บทคัดย่อ

T 163907

การชักนำให้เกิดคัพภะร่างกายของมะละกอพันธุ์แขกดำโดยการนำใบเลี้ยงจากต้นอ่อนที่มีอายุ 4 สัปดาห์ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง ½ MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีกลูตามีน 400 มก/ล adenine sulfate 80 มก/ล Sodiumdihydrogenphosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$) 170 มก/ล น้ำมะพร้าว 15% น้ำตาลซูโครส 60 ก/ล และ 2,4-D 15 มก/ล ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ ได้รับความเข้มแสง 1,000 ลักซ์จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนท์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าเนื้อเยื่อใบเลี้ยงเจริญเป็นแคลลัสและเกิดคัพภะร่างกายได้ เมื่อนำเอา embryogenic callus ไปเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง ½ MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) ที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ปรากฏว่าในทุกความเข้มข้นของ 2,4-D สามารถกระตุ้นให้เกิดคัพภะร่างกายได้ 100% ของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง การกระตุ้นให้คัพภะร่างกายเจริญเป็นต้นพบว่าคัพภะร่างกายสามารถเจริญเป็นต้นและรากได้ดีที่สุดในอาหารพื้นฐานของ MS นอกจากนี้คัพภะร่างกายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NAA (Napthalene Acetic Acid) ร่วมกับ BA (Benzyladenine) นั้นจะเจริญผิดปกติและมักจะเกิดแคลลัสตามส่วนอื่น ๆ เมื่อนำต้นอ่อนที่สมบูรณ์ไปปลูกในวัสดุปลูกต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนที่ย้ายปลูกในทรายมีการรอดชีวิตได้สูงสุด 60% เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะละกอจึงได้คัดเลือกคัพภะร่างกายจาก clone ที่ 43 นำมาย้ายปลูกในดินและออกปลูกในแปลงทดลองเป็นเวลา 8 เดือน พบว่าต้นมะละกอที่ออกดอกเป็นต้นกระเทย 100%

งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ และเลือกวิธีดัดแปลงของ Kikuchi (1998) เพื่อนำมาใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา RAPD-PCR เนื่องจากเมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีดังกล่าวมาใช้ใน RAPD-PCR ได้ให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอจำนวนมากพอที่จะศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอจากคัพภะร่างกาย เมื่อใช้ไพรเมอร์ชุด PPWA, PPWE และ PPWS ทั้งหมด 26 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ PPWE และ PPWS จำนวน 5 ชนิดซึ่งให้ผลผลิตจำนวนแถบดีเอ็นเอ 3-7 แถบ จึงเลือกไพรเมอร์ 3 ชนิด (PPWS-02, PPWS-03 และ PPWS-07) มาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมต่อไป พบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ PPWS-02, PPWS-03 และ PPWS-07 ในปฏิกิริยา RAPD-PCR จะได้แถบดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตมีขนาด 195-7,123, 123-4,986 และ 279-3,602 คู่เบสตามลำดับ จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็นทั้ง monomorphic และ polymorphic แสดงว่า clone มะละกอที่นำมาศึกษามีความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบลักษณะฟีโนไทป์ของมะละกอที่ปลูกในแปลงพบว่ามีความแตกต่างกันบางลักษณะเช่น ความสูง ชนิดของดอกและผล แต่ทุกต้นมีเพศเดียวกัน

ABSTRACT

TE 163907

Induction of somatic embryos from papaya (*Carica papaya* L.) cv. Kaekdum were performed through cotyledon culturing from 4 weeks-old seedlings on modified ½ MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with 400 mg/l glutamine, 80 mg/l adenine sulfate, 170 mg/l Sodiumdihydrogenphosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$), 15% coconut water, 60 g/l sucrose and 15 mg/l 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid). The cultures were kept in the incubation room which controlled temperature at 25 ± 2 °C, 1,000 lux light intensity of fluorescent for 16 hours/day. After twelve weeks of culturing, the result showed that callus and somatic embryos were produced. After 4 weeks, the embryogenic callus, which was transferred to modified ½ MS added with various concentration of 2,4-D, was revealed that 100% of the cultures provoked somatic embryo formation in all medium supplemented with 2,4-D concentration treatments. Plantlet formation from somatic embryos was acheived on the basal MS medium without any growth regulators. Furthermore, it was found that somatic embryos which cultured on the MS added with NAA (Napthalene Acetic Acid) and BA (Benzyladenine) showed abnormality with some callus on the embryonic organs. Twelve weeks after transferring, the complete plantlets were moved to different kinds of potted soil, it was found that sand was the best supporting material with 60% survival. Morphological study of papaya derived from somtic embryos of clone number 43 growing in the field for 8 months showed 100% hermaphroditic compared to all flowered plants.

DNA extraction methods were studied for using as DNA template RAPD-PCR reactions. The modified Kikuchi (1998) method was then used for further RAPD-PCR reactions for studying the genetic variation of papaya plants derived from somatic embryos. A set of 26 primers (PPWA, PPWE and PPWS) was studied for the ability of producing RAPD-PCR products. The results showed that PPWE and PPWS primers produced 3-7 PCR fragments. Selected three primers (PPWS-02, PPWS-03 and PPWS-07) were then used for detection genetic variation of plantlets derived from somatic embryos. Using PPWS-02, PPWS-03 and PPWS-07 primers showed polymorphic bands ranging from approximately 195-7,123, 123-4,986 and 279-3,602 base pairs, respectively. These DNA fingerprints gave both monomorphic and polymorphic bands which indicated that the genetic differences of papaya clone number 43. This result agreed with some different phenotypes, for example, plant height, flower and fruit types. Except that, all of the clones produced the hermaphrodite plants.