4. วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสในการวิเคราะห์โฟลไซโทเมทรีของพืชแต่ละชนิดมีความจำเป็น 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.$MgCl_2$ 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 $MgCl_2$ ทำหน้าที่เป็น chromatin stabilizer ซึ่งทำหน้าที่เดียวกับ spermine.4HCl (พบในสารละลายนิวเคลียสชนิด LB01) สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB มีองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ชนิด คือ Na_2EDTA ทำหน้าที่เป็น chelating agent และ sodium metabisulfite (reducing agent) ซึ่งมีหน้าที่หลักช่วยหยุดปฏิกิริยาการเกิดสารกลุ่ม phenolic compounds สารกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นกรดที่ถูกใส่เป็นองค์ประกอบในสารละลายนิวเคลียส จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชั่นของสารกลุ่ม 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 จะไปรบกวนการอ่านผลวิเคราะห์โฟลไซโทเมทรี (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 จะเปลี่ยนจากสีเขียวใสไปเป็นสีน้ำตาลใส 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 ซึ่งเป็นสารละลายนิวเคลียสหลักสำหรับการวิเคราะห์คัพภะปาล์มน้ำมัน (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 และเหมาะสำหรับการวิเคราะห์กับเนื้อเยื่อคัพภะของปาล์มน้ำมันเท่านั้น

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 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ที่ได้ปริมาณดีเอ็นเอของคัพภะปาล์มน้ำมันเท่ากับ 3.7 pg (ใช้ LB01 เป็นสารละลายนิวเคลียส ใช้เครื่อง FACScalibur และใช้ *G. max* cv. Polanka เป็นพืชอ้างอิงมาตรฐาน) ซึ่งแม้ว่าในการทดลองดังกล่าวจะมีการใช้พืชอ้างอิงมาตรฐานที่ต่างชนิดกัน และใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่างรุ่นกัน แต่ผลที่ได้ก็ยังคงเท่ากัน จึงเป็นที่ยืนยันได้ว่าชนิดของพืชอ้างอิง และเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ ไม่มีผลต่อการอ่านผลวิเคราะห์แต่อย่างใด อย่างไรก็ดีเป็นที่น่าสังเกตว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันในการทดลองครั้งนี้ ได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 3.8 pg โดยใช้สารละลายนิวเคลียสชนิด WPB แต่เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์สารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 พบว่าได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างไป คือ 2.0-2.7 pg ชี้ให้เห็นว่าประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสต่างชนิดกัน ย่อมส่งผลต่อปริมาณดีเอ็นเอของพืชที่ต่างกันไป การเลือกใช้

สารละลายนิวเคลียสชนิดใดชนิดหนึ่งกับพืช จึงควรต้องทดสอบค่าพารามิเตอร์ FL, %CV, YF และ DF ก่อนเสมอ

การใช้พืชอ้างอิงแบบภายใน (internal standard) ได้รับการยอมรับในผลการวิเคราะห์เซลล์พืชด้วยวิธีโฟลไซโทเมทรี (Greihuber et al., 2007) แต่สำหรับการวิเคราะห์โฟลไซโทเมทรีกับเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน การใช้พืชอ้างอิงแบบภายนอก (external standard) เป็นสิ่งจำเป็น เพราะการใช้พืชอ้างอิงแบบภายใน ไม่สามารถวิเคราะห์และแสดงฮิสโทแกรมให้ปรากฏได้ อาจเป็นผลมาจากลักษณะของนิวเคลียสปาล์มน้ำมันที่เป็นพืชยืนต้นใบเลี้ยงเดี่ยว มีขนาดใหญ่และมีความจำเพาะต่อองค์ประกอบของสารละลายนิวเคลียส สารที่หลั่งออกมาอาจทำปฏิกิริยาหรือนิวเคลียสปาล์มน้ำมันอาจเกาะกลุ่มกับนิวเคลียสของพืชอ้างอิง (พืชสัมลุก) ดังเห็นได้จากรายงานการวิจัยของ Rival et al.(1997) และ Madon et al. (2008) ที่ต้องใช้พืชอ้างอิงแบบภายนอกเช่นกัน ดังนั้นงานวิจัยต่อไปข้างหน้า ควรที่จะมีการพัฒนาองค์ประกอบของสารละลายนิวเคลียสที่เหมาะสมสำหรับปาล์มน้ำมันโดยเฉพาะ โดยมุ่งใช้ common buffers เป็นสารละลายนิวเคลียสพื้นฐาน และปรับสูตรสารละลายดังกล่าวให้มีองค์ประกอบของ chromatin stabilizer และ reducing agent เพื่อส่งเสริมความสามารถในการสกัดนิวเคลียส และยับยั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจาก phenolic compounds ดังเช่นที่ปรากฏในสารละลายนิวเคลียสชนิด LB01 และ WPB ตามลำดับต่อไป

ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของต้นแม่พันธุ์ปาล์มน้ำมันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอร่า ที่มีอายุ 10 ปี จำนวนชนิดละ 5 ต้นพันธุ์ พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความแตกต่างกัน ต้นแม่พันธุ์ดูร่า มีปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 6.3 - 7.6 pg ต้นพ่อพันธุ์พิสิเฟอร่า มีปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 5.3 - 6.1 pg ขณะที่ลูกผสมเทเนอร่าที่ผลิตเป็นคู่ผสมสุราษฎร์ธานี มีการผลิต ณ เวลาที่ได้ดำเนินงานวิจัย 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 มีปริมาณดีเอ็นเอที่มากกว่าต้นพ่อพันธุ์พิสิเฟอร่าทุกสายพันธุ์ ขณะเดียวกัน ทั้งแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอร่า มีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าลูกผสมเทเนอร่าอย่างชัดเจน จึงเป็นข้อมูลที่แตกต่างไปจากการทดลองก่อนหน้านี้ ที่มีรายงานปริมาณดีเอ็นเอของต้นแม่พันธุ์ดูร่า (D109) เท่ากับ 3.4 pg และพ่อพันธุ์พิสิเฟอร่า (P168) เท่ากับ 3.2 pg (Srisawat et al., 2005) ขณะที่รายงานของ Madon et al. (2008) ได้รายงาน

ปริมาณดีเอ็นเอของต้นแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอร่า เท่ากับ 4.1 และ 3.64 pg ตามลำดับ ความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอดังกล่าว อาจเป็นเพราะการใช้สารละลายนิวเคลียสที่ต่างชนิดกัน การทดลองครั้งนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบอ่อนปาล์มน้ำมัน พบว่า WPB เหมาะที่จะใช้ในการวิเคราะห์กับเนื้อเยื่อใบอ่อนปาล์มน้ำมัน มากกว่า LB01 โดยหากใช้ LB01 ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จะมีค่าต่ำกว่าการใช้ WPB ซึ่งหากเปรียบเทียบกับรายงานของ Madon et al. (2008) ปริมาณดีเอ็นเอของต้นแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอร่า จะมีค่าต่ำกว่าปริมาณดีเอ็นเอในการทดลองครั้งนี้ และหากใช้ Tris.$MgCl_2$ (Srisawat et al., 2005) ปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันต้นแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอร่าที่ได้ จะมีค่าต่ำกว่าการใช้ LB01 และ WPB ดังนั้น รายงานปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันแม่พันธุ์ดูร่า และพ่อพันธุ์พิสิเฟอร่าในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งใช้ WPB เป็นสารละลายนิวเคลียส จึงมีความน่าเชื่อถือ และจะเป็นข้อมูลสำคัญในโครงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันของประเทศไทยต่อไป

เปรียบเทียบรายงานการวิจัยการตรวจสอบลักษณะพันธุ์ของปาล์มน้ำมันโดยใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายบ่งชี้โมเลกุล (DNA marker) ด้วยวิธี Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) พบว่าการใช้ Primer P12 และ P15 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น TCTGGTGAGG และ TTGGCACGGG ตามลำดับ สามารถแยกแยะความแตกต่างของปาล์มน้ำมันทั้งสามสายพันธุ์ ออกจากกันได้ โดยเฉพาะ Primer P15 แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะของต้นพันธุ์ดูร่ามากกว่าพิสิเฟอร่า ขณะที่ต้นเทเนอร่ามีแถบดีเอ็นเอจำเพาะน้อยที่สุด (Sathish and Mohankumar, 2007) รายงานดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่แสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นพันธุ์ดูร่า มากกว่าพิสิเฟอร่า และเทเนอร่ามีปริมาณดีเอ็นเอต่ำที่สุด ขณะที่รายงานของ Te-Chato and Thawaro (2008) แสดง Primer OPT06 ในการแยกแยะลูกผสมเทเนอร่าออกจากแม่พันธุ์ดูร่าและพิสิเฟอร่า ได้เช่นกัน

รายงานการใช้วิธีการอื่น ๆ ในการจำแนกพันธุกรรมปาล์มน้ำมันโดยการใช้ดีเอ็นเอเป็นตัวบ่งชี้ระดับโมเลกุล เช่น Mayes et al. (2000) ได้นำเอาวิธี RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ที่มีตัวตรวจจับ 40 ตัวที่ครอบคลุมดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน และสามารถใช้วิธีนี้ในการดูความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน และสามารถจำแนกปาล์มน้ำมันชนิด *Deli* Dura จากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ออกจาก AVROS Pisifera ได้ มีการเปรียบเทียบเทคนิคดังกล่าวกับเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปาล์มน้ำมัน (*Elaeis oleifera* (Kunth)) จากอเมริกาและปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis*) จากแอฟริกา พบว่าเทคนิค AFLP สามารถจำแนกพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันที่มาจากแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ที่ต่างกันได้ คือที่มาจาก Brazil, French Guyana/Surinam, Peru และ North of Colombia/Central America (Barcelos et al., 2002) เทคนิคอื่น ๆ ก็สามารถใช้ในการจำแนกพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันได้เช่นกัน 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) และยังใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ดีอีกด้วย (Gupta *et al.*, 1994)

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