้ยง เนื่องจากชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ดูแลโดยการย้ายเลี้ยงทุกเดือนในหลอดทดลองเป็นเวลามากกว่า 6 ปี สอดคล้องกับรายงานของ Smykal และคณะ (2007) รายงานว่าพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นถั่วลันเตา (*Pisum sativum* L.) ที่ทำการย้ายเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลานาน 24 ปี โดยพบลักษณะ polymorphism 11.2 และ 18.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบโดยเทคนิค AFLP และ MASP อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphism อาจเกิดจากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอระหว่างขั้นตอนการสกัด จึงควรทำการทดลองซ้ำสำหรับไพรเมอร์ EgClR0465 เพื่อเป็นการยืนยันว่าแถบดีเอ็นเอมีลักษณะ polymorphism หรือมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นของชิ้นส่วนพืชในหลอดทดลอง หรือการเพิ่มจำนวนไพร์เมอร์ที่มีความสามารถแยกแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphism ได้

การศึกษาครั้งนี้อาจเป็นส่วนหนึ่งในการหาแนวทางที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง เพื่อผลิตต้นกล้าพันธุ์ดีที่มีลักษณะตรงตามความต้องการของเกษตรกรได้ต่อไปในอนาคต

บทที่ 3

สรุป

สรุปผลการทดลอง

อาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 468 มิลลิกรัม และอาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอซึ่งให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดสูงสุด 42.95 เอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวที่มีการสร้างรากชักนำได้บนอาหารสูตร Y_3 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ กล่าวคือมีทั้งยอดและราก อัตราการสร้างยอด 25 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 1 ยอด ความยาวยอด 4.3 อัตราการสร้างราก 25 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากเฉลี่ย 1 ราก และความยาวรากเฉลี่ย 2.8 เซนติเมตร

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาว พบไพรเมอร์ 8 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความแตกต่างกัน (monomorphism) คิดเป็นอัตราการเกิด monomorphism ได้ 97.73 เปอร์เซ็นต์ มีเพียงไพรเมอร์เดียวที่ให้แถบดีเอ็นเอเป็น polymorphism ได้แก่ EgClR0446 คิดเป็นอัตราการเกิด polymorphism เพียง 2.27 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาปรับใช้สำหรับการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2546. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กาญจนี ทองเทพ. 2553. ปัจจัยทางกายภาพ และเคมีต่อการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

เจริญ สิงห์ลอ. 2532. การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมันเพื่อทวีจำนวนต้นและย่นระยะเวลาในการงอก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชญานีย์ สังวาลย์. 2557. ผลของเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ที่ให้กับโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของต้นกล้าที่พัฒนา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชวนพิศ แดงสวัสดิ์. 2544. สรีรวิทยาของพืช. กรุงเทพฯ: บริษัท ธนธัชการพิมพ์ จำกัด.

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

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และอารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2551. บทปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: บริษัท เอเจนเทค จำกัด.

เพ็ญติมาส กระมุท. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วราภรณ์ หีดฉิม. 2557. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลและเทคนิคโฟลไซโทเมทรีในการตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์. 2553. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. ดุษฎีนิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

สมปอง เตชะโต, พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, จรัสศรี นวลศรี และ วันทนา เอ้งย่อง. 2530. การชักนำแคลลัสปฐมภูมิในปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจาก ชิ้นส่วนใบอ่อน. วารสารสงขลานครินทร์ 8: 1-6.

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

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

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5: 37-59.

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Aboshama, H. M. S. 2011. Direct somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). World Journal of Agricultural Sciences 7: 755-762.

Al-Khayri, J. M. and Al-Bahrany, A. M. 2001. Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulturae 89: 291-298.

Arthipatjaporn, A. and Te-chato, S. 2012. Verification of somaclonal variation of oil palm embryogenic callus on solid and liquid medium by RAPD and SSR techniques. Khon Kaen Agriculture Journal 40: 157-166.

Asad, S., Arshad, M., mansor, S. and Zafar, Y. 2009. Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Sacchrum officinarum* L.). African Journal of Biotechnology 8: 1214-1218.

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

Banerjee, P. 2013. *In vitro* plant regeneration of *Bauhinia variegata* Linn. through direct and indirect shoot bud development from different explants on MS solid and liquid media. Indian Journal Applied and Pure Biology 28: 181-192.

Chan, J. L., Saenz, L., Talavera, C., Hornung, R., Robert, M. and Oropeza, C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 17: 515-521.

Chew, T. L. and Bhatia, S. 2008. Catalytic processes towards the production of biofuels in a palm oil and oil palm biomass-based biorefinery. Bioresource Technology 99: 7911 - 7922.

Constantin, M., Nchu, W. A., Godswill, N. N., Wiendi, N. M. A., Wachjar, A. and Frank, N. E. G. 2015. Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. Journal of Applied Biology and Biotechnology 4: 4–10.

Eeuwens, C. J. 1978. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date palms (*Phoenix dactylifera*) cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum 42: 173-178.

Fuentes, S. R. L., Calheiros, M. B. P., Manetti-Filho, J. and Vieira, L.G.E. 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *coffea canephora*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 5-13.

Gutierrez, L. F., Sanchez, O. J. and Cardona, C. A. 2009. Process integration possibilities for biodiesel production from palm oil using ethanol obtained from lignocellulosic residues of oil palm industry. Bioresource Technology 100: 1227-1237.

Heikrujam, M., Kumar, D., Kumar, S., Gupta, S. C. and Agrawal, V. 2014. High efficiency cyclic production of secondary somatic embryos and ISSR based assessment of genetic fidelity among the emblings in *Calliandra tweedii* (Benth.). Scientia Horticulturae 177: 63-70.

Hilae, A. and Te-chato, S. 2005. Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Songklanakarin Journal of Science and Technology 27: 630-635.

Jana, S., Sivanesan, I. and Jeong, B. R. 2013. Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication of *Sophora tonkinensis.* Asia Pacific Journal of Tropical Biomedicine 3: 549-553.

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

Karun, A. and Sajini, K. K. 1996. Plantlet regeneration from leaf explants of oil palm seedlings. Current-Science 71: 922-926.

Kumar, V., Moyo, M., Staden, J. V. 2015. Somatic embryogenesis of *Pelargonium sidoides* DC. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 121: 571-577.

Kumar, V., Parvatam, G. and Ravishankar, G. A. 2009. $AgNO_3$ – A potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. Electronic Journal of Biotechnology 12: 1-15.

Lokko, Y., Dixon, A., Offei, S., Danquah, E. and Fregene, M. 2006. Assessment of genetic diversity among African cassava *Manihot esculenta* Grantz accessions resistant to the cassava mosaic virus disease using SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution 53: 1441–1453.

Luis, Z. G. and Scherwinski-Pereira, J. E. 2014. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 118: 485-496.

Mazri, M. A. 2015. Role of cytokinins and physical state of the culture medium to improve *in vitro* shoot multiplication, rooting and acclimatization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Boufeggous. Plant Biochemistry and Biotechnology 24: 268-275.

Morcillo, F., Aberlenc-Bertossi, F., Noirot, M., Hamon, S. and Duval, Y. 1999. Differential effects of glutamine and arginine on 7S globulin accumulation during the maturation of oil palm somatic embryos. Plant Cell Reports 18: 868-872.

Mukherjee, I. and Sovacool, B. K. 2014. Palm oil-based biofuels and sustainability in southeast Asia: A review of Indonesia, Malaysia and Thailand. Renewable and Sustainable Energy Reviews 37: 1-12.

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

Naik, S. K. and Chand, P. K. 2003. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote *in vitro* adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.). Journal of Plant Physiology 160: 423-430.

Niedz, R. P. 1994. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39: 1-5.

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

Romyanon, K., Mosaleeyanon, K. and Kirdmanee, C. 2015. Direct-shoot organogenesis as an alternative protocol for *in vitro* regeneration of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Scientia Horticulturae 195: 1–7.

Sgamma, T., Thomas, B. and Muleo, R. 2015. Ethylene inhibitor silver nitrate enhances regeneration and genetic transformation of *Prunus avium* (L.) cv Stella. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 120: 79-88.

Silva, R. D. C., Luis, Z. G. and Scherwinski-Pereira, J. E. 2014. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Journal of Plant Growth Regulation 72: 67–80.

Singh, A., Negi, M. S., Rajagopal, J., Bhatia, S., Tomar, U. K., Srivastava, P. S. and Lakshimikumaran, M. 1999. Assessment of genetic diversity in *Azadirachta indica* using AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 99: 272-279.

Sivanandhan, G., Selvaraj, N., Ganapathi, A. and Manickavasagam, M. 2015. Effect of nitrogen and carbon sources on in vitro shoot multiplication, root induction and withanolides content in *Withania somnifera* (L.) Dunal. Acta Physiologiae Plantarum 37: 12.

Smykal, P., Valledor, L. Rodriguez, R. and Griga, M. 2007. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). Plant Cell Reports 26: 1985-1998.

Steinmacher, D. A., Cangahuala-Inocente, G. C., Clement, C. R. and Guerra, M. P. 2007. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 43: 124-132.

Suranthran, P., Sinniah, U. R., Subramaniam, S., Aziz, M. A., Romzi, N. and Gantait, S. 2011. Effect of plant growth regulators and activated charcoal on *in vitro* growth and development of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Dura) zygotic embryo. African Journal of Biotechnology 10: 10600–10606.

Tamimi S. M. 2015. Effects of ethylene inhibitors, silver nitrate ($AgNO_3$), cobalt chloride ($CoCl_2$) and aminooxyacetic acid (AOA), on *in vitro* shoot induction and rooting of banana (*Musa acuminata* L.). African Journal of Biotechnology 15: 2510-2516.

Te-chato, S., Hilae, A. and Yeedum, I. 2004. Induction of embryogenic callus and plantlet regeneration from young leaves of high yielding mature oil palm. Songklanakarin Journal of Science and Technology 26: 617-628.

Te-chato, S. and Muangkaewngam, A. 1992. Tissue culture of oil palm: enhanced root induction efficiency from young leaf-derived shoots. Songklanakarin Journal of Science and Technology 14: 223-229.

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

Vasanth, K., Lakshmiprabha, A. and Jayabalan, N. 2006. Amino acids enhancing plant regeneration from cotyledon and embryonal axis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Indian Journal of Crop Science 1: 79-83.

Vasudevan, A., Selvaraj, N., Ganapathi, A., Kasthurirengan, S. Anbazhagan, V. R. and Manickavasagam, M. 2004. Glutamine: a suitable nitrogen source for enhanced shoot multiplication in *Cucumis sativus* L. Biologia Plantarum 48: 125-128.

Verma, P. C., Chakrabarty, D., Jena, S. N., Mishra, D. K., Singh, P. K., Sawant, S. V. and Tuli, R. 2009. The extent of genetic diversity among *Vanilla* species: Comparative results for RAPD and ISSR. Scientia Horticulturae 29: 581-589.

Zouine, J. and Hadrami, I. E. I. 2007. Effect of 2, 4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Scientia Horticulturae. 112: 221-226.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหารสังเคราะห์

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	MS	Y_3	WPM	OPCM#1	OPCM#2
NH_4NO_3	1650.00	0.00	400.00	1025.00	825.00
NH_4Cl	0.00	535.00	0.00	0.00	267.50
KNO_3	1900.00	2020.00	0.00	950.00	1960.00
KCl	0.00	1492.00	0.00	0.00	746.00
NaH_2PO_4 $1H_2O$	0.00	312.00	0.00	0.00	156.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00	294.00	96.00	268.00	367.00
$Ca(NO_3).4H_2O$	0.00	0.00	556.00	278.00	0.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00	247.00	0.00	185.00	308.50
K_2 SO_4	0.00	0.00	990.00	495.00	0.00
KH_2PO_4	170.00	0.00	170.00	170.00	85.00
H_3BO_3	6.20	3.10	6.20	6.20	4.65
$MnSO_4.H_2O$	16.90	11.20	16.90	16.90	14.05
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60	7.20	8.60	9.60	8.90
KI	0.83	8.30	0.00	0.415	4.565
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.24	0.25	0.25	0.365
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.16	6.25	3.1375	0.0925
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.24	0.00	0.0125	0.1325
Na_2EDTA	37.30	37.30	37.30	37.30	37.30
$FeSO_4.7H_2O$	27.80	27.80	27.80	27.80	27.80
$NiCl_2$ $6H_2O$	0.00	0.024	0.00	0.00	0.012
Myoinositol	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Glycine	2.00	0.00	2.00	2.00	1.00
Nicotinic acid	0.50	0.05	0.50	0.50	0.275

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	MS	Y_3	WPM	OPCM#1	OPCM#2
Pyridoxine.HCl	0.50	0.05	0.50	0.50	0.50
Thiamine.HCl	0.10	0.50	1.00	0.55	0.30
Ca-pantothenate	0.00	0.05	0.00	0.00	0.025
Biotin	0.00	0.05	0.00	0.00	0.025
Sucrose (กรัม)	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
วุ้น (กรัม)	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50
pH	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7

ตารางภาคผนวกที่ 2 ไพร์เมอร์ SSR ที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

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

ผลงานตีพิมพ์

วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 4 ฉบับที่ 1 (มกราคม-มีนาคม): 25-30, 2560
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 4, No. 1 (January-March): 25-30, 2017

Research article

ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.

Influences of Culture Media and Plant Growth Regulators on Somatic Embryo Induction in Oil Palm SUP-PSU

ชาคริยา นิหะ[1], สุรีรัตน์ เย็นช้อน[1*] และสมปอง เตชะโต[1]
Niha, C.[1] Yenchon, S.[1*] and Te-chato, S.[1]

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
[1] Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112

** Corresponding author: sureerat.y@psu.ac.th*
Received 12 November 2016; Revised 24 November 2016; Accepted 1 December 2016

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ โดยวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตรต่าง ๆ เติม 3, 6-dichloro-2-methoxybenzoic-acid (dicamba) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 468 มิลลิกรัม สำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า อาหารสูตร Y_3 (Eeuwens) ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 12 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด 1.33 เอ็มบริโอต่อหลอด เมื่อพิจารณาสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า N_6-(2-isopentenyl) adenine (2-iP) ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด 42.95 เอ็มบริโอต่อหลอด หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ดังนั้นอาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ.
คำสำคัญ: ปาล์มน้ำมัน, สูตรอาหาร, สารควบคุมการเจริญเติบโต, เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

Abstract

The influences of culture media and plant growth regulators (PGRs) on embryogenic callus (EC) proliferation and somatic embryo (SE) formation were investigated. EC was cultured on different culture media with 0.1 mg/L dicamba for 3 weeks. The results revealed that the MS medium gave the highest fresh weight of embryogenic callus at 468 mg. For SE formation, Y_3 medium gave the highest frequency of somatic embryo formation at 12% and mean number of SEs at 1.33 SEs/tube. In case of PGRs, 2-iP at concentration of 0.3 mg/L gave the highest somatic embryo formation at 100% and mean number of SEs at 42.95 SEs/tube after culture for 3 weeks. Accordingly, Y_3 medium with 0.3 mg/L 2-iP was suitable for somatic embryo formation in oil palm SUP-PSU.
Keywords: Oil palm, Culture media, Plant growth regulators, Embryogenic callus

บทนำ

ปัญหามลพิษทางด้านสิ่งแวดล้อมและการลดปริมาณลงของแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลประกอบกับการเพิ่มขึ้นของราคาน้ำมันดิบเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่การคิดค้นพัฒนาและผลิตพลังงานจากแหล่งพลังงานทางเลือกแทนการผลิตจากแหล่งฟอสซิล เพื่อตอบสนองความต้องการใช้พลังงานที่เพิ่มมากขึ้น (Chew and Bhatia, 2008) ส่งผลให้ปัจจุบันหลายรัฐบาลทั่วโลกมีการส่งเสริมให้ใช้พลังงานจากเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) ได้แก่ เอทานอลที่ได้จากพืชประเภทแป้งและน้ำตาล และไบโอดีเซลที่ได้จากพืชน้ำมันและไขมันสัตว์ (Mukherjee and Sovacool, 2014) ถึงแม้ว่าประเทศในยุโรปจะเป็นผู้นำในการผลิตไบโอดีเซล โดยประเทศเยอรมันเป็นประเทศแรกที่ทำการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งน้ำมันที่นำมาใช้ได้แก่ น้ำมันเรพซีด น้ำมันถั่วเหลือง

Published by Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: nr-sjps@group.psu.ac.th.

และน้ำมันดอกทานตะวัน แต่สำหรับประเทศในเขตร้อน เช่น ไทย มาเลเซีย และโคลัมเบีย ใช้น้ำมันจากปาล์มน้ำมันมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล (Gutierrez *et al*., 2009) ประกอบกับปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันชนิดเดียวของโลกที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันอื่นทุกชนิด ซึ่งให้ผลผลิตน้ำมันดิบเฉลี่ย 4-5 ตันต่อเฮกตาร์ และอาจเพิ่มสูงขึ้นถึง 7-8 ตันต่อเฮกตาร์ (Biofuel, 2007 อ้างโดย กาญจนี, 2553) จึงทำให้ปาล์มน้ำมันกลายเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่มีการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ทั้งทางด้านอาหาร เครื่องสำอางและเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล ปริมาณความต้องการใช้น้ำมันปาล์มที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้มีการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มมากขึ้นซึ่งส่งผลต่อความต้องการกล้าปาล์มน้ำมันที่เพิ่มมากขึ้นด้วย

เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้ามซึ่งปกติมีการขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ดพันธุ์ และไม่สามารถขยายพันธุ์ด้วยวิธีไม่อาศัยเพศ จึงมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อประโยชน์ทางด้านการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ โดยในประเทศไทยเริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528 และประสบความสำเร็จในการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของต้นกล้าในปี พ.ศ. 2530 และในปี พ.ศ. 2535 สามารถชักนำเป็นพืชต้นใหม่ได้ (ธีระ, 2554) ปัจจุบันสามารถเพาะเลี้ยงส่วนของคัพภะและใบอ่อน ของปาล์มน้ำมัน ซึ่งสามารถชักนำการสร้างยอดใหม่ได้จำนวนมาก มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน โดยสมปองและคณะ (2530) จากต้นกล้าอายุ 195 วัน บนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นที่ให้ผลผลิตแล้วบนอาหารเติม 2, 4-D และ α-naphthaneacetic acid (NAA) เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มที่จะชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสได้ดี Karun และ Sajini (1996) ชักนำแคลลัสโดยเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันจากต้นกล้าพันธุ์ เทเนอรา และดูราอายุ 6 และ 18 เดือน บนอาหารสูตร ½ MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ระยะเวลาและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสแตกต่างกัน สำหรับพันธุ์เทเนอรามีการสร้างแคลลัส 7 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยง 150-180 วัน และพันธุ์ดูรามีการสร้างแคลลัส 10 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยง 100-120 วัน อาสลัน (2545) เพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นกล้าอายุ 1 ปี บนอาหารสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ dicamba เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 11.2 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเสท เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

การขยายพันธุ์ด้วยโซมาติกเอ็มบริโอเป็นการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศที่มีความสำคัญในพืชหลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการปกติทำได้ยาก เช่น ปาล์มน้ำมัน (Hilae and Te-chato, 2005) มะพร้าว (Chan *et al*., 1998) และอินทผลัม (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2001) เป็นต้น ซึ่งพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 4 ระยะ คือ เอ็มบริโอระยะรูปกลม รูปหัวใจ รูปทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง (สมปอง, 2539) โดยโซมาติกเอ็มบริโอจะพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้นั้นสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือต้องอาศัยปัจจัยต่าง ๆ ในการชักนำการงอกและพัฒนาโดยการชักนำและพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ มีการตอบสนองที่ไวต่อสภาพการวางเลี้ยง เช่น องค์ประกอบของอาหาร แสง อุณหภูมิ ลักษณะทางพันธุกรรม และชิ้นส่วนพืช (Fuentes *et al*., 2000) ซึ่งพืชแต่ละชนิดต้องการปัจจัยที่ใช้ในการชักนำที่แตกต่างกันออกไป ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันมีหลายปัจจัย เช่น แสง อุณหภูมิ ภาชนะที่เพาะเลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ลูกผสมเทเนอรา C3/77(25) เพื่อประโยชน์ทางด้านการขยายพันธุ์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากคัพภะแก่ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา C3/77(25) มาวางเลี้ยงบนอาหาร 6 สูตร คือ Y_3 ½ Y_3 MS ½ MS OPCM#1 และ OPCM#2 เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25x150 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารแข็งปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส อัตราการเกิดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

2. ศึกษาผลของ dicamba และ 2-iP ต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 เติม dicamba หรือ 2-iP ความเข้มข้น 0.1 0.3 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละสูตรอาหารเติมกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25x150 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารแข็งปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

ผลการทดลอง

1. ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า การเพิ่มน้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยบนอาหารสูตร MS สูงสุด 468 มิลลิกรัม รองลงมาคืออาหารสูตร OPCM#1 OPCM#2 Y_3 ½ Y_3 และ ½ MS ซึ่งให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 466 442 440 416 และ 416 มิลลิกรัม ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) เมื่อพิจารณาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า อาหารสูตร Y_3 ให้การตอบสนองดีที่สุด คือให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 12 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารสูตร OPCM#1 OPCM#2 MS Y_3 และ ½ MS ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 10 5 4 4 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อีกทั้งอาหารสูตร Y_3 ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 1.33 เอ็มบริโอต่อหลอด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (Table 1) โดยลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำบนอาหารสูตรต่าง ๆ มีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน คือ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ มีสีเหลือง (Figure 1)

Table 1 Effect of different culture media on embryogenic callus proliferation and somatic embryo induction after 3 weeks of culture.

Culture media	Fresh weight of EC (mg/tube)	Frequency of SE induction (%)	Mean number of SEs/tube
OPCM#1	466^{a}	10^{ab}	1
OPCM#2	442^{ab}	5^{b}	1
MS	468^{a}	4^{bc}	1
½MS	416^{b}	0^{c}	0
Y_3	440^{ab}	12^{a}	1.33
½ Y_3	416^{b}	4^{bc}	1
F-test	**	**	ns
C.V. (%)	5.69	57.50	47.14

ns = not significantly different according to DMRT

** = significant difference at $p \leq 0.01$ level

Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT

2. ผลของ dicamba และ 2-iP ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร Y_3 เติม dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 ไม่เติม dicamba หรือ 2-iP หรือเติมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติม 2-iP ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอาหารที่เติม dicamba และพบว่า 2-iP ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงสุด 42.95 เอ็มบริโอต่อหลอด รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 1 0.1 2 0.5 และไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 36.47 32.40 31.36 22.47 และ 17.30 เอ็มบริโอต่อหลอดตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) (Table 2) และเมื่อศึกษาระยะการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า 2-iP ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม (globular embryo: GE) เฉลี่ยสูงสุด 36.05 เอ็มบริโอต่อหลอด 2-iP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยง (haustorium embryo : HE) (Figure 2a) เฉลี่ยสูงสุด 7.71 เอ็มบริโอต่อหลอด 2-iP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยงที่มีการสร้างราก (Figure 2b) เฉลี่ยสูงสุด 3.5 เอ็มบริโอต่อหลอด

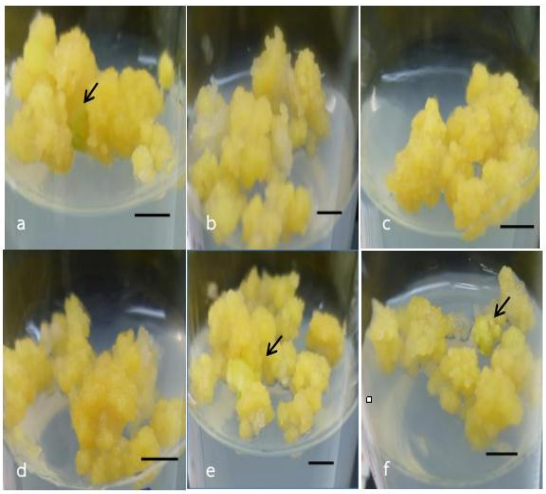


Figure 1 Characteristics of embryogenic callus and somatic embryo (arrow) on different culture media in combination with 0.1 mg/L dicamba after 3 weeks of culture (bar=0.5 cm).

a : OPCM#1 b : OPCM#2

c : MS d : ½ MS

e : Y_3 f : ½ Y_3

วิจารณ์ผล

สูตรอาหารเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากสูตรอาหารแต่ละชนิดมีองค์ประกอบของธาตุอาหารที่แตกต่างกันออกไป สำหรับการศึกษาในครั้งนี้สูตรอาหาร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การตอบสนองดีที่สุดในการเพิ่มน้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส สอดคล้องกับการรายงานของสกุลรัตน์ (2553) ที่สามารถเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัสได้สูงสุด 316.39 มิลลิกรัม บนอาหารสูตร MS หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน เมื่อ

Niha et al. (2017)

เปรียบเทียบการชักนำ โซมาติกเอ็มบริโอ ระหว่างอาหารสูตร MS และ Y_3 พบว่า อาหารสูตร Y_3 ให้การตอบสนองดีกว่าอาหารสูตร MS สูตรอาหาร Y_3 ให้อัตราการเกิดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดสูงกว่า สอดคล้องกับรายงานของ Luis และ Scherwinski-Pereira (2014) รายงานการวางเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะของ macaw palm เป็นเวลา 90 วัน พบว่าอาหารสูตร Y_3 ให้จำนวน โซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 7.0 เอ็มบริโอ สูงกว่าอาหารสูตร MS (2.5 เอ็มบริโอ) จากรายงานของ Eeuwen (1976) อ้างโดย Luis และ Scherwinski-Pereira (2014) พบว่าอาหารสูตร Y_3 เหมาะสมกว่าสูตรอาหาร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงมะพร้าวในหลอดทดลองอาจเนื่องมาจากพืชกลุ่มนี้ต้องการระดับของไอโอดีนและโพแทสเซียมสูง แต่ต้องการระดับของไนโตรเจนน้อย อาหารสูตร Y_3 จึงเหมาะสมกว่าสูตรอาหาร MS ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชที่อยู่ในตระกูลเดียวกับมะพร้าว อาหารสูตร Y_3 จึงอาจเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

Table 2 Effects of dicamba and 2-iP on somatic embryo induction after 3 weeks of culture.

PGRs (mg/L)		Frequency of SE induction (%)	Mean number of different stages of SEs/tube			Mean number of SEs/tube
dicamba	2-iP		GE	HE	HE + root	
-	-	100.00^{a}	14.95^{bcd}	3.25^{bc}	1.33	17.30^{d}
0.1	-	46.00^{bc}	2.40^{cd}	1.43^{c}	0.00	2.20^{e}
0.3	-	73.00^{ab}	1.91^{cd}	1.00^{c}	0.00	1.87^{e}
0.5	-	52.00^{bc}	2.43^{cd}	1.33^{c}	0.00	2.27^{e}
1	-	64.33^{bc}	3.27^{cd}	1.13^{c}	0.00	3.46^{e}
2	-	37.33^{c}	0.00^{d}	1.00^{c}	0.00	1.00^{e}
-	0.1	100.00^{a}	25.15^{ab}	6.60^{ab}	2.17	32.40^{abc}
-	0.3	100.00^{a}	36.05^{a}	6.53^{ab}	1.75	42.95^{a}
-	0.5	100.00^{a}	17.76^{bc}	4.40^{abc}	3.50	22.47^{cd}
-	1	100.00^{a}	28.06^{ab}	7.71^{a}	2.40	36.47^{ab}
-	2	100.00^{a}	24.57^{ab}	4.71^{abc}	2.90	31.36^{bc}
F - test		**	**	**	ns	**
C.V. (%)		19.73	51.06	62.34	93.38	45.24

ns = not significantly different according to DMRT

** = significant difference at p≤0.01 level

Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT

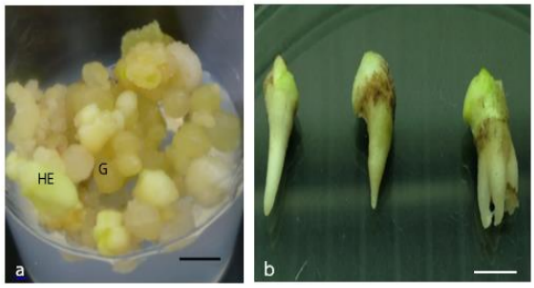


Figure 2 Somatic embryo on Y_3 medium after 3 weeks of culture (bar=0.5 cm)

a : somatic embryo in globular stage (GE) and haustorium stage (HE) on Y_3 in combination with 0.3 mg/L 2-iP

b : somatic embryo in haustorium stage with root on Y_3 in combination with 2 mg/L 2-iP.

นอกจากสูตรอาหารแล้วสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยเพิ่มความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออีกด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนเป็นปัจจัยภายในพืชที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ฮอร์โมนสองกลุ่ม คือ ออกซิน (dicamba) และไซโตไคนิน (2-iP) ออกซินและไซโตไคนินเป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ ส่งผลต่อการเพิ่มขนาดของเซลล์ ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตของพืชจะกระตุ้นการแบ่งเซลล์ซึ่งมีการกระตุ้นให้สังเคราะห์กรดนิวคลิอิกและโปรตีน (ชวนพิศ, 2544) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นไซโตไคนินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์และส่งเสริมการเกิดและเพิ่มปริมาณยอด สอดคล้องกับรายงานของ Mazri (2015) ที่พบว่า ไซโตไคนินมีความสำคัญในการกระตุ้นการเกิดและเพิ่มปริมาณยอด เนื่องจากชิ้นส่วนปลายยอดอินทผาลัมที่วางเลี้ยงบนอาหารปราศจากไซโตไคนินให้อัตราการเกิดยอดต่ำที่สุด สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ 2-iP ให้ผลดีกว่า dicamba คือให้อัตราการเกิดและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดสูงกว่าซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Banerjee (2013) ที่รายงานว่า 2-iP เป็นปัจจัยสำคัญต่อการชักนำตายอดในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงของ *Bauhinia variegata* และพบว่าอาหารเหลวสูตร MS เติม 2-iP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนตายอดสูงสุด 212.2 ยอด หลังวางเลี้ยง 60 วัน Jana และคณะ (2013) รายงานว่า การวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของ *Sophora tonkinensis* บนอาหาร MS เติม 2-iP ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ให้อัตราการชักนำยอดสูงสุด 75

เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน 5.0 ยอด Heikrujam และคณะ (2014) รายงานว่า หลังเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องของ *Callian tweedii* บนอาหารสูตร MS เติม 2-iP ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 16 สัปดาห์ สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดแรก (Primary somatic embryo: SE) ได้ 65 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำ SSE ได้ 19.44 เอ็มบริโอ หลังวางเลี้ยง SE เป็นเวลา 6 สัปดาห์

การศึกษาครั้งนี้อาจเป็นส่วนหนึ่งในการหาแนวทางที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง เพื่อผลิตต้นกล้าพันธุ์ดีที่มีลักษณะตรงตามความต้องการของเกษตรกรได้ต่อไปในอนาคต

สรุปผล

อาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคเฉลี่ยสูงสุด 468 มิลลิกรัม ส่วนอาหารสูตร Y_3 เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 12 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดสูงสุด 1.33 เอ็มบริโอ

อาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดสูงสุด 42.95 เอ็มบริโอ

อาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 468 มิลลิกรัม และอาหารสูตร Y_3 เติม 2-iP ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอซึ่งให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยต่อหลอดสูงสุด 42.95 เอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ สามารถนำมาปรับใช้สำหรับการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. ต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการทำวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติระยะที่ 2 และสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมันระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กาญจนี ทองเทพ. 2553. ปัจจัยทางกายภาพ และเคมีต่อการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชวนพิศ แดงสวัสดิ์. 2544. สรีรวิทยาของพืช. กรุงเทพฯ: บริษัท ธนธัชการพิมพ์ จำกัด.

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

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์. 2553. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. ดุษฎีนิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

สมปอง เตชะโต, พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, จรัสศรี นวลศรี และ วันทนา เอ้งย่อง. 2530. การชักนำแคลลัสปฐมภูมิในปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจาก ชิ้นส่วนใบอ่อน. วารสารสงขลานครินทร์ 8: 1-6.

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Al-Khayri, J.M. and Al-Bahrany, A.M. 2001. Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm *(Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulturae 89: 291-298.

Banerjee, P. 2013. *In vitro* plant regeneration of *Bauhinia variegata* Linn. through direct and indirect shoot bud development from different explants on MS solid and liquid media. Indian Journal Applied and Pure Biology 28: 181-192.

Chan, J.L., Saenz, L., Talavera, C., Hornung, R., Robert, M. and Oropeza, C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 17: 515-521.

Chew, T.L. and Bhatia, S. 2008. Catalytic processes towards the production of biofuels in a palm oil and oil palm biomass-based biorefinery. Bioresource Technology 99: 7911-7922.

Fuentes, S.R.L., Calheiros, M.B.P., Manetti-Filho, J. and Vieira, L.G.E. 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 5-13.

Gutierrez, L.F., Sanchez, O.J. and Cardona, C.A. 2009. Process integration possibilities for biodiesel production from palm oil using ethanol obtained from lignocellulosic residues of oil palm industry. Bioresource Technology 100: 1227-1237.

Heikrujam, M., Kumar, D., Kumar, S., Gupta, S.C. and Agrawal, V. 2014. High efficiency cyclic production of secondary somatic embryos and ISSR based assessment of genetic

fidelity among the emblings in *Calliandra tweedii* (Benth.). Scientia Horticulturae 177: 63-70.

Hilae, A. and Te-chato, S. 2005. Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Songklanakarin Journal of Science and Technology 27: 630-635.

Jana, S., Sivanesan, I. and Jeong, B.R. 2013. Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication of *Sophora tonkinensis*. Asia Pacific Journal of Tropical Biomedicine 3: 549-553.

Karun, A. and Sajini, K.K. 1996. Plantlet regeneration from leaf explants of oil palm seedlings. Current-Science 71: 922-926.

Luis, Z.G. and Scherwinski-Pereira, J.E. 2014. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 118: 485-496.

Mazri, M.A. 2015. Role of cytokinins and physical state of the culture medium to improve *in vitro* shoot multiplication, rooting and acclimatization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Boufeggous. Plant Biochemistry and Biotechnology 24: 268-275.

Mukherjee, I. and Sovacool, B.K. 2014. Palm oil-based biofuels and sustainability in Southeast Asia: A review of Indonesia, Malaysia and Thailand. Renewable and Sustainable Energy Reviews 37: 1-12.

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

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวชาคริยา นิหะ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5710620008

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2556

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

1. วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก สถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2
2. ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
3. ทุนสนับสนุนการผลิตบัณฑิต สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
4. ทุนเรียนดี ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
5. ทุนภายใต้ความร่วมมือ (MOU) ระหว่างคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กับมหาวิทยาลัยมิยาซากิ ประเทศญี่ปุ่น สนับสนุนเงินทุนจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ชาคริยา นิหะ สุรีรัตน์ เย็นช้อน และสมปอง เตชะโต. 2560. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 4(1): 25-30.