การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD และ SSR

Verification of somaclonal variation of oil palm embryogenic callus on solid and liquid medium by RAPD and SSR techniques

อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์[1,2] และ สมปอง เตชะโต[1,2*]

Anchalee Arthipatjaporn[1,2] and Sompong Te-chato[1,2*]

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของอาหารแข็ง และอาหารเหลวต่อความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็ง หรือในอาหารเหลวสูตร MS ซึ่งเติมไดแคมบาที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน โดยย้ายเลี้ยงทุกๆ เดือน เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า อาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มก./ล. ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งเฉลี่ยสูงสุด 0.333 กรัม และในอาหารเหลว 1.191 กรัม เมื่อนำเอ็มโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิดมาประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD และ SSR จากการใช้ไพรเมอร์ RAPD ทั้งหมด 8 ไพรเมอร์ พบว่า มี 6 ไพรเมอร์ คือ OPA-03 OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPR-11 และ OPT-06 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน ไม่พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ ส่วนไพรเมอร์ SSR ทั้ง 9 ไพรเมอร์ ก็ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน และไม่มีความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ จากการตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลทั้งสองวิธี ทำให้ทราบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารทั้งสองแบบไม่เหนี่ยวนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น

คำสำคัญ: ปาล์มน้ำมัน, เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส, RAPD, SSR

ABSTRACT: Effects of types of medium on somaclonal variation of the embryogenic callus of oil palm were investigated. The calli were cultured either on solidified or in liquidified MS medium supplemented with dicamba at different concentrations and subcultured at monthly intervals for 3 months. The results showed that the maximum growth of the callus at 0.333 gram fresh weight (gFW) and 1.191 gFW were obtained from the solidified and liquidified medium containing 0.1 mg/l dicamba, respectively. Verification of somaclonal variation in embryogenic callus raised on both types of culture media was detected by RAPD and SSR techniques. The RAPD technique revealed that 6 primers namely OPA-03, OPAB-01, OPAB-09, OPAB-14, OPR-11 and OPT-06 gave clear DNA patterns with monomorphic bands. In the case of SSR primers, all of them provided clear DNA patterns and high uniformity without somaclonal variation of embryogenic callus. The results obtained from this study suggest that there are no somaclonal variations in cultured calli using both solidified and liquidified media.
Keywords: Oil palm, embryogenic callus, RAPD, SSR

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

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding author: sompong.t@psu.ac.th/ stechato@yahoo.com

คำนำ

ปาล์มน้ำมันมีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกาจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีพื้นที่ปลูกส่วนใหญ่ทางตอนใต้ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี กระบี่ และ ชุมพร โดยกลุ่มหรือแบบเทเนอรานิยมปลูก เป็นการค้าเกิดจากการผสมข้ามระหว่างปาล์มน้ำมันแบบดูรากับพิสิเฟอรา มีเปลือกผลสำหรับอัดน้ำมันมาก กะลาบาง พบปริมาณน้ำมันประมาณ 22-25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักทะลายสด และมีจำนวนทะลายมากกว่าแบบดูรา (ศักดิ์ศิลป์ และคณะ, 2541) น้ำมันปาล์มมีคุณภาพสูงได้ประโยชน์ทั้งในแง่อุปโภคและบริโภค รวมทั้งการผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซล โดยทั่วไปปาล์มน้ำมันขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดพันธุ์ ทำให้ต้องผลิตเมล็ดพันธุ์เทเนอราตลอดเวลา หากปลูกโดยใช้เมล็ดพันธุ์ที่เก็บจากโคนต้นจะส่งผลให้ผลผลิตต่ำ ต้นกล้าที่ได้มีความหลากหลาย กระจายตัวสูง และที่สำคัญเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันเมื่อสุกแก่มีการพักตัว การเพาะเมล็ดต้องใช้เวลานานจนกว่าเมล็ดจะงอก และต้องผ่านกระบวนการเตรียมหลายขั้นตอนในการเพาะเมล็ด (Te-chato,1998) จึงจำเป็นต้องหาวิธีการขยายพันธุ์และเพิ่มจำนวนปาล์มน้ำมันอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีการหนึ่งเพื่อเพิ่มจำนวนต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันนั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ เช่น พันธุกรรมหรือสายพันธุ์ ชิ้นส่วน อายุพืช วัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง และสภาพของอาหารที่เพาะเลี้ยง (นิตย์ศรี, 2541) ทั้งนี้อาจชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เรียกว่า somaclonal variation ได้ (Matsumoto et al., 2006) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่ผ่านมาประสบผลสำเร็จ สามารถชักนำเป็นพืชต้นใหม่ได้ แต่พบลักษณะผิดปกติต่างๆ ที่เป็นผลมาจากความแปรปรวนทางพันธุกรรม เช่น ผลผิดปกติแบบแมนเทิล การแตกกอ การพัฒนาของดอกที่ยอด เกิดเฉพาะดอกตัวผู้ หรือดอกกระเทย (สมปอง, 2544) ลักษณะผิดปกตินี้เป็นการสังเกตทางสัณฐานวิทยาในแปลงปลูก หลังปลูกประมาณ 2-5 ปี ในปัจจุบันจึงมีการนำเอาเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลหรือดีเอ็นเอมาตรวจสอบความแปรปรวนของปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่ระดับเนื้อเยื่อ โดยไม่ต้องรอให้มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ นับว่าช่วยร่นระยะเวลาในการคัดเลือกพันธุ์ได้ (Jaligot et al., 2000) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ simple sequence repeat (SSR) สำหรับตรวจสอบความแปรปรวน เพื่อยืนยันว่าการใช้ระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะไม่ก่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในปาล์มน้ำมันต่อไป

วิธีการศึกษา

วัสดุพืช

แคลลัสซึ่งชักนำจากการเพาะเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราที่ให้ผลผลิตสูงถูกใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดยแคลลัสที่ชักนำได้เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติมไดแคมบาเข้มข้น 1.0 มก./ล. กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มก./ล. ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 ให้แสงความเข้ม 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 28±2 °ซ และดูแลโดยการย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 4 ปี ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ระยะเวลาทำการศึกษาเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2554

ศึกษาความเข้มข้นของไดแคมบาในอาหารแข็งและอาหารเหลว ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส/เซลล์ซัสเพนชั่น

ย้ายแคลลัสหนัก 0.1 และ 0.25 กรัม ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และอาหารเหลวตามลำดับ โดยใช้

อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มก./ล. ไดแคมบาเข้มข้น 0-1.0 มก./ล. ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 อาหารแข็งเติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ การวางเลี้ยงบนอาหารแข็งใช้หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มม. บรรจุอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 °ซ ให้แสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 14 ชั่วโมงต่อวัน ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอด และวางเลี้ยงในอาหารเหลวใช้ฟลาสก์ขนาด 125 มล. บรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที สภาพการวางเลี้ยงเช่นเดียวกับอาหารแข็ง ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ฟลาสก์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน โดยย้ายเลี้ยงทุกๆ เดือน จากนั้นชั่งน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นในอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 2 แบบ และตรวจสอบลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Te-chato (2000) โดยเก็บตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากอาหารแข็งและอาหารเหลว ตัวอย่างละ 50 มิลลิกรัมน้ำหนักสด ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. เติม TE บัฟเฟอร์ (Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 และ EDTA 0.1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และโซเดียมโดดิซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 20 ไมโครลิตร บดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 70 °ซ นาน 15 นาที เติมแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 110 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ -20 °ซ นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เมื่อเห็นสายดีเอ็นเอแล้ว เทไอโซโพรพานอลทิ้ง ล้างด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 2 ครั้ง เทเอธานอลทิ้ง ผึ่งให้แห้ง จากนั้นเติม TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ทราบขนาดที่แน่นอน) ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ผ่านกระแสไฟ 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ ประมาณ 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นนำไปตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เครื่องหมายโมเลกุล RAPD เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสตามวิธีการของ สายชล (2548) โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ที่มีองค์ประกอบ ดังนี้ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ จำนวน 8 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA-03 OPA-19 OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPB-08 OPR-11 และ OPT-06 ความเข้มข้นของแต่ละไพรเมอร์ 0.3 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร 10X บัฟเฟอร์ร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (dNTP) เข้มข้นชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* polymerase 1.5 ยูนิต ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 17.75 ไมโครลิตร สำหรับปฏิกิริยา PCR ที่ใช้มีดังนี้ ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 °ซ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยขั้นตอน Denaturation ใช้อุณหภูมิ 92 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที ต่อมาขั้นตอน Annealing ใช้อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน Extention ใช้อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 2 นาที ทั้ง 3 ขั้นตอนนี้ทำซ้ำทั้งสิ้น 39 รอบ ในขั้นตอนสุดท้าย

ใช้อุณหภูมิ 95 °ซ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 นาที และ 72 °ซ เป็นเวลา 10 นาที อีก 1 รอบ

เครื่องหมายโมเลกุล SSR ดำเนินการตรวจสอบตามรายงานของ Thawaro and Te-chato (2009) และ สกุลรัตน์ (2553) จำนวน 9 ไพรเมอร์ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 จากปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบ ดังนี้ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 20 นาโนกรัม ปริมาตร 1.8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละชนิดเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10X บัฟเฟอร์ร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เข้มข้น 0.5 ยูนิต ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (dNTP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 4.1 ไมโครลิตร สำหรับปฏิกิริยา PCR ที่ใช้มีดังนี้ ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 °ซ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยขั้นตอน Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที ต่อมา Annealing ที่อุณหภูมิ 52 °ซ เป็นเวลา 1 นาที และ Extention ที่อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 2 นาที ทั้ง 3 ขั้นตอนนี้ทำซ้ำทั้งสิ้น 35 รอบ และในขั้นตอนสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 8 นาที

การประเมินด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD

นำผลผลิต PCR มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE บัฟเฟอร์ ผ่านกระแสไฟ 100 โวลต์ ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ นำแผ่นเจลตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation บันทึกภาพและเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม

การประเมินด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR

หลังจากทำ PCR นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณมาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาทำให้เสียสภาพก่อน เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการเสียสภาพธรรมชาติในเวลาต่างกันเมื่ออยู่ในเจล โดยผสมกับฟอร์มาไมด์ 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบใน loading dry นำไปทำให้เสียสภาพที่อุณหภูมิ 95 °ซ แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแนวดิ่งเจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมแถบดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท โดยนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย fixative (acetic acid 10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 20 นาที เขย่าเบาๆ ล้างในน้ำกลั่น 20 นาที เปลี่ยนน้ำล้างใหม่แล้วล้างต่ออีก 10 นาที นำแผ่นเจลมาย้อมในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ หลังจากนั้นนำแผ่นเจลจุ่มน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว (5 วินาที) แล้วนำแผ่นเจลใส่ในสารละลาย developer [sodium carbonate 25 เปอร์เซ็นต์ (แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ) formaldehyde 40 เปอร์เซ็นต์ sodium thiosulfate 50 มก./ล.] เขย่าด้วยความเร็วสม่ำเสมอจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่สารละลายกรดอะซิติก (stop solution) นาน 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏระหว่างดีเอ็นเอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวเพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ผลการศึกษา

ผลของความเข้มข้นของไดแคมบาในอาหารแข็งและอาหารเหลว ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส/เซลล์ซัสเพนชั่น

น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น หลังจากการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมหรือเติมไดแคมบาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า หลังจากวางเลี้ยงในเดือนแรกการเจริญของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ทุกหน่วยการทดลองใกล้เคียงกัน เริ่มมีความแตกต่างกันหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนขึ้นไป (Figure 1) เมื่อย้ายเลี้ยงนาน 3 เดือน บนอาหารเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มก./ล. ให้การตอบสนองต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 0.333 กรัม แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (Table 1) แคลลัสมีลักษณะเป็นปมขนาดเล็ก เกาะกันหลวมๆ สีเหลืองถึงเหลืองเข้ม (Figure 2) ในขณะที่การวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันเติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มก./ล. ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 1.191 กรัม แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) (Table 1 และ Figure 1) แคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็ก เกาะกันแน่น แต่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่เติมไดแคมบาเป็นเวลา 2 เดือน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบางส่วนเกิดอาการตาย เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือสีดำ และไม่สามารถเจริญ และเพิ่มปริมาณต่อไปได้ (Figure 3) และเกิดลักษณะเช่นนี้กับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ไม่เติมไดแคมบาเป็นเวลา 3 เดือนขึ้นไป

Table 1 Growth rate of embryogenic callus cultured on the two difference types of culture media with dicamba for 3 months.

Dicamba (mg/l)	Fresh weight (g)	
	Solidified medium[1/]	Liquidified medium
0	0.279[ab]	0.718
0.1	0.333[a]	1.191
0.3	0.295[ab]	0.946
0.5	0.303[ab]	0.885
0.7	0.258[b]	0.848
0.9	0.261[b]	0.776
1.0	0.262[b]	0.764
F-test	*	ns
C.V. (%)	10.53	36.17

[1/] Means sharing letter in common within column are not significant difference by DMRT.

ns = not significant difference at $P>0.05$

* Significant difference at $P < 0.05$

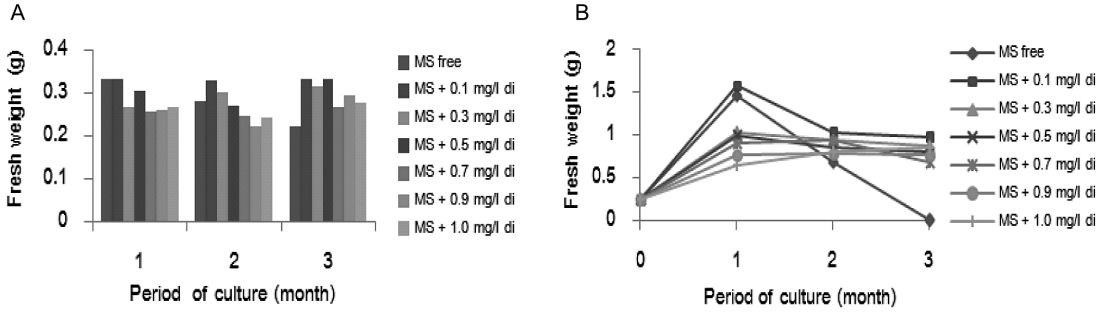

Figure 1 Fresh weight of embryogenic callus on two different types of culture media with dicamba. A: solidified medium, B: liquidified medium

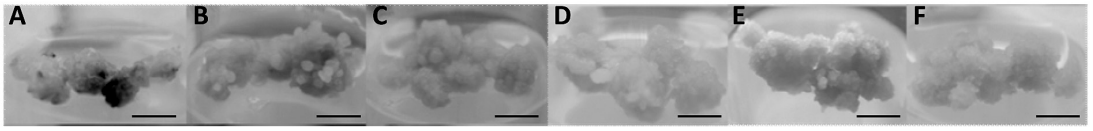

Figure 2 Characteristics of embryogenic callus on solidified MS medium with various concentrations of dicamba. (A: PGR-free MS medium, B: 0.1 mg/l, C: 0.3 mg/l, D: 0.5 mg/l, E: 0.7 mg/l, F: 1.0 mg/l dicamba containing MS medium) after 3 months of culture. (bar = 0.5 cm)

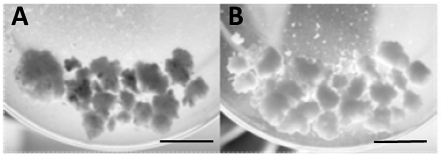

Figure 3 Characteristics of embryogenic cell suspension in liquid MS medium after 3 months of culture. A: PGR-free MS medium, B: 0.1 mg/l dicamba containing medium. (bar = 1.0 cm)

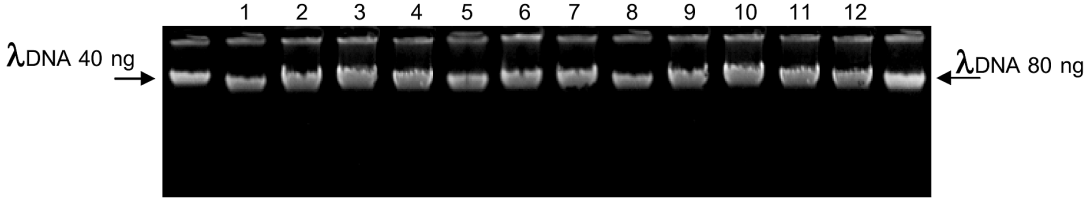

Figure 4 Genomic DNA from oil palm embryogenic callus cultured on two different types of culture media, solidified media (lane 1-6) and liquidified media (lane 7-12)

ผลของการสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างเอ็มบริโอเจนิคที่ได้จากการทดลองข้างต้น ตามวิธีของ Te-chato (2000) พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ครั้งละประมาณ 80-160 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (**Figure 4**) นำดีเอ็นเอที่สกัดมาเพิ่มปริมาณด้วยด้วยปฏิกิริยา PCR ต่อไป

การประเมินความแปรปรวนด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD

การใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 เบส จำนวน 8 ไพรเมอร์ ดังนี้ OPA-03 OPA-19 OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPB-08 OPR-11 และ OPT-06 พบว่า มี 6 ไพรเมอร์ คือ OPA-03 OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPR-11 และOPT-06 ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน สามารถนำไปใช้ในการประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว โดยที่แถบดีเอ็นเอของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารสองชนิดมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน (monomorphism) (**Figure 5**)

การประเมินความแปรปรวนด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR

การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSR จำนวน 9 ไพรเมอร์ คือ EgCIR0008 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0905 EgCIR0243 EgCIR0781 EgCIR0337 EgCIR1172 EgCIR0465 หลังจากเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR แล้ว นำมาตรวจสอบบนอะคริละไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า ไพรเมอร์สามารถให้แถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน

สามารถใช้ประเมินวิธีการในการตรวจสอบแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ โดยที่ไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้แถบดีเอ็นเอจำเพาะขนาด 500-600 คู่เบส (**Figure 6**) จากการตรวจสอบความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น

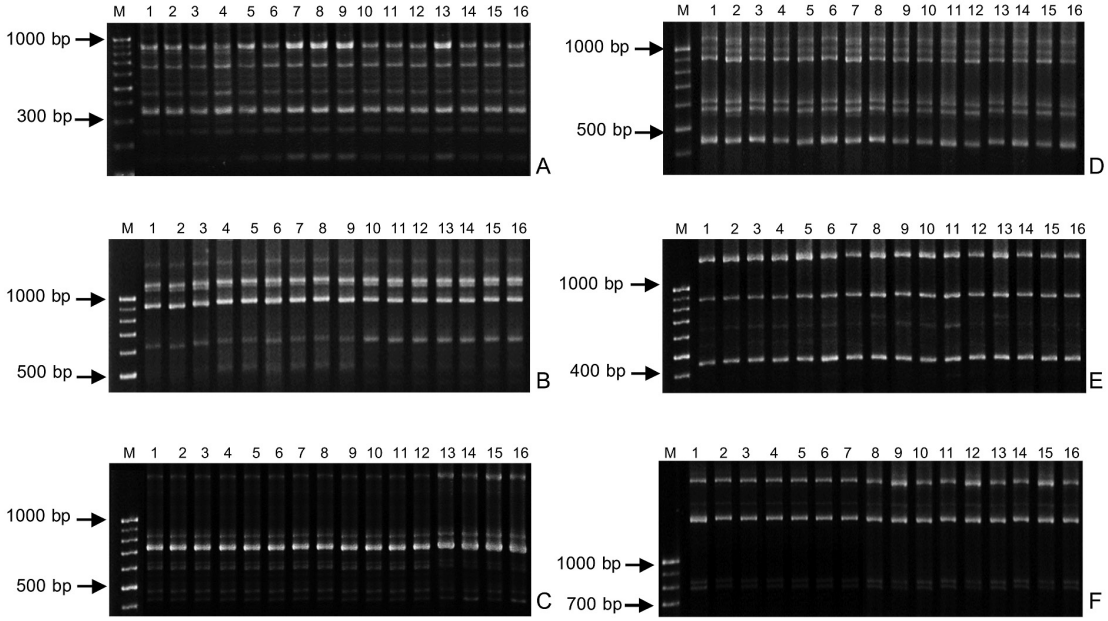

Figure 5 RAPD patterns of oil palm embryogenic callus cultured on solidified (lane 1-8) and liquidified MS medium (lane 9-16) amplified by primer OPA-03(A) OPAB-01(B) OPAB-09(C) OPAB-14(D) OPR-11(E) and OPT-06(F)

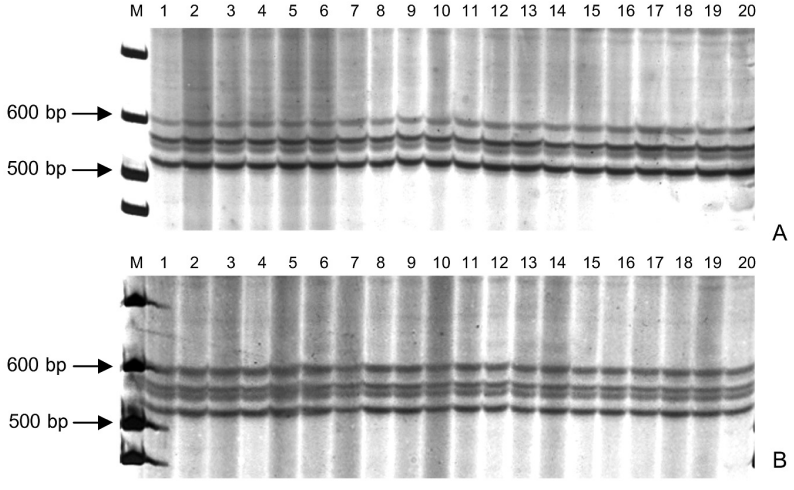

Figure 6 SSR patterns of oil palm embryogenic callus cultured on solidified culture medium (A) and liquidified media (B) obtained with primer EgCIR0008.

วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยใช้ชนิดอาหาร และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกัน ทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการตอบสนองที่แตกต่างกัน จากการศึกษาครั้งนี้ได้รับผลสำเร็จสามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา ให้การตอบสนองต่อการเพิ่มน้ำหนักสดได้ดีที่ไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มก./ล. ทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว โดยที่อาหารแข็งสูตร MS สามารถเพิ่มน้ำหนักสดได้ 3.33 เท่า สอดคล้องกับรายงานของเพ็ญติมาส (2552) ที่สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสของปาล์มน้ำมันบนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มก./ล. ได้สูงสุด 336 มิลลิกรัมน้ำหนักสด และสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวได้ 6 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง ในขณะที่การวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันสามารถเพิ่มได้ 4.764 เท่า ในสภาพที่มีการเขย่าตลอดเวลาเพื่อให้แลกเปลี่ยนอากาศหรือเป็นการเพิ่มออกซิเจนแก่เนื้อเยื่อพืชช่วยกระตุ้นให้เนื้อเยื่อดูดซึมสารอาหารและฮอร์โมนที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่า เมื่อวางเลี้ยงได้ระยะหนึ่งจำเป็นต้องมีการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อเนื่องจากสารอาหารลดน้อยลง อีกทั้งยังมีการปลดปล่อยของเสียจากเนื้อเยื่อพืชออกมาด้วย ซึ่งอาจส่งผลให้เนื้อเยื่อนั้นตายได้ นอกจากนี้พบว่า ออกซินชนิดไดแคมบาที่ความเข้มข้นต่ำ 0.1 มก./ล. ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ สำหรับการใช้ไดแคมบาที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 มก./ล. ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีเช่นเดียวกันเมื่ออายุการเพาะเลี้ยงนานขึ้น อาจเป็นเพราะว่าไดแคมบาที่ความเข้มข้นต่ำ 0.1-0.5 มก./ล. เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ และการลดความเข้มข้นของไดแคมบาลง ช่วยส่งเสริมกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Areca catechu* (Wang et al., 2006) ทั้งนี้ในอาหารที่เติมไดแคมบา 0.1 มก./ล. ชักนำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันเข้าสู่ระยะสุกแก่ได้เร็ว (Te-chato, 1998) จากการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา พบว่า ไดแคมบาส่งเสริมกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงในชั้น epidermis และ subepidermis (Te-chato et al., 2003) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลานาน 3 เดือน ส่งผลให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบางส่วนเกิดอาการตาย เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ หยุดการพัฒนาไม่สามารถเพิ่มปริมาณต่อไปได้ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไดแคมบานั้นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพิ่มปริมาณได้ดี มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดี สอดคล้องกับการศึกษาของซูไฮมิน (2551) ซึ่งรายงานว่าออกซินชนิดไดแคมบาส่งเสริมการชักนำแคลลัสได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับ 2,4-D และ NAA อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมันจากคู่ผสม D174xP206 ที่อายุ 5 เดือนหลังการผสม พบว่า 2,4-D ให้การตอบสนองต่อการชักนำแคลลัสได้สูงกว่าไดแคมบา แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 3 เดือน แคลลัสมีการสร้างสารประกอบฟีนอลออกมามาก ส่งผลให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หยุดการพัฒนาหรือหยุดการเจริญเติบโต ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารที่เติมไดแคมบา แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณ และไม่มีการเกิดสีน้ำตาลขึ้นกับเนื้อเยื่อ ดังนั้นไดแคมบาจึงเป็นออกซินที่มีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการชักนำแคลลัส การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัส และพัฒนาการของปาล์มน้ำมัน

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยเทคนิค RAPD และ SSR จากการใช้ 8 ไพรเมอร์สำหรับ RAPD มีประสิทธิภาพ เนื่องจาก ไพรเมอร์ OPA-03 OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPR-11 และ OPT-06 ให้ผลชัดเจน แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏสม่ำเสมอ และไม่มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าจากการใช้อาหารแข็งและอาหารเหลวเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม และไม่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในระดับดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์

เพียง 8 ไพรเมอร์ อาจยังไม่เพียงพอ เนื่องจากเทคนิค RAPD เป็นการจับกันของดีเอ็นเอแบบสุ่ม ซึ่งตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ไพรเมอร์ไปจับอาจแตกต่างกัน จากการศึกษาของสายชล (2547) ถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันทั้ง 3 แบบในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย คือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPAB-01 OPAB-09 OPAB-14 OPB-08 OPR-11 OPT-06 และ OPT-19 ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพันธุ์ โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 209 แถบ เฉลี่ย 29.85 แถบต่อไพรเมอร์ และเมื่อนำมาสร้างเดนโดรแกรมเพื่อหาความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม โดยใช้วิธี UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) จากโปรแกรม SPSS พบว่าปาล์มน้ำมันที่ปลูกในแถบภาคใต้ของประเทศไทยมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย ธนวดี และคณะ (2552) ได้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า ไพรเมอร์ OPAB-01 และ OPAB-09 ให้ความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอสูง และแถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็น monomorphism และไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ได้ Thawaro and Te-chato (2009) ใช้เทคนิคดังกล่าวตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มโอระยะรูปกลมของปาล์มน้ำมัน พบว่า ไพรเมอร์ OPT-06 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดขึ้น จากการใช้เทคนิค RAPD ที่กล่าวมาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในระยะต่างๆ ยังไม่พบความแปรปรวนเกิดขึ้น แต่หากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหรือแคลลัสในอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นสูงเป็นเวลานานอาจส่งเสริมให้เกิดความแปรปรวนขึ้นได้ อย่างไรก็ตามเพื่อความมั่นใจและยืนยันผลดังกล่าวจึงทำการประเมินด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากแหล่งเดียวกัน ตรวจสอบด้วย 9 ไพรเมอร์ และจากการศึกษา SSR ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมเช่นเดียวกัน ทั้ง 9 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน ไม่มีความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยที่ไพรเมอร์ EgCIR0008 มีลักษณะแถบดีเอ็นเอเป็นแบบ monomorphism สอดคล้องกับ สกุลรัตน์ (2553) รายงานการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อน การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันลูกผสมในระยะแคลลัสด้วยเทคนิค SSR พบว่า ไพรเมอร์ EgCIR0008 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน เป็นชนิด monomorphism และไม่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม แสดงว่าแคลลัสตรงตามพันธุ์ สามารถใช้ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปได้ Singh et al. (2007) รายงานว่า เทคนิค SSR สามารถแยกต้น ramet ที่ปะปนหรือเป็นพันธุ์ปลอมได้ เมื่อนำต้น ramet มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม พบว่า ให้รูปแบบดีเอ็นเอเหมือนเดิม บ่งบอกได้ว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม

สรุป

อาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.1 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิค 200 มก./ล. สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 0.333 กรัม ในอาหารแข็ง และ 1.191 กรัม ในอาหารเหลว หลังจากวางเลี้ยง 3 เดือน อาหารทั้งสองชนิดให้ลักษณะแคลลัสเป็นกลุ่มค่อนข้างกลม เป็นปมเกาะกันหลวมๆ สีเหลืองถึงเหลืองเข้ม

การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระยะเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงคัพภะลูกผสมเทเนอรา ที่ผ่านการย้ายเลี้ยงมาเป็นเวลานาน 4 ปี แล้วนำมาเพิ่มปริมาณในอาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกันสองชนิดไม่พบความแปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นจากระบบการเพาะเลี้ยง เมื่อประเมินด้วยเทคนิค RAPD และ SSR

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาพืชศาสตร์ สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

ซูไฮมิน เจ๊ะมาลี. 2551. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทอเนอราโดยการเพาะเลี้ยงคัพภะ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

ธนวดี พรหมจันทร์, อาสลัน หิเล และสมปอง เตชะโต. 2552. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใยอ่อนของปาล์มน้ำมัน. วารสารเกษตร 25: 211-28.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2541. พันธุศาสตร์พืช. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์. กรุงเทพฯ.

เพ็ญติมาส กระมุท. 2552. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชันและการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

ศักดิ์ศิลป์ โชติสกุล,วินาภรณ์ กูฎีรัตน์และกิจจารักษ์ วงษ์กุดเลาะ. 2541. ปาล์มน้ำมัน. กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงศ์. 2553. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

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

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

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

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

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

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

Te-chato, S. 1998. Fertile plant from young leaves-derived somatic embryo of oil palm. Songklanakarin J. Sci. Technol. 20:7-13.

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

Te-chato, S., A. Hilae, and I. Yeedum. 2003. Histological study on oil palm of somatic embryos development as affected by sources of leaf explants and auxin. J. Agric. Sci. 36:243-250

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

Wang, H. C., J. T. Chen, and W. C. Chang. 2006. Somatic embryogenesis and regeneration from leaf root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. Biol. Plantarum. 50:279-282.