2. วิธีการทดลอง

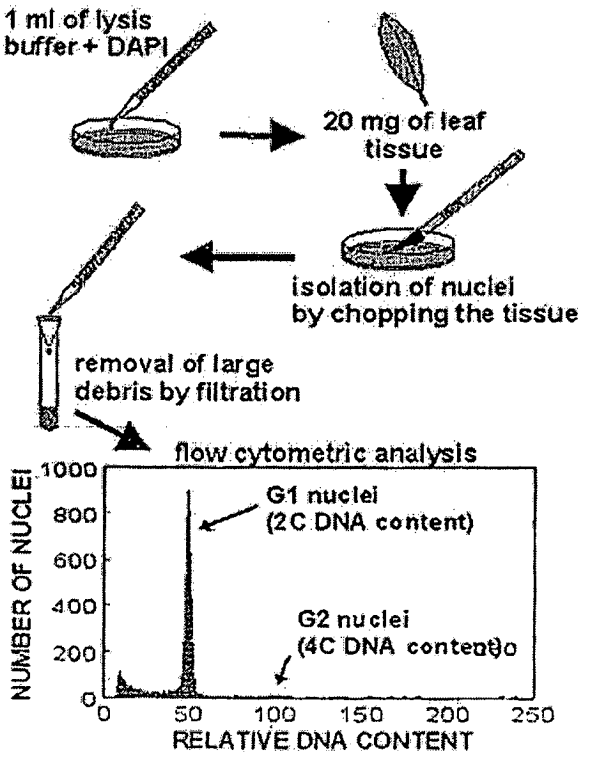
2.1 วัสดุพืช

ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทเนอร่าที่มีอายุ 3-12 เดือน และเนื้อเยื่อใบอ่อนของต้นแม่พันธุ์ดูร่า (Deli Dura; D109, D067, D064, D069 และD068) และพ่อพันธุ์พิสิเฟอร่า (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-$MgCl_2$: [200 mM Tris, 4 mM $MgCl_2$, 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 $MgCl_2$, 2mM Na_2EDTA, 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 Na_2EDTA, 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 $MgCl_2$, 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 Na_2HPO_4, pH 8-9)] (Otto, 1990)

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



ภาพที่ 6 แสดงตัวอย่างวิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน ซึ่งเติมสีฟลูออเรสเซนซ์ที่จะใช้ย้อมลงในสารละลายนิวเคลียส

คำอธิบายเพิ่มเติม

1. ชิ้นส่วนใบอ่อนและคัพภะจะถูกตัดแยกออกจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันและเมล็ดที่สะอาดและสมบูรณ์ ในการเตรียมชิ้นส่วนใบอ่อน ก่อนวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโทมิเตอร์ต้องทำความสะอาดชิ้นส่วนนั้นให้สะอาด น้ำหนักของชิ้นส่วนใบอ่อนและคัพภะที่จะใช้ในการวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโทมิเตอร์คือประมาณ 50 มิลลิกรัม ($5x10^3$ nuclei) ต่อการวิเคราะห์ 1 ครั้ง

2. ใส่ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร แล้วเติมสารละลาย lysis buffer 1.0 มิลลิลิตร

3. ย่อยชิ้นส่วนพืชดังกล่าวด้วยใบมีดผ่าตัด ทิ้งไว้ 2–3 นาที แล้วเติมสารละลายสีย้อม Propidium iodide (PI), ผสมลงไป 50 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายเอ็นไซม์ RNase อีก 50 ไมโครลิตร

4. กระบวนการใช้พืชอ้างอิงเปรียบเทียบ เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการเดียวกันกับตัวอย่างปาล์มน้ำมัน นำสารละลายที่ได้นำมากรองผ่านตะแกรงไนลอนขนาด 42 ไมครอน ลงในหลอดสำหรับเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ เก็บไว้ในสภาพมืดและเย็นประมาณ 2-3 นาที จึงนำเข้าเครื่องวิเคราะห์

2.3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์

ใช้เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ FACScalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่) ทำงานด้วยโปรแกรม CELLQUEST (Becton Dickinson) ใช้ 488 นาโนเมตร argon iron laser เป็นแหล่งกำเนิดแสง 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

นำข้อมูลจากเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป WinMDI รุ่น 2.9 จากนั้นนำค่า FS, SS, FL, CVs, DF และ YF รวมทั้งปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการทดสอบมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS กำหนดระดับนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อจำแนกประสิทธิภาพของสารละลายนิวเคลียสโดยสารละลายที่ถูกคัดเลือกจะต้องให้ค่า FL และ YF สูงสุด และค่า %CV และ DF ต่ำสุด (Loureiro et al., 2007) ประกอบกับข้อมูลตำแหน่งของฮิสโทแกรม จะถูกใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกสารละลายนิวเคลียสที่ดีที่สุดสำหรับปาล์มน้ำมันด้วยเช่นกัน

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:

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

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

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