



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจสอบสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยอาศัยเทคนิคโพลีไซโทเมทรี

โดย

ดร.วีร ศรีสวัสดิ์

สิงหาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในฐานะหน่วยงานที่สนับสนุนเงินทุนตลอดโครงการวิจัย ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์ และ Dr. Jaroslav Dolezel นักวิจัยที่ปรึกษาในโครงการ ที่ได้ให้คำปรึกษาและช่วยเหลืองานวิจัยนี้จนสำเร็จ ขอขอบคุณ คุณอรรัตน์ วงศ์ศรี และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์คำปรึกษา รวมทั้งเมล็ดพันธุ์และเนื้อเยื่อต้นแม่พันธุ์ และพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัย

ดร. ชีร ศรีสวัสดิ์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2554

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5080372

ชื่อโครงการ : การตรวจสอบสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยอาศัยเทคนิคโพลีไซโทเมทรี

ชื่อนักวิจัย : ดร.ธีร ศรีสวัสดิ์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

E-mail: theera918s@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 กรกฎาคม 2550 ถึง 1 กรกฎาคม 2552

การเปรียบเทียบชนิดของสายละลายนิวเคลียสที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันโดยอาศัยเทคนิคโพลีไซโทเมทรี พบว่า สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 และ WPB มีความเหมาะสมที่จะใช้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน โดยสารละลายนิวเคลียสชนิด WPB ให้ค่า Fluorescence intensity (FL) สูงที่สุด และให้ค่า Coefficient of variance (%CV) ต่ำที่สุด ขณะที่ สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 ให้ค่า Yield factor (YF) สูงที่สุด และให้ค่า Debris factor (DF) ต่ำที่สุด เมื่อวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอของคัพพะปาล์มน้ำมัน มีค่า 3.7 pg เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 สำหรับปริมาณดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา มีค่า 3.8 pg เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารละลายนิวเคลียสชนิด WPB ซึ่งให้ตำแหน่งของฮิสโทแกรมที่ค่อนข้างคงที่ ขณะที่สารละลายนิวเคลียสชนิดอื่น (Tris.MgCl₂, Otto's และ Galbraith) ให้ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ไม่เป็นที่น่าพอใจ จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา และฟิลิเฟอร์า โดยใช้สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB พบว่าต้นปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ดูรา และฟิลิเฟอร์า มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 6.3 - 7.6 และ 5.3 - 6.1 pg จึงมีขนาดจีโนมอยู่ในช่วงที่มากกว่า 3000 และ 2000 Mbp ตามลำดับ ข้อมูลเหล่านี้ ยืนยันความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันทั้งสามสายพันธุ์

คำสำคัญ: 2C DNA, flow cytometry, genome size, nuclear lysis buffers, oil palm

Abstract

Project number: MRG5080372

Project title: Cultivars classification approach in oil palm by using flow cytometry

Researcher: Dr. Theera Srisawat, Faculty of Science and Industrial technology, Prince of Songkla University, Suratthani campus

E-mail address: theera918s@hotmail.com

Project period: 2 July 2007 to 1 July 2009

Efficiencies in each nuclear lysis buffer on flow cytometric analysis (FCM) of oil palm were compared for cultivars classification. Five nuclear lysis buffers (LB01, WPB, Otto's, Tris.MgCl₂ and Galbraith) were used to prepare samples from embryos and unopened leaves of one to twelve months-old seedlings. Although these buffers showed distinct peaks of PI fluorescence for oil palm embryos, the buffers differed considerably in Fluorescence intensity (FL), Coefficient of variance (%CV), Debris factor (%DF) and Yield factor (YF) values when analyzed with their seedlings. The results showed that LB01 was the most suitable buffer (lowest %CV and high FL value) for oil palm embryos resulting in 3.7 pg of 2C DNA. For all seedlings, only WPB gave the highest value of FL and lowest value of %CV resulting approximately in 3.8 pg of 2C DNA whereas the highest value of YF and lowest value of %DF were mostly found in LB01. By the way, only WPB showed consistency position of PI fluorescence histograms when analyzed with all seedlings. WPB was therefore used to classify the cultivars of hybrid Tenera and its parents (Dura and Pisifera) by means of DNA contents. DNA contents of Dura and Pisifera were ranged from 6.3 - 7.6 and 5.3 – 6.1 pg, their genome size (1C DNA contents) is therefore greater than 3000 and 2000 Mbp, respectively. The results confirmed that Dura, Pisifera and Tenera cultivars could be classified by using FCM-derived DNA contents.

Keyword: 2C DNA, flow cytometry, genome size, nuclear lysis buffers, oil palm

Executive summary

ปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน บ่งบอกถึงความแตกต่างของปริมาณและลำดับคู่เบสในสายดีเอ็นเอ ซึ่งสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันย่อมมีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากัน แต่สิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันย่อมมีปริมาณดีเอ็นเอต่างกัน

ปาล์มน้ำมันมียีนควบคุมลักษณะของกะลา 2 ลักษณะ คือ SH+SH+ ควบคุมการมีกะลาหนา (ดูร่า) และ SH-SH- ควบคุมการไม่มีกะลา (พิสิเฟอรา) ซึ่งตามสมมติฐาน ปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ดูร่า และพิสิเฟอรา ย่อมที่จะมีปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน การพิสูจน์ทราบถึงสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันทางการค้าลูกผสมเทเนอรา (SH+ SH-) ซึ่งมีลักษณะกะลาบาง ควรดำเนินการก่อนปลูกจนกระทั่งให้ผลผลิต ซึ่งเทคนิคการใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องบ่งชี้ทางโมเลกุล (DNA marker) ไม่สามารถตอบสนองต่อเรื่องดังกล่าวได้ เพราะการตรวจสอบในระดับประชากร มีค่าใช้จ่ายสูงและใช้ระยะเวลาในการพิสูจน์ทราบนาน อย่างไรก็ตามการพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ด้วยโพลีไซโทเมทรี ยังคงต้องอาศัยสารละลายนิวเคลียส (Nuclear lysis buffer) ที่มีความจำเพาะสำหรับปาล์มน้ำมัน เนื่องจากไม่มีสารละลายนิวเคลียสชนิดใดเหมาะที่จะใช้กับพืชทุกชนิด จึงต้องมีการศึกษาชนิดของสารละลายดังกล่าวให้เหมาะสมสำหรับปาล์มน้ำมันโดยเฉพาะ เมื่อค้นพบสารละลายที่มีความเหมาะสมต่อปาล์มน้ำมันได้แล้ว การอ่านผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโพลีไซโทเมทรีก็จะมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาชนิดของสารละลายนิวเคลียสที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์เนื้อเยื่อของปาล์มน้ำมันด้วยวิธีโพลีไซโทเมทรี จากนั้นนำสารละลายนิวเคลียสชนิดนั้นไปวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ดูร่า พิสิเฟอรา และเทเนอราต่อไป

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 และ WPB มีความเหมาะสมที่จะใช้วิเคราะห์กับคัพพะ และเนื้อเยื่อต้นกล้าลูกผสมปาล์มน้ำมัน ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์คัพพะปาล์มน้ำมันด้วยสารละลายนิวเคลียส LB01 ปริมาณดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 3.7 pg และเมื่อวิเคราะห์ต้นกล้าปาล์มน้ำมันด้วย WPB ปริมาณดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 3.8 pg เมื่อนำสารละลายนิวเคลียสชนิด WPB มาวิเคราะห์กับเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันต้นแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา พบว่าต้นพันธุ์ดังกล่าวมีปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 6.3 – 7.6 และ 5.3 – 6.1 pg ตามลำดับ ผลที่ได้ยืนยันความแม่นยำของวิธีโพลีไซโทเมทรีต่อการวิเคราะห์เนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน โดยต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูร่า พิสิเฟอรา และเทเนอรา มีปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ไทย)	ข
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ค
Executive summary	ง
สารบัญ	จ
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
1. บทนำ	1
2. วิธีการทดลอง	9
3. ผลการทดลอง	13
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	32
5. สรุปผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	38
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	41
ภาคผนวก	42

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. (ก) ลักษณะราก และ ลำต้น และ (ข) ทางใบและใบปาล์มน้ำมัน	4
2. การเวียนของทางใบเป็นเกลียวรอบลำต้น	4
3. (ก - ค) แสดงช่อดอกปาล์มน้ำมันประเภทต่าง ๆ	4
4. (ก) เมล็ด และ (ข) ผลปาล์มน้ำมัน	5
5. ส่วนประกอบต่าง ๆ ของผลปาล์มน้ำมัน	6
6. แสดงตัวอย่างวิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน ซึ่งเติมสีฟลูออเรสเซนซ์ที่จะใช้ย้อมลงในสารละลายนิวเคลียส	10
7. แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียสจากคัพพะปาล์มน้ำมันที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด	14
8. Density plot แสดงค่า forward scatter (logarithmic scale,FS log) vs. side scatter (Logarithmic scale,SS log) ของนิวเคลียสจากคัพพะปาล์มน้ำมัน ที่แยกด้วยสารละลายนิวเคลียสต่างชนิดกัน	17
9. Density plot แสดงค่า forward scatter (logarithmic scale,FS log) vs. side scatter (Logarithmic scale,SS log) ของนิวเคลียสจากฐานใบอ่อนต้นกล้า ปาล์มน้ำมันที่แยกด้วยสารละลายนิวเคลียสต่างชนิดกัน	18
10. แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียส จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือน ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด	20
11. แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียส จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 3 เดือน ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด	21
12. แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียส จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 6 เดือน ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด	22
13. แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียส จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือน ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด	23
14. (ก-จ) แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียสจากใบอ่อนต้นปาล์มน้ำมันแม่พันธุ์คูราอายุ 10 ปี ที่ถูกแยกด้วย สารละลายนิวเคลียส WPB	28
15. (ก-จ) แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียสจากใบอ่อนต้นปาล์มน้ำมันพ่อพันธุ์พิสิเฟอร์อายุ 10 ปี ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส WPB	29

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
16. (ก-ง) แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียสจากไบอ้อนต้นปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอซ่าสุราษฎร์ธานี 1, 2, 3 และ 6 อายุ 1 ปี ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส WPB	30

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. เปรียบเทียบลักษณะผลของปาล์มน้ำมันแบบต่าง ๆ	6
2. แสดงพารามิเตอร์โฟลไซโทเมทรี ของนิวเคลียสจากคัพภะและใบอ่อน ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1-12 เดือน	15
3. ปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนมของคัพภะและใบอ่อนจากต้นกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 1-12 เดือน	25
4. ปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนมของใบอ่อน จากต้นแม่พันธุ์ปาล์มน้ำมันดูร่า และพ่อพันธุ์พิลีเฟอร่าของลูกผสมเทเนอรัสสุราษฎร์ธานี	31

1. บทนำ

โพลไซโทเมทรี ถูกนำมาใช้เพื่อประโยชน์ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพมาแล้วหลายสิบปี สำหรับในพืช มีการใช้โพลไซโทเมทรีเพื่อตรวจสอบหาปริมาณดีเอ็นเอ ชุดโครโมโซม ความผันแปรทางด้านพันธุกรรม วัฏจักรของเซลล์ และความแตกต่างระหว่างชุดประชากร เป็นต้น ภายใต้สมมติฐานทางชีววิทยาที่แสดงให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ย่อมมีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากัน ดังนั้นปาล์มน้ำมันจึงควรที่จะมีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากันในสายพันธุ์เดียวกัน ในธรรมชาติ ปาล์มน้ำมันมีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ *Elaeis guineensis*, *E. oleifera* และ *E. odora* สายพันธุ์ที่ใช้ปลูกทางการค้ามีสายพันธุ์เดียวคือ *E. guineensis* Jacq. ดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่ปลูกทางการค้าจึงควรมีปริมาณเท่ากันทุกต้น อย่างไรก็ตาม ในปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ดังกล่าว มีลักษณะการแสดงออกถึงความแตกต่างบางอย่างที่ถูกควบคุมด้วยยีนแบบ Homozygous dominant และ Homozygous recessive นั่นคือลักษณะการแสดงออกของกะลา (Shell) ภายในผล โดยต้นที่มียีนควบคุมแบบ Homozygous dominant (Sh+ Sh+) จะแสดงออกลักษณะของกะลาหนาและทะลายใหญ่ เรียกลักษณะผลแบบนี้ว่า ผลแบบดुर่า (Dura) ขณะที่ต้นที่มียีนควบคุมแบบ Homozygous recessive (Sh- Sh-) จะแสดงออกลักษณะของผลที่ไม่มีกะลาและทะลายเล็ก เรียกลักษณะผลแบบนี้ว่า ผลแบบพิสิเฟอร์่า (Pisifera) ลักษณะผลทั้งสองแบบไม่นิยมปลูกทางการค้าเพราะให้ปริมาณน้ำมันน้อย ดังนั้นจึงมีการผสมข้ามระหว่างต้นที่มีผลแบบดुर่า (Female) และพิสิเฟอร์่า (Male) เพื่อให้ได้ผลผลิตปาล์มน้ำมันที่มีขนาดทะลายใหญ่ ผลมีกะลาบาง และเนื้อผลมาก อันจะส่งผลให้มีปริมาณเปอร์เซ็นต์น้ำมันมาก เรียกลักษณะผลที่เกิดขึ้นใหม่นี้ว่า ลูกผสมเทเนอร์่า (Tenera) โดยมียีนควบคุมแบบ Heterozygous (Sh+ Sh-)

ปาล์มน้ำมันที่ปลูกทางการค้า ได้มาจากการขยายพันธุ์โดยการผสมข้ามดังที่ได้กล่าวไปแล้ว ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้การขยายพันธุ์แบบเดิมเพื่อผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร์่าได้ เนื่องจากจะมีการกระจายตัวของลักษณะการแสดงออกทาง Genotype และ Phenotype แบบดुर่าต่อเทเนอร์่าต่อพิสิเฟอร์่าในอัตราส่วน 1:2:1 ตามหลักการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของเมนเดล หากมีการนำปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผลแบบดुर่าและพิสิเฟอร์่ามาปลูกในแปลงจะทำให้ปริมาณทะลายสดปาล์มน้ำมันลดลง 15 - 35 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณน้ำมันปาล์มดิบต่อพื้นที่ลดลงกว่า 35 - 55 เปอร์เซ็นต์

ด้วยขณะนี้พื้นที่การปลูกปาล์มน้ำมันในประเทศไทยได้มีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง จากนโยบายของรัฐบาลที่สนับสนุนให้ขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันให้ครบ 2 ล้านไร่ เพื่อที่จะนำผลผลิตดังกล่าวไปใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล ซึ่งกฎหมายกำหนดให้ในปี 2553 น้ำมันดีเซลที่ขายในทุกปี ต้องมีส่วนผสมของน้ำมันไบโอดีเซลอยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ และจะมีสัดส่วนมากขึ้นในทุก ๆ 2 ปี แต่เมื่อย้อนกลับไปพิจารณาปริมาณน้ำมันปาล์มดิบต่อพื้นที่พบว่า ปริมาณน้ำมันปาล์มดิบที่ผลิตได้อยู่ในปริมาณที่ต่ำกว่าปริมาณของการผลิตในต่างประเทศ อันมีสาเหตุมาจากเรื่องของสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันและการจัดการพื้นที่ปลูก ดังนั้นเพื่อให้ปริมาณผลผลิตทะลายปาล์มสดและปริมาณน้ำมันปาล์มดิบต่อพื้นที่เพิ่มขึ้น จึงควรที่จะส่งเสริมให้มีการตรวจสอบสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันก่อนปลูกลงแปลงโดยใช้เทคนิคโพลีไซโทเมทรี ซึ่งเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายไม่สูง และสามารถตรวจสอบสายพันธุ์ในระดับประชากรได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว ซึ่งเทคนิคการใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทางโมเลกุล (DNA marker) ไม่สามารถตอบสนองต่อเรื่องดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามการพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ด้วยโพลีไซโทเมทรี ยังคงต้องอาศัยสารละลายนิวเคลียส (Nuclear lysis buffer) ที่มีความเหมาะสมต่อเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน เนื่องจาก ภายในเซลล์ของพืชแต่ละชนิด มีองค์ประกอบและอาจมีการหลังสารที่ออกมารบกวนการอ่านผลวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน จึงต้องมีการทดสอบชนิดสารละลายนิวเคลียสหลายชนิด เพื่อหาชนิดของสารละลายที่มีความเหมาะสมสำหรับปาล์มน้ำมันโดยเฉพาะ หากสามารถค้นพบสารละลายที่มีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันดังกล่าวได้ การอ่านผลจากวิธีนี้ก็ง่าย รวดเร็วและมีความแม่นยำขึ้น ท้ายที่สุดต้นกล้าปาล์มน้ำมันก็จะได้รับการพิสูจน์ทราบถึงสายพันธุ์ก่อนปลูกลงแปลง ซึ่งหากเป็นต้นกล้าลูกผสมแทนอ้อร่า ก็จะส่งผลให้มีปริมาณการผลิตทะลายสดและน้ำมันปาล์มดิบในสัดส่วนที่สูงยิ่งขึ้นต่อไป

1.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในวงศ์ Arecaceae ได้มีการจัดจำแนกอนุกรมวิธานของปาล์มน้ำมันไว้ ดังนี้

วงศ์ (Family): Palmae หรือ Arecaceae

จีนัส (Genus): *Elaeis*

สปีชีส์ (Species): *guineensis*

สามัญ (Common name): oil palm

ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name): *Elaeis guineensis* Jacq.

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปาล์มน้ำมันโดยทั่วไป

ราก ปาล์มน้ำมันมีระบบรากฝอย รากอ่อน จะงอกออกจากเมล็ดเป็นอันดับแรก เมื่อต้นกล้าอายุได้ประมาณ 2 - 4 เดือน รากอ่อนจะหยุดเจริญเติบโตและหายไป ระบบรากจริงจะงอกจาก

ส่วนฐานของลำต้น ต้นปาล์มที่เจริญเติบโตเต็มที่นั้น ประกอบด้วยรากแรกที่หยั่งลึกลงผิวดินช่วยยึด ลำต้นบ้างเล็กน้อย และมีรากสอง สามและสี่ที่แตกแขนงออกมาตามลำดับทอดไปตาม แนวนอนจะเป็นระบบรากสานกันอย่างหนาแน่นอยู่บริเวณผิวดินระดับลึก 30 - 50 เซนติเมตร (ภาพที่ 1 ก)

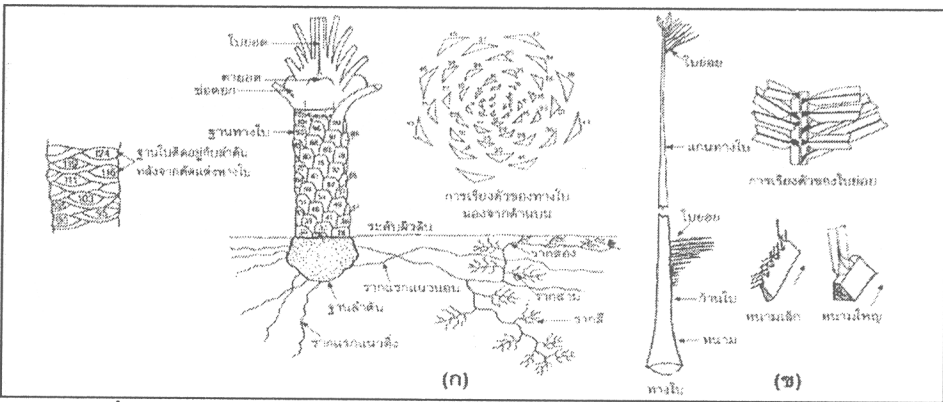
ลำต้น ปาล์มน้ำมันมีลำต้นตั้งตรง มียอดเดี่ยวรูปรูปรวย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 - 12 เซนติเมตร สูง 2.5 - 4 เซนติเมตร ประกอบด้วยใบอ่อนและเนื้อเยื่อเจริญ ต้นปาล์มน้ำมันในระยะ 3 ปีแรกจะเจริญเติบโตทางด้านกว้าง หลังจากนั้นลำต้นจะยึดขึ้น ปล้องฐาน โคนใบ และข้อ จะปรากฏให้เห็นก็ต่อเมื่อปาล์มน้ำมันอายุมากแล้ว ทางใบจะติดอยู่กับลำต้นอย่างน้อย 12 ปี หรือมากกว่านั้นแล้วเริ่มหลุดจากใบล่างขึ้นไป ทางใบบนลำต้นมีการจัดเรียงตัวเวียนตามแกนลำต้น รอบละ 8 ทางใบ 2 ทิศทางคือเวียนซ้ายและเวียนขวา เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น ประมาณ 20 - 75 เซนติเมตร โดยทั่วไปลำต้นมีความสูงเพิ่มขึ้นประมาณ 35 - 60 เซนติเมตรต่อปีขึ้นกับสภาพแวดล้อมและพันธุกรรม ปาล์มน้ำมันมีความสูงได้มากกว่า 30 เมตร และมีอายุยืนนานมากกว่า 100 ปี แต่การปลูกปาล์มน้ำมันเป็นการค้า ไม่ควรมีความสูงเกิน 15 - 18 เมตร หรืออายุประมาณ 25 ปี (ภาพที่ 1 ก) เพราะจะเป็นอุปสรรคต่อการเก็บเกี่ยว และผลผลิตเริ่มลดลง

ใบ หรือทางใบ ประกอบด้วย แกนทางใบ ก้านใบ และใบย่อย ซึ่งเกิดจากการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของลำต้น ทางใบจะเกิดในลักษณะเป็นเกลียวรอบลำต้น โดยลักษณะการเวียนของทางใบปาล์มน้ำมันมีสองแบบ แบบแรกคือการเกิดทางใบแบบเวียนซ้าย แบบที่สองคือ การเกิดทางใบแบบเวียนขวา ใบของปาล์มน้ำมันเป็นใบประกอบรูปขนนก (pinnate) แต่ละใบแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนแกนกลางที่มีใบย่อยอยู่ 2 ข้างและส่วนก้านทางใบ ซึ่งมีขนาดสั้นกว่า ส่วนแรกและมีหนามสั้น ๆ อยู่ 2 ข้าง แต่ละทางมีใบย่อย 100 - 160 คู่ แต่ละใบย่อยยาว 100 - 120 เซนติเมตร กว้าง 4 - 6 เซนติเมตร (ภาพที่ 1 ข และภาพที่ 2)

ช่อดอก ช่อดอกปาล์มน้ำมันเกิดจากตาดอกที่บริเวณซอกใบที่ติดกับต้น ตาดอกอาจพัฒนาเป็นช่อดอกตัวเมีย หรือช่อดอกตัวผู้ก็ได้ ขึ้นอยู่กับฤดูกาล และความสมบูรณ์ของธาตุอาหารที่ได้รับ ดังนั้นปาล์มน้ำมันจึงมีทั้งช่อดอกตัวเมียและช่อดอกตัวผู้บนต้นเดียวกัน แต่เกิดในตำแหน่งของทางใบที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3)

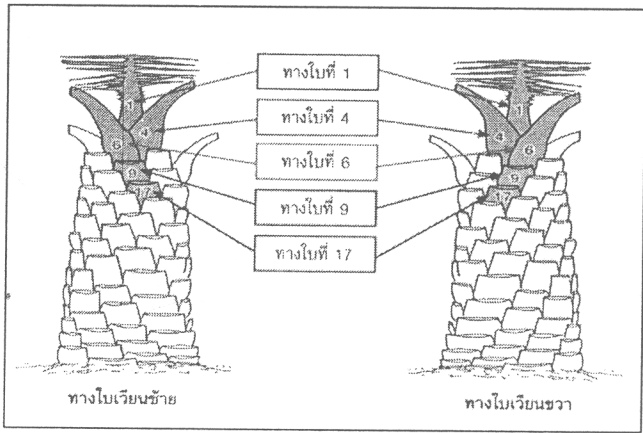
ผลและเมล็ด หลังจากช่อดอกตัวเมียได้รับการผสมเรียบร้อยแล้วประมาณ 5.5 - 8 เดือน ผลปาล์มน้ำมันในทะลายจึงสุกพร้อมเก็บเกี่ยวได้ ผลของปาล์มน้ำมันประกอบด้วยเปลือกผลชั้นนอก เนื้อผลชั้นนอก กะลา เนื้อผลชั้นใน และคัพภะ

เมล็ดปาล์มน้ำมันประกอบด้วย กะลา เนื้อผลชั้นในและคัพภะใช้สำหรับการขยายพันธุ์ โดยปกติเมล็ดปาล์มมีระยะพักตัวจะต้องใช้เวลา 3 ถึง 6 เดือน แต่หากมีการควบคุมปัจจัยสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงที่ระดับเปอร์เซ็นต์การงอก 85 - 90 เปอร์เซ็นต์ จะใช้เวลาเพียง 40 วัน (ธีระ และคณะ 2548) (ภาพที่ 4)



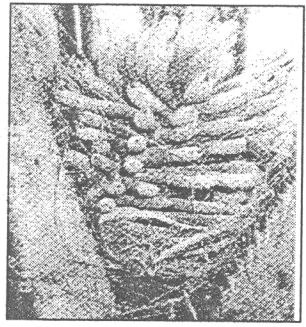
ภาพที่ 1 (ก) ลักษณะราก และ ลำต้น และ (ข) ทางใบและใบปาล์มน้ำมัน

ที่มา : ชีระ และคณะ (2548)

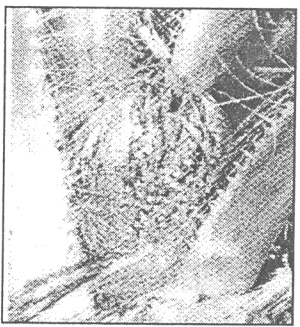


ภาพที่ 2 การเวียนของทางใบเป็นเกลียวรอบลำต้น

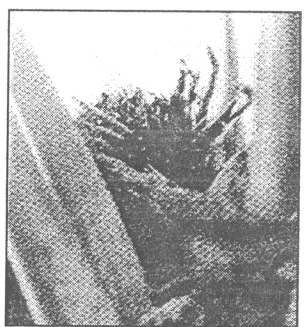
ที่มา : ชีระ และคณะ (2548)



(ก) ช่อดอกตัวผู้



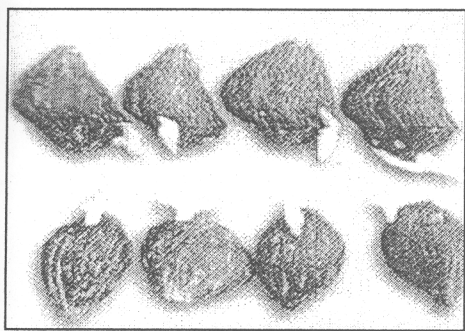
(ข) ช่อดอกตัวเมีย



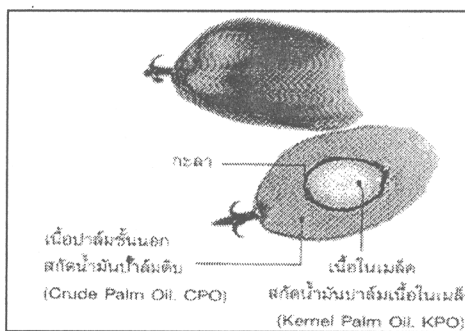
(ค) ช่อดอกกะเทย

ภาพที่ 3 (ก - ค) แสดงช่อดอกปาล์มน้ำมันประเภทต่าง ๆ

ที่มา : ชีระ และคณะ (2548)



(ก) ลักษณะเมล็ดปาล์มน้ำมัน



(ข) ส่วนประกอบของผลปาล์มน้ำมัน

ภาพที่ 4 (ก) เมล็ดปาล์มน้ำมัน และ (ข) ผลปาล์มน้ำมัน

ที่มา : วีระ และคณะ (2548)

1.2 พันธุ์ปลูกปาล์มน้ำมัน

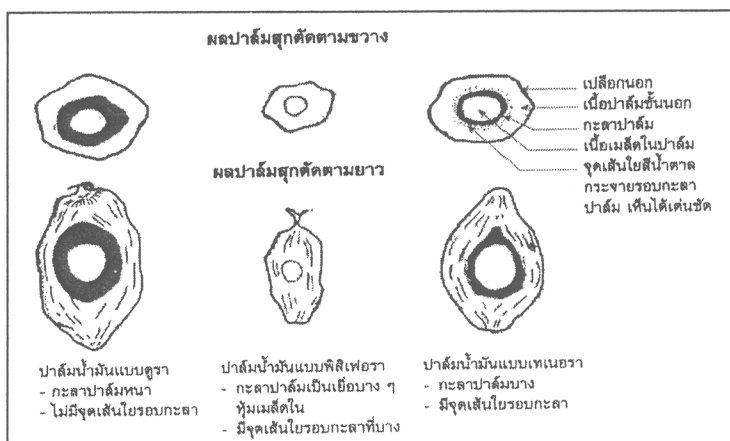
พืชนี้จัดอยู่ในสกุล *Elaeis* ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ *E. guineensis*,

E. oleifera และ *E. odora*

1. ปาล์มน้ำมันชนิด *E. guineensis* เป็นปาล์มน้ำมันชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นพันธุ์ปลูกที่นิยมปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในประเทศต่าง ๆ ในทวีปแอฟริกาบริเวณตอนกลางและตะวันตกของทวีป สายพันธุ์ของปาล์มน้ำมันชนิดนี้สามารถจำแนกออกได้ 3 แบบตามลักษณะของผล คือ แบบดูร่า แบบฟิสิเฟอรา และแบบเทเนอรา ปาล์มน้ำมันแบบฟิสิเฟอราเป็นพันธุ์ที่ไม่นิยมปลูกเป็นการค้า เนื่องจากช่อดอกตัวเมียมีโอกาสเป็นหมันสูง จึงนิยมใช้เป็นพ่อพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ผสมกับแม่พันธุ์ดูร่า ดังนั้นพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าโดยเฉพาะ คือพันธุ์เทเนอรา ซึ่งมีการปลูกกันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน เพราะมีเปลือกผลหรือ Mesocarp หนา 35 - 55 เปอร์เซ็นต์ มีกะลาบางอยู่ระหว่าง 0.5 - 5.4 มิลลิเมตร ซึ่งให้ผลผลิตและเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง

2. ปาล์มน้ำมันชนิด *E. oleifera* ปาล์มน้ำมันชนิดนี้ มีถิ่นกำเนิดอยู่แถบประเทศต่าง ๆ ทางภาคเหนือของลุ่มแม่น้ำอะเมซอนของทวีปอเมริกาใต้ยาวติดต่อไปจนถึงอเมริกากลาง แต่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่นิยมปลูกเป็นการค้า เนื่องจากมีการเจริญเติบโตช้า ผลมีขนาดเล็ก และให้ผลผลิตน้ำมันต่ำกว่าชนิด *E. guineensis* ได้มีการอาศัยลักษณะได้เปรียบบางประการในกลุ่มพันธุ์พวกนี้ เช่น ต้นเตี้ย การเจริญเติบโตช้าเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ปลูกในกลุ่ม *E. guineensis* โดยสร้างพันธุ์ลูกผสมข้ามชนิด ซึ่งสามารถให้ผลผลิตได้ดี ลำต้นสั้น ก้านทะลายยาว และเก็บเกี่ยวผลง่าย

3. ปาล์มน้ำมันชนิด *E. odora* มีรายงานพบปาล์มน้ำมันพวกนี้ในบริเวณเดียวกับ *E. oleifera* คือ แถบลุ่มแม่น้ำอะเมซอน บทบาทและความสำคัญของปาล์มน้ำมันในกลุ่มนี้ยังไม่มีรายงานมากนัก (วีระ และคณะ 2548) (ภาพที่ 5 และ ตารางที่ 1)



ภาพที่ 5 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของผลปาล์มน้ำมัน

ที่มา : วีระ และคณะ (2548)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะผลของปาล์มน้ำมันแบบต่าง ๆ

แบบ	กะลา (มม.)	เส้นใยสีน้ำตาลรอบกะลา	เปลือกนอก/ผล (%)
ตูร่า	2 - 8	ไม่มี	35 - 60
เทเนอรา	3 (0.5 - 4)	มี	60 - 90
ฟิลิเฟอรา	บางมากหรือไม่มี	เส้นใยหุ้มรอบกะลา	>90

ที่มา : ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี (2532)

1.3 การทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

การใช้เทคนิคโพลไซโทเมตรี เพื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในวงการแพทย์ ต่อมาจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้กับพืชหลาย ๆ ชนิด (Bennett and Leitch, 2005) นอกจากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอแล้ว ยังสามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบวัฏจักรของเซลล์ในระดับกลุ่มประชากรของสิ่งมีชีวิตได้ (Winkelmann et al., 1998; Dolezel, 1991; Dolezel and Bartos, 2005) นอกจากนั้นข้อมูลจำนวนชุดโครโมโซมและปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสที่เป็นผลจากเทคนิคโพลไซโทเมตรี ยังเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์เพื่อผลิตพืชสายพันธุ์ใหม่ ๆ อีกด้วย

มีรายงานการใช้เทคนิคโพลไซโทเมตรีในปาล์มน้ำมันไม่มากนัก เช่น การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทเนอราและเนื้อเยื่อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วยเครื่องโพลไซโทมิเตอร์ FACScan (Becton Dickinson) โดยใช้ต้นพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) เป็นพืชอ้างอิง (internal standard) พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์เทเนอราเท่ากับ

3.7 pg ในขณะที่เนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งผ่านการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง มีค่าปริมาณดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Rival et al., 1997) ต่อมา Srisawat et al. (2005) ได้รายงานการใช้เทคนิคโพลีไซโทเมทริกกับปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ดูรา ฟิสิเฟอรา และเทเนอรา ที่เป็นต้นแม่ พ่อ และลูกกัน ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี เปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ผลโดยใช้พืชอ้างอิงหลาย ๆ ชนิด (external standard) ใช้เครื่องโพลีไซโทมิเตอร์ FACScalibur (Becton Dickinson) ผลการตรวจสอบพบว่าปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทเนอราเท่ากับ 3.7 pg เมื่อใช้ถั่วเหลือง (*Glycine max* cv. Polanka) เป็นพืชอ้างอิงสำหรับต้นดูราและฟิสิเฟอราซึ่งเป็นต้นแม่และต้นพ่อ มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 3.4 และ 3.2 pg ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้รายงานปริมาณดีเอ็นเอที่เปลี่ยนแปลงไปของเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และจำนวนเซลล์ในวัฏจักรของเซลล์ในคัพพะปาล์มน้ำมันอีกด้วย (Srisawat and Kanchnapoom, 2005; Srisawat et al., 2005) ต่อมา Madon et al. (2008) รายงานการใช้ถั่วเหลืองชนิดเดียวกันเป็นพืชอ้างอิง (external standard) เพื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ดูรา ฟิสิเฟอราและเทเนอราที่เป็นแม่ พ่อและลูกกัน โดยวิเคราะห์ในเครื่องโพลีไซโทมิเตอร์ FACScalibur (Becton Dickinson) พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ดูรา ฟิสิเฟอราและเทเนอรา มีค่าเท่ากับ 4.1, 3.64 และ 3.83 pg ตามลำดับ

ความพยายามในการพัฒนาการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีโพลีไซโทเมทรี มุ่งที่จะศึกษาองค์ประกอบของสารละลายนิวเคลียส เพราะไม่มีสารละลายนิวเคลียสชนิดใด ที่เหมาะสมสำหรับใช้กับพืชทุกชนิด ดังนั้น การพัฒนาสารละลายนิวเคลียสที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดจึงมีความจำเป็น (Loureiro et al., 2006b, 2007) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสต่อการวิเคราะห์ในพืชต่างชนิดกัน พบว่าสารละลายนิวเคลียสแต่ละชนิดเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ในพืชต่างชนิดกัน สำหรับสารละลายนิวเคลียสที่ถูกนำมาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน พบว่าสารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 ถูกนำมาใช้มากที่สุด (Rival et al., 1997 และ Madon et al., 2008) ขณะที่สารละลายบัฟเฟอร์ชนิด Tris.MgCl₂ มีรายงานการนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันด้วยเช่นกัน (Srisawat et al., 2005)

การพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของสารที่เป็นองค์ประกอบในสารละลายนิวเคลียสทุกชนิด พบว่าสารละลายนิวเคลียสแต่ละชนิด มีองค์ประกอบที่แตกต่างกันไป เฉพาะในสารละลายนิวเคลียสชนิด WPB เท่านั้น ที่มีองค์ประกอบของ Reducing agent นั่นคือ Sodium metabisulfite แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์เนื้อเยื่อไม้ยืนต้น (Woody) ด้วยวิธีโพลีไซโทเมทรี อาจได้รับผลกระทบจากสาร Phenolic compounds ที่ปล่อยมาจากเนื้อเยื่อไม้ยืนต้น (Loureiro et al., 2006a) ขณะที่สารที่ช่วยไม่ให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของนิวเคลียสหรือ debris สารละลายนิวเคลียสส่วนใหญ่จะใช้ Triton X-100 ยกเว้น Otto's I ที่ใส่ Tween-20 ลงไปแทน องค์ประกอบที่สำคัญของสารละลายนิวเคลียสที่สำคัญอีกส่วนหนึ่งคือ chromatin stabilizer ซึ่งเป็นสารที่มี

ส่วนรักษาสภาพของเส้นใยโครมาตินในนิวเคลียส สารดังกล่าวคือ $MgCl_2$ และ spermine.4HCl ซึ่งพบได้เฉพาะในสารละลายนิวเคลียสชนิด Tris.MgCl₂ และ LB01 ตามลำดับ ดังนั้นจึงควรที่จะมีการทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสแต่ละชนิดต่อเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันในระยะต่าง ๆ ก่อนที่จะมีการเลือกใช้สารละลายนิวเคลียสที่เหมาะสม เพื่อแยกแยะสายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน โดยใช้ความแตกต่างด้านปริมาณดีเอ็นเอเป็นเกณฑ์ต่อไป

2. วิธีการทดลอง

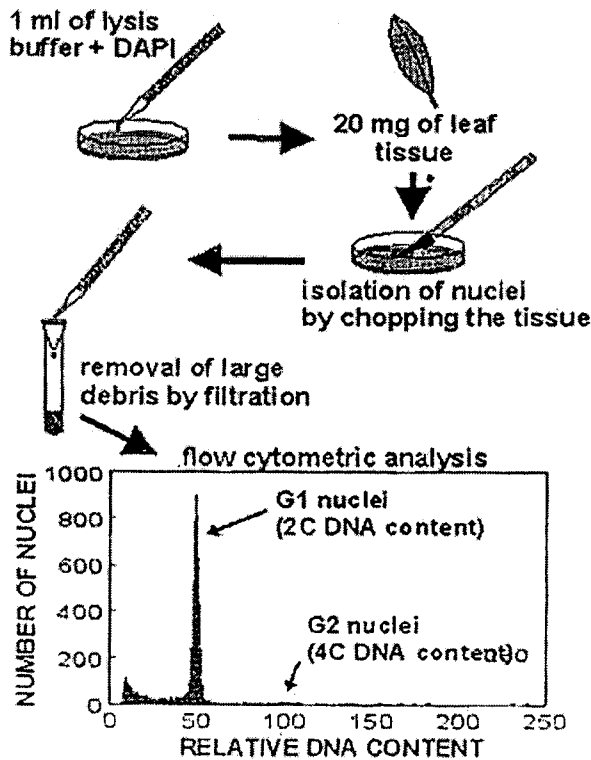
2.1 วัสดุพืช

ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทเนอราที่มีอายุ 3-12 เดือน และเนื้อเยื่อใบอ่อนของต้นแม่พันธุ์ดูรา (Deli Dura; D109, D067; D064, D069 และ D068) และพ่อพันธุ์ฟิลิเฟอร์ (Calabar; P109, LA ME; P106, DAMI; P116, Nigeria; P110 และ EKONA; P105) ของประชากรปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 ถึง 6 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ในส่วนพันธุ์พืชอ้างอิงใช้ถั่วเหลือง (*G. max* cv. Polanka) เป็นพืชอ้างอิง (Srisawat et al., 2005) ได้รับจาก Dr. Jaroslav Dolezel, Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, สาธารณรัฐเชก

2.2 การเตรียมสารละลายนิวเคลียสปาล์มน้ำมัน

เตรียมสารละลายนิวเคลียสเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน 5 สูตร ได้แก่ (1) Tris-MgCl₂: [200 mM Tris, 4 mM MgCl₂, 0.5%(w/v) Triton X-100 and 3.0%(w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP)] (Pfosser et al., 1995), (2) WPB: [200 mM Tris.HCl, 4mM MgCl₂, 2mM Na₂EDTA, 86 mM NaCl, 10 mM sodium metabisulfite, 1% PVP-10, 1%(v/v) Triton X-100, pH 7.5] (Loureiro et al., 2007), (3) LB01: [15 mM Tris, 2mM Na₂EDTA, 0.5 mM spermine.4HCl, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 8.0] (Dolezel et al., 1989), (4) Galbraith: [45 mM MgCl₂, 30 mM sodium citrate, 20 mM MOPS, 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 7.0] (Galbraith et al., 1983) และ (5) Otto I: [100 mM citric acid, 0.5% (v/v) Tween 20 pH 2-3] และ Otto II: [400 mM Na₂HPO₄, pH 8-9] (Otto, 1990)

การเตรียมตัวอย่างนิวเคลียสปาล์มน้ำมันเพื่อการศึกษาด้านโพลีไซโทเมทรี เนื่องจากเซลล์พืชมีผนังเซลล์ จึงต้องกำจัดออกก่อนที่จะย้อมเซลล์ด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ วิธีการคือตัดชิ้นส่วนคัพภะและใบอ่อนปาล์มน้ำมันให้เป็นชิ้นเล็ก ที่มีน้ำหนักประมาณ 50 มิลลิกรัม จากนั้นใส่ชิ้นส่วนปาล์มน้ำมันลงในจานแก้วที่มีสารละลายนิวเคลียสชนิดต่าง ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีการเติมสีฟลูออเรสเซนซ์ลงไป แล้วย่อยเนื้อเยื่อด้วยใบมีดผ่าตัดที่มีความคมและบดเนื้อเยื่อดังกล่าวเพื่อละลายสารประกอบพันธุกรรมออกมา การเตรียมตัวอย่างจากชิ้นส่วนใบอ่อนของต้นแม่พันธุ์ และ พ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันก็ดำเนินการด้วยวิธีการเดียวกัน (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แสดงตัวอย่างวิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน ซึ่งเติมสีฟลูออเรสเซนต์ที่จะใช้ย้อมลงในสารละลายนิวเคลียส

คำอธิบายเพิ่มเติม

1. ชิ้นส่วนใบอ่อนและคัพภะจะถูกตัดแยกออกจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันและเมล็ดที่สะอาดและสมบูรณ์ ในการเตรียมชิ้นส่วนใบอ่อน ก่อนวิเคราะห์ด้วยฟลูออโรมิเตอร์ต้องทำความสะอาดชิ้นส่วนนั้นให้สะอาด น้ำหนักของชิ้นส่วนใบอ่อนและคัพภะที่จะใช้ในการวิเคราะห์ด้วยฟลูออโรมิเตอร์คือประมาณ 50 มิลลิกรัม (5×10^3 nuclei) ต่อการวิเคราะห์ 1 ครั้ง
2. ใส่ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร แล้วเติมสารละลาย lysis buffer 1.0 มิลลิลิตร
3. ย่อยชิ้นส่วนพืชดังกล่าวด้วยใบมีดผ่าตัดทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วเติมสารละลายสีย้อม Propidium iodide (PI) ผสมลงไป 50 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายเอ็นไซม์ RNase อีก 50 ไมโครลิตร

4. กระบวนการใช้พีซีอ้างอิงเปรียบเทียบ เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการเดียวกันกับตัวอย่าง ปาล์มน้ำมัน นำสารละลายที่ได้นำมากรองผ่านตะแกรงไนลอนขนาด 42 ไมครอน ลงในหลอด สำหรับเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ เก็บไว้ในสภาพมืดและเย็นประมาณ 2-3 นาที จึงนำเข้าเครื่อง วิเคราะห์

2.3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์

ใช้เครื่องฟลูออโรมิเตอร์ FACScalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่) ทำงานด้วย โปรแกรม CELLQUEST (Becton Dickinson) ใช้ 488 นาโนเมตร argon iron laser เป็น แหล่งกำเนิดแสง นำหลอดสารละลายเข้าวิเคราะห์ในเครื่องดังกล่าว กำหนดความยาวคลื่นแสง 585 นาโนเมตร และอ่านค่าสารละลายพันธุกรรม 5,000 nuclei ต่อการวิเคราะห์ตัวอย่าง 1 ครั้ง กำหนดจำนวนซ้ำของตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง ไม่น้อยกว่า 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำวิเคราะห์อย่างน้อย 3 ครั้ง

นำข้อมูลฮิสโทแกรมมาคำนวณเป็นปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ข้อมูลของ *G. max* cv Polanka เป็นดีเอ็นเออ้างอิง และใช้สูตรดังนี้

$$2\text{CDNA content} = \frac{\text{Sample G1 mean FL}}{\text{Reference standard G1 mean FL}} \times \text{DNA content of reference standard}$$

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลจากเครื่องฟลูออโรมิเตอร์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป WinMDI รุ่น 2.9 จากนั้นนำค่า FS, SS, FL, CVs, DF และ YF รวมทั้งปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการทดสอบมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SF3S กำหนดระดับ นัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อจำแนกประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียส โดยสารละลายที่ถูกคัดเลือกจะต้องให้ค่า FL และ YF สูงสุด และค่า %CV และ DF ต่ำสุด (Loureiro et al., 2007) ประกอบกับข้อมูลตำแหน่งของฮิสโทแกรม จะถูกใช้เป็นเกณฑ์ในการ คัดเลือกสารละลายนิวเคลียสที่ดีที่สุดสำหรับปาล์มน้ำมันด้วยเช่นกัน

การกำหนดค่า FS, SS, FL, CV และ DF

FS=Forward scatter as a rough measure of particle's size

SS=Side scatter as a measure of particles optical complexity

FL=Fluorescence intensity of PI-stained nuclei

%CV=G0/G1 peaks as a measure of nuclear intensity and variation in DNA staining.

%DF=Debris background factor as a measure of sample quality

Use the equation:

$$\%DF = \frac{\text{total number of particles} - \text{total number of intact nuclei}}{\text{total number of particles}} \times 100$$

YF=Nuclear yield factor in order to compare the quantity of nuclei in suspension. Use the equation:

$$YF = \frac{\frac{\text{total number of intact nuclei}}{\text{number of second run (s)}}}{\text{weight of tissue (mg)}}$$

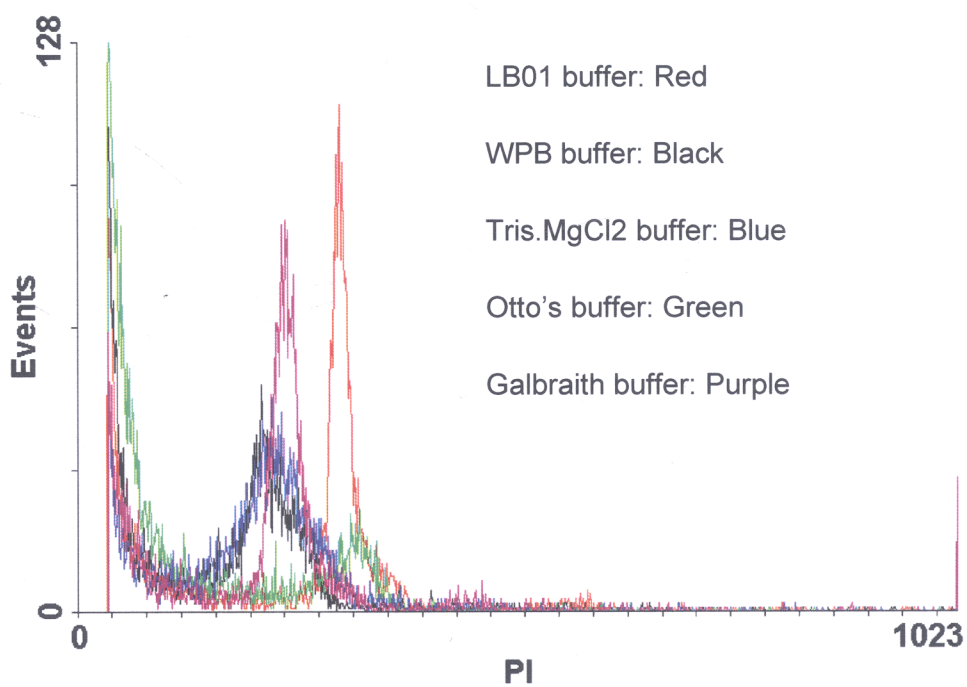
3. ผลการทดลอง

3.1 การเปรียบเทียบชนิดของสารละลายนิวเคลียส ต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยวิธีโฟลไซโทเมทรี

3.1.1 การทดสอบพารามิเตอร์ FS, SS, FL, %CV, DF และ YF

จากการวิเคราะห์โฟลไซโทเมทรี กับคัพภะ และเนื้อเยื่อใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 1-12 เดือน โดยใช้สารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด ได้แก่ Tris.MgCl₂, LB01, Otto's, WPB และ Galbraith และใช้ถั่วเหลือง (2.5 pg) เป็นพีซอ้างอิงแบบภายนอก (external standard) พบว่าสารละลายนิวเคลียสทุกชนิด แสดงฮิสโทแกรม (PI fluorescence intensity) ที่ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของฮิสโทแกรม พบว่าสารละลายนิวเคลียสทั้ง 5 ชนิด แสดงตำแหน่งของฮิสโทแกรมที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 7) เมื่อพิจารณาค่า FS, SS, FL, %CV, DF และ YF ในตารางที่ 1 พบว่า ค่า FS และ SS ของนิวเคลียสที่แยกจากคัพภะ และใบอ่อนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ในช่วงอายุต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายบัพเฟอร์ทุกชนิด แต่เมื่อพิจารณาจากภาพ density plot เป็นที่น่าสังเกตว่ากลุ่มนิวเคลียสอยู่นอกสเกลของ density plot ซึ่งอาจจะหมายถึงระดับของ FS และ SS มีค่าสูงมาก (ตารางที่ 2 และภาพที่ 8 และ 9) นอกจากนี้ยังพบว่า %CV และ DF ยังมีค่าสูงในทุกระยะการเจริญ และทุกชนิดของสารละลายนิวเคลียส ทั้งนี้ อาจจะเป็นผลมาจากปฏิกิริยาที่เรียกว่า "the tannic acid effect" ซึ่งปาล์มน้ำมันสามารถหลั่งสารกลุ่มแทนนินออกมาบริเวณการอ่านผลโฟลไซโทเมทรี (Loureiro *et al.*, 2006a)

สำหรับประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสแต่ละชนิดต่อการวิเคราะห์โฟลไซโทเมทรีของนิวเคลียสคัพภะปาล์มน้ำมัน พบว่าสารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 ให้ค่า FL สูงที่สุดเป็นลำดับที่สอง (299.73) และให้ค่า %CV ต่ำที่สุดเป็นลำดับที่หนึ่ง (4.57%) แต่ให้ค่า YF ต่ำที่สุดคือ 0.68 nuclei s⁻¹ mg⁻¹ สารละลายนิวเคลียสชนิด Otto's ให้ค่า FL สูงที่สุดเป็นลำดับที่หนึ่ง (385.55) และให้ค่า %CV ต่ำที่สุดเป็นลำดับที่สอง (4.93%) สารละลายนิวเคลียสชนิด Galbraith ให้ค่า DF ต่ำที่สุดเป็นลำดับที่หนึ่ง (98.90%) และให้ค่า YF สูงที่สุดเป็นลำดับที่สองคือ 0.96 nuclei s⁻¹ mg⁻¹ สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB ให้ค่า YF สูงที่สุดเป็นลำดับที่หนึ่ง คือ 0.99 nuclei s⁻¹ mg⁻¹ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่า ค่า DF และ YF ไม่มีความแตกต่างกันในทุกชนิดของสารละลายนิวเคลียส ยกเว้น ค่า FL และ %CV สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 และ Otto's จึงมีความเหมาะสมที่จะถูกเลือกนำไปใช้ (p<0.05) ในการวิเคราะห์กับคัพภะของปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 7 แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียส จากคัพภะปาล์มน้ำมันที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด

ตารางที่ 2 แสดงพารามิเตอร์โฟลไซโทเมตรี ของนิวเคลียสจากคัพภะและใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1-12 เดือน

Growth stages	Buffer	FCM Parameters (Mean \pm SD)					
		FS (channel unit)	SS (channel unit)	FL (channel unit)	CV (%)	DF (%)	YF (nuclei s ⁻¹ mg ⁻¹)
Embryos	LB01	4149.60 \pm 2950.15 ^a	862.30 \pm 504.36 ^a	299.73 \pm 4.98 ^{ab}	4.57 \pm 0.38 ^a	99.22 \pm 0.15 ^a	0.68 \pm 0.36 ^a
	WPB	6723.60 \pm 4975.76 ^a	765.77 \pm 366.31 ^a	211.36 \pm 10.59 ^{bc}	6.59 \pm 2.15 ^{ab}	99.13 \pm 0.59 ^a	0.99 \pm 0.78 ^a
	Otto's	6854.67 \pm 5155.52 ^a	2738.87 \pm 2078.82 ^a	385.55 \pm 52.42 ^a	4.93 \pm 0.38 ^a	99.08 \pm 0.35 ^a	0.78 \pm 0.12 ^a
	Tris.MgCl ₂	6181.40 \pm 4571.84 ^a	1582.60 \pm 1037.63 ^a	208.91 \pm 14.46 ^{bc}	7.31 \pm 0.30 ^{ab}	98.93 \pm 0.09 ^a	0.96 \pm 0.26 ^a
	Galbraith	5860.37 \pm 4286.90 ^a	1163.43 \pm 585.23 ^a	166.33 \pm 60.00 ^c	8.93 \pm 2.11 ^b	98.90 \pm 0.33 ^a	0.96 \pm 0.86 ^a
One month-old seedlings	LB01	861.93 \pm 136.86 ^a	496.63 \pm 218.05 ^a	156.30 \pm 72.84 ^b	11.22 \pm 3.73 ^a	98.61 \pm 1.09 ^a	0.52 \pm 0.26 ^a
	WPB	919.73 \pm 39.66 ^a	593.13 \pm 152.19 ^a	314.65 \pm 38.29 ^a	8.75 \pm 3.48 ^a	99.74 \pm 0.17 ^a	0.27 \pm 0.13 ^{ab}
	Otto's	944.00 \pm 113.46 ^a	672.70 \pm 434.13 ^a	159.87 \pm 67.45 ^{ab}	12.87 \pm 11.39 ^a	99.89 \pm 0.06 ^a	0.10 \pm 0.05 ^b
	Tris.MgCl ₂	*666.00 \pm 576.86 ^a	*457.50 \pm 446.86 ^a	*72.74 \pm 64.19 ^b	*8.36 \pm 7.26 ^a	*64.87 \pm 56.25 ^a	*0.03 \pm 0.03 ^b
	Galbraith	1019.40 \pm 1.25 ^a	1009.533 \pm 7.98 ^a	94.16 \pm 37.32 ^b	18.86 \pm 5.77 ^a	99.94 \pm 0.01 ^a	0.07 \pm 0.03 ^b
Three month-old seedlings	LB01	707.70 \pm 250.07 ^a	273.27 \pm 220.98 ^a	203.72 \pm 85.90 ^a	6.52 \pm 3.89 ^{bc}	93.41 \pm 10.08 ^b	1.81 \pm 2.46 ^a
	WPB	881.87 \pm 49.47 ^a	263.80 \pm 143.24 ^a	281.17 \pm 21.57 ^a	6.45 \pm 1.56 ^{bc}	99.80 \pm 0.06 ^b	0.21 \pm 0.05 ^a
	Otto's	-	-	-	-	-	-
	Tris.MgCl ₂	911.03 \pm 56.91 ^a	233.60 \pm 137.67 ^a	59.12 \pm 6.17 ^b	12.86 \pm 1.72 ^c	99.82 \pm 0.02 ^b	0.15 \pm 0.03 ^a
	Galbraith	*272.83 \pm 472.56 ^{ab}	*141.57 \pm 245.20 ^a	*14.18 \pm 24.55 ^b	*1.63 \pm 2.82 ^{ab}	*32.65 \pm 56.55 ^{ab}	*0.41 \pm 0.71 ^a

Six month-old seedlings	LB01	658.13 ± 249.40 ^{ab}	326.37 ± 295.42 ^a	223.24 ± 24.34 ^{ab}	6.38 ± 1.01^{ab}	96.44 ± 2.17^a	1.38 ± 0.66^{ab}
	WPB	922.20 ± 24.53 ^a	365.93 ± 227.66 ^a	362.78 ± 44.11^a	4.47 ± 1.65^{ab}	99.59 ± 0.26 ^a	0.50 ± 0.30 ^{ab}
	Otto's	863.10 ± 49.96 ^a	306.53 ± 196.14 ^a	228.19 ± 106.14^{ab}	7.18 ± 1.30 ^{ab}	99.72 ± 0.08 ^a	0.23 ± 0.10 ^b
	Tris.MgCl ₂	*179.10 ± 310.21 ^b	*18.37 ± 31.81 ^a	*94.15 ± 163.07 ^b	*2.47 ± 4.28 ^a	*33.28 ± 57.65 ^a	*0.05 ± 0.09 ^b
	Galbraith	853.40 ± 179.79 ^a	538.93 ± 319.73 ^a	161.35 ± 12.76 ^{ab}	10.11 ± 1.22 ^b	97.03 ± 1.96^a	1.74 ± 0.87^a
Twelve month-old seedlings	LB01	466.70 ± 103.06 ^a	147.93 ± 116.39 ^a	164.34 ± 41.55 ^{bc}	10.28 ± 5.14 ^a	97.57 ± 0.12^a	0.83 ± 0.23^a
	WPB	909.67 ± 34.12 ^a	224.33 ± 57.91 ^a	285.49 ± 28.90^a	6.91 ± 2.65^a	99.71 ± 0.17 ^a	0.34 ± 0.14^a
	Otto's	720.23 ± 63.31 ^a	142.43 ± 55.40 ^a	238.15 ± 25.23^{ab}	8.41 ± 3.06^a	99.59 ± 0.33^a	0.27 ± 0.23 ^a
	Tris.MgCl ₂	470.17 ± 98.76 ^a	141.43 ± 48.14 ^a	201.03 ± 24.71 ^{ab}	7.33 ± 0.55 ^a	99.70 ± 0.09 ^a	0.21 ± 0.06 ^a
	Galbraith	*425.50 ± 378.34 ^a	*395.30 ± 426.18 ^a	*83.11 ± 72.02 ^c	*8.63 ± 7.60 ^a	*64.73 ± 56.12 ^a	*1.11 ± 0.98 ^a

Values are given as mean and standard deviation of the mean (SD) of forward scatter (FS, channel units), side scatter (SS, channel units), fluorescence (FL, channel units), coefficient of variation of G0/G1 DNA peak (CV, %), debris background factor (DF, %) and yield factor (YF, %).

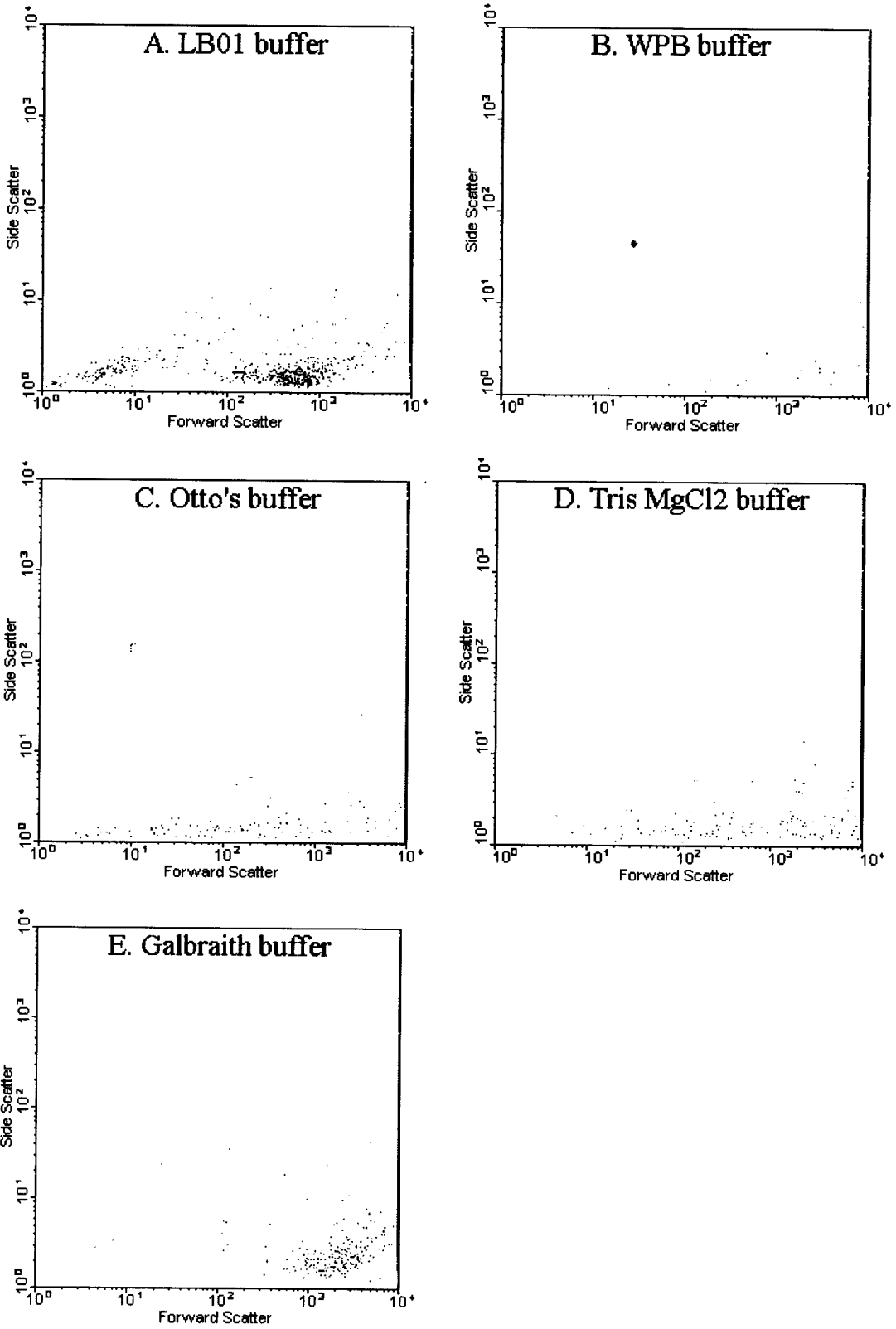
Means for the same growth stages followed by the same letter (a, b or c) are not statistically different according to the multiple comparison Tukey test at $P \leq 0.05$.

The parameter's first and second highest (FL and YF) and lowest (CV and DF) values of the estimation in each essential parameter are shown in bold type.

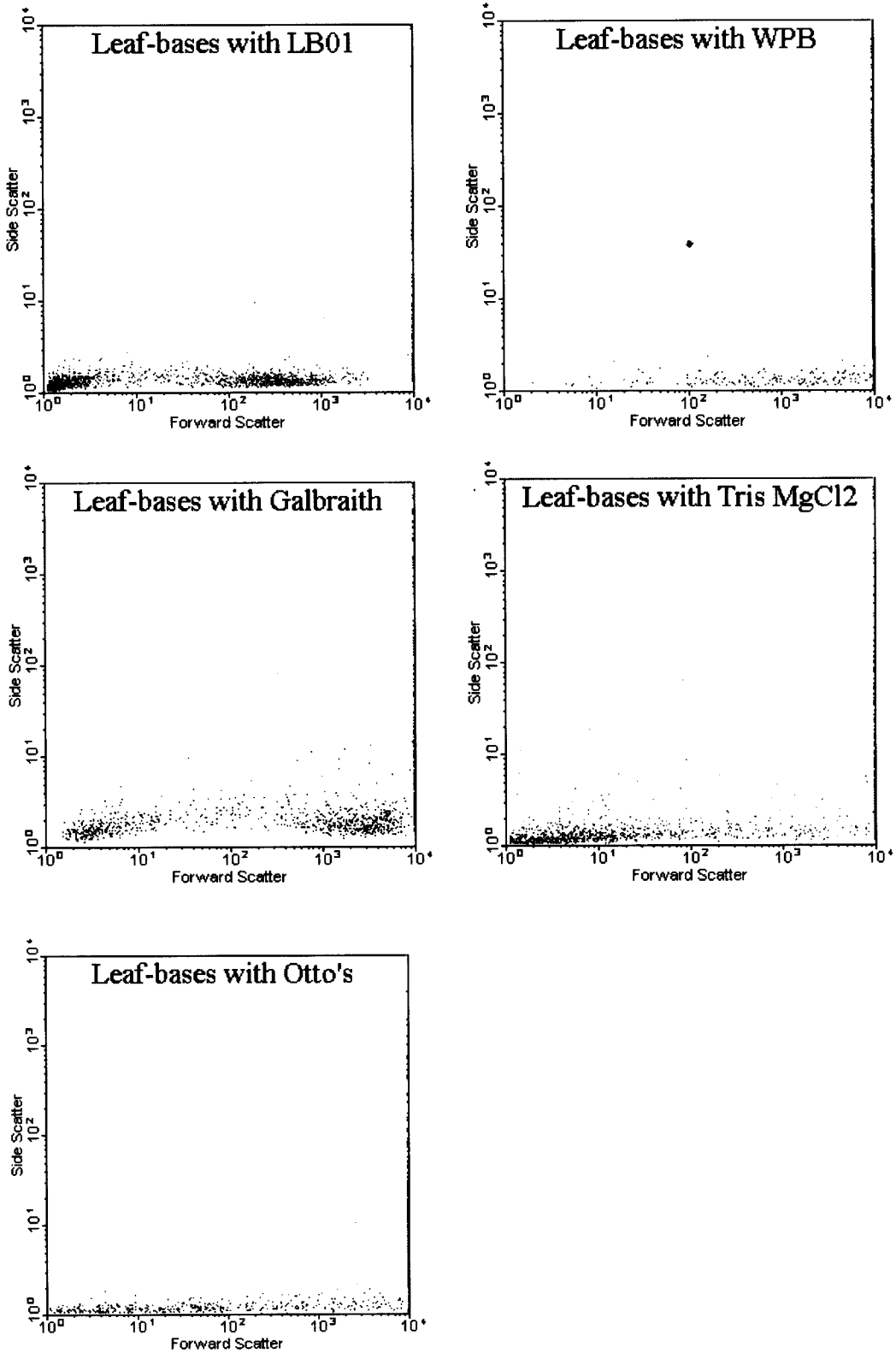
The nuclear lysis buffer chosen for the FCM of oil palm embryos and one to twelve month-old seedlings of oil palm are shown in bold type.

* Buffer did not produce their nuclei from some leaf positions.

- No oil palm nuclei peaks were distinguishable.



ภาพที่ 8 Density plot แสดงค่า forward scatter (logarithmic scale, FS log) vs. side scatter (Logarithmic scale, SS log) ของนิวเคลียสจากคัพอะปาล์มน้ำมันที่แยกด้วยสารละลายนิวเคลียสต่างชนิดกัน



ภาพที่ 9 Density plot แสดงค่า forward scatter (logarithmic scale, FS log) vs. side scatter (Logarithmic scale, SS log) ของนิวเคลียสจากฐานใบอ่อนต้นกล้วยน้ำมั้นที่แยกด้วยสารละลายนิวเคลียสต่างชนิดกัน

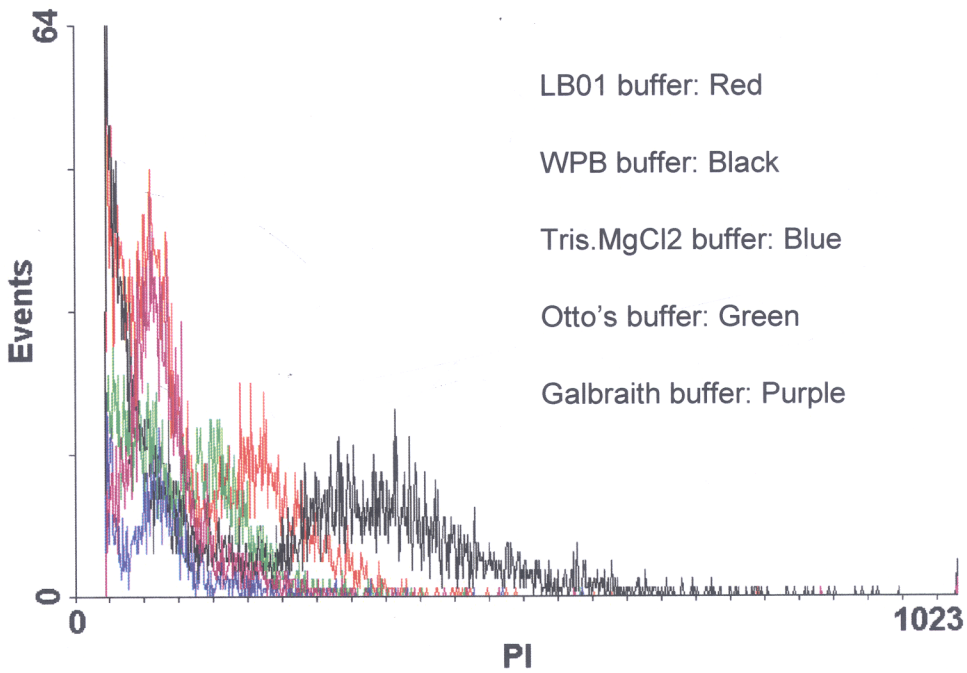
สำหรับประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสแต่ละชนิดต่อการวิเคราะห์โฟลไซโทเมตรีของนิวเคลียสจากไบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 1-12 เดือน พบว่า เมื่อวิเคราะห์กับไบอ่อนจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือน สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB ให้ค่า FL สูงที่สุดเป็นลำดับที่หนึ่ง (314) และให้ค่า %CV ต่ำที่สุดเป็นลำดับที่หนึ่งเช่นกัน (8.75%) และให้ค่า DF ต่ำที่สุดเป็นลำดับที่สอง (99.74%) และ YF สูงที่สุดเป็นลำดับที่สอง ($0.27 \text{ nuclei s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) ขณะที่สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 ให้ค่า YF สูงที่สุดเป็นลำดับที่หนึ่ง ($0.52 \text{ nuclei s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) และ DF ต่ำที่สุดเป็นลำดับที่หนึ่ง (98.61%) ดังนั้นต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือนจึงควรเลือกใช้สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB เป็นสารละลายในการสกัดนิวเคลียส (FL สูงที่สุด %CV ต่ำที่สุด YF และ DF สูงและต่ำเป็นอันดับรอง) (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 10)

ต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 เดือน มีเฉพาะสารละลายนิวเคลียสชนิด WPB ให้ค่า FL สูงที่สุด และ %CV ต่ำที่สุดเป็นลำดับที่หนึ่ง (281.17 และ 6.45%) ขณะที่สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 ให้ค่า DF ต่ำที่สุด และ YF สูงที่สุดเป็นลำดับที่หนึ่ง (93.41% และ $1.81 \text{ nuclei s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) ดังนั้นสารละลายนิวเคลียสที่มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 เดือนคือสารละลายนิวเคลียสชนิด WPB และ LB01 (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 11)

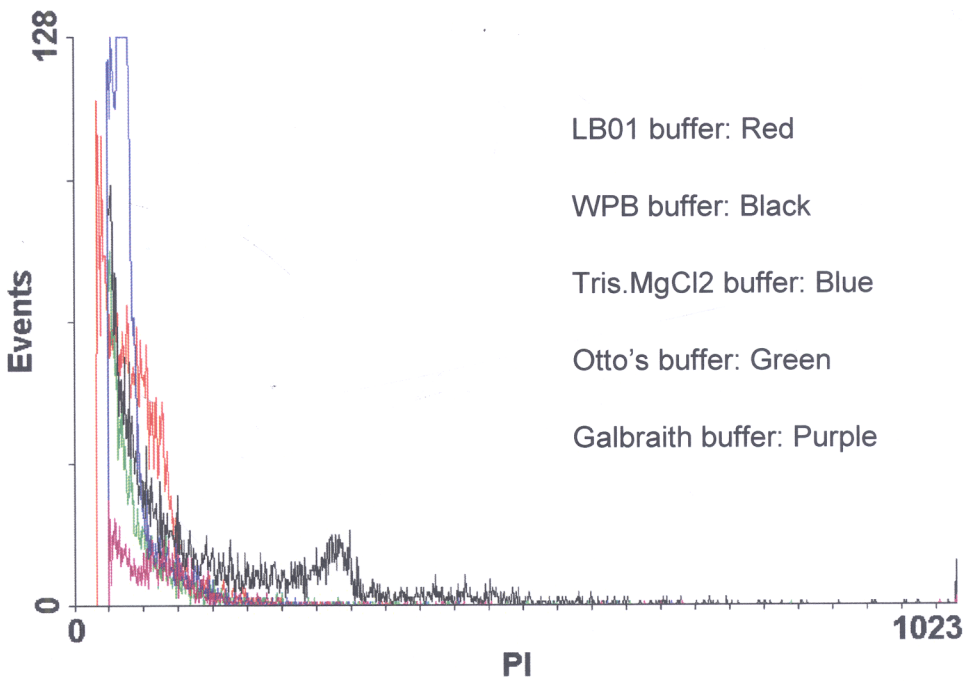
ต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 6 เดือน สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 ให้ค่า DF ต่ำที่สุดเป็นอันดับหนึ่ง (96.44%) และให้ค่า YF สูงที่สุดเป็นอันดับสอง ($1.38 \text{ nuclei s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) ขณะที่สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB ให้ค่า FL สูงที่สุดเป็นอันดับหนึ่ง (362.28) และ %CV ต่ำที่สุดเป็นอันดับหนึ่ง (4.47%) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองกับต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือน ที่ให้ค่า FL สูงที่สุดเป็นอันดับหนึ่ง (285.49) และ %CV ต่ำที่สุดเป็นอันดับหนึ่ง (6.91%) เมื่อแยกนิวเคลียสด้วยสารละลายนิวเคลียสชนิด WPB (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 12 และ 13)

ดังนั้น สารละลายนิวเคลียสที่มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของต้นปาล์มน้ำมันจึงเป็นสารละลาย WPB เท่านั้น เพราะนอกจากให้ค่า FL สูงที่สุด และ %CV ต่ำที่สุดแล้ว ตำแหน่งฮิสโทแกรมยังมีการปรากฏในตำแหน่งคงที่ สำหรับ LB01 แม้ว่าจะให้ค่า YF สูงที่สุด และให้ค่า DF ต่ำที่สุดแล้วก็ตาม แต่ตำแหน่งของฮิสโทแกรมกลับมีการปรากฏในตำแหน่งที่ไม่คงที่ ขณะที่สารละลายนิวเคลียสชนิดอื่น ให้ค่า Parameter ต่าง ๆ ไม่เป็นที่น่าพอใจ

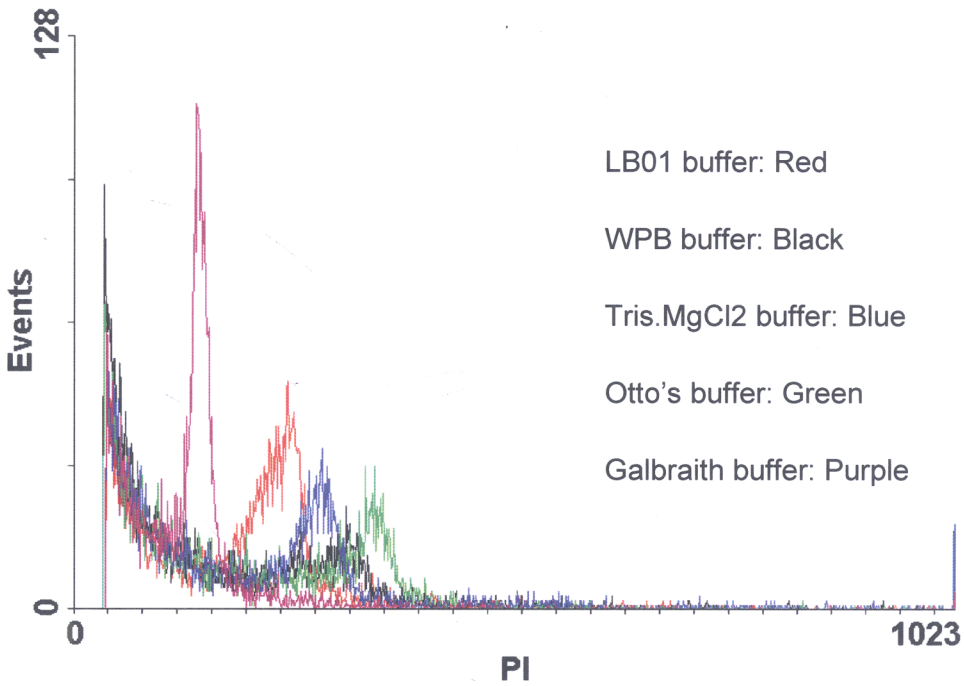
สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คหกิจหลวง อรรถกระวีสุนทร



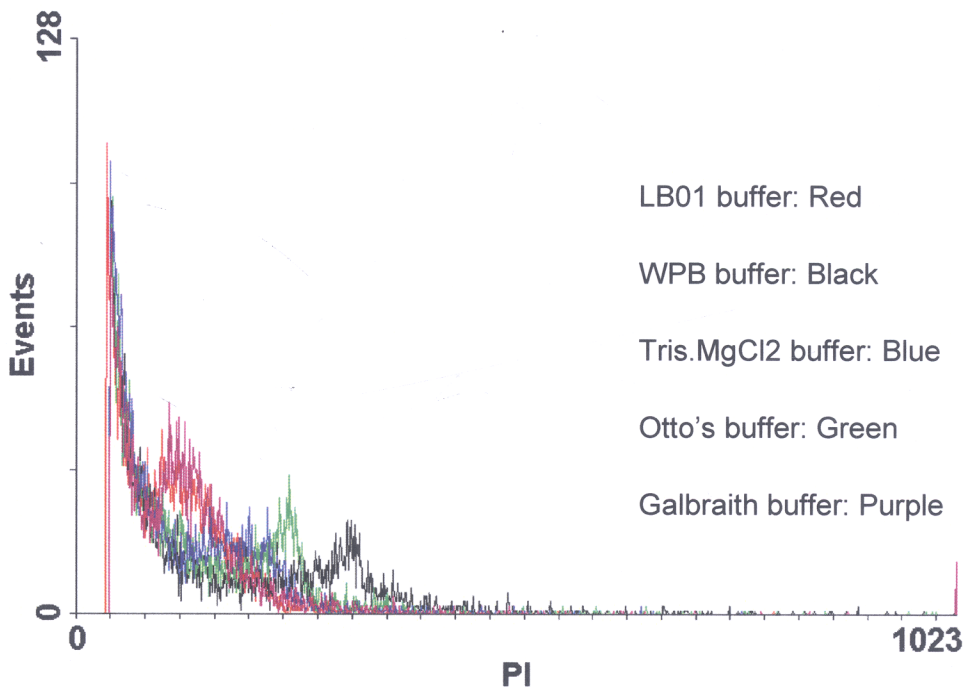
ภาพที่ 10 แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือน ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด



ภาพที่ 11 แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 3 เดือน ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด



ภาพที่ 12 แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 6 เดือน ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด



ภาพที่ 13 แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือน ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด

3.1.2 การเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอ ขนาดจีโนมของคัพภะ และไบอ่อนปาล์มน้ำมัน

เมื่อวิเคราะห์คัพภะปาล์มน้ำมัน ด้วยวิธีโพลไซโทเมทรี โดยใช้สารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด โดยใช้ไบอ่อนของถั่วเหลืองเป็นพีชอ้างอิงมาตรฐานแบบภายนอก (external standard) พบว่า สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 ให้ค่าปริมาณดีเอ็นเอของคัพภะปาล์มน้ำมันเท่ากับ 3.7 – 3.8 pg ขณะที่สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB, Otto's, Tris.MgCl₂ และ Galbraith ให้ค่าปริมาณดีเอ็นเอของคัพภะปาล์มน้ำมัน เท่ากับ 2.7- 3.0 pg, 4.2 - 5.2 pg, 2.7 - 2.8 pg และ 1.8 - 3.1 pg ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 1) เมื่อพิจารณาจากค่าสูงสุด-ต่ำสุดของพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากการวิเคราะห์ในข้อ 3.1.1 พบว่า สารละลายนิวเคลียสชนิดที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากคัพภะปาล์มน้ำมันคือ LB01 ดังนั้น ปริมาณดีเอ็นเอของคัพภะปาล์มน้ำมันที่ยอมรับได้คือ 3.7-3.8 pg สำหรับสารละลาย LB01 และ 4.2-5.2 pg สำหรับสารละลาย Otto's

เมื่อวิเคราะห์ไบอ่อน (ปลายใบ กลางใบ และฐานใบ) จากต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1-12 เดือน ด้วยวิธีโพลไซโทเมทรี โดยใช้สารละลายนิวเคลียส และพีชอ้างอิงชนิดเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของคัพภะปาล์มน้ำมัน พบว่า ตำแหน่งไบอ่อนที่มีความเหมาะสมสำหรับการแยกนิวเคลียสออกมา คือ ตำแหน่งฐานใบ เพราะฮิสโทแกรมที่ได้แสดงถึง %CV ที่ต่ำ และมีการหลังสารออกมารบกวนการอ่านผลน้อย จึงเป็นลักษณะฮิสโทแกรมที่ดี และตำแหน่งของฮิสโทแกรม เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารละลายนิวเคลียสชนิด WPB พบว่า กล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือน มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 4.3 pg (ตารางที่ 3) แต่หากพิจารณาผลการวิเคราะห์ที่ตำแหน่งฐานไบอ่อน พบว่าฐานไบอ่อนกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือน มีปริมาณดีเอ็นเอ เท่ากับ 3.69 pg (ตารางภาคผนวกที่ 1) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์จากคัพภะปาล์มน้ำมันด้วยสารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 และจากการวิจัยก่อนหน้านี้ (Rival et al., 1997; Srisawat et al., 2005; Madon et al., 2008) ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าฐานไบอ่อนปาล์มน้ำมันไม่มีผลมาจาก “the tannic acid effect” เช่นเดียวกับคัพภะของปาล์ม น้ำมัน ขณะที่สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01, Otto's, Tris.MgCl₂, และ Galbraith ให้ค่าปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 1.95, 2.08, 1.38 และ 1.22 pg ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 2 - 6)

ตารางที่ 3 ปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนมของคัพพะและใบอ่อนจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1-12 เดือน

Growth stages	Buffers	C-DNA values (Mean \pm SD)		
		2C (pg)	1C (Mbp)	Peak CV (%)
Embryos	LB01	3.75 \pm 0.06 ^b	1834	4.57 \pm 0.38 ^a
	WPB	2.91 \pm 0.15 ^{bc}	1422	6.59 \pm 2.15 ^{ab}
	Otto's	4.88 \pm 0.57 ^a	2389	4.93 \pm 0.38 ^a
	Tris.MgCl ₂	2.80 \pm 0.04 ^{bc}	1370	7.31 \pm 0.30 ^{ab}
	Galbraith	2.25 \pm 0.71 ^c	1100	8.93 \pm 2.11 ^{cb}
One month-old seedlings	LB01	1.95 \pm 0.91 ^b	954	11.22 \pm 3.73 ^a
	WPB	4.30 \pm 0.54 ^a	2103	8.75 \pm 3.48 ^a
	Otto's	2.08 \pm 0.88 ^b	1017	12.87 \pm 11.39 ^a
	Tris.MgCl ₂	*1.38 \pm 0.22 ^b	675 597	8.36 \pm 7.26 ^a
	Galbraith	1.22 \pm 0.48 ^b	-	18.86 \pm 5.77 ^a
Three month-old seedlings	LB01	2.44 \pm 1.09 ^a	1193	6.52 \pm 3.90 ^{ab}
	WPB	3.81 \pm 0.30 ^a	1863	6.45 \pm 1.56 ^{ab}
	Otto's	-	-	-
	Tris.MgCl ₂	0.75 \pm 0.43 ^b	367	12.86 \pm 1.72 ^a
	Galbraith	*0.55	269	1.63 \pm 2.82 ^{ab}

Six month-old seedlings	LB01	2.76 ± 0.31 ^b	1350	6.38 ± 1.01 ^b
	WPB	4.91 ± 0.56 ^a	2401	4.47 ± 1.65 ^b
	Otto's	3.10 ± 1.44 ^{ab}	1516	7.18 ± 1.30 ^{ab}
	Tris.MgCl ₂	*3.46	1692	2.47 ± 4.28 ^b
	Galbraith	1.94 ± 0.16 ^b	949	10.11 ± 1.22 ^a
Twelve month-old seedlings	LB01	2.02 ± 0.51 ^{bc}	988	10.28 ± 5.14 ^a
	WPB	3.82 ± 0.39^a	1868	6.91 ± 2.65 ^a
	Otto's	2.99 ± 0.31 ^{ab}	1462	8.41 ± 3.06 ^a
	Tris.MgCl ₂	2.71 ± 0.33 ^b	1325	7.33 ± 0.55 ^a
	Galbraith	*1.57 ± 0.04 ^c	768	8.63 ± 7.60 ^a

Values are given as mean and standard deviation of the mean genome in mass values (2C, pg) and base pair (1C, Mbp), 1 pg = 978 Mbp (Dolezel *et al.*, 2003) using *Glycine max* cv. Polanka (2C=2.5 pg) as external reference plant

Means for the same growth stages followed by the same letter (a b or c) are not statistically different according to the multiple comparison Tukey test at $P \leq 0.05$.

The nuclear lysis buffer chosen for the FCM of oil palm embryos and three and twelve month-old seedlings of oil palm are shown in bold type.

* Buffer did not produce their nuclei from some leaf positions.

- No oil palm nuclei peaks were distinguishable.

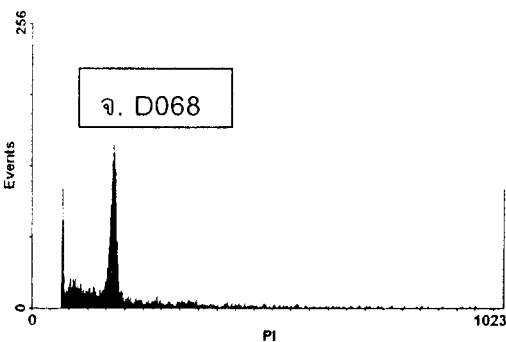
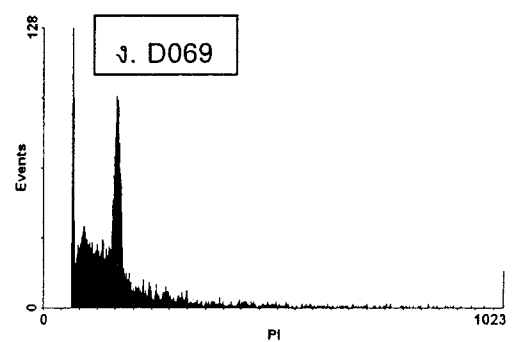
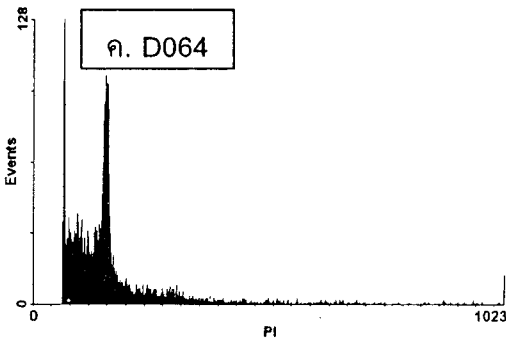
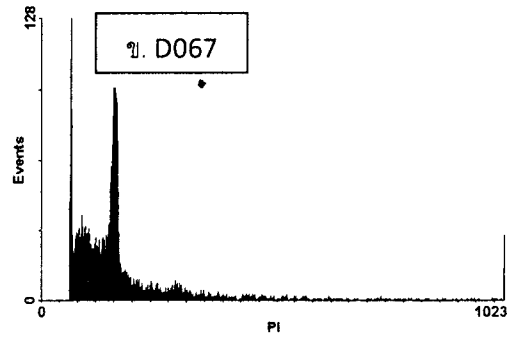
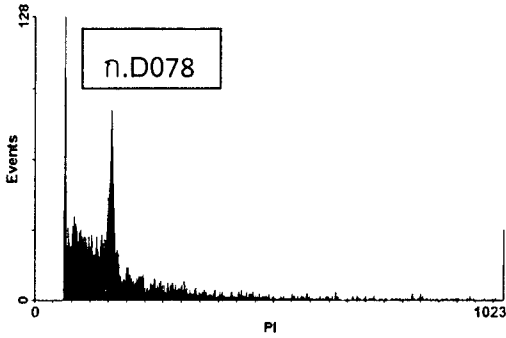
สำหรับต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3-12 เดือน พบว่าตำแหน่งปลายใบ และกลางใบอ่อน ไม่เหมาะที่จะใช้ในการสกัดนิวเคลียสด้วยสารละลายนิวเคลียสชนิด Otto's, Galbraith และ Tris.MgCl₂ ดังนั้น ตำแหน่งฐานใบอ่อนจึงถูกเลือกใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันต้นแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา ต่อไป เมื่อใช้สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 และ 12 เดือน มีค่าเท่ากัน คือ 3.8 pg ขณะที่สารละลายนิวเคลียสชนิดอื่นให้ค่าปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไป (ตารางที่ 3)

เป็นที่น่าสังเกตว่าสารละลายนิวเคลียสชนิดที่ถูกเลือกใช้สำหรับคัพภะ (LB01) และต้นกล้าปาล์มน้ำมัน (WPB) แสดงค่าปริมาณดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน คือ 3.7 และ 3.8 pg ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ และตำแหน่งของฮิสโทแกรม สารละลายนิวเคลียส WPB จึงถูกใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของต้นแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา ต่อไป

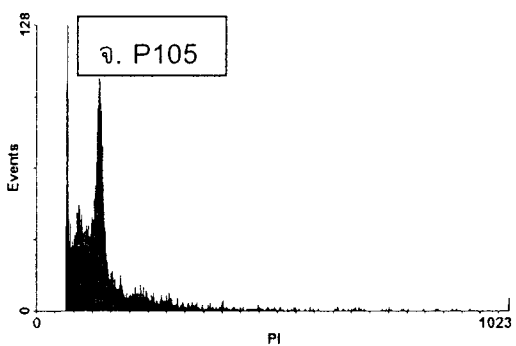
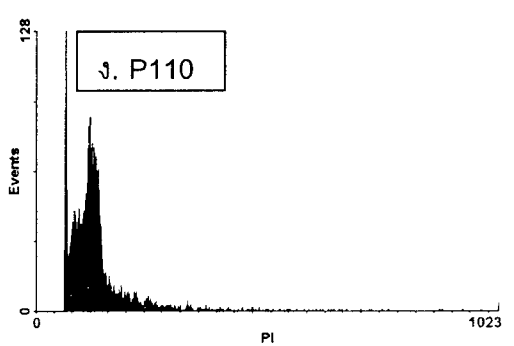
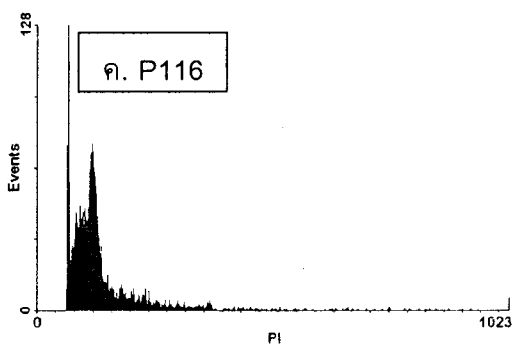
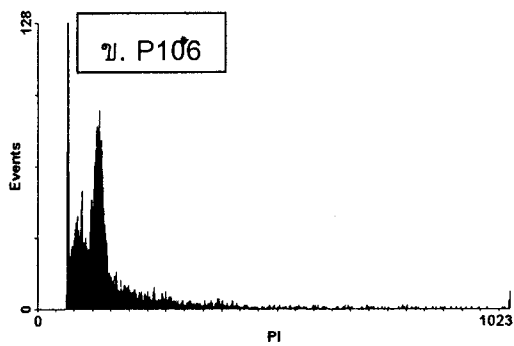
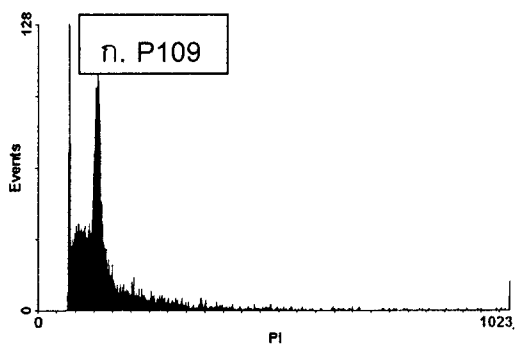
3.2 การเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนม จากใบอ่อนต้นปาล์มน้ำมันแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา

เมื่อวิเคราะห์เนื้อเยื่อใบอ่อนปาล์มน้ำมัน ของต้นแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา ที่มีอายุ 10 ปี จำนวนชนิดละ 5 ต้นพันธุ์ ด้วยวิธีโพลีไซโทเมทรี โดยใช้สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB และใช้ใบอ่อนของลูกผสมเทเนอรา (2C=3.8 pg) เป็นพีชอ้างอิงมาตรฐานแบบภายนอก (external standard) พบว่า ฮิสโทแกรมของต้นแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา ในกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1-6 ให้ลักษณะของฮิสโทแกรมที่ดี มีค่า %CV ต่ำ และตำแหน่งของฮิสโทแกรมในสายพันธุ์เดียวกันจะอยู่ในตำแหน่งซ้อนทับกัน ขณะที่ฮิสโทแกรมของทั้งสองสายพันธุ์ปรากฏ ณ ตำแหน่งที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน และต่างไปจากตำแหน่งฮิสโทแกรมของลูกผสมเทเนอรา (ภาพที่ 14 ก - จ; ภาพที่ 15 ก - จ; ภาพที่ 16 ก - ง) (ถูกปรับลด voltage ของ FL2 detector เพื่อให้ฮิสโทแกรมของทั้งสามสายพันธุ์ ปรากฏในมุมมองที่ใกล้เคียง) ผลการวิเคราะห์พบว่า กลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 ต้นแม่พันธุ์ดูร่า (D078) และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา (P109) มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 6.88 และ 6.14 pg ตามลำดับ กลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 ต้นแม่พันธุ์ดูร่า (D067) และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา (P106) มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 7.13 และ 5.96 pg ตามลำดับ กลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 3 ต้นแม่พันธุ์ดูร่า (D064) และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา (P116) มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 6.70 และ 5.37 pg ตามลำดับ กลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 4 ต้นแม่พันธุ์ดูร่า (D069) และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา (P105) มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 6.35 และ 5.44 pg ตามลำดับ กลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 5 ต้นแม่พันธุ์ดูร่า (D064) และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา (P110) มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 6.70 และ 5.90 pg ตามลำดับ และ กลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 6 ต้นแม่พันธุ์ดูร่า (D068) และพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา (P116) มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 7.62 และ 5.37 pg ตามลำดับ

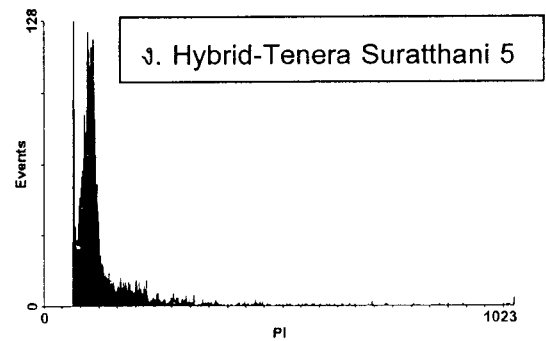
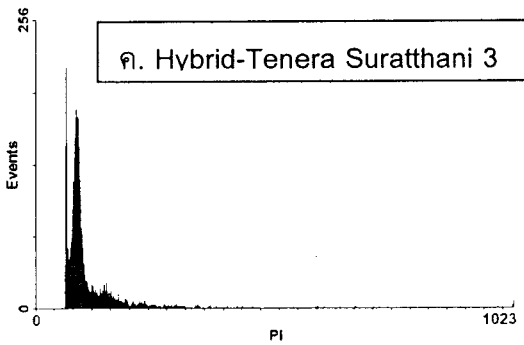
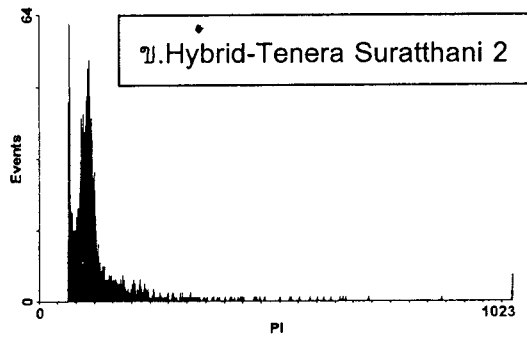
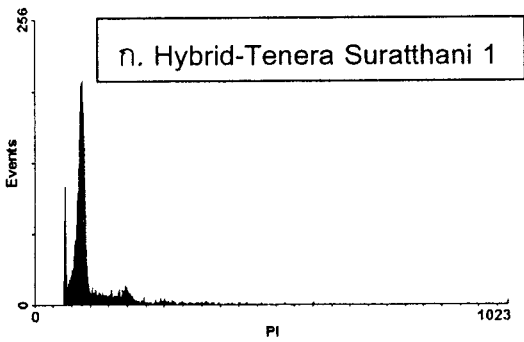
($P < 0.05$) ขนาดจีโนมของต้นปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ดูรา และ ฟิสิเฟอรา จึงอยู่ในช่วง 3100 - 3700 และ 2600 - 3000 Mbp ตามลำดับ (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 14 (ก-จ) แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียส จากใบอ่อนต้นปาล์มน้ำมันแม่พันธุ์ดูราอายุ 10 ปี ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส WPB



ภาพที่ 15 (ก-จ) แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียส จากไบอ้อนตันปาล์มน้ำมันพอพันธุ์พิสิเฟอร์อายุ 10 ปี ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส WPB



ภาพที่ 16 (ก-ง) แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียส จากใบอ่อนต้นปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร์่าสุราษฎร์ธานี 1, 2, 3 และ 5 อายุ 1 ปี ที่ถูกแยกด้วย สารละลายนิวเคลียส WPB

ตารางที่ 4 ปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนมของไบอ่อน จากต้นแม่พันธุ์ปาล์มน้ำมันดูว่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอว่าของลูกผสมเทเนอว่าสุราษฎร์ธานี

Hybrid Tenera	Cultivars (code)	C-DNA values (Mean \pm SD)		
		2C (pg)	1C (Mbp)	Peak CV (%)
Suratthani 1	Deli Dura (D078)	6.88 \pm 0.67 ^{ab}	3362	3.84 \pm 0.49 ^{ab}
	Calabar Pisifera (P109)	6.14 \pm 0.74 ^{ab}	3005	4.58 \pm 0.49 ^{ab}
Suratthani 2	Deli Dura (D067)	7.13 \pm 0.27 ^{ab}	3484	4.17 \pm 0.45 ^{ab}
	LA ME Pisifera (P106)	5.96 \pm 0.66 ^{ab}	2915	6.13 \pm 1.63 ^a
Suratthani 3	Deli Dura (D064)*	6.70 \pm 0.23 ^{ab}	3278	4.52 \pm 0.62 ^{ab}
	DAMI Pisifera (P116)**	5.37 \pm 0.72 ^b	2628	6.08 \pm 1.75 ^{ab}
Suratthani 4***	Deli Dura (D069)	6.35 \pm 0.07 ^{ab}	3103	3.80 \pm 0.34 ^{ab}
	EKONA Pisifera (P105)	5.44 \pm 0.62 ^b	2659	5.08 \pm 1.35 ^{ab}
Suratthani 5	Deli Dura (D064)*	6.70 \pm 0.23 ^{ab}	3278	4.52 \pm 0.62 ^{ab}
	Nigeria Pisifera (P110)	5.90 \pm 1.09 ^{ab}	2884	4.81 \pm 1.58 ^{ab}
Suratthani 6***	Deli Dura (D068)	7.62 \pm 0.14 ^a	3725	3.30 \pm 0.14 ^b
	DAMI Pisifera (P116)**	5.37 \pm 0.72 ^b	2628	6.08 \pm 1.75 ^{ab}

Values are given as mean and standard deviation of the mean genome in mass values (2C, pg) and base pair (1C, Mbp), 1 pg = 978 Mbp (Dolezel *et al.*, 2003) using *Elaeis* cv. Tenera (2C=3.8 pg) as external reference plant

Means for the same growth stages followed by the same letter (a b or c) are not statistically different according to the multiple comparison Tukey test at $P \leq 0.05$.

* Hybrid Tenera Suratthani 3 used the same Deli Dura with Hybrid Tenera Suratthani 5

** Hybrid Tenera Suratthani 3 used the same DAMI Pisifera with Hybrid Tenera Suratthani 6

***No longer available of seed production.

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสในการวิเคราะห์โพลีไซโทเมตรีของพืชแต่ละชนิดมีความจำเป็น เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีโครงสร้างและองค์ประกอบภายในที่แตกต่างกัน จึงไม่มีสารละลายนิวเคลียสชนิดใดที่มีความเหมาะสมต่อพืชทุกชนิด (Loureiro, et al. 2006a, b; Loureiro, et al. 2007) ในปาล์มน้ำมัน ยังไม่มีรายงานการเปรียบเทียบชนิดของสารละลายนิวเคลียสที่มีความเหมาะสม ดังนั้นรายงานวิจัยเรื่องนี้จึงมีประโยชน์สำหรับงานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต่อไป

สารละลายนิวเคลียสทั้ง 5 ชนิดที่ทำการทดลอง มีส่วนประกอบทั้งชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งสารแต่ละตัวทำหน้าที่สำคัญ ๆ ดังนี้ Tris ทำหน้าที่เป็น pH stabilizer พบในสารละลายนิวเคลียสชนิด Tris.MgCl₂ ขณะที่ MOPS ทำหน้าที่เช่นเดียวกัน แต่พบในสารละลายนิวเคลียสชนิด Galbraith ส่วน Triton X-100 ทำหน้าที่ป้องกันการเกาะเป็นกลุ่มของนิวเคลียส และป้องกันการเป็นกลุ่มกันของเศษ debris จึงเป็นส่วนประกอบของสารละลายนิวเคลียสแทบทุกชนิด ยกเว้น Otto's I ที่ใช้ Tween 20 แทน ขณะที่ PVP ทำหน้าที่จับกับสารกลุ่ม phenolic compounds ที่พืชปล่อยออกมา ส่วน MgCl₂ ทำหน้าที่เป็น chromatin stabilizer ซึ่งทำหน้าที่เดียวกับ spermine.4HCl (พบในสารละลายนิวเคลียสชนิด LB01) สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB มีองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ชนิด คือ Na₂EDTA ทำหน้าที่เป็น chelating agent และ sodium metabisulfite (reducing agent) ซึ่งมีหน้าที่หลักช่วยลดปฏิกิริยาการเกิดสารกลุ่ม phenolic compounds สารกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นกรดที่ถูกใส่เป็นองค์ประกอบในสารละลายนิวเคลียส จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของสารกลุ่ม phenolic compounds เช่น citric acid และ sodium citrate ที่พบในสารละลายนิวเคลียสชนิด Otto's และ Galbraith (Loureiro, et al. 2006b)

จากองค์ประกอบต่าง ๆ ของสารละลาย พบว่ามีสารอยู่กลุ่มหนึ่งที่ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาของสารกลุ่ม phenolic compounds ที่เนื้อเยื่อพืชปล่อยออกมา (Altunkaya and Gokmen, 2009) นั่นคือกลุ่ม กรด และกลุ่ม reducing agent สารกลุ่ม phenolic compounds ที่เนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันปล่อยออกมา เช่น แทนนิน จะไปรบกวนการอ่านผลวิเคราะห์โพลีไซโทเมตรี (Loureiro, et al. 2006a) ทำให้คุณภาพของฮิสโทแกรมลดลง และยังส่งผลให้ตำแหน่งของฮิสโทแกรมเปลี่ยนไป สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB ถูกคิดค้นขึ้นเพื่อวิเคราะห์เนื้อเยื่อของไม้ยืนต้นโดยเฉพาะ เนื่องจากไม้ยืนต้นมีคุณสมบัติในการหลั่งสารกลุ่ม phenolic compounds เมื่อเกิดบาดแผล (Loureiro, et al. 2006b) ดังนั้น WPB จึงมีองค์ประกอบสำคัญคือ chelating agent และ reducing agent ซึ่งสารละลายนิวเคลียสจากใบปาล์มน้ำมัน ยังคงมีสีเขียวใส ขณะที่สารละลายนิวเคลียสชนิด

อื่น เมื่อละลายนิวเคลียสจากใบปาล์มน้ำมัน พบว่า จะเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีน้ำตาลใส แสดงให้เห็นว่า sodium metabisulfite มีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสารกลุ่ม phenolic compounds ขณะที่สารกลุ่มกรด ยังมีประสิทธิภาพไม่ดีพอสำหรับเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน ผลที่สอดคล้องกับเรื่องนี้คือค่าพารามิเตอร์ของสารละลายนิวเคลียสใบอ่อนปาล์มน้ำมันโดยใช้ WPB เป็นสารละลายนิวเคลียส พบว่าค่าสูงที่สุดของ FL และ ต่ำที่สุดของ %CV ปรากฏในสารละลายนิวเคลียสที่ใช้ WPB เท่านั้น และเป็นที่น่าสังเกตว่าตำแหน่งของฮิสโทแกรมส่วนใหญ่ยังคงปรากฏ ณ ตำแหน่งเดิม แม้ว่าจะใช้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีอายุต่างกันไปก็ตาม

ส่วนสารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 ซึ่งเป็นสารละลายนิวเคลียสหลักสำหรับการวิเคราะห์คัพพะปาล์มน้ำมัน (2C DNA = 3.7 pg) เมื่อใช้เป็นสารละลายนิวเคลียสสำหรับเนื้อเยื่อใบอ่อนปาล์มน้ำมัน พบว่ายังคงประสิทธิภาพในการสกัดนิวเคลียสที่สูง เนื่องจากค่าสูงที่สุดของ YF และ ค่าต่ำที่สุดของ DF ปรากฏในสารละลายนิวเคลียสชนิดนี้ นอกจากนั้น การมีสาร Spermine.4HCl ที่ทำหน้าที่เป็น chromatin stabilizer เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ช่วยทำให้สามารถสกัดนิวเคลียสออกมาได้จำนวนมากที่สุด แต่เนื่องจากมีเพียง chelating agent (Na_2EDTA) แต่ไม่มี reducing agent ชนิดอื่น ๆ จึงทำให้เกิดการรบกวนการอ่านผลวิเคราะห์จากปฏิกิริยาของสารกลุ่ม phenolic compounds ที่ปล่อยออกมาจากเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน ตำแหน่งของฮิสโทแกรมจึงไม่คงที่ ฉะนั้นสารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 จึงเหมาะสำหรับพืชที่ไม่มีการปล่อยสารกลุ่ม phenolic compounds ออกมา และเหมาะสำหรับการวิเคราะห์กับเนื้อเยื่อคัพพะของปาล์มน้ำมันเท่านั้น

รายงานการวิเคราะห์เนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันโดยใช้สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 เหมือนกัน แต่ใช้พืชอ้างอิงมาตรฐานต่างชนิดกัน ได้แก่รายงานวิจัยของ Rival et al. (1997) ใช้เครื่อง FACScan พืชอ้างอิงคือ *Petunia hybrida* และ Madon et al. (2008) ใช้เครื่อง FACScalibur พืชอ้างอิงคือ *G. max* cv. Polanka ผลที่ได้แสดงปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 3.7 - 3.8 pg ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ที่ได้ปริมาณดีเอ็นเอของคัพพะปาล์มน้ำมันเท่ากับ 3.7 pg (ใช้ LB01 เป็นสารละลายนิวเคลียส ใช้เครื่อง FACScalibur และใช้ *G. max* cv. Polanka เป็นพืชอ้างอิงมาตรฐาน) ซึ่งแม้ว่าในการทดลองดังกล่าวจะมีการใช้พืชอ้างอิงมาตรฐานที่ต่างชนิดกัน และใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่างรุ่นกัน แต่ผลที่ได้ก็ยังคงเท่ากัน จึงเป็นที่ยืนยันได้ว่าชนิดของพืชอ้างอิง และเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ ไม่มีผลต่อการอ่านผลวิเคราะห์แต่อย่างใด อย่างไรก็ตามก็เป็นที่น่าสังเกตว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันในการทดลองครั้งนี้ ได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 3.8 pg โดยใช้สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB แต่เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 พบว่าได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกัน คือ 2.0-2.7 pg ซึ่งให้เห็นว่าประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสต่างชนิดกัน ย่อมส่งผลต่อปริมาณดีเอ็นเอของพืชที่ต่างกันไป การเลือกใช้

สารละลายนิวเคลียสชนิดโคซินิดหนึ่งกับพีช จึงควรต้องทดสอบค่าพารามิเตอร์ FL, %CV, YF และ DF ก่อนเสมอ

การใช้พีชอ้างอิงแบบภายใน (internal standard) ได้รับการยอมรับในผลการวิเคราะห์เซลล์พีชด้วยวิธีโฟลไซโทเมตรี (Greihuber et al., 2007) แต่สำหรับการวิเคราะห์โฟลไซโทเมตรีกับเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน การใช้พีชอ้างอิงแบบภายนอก (external standard) เป็นสิ่งจำเป็น เพราะการใช้พีชอ้างอิงแบบภายใน ไม่สามารถวิเคราะห์และแสดงฮิสโทแกรมให้ปรากฏได้ อาจเป็นผลมาจากลักษณะของนิวเคลียสปาล์มน้ำมันที่เป็นพีชยืนต้นใบเลี้ยงเดี่ยว มีขนาดใหญ่และมีความจำเพาะต่อองค์ประกอบของสารละลายนิวเคลียส สารที่หลั่งออกมาอาจทำปฏิกิริยาหรือนิวเคลียสปาล์มน้ำมัน อาจเกาะกลุ่มกับนิวเคลียสของพีชอ้างอิง (พีชล้มลุก) ดังเห็นได้จากรายงานการวิจัยของ Rival et al. (1997) และ Madon et al. (2008) ที่ต้องใช้พีชอ้างอิงแบบภายนอกเช่นกัน ดังนั้นงานวิจัยต่อไปข้างหน้า ควรที่จะมีการพัฒนาองค์ประกอบของสารละลายนิวเคลียสที่เหมาะสมสำหรับปาล์มน้ำมัน โดยเฉพาะ โดยมุ่งใช้ common buffers เป็นสารละลายนิวเคลียสพื้นฐาน และปรับสูตรสารละลายดังกล่าวให้มีส่วนประกอบของ chromatin stabilizer และ reducing agent เพื่อส่งเสริมความสามารถในการสกัดนิวเคลียส และยับยั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจาก phenolic compounds ดังเช่นที่ปรากฏในสารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 และ WPB ตามลำดับต่อไป

ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของต้นแม่พันธุ์ปาล์มน้ำมันดูว์รา และพ่อพันธุ์ฟิลิเฟอรา ที่มีอายุ 10 ปี จำนวนชนิดละ 5 ต้นพันธุ์ พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความแตกต่างกัน ต้นแม่พันธุ์ดูว์รา มีปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 6.3 - 7.6 pg ต้นพ่อพันธุ์ฟิลิเฟอรา มีปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 5.3 - 6.1 pg ขณะที่ลูกผสมเทเนอราที่ผลิตเป็นคู่ผสมสุราษฎร์ธานี มีการผลิต ณ เวลาที่ได้ดำเนินการวิจัย เพียงแค่ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1, 2, 3 และ 5 ซึ่งแสดงตำแหน่งฮิสโทแกรมที่ซ้อนทับกัน และแสดงปริมาณดีเอ็นเอตามผลที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ (3.8 pg) ต้นแม่พันธุ์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือต้นแม่พันธุ์ Deli Dura ซึ่งมาจากแหล่งปลูกเดียวกัน ขณะที่ต้นพ่อพันธุ์มาจากแหล่งปลูกต่างกัน จึงมีชื่อพันธุ์ทางการค้าต่างกัน ได้แก่ Calabar (พ่อพันธุ์ของลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1), LA ME (พ่อพันธุ์ของลูกผสมสุราษฎร์ธานี 2), DAMI (พ่อพันธุ์ของลูกผสมสุราษฎร์ธานี 3 และ 6), Nigeria (พ่อพันธุ์ของลูกผสมสุราษฎร์ธานี 4) และ EKONA (พ่อพันธุ์ของลูกผสมสุราษฎร์ธานี 5) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าต้นแม่พันธุ์ Deli Dura มีปริมาณดีเอ็นเอที่มากกว่าต้นพ่อพันธุ์ฟิลิเฟอราทุกสายพันธุ์ ขณะเดียวกัน ทั้งแม่พันธุ์ดูว์รา และพ่อพันธุ์ฟิลิเฟอรา มีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าลูกผสมเทเนอราอย่างชัดเจน จึงเป็นข้อมูลที่แตกต่างไปจากการทดลองก่อนหน้านี้ ที่มีรายงานปริมาณดีเอ็นเอของต้นแม่พันธุ์ดูว์รา (D109) เท่ากับ 3.4 pg และพ่อพันธุ์ฟิลิเฟอรา (P168) เท่ากับ 3.2 pg (Srisawat et al., 2005) ขณะที่รายงานของ Madon et al. (2008) ได้รายงาน

ปริมาณดีเอ็นเอของต้นแม่พันธุ์ดูรา และพ่อพันธุ์ฟิสิเฟอรา เท่ากับ 4.1 และ 3.64 pg ตามลำดับ ความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอดังกล่าว อาจเป็นเพราะการใช้สารละลายนิวเคลียสที่ต่างชนิดกัน การทดลองครั้งนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบอ่อน ปาล์มน้ำมัน พบว่า WPB เหมาะที่จะใช้ในการวิเคราะห์กับเนื้อเยื่อใบอ่อนปาล์มน้ำมัน มากกว่า LB01 โดยหากใช้ LB01 ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จะมีค่าต่ำกว่าการใช้ WPB ซึ่งหากเปรียบเทียบกับ รายงานของ Madon et al. (2008) ปริมาณดีเอ็นเอของต้นแม่พันธุ์ดูรา และพ่อพันธุ์ฟิสิเฟอรา จะมีค่าต่ำกว่าปริมาณดีเอ็นเอในการทดลองครั้งนี้ และหากใช้ Tris.MgCl₂ (Srisawat et al., 2005) ปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันต้นแม่พันธุ์ดูรา และพ่อพันธุ์ฟิสิเฟอราที่ได้ จะมีค่าต่ำกว่าการใช้ LB01 และ WPB ดังนั้น รายงานปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันแม่พันธุ์ดูรา และพ่อพันธุ์ฟิสิเฟอรา ในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งใช้ WPB เป็นสารละลายนิวเคลียส จึงมีความน่าเชื่อถือ และจะเป็นข้อมูล สำคัญในโครงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันของประเทศไทยต่อไป

เปรียบเทียบรายงานการวิจัยการตรวจสอบลักษณะพันธุของปาล์มน้ำมันโดยใช้ดีเอ็นเอเป็น เครื่องหมายซึ่งมีโมเลกุล (DNA marker) ด้วยวิธี Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) พบว่าการใช้ Primer P12 และ P15 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น TCTGGTGAGG และ TTGGCACGGG ตามลำดับ สามารถแยกแยะความแตกต่างของปาล์มน้ำมันทั้งสามสายพันธุ์ ออกจากกันได้ โดยเฉพาะ Primer P15 แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะของต้นพันธุ์ดูรามากกว่าฟิสิเฟอรา ขณะที่ ต้นเทเนอรา มีแถบดีเอ็นเอจำเพาะน้อยที่สุด (Sathish and Mohankumar, 2007) รายงานดังกล่าว สอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่แสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นพันธุ์ดูรา มากกว่าฟิสิเฟอรา และ เทเนอรา มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำที่สุด ขณะที่รายงานของ Te-Chato and Thawaro (2008) แสดง Primer OPT06 ในการแยกแยะลูกผสมเทเนอราออกจากแม่พันธุ์ดูราและฟิสิเฟอรา ได้เช่นกัน

รายงานการใช้วิธีการอื่น ๆ ในการจำแนกพันธุกรรมปาล์มน้ำมันโดยการใช้ดีเอ็นเอเป็นตัว บ่งชี้ระดับโมเลกุล เช่น Mayes et al. (2000) ได้นำเอาวิธี RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ที่มีตัวตรวจจับ 40 ตัวที่ครอบคลุมดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน และสามารถใช่วิธีนี้ใน การดูความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน และสามารถจำแนกปาล์มน้ำมันชนิด *Deli Dura* จากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ออกจาก *AVROS Pisifera* ได้ มีการเปรียบเทียบเทคนิคดังกล่าว กับเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis oleifera* (Kunth)) จากอเมริกาและปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis*) จากแอฟริกา พบว่าเทคนิค AFLP สามารถจำแนกพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันที่มาจากแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ ที่ต่างกันได้ดี คือที่มาจาก Brazil, French Guyana/Surinam, Peru และ North of Colombia/Central America (Barcelos et al., 2002) เทคนิคอื่น ๆ ก็สามารถใช้ในการจำแนกพันธุกรรมของปาล์ม น้ำมันได้เช่นกัน เช่น Zehdi et al. (2004) ใช้เทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) โดย

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ Primer ที่มีลำดับเบสที่ซ้ำ ๆ กัน (microsatellite sequence) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการบอกความหลากหลายของอินทผาลัม Tunisian date ได้อย่างรวดเร็ว และเทคนิคนี้ยังใช้ในการแยกลักษณะที่มีความใกล้ชิดกัน (closely related genotype) (Fang and Roose, 1997) และยังใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการจำแนกสายพันธุ์ดีเอ็นเอได้ดีอีกด้วย (Gupta *et al.*, 1994)

การทดลองด้านโพลีไซโทเมตรีสำหรับปาล์มน้ำมันต่อไป คือการพัฒนาสูตรสารละลายนิวเคลียสที่มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น เพราะสารละลายนิวเคลียสที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันควรมีส่วนประกอบของ Chromatin stabilizer (เช่น Spermine.4HCl ใน LB01) และ Reducing agent (เช่น Metabisulfite ใน WPB) ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเพิ่มปริมาณ Yield ของสารพันธุกรรม และยับยั้งปฏิกิริยาของสารกลุ่ม Phenolic compounds อันจะส่งผลให้ค่า FL และ YF สูงขึ้น และค่า %CV และ DF ลดลง และอีกเรื่องหนึ่งที่มีความสำคัญคือ การพัฒนาชนิดของพืชอ้างอิงขึ้นมาใช้เอง เพราะปัจจุบันการทดลองทางด้านโพลีไซโทเมตรีกับเซลล์พืชในประเทศไทย ยังคงต้องอาศัยพืชอ้างอิงจากต่างประเทศเท่านั้น (จาก Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, สาธารณรัฐเชก) หากห้องปฏิบัติการในประเทศไทยสามารถคิดค้นชนิดของพืชอ้างอิงขึ้นมาได้เอง จะมีส่วนช่วยในการพัฒนางานวิจัยโดยการวิเคราะห์โพลีไซโทเมตรีกับเซลล์พืชในประเทศไทย ให้มีมากยิ่งขึ้น

5. สรุปผลการทดลอง

สารละลายนิวเคลียสที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โพลไซโทเมทริกกับเนื้อเยื่อคัพพะปาล์ม น้ำมัน คือ LB01 (2C DNA = 3.7 pg) เพราะให้ค่า YF สูงที่สุด และ DF ต่ำที่สุด ขณะที่สารละลายนิวเคลียสที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โพลไซโทเมทริกกับเนื้อเยื่อต้นกล้าปาล์มน้ำมันเทเนอร์่า คือ WPB (2C DNA = 3.8 pg) เพราะให้ค่า FL สูงที่สุด และ %CV ต่ำที่สุด ตามลำดับ และฮิสโทแกรมที่ได้ จะปรากฏในตำแหน่งที่ค่อนข้างคงที่ เมื่อสกัดนิวเคลียสของเนื้อเยื่อใบอ่อนต้นแม่พันธุ์ปาล์ม น้ำมันสายพันธุ์ดูร่า และพิสิเฟอร่า (ของลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1-6) ด้วยสารละลายนิวเคลียสชนิด WPB พบว่า ทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกัน คืออยู่ในช่วง 6.3 - 7.6 pg และ 5.3 - 6.1 p pg ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณดีเอ็นเอของลูกผสมเทเนอร์่าจากต้นพ่อพันธุ์และต้นแม่พันธุ์ดังกล่าว ยังคงปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 3.8 pg ขนาดจีโนมของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ดูร่า พิสิเฟอร่า และเทเนอร์่า จึงมีค่าอยู่ในช่วงมากกว่า 3000, 2000 และ 1000 Mbp ตามลำดับ ผลที่ได้ยืนยันความแตกต่างกันของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ดูร่า พิสิเฟอร่า และเทเนอร์่าอย่างชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

- ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ชีรพงศ์ จันทรมนิยม, ประกิจ ทองคำ และสมเกียรติ สีสนอง. 2548. เส้นทางสู่ความสำเร็จการผลิตปาล์มน้ำมัน. พิมพ์ครั้งที่ 2. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตปาล์มน้ำมันคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา
- ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี. 2532. ปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี. โครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ปาล์มน้ำมัน สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.
- Altunkaya, A. and Gokmen, V. 2009. Effect of various anti-browning agents on phenolic compounds profile of fresh lettuce (*L. sativa*). Food Chem. Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.085.
- Barcelos, E., Amblard, P., Berthaud, J., and Seguin, M. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular marker. Pesq Agropec Bras. 37(8): 1105-1114.
- Bennett, MD and Leitch, I. 2005. Genome size evolution in plants. In: Gregory T, ed. The evolution of the genome. London: Elsevier Academic Press, 89–162.
- Dolezel, J., Binarova, P. and Lucretti, S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cell by flow cytometry. Biol. Plantarum (Praha). 31(2): 113-120.
- Dolezel, J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. Phytochem. Analysis. 2: 143-154.
- Dolezel, J., Bartos. J., Voglmayr, H. and Greilhuber, J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry Part A. 51A: 127-128.
- Dolezel, J. and Bartos, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Ann. Bot. 95: 99-110.
- Fang, D.Q. and Roose, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor Appl Genet. 95: 408-417.
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P. and Firoozabady, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science. 220: 1049-1051.
- Greihuber, J., Tensch, E. M. and Loureiro, J. 2007 Nuclear DNA content measurement. In: *Flow cytometry with plant cells*. (Eds) Dolezel, J., Greihuber, J. and Suda J. WILEY-VSH Verlag GmbH&Co. KGaA. Weinheim, Germany. pp. 67-101.
- Gupta, M., Chyi, Y-S., Romeo-Severson, J. and Owen, J.L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theor Appl Genet. 89: 998-1006.

- Loureiro, J., Rodriguez, E., Dolezel, J. and Santos, C. 2006a. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Ann. Bot.* 98: 515-527.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Dolezel, J. and Santos, C. 2006b. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Ann. Bot.* 98: 679-689.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Dolezel, J. and Santos, C. 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Ann. Bot.* 1-14. doi:10.1093/annbot/mcm152.
- Madon, M., Phoon, L. Q., Clyde, M. M. and Mohd, D. 2008. Application of flow cytometry for estimation of nuclear DNA content in *Elaeis*. *J Oil Palm Res.* 20: 447-452.
- Mayes, S., Jack, P. L. and Corley, R. H. V. 2000. The use of molecular markers to investigate the genetic structure of an oil palm breeding programme. *Heredity.* 85(3): 288-293.
- Otto, E. J. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: *Methods in cell biology.* (Eds) Darzynkiewickz, Z. and Crissman, H. A. Vol.33. San Diego: Academic Press. pp. 105-110.
- Pfosser, A., Amon, A., Lelley, T. and Heberle-bors, E. 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry.* 21: 387-393.
- Rival, A., Beule, T., Barre, P., Hamon, S., Duval, Y. and Noirot, M. 1997. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Rep.* 16: 884-887.
- Sathish, D. K. and Mohankumar, C. 2007. RAPD markers for identifying oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) parental varieties (*dura* & *pisifera*) and the hybrid *Tenera*. *Indian J Biotechnol.* 6: 354-358.
- Srisawat, T., Kanchanapoom, K., Pattanapanyasat, K., Srikul, S. and Chuthammathat, W. 2005. Flow cytometric analysis of oil palm: a preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration. *Songklanakarini J Sci. Technol.* 27(Suppl. 3): 645-652.
- Srisawat, T. and Kanchanapoom, K. 2005. The influence of physical conditions on embryo and protoplast culture in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *ScienceAsia.* 31: 23-28.
- Te-Chato, S. and Thawaro, S. 2008. RAPD (random amplified polymorphic DNA) marker as a tool for hybrid oil palm verification from half mature zygotic embryo culture. *J Agri. Technol.* 2: 165-176.

Winkelmann, T., Sangwan, R. S. and Schwenke, H. G. 1998. Flow cytometric analyses in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Cyclamen persicum* Mill.: relation between ploidy level and competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17: 400-404.

Output ที่ได้รับจากโครงการวิจัย

-

•

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงปริมาณดีเอ็นเอ (pg) ของคัพภะปาล์มน้ำมันที่สกัดด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด โดยมีพีซีอ้างอิงมาตรฐานคือถั่วเหลือง

Nuclear lysis buffers	Embryos (pg)			Average (pg)
	Rep1	Rep2	Rep3	
LB01	3.82	3.74	3.70	3.75
WPB	2.98	2.73	3.01	2.91
Otto's	4.23	5.22	5.21	4.89
Tris.MgCl ₂	2.84	2.76	2.80	2.80
Galbraith	3.07	1.89	1.79	2.25

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงปริมาณดีเอ็นเอ (pg) ของใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือน ที่สกัดด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด โดยมีพีซีอ้างอิงมาตรฐานคือถั่วเหลือง

Nuclear lysis buffers	Leaf positions (1 month-old seedling) (pg)			Average (pg)
	Leaf apices	Leaf middles	Leaf bases	
LB01	2.90	1.09	1.86	1.95
WPB	4.68	4.53	3.69	4.30
Otto's	1.11	2.33	2.81	2.08
Tris.MgCl ₂	-*	1.23	1.54	1.39
Galbraith	1.73	1.16	0.78	1.22

*ไม่สามารถสกัดนิวเคลียสออกมาได้

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงปริมาณดีเอ็นเอ (pg) ของใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 3 เดือน ที่สกัดด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด โดยมีพีซีอ้างอิงมาตรฐานคือถั่วเหลือง

Nuclear lysis buffers	Leaf positions (3 month-old seedling) (pg)			Average (pg)
	Leaf apices	Leaf middles	Leaf bases	
LB01	1.51	2.17	3.64	2.44
WPB	3.50	4.02	3.93	3.82
Otto's	-*	-*	-*	-
Tris.MgCl ₂	0.72	0.70	0.83	0.75
Galbraith	-*	-*	0.55	0.55

*ไม่สามารถสกัดนิวเคลียสออกมาได้

ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงปริมาณดีเอ็นเอ (pg) ของใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 6 เดือน ที่สกัดด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด โดยมีพีซีอ้างอิงมาตรฐานคือถั่วเหลือง

Nuclear lysis buffers	Leaf positions (6 month-old seedling) (pg)			Average (pg)
	Leaf apices	Leaf middles	Leaf bases	
LB01	2.43	2.82	3.03	2.76
WPB	4.90	5.48	4.36	4.91
Otto's	2.1	2.46	4.75	3.10
Tris.MgCl ₂	-*	-*	3.46	3.46
Galbraith	2.09	1.95	1.78	1.94

*ไม่สามารถสกัดนิวเคลียสออกมาได้

ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงปริมาณดีเอ็นเอ (pg) ของใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือน ที่สกัดด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด โดยมีพีซีอ้างอิงมาตรฐานคือถั่วเหลือง

Nuclear lysis buffers	Leaf positions (12 month-old seedling) (pg)			Average (pg)
	Leaf apices	Leaf middles	Leaf bases	
LB01	1.47	2.12	2.47	2.02
WPB	4.27	3.58	3.61	3.82
Otto's	3.08	2.64	3.24	2.99
Tris.MgCl ₂	2.51	2.52	3.09	2.71
Galbraith	1.60	1.54	-*	1.57

*ไม่สามารถสกัดนิวเคลียสออกมาได้

ตารางภาคผนวกที่ 6 แสดงปริมาณดีเอ็นเอ (pg) ของใบอ่อนปาล์มน้ำมันรวมทุกระยะการเจริญเปรียบเทียบกับคัพภะปาล์มน้ำมัน ที่สกัดด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด โดยมีพีซีอ้างอิงมาตรฐานคือถั่วเหลือง

Nuclear lysis buffers	Average all stages of oil palm seedling (pg)			Embryos (pg)
	Leaf apices	Leaf middles	Leaf bases	
LB01	2.08	2.05	2.75	3.75
WPB	4.34	4.40	3.90	2.91
Otto's	2.10	2.48	3.60	4.89
Tris.MgCl ₂	1.62	1.48	2.23	2.80
Galbraith	1.81	1.55	1.04	2.25

Manuscript

Cultivars classification approach in oil palm by using flow cytometry

Theera Srisawat^{1*}, Kovit Pattanapanyasat² and Jaroslav Dolezel³

¹Oil Palm Research Unit: PSU Suratthani, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Suratthani Campus, Suratthani 84000 Thailand

²Center of Excellence for Flow Cytometry, Office for Research and Development, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700 Thailand

³Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, Sokolovska 6, Olomouc, CZ-77200 Czech Republic

*Corresponding e-mail: theera918s@hotmail.com

Abstract

Efficiencies in each nuclear lysis buffer on flow cytometric analysis (FCM) of oil palm were compared for cultivars classification. Five nuclear lysis buffers (LB01, WPB, Otto's, Tris.MgCl₂ and Galbraith) were used to prepare samples from embryos and unopened leaves of one to twelve months-old seedlings. Although these buffers showed distinct peaks of PI fluorescence for oil palm embryos, the buffers differed considerably in Fluorescence intensity (FL), Coefficient of variance (%CV), Debris factor (%DF) and Yield factor (YF) values when analyzed with their seedlings. The results showed that LB01 was the most suitable buffer (lowest %CV and high FL value) for oil palm embryos resulting in 3.7 pg of 2C DNA. For all seedlings, only WPB gave the highest value of FL and lowest value of %CV resulting approximately in 3.8 pg of 2C DNA whereas the highest value of YF and lowest value of %DF were mostly found in LB01. By the way, only WPB showed consistency position of PI fluorescence histograms when analyzed with all seedlings. WPB was therefore used to classify the cultivars of hybrid Tenera and its parents (Dura and Pisifera) by means of DNA contents. DNA contents of Dura and Pisifera were ranged from 6.3 - 7.6 and 5.3 - 6.1 pg, their genome size (1C DNA contents) is therefore greater than 3000 and 2000 Mbp, respectively. The results confirmed that Dura, Pisifera and Tenera cultivars could be classified by using FCM-derived DNA contents.

Keywords: 2C DNA value, cultivars, flow cytometry, nuclear lysis buffers, oil palm

Introduction

Information of ploidy levels and DNA content is important in any breeding program of plant varieties. Based on fruit structure, oil palm has been systematically classified into 1. Dura (thick shell; less mesocarp) 2. Pisifera (shellless; embryo rarely formed) and 3. Tenera, the Dura×Pisifera hybrid (thin shell; more mesocarp: 60-95%), with high oil content. Tenera is a valuable economically important source of vegetable oil and is increasingly used to power vehicle namely biodiesel. Since there is high potential of conventional cross breeding among Dura and Pisifera cultivars in the first filial hybrid trait, DNA content of the hybrid is probably variable. However, intra-specific identification of these species remains difficulties, since they have very similar morphological features at vegetative phase. The only possible way to identify them is the presence or absence of endocarp or shell of the fruits (Sathish and Mohankumar, 2007). Investigating the variability within the species is therefore important to determine the oil yield representation and to identify unique fruit types that would help in developing improved cultivars (Narasimhamoorthy *et al.*, 2008). Although there are many potential DNA markers to investigate cultivated clone of oil palm (Mayes *et al.*, 2000; Barcelos *et al.*, 2002; Zehdi *et al.*, 2004), difficulties have been encountered when using these procedures on a large scale (Rival *et al.*, 1997).

Flow cytometry (FCM) is the method offering a simple, rapid, accurate and convenient analysis for determining ploidy levels of DNA, assessment and analysis of the cell cycle of large cell populations (Winkelmann *et al.*, 1998; Dolezel, 1991). The extension of FCM analysis was recently supported by the relative complexity of nuclear lysis buffer compositions, which involves peak position and quality and values of DNA content in various species. A systematic comparison of nuclear lysis buffers was done by Loureiro *et al.* (2006a,b) and Loureiro *et al.* (2007) who

compared six of the most common buffers differing in chemical composition: Galbraith, LB01, Otto's, Tris.MgCl₂, GPB (General Purpose Buffer) and WPB (Woody Plant Buffer) (Loureiro *et al.*, 2007) buffers. The buffers have been considered by giving the parameters including higher FL and YF, and lower %CV and DF (Greihuber *et al.*, 2007). However, given the different chemical composition and distinction of plant tissues promoting performed differently in each buffer (Loureiro *et al.*, 2006b). Therefore it is unacceptable to use only single buffer with every plant species (Dolezel and Bartos, 2005).

There are only three previous FCM analyses of oil palm reported by Rival *et al.* (1997), Srisawat *et al.* (2005) and Madon *et al.* (2008). The results of their DNA content have been resembled for 3.7 pg (Rival *et al.* 1997; Srisawat *et al.* 2005) and slightly differed to 3.8 pg (Madon *et al.*, 2008). Not only the differences of the techniques and types of standard used effecting on discrepancies of oil palm DNA content, type of nuclear lysis buffers is also revealing (Loureiro *et al.*, 2006b; Loureiro *et al.*, 2007). Therefore an appropriate nuclear lysis buffer for oil palm FCM analysis should be investigated more extensively for any further breeding and production programs of oil palm. The chosen buffer used to classify oil palm cultivars was usually characterized by giving higher FL and YF and lower %CV and DF (Loureiro *et al.*, 2007).

Our attentions focus on the discrimination of the effective nuclear lysis buffers from FCM analysis of oil palm embryos and seedlings replicating into three unopened-leaf positions (leaf-apices, leaf-middles and leaf-bases) and establishment the effective marker for classification of oil palm cultivars by using DNA content values.

Methodology

Plant materials

Breaking dormancy-derived seeds, one to twelve months-old seedlings of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cv. Tenera and young leaves of more than ten years-old tree of Deli Dura: (D109, D067, D064, D069 and D068), Pisifera: (Calabar; P109, LA ME; P106, DAMI; P116, Nigeria; P110 and EKONA; P105) and hybrid Tenera (Suratthani1, 2, 3 and 5) cultivars were prepared by the Suratthani Oil Palm Research Center, Suratthani province, Thailand. Seeds of soybean (*Glycine max* cv. Polanka), reference plant, were kindly provided by Dr Jaroslav Dolezel (Institute of Experimental Botany, Olomouc, Czech Republic).

Comparison of five Flow cytometric nuclear lysis buffers

The flow cytometer was a FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) working with CellQuest software (Becton Dickinson) equipped with a 488 nm argon iron laser. Propidium iodide (PI) was measured at 585 nm to read 2C nuclei histograms of 5,000 nuclei per sample. During analysis, after every three samples, the reference plant was used as a controller to check the calibration of the flow cytometer in each buffer by adjusting the gain of *Glycine* to channel 200. All experiments were carried out with 3 replicates per treatment.

Soybean was used as external reference plants (2C=2.50 pg; Dolezel *et al.*, 1994). Unopened leaves (replicating to leaf-apices, leaf-middles and leaf-bases) of one to twelve months-old seedlings and embryos of oil palm and the 2nd - 3rd leaves from the shoot apex of reference plants, approximately 50 mg, were finely chopped with a razor blade in 1.0 ml Tris-MgCl₂, WPB, LB01, Galbraith and Otto's extraction buffers containing: [200 mM Tris, 4 mM MgCl₂, 0.5%(w/v) Triton X-100 and

3.0%(w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP)], [200 mM Tris.HCl, 4mM MgCl₂, 2mM Na₂EDTA, 86 mM NaCl, 10 mM sodium metabisulfite, 1% PVP-10, 1%(v/v) Triton X-100, pH 7.5], [15 mM Tris, 2mM Na₂EDTA, 0.5 mM spermine.4HCl, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 8.0], [45 mM MgCl₂, 30 mM sodium citrate, 20 mM MOPS, 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 7.0] and [(Otto I: 100 mM citric acid, 0.5% (v/v) Tween 20 pH 2-3), (Otto II: 400 mM Na₂HPO₄, pH 8-9)], respectively. After extraction, 50 microlitres of RNase and PI were added immediately prior to filtering through a 42 micrometre nylon mesh (Pfosser *et al.*, 1995). FCM parameters and DNA contents were recorded and analyzed for selecting the chosen buffer and plant material for classifying oil palm cultivars: FS, SS, FL, %CV, %DF and YF.

FS=Forward scatter as a rough measure of particle's size

SS=Side scatter as a measure of particles optical complexity

FL=Fluorescence intensity of PI-stained nuclei

%CV=G0/G1 peaks as a measure of nuclear intensity and variation in DNA staining.

%DF=Debris background factor as a measure of sample quality

Use the equation:

$$\%DF = \frac{\text{total number of particles} - \text{total number of intact nuclei}}{\text{total number of particles}} \times 100$$

YF=Nuclear yield factor in order to compare the quantity of nuclei in suspension.

Use the equation:

$$YF = \frac{\frac{\text{total number of intact nuclei}}{\text{number of second run (s)}}}{\text{weight of tissue (mg)}}$$

Estimation of DNA contents for cultivars classification

Young leaves of Deli Dura, Pisifera and hybrid Tenera trees were prepared followed the procedures mentioned above. FCM analysis was carried out by using the chosen buffer and subsequently determined DNA content in each cultivar.

Use the equation:

$$2CDNA \text{ content} = \frac{\text{Sample G1 mean FL}}{\text{Reference standard G1 mean FL}} \times \text{DNA content of reference standard}$$

Laboratory trial design and data analysis

The experiment was designed in accordance with the Completely Randomized Design (CRD) with two factors, namely: five types of lysis buffer and five growth stages of oil palm seedlings with three replicates by means of three positions of unopened leaves.

The fluorescence histograms were resolved into G0/G1 (2C), S and G2/M (4C) cell-cycle compartments with a peak-reflect algorithm using two Gaussian curves (WinMDI version 2.9). The FCM parameters and DNA contents of oil palm were statistically analyzed by ANOVA (Analysis of Variance) and the significant differences between the contents in each parameter and DNA value were tested against the *F*-distribution at $P < 0.05$. Tukey testing was performed for routine multiple mean comparison.

Results

Comparison of five flow cytometric nuclear lysis buffers for parameters estimation

Testing the five nuclear lysis buffers with embryos and one to twelve months-old seedlings of oil palm revealed significant distinctions in all parameters. The use of each buffer resulted in acceptable parameters with oil palm embryos. As seen in Figure 1, the PI-fluorescence peak histograms of oil palm embryos analyzed with all buffers gave a good reading in peak qualities and positions, indicating that each buffer can be used to investigate 2C DNA contents of oil palm embryos which releasing of their nuclei, considerably. Table 1 lists the average of FS, SS, FL, %CV, %DF and YF values, discriminating of suitable buffer for FCM analysis of oil palm by deciding the following criteria: first and second highest of FL and YF and first and second lowest of %CV and DF values.

Nuclei isolated from embryos and seedlings of oil palm with all five buffers had no significant differences in FS and SS values. Interestingly, both of these values revealed their event out of scale on FS and SS logarithm density plots, corresponding too high values of FS and SS (Table1). In most of leaf tissues, an effect similar to the “the tannic acid effect” was observed which involved the occurrence of two populations, higher %CV and DF (Loureiro *et al.*, 2006a). Correspondingly, two populations of particles on cytograms of FS vs. SS, high values of %CV and DF were found in this study. Leaf tissues treated with all buffers maintained a high level of FS, SS, %CV and %DF which might effect from “the tannic acid effect” reaction.

The LB01 gave the second highest of FL (299.73) and first lowest of %CV of DNA peak (4.57%) of oil palm embryos, unfortunately the YF value showed unexpected yields in the lowest ($0.68 \text{ nuclei s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Otto’s buffer yielded acceptable histograms with the first highest of FL value for 385.55 and second lowest of %CV

(4.93%) whereas the first lowest of debris factor (98.90%) and second highest YF value ($0.96 \text{ nuclei s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) were found when using Galbraith. The highest value of yield factor was found to be $0.99 \text{ nuclei s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ for WPB buffer. Although, no significant difference among the buffers was obtained in FS, SS, %DF and YF values, there are different significantly in FL and %CV implying that LB01 and Otto's had more significant efficiencies than the others (Figure 1A and Table 1). Moreover, no detectable tannic acid or phenolic compound effects in the solutions prepared from embryo tissues.

With the oil palm seedlings, the differences were due to different yields, debris, fluorescence intensity, %CV and peak positions observed while analysis of all buffers with one to twelve months-old seedlings. WPB buffer yielded approximately 314 for the first highest FL value and lowest of %CV (8.75%) of one month-old seedlings. The second lowest and highest of %DF and YF were also found with this buffer for 99.74% and $0.27 \text{ nuclei s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectively. Using LB01, the sufficient amount of yields and debris factors were revealed with the first highest and lowest for $0.52 \text{ nuclei s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ and 98.61%, respectively. Using WPB, the peak position of PI-fluorescence intensity from young leaves of one month-old seedling resembled sustainability with those obtained from analysis of embryos by using LB01 (Figure 1A and B). The most suitable buffer for one month-old seedling of oil palm is therefore WPB buffer by means of the highest of FL, lowest of %CV values (Table 1) and maintainable of histogram position.

Figure 1C outlines the PI-fluorescence histograms of three months-old seedlings of oil palm estimated with the five buffers. Only LB01 and WPB buffers affected the sufficient amount of FL and YF and against %CV and DF for this stage of oil palm seedlings. The buffers yielded sufficiently several parameters; the first

highest of FL and lowest of %CV were detected in the nuclei solution of WPB (281.17 and 6.45%) whereas %DF and YF were compared to the first lowest (93.41%) and highest ($1.81 \text{ nuclei s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) values in the solution of LB01 (Table 1). In addition the second levels of these parameters were also found correspondingly in those buffers. The chosen buffers for FCM of three month-old seedlings of oil palm are LB01 and WPB buffers. It is interesting to note that peak position of WPB-derived nuclei revealed in the same position compared to the position of one month-old seedlings-derived nuclei isolated by WPB.

For six months-old seedlings, although LB01 produced the first lowest of %DF (96.44%) and the second highest of YF ($1.38 \text{ nuclei s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), the result showed that WPB buffer is the suitable isolation for nuclei extraction by means of the first highest FL (362.28) and lowest %CV (4.47%) values (Figure 1D and Table 1). This result resembled to the analysis of twelve months-old seedlings which showed the same suitable buffer, revealing the first highest FL (285.49) and lowest %CV (6.91%) (Figure 1E and Table 1). Consequently, there are two suitable buffers (WPB and LB01) for analysis of FCM in oil palm by means of the highest of FL and YF and lowest of %CV and DF. However, the position of histogram peaks could be considered significantly because only WPB gave the same position of PI histogram. These seem to be a high efficiency of WPB for maintaining quality of nuclei solution. It is interesting to note that some leaf positions of oil palm seedlings were found to be undetectable tissues for their nuclei isolation when analysis with specific buffer. As above mentioned, the WPB buffer is accepted to estimate 2C-DNA value of oil palm cultivars. Analysis of each buffer on 2C DNA content will be clarified below.

Estimation of nuclear genome size (C-DNA values) of oil palm embryos and seedlings

Table 2 lists the average C-values of 5 growth stages of oil palm determined by using *Glycine* as external reference plant. Using LB01, the 2C DNA contents from oil palm embryos were regularly lessen in width between 3.7-3.8 pg whereas ranging from 2.7-3.0 pg, 4.2-5.2 pg, 2.7-2.8 pg and 1.8-3.1 pg were revealed when using WPB, Otto's, Tris.MgCl₂ and Galbraith as nuclear lysis buffers, respectively (data not shown). Although LB01 and Tris.MgCl₂ were the most unchangeable buffers for a value of DNA content from FCM, only LB01 is the acceptable nuclear lysis buffer for 2C DNA content value followed by the first lowest value of %CV, the second highest of FL and is resembled with previous reported works (3.7-3.8 pg) (Rival *et al.*, 1997; Srisawat *et al.*, 2005; Madon *et al.*, 2008).

The 2C DNA contents from analysis of one to twelve months-old seedlings of oil palm were significantly different in stages of oil palm seedlings and nuclear lysis buffers, with three positions of their unopened leaves. In one month-old seedlings, with the exception of WPB buffer, the lysis buffers mostly produced the low of 2C DNA content (1.2-2.1 pg). Although leaf-bases of one month-old seedlings did not produce the highest 2C DNA value of oil palm when using WPB buffer, this DNA content closely agreed with our previously reported (3.7 pg) (data not shown). Remarkably, leaf-base of unopened-leaves was found to be most suitable tissue for nuclei isolation. The DNA contents from this tissue were generally higher and more consistent than those obtained from leaf-apices and leaf-middles. Therefore leaf-apices and leaf-middles of oil palm are not suitable tissues for FCM analysis.

For three and twelve months-old seedlings, the results revealed that the average 2C DNA values from analysis with WPB were generally within the range of values obtained in the previous reported for 3.8 pg (Madon *et al.*, 2008). Not only the

WPB buffer found to be the suitable buffer, but also produced the highest values of 2C DNA content. The results of 2C DNA values from three months-old seedlings revealed that using Otto's as nuclear lysis buffer did not extract their nuclei from all leaf positions. In addition both of leaf-apices and leaf-middles were found to be less effective tissues when using Galbraith and Tris.MgCl₂ for three and six month-old seedlings of oil palm (Table 2). Since leaf positions used in this work were significant differences of genome size, especially 2C DNA from leaf-bases of six and twelve months-old seedlings higher than those of leaf-apices and leaf-middles, we therefore used leaf-bases of oil palm as the plant material for FCM analysis in cultivars verifying experiment. Moreover, using LB01 (2C DNA content=3.7 pg) and WPB (2C DNA content=3.8 pg) for isolating the nuclei from oil palm embryos and leaves of oil palm seedlings, respectively, resembled those obtained from Rival *et al.* (1997), Srisawat *et al.* (2005) and Madon *et al.* (2008). Therefore, WPB buffer need to be used as the suitable buffer in the next research for cultivars classification in oil palm using young leaves of Dura and Pisifera cultivars as plant materials. In addition, these findings confirmed that DNA content level of oil palm (3.8 pg) could be considered as marker of Tenera for cultivars analysis by using FCM.

Estimation of nuclear genome size (C-DNA values) of Dura and Pisifera cultivars

Young leaves of five parents of Deli Dura and five parents of Pisifera (Calabar, LA ME, DAMI, Nigeria and EKONA) were investigated by using WPB as nuclear lysis buffer. 2C-value of all cultivars revealed differently in terms of DNA content by using Tenera (2C=3.8 pg) as external standard plant. The results showed that DNA contents of Deli Dura (D109, D067, D064, D069 and D068) were ranged from 6.3 - 7.6 pg whereas the DNA content values ranging between 5.3 – 6.1 pg were found in young

leaves tissues of *Pisifera* (Calabar; P109, LA ME; P106, DAMI; P116, Nigeria; P110 and EKONA; P105) (Figure 2 Table 3). Therefore, the numbers of base pairs of one haploid genome of Deli Dura and *Pisifera* parents were ranged greater than 3000 and 2000 Mbp, respectively.

Discussion

Type of nuclear lysis buffer is known to be a criterion which has been less investigated in restricted reports (Loureiro, *et al.* 2006a, b; Loureiro, *et al.* 2007). Since the investigation of the various FCM nuclear lysis buffers in oil palm has not been described to date, this is therefore the first report on comparison of various lysis buffers with oil palm. It is generally known that there is no individual buffer worked well with all plant species (Loureiro, *et al.* 2006a,b; Loureiro, *et al.* 2007). The effective lysis buffer for FCM of oil palm should be carried out more extensively.

Five buffers used in this study are composed of different types and concentrations of chemical substances. Basically, Tris.MgCl₂ is consisted of pH stabilizer (200 mM Tris), preventer of clumping and attachment of debris (0.5% Triton X-100), substance for phenolic compounds bindings (3.0% PVP) and chromatin stabilizer (4 mM MgCl₂) whereas another chromatin stabilizer (0.5 mM spermine.4HCl) only found in LB01 buffer. WPB consists differently in some specific substances such as 2 mM Na₂EDTA (chelating agent) and 10 mM sodium metabisulfite (reducing agent which is suppressor of phenolic compound reactions). Polyphenol oxidase inhibitor (catalyse the oxidation of phenolic compounds) is acidulant such as citric acid or sodium citrate found in Otto's and Galbraith buffers, respectively. These acids are used for prevention of phenolic compound reactions. 20 mM MOPS is one type of pH stabilizer that found in Galbraith buffer (Loureiro *et al.*, 2007).

Phenolic compounds are plant secondary metabolites, involving in the protection of plants against attacking of pathogens or injuring, and are widely distributed in plant-derived product (Altunkaya and Gokmen, 2009). In this study, physical damage during the chopping process on leaves tissue of oil palm caused an

increase of phenolic compound reaction, which often results in color degradation of the tissue or buffer solution from green to brown color. Comparing to chemical compositions on five nuclear lysis buffers, although WPB and Otto's buffers consisted of some reducing agents namely sodium metabisulfite and citric acid, respectively, only Otto's-derived nuclei solution was found to be browning. This implies that sodium metabisulfite in WPB had a positive effect for the prevention of oxidation of phenolic compounds. The effectiveness of this reducing agent could suppress some phenolic compounds releasing when chopping leaf tissues of oil palm in a buffer solution, resulting in consistency of their peak positions, FCM parameters and 2C DNA contents. As described above, the necessary substances in an applied buffer are an effective reducing agent namely sodium metabisulfite (in WPB) resulting in high value of FL, low value of %CV and consistency of PI histogram and an effective chromatin stabilizer namely spermine 4.HCl (in LB01) which resulting in high value of YF and low value of %DF.

After analyses of embryos and one to twelve months-old seedlings of oil palm with the five nuclear lysis buffers, the results confirmed that some phenolic compounds are regularly found in the nuclei extracting solution of seedlings than that of embryos. Because the seedlings gave the higher value of %CV than embryos, it is indicating that "the tannic acid effect" could cause effect on fluorescence histograms of oil palm seedling with higher %DF and higher %CV (Loureiro *et al.*, 2007). Loureiro *et al.* (2006a) analyzed the SS and CV values of *Pisum sativum* nuclei in the solution of Tris.MgCl₂ supplemented with various concentrations of tannic acid (TA), a common phenolic compound, at a concentration of 0.75 mL⁻¹ to 1.00 mL⁻¹ and showed poor reading in peak positions and qualities which might be affected from the

role of their phenolic compounds. This reaction is termed that “the tannic effect” by Loureiro *et al.* (2006a).

The buffer given the higher of FL and YF and lower %CV and DF, and gave consistency of PI histograms should be selected for genome size analysis in cultivars verification. After analysis of five nuclear lysis buffers with embryos and seedlings of oil palm, the results revealed significant differences among the buffers and growth stages of oil palm used. Table 2 lists the average C-values of embryos and seedlings of oil palm. Using LB01, 2C DNA content of oil palm embryos was found to be 3.7 pg. Although the flow cytometer, reference plant and type of buffer were used differently, this value resembled those obtained from Rival *et al.* (1997) (FACScan, *Petunia hybrida*, LB01) and Srisawat *et al.* (2005) (FACScalibur, *G. max* cv. Polanka, Tris.MgCl₂) for 3.7 pg and mostly closed for 3.8 pg (Madon, *et al.*, 2008; FACScalibur, *G. max* cv. Polanka, LB01). The 2C DNA contents of other buffers have wide ranged from 2.25 - 4.88 pg, resulting in differences type of chemical compositions in each buffer and its concentration. When oil palm tissues were analyzed differently in various growth stages, buffers utilization gave the different reading in peak position among seedlings and its embryos, indicating that some interference occurred between the chopping and staining by phenolic compounds in those seedlings. Using LB01, Tris.MgCl₂, Otto's and Galbraith showed less 2C DNA contents of seedlings than that of embryos whereas higher 2C DNA content is only found in WPB which might be affected from the preventer of phenolic compounds reaction (sodium metabisulfite) in WPB solution. The 2C DNA contents of oil palm seedlings ranged differently between 1.95 – 2.76 pg, 3.81 - 4.91 pg, 2.08 – 3.10 pg, 0.75 - 3.46 pg and 0.55 – 1.94 pg when using LB01, WPB, Otto's, Tris.MgCl₂ and Galbraith as nuclear lysis buffer compared to that of embryos, respectively. By the

way, WPB gave the interesting value of 2C DNA content (3.8 pg) on three and twelve month-old seedlings of oil palm.

For leaf position, 2C DNA contents ranged from 1.47 - 2.90 pg for leaf-apices whereas the DNA contents ranged from 1.09 - 5.48 pg and 0.55 - 4.75 pg when analyzed with leaf-middles and leaf bases, respectively (data not shown). Consequently, there appears to be a close relation between the ability of nuclei isolation and unopened-leaf positions. Moreover the average DNA content of leaf-bases of unopened leaves found to be 3.89 pg (data not shown). Leaf-base is therefore the chosen leaf position for the unopened leaves of oil palm seedlings because this tissue is easier in nuclei isolation and freshness and is suitable for isolating their nuclei in various types of isolation buffers. Furthermore, the interaction among growth stages of seedlings and types of isolation buffers are clarified for the suitable estimation of 2C DNA content analysis of oil palm, indicating the most suitable buffer and tissues for cultivar classification experiment.

For cultivars verification, young leaves of five parents Deli Dura and Pisifera excised from adult tree (unopened leaves) were used as source of nuclei. Although, the DNA contents of Deli Dura (D109, D067, D064, D069 and D068) and Pisifera (Calabar; P109, LA ME; P106, DAMI; P116, Nigeria; P110 and EKONA; P105) cultivars were not significantly differences but it should be distinctly separated into two groups. First is ranged higher than 6.3 pg (Deli Dura) and lower than 6.1 pg (Pisifera) is the second. These data were evaluated and compared to that of their hybrid. It is interesting to note that DNA content of *Tenera* reported here was found to be clearly significantly lower than that of their parents. These resembled the results of using RAPD marker reported by Sathish and Mohankumar (2007) which revealed that Dura showed the highest amounts of bands whereas giving the lowest was found in

Tenera by using an effective marker: P15. The Deli Dura and Pisifera DNA contents analyzed with WPB buffer using Tenera as external standard (3.8 pg) are firstly reported on using progeny DNA value to determined DNA values of their parents. The DNA content of five Deli Dura and five Pisifera parents can be used as a database in any further oil palm breeding programs and may be helpful in verifying cultivars or clone.

In conclusion, we have the possibility to carry out DNA contents of Deli Dura and Calabar, LA ME, DAMI, Nigeria and EKONA Pisifera using DNA content of their hybrid as an external reference plant. The DNA contents of Tenera, Deli Dura and Pisifera are 3.8, 6.3-7.6 and 5.3-6.1 pg, respectively. These DNA contents of oil palm mostly a useful database for routine breeding program and for routine assay of accepted cultivated cultivars. Further application of nuclear lysis buffer for FCM of oil palm should be re-consisted of some effective substances such as sodium metabisulfite and spermine.4HCl for giving the higher of FL and lower of %CV and giving higher of YF and lower of % DF, respectively.

Table 1. Flow cytometric parameters assessed of oil palm embryos and unopened-leaves of one to twelve month-old seedling of oil palm in various isolation buffers

Growth stages	Buffer	FCM Parameters (Mean \pm SD)					
		FS (channel unit)	SS (channel unit)	FL (channel unit)	CV (%)	DF (%)	YF (nuclei s ⁻¹ mg ⁻¹)
Embryos	LB01	4149.60 \pm 2950.15 ^a	862.30 \pm 504.36 ^a	299.73 \pm 4.98 ^{ab}	4.57 \pm 0.38 ^a	99.22 \pm 0.15 ^a	0.68 \pm 0.36 ^a
	WPB	6723.60 \pm 4975.76 ^a	765.77 \pm 366.31 ^a	211.36 \pm 10.59 ^{bc}	6.59 \pm 2.15 ^{ab}	99.13 \pm 0.59 ^a	0.99 \pm 0.78 ^a
	Otto's	6854.67 \pm 5155.52 ^a	2738.87 \pm 2078.82 ^a	385.55 \pm 52.42 ^a	4.93 \pm 0.38 ^a	99.08 \pm 0.35 ^a	0.78 \pm 0.12 ^a
	Tris.MgCl₂	6181.40 \pm 4571.84 ^a	1582.60 \pm 1037.63 ^a	208.91 \pm 14.46 ^{bc}	7.31 \pm 0.30 ^{ab}	98.93 \pm 0.09 ^a	0.96 \pm 0.26 ^a
	Galbraith	5860.37 \pm 4286.90 ^a	1163.43 \pm 585.23 ^a	166.33 \pm 60.00 ^c	8.93 \pm 2.11 ^b	98.90 \pm 0.33 ^a	0.96 \pm 0.86 ^a
One month-old seedlings	LB01	861.93 \pm 136.86 ^a	496.63 \pm 218.05 ^a	156.30 \pm 72.84 ^b	11.22 \pm 3.73 ^a	98.61 \pm 1.09 ^a	0.52 \pm 0.26 ^a
	WPB	919.73 \pm 39.66 ^a	593.13 \pm 152.19 ^a	314.65 \pm 38.29 ^a	8.75 \pm 3.48 ^a	99.74 \pm 0.17 ^a	0.27 \pm 0.13 ^{ab}
	Otto's	944.00 \pm 113.46 ^a	672.70 \pm 434.13 ^a	159.87 \pm 67.45 ^{ab}	12.87 \pm 11.39 ^a	99.89 \pm 0.06 ^a	0.10 \pm 0.05 ^b
	Tris.MgCl₂	*666.00 \pm 576.86 ^a	*457.50 \pm 446.86 ^a	*72.74 \pm 64.19 ^b	*8.36 \pm 7.26 ^a	*64.87 \pm 56.25 ^a	*0.03 \pm 0.03 ^b
	Galbraith	1019.40 \pm 1.25 ^a	1009.533 \pm 7.98 ^a	94.16 \pm 37.32 ^b	18.86 \pm 5.77 ^a	99.94 \pm 0.01 ^a	0.07 \pm 0.03 ^b

	LB01	707.70 ± 250.07 ^a	273.27 ± 220.98 ^a	203.72 ± 85.90^a	6.52 ± 3.89^{bc}	93.41 ± 10.08^b	1.81 ± 2.46^a
	WPB	881.87 ± 49.47 ^a	263.80 ± 143.24 ^a	281.17 ± 21.57^a	6.45 ± 1.56^{bc}	99.80 ± 0.06^b	0.21 ± 0.05^a
Three month- old seedlings	Otto's	-	-	-	-	-	-
	Tris.MgCl ₂	911.03 ± 56.91 ^a	233.60 ± 137.67 ^a	59.12 ± 6.17 ^b	12.86 ± 1.72 ^c	99.82 ± 0.02 ^b	0.15 ± 0.03 ^a
	Galbraith	*272.83 ± 472.56 ^{ab}	*141.57 ± 245.20 ^a	*14.18 ± 24.55 ^b	*1.63 ± 2.82 ^{ab}	*32.65 ± 56.55 ^{ab}	*0.41 ± 0.71 ^a
	LB01	658.13 ± 249.40 ^{ab}	326.37 ± 295.42 ^a	223.24 ± 24.34 ^{ab}	6.38 ± 1.01^{ab}	96.44 ± 2.17^a	1.38 ± 0.66^{ab}
	WPB	922.20 ± 24.53 ^a	365.93 ± 227.66 ^a	362.78 ± 44.11^a	4.47 ± 1.65^{ab}	99.59 ± 0.26 ^a	0.50 ± 0.30 ^{ab}
Six month-old seedlings	Otto's	863.10 ± 49.96 ^a	306.53 ± 196.14 ^a	228.19 ± 106.14^{ab}	7.18 ± 1.30 ^{ab}	99.72 ± 0.08 ^a	0.23 ± 0.10 ^b
	Tris.MgCl ₂	*179.10 ± 310.21 ^b	*18.37 ± 31.81 ^a	*94.15 ± 163.07 ^b	*2.47 ± 4.28 ^a	*33.28 ± 57.65 ^a	*0.05 ± 0.09 ^b
	Galbraith	853.40 ± 179.79 ^a	538.93 ± 319.73 ^a	161.35 ± 12.76 ^{ab}	10.11 ± 1.22 ^b	97.03 ± 1.96^a	1.74 ± 0.87^a
	LB01	466.70 ± 103.06 ^a	147.93 ± 116.39 ^a	164.34 ± 41.55 ^{bc}	10.28 ± 5.14 ^a	97.57 ± 0.12^a	0.83 ± 0.23^a
	WPB	909.67 ± 34.12 ^a	224.33 ± 57.91 ^a	285.49 ± 28.90^a	6.91 ± 2.65^a	99.71 ± 0.17 ^a	0.34 ± 0.14^a
Twelve month-old seedlings	Otto's	720.23 ± 63.31 ^a	142.43 ± 55.40 ^a	238.15 ± 25.23^{ab}	8.41 ± 3.06^a	99.59 ± 0.33^a	0.27 ± 0.23 ^a
	Tris.MgCl ₂	470.17 ± 98.76 ^a	141.43 ± 48.14 ^a	201.03 ± 24.71 ^{ab}	7.33 ± 0.55 ^a	99.70 ± 0.09 ^a	0.21 ± 0.06 ^a
	Galbraith	*425.50 ± 378.34 ^a	*395.30 ± 426.18 ^a	*83.11 ± 72.02 ^c	*8.63 ± 7.60 ^a	*64.73 ± 56.12 ^a	*1.11 ± 0.98 ^a

Values are given as mean and standard deviation of the mean (SD) of forward scatter (FS, channel units), side scatter (SS, channel units), fluorescence (FL, channel units), coefficient of variation of G0/G1 DNA peak (CV, %), debris background factor (DF, %) and yield factor (YF, %).

Means for the same growth stages followed by the same letter (a, b or c) are not statistically different according to the multiple comparison Tukey test at $P \leq 0.05$.

The parameter's first and second highest (FL and YF) and lowest (CV and DF) values of the estimation in each essential parameter are shown in bold type.

The nuclear lysis buffer chosen for the FCM of oil palm embryos and one to twelve month-old seedlings of oil palm are shown in bold type.

* Buffer did not produce their nuclei from some leaf positions.

- No oil palm nuclei peaks were distinguishable.

Table 2. Estimation of genome size in oil palm embryos and one to twelve month-old seedlings of oil palm using *Glycine max* cv. Polanka (2C=2.5 pg) as external reference plant

Growth stages	Buffers	C-DNA values (Mean \pm SD)		
		2C (pg)	1C (Mbp)	Peak CV(%)
Embryos	LB01	3.75 \pm 0.06 ^b	1834	4.57 \pm 0.38 ^a
	WPB	2.91 \pm 0.15 ^{bc}	1422	6.59 \pm 2.15 ^{ab}
	Otto's	4.88 \pm 0.57 ^a	2389	4.93 \pm 0.38 ^a
	Tris.MgCl ₂	2.80 \pm 0.04 ^{bc}	1370	7.31 \pm 0.30 ^{ab}
	Galbraith	2.25 \pm 0.71 ^c	1100	8.93 \pm 2.11 ^{cb}
One month-old seedlings	LB01	1.95 \pm 0.91 ^b	954	11.22 \pm 3.73 ^a
	WPB	4.30 \pm 0.54 ^a	2103	8.75 \pm 3.48 ^a
	Otto's	2.08 \pm 0.88 ^b	1017	12.87 \pm 11.39 ^a
	Tris.MgCl ₂	*1.38 \pm 0.22 ^b	675	8.36 \pm 7.26 ^a
	Galbraith	1.22 \pm 0.48 ^b	597	18.86 \pm 5.77 ^a

Three month-old seedlings	LB01	2.44 ± 1.09 ^a	1193	6.52 ± 3.90 ^{ab}
	WPB	3.81 ± 0.30^a	1863	6.45 ± 1.56 ^{ab}
	Otto's	-	-	-
	Tris.MgCl ₂	0.75 ± 0.43 ^b	367	12.86 ± 1.72 ^a
	Galbraith	*0.55	269	1.63 ± 2.82 ^{ab}
Six month-old seedlings	LB01	2.76 ± 0.31 ^b	1350	6.38 ± 1.01 ^b
	WPB	4.91 ± 0.56 ^a	2401	4.47 ± 1.65 ^b
	Otto's	3.10 ± 1.44 ^{ab}	1516	7.18 ± 1.30 ^{ab}
	Tris.MgCl ₂	*3.46	1692	2.47 ± 4.28 ^b
	Galbraith	1.94 ± 0.16 ^b	949	10.11 ± 1.22 ^a
Twelve month-old seedlings	LB01	2.02 ± 0.51 ^{bc}	988	10.28 ± 5.14 ^a
	WPB	3.82 ± 0.39^a	1868	6.91 ± 2.65 ^a
	Otto's	2.99 ± 0.31 ^{ab}	1462	8.41 ± 3.06 ^a
	Tris.MgCl ₂	2.71 ± 0.33 ^b	1325	7.33 ± 0.55 ^a
	Galbraith	*1.57 ± 0.04 ^c	768	8.63 ± 7.60 ^a

Values are given as mean and standard deviation of the mean genome in mass values (2C, pg) and base pair (1C, Mbp), 1 pg = 978 Mbp (Iolezel *et al.*, 2003).

Means for the same growth stages followed by the same letter (a b or c) are not statistically different according to the multiple comparison Tukey test at $P \leq 0.05$.

The nuclear lysis buffer chosen for the FCM of oil palm embryos and three and twelve month-old seedlings of oil palm are shown in bold type.

* Buffer did not produce their nuclei from some leaf positions.

- No oil palm nuclei peaks were distinguishable.

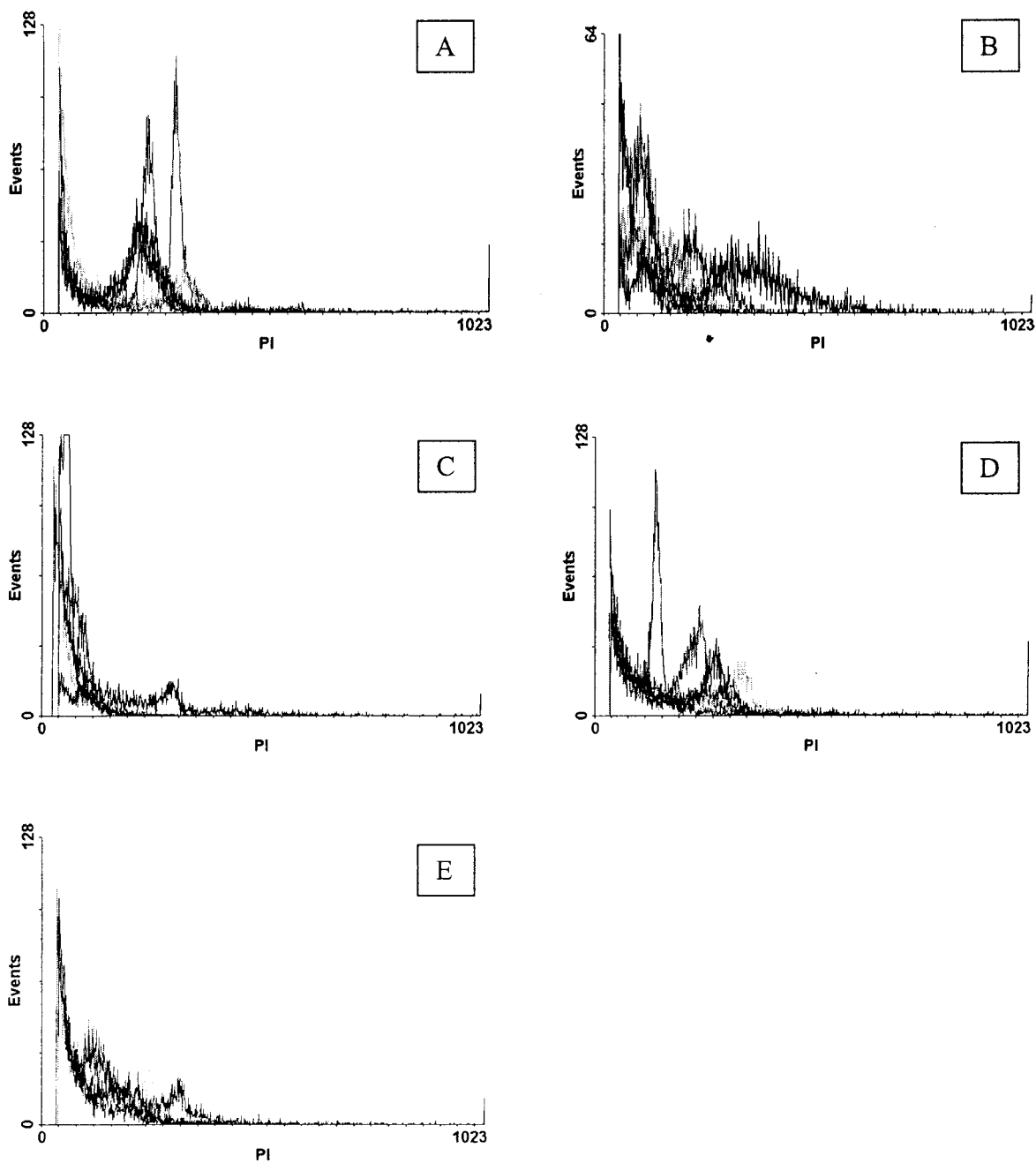


Fig 1. Histogram of relative fluorescence intensities (PI fluorescence) of oil palm embryo nuclei (A), one month-old seedling (B), three months-old seedling (C), six months-old seedling (D) and twelve months-old seedling (E) isolated with five nuclear lysis buffers. (LB01 buffer: Red, WPB buffer: Black, Tris.MgCl₂ buffer: Blue, Otto's buffer: Green and Galbraith buffer: Purple)

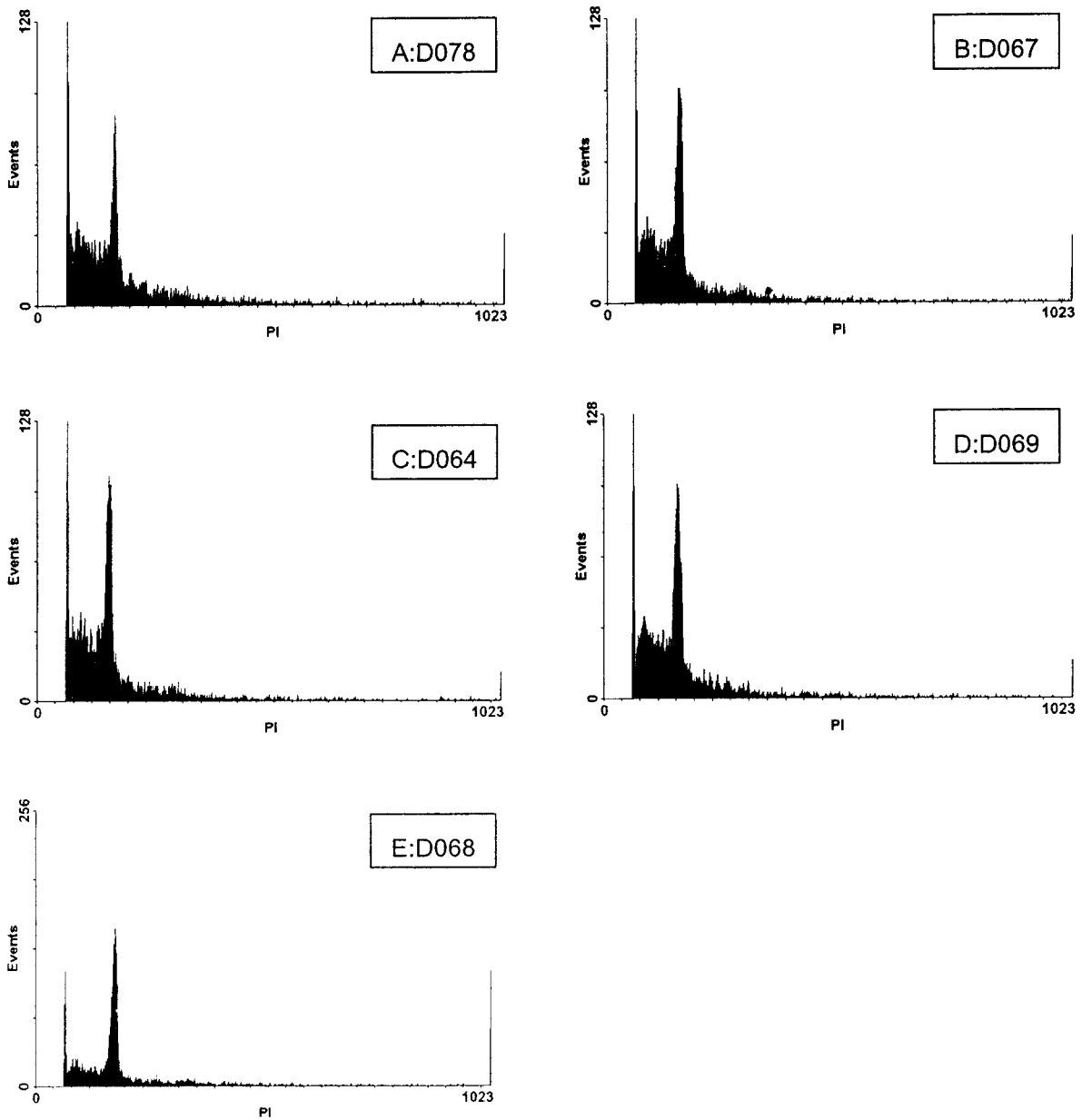


Fig 2. A-E Histogram of relative fluorescence intensities (PI fluorescence) of five parents of *Delia* nuclei of young leaves isolated with WPB buffer

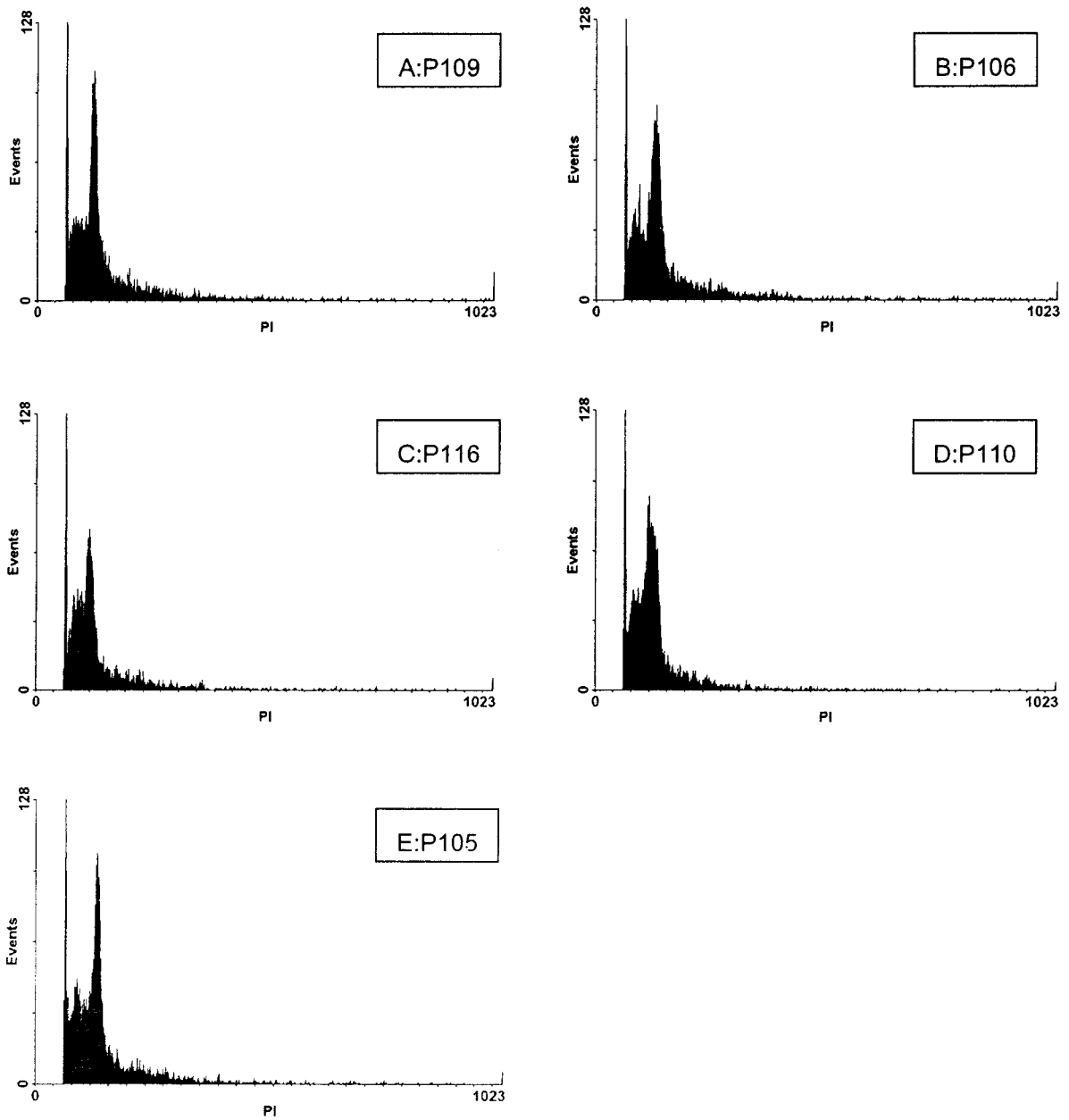


Fig 3. A-E Histogram of relative fluorescence intensities (PI fluorescence) of five parents of *Pisifera*; Calabar: P109 (A), LA ME: P106 (B), DAMI: P116 (C), Nigeria: P110 (D) and EKONA: P105 (E), nuclei of young leaves isolated with WPB buffer

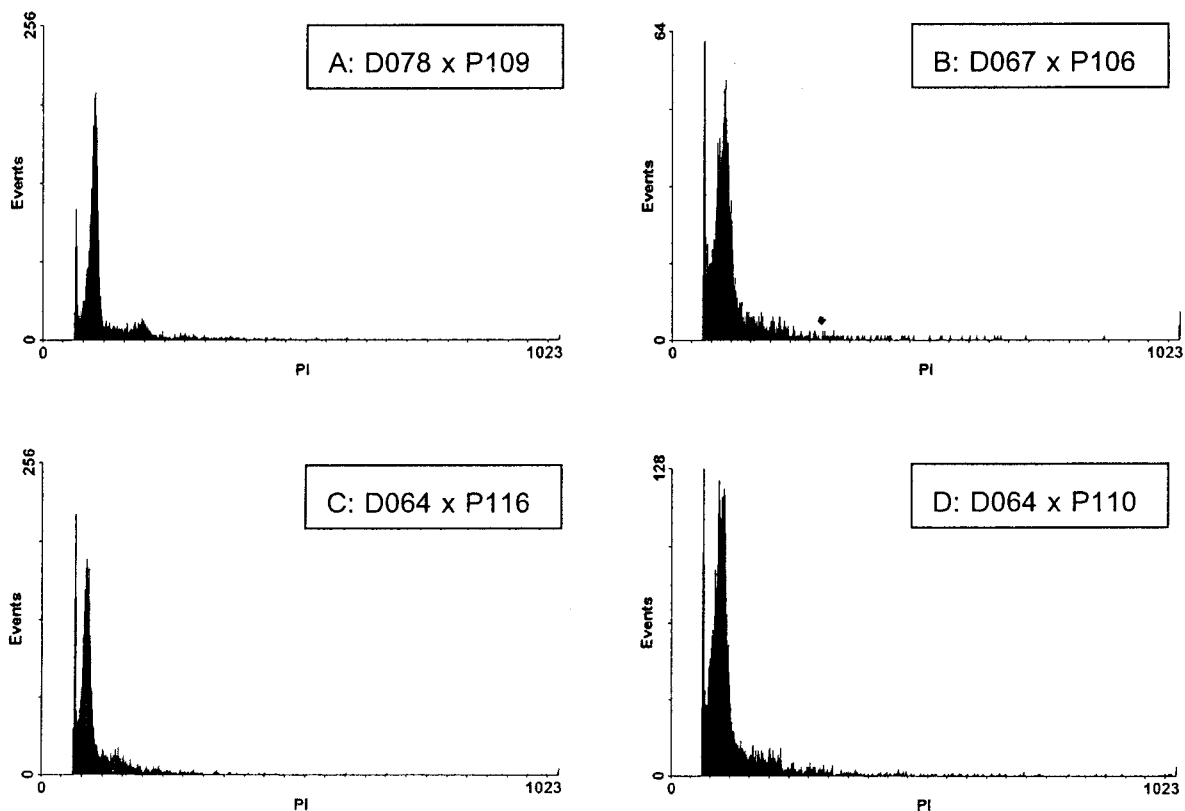


Fig 4. A-D Histogram of relative fluorescence intensities (PI fluorescence) of four hybrid Tenera; Suratthani 1 (A), Suratthani 2 (B), Suratthani 3 (C) and Suratthani 5, nuclei of young leaves isolated with WPB buffer

Table 3. Estimaouon of genome size (C-DNA values) in five Deli Dura and five Pisifera parents

Hybrid Tenera	Cultivars (code)	C-DNA values (Mean \pm SD)		
		2C (pg)	1C (Mbp)	Peak CV (%)
Suratthani 1	Deli Dura (D078)	6.88 \pm 0.67 ^{ab}	3362	3.84 \pm 0.49 ^{ab}
	Calabar Pisifera (P109)	6.14 \pm 0.74 ^{ab}	3005	4.58 \pm 0.49 ^{ab}
Suratthani 2	Deli Dura (D067)	7.13 \pm 0.27 ^{ab}	3484	4.17 \pm 0.45 ^{ab}
	LA ME Pisifera (P106)	5.96 \pm 0.66 ^{ab}	2915	6.13 \pm 1.63 ^a
Suratthani 3	Deli Dura (D064)*	6.70 \pm 0.23 ^{ab}	3278	4.52 \pm 0.62 ^{ab}
	DAMI Pisifera (P116)**	5.37 \pm 0.72 ^b	2628	6.08 \pm 1.75 ^{ab}
Suratthani 4***	Deli Dura (D069)	6.35 \pm 0.07 ^{ab}	3103	3.80 \pm 0.34 ^{ab}
	EKONA Pisifera (P105)	5.44 \pm 0.62 ^b	2659	5.08 \pm 1.35 ^{ab}
Suratthani 5	Deli Dura (D064)*	6.70 \pm 0.23 ^{ab}	3278	4.52 \pm 0.62 ^{ab}
	Nigeria Pisifera (P110)	5.90 \pm 1.09 ^{ab}	2884	4.81 \pm 1.58 ^{ab}
Suratthani 6***	Deli Dura (D068)	7.62 \pm 0.14 ^a	3725	3.30 \pm 0.14 ^b
	DAMI Pisifera (P116)**	5.37 \pm 0.72 ^b	2628	6.08 \pm 1.75 ^{ab}

Values are given as mean and standard deviation of the mean genome in mass values (2C, pg) and base pair (1C, Mbp), 1 pg = 978 Mbp (Dolezel *et al.*, 2003) using *Elaeis* cv. Tenera (2C=3.8 pg) as external reference plant

Means for the same growth stages followed by the same letter (a b or c) are not statistically different according to the multiple comparison Tukey test at $P \leq 0.05$.

* Tenera Suratthani 3 used the same Deli Dura with Hybrid Tenera Suratthani 5

**Tenera Suratthani 3 used the same DAMI Pisifera with Hybrid Tenera Suratthani 6

***No longer available of seed production.

Acknowledgement

This work was financial supported by the Thailand Research Fund through the Grant for New Researcher contract no. MRG5080372. Special thanks to Professor Dr Kovit Pattana Panyasat (KP) who is the TRF-Senior Research Scholar for kind help.

References

- Altunkaya, A. and Gokmen, V. 2009. Effect of various anti-browning agents on phenolic compounds profile of fresh lettuce (*L. sativa*). Food Chem. Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.085.
- Arumuganathan, K. and Earle, E. D. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Mol. Biol. Rep. 9: 229-241.
- Barcelos, E., Amblard, P., Berthaud, J., and Seguin, M. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular marker. Pesq Agropec Bras. 37(8): 1105-1114.
- Dolezel, J. Binarova, P. and Lucretti, S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cell by flow cytometry. Biol. Plant (Praha). 31(2): 113-120.
- Dolezel, J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. Phytochem. Analysis. 2: 143-154.
- Dolezel, J., Dolezelova, M. and Novak, F. J. 1994. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). Biol. Plant. 36: 351-357.
- Dolezel, J. and Gohde, W. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. Cytometry. 19: 103-106.
- Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H. and Greilhuber, J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry Part A. 51A: 127-128.
- Dolezel, J. and Bartos, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Ann. Bot. 95: 99-110.

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

Greihuber, J., Temsch E. M. and Loureiro, J. 2007. Nuclear DNA content measurement. In: *Flow cytometry with plant cells*. (Eds) Dolezel, J., Greihuber, J. and Suda J. WILEY-VSH Verlag GmbH&Co. KGaA. Weinheim, Germany. pp. 67-101.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Dolezel, J. and Santos, C. 2006a. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Ann. Bot.* 98: 515-527.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Dolezel, J. and Santos, C. 2006b. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Ann. Bot.* 98: 679-689.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Dolezel, J. and Santos, C. 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Ann. Bot.* 1-14. doi:10.1093/annbot/mcm152.

Madon, M., Phoon, L. Q., Clyde, M. M. and Mohd, D. 2008. Application of flow cytometry for estimation of nuclear DNA content in *Elaeis*. *J. Oil Palm Res.* 20: 447-452.

Marie, D. and Brown, S. C. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol. Cell.* 78: 41-51.

Mayes, S., Jack, P. L. and Corley, R. H. V. 2000. The use of molecular markers to investigate the genetic structure of an oil palm breeding programme. *Heredity.* 85(3): 288-293.

Narasimhamoorthy, B., Saha, M. C., Swaller, T. and Bouton, J. H. 2008. Genetic Diversity in Switchgrass Collections Assessed by EST-SSR Markers. *Bioenerg. Res.* 1:136-146.

Otto, E. J. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: *Methods in cell biology*. (Eds) Darzynkiewickz, Z. and Crissman, H. A. Vol.33. San Diego: Academic Press. pp. 105-110.

Pfossier, A., Amon, A., Lelley, T. and Heberle-bors, E. 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry.* 21: 387-393.

- Rival, A., Beule, T., Barre, P., Hamon, S., Duval, Y. and Noirot, M. 1997. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Rep.* 16: 884-887.
- Sathish D. K. and Mohankumar, C. 2007. RAPD markers for identifying oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) parental varieties (*dura* & *pisifera*) and the hybrid *Tenera*. *Indian J. Biotechnol.* 6: 354-358.
- Srisawat, T., Kanchanapoom, K., Pattanapanyasat, K., Srikul, S. and Chuthammathat, W. 2005. Flow cytometric analysis of oil palm: a preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27(Suppl. 3): 645-652.
- Winkelmann, T., Sangwan, R.S. and Schwenkle, H.G. 1998. Flow cytometric analyses in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Cyclamen persicum* Mill.: relation between ploidy level and competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17: 400-404.
- Zehdi, S., Sakka, H., Rhouma, A., Ould Mohamed Salem, A., Marrakchi, M. and Trifi, M. 2004. Analysis of Tunisian date palm germplasm using simple sequence repeat primers. *Afr. J. Biotechnol.* 3(4): 215-219.