# การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรีและเครื่องหมายเอสเอสอาร์

# Investigation for somaclonal variation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) *in vitro* by flow cytometry and SSR marker

**วราภรณ์ หีดฉิม[1] และ สมปอง เตชะโต[1*]**

**Waraporn Heedchim[1] and Sompong Te-chato[1*]**

**บทคัดย่อ**: การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าโคลนกระบี่ที่ออกดอก (ผิดปกติ) และไม่ออกดอก (ปกติ) ในหลอดทดลอง โดยตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรีและเครื่องหมายเอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat ; SSR marker) จากการตรวจสอบ พบว่า ทั้งต้นที่ออกดอกและไม่ออกดอกมีปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกันเล็กน้อย โดยต้นที่ออกดอกมีค่าปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 3.54 น้อยกว่าต้นที่ไม่ออกดอก ซึ่งมีค่าปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 3.69 พิโคแกรม เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ ซึ่งใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 9 คู่ไพรเมอร์ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 พบว่า มีเพียง 3 คู่ไพรเมอร์ คือ EgCIR0446 EgCIR0243 และ EgCIR0409 เท่านั้นที่ให้รูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างกัน ซึ่งไพรเมอร์ดังกล่าวให้เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึ่ม 75, 66.67 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์อื่นๆ ให้รูปแบบดีเอ็นเอเหมือนกัน ซึ่งสามารถใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวในการตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันก่อนปลูกลงแปลงได้

**คำสำคัญ**: ความแปรปรวนทางพันธุกรรม, โฟลไซโทเมทรี, เครื่องหมายเอสเอสอาร์

**ABSTRACT:** Flowering characteristics are somaclonal variations of oil palm (*Eleais guigeensis* Jacq.) *in vitro* which caused damage to farming. Flowering and non-flowering of *in vitro*-plantlets of oil palm Tenera (Krabi clone) were investigated using flow cytometry and Simple Sequence Repeat (SSR marker). The results showed that all *vitro*-flowering and *vitro* non-flowering plantlets of oil palm had slightly difference in DNA content. *Vitro* flowering plantlet had DNA content at 3.54 picogram slightly lower than that of non-flowering one which had DNA content at 3.69 picogram. In case of SSR marker, nine SSR primers; EgCIR0008, EgCIR0243, EgCIR0337, EgCIR0409, EgCIR0446, EgCIR0465, EgCIR00781, EgCIR0905 and EgCIR1772 were used to verify the DNA profiles between *vitro*-flowering and *vitro* non-flowering. The results showed that three primers including EgCIR0446 EgCIR0243 and EgCIR0409 gave polymorphism of DNA banding at 75, 66.67 and 25 %, respectively. These primers could be used as a key marker for screening *in vitro* flowering plantlets of oil palm.

**Keywords:** Somaclonal variation, Flow cytometry, SSR marker

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112

* Corresponding author: stechato@yahoo.com

## บทนำ

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของไทย เป็นแหล่งของพลังงานไบโอดีเซลที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตและปริมาณน้ำมันสูงเมื่อเทียบกับน้ำมันที่ได้จากพืชอื่นๆ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการผลิตปาล์มน้ำมันเพิ่มมากขึ้น โดยธรรมชาติแล้วปาล์มน้ำมันสามารถขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด (ธีระ, 2545) แต่วิธีการดังกล่าวมีข้อเสีย คือ ต้องใช้ระยะเวลานาน แต่ในปัจจุบันมีเทคนิคหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้ได้ปริมาณมากและใช้ระยะเวลาสั้น คือ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่เทคนิคดังกล่าวมีข้อเสีย คือ ต้นปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีโอกาสเสี่ยงต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรม ส่งผลให้ต้นกล้าปาล์มที่ได้มีลักษณะผิดปกติไปจากเดิม นอกจากนี้ การปลูกปาล์มน้ำมันในปัจจุบันประสบกับปัญหาในเรื่องของพันธุ์ปลอมปนเป็นอย่างมาก ซึ่งเกษตรกรจะต้องระยะเวลาอย่างน้อย 3 ปี จึงจะรู้ว่าปาล์มน้ำมันที่ปลูกนั้นเป็นพันธุ์ดีหรือพันธุ์ปลอม ดังนั้น หากมีการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมก่อนที่จะปลูกลงแปลงก็จะช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ เทคนิคที่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้แก่ เทคนิคโฟลไซโทเมทรี เช่น Srisawat et al. (2012) และเทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น อัญชลีและสมปอง (2555) Sanputawong และ Te-chato (2011) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โคลนกระบี่ ที่ออกดอกในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นลักษณะต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติ โดยใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรีและเครื่องหมายเอสเอสอาร์ เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันก่อนปลูกลงแปลงเป็นการลดความเสียหายและค่าใช้จ่ายให้กับเกษตรกรผู้ปลูกสวนปาล์ม

## วิธีการศึกษา

### การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคไฟลไซโทมิเตอร์

ตัดใบอ่อนของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองที่ออกดอกหรือไม่ออกดอก (Figure 1) ลงในจานเพาะเลี้ยง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (PVP solution) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ให้ละเอียดด้วยใบมีดผ่าตัด กรองสารละลายด้วยผ้ากรอง 20 ไมโครเมตร ใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติมสีย้อมโพรพิเดียม ไอโอไดด์ (PI) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโทเมทรี เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันดังกล่าวโดยใช้ดีเอ็นเอของข้าวญี่ปุ่นสายพันธุ์ Nipponbare ซึ่งทราบขนาดจีโนมแน่นอนแล้วเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

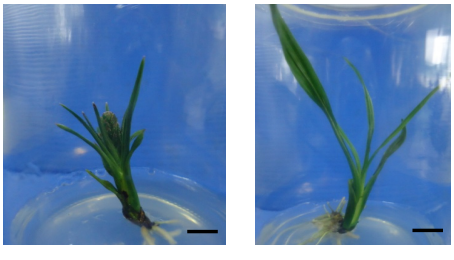

Figure 1 Morphology of *in vitro* flowering and non flowering in oil palm plantlets (bar = 5 mm).

**สมการในการหาขนาดจีโนมของพืชจากการใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรี**

$$\text{DNA Content} = \frac{\text{Sample G1mean FL}}{\text{Reference standard G1mean FL}} \times \text{DNA content of reference standard}$$

เปรียบเทียบกันระหว่างต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอก โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละหน่วยการทดลองทำ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ขวด

**การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์**

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชิ้นส่วนใบจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลอง ตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (นาโนดรอป) ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็น forward และ reverse จำนวน 9 คู่ (อัญชลีและสมปอง, 2555; Thawaro and Te-chato, 2009) ได้แก่ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์จากปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 0.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละชนิดเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ampli *Taq* 360 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิของปฏิกิริยาดังนี้ Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที Denaturation ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ใช้อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที Extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำ จำนวน 35 รอบ Final-extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จากนั้นนำมาแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องแยกขนาดดีเอ็นเออัตโนมัติ (มัลตินา) นาน 2 ชั่วโมง

## ผลการศึกษา

**การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี**

จากการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลองด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลองที่มีค่าเท่ากับ 3.54 และ 3.69 พิโคแกรม ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (Table 1; Figure 2)

**Table 1** DNA content of *in vitro* flowering and non flowering in oil palm plantlets.

| Oil palm | *Oryza sativa* Fluorescent Intensity | Oil palm Fluorescent Intensity | Genome size (pg) |
|---|---|---|---|
| Flowering | 117.47 | 454.98 | 3.54 |
| Non-flowering | 116.04 | 471.33 | 3.69 |
| F-test | ns | ns | ns |
| C.V.(%) | 5.51 | 2.5 | 6.06 |

ns = non-significant

**การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์**

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกและไม่ออกดอกในหลอดทดลองด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 9 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามี 3 คู่ไพรเมอร์ที่ให้รูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างกันในต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งสองลักษณะ คือ ไพรเมอร์ EgCIR0446 EgCIR0243 และ EgCIR0409 ซึ่งไพรเมอร์ดังกล่าวให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลีมอร์ฟิซึมที่ 75 66.67 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (**Table 2**) อย่างไรก็ตาม พบว่าไพรเมอร์ EgCIR0243 ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนกว่าไพรเมอร์ EgCIR0446 นอกจากนี้ไพรเมอร์ดังกล่าวยังให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างประชากรภายในกลุ่มขนาด 300 และ 325 คู่เบส (**Figure 3**)

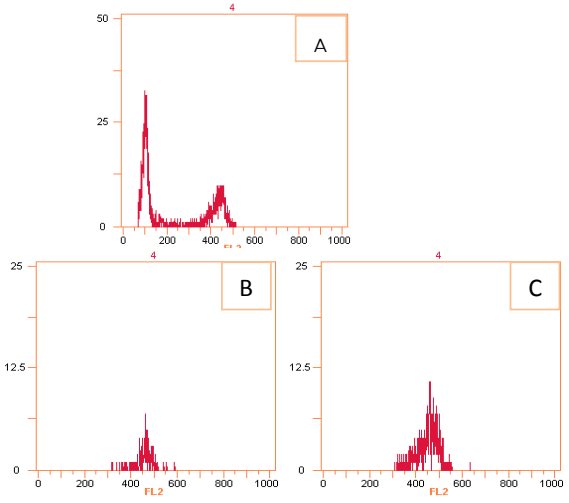


**Figure 2** Histogram derived from flowering plantlet (B) and non-flowering plantlet (C) compared with DNA content of *Oryza sativa* “Nipponbare” (A).

**Table 2** Primer type, sequence, total of number DNA pattern, polymorphic fragment and percentage of polymorphic fragment obtained from SSR analysis.

| Primer type | Sequence (5’-3’) | Amplified fragment | Polymorphic fragment | Polymorphism (%) |
|---|---|---|---|---|
| EgCIR0446 | (F) CCCCTTCGAATCCACTAT | 4 | 3 | 75 |
| | (R) CAAATCCGACAAATCAAC | | | |
| EgCIR0243 | (F) TGGAACTCCTATTTTACTGA | 6 | 4 | 66.67 |
| | (R) GCCTCGTAATCCTTGTCA | | | |
| EgCIR0409 | (F) GGGAATTGGAAGAAAAGAAAG | 4 | 1 | 25 |
| | (R) TCCTGAGCTGGGGTGGTC | | | |

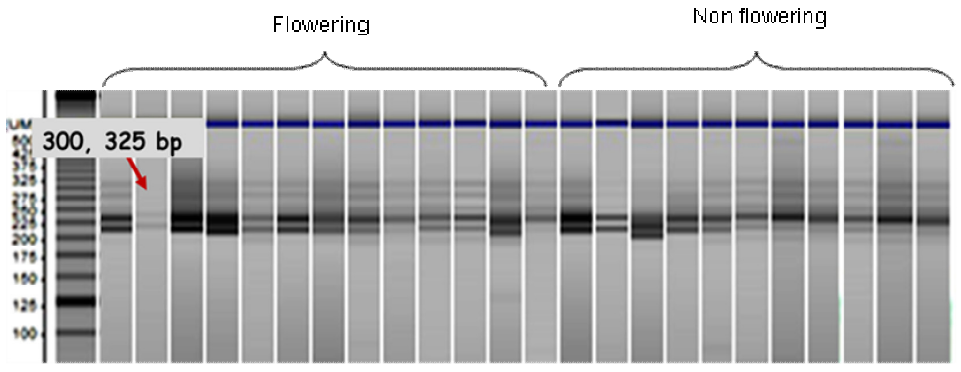


**Figure 3** DNA patterns from oil palm leaves *in vitro* obtained with SSR analysis by using EgCIR0243 primer.

## วิจารณ์

จำนวนครั้งและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อความผันแปรทางพันธุกรรมของพืช หากจำนวนครั้งและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมากขึ้นจะกระตุ้นให้มีความผันแปรเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน (กิตติ และคณะ, 2555) เช่นเดียวกับต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกในหลอดทดลองซึ่งเป็นความผิดปกติหนึ่งที่อาจเกิดจากความผันแปรทางพันธุกรรมมาจากสาเหตุข้างต้น โดยเฉพาะในขั้นตอนของการชักนำเป็นต้นอ่อนชุดที่ 1 (primary somatic embryo ; pSE) จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากการทดลองพบว่า บางชิ้นส่วนสามารถเกิด pSE ได้ง่ายและเร็ว บางชิ้นส่วนต้องย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่ ถึงจะเกิด ขึ้นอยู่กับศักยภาพความพร้อมของเซลล์ในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี ซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นในปาล์มน้ำมันเนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่ายมีประสิทธิภาพ และประหยัดค่าใช้จ่ายเมื่อวิเคราะห์หลายตัวอย่าง (Ochatt, 2006) พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกมีค่าเท่ากับ 3.54 พิโคแกรม น้อยกว่าต้นกล้าปาล์มที่ไม่ออกดอกซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.69 พิโคแกรม ซึ่งใกล้เคียงกับ Srisawat et al. (2012) ได้รายงานปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่า พบว่า ใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันดังกล่าวมีค่าประมาณ 3.8 พิโคแกรม และสอดคล้องกับการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย เอสเอสอาร์ พบว่าไพรเมอร์ EgCIR0243 สามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอได้และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกน้อยกว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ออกดอก นั่นก็แสดงว่าความผิดปกติดังกล่าวอาจส่งผลให้ดีเอ็นเอบางส่วนขาดหายไป ทำให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ออกดอกมีปริมาณและแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ออกดอก นอกจากนี้ยังพบความแปรปรวนของดีเอ็นเอภายในประชากรเดียวกันของต้นที่ออกดอกด้วย ซึ่งต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผิดปกติเหล่านี้อาจเกิดมาจากการย้ายเลี้ยงเป็นเวลานานในการที่จะชักนำให้เป็นพืชต้นใหม่ทำให้เซลล์เกิดความเครียดในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ผลจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้น นำไปสู่การผันแปรของเซลล์ร่างกายตั้งแต่ระดับโมเลกุล โครโมโซม ไซโทพลาซึม เซลล์เนื้อเยื่อ และการเกิดสัณฐานของพืชในที่สุด (กิตติ และคณะ, 2555) จากการที่เครื่องหมายเอสเอสอาร์มีประสิทธิภาพสามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดีกว่าเทคนิคอื่น (Kate-ngam, 2003) จึงทำให้เทคนิคดังกล่าวถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลาย เช่น พืชตระกูลถั่ว (Siripin and Jindasing, 2012) แคนตาลูป (Malik et al., 2011) ปาล์มน้ำมัน (Sanputawong and Te-chato, 2011) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามจำนวนไพร

เมอร์ที่ใช้อาจน้อยเกินไปและบางไพรเมอร์ยังให้ผลการตรวจสอบที่ไม่ชัดเจน ซึ่งการเลือกไพรเมอร์เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การวิเคราะห์ผลง่าย ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

## สรุป

การใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรีในการตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งสองลักษณะได้ แต่การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอได้โดยใช้ 3 คู่ไพรเมอร์ คือ EgCIR0446 EgCIR0243 EgCIR0409 แต่ไพรเมอร์ EgCIR0243 ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถวิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากรภายในกลุ่มได้ด้วย ดังนั้นการศึกษานี้จึงสามารถสรุปได้ว่าเครื่องหมายเอสเอสอาร์สามารถแยกความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันก่อนปลูกลงแปลงได้

## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนบัณฑิตศึกษาภายใต้โครงการวิจัยมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติและศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ และสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

## เอกสารอ้างอิง

กิตติ โพธิปัทมะ, สุริยา ฤธาทิพย์ และ กรวิศฎ์ ณ ถลาง. 2555. การแปรผันและการกลายของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 22: 225-231.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, นิทัศน์ สองศรี, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำ และชัยรัตน์ นิลนนท์. 2545. ผลของการปลูกปาล์มน้ำมันที่เก็บจากโคนต้น (พันธุ์ปลอม): ความเสียหายต่อเกษตรกรและเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ. จดหมายข่าวปาล์มน้ำมัน 3 วันที่ กันยายน – พฤศจิกายน 2545: หน้า 2- 5.

อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์ และสมปอง เตชะโต. 2555. การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD และ SSR. แก่นเกษตร 40: 157-166.

Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Kate-ngam, S. 2003. DNA markers in plant breeding. Jour of ubon ratchathani university 5: 37-58.

Malik, A. A., L. Cui, S. Zhang, and J. Chen. 2011. Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. Hort. Sci. (Prague) 38: 27–34.

Sanputawong, S. and S. Te-chato. 2011. Analysis of somaclonal variation of callus, somatic embryo and plant regeneration of *in vitro* oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Journal of Agricultural Technology 7: 531-545.

Siripin, S. and M. Jindasing. 2012. Genetics diversity in vegetable soybean cultivars by SSR markers. Agricultural Science 43: 525-528.

Srisawat, T., K. Pattanapanyasat, and J. Dolezel. 2012. Flow cytometric classification of oil palm cultivars. African Journal of Biotechnology 11: 3714-3724.

Thawaro, S. and S. Te-chato. 2009. Application of molecular markers in the hybrid verification and assessment of somaclonal variation from oil palm propagated *in vitro.* ScienceAsia 35: 142-149.

Ochatt, S. J. 2006. Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus). In: Medicago truncatula Handbook: 13. Available: http://www.google.co.th/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDAQFjAA&url=htth%3A%2F%2Fwww.noble.org. Accessed 3/1/2013.