

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้า ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน

Genetic Variation Analysis of Oil Palm Plantlet from Young Leaf Tissue Culture

ธนวดี พรหมจันทร์^{1/} อาสลัน ฮิเล^{1/} และ สมปอง เตชะโต^{1/}
Thanawadee Promchan^{1/}, Aslan Hiae^{1/} and Sompong Te-chato^{1/}

Abstract: Detection of genetic variation in oil palm plantlets cultured from young leaf tissue by isozyme technique revealed that esterase-based system gave the best result. The ratio to leaf tissues and extraction buffer at 1:5 was proved to give the best resolution of enzyme patterns. The esterase-based system gave 5 clearly uniform bands of the regenerants. The RAPD technique using OPAB-09 and OPAB-01 also gave uniformity and monomorphism of DNA patterns. The technique could be used to detect both *in intro* and *ex vitro* plantlet variation. In conclusion, propagation of oil palm ortet through culturing of young leaf gave uniformity of plantlets.

Keywords: Oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq., analysis of variant, RAPD, isozyme

บทคัดย่อ: การตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) ที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ พบว่า อัตราส่วนของชิ้นส่วนพืชต่อบัฟเฟอร์สกัดที่เหมาะสมสำหรับสกัดเอนไซม์จากใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคือ 1:5 ระบบเอนไซม์เอสเทอเรส เป็นระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดในการทดสอบความสม่ำเสมอของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยสามารถย้อมติดสีเอนไซม์ชัดเจนและได้แถบเอนไซม์สูงสุด 5 แถบ รูปแบบของไอโซไซม์ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนการตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPAB-09 และ OPAB-01 ให้ความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอสูง ซึ่งแถบที่ได้มีลักษณะเป็น monomorphism จึงสามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าทั้งในและนอกหลอดทดลอง ดังนั้น การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นที่ให้ผลผลิตดี สามารถผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีความสม่ำเสมอสูง

คำสำคัญ: ปาล์มน้ำมัน *Elaeis guineensis* Jacq. ตรวจสอบความแปรปรวน อาร์เอฟดี ไอโซไซม์

^{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, Thailand

คำนำ

ปาล์มน้ำมันที่เพาะปลูกในปัจจุบันเป็นแบบ เหนือรา ซึ่งเป็นลูกผสมเฮเทอไรซัสที่ได้จากการผสมข้าม ระหว่างดูรากับพิลีเฟอราเท่านั้น จึงไม่สามารถเก็บเมล็ด ได้ต้นไปขยายพันธุ์ได้ (เปรมปรี, 2549) การซื้อต้นพันธุ์ จากต่างประเทศ หรือการลักลอบนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ในรูปแบบของเมล็ดงอกมีความเสี่ยงสูงมาก เนื่องจาก ความผิดพลาดในการผลิตเมล็ดพันธุ์หรือการปลอมปน โดยตั้งใจ นอกจากนี้ยังเสี่ยงต่อโรค แมลงที่อาจติดมากับ เมล็ดหรือต้นกล้า ทำให้ต้องสูญเสียเงินตราในการซื้อ พันธุ์ปาล์มเป็นจำนวนมาก เนื่องจากมีราคาค่อนข้างสูง (สุจินต์ และคณะ, 2530) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของ ปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตสูง จึงเป็นแนวทางสำคัญ ในการผลิตต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี ในประเทศมาเลเซีย มีรายงานการนำต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน มาปลูกทดสอบมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 โดยงานส่วนใหญ่ ดำเนินการโดยหน่วยงานของเอกชนได้แก่ นิคมพัฒนา ที่ดินสร้างตนเอง และบริษัทอะโกรคอม ในกรณีของ บริษัทอะโกรคอมได้ร่วมมือกับกลุ่มผู้ปลูกปาล์มน้ำมัน ปลูกปาล์มน้ำมันมากกว่า 100 ไร่ในพื้นที่กว่า 9,000 ไร่ ในหลายสภาพแวดล้อมและหลายสภาพปลูกทั่วประเทศ มาเลเซีย ซึ่งพบการกลายพันธุ์เพียง 1 เปอร์เซนต์ (Khaw and Ng, 1999) ซึ่งลักษณะการกลายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถ ที่จะดูจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏ (phenotype) ได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องนำเทคนิคทางด้านโปรตีน และการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบ ความแปรปรวนของต้นที่ได้เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้อง ทางพันธุกรรมของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อสร้างความมั่นใจให้กับเกษตรกรที่จะนำไปปลูกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ใช้ใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีอายุ 10 ปี จากสถานีวิจัยเทพา อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา แช่ในแอลกอฮอล์ 70% พร้อมเขย่าเป็นเวลา 1 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์เข้มข้น 20% ร่วมกับทวิน-20

2-3 หยดต่อสารฟอกฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฟาส์แล้ว 3 ครั้ง ตัดแบ่ง ใบอ่อนปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำไป เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ภายใต้ภายใต้การให้แสง ความเข้ม 1,300 ลักซ์ อุณหภูมิ 26 ± 4 องศาเซลเซียส โดยย้ายเลี้ยงทุก ๆ 1 เดือน เป็นระยะเวลา 3-4 เดือน

การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตร MS เติบโตแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซนต์ ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซนต์ ความ เป็นกรดต่างของอาหารเท่ากับ 5.7 มาชักนำให้ เกิดการ พัฒนาของไซมาติกเอ็มบริโอ ในระยะต่าง ๆ เป็นเวลา 3-4 เดือน หลังจากนั้นคัดเลือกระยะสร้างจาวไปชักนำไซมาติก เอ็มบริโอชุดที่สอง(secondary somatic embryo, SSE) ในอาหารสูตรชักนำ SSE (MS ที่สูตรเดิมแต่เปลี่ยนมาใช้ น้ำตาลซูโครสพิทอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์) เป็นเวลา 4 เดือนก่อนนำไปชักนำการงอกเป็นต้นกล้าในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 1-2 เดือน ย้ายต้นกล้าที่มีรากสมบูรณ์นำไปอนุบาลใน โรงเรือนพรางแสง

การอนุบาลต้นกล้าลงปลูก

นำต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีรากเพียง 1-2 ราก มาล้างรากที่ติดมากับรากให้สะอาดเพื่อป้องกันรากเน่า หลังจากนั้นย้ายไปปลูกในวัสดุปลูกครอบต้นกล้าด้วย ขวดใสขนาด 8 ออนซ์ หรือพลาสติกใส เป็นเวลา 1 เดือน โดยหลังจากครอบต้นกล้าเป็นเวลา 2 สัปดาห์แล้วให้นำ วัสดุครอบออก

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้ เทคนิคไอโซไซม์ สุ่มตัวอย่างใบ (ใบที่ 1 และ 2 นับจาก ยอด) ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน (ระบบเอนไซม์ละ 30 ต้น คิดเป็น 10 เปอร์เซนต์ของจำนวนต้นที่ชักนำได้) มาบดให้ ละเอียดภายในโกร่งเย็น เติมน้ำบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ (Extraction buffer) ดัดแปลงตามวิธีการของ ัญญาพร

(2547) ในปริมาณต่าง ๆ คือ 5, 10 และ 30 เท่า ของ น้ำหนักใบ จากนั้นจึงดูดของเหลวที่ได้จากการสกัดข้างต้น เทใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น ดูดส่วนใส (supernatant) ที่อยู่ส่วนบนมาใส่หลอด ไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ที่สะอาด นำส่วนใสข้างต้น มาแยกเอนไซม์ผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้นอะคริลไมด์ 30% electrode บัฟเฟอร์ ชนิดไม่ต่อเนื่อง (discontinuous) ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลมาเชื่อมสไลด์เอนไซม์ 8 ระบบ คือ เอสเทอร์ส (EST) เปอร์ออกซิเดส (PER) แอสิดฟอสฟาเทส (ACP) แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ADH) ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส (PGI) ฟอสโฟกลูโคมิวเทส (PGM) มาเลตดีไฮโดรจีเนส (MDH) และชิกิเมตดีไฮโดรจีเนส (shDH) โดยการย้อมสี เอนไซม์ทำในสภาพมืด ภายใต้สภาพเขย่าบนเครื่องเขย่า 80 รอบต่อนาที รอจนเห็นแถบเอนไซม์ชัดเจนหรือแถบสี คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ตรวจสอบรูปแบบของ zymogram เปรียบเทียบกัน ระหว่างต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้น เลือกระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษาข้างต้น มาตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ในหลอดทดลองจำนวน 50 ต้น และต้นกล้านอกหลอด ทดลองจำนวน 8 ต้น เปรียบเทียบความแตกต่างของ zymogram ของต้นกล้าแต่ละต้น

การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้ เทคนิคอาร์เอพีดี

การสกัดดีเอ็นเอ สุ่มตัวอย่างใบ (ใบที่ 1 และ 2 นับจากยอด) ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อ จำนวน 10-20 ต้น (คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนต้นที่ชักนำได้) มาสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลง วิธีการของ Doyle and Doyle (1990) ดังนี้ คือ เติม polyvinyl pyrrolidone ขนาดโมเลกุล 40,000 ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ใช้ใบประมาณ 200 มิลลิกรัม น้ำหนักสด ตัดใส่ ในโกร่ง เทโนโดรเจนเหลว บดให้ละเอียด ตักใส่หลอด ไมโครเซนติฟิวจ์ ที่บรรจุ CTAB บัฟเฟอร์ (พอลิไวนิลไพโร- ลิโดน 40 ไฮเดียมคลอไรด์ กรดเอซิลีนไดอะมีนเตตราอะซิติก

0.5 โมลาร์ ความเข้มข้นต่าง 8.0 เอทิลเอทิลไดรเมทิล แอมโมเนียมโบรไมด์ 2 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับ β -mercapto ethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับไปมาทุก 10 นาที เติมนคลอโรฟอร์ม 800 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงใช้ ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ได้ สารละลายที่แยกชั้นใสส่วนบน ดูดสารละลายเฉพาะส่วน ใสใส่หลอดเอพเพนดอร์ฟใหม่ เติมนไอโซโพรพานอล 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ หรือ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการแช่เย็น จำนวน 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE บัฟเฟอร์ 70 ไมโครลิตร [10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA] ที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่า จะนำมาใช้

วิธีการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ ตรวจสอบ ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ มาตรฐาน (Promega) โดยการทำ อิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรส (LE Agarose; Promega, USA) เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทิลโบรไมด์ (10 μ g/ μ l) แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตามวิธีการของสายซล (2547) โดยการทำพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ไพรมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ (ไพรมอร์ ได้แก่ OPB-08, OPR-11, OPT-06, OPT-19, OPAB-01, OPAB-09 และ OPAB-14) 10X บัฟเฟอร์ปริมาณ 2.5 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ ดีออกซินิวคลีโอไทด์มิกซ์ (dNTPs mix) เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ Taq polymerase 1.5 ยูนิต ตั้งอุณหภูมิเป็น 3 ระดับ คือ อุณหภูมิเริ่มต้นใช้

อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวนทั้งสิ้น 39 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาทีอีก 1 รอบ

การตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมาแยกแแถบ โดยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ใช้ agarose ความเข้มข้น 1.5 % ในสารละลาย TBE buffer นาน 40 นาที แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ย้อมแแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide (EtBr) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร นำแผ่นเจลส่องดูภายใต้แสง UV บันทึกภาพ เปรียบเทียบแแถบ ดีเอ็นเอที่ปรากฏ

ผลการศึกษา

การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

จากการนำใบของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองอายุ 6 เดือนหลังชักนำการงอก มาสกัดเอนไซม์ด้วย Extraction buffer ในสัดส่วนต่างๆ แล้วตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ 8 ระบบ พบว่า ตัวอย่างพืชต่อ Extraction buffer ในสัดส่วน 1 : 5 ให้รูปแบบของ Zymogram และความชัดเจนของแแถบเอนไซม์ดีที่สุด การเจือจางตัวอย่างด้วย Extraction buffer สูงกว่านี้ (1:10) ไม่สามารถตรวจสอบรูปแบบของ Zymogram ได้ โดยเฉพาะระบบ ADH PGI PGM MDH และ shDH (ตารางที่ 1) แม้ว่าสัดส่วนของตัวอย่างพืชต่อ Extraction buffer 1 : 5 ย่อมให้รูปแบบ Zymogram จากทุกระบบที่ตรวจสอบ แต่คงมีเพียง 3 ระบบเท่านั้นที่มีความชัดเจน คือ ACP (ภาพที่ 1A) PER (ภาพที่ 1B) และ EST (ภาพที่ 1C) และสามารถตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ โดยระบบ EST ให้รูปแบบ (แแถบ) เอนไซม์ 2 โซน ให้จำนวนแแถบเอนไซม์มากที่สุดทั้งหมด 5 แแถบ โดยโซนที่ 1 (EST1) มีแแถบเอนไซม์ 2 แแถบ และโซนที่ 2 (EST2) มีแแถบเอนไซม์ 3 แแถบ (ตารางที่ 1 ; ภาพที่ 1 C) จึงเป็นระบบเอนไซม์

ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง

การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD

จากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 7 ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ OPAB-09 ที่ให้แแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนที่สุด รองลงมาคือ OPAB-01 สามารถที่จะนำมาใช้ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมต้นกล้าที่พัฒนาจาก SSE ได้ ในกรณีไพรเมอร์ OPB-08, OPR-11, OPT-06, OPT-19 และ OPAB-14 ไม่สามารถ amplify จากทุกตัวอย่าง จึงไม่นำมาใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม (ตารางที่ 2)

การใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD พบว่าไพรเมอร์ที่ให้ผลคมชัดของดีเอ็นเอมากที่สุด คือ OPAB-09 รองลงมา คือ OPAB-01 และ OPT-06 ส่วนไพรเมอร์ที่ไม่ปรากฏแแถบดีเอ็นเอ คือ OPT-19 และไม่พบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 2 และ 3)

วิจารณ์

การใช้เทคนิคไอโซไซม์เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคไอโซไซม์มาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองเท่านั้น Wemer (1992) อ้างโดย อรุณา (2550) รายงานว่าพืชแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อระบบเอนไซม์ในแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังนั้นในเบื้องต้นได้ศึกษาระบบเอนไซม์รวมทั้งสิ้น 8 ระบบ อย่างไรก็ตาม มีระบบเอนไซม์เพียง 3 ระบบเท่านั้นที่สามารถย้อมติดสีได้ชัดเจนได้แก่ แอซิดฟอสฟาเทส เปอร์ออกซิเดส และเอสเตอเรส ระบบเอนไซม์ 3 ระบบดังกล่าวให้จำนวนแแถบเอนไซม์ที่แตกต่างกัน โดยระบบเอสเตอเรสสามารถย้อมติดสีเอนไซม์ได้ชัดเจนสูงสุด 5 แแถบ ดังนั้นจึงเป็นระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน รัญญาพร (2547) ศึกษาเอนไซม์ต่างๆ

Table 1 Effects of the ratio of leaf and extraction buffer and enzyme system on zymogram patterns for evaluation of somaclonal variation in oil palm tissue culture.

Enzyme system	Leaf sample:extraction Buffer	Zymogram patterns	No. of band appear	Staining quality
EST	1:5	2	5	+++
ACP		2	4	+++
PER		1	1	+++
ADH		-	-	-
PGI		1	1	+
PGM		1	1	+
MDH		1	1	+
shDH		1	1	+
EST	1:10	2	5	++
ACP		2	4	++
PER		1	1	+++
ADH		Nd	Nd	Nd
PGI		Nd	Nd	Nd
PGM		Nd	Nd	Nd
MDH		Nd	Nd	Nd
shDH		Nd	Nd	Nd
EST	1:30	1	3	+
ACP		1	2	-
PER		1	1	+++
ADH		Nd	Nd	Nd
PGI		Nd	Nd	Nd
PGM		Nd	Nd	Nd
MDH		Nd	Nd	Nd
shDH		Nd	Nd	Nd

PER: Peroxidase

EST: esterase

ACP: acid phosphatase

MDH: malate dehydrogenase

PGI: phosphoglucoisomerase

PGM: phosphoglucomutase

ADH: Alcohol dehydrogenase

ShDH: shikimate dehydrogenase

+++ : Good staining

++: Moderate staining

+ : Poor staining

- :Cann't stain

Nd : Not detect

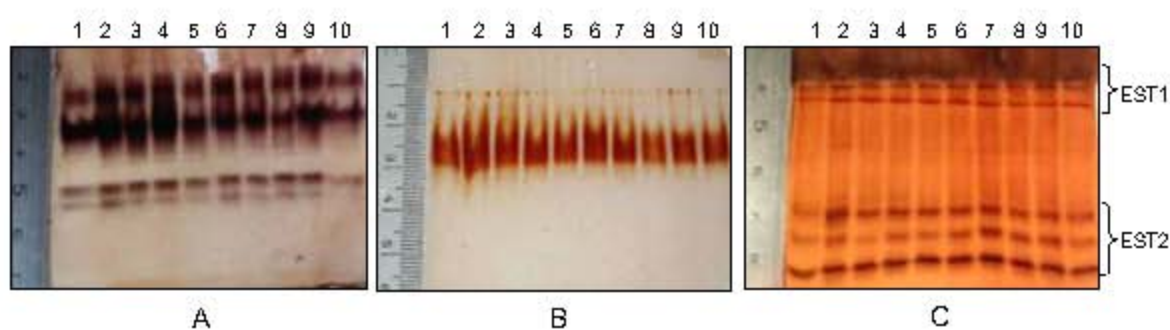


Figure 1 Zymogram patterns of young leaves of oil palm somaclone (lane 1-9) through somatic embryogenesis. (A) ACP: acid phosphates, (B) PER: peroxidase and (C) EST: esterase

Table 2 RAPD primers used for evaluation of somaclonal variation of oil palm seedlings derived from somatic embryogenesis on MS medium supplemented with 3% sucrose, 1 mg/l dicamba, 200 mg/l ascorbic acid and 0.75% agar.

Primers	Sequence 5' → 3'	Amplification
OPAB-09	GGGCGACTAC	++++
OPAB-01	CCGTCGGTAG	+++ -
OPT-06	CAAGGGCAGA	++ - -
OPR-11	GTAGCCGTCT	++ - -
OPAB-14	AAGTGCGACC	+ - - -
OPB-08	GTCCACACGG	+ - - -
OPA-19	GTCCGTATGG	- - - -

++++ Good amplification

+++ - Fair amplification

++ - - Moderate amplification

+ - - - Poor amplification

- - - - No amplification

เพื่อใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนของหน้าวัวในหลอดทดลอง พบว่า ระบบเอนไซม์เอสเทอเรสเป็นระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบความแปรปรวนของหน้าวัวในหลอดทดลอง โดยให้ การติดสีและการกระจายตัวของแถบเอนไซม์ดีที่สุด สามารถใช้ระบบเอนไซม์ดังกล่าวตรวจสอบความแปรปรวน

ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง (6 เดือน และ 1 ปี หลังจากงอก) และต้นกล้าที่อนุบาลเป็นเวลา 6 เดือน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) สำหรับชิ้นส่วนใบนอกหลอดทดลองนั้น แม้สามารถย้อมติดสีได้ก็ตาม แต่ไม่เหมาะสมมากนัก เนื่องจากอาจมีการปนเปื้อนของสิ่งสกปรกในสภาวะนอกหลอดทดลองมากกว่าทำให้แถบเอนไซม์ที่ได้มีลักษณะ

ขึ้นแยกความแตกต่างของแถบเอนไซม์ได้ไม่ชัดเจน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) นอกจากนี้ใบจากนอกหลอดทดลองมีความแข็งแรงและมีเส้นใยมากกว่าใบในหลอดทดลองมาก ทำให้สกัดเอนไซม์ยาก อย่างไรก็ตามสามารถแก้ไขได้โดยใช้ไนโตรเจนเหลวบดตัวอย่างพืชก่อนนำไปสกัดเอนไซม์ (จิไลวรรณ และอมรรัตน์, 2533) เหตุผลที่เลือกชิ้นส่วนใบ (ใบที่ 1 และ 2) เป็นแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่นำมาตรวจสอบความแปรปรวนเนื่องจาก ชิ้นส่วนดังกล่าวถือเป็นตัวแทนของต้นกล้าแต่ละต้นอย่างแท้จริง และต้นกล้าไม่เกิดความเสียหาย สามารถติดตามผลการเปลี่ยนแปลงจนถึงระยะการให้ผลผลิตได้สัดส่วนของบัพเฟอร์สกัดต่อชิ้นส่วนพืชเป็นปัจจัยหลักต่อความชัดเจนในการตรวจสอบ นอกจากนี้พบว่า น้ำหนักใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันนั้นถือว่าน้อยมาก ดังนั้นควรใช้อัตราส่วนของตัวอย่างใบกับบัพเฟอร์อย่างเหมาะสม อัตราส่วนของชิ้นส่วนใบต่อบัพเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดคือ 1:5 หากใช้อัตราส่วนของบัพเฟอร์สกัดที่น้อยกว่านี้ ส่งผลให้ไม่สามารถเก็บของเหลวที่สกัดได้เลย เนื่องจากใบของปาล์มน้ำมันมีปริมาณน้ำในใบน้อย ในทางตรงกันข้ามหากใช้อัตราส่วนของตัวอย่างพืชและบัพเฟอร์สกัดที่สูงกว่า 1:5 ส่งผลให้เอนไซม์ที่สกัดได้เจือจางลงทำให้การติดสีของเอนไซม์น้อยแม้จะใช้ระบบที่เหมาะสมก็ตาม ส่วนการตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD พบว่า ไม่พบความแปรปรวนของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่ Rival *et al.* (1998) ได้ใช้เครื่องหมาย RAPD เพื่อตรวจสอบ somaclonal variants ในปาล์มน้ำมันลักษณะเป็นแมนเทิลเพื่อความมั่นใจก่อนนำไปปลูก ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ต้นแม่และต้นลูกที่ได้จากกระบวนการชักนำไซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน โดย Toruan-Mathius *et al.* (2001) ได้ทำการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างต้นปกติกับต้นที่มีความผิดปกติ ของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า ไพโรเมอร์ OPC-07, OPC-09, OPW-19 และ SC10-19 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นจาก 16 สายพันธุ์ได้ 0.47-0.96% โดยเฉพาะโคลน MK176 มีการตอบสนองคงที่ ในขณะที่ไม่มีรูปแบบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อการตรวจสอบลักษณะความผิดปกติได้

สรุป

อัตราส่วนของชิ้นส่วนพืชต่อบัพเฟอร์สกัดที่เหมาะสมสำหรับสกัดเอนไซม์จากใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคือ 1:5 ระบบเอนไซม์เอสเทอร์ส เป็นระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดในการทดสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยสามารถย้อมติดสีเอนไซม์ชัดเจน และแถบเอนไซม์สูงสุด 5 แถบ รูปแบบของไอโซไซม์ดังกล่าวนี้มีความสม่ำเสมอ ไม่มีความแปรปรวนของต้นกล้าทั้งในและนอกหลอดทดลอง สำหรับการตรวจสอบโดยการใช้เทคนิคอาร์เอฟดี จากต้นที่ผ่านการชักนำพืชต้นใหม่ด้วยวิธีการเดียวกัน ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนบางส่วนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

- เปรมปรี ณ สงขลา. 2549. ผู้ยิ่งใหญ่แห่งปาล์มน้ำมัน. ว. เคนการเกษตร 11: 76-98.
- ธัญญาพร สุสานนท์. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน้าวัว (*Anthurium* spp.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 57 หน้า.
- จิไลวรรณ ชาติเกียรติ และอมรรัตน์ พงศ์ดารา. 2533. การศึกษาโปรตีนและไอโซไซม์ในสารสกัดปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนรา. ว.สงขลานครินทร์ 12(1): 21-28.
- สายชล จันมาก. 2547. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแหล่งเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) โดยเทคนิคอาร์เอฟดี

- (Random Amplified Polymorphic DNA).
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 72 หน้า.
สุจินต์ จินายน ประเสริฐ ชิตพงศ์ พรชัย เหลืองอาภาพงศ์
ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และสมปอง เตชะโต.
2530. ภาวะ ปัญหา และแนวทางแก้ไขการขาด
แคลนต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีในประเทศไทย.
ว.สงขลานครินทร์ 9(1): 105-110.
อรอุมา บุญมี. 2550. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยน้ำว้า
[*Musa* (ABB group)] และความแปรปรวนทาง
พันธุกรรม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์,
สงขลา. 49 หน้า.
Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant
DNA from fresh tissue. Focus 12: 13 – 15.
Khaw, C.H. and S.K. Ng. 1999. Agrocom's proven
tissue culture technology for oil palm. Paper
presented at the Special Meeting on
Potential of the Oil Palm Industry and Clonal
Tissue Cultured Oil Palm Development in
South Thailand. 6 November 1999, Meritime
Hotel, Krabi, Thailand. 10 pp.
Rival, A., L. Bertrand, T. Beulé, M.C. Combes, P.
Trousot and P. Lashermes. 1998. Suitability
of RAPD analysis for the detection of
somaclonal variants in oil palm (*Elaeis
guineensis* Jacq.) Plant Breeding 117(1):
73-76.
Toruan-Mathius, N., S. I. I. Bangun. and Maria-
Bintang. 2001. Analysis abnormalities of oil
palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from tissue
culture by random amplified polymorphic
DNA (RAPD). Menara Perkebunan 69(2):
58-70.
-