

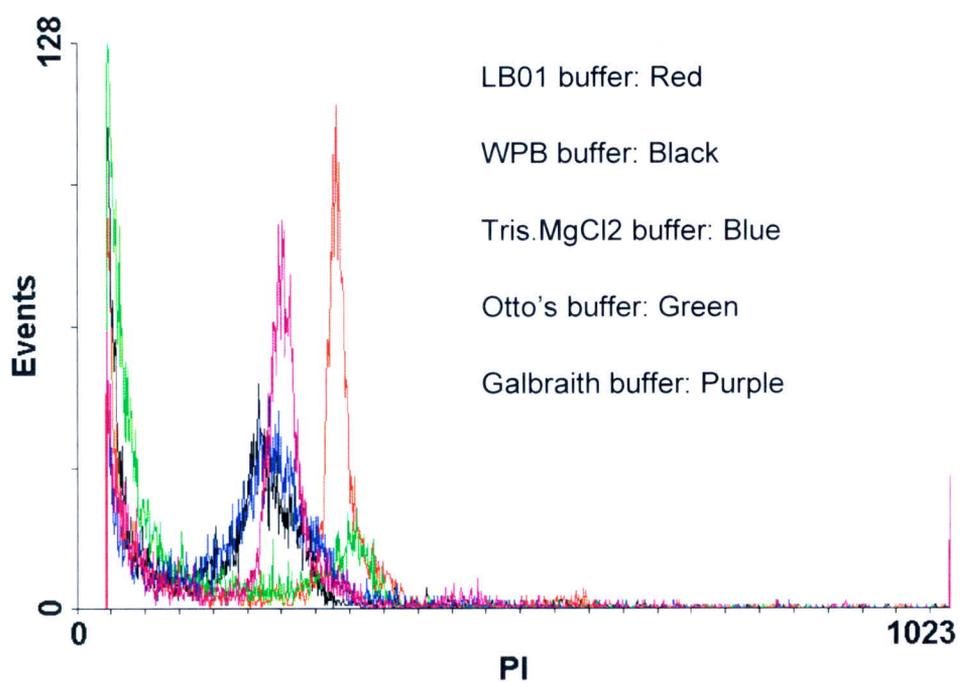
3. ผลการทดลอง

3.1 การเปรียบเทียบชนิดของสารละลายนิวเคลียส ต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยวิธีฟลูออโรเมทรี

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

จากการวิเคราะห์ฟลูออโรเมทรี กับคัพภะ และเนื้อเยื่อใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 1-12 เดือน โดยใช้สารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด ได้แก่ Tris.MgCl₂, LB01, Otto's, WPB และ Galbraith และใช้ถั่วเหลือง (2.5 pg) เป็นพีชอ้างอิงแบบภายนอก (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 เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์ทุกชนิด 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" ซึ่งปาล์มน้ำมันสามารถหลั่งสารกลุ่มแทนนินออกมารบกวนการอ่านผลฟลูออโรเมทรี (Loureiro *et al.*, 2006a)

สำหรับประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสแต่ละชนิดต่อการวิเคราะห์ฟลูออโรเมทรีของนิวเคลียสคัพภะปาล์มน้ำมัน 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 จากคัพอะปาล์มน้ำมันที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส 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, %).

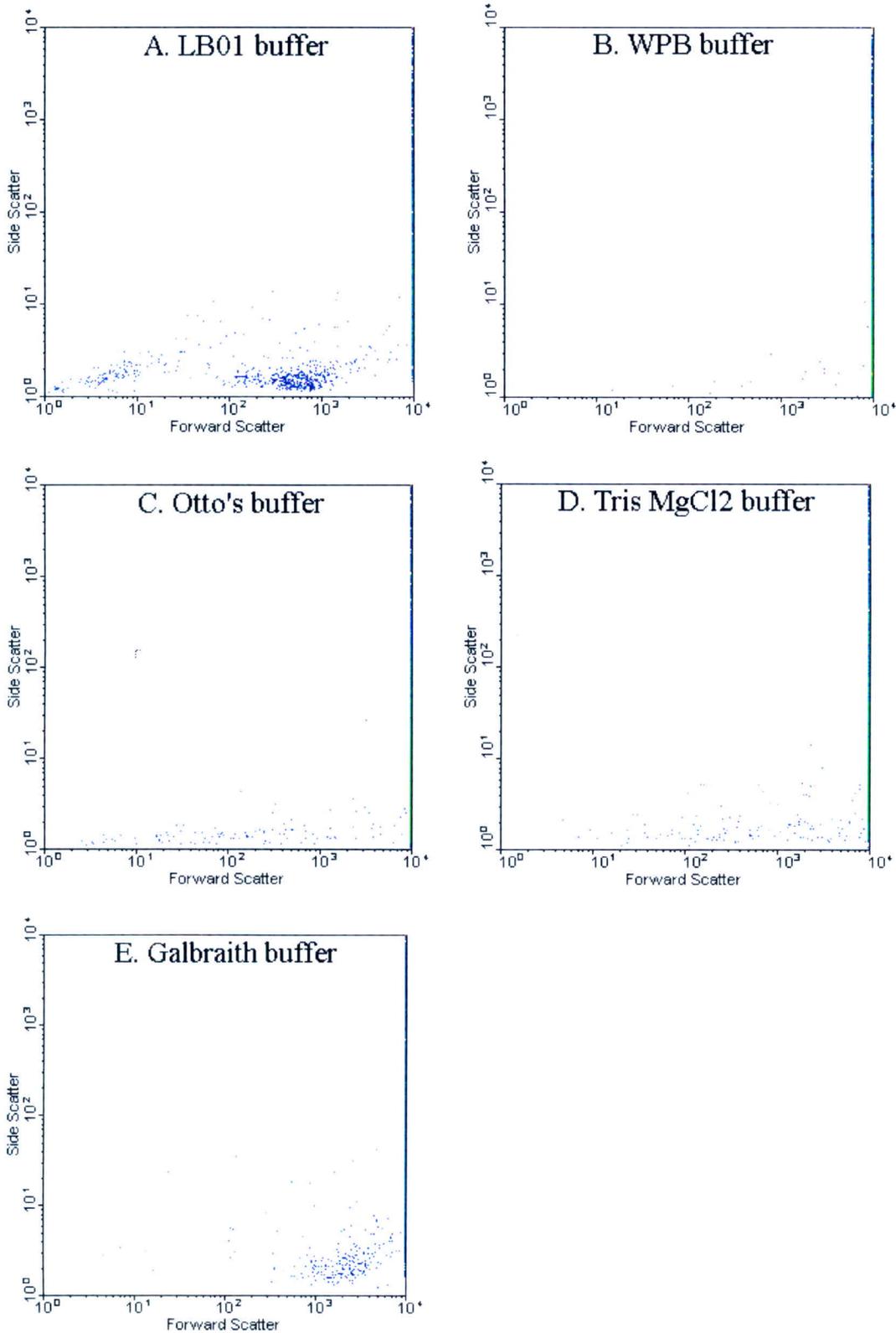
Means for the same growth stages followed by the same letter (a, b or c) are not statistically different according to the multiple comparison Tukey test at $P \leq 0.05$.

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.

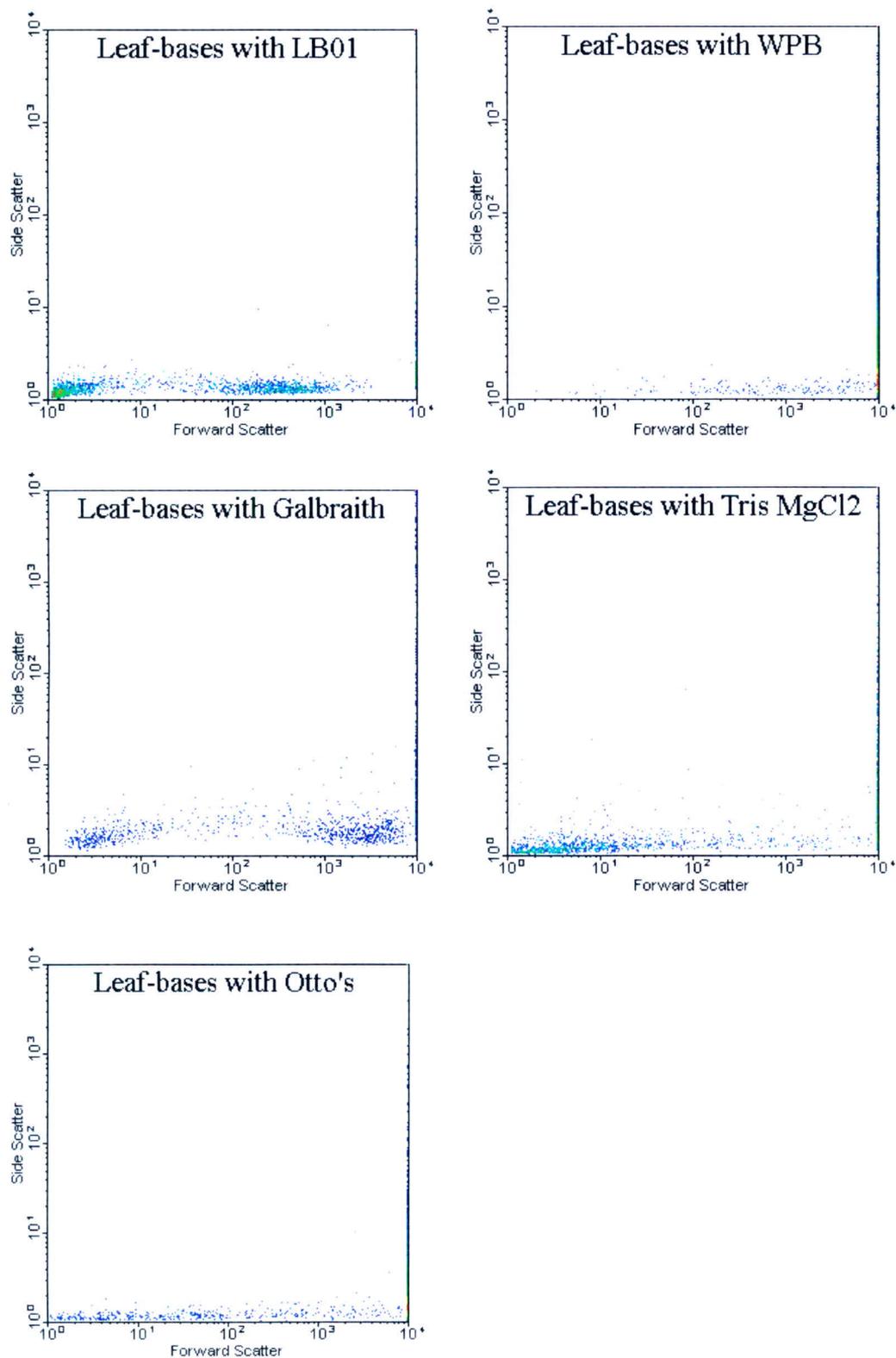
The nuclear lysis buffer chosen for the FCM of oil palm embryos and one to twelve month-old seedlings of oil palm are shown in bold type.

* 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



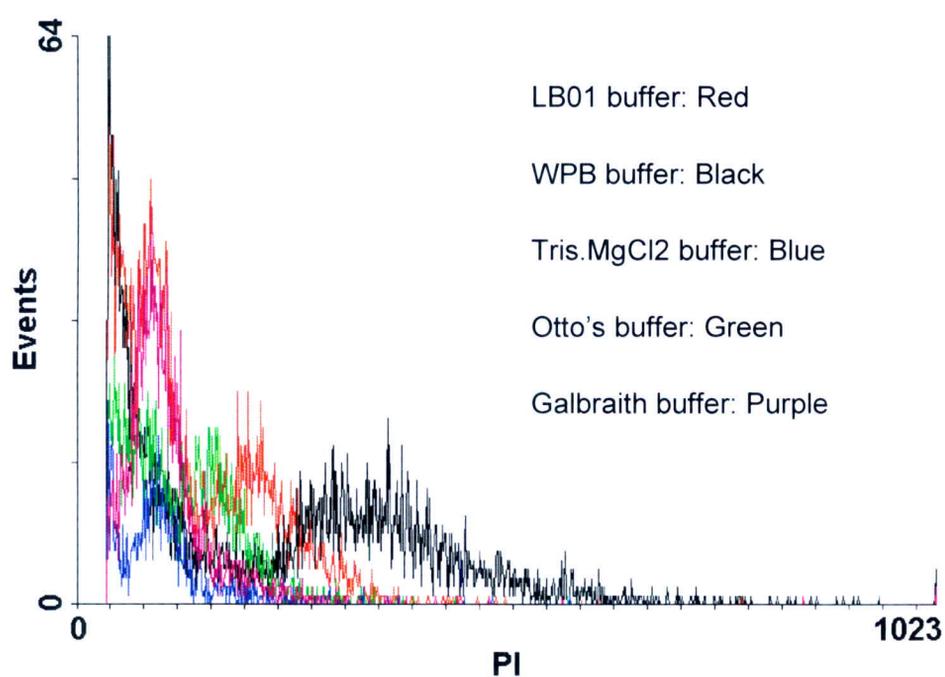
ภาพที่ 9 Density plot แสดงค่า forward scatter (logarithmic scale,FS log) vs. side scatter (Logarithmic scale,SS log) ของนิวเคลียสจากฐานใบอ่อนต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่แยกด้วยสารละลาย นิวเคลียสต่างชนิดกัน

สำหรับประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสแต่ละชนิดต่อการวิเคราะห์โพลีไซโทเมทรีของนิวเคลียสจากไบโอมเนปาล์มน้ำมันอายุ 1-12 เดือน พบว่า เมื่อวิเคราะห์กับไบโอมเนจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 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)

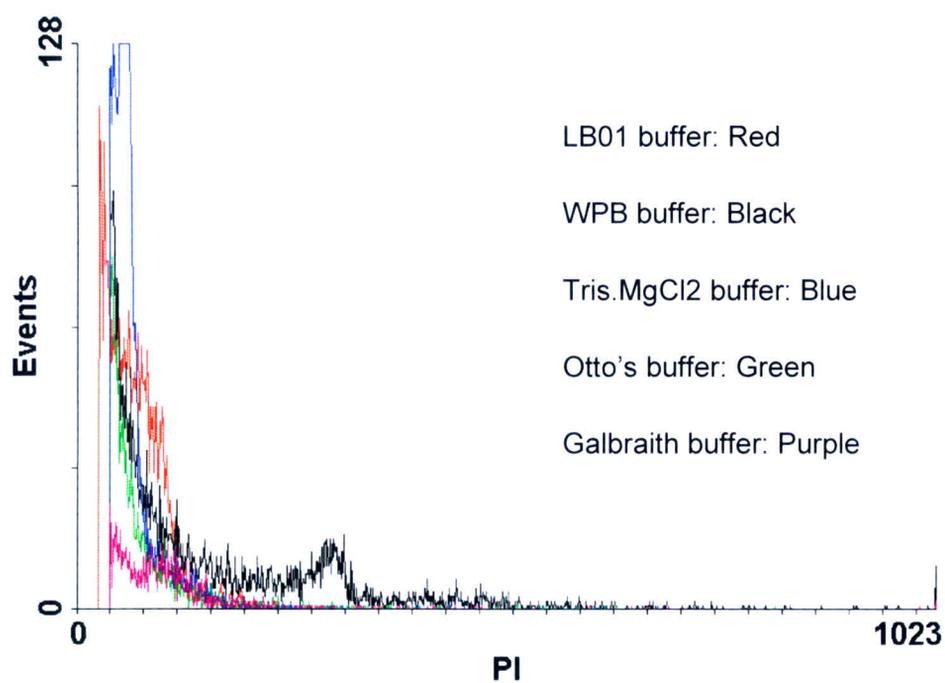
ต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 เดือน มีเฉพาะสารละลายนิวเคลียสชนิด WPB ให้ค่า FL สูงที่สุด และ %CV ต่ำที่สุดเป็นลำดับที่หนึ่ง (281.17 และ 6.45%) ขณะที่สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 ให้ค่า DF ต่ำที่สุด และ YF สูงที่สุดเป็นลำดับที่หนึ่ง (93.41% และ $1.81 \text{ nuclei s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) ดังนั้นสารละลายนิวเคลียสที่มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ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

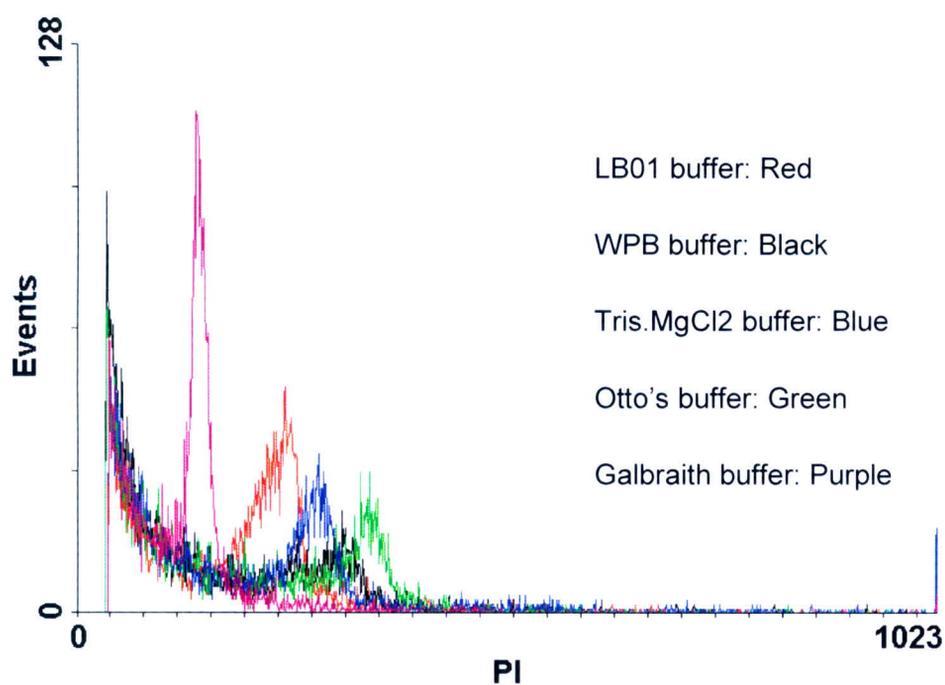
ดังนั้น สารละลายนิวเคลียสที่มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของต้นปาล์มน้ำมันจึงเป็นสารละลาย WPB เท่านั้น เพราะนอกจากให้ค่า FL สูงที่สุด และ %CV ต่ำที่สุดแล้ว ตำแหน่งฮิสโทแกรมยังมีการปรากฏในตำแหน่งคงที่ สำหรับ LB01 แม้ว่าจะให้ค่า YF สูงที่สุด และให้ค่า DF ต่ำที่สุดแล้วก็ตาม แต่ตำแหน่งของฮิสโทแกรมกลับมีการปรากฏในตำแหน่งที่ไม่คงที่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



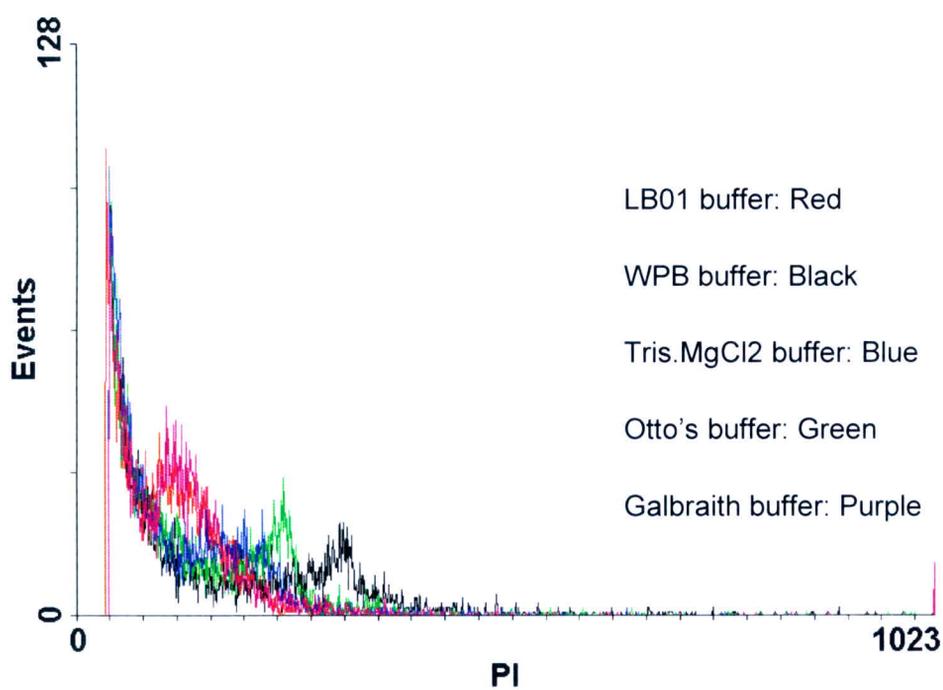
ภาพที่ 10 แสดงฮิสโทแกรมของ Fluorescence intensities (PI fluorescence) ของนิวเคลียสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือน ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด



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 และใบอ่อนปาล์มน้ำมัน

เมื่อวิเคราะห์คัพภะปาล์มน้ำมัน ด้วยวิธีโพลีไซโทเมตรี โดยใช้สารละลายนิวเคลียส 5 ชนิด โดยใช้ใบอ่อนของถั่วเหลืองเป็นพีชอ้างอิงมาตรฐานแบบภายนอก (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

เมื่อวิเคราะห์ใบอ่อน (ปลายใบ กลางใบ และฐานใบ) จากต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1-12 เดือน ด้วยวิธีโพลีไซโทเมตรี โดยใช้สารละลายนิวเคลียส และพีชอ้างอิงชนิดเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของคัพภะปาล์มน้ำมัน พบว่า ตำแหน่งใบอ่อนที่มีความเหมาะสมสำหรับการแยกนิวเคลียสออกมา คือ ตำแหน่งฐานใบ เพราะฮิสโทแกรมที่ได้แสดงถึง %CV ที่ต่ำ และมีการหลังสารออกมารบกวนการอ่านผลน้อย จึงเป็นลักษณะฮิสโทแกรมที่ดี และตำแหน่งของฮิสโทแกรม เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารละลายนิวเคลียสชนิด WPB พบว่า กล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือน มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 4.3 pg (ตารางที่ 3) แต่หากพิจารณาผลการวิเคราะห์ที่ตำแหน่งฐานใบอ่อน พบว่าฐานใบอ่อนกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือน มีปริมาณดีเอ็นเอ เท่ากับ 3.69 pg (ตารางภาคผนวกที่ 1) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์จากคัพภะปาล์มน้ำมันด้วยสารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 และจากการวิจัยก่อนหน้านี้ (Rival et al., 1997; Srisawat et al., 2005; Madon et al., 2008) ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าฐานใบอ่อนปาล์มน้ำมันไม่มีผลมาจาก "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 ปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนมของคัพภะและใบอ่อนจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 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	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 \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.

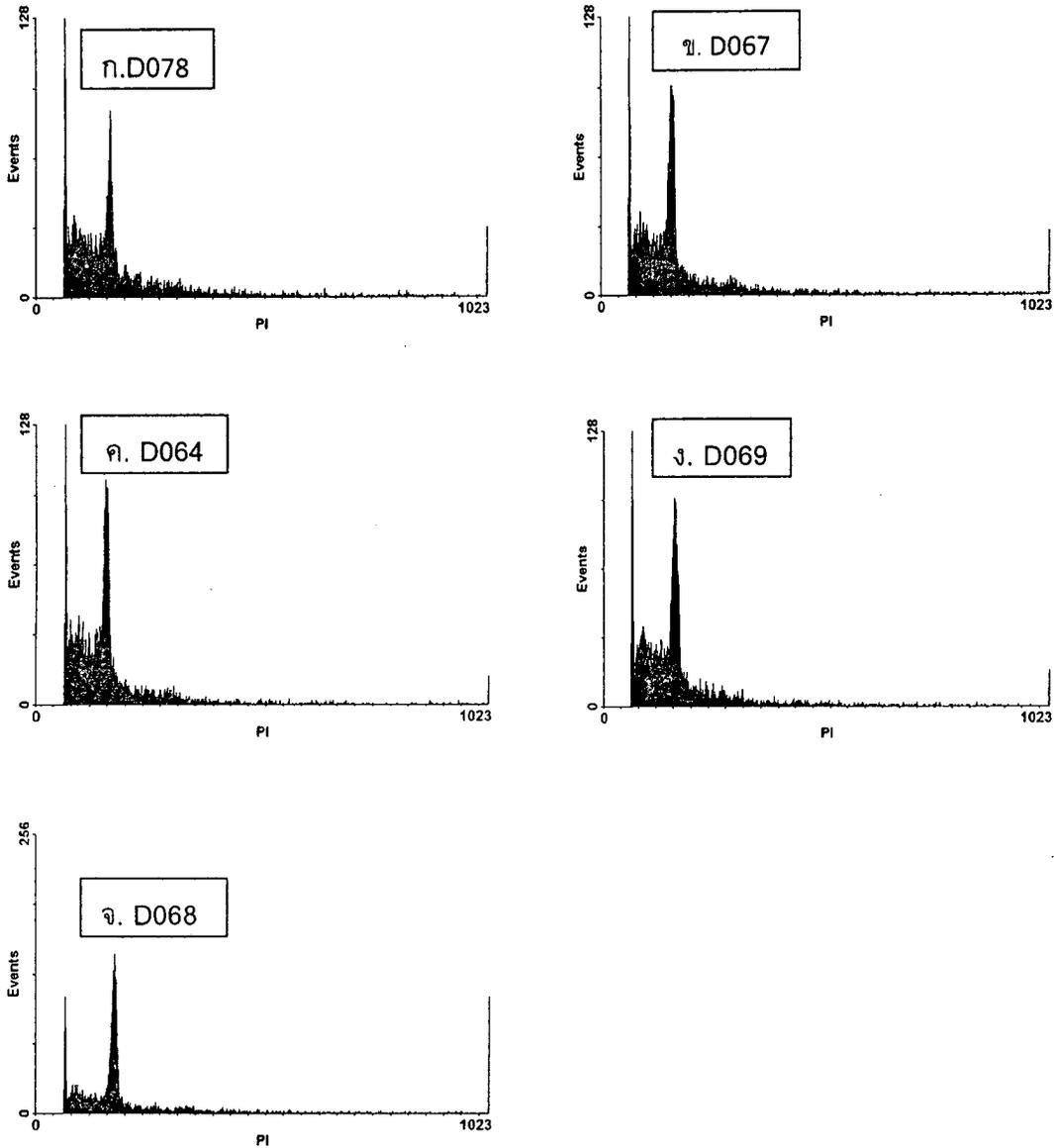
สำหรับต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3-12 เดือน พบว่าตำแหน่งปลายใบ และกลางใบอ่อน ไม่เหมาะที่จะใช้ในการสกัดนิวเคลียสด้วยสารละลายนิวเคลียสชนิด Otto's, Galbraith และ Tris.MgCl₂ ดังนั้น ตำแหน่งฐานใบอ่อนจึงถูกเลือกใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันต้นแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์ฟิลิเฟอร์่า ต่อไป เมื่อใช้สารละลายนิวเคลียสชนิด 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 และพ่อพันธุ์ฟิลิเฟอร์่า ต่อไป

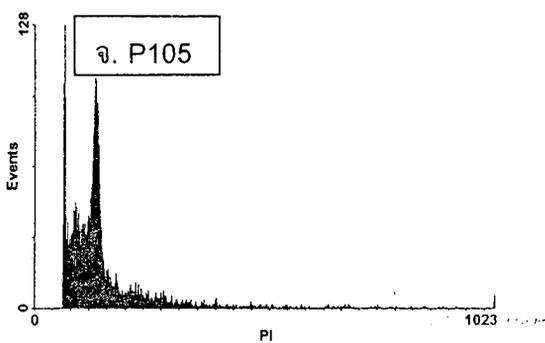
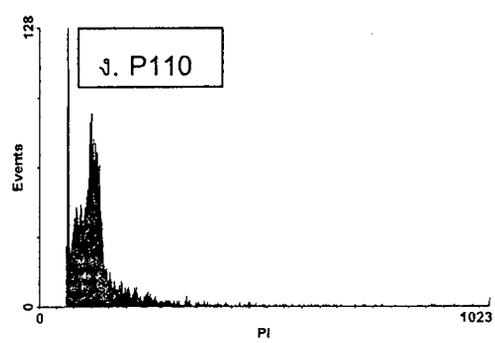
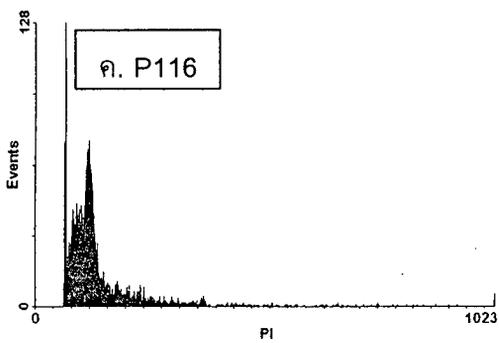
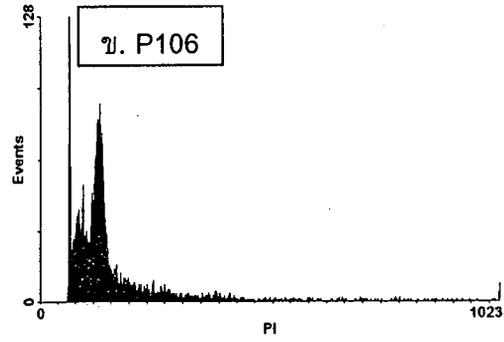
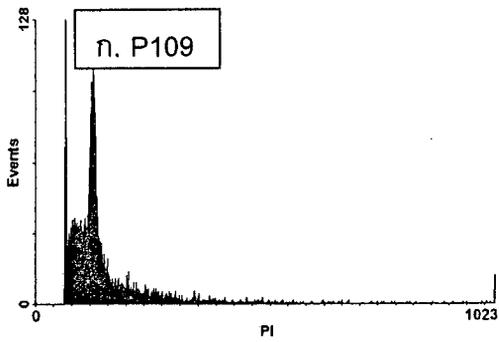
3.2 การเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนม จากใบอ่อนต้นปาล์มน้ำมันแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์ฟิลิเฟอร์่า

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

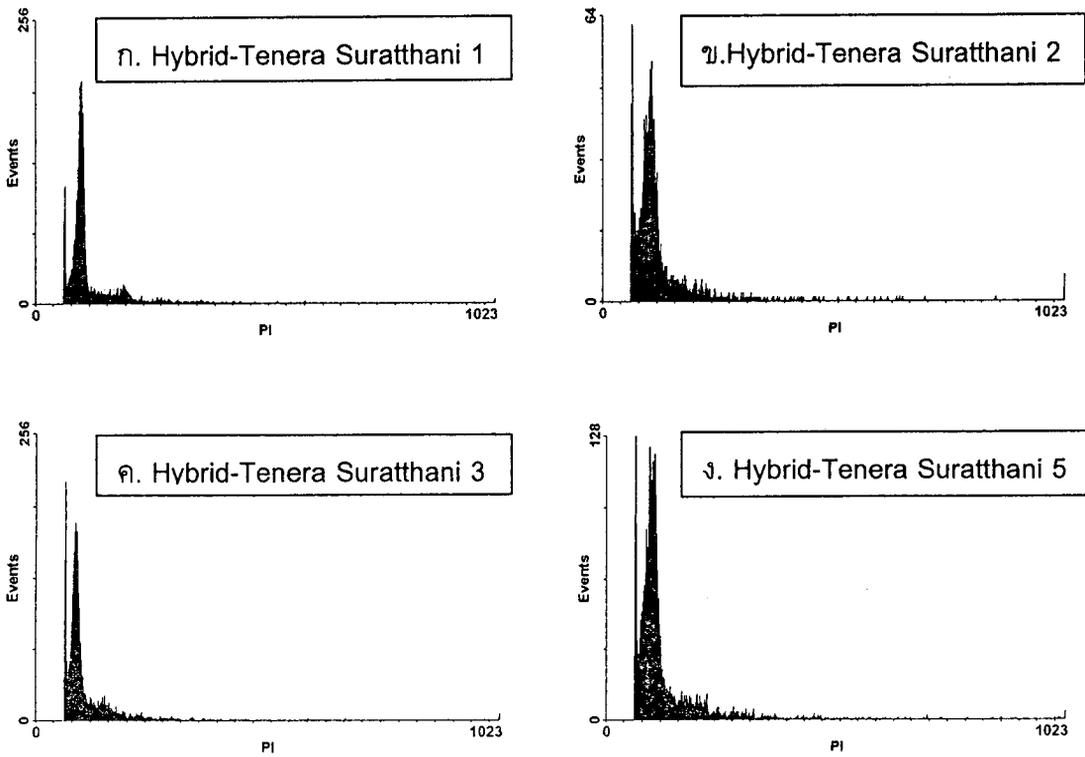
($P < 0.05$) ขนาดจีโนมของต้นปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ดูรา และ ฟิสเฟอรา จึงอยู่ในช่วง 3100 - 3700 และ 2600 - 3000 Mbp ตามลำดับ (ตารางที่ 4)



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 จากไบออนต้นปาล์มน้ำมันพอพันธุ์พิติเฟอราอายุ 10 ปี ที่ถูกแยกด้วยสารละลายนิวเคลียส WPB



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

ตารางที่ 4 ปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนมของไยอ่อน จากต้นแม่พันธุ์ปาล์มน้ำมันดูรา และพ่อพันธุ์พิลีเฟอราของลูกผสมเทเนอราสุราษฎร์ธานี

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.