

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมัน
ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

Molecular Markers for Analysis of Genetics Diversity
and Identification of Oil Palm Hybrid Varieties

หทัยรัตน์ อุไรรงค์^{1/} อรรถรัตน์ วงศ์ศรี^{2/} นัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ^{1/}
Hathairat Urairong^{1/} Ornrat Wongsri^{2/} Naiyanate Jaroensanit Tanaka^{1/}

ABSTRACT

The genetic diversity studies and *SHELL* type analysis of oil palm are achieved by molecular marker. Thirteen simple sequence repeat (SSR) markers loci were selected to distinct 10 oil palm populations viz. Deli Dura, AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania and La Me. The results showed that male parent oil palm, La Me had the most genetical differentiation from other male and female parent populations, followed by Calabar, Nigeria, Tanzania and Ghana. Among male parent oil palms, AVROS had the most genetic similarity to female parent, Deli Dura followed by DAMI. In addition, the new SSR markers were reselected for investigating the genetic diversity of Deli Dura populations as well as the progenies derived from inter-specific hybridization between *Elaeis guineensis* and *E. oleifera*. The obtained data are efficient to differentiate all oil palm populations. Moreover, the primers mEgCIR3428, mEgCIR3519 and mEgCIR0874, were sufficient to be used as markers in identifying Surat Thani 1-8 oil palm varieties. For analysis of oil palm *SHELL* type, the MADS-box gene of 129 samples including 3 shell types, Dura, Pisifera and Tenera from 10 distinct oil palm populations were sequenced and performed multiple nucleotides alignment. The SNPs that can differentiate the oil palm *SHELL* type in each population were discovered as follow, SNP_{ENG} (T/C) in Ekona Ghana Calabar and Nigeria, SNP_{TaYa} (A/T) in Tanzania Yangambi, SNP_{DA} (C/G) in DAMI, SNP_{LaAv} (C/A) in La Me and AVROS, SNP_{Tan} (C/G) in Tanzania. The obtained data of SNPs loci were used to generate 4 sets of primers and probes for accurately and rapidly determining oil palm *SHELL* type with real-time PCR. These markers are very applicable for quality control

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, กรมวิชาการเกษตร

^{1/} Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture

^{2/} ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี, กรมวิชาการเกษตร

^{2/} Surat Thani Oil palm Research Center, Department of Agriculture

^{1/} Current address : Faculty of Biotechnology, College of Agricultural Innovation, Biotechnology and food, Rangsit University

of Tenera oil palm seedling production for reducing or eliminating Dura contamination, and distinguishing the female and male parent genotype efficiently.

Key words: molecular markers, genetics diversity, oil palm hybrid Tenera

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และตรวจวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมัน ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล โดยคัดเลือก SSR Markers 13 ตำแหน่ง ที่สามารถให้ความแตกต่างของประชากรปาล์มน้ำมัน 10 กลุ่มพันธุ์คือ Deli Dura, AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me พบว่า กลุ่มพันธุ์พ่ที่มีแตกต่างจากกลุ่มพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อื่น ๆ มากที่สุด คือ La Me รองลงมาได้แก่ Calabar, Nigeria, Tanzania และ Ghana กลุ่มพันธุ์ AVROS มีพันธุกรรมคล้ายพันธุ์แม่ Deli Dura มากที่สุด รองลงมาคือ DAMI จากการศึกษาพันธุกรรมของประชากร Deli Dura และลูกผสมต่างสปีชีส์ของ *Elaeis guineensis* กับ *E. oleifera* โดยใช้ SSR Markers 32 ตำแหน่ง สามารถจำแนกกลุ่มพันธุ์ทั้งหมดออกจากกันได้ และพบว่า ไพรมอร์ mEgCIR3428, mEg CIR3519 และ mEgCIR0874 เพียงพอที่จะใช้จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1-8 สำหรับการวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมัน โดยการอ่านและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MADS-box ชนิด Dura Pisifera และ Tenera ของ 10 กลุ่มพันธุ์ จำนวน 129 ตัวอย่าง พบ สนิปส์ที่สามารถแยกชนิดของปาล์มน้ำมันได้ คือ SNP_{ENG} (T/C) ใน Ekona Ghana Nigeria และ

Calabar, SNP_{TaYa} (A/T) ใน Tanzania Yangambi, SNP_{DA} (C/G) ใน DAMI, SNP_{LaAv} (C/A) ใน La Me และ AVROS, SNP_{Tan} (C/G) ใน Tanzania จากข้อมูล SNP ที่พบได้พัฒนา ไพรมอร์และโพรบจำนวน 4 ชุด สำหรับตรวจสอบชนิดของปาล์มน้ำมันได้แม่นยำและรวดเร็ว ด้วยเครื่อง Real-time PCR เพื่อประโยชน์ในการตรวจควบคุมคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมัน และคัดเลือก ต้นพ่อพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำหลัก: เครื่องหมายโมเลกุล ความหลากหลายทางพันธุกรรม ปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอร่า

คำนำ

อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มมีอัตราการขยายตัวที่ค่อนข้างสูงโดยมีการเพิ่มปริมาณของพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันจาก 69,625 ไร่ ในปี พ.ศ. 2520 เป็น 4.5 ล้านไร่ ให้ผลผลิต 12.37 ล้านตัน ปี พ.ศ. 2556 รัฐบาลมีเป้าหมายขยายพื้นที่การปลูกให้ได้ 10 ล้านไร่ ภายในปีพ.ศ. 2572 เพื่อให้ได้ผลผลิตปาล์มน้ำมัน 25 ล้านตัน หรือน้ำมันปาล์มดิบ 4.5 ล้านตัน ทั้งนี้ปาล์มน้ำมันมีส่วนแบ่งทางการผลิตสูงสุดถึงร้อยละ 73 ของอุตสาหกรรมน้ำมันพืชของไทย (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) จากการวิเคราะห์ผลผลิตปาล์ม น้ำมันต่อไร่ต่อปีของไทย พบว่า ผลผลิตค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับผลผลิตของประเทศมาเลเซีย ดังนั้น การพัฒนาสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้มีผลผลิตสูง และใช้ต้นกล้าพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ดีได้มาตรฐาน รวมถึงการจำแนก และตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน จึงเป็นเรื่องสำคัญในการเพิ่มผลผลิต

ปาล์มน้ำมันสามารถแบ่งตามลักษณะของผลได้เป็น 3 ชนิด คือ ดุรา (Dura) พิสิเฟอร่า (Pisifera)

และ เทเนอรา (Tenera) ซึ่งเป็นผลมาจากยีน 1 คู่ ที่ควบคุมความหนาของกะลา (SHELL gene) คือ ดูรา มียีนควบคุมลักษณะเด่น (homozygous dominance, Sh+Sh+) ลักษณะผลมีกะลาหนา 2-8 มล. ไม่มีวงเส้นประสีดำรอบกะลา มีชั้นเปลือกนอกบาง 35-60% ของน้ำหนักผล นิยมใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ คือ Deli dura

ฟิลิเฟอรา มียีนควบคุมลักษณะผลเป็นลักษณะด้อย (homozygous recessive, Sh_Sh_) ผลไม่มีกะลา ข้อดอกตัวเมียส่วนใหญ่เป็นหมัน (abortion) ทำให้ผลฝ่อลีบ ทะลายเล็ก ผลผลิตทะลายต่ำมาก ไม่ปลูกเป็นการค้าแต่ใช้เป็นต้นพ่อพันธุ์

เทเนอรา เป็นพันธุ์ทาง (heterozygous, Sh+Sh_) เกิดจากการผสมข้ามระหว่างดูรา และ ฟิลิเฟอรา ลักษณะผลมีกะลาบาง ตั้งแต่ 0.5-4 มล. มีวงเส้นประสีดำอยู่รอบกะลา มีชั้นเปลือกนอก 60-90% ของน้ำหนักผล ปาล์มน้ำมันชนิดเทเนอรา เป็นปาล์มที่ใช้ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงกว่าชนิดอื่น (กรมวิชาการ เกษตร, 2547) จากร่างแผนยุทธศาสตร์ปาล์มน้ำมัน และน้ำมันปาล์มของประเทศไทย จะมีการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันปีละ 2.5 แสนไร่ ปลูกทดแทนสวนปาล์มน้ำมันเก่า 0.3 แสนไร่ และปลูกทดแทนยางพารา 1.0 แสนไร่ คิดเป็นความต้องการการตัดกล้าปาล์มน้ำมัน จำนวน 9,500,000 ต้น/ปี (25 ต้น/ไร่) หรือคิดเป็นเมล็ดงอก 11,400,000 เมล็ด/ปี (30 เมล็ด/ไร่) ทำให้ความต้องการต้นกล้าปาล์มพันธุ์ดีเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีการนำกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้มาตรฐาน หรือเก็บจากโคนต้นไปขายให้เกษตรกร เกิดการปะปนของต้นปาล์มชนิด ดูรา และฟิลิเฟอรา กว่าเกษตรกรจะทราบว่าเป็นพันธุ์ปาล์มที่ปลูกไม่ได้มาตรฐาน ให้ผลผลิตต่ำ (ผลผลิตทะลายลดลง 15-35%)

ต้องใช้เวลานานประมาณ 3 ปี นอกจากผลผลิตลดลงแล้ว เกษตรกรต้องเสียเวลาปลูกทดแทนใหม่ ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ และชนิดของปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้า จึงเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อช่วยในการควบคุมคุณภาพของต้นกล้าปาล์มน้ำมันตาม พรบ.พันธุ์พืช พ.ศ. 2518 (ฉบับที่ 2 พ.ศ.2541) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันที่รวบรวมไว้ในศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกปาล์มน้ำมันชนิด ดูรา ฟิลิเฟอรา และเทเนอรา ในระยะต้นกล้า

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พืชทดลอง

เชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันรวม 531 ตัวอย่างพันธุ์ ประกอบด้วยประชากรที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ Deli Dura 246 ตัวอย่างพันธุ์ ต้นพ่อพันธุ์ ฟิลิเฟอรา 151 ตัวอย่างพันธุ์ ได้แก่ AVROS, Calabar, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Tanzania, DAMI และ Yangambi ประชากรลูกผสมเทเนอรา พันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 - 8 จำนวน 74 ตัวอย่างพันธุ์ ที่รวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และปาล์มน้ำมันของบริษัทเอกชน 60 ตัวอย่างพันธุ์

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

2.1 การคัดเลือก SSR primer ในการจำแนก และวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

มีขั้นตอน ดังนี้

2.1.1 สกัดดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน

36 ตัวอย่าง โดยสุ่มเลือกจากประชากรปาล์ม น้ำมัน กลุ่ม Deli Dura ที่ใช้เป็นพันธุ์แม่ 9 ตัวอย่าง และที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อ 9 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการของ หทัยรัตน์และคณะ (2548) ที่ดัดแปลงมาจาก Agrawal *et al.* (1992) โดยนำตัวอย่างใบปาล์ม น้ำมัน 2 ก. ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ บดด้วยโกร่งให้ละเอียดพร้อมกับไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างที่บดแล้วใส่หลอด เติมนัฟเฟอร์สกัด (2xCTAB; 2% (w/v) Cetyl trimethyl ammonium bromide, 1.4 M NaCl, 50 mM Na₂ EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) และ 2 ไมโครลิตร 2-mercaptoethanol) ปริมาณ 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 60°C 30 นาที เขย่าหลอดทุก 10 นาที เมื่อครบเวลาเติม chloroform : Isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในหลอดโดยวิธีกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 M NaHCO₃ 50 ไมโครลิตร และ Isopopanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % Ethanol 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ล้างตะกอน 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย TE buffer (1 mM Na₂ EDTA 10 mM Tris-HCl pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอ ที่ได้วัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Spectrophotometer

2.1.2 การทำปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยนำ SSR primer (Billotte *et al.* 2005) จำนวน 100 คู่ ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ที่ปลาย 5' นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้ดีเอ็นเอ ข้อ 2.1.1 เข้มข้น 50 นาโนกรัม เป็นแม่พิมพ์ องค์ประกอบและสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ 10 mM Tris – HCl (pH 8.3), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, gelatin 0.01%, dNTP 1.6 mM ใช้ forward primers และ reverse primers เข้มข้น 0.25 mM, Tag DNA polymerase 0.5 unit ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 95°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94°C 30 วินาที 55°C 30 วินาที 72°C 30 วินาที 35 รอบ และ 72°C 7 นาที 1 รอบ

2.1.3 การวิเคราะห์ผลผลิต PCR : นำผลผลิต PCR ข้อ 2.1.2 จำนวน 1 ไมโครลิตร ไปแยกขนาดด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetics Analyzer วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Genescan และ Genotyper ตามเอกสารแนะนำการใช้ของบริษัทที่ผลิตเครื่องมือ (Anonymous, 1997) คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิต PCR ชัดเจน และมีอัลลีลที่แตกต่างกัน (polymorphic) มาก

2.2 จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์ม น้ำมัน

2.2.1 สกัดดีเอ็นเอ ของประชากรปาล์ม น้ำมันที่ปลูกรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยปาล์ม น้ำมัน สุราษฎร์ธานี และพันธุ์ปาล์มของบริษัทเอกชน รวม 531 ตัวอย่าง โดยสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีข้อ 2.1.1

2.2.2 เจือจางดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.2.1 ให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/มล. ใช้เป็นแม่พิมพ์สำหรับการขยายยีนในหลอดทดลองใช้

ไพรเมอร์ ที่คัดเลือกจากข้อ 2.1 นำไปเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ โดยมีองค์ประกอบ และสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 จากนั้นแยกขนาดของผลผลิต PCR ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer

2.2.3 วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรม Genotyper วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันแบบจัดกลุ่ม (Cluster Analysis) และสร้าง Dendrogram

3. การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสลับ (SNP) เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน

ใช้เครื่องหมายโมเลกุลสลับ ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสของจีโนมดีเอ็นเอ บริเวณเป้าหมายที่เกิดการกลายพันธุ์แบบแทนที่ เพียงหนึ่งตำแหน่ง โดยใช้พันธุ์ปาล์มน้ำมันสามชนิด คือ พันธุ์แม่ชนิดดูรา พันธุ์พ่อชนิดฟิลิเฟอร่า และพันธุ์ลูกผสมชนิดเทเนอร่า ของ 10 กลุ่มพันธุ์กรรมคือ Deli Dura, DAMI, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Tanzania, Yangambi AVROS และ Calabar จำนวน 129 ตัวอย่างพันธุ์ สกัดดีเอ็นเอของใบปาล์ม ตามวิธี ในข้อ 2.1

3.1 การทำปฏิกิริยา PCR ขยายยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมัน

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน 129 ตัวอย่างที่สกัดไว้ไปขยายยีน MADS-box โดยใช้ไพรเมอร์ในบริเวณอนุรักษ์ของยีน (Singh *et al.* 2013) การทำปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 4 mM dNTPs 2 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 5 หน่วย/ไมโครลิตร Tag DNA polymerase, (Bioline, USA) 0.2 ไมโครลิตร, 5 mM ของคู่ primer อย่างละ 0.5

ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 20 ไมโครลิตร และตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง PCR ดังนี้ 95 °ซ 7 นาที 1 รอบ 94 °ซ 30 วินาที 55 °ซ 30 วินาที และ 72 °ซ 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72 °ซ เวลา 7 นาที 1 รอบ นำผลผลิตของ PCR ที่ได้แยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.2 % low melting temperature agarose ย้อมแถบ ดีเอ็นเอด้วย Gel Star® (Cambrex Bio science, USA) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง Gel Documentation ตัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ใส่หลอด จากนั้นแยกดีเอ็นเอเป้าหมายออกจาก agarose โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany)

3.2 การอ่านลำดับดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) ของยีน MADS-box

ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ในข้อ 3.1 นำไปอ่านลำดับพันธุกรรมหรือลำดับเบส 2 ครั้งต่อแถบดีเอ็นเอ อ่านในทิศทาง forward primer และ reverse primer เพื่อยืนยันผลและได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง โดยใช้เครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer นำลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่อ่านได้ของเส้น forward primer และ reverse primer มาต่อกันด้วยโปรแกรม BioEdit

3.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ระหว่างดีเอ็นเอมากกว่า 2 เส้น (Multiple Sequence Alignment)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MADS-box ที่อ่านได้ในข้อ 3.2 มาเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างกันด้วยโปรแกรม Clustal W2 โดยเปรียบเทียบทีละกลุ่มพันธุ์ เมื่อพบตำแหน่งของเบสตั้งแต่หนึ่งตัวขึ้นไปมีการเปลี่ยนแปลง (mutation) ในแต่ละชนิดของปาล์มน้ำมัน จะตรวจสอบจุดนั้น ๆ เพื่อยืนยันซ้ำ จากกราฟ

ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (electropherogram) เมื่อพบตำแหน่งสนิปส์ จะใช้ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปนี้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่อง Real Time PCR

4. การตรวจสนิปส์ (SNP) เพื่อวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมัน ด้วยเครื่อง Real Time PCR

4.1 การออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจสนิปส์

ออกแบบไพรเมอร์ และโพรบโดยใช้โปรแกรมของ TaqMan probe and primer chemistry design ของ Applied Biosystems ซึ่งแต่ละตำแหน่งของสนิปส์จะออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ ขนาบข้าง สนิปส์ และออกแบบโพรบ ที่มีความยาว 13 คู่เบส 2 เส้น โพรบเส้นแรกติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ สี FAM ที่ปลาย 5' ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งสนิปส์เหมือนลำดับเบสของปาล์มน้ำมันต้นแม่ดูรา และปลาย 3' ของโพรบติดฉลากด้วย Quencher และ Minor Groove Binder (MGB) สำหรับโพรบอีกเส้นหนึ่งจะคล้ายโพรบตัวแรก แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งสนิปส์ จะเหมือนกับลำดับเบสของต้นพ่อพิสิเฟอรา และติดฉลากที่ปลาย 5' เป็นสี VIC ที่ต่างจากสีโพรบตัวแรก ตรวจผลด้วยเครื่อง Real time PCR ถ้าดีเอ็นเอตัวอย่างส่งตรวจเหมือนพันธุ์แม่ดูรา โพรบที่ตำแหน่งสนิปส์เหมือนต้นแม่ดูราเท่านั้นที่จะจับกับดีเอ็นเอตัวอย่าง เมื่อมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ สี FAM ทางปลาย 5' จะถูกตัด (Hydrolysis) ออกห่างจาก Quencher ที่อยู่ปลาย 3' ของโพรบ ทำให้ปรากฏเส้นกราฟสีฟ้าของ FAM เพิ่มขึ้นตามจำนวนทำสำเนาของสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ และตามจำนวนรอบของ PCR ที่เพิ่มขึ้น ถ้า

ตรวจดีเอ็นเอของพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา ต้องให้ผลเป็นกราฟ 2 เส้นทั้งของพันธุ์แม่และพ่อ

4.2 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

นำดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันชนิดต่าง ๆ ทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ จากข้อ 3.1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ใช้เป็นแม่พิมพ์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจวิเคราะห์สนิปส์บนเครื่อง Real time PCR ด้วย ไพรเมอร์ และ TaqMan® MGB โพรบที่ออกแบบไว้ในข้อ 4.1 โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ดังนี้ 2x TaqMan® Genotyping master mix 5 ไมโครลิตร 20x Assay primer and probe 0.25 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมัน 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นสำหรับ PCR 3.7 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง StepOnePlus™ Real time PCR (Applied Biosystems®, USA) โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยา ดังนี้ 95°ซ 30 วินาที 1 รอบ ตามด้วย 95°ซ 20 วินาที และ 60°ซ 60 วินาที 50 รอบ ค่าของสีฟลูออเรสเซนต์ จะถูกบันทึกไว้ตามจำนวนรอบที่ทำ PCR การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งสนิปส์ จะสร้าง Allelic Discrimination ของตัวอย่างด้วยโปรแกรม StepOne™ V 2.3 ซึ่ง อัลลีลของพันธุ์แม่ชนิดดูรา จะอยู่ที่แกน X และ อัลลีล ของพันธุ์พ่อชนิดพิสิเฟอรา จะอยู่แกน Y ลูกผสมจะอยู่กึ่งกลางระหว่างแกนทั้งสอง พันธุ์ปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ที่นำมาตรวจวิเคราะห์ครั้งนี้ ทราบกลุ่มพันธุ์และชนิดของปาล์มแล้ว การตรวจสนิปส์ครั้งนี้ เป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์ และโพรบ ของสนิปส์ตำแหน่งต่าง ๆ

4.3 การตรวจแยกชนิดปาล์มน้ำมันของบริษัทเอกชน

เก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันพันธุ์ต่าง ๆ ของบริษัทเอกชน ได้แก่ บริษัท อาร์ แอนด์ ดี เกษตรพัฒนา, บริษัท โกลเด้น เทเนอรา, บริษัท ยูนิวานิช น้ำมันปาล์ม จำกัด และ บริษัท ทักษิณ ปาล์ม จำกัด ซึ่งปลูกที่ อ. หนองเสือ จ. ปทุมธานี จำนวน 60 ตัวอย่าง นำไปมาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB ตามข้อ 2.1 ตรวจชนิดของปาล์มน้ำมัน โดยใช้วิธีเดียวกันข้อ 4.2 แต่เลือกใช้ไพรเมอร์ และ โพรบตามตำแหน่งสปีส์ที่ตรวจสอบได้จาก ประวัติพันธุ์ของแต่ละบริษัท และทดลองใช้ไพรเมอร์และโพรบตำแหน่งอื่น ๆ ตรวจวิเคราะห์ด้วย

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

1.1 คัดเลือก SSR ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ 100 คู่ ที่ใช้ทำปฏิกิริยาขยายยีนในหลอดทดลอง (PCR) ให้แถบดีเอ็นเอหรืออัลลิล ตั้งแต่ 2-11 แถบ จึงคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและสูง (5-11 แถบ) ไว้ 13 คู่ ซึ่งจะให้ความแตกต่างของพันธุ์ปาล์มน้ำมันสูงด้วยเช่นกัน ไพรเมอร์ ที่คัดเลือก ได้แก่ mEgCIR0074, mEgCIR0173, mEgCIR0804, mEgCIR3428, mEgCIR3641, mEgCIR3643, mEgCIR3698, mEgCIR0874, mEgCIR2215, mEgCIR2577, mEgCIR3519, mEgCIR3593 และ mEgCIR3755

1.2 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ ไพรเมอร์ ที่คัดเลือกไว้ 13 คู่ จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากรปาล์มน้ำมันที่เป็นพ่อและแม่พันธุ์ ในการผลิตปาล์มน้ำมันลูกผสม 471 ต้น ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 6,123 ข้อมูล ในจำนวนนี้มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากร Deli Dura ที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ 246 ต้น

ประชากรที่ใช้เป็นต้นพ่อแม่พันธุ์เฟอรา กลุ่มต่าง ๆ 151 ต้น และกลุ่มประชากรเทเนอรา ที่ส่งเสริมให้ปลูกเป็นการค้า (สุราษฎร์ธานี 1 -8) 74 ต้น พบว่า ในจำนวนไพรเมอร์ 13 คู่ที่ใช้ ให้อัลลิล หรือแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 95 แถบ (Table 1) โดยแต่ละ ไพรเมอร์ ให้อัลลิล ที่ต่างกัน หรือมีความผันแปรตั้งแต่ 5-11 แบบ ไพรเมอร์ ที่ให้อัลลิลต่างกันมากที่สุดได้แก่ mEgCIR0874, mEgCIR0804 และ mEg CIR2215 ให้อัลลิลต่างกัน 11, 10 และ 9 แบบ อัลลิลส่วนใหญ่มีความยาวต่างกันเพียง 2 คู่เบส เช่น mEgCIR0074 ให้อัลลิลขนาด 118 120 122 124 126 128 และ 130 คู่เบส เมื่อดูความแตกต่างภายในประชากรแต่ละกลุ่ม (Table 2) พบว่า ไพรเมอร์ ทั้ง 13 คู่ สามารถจำแนกความแตกต่างของประชากรปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นพ่อแม่พันธุ์ได้ดีมาก ขณะที่พันธุ์ Deli Dura เกือบทุกไพรเมอร์ ให้อัลลิลขนาดเดียว ยกเว้นไพรเมอร์ mEgCIR0804 ที่มีอัลลิลต่างกันขนาด 195 และ 201 คู่เบส mEgCIR2577 ให้อัลลิลต่างกันขนาด 89, 93 และ 107 คู่เบส และ mEgCIR3519 ให้อัลลิลต่างกันขนาด 242 และ 250 คู่เบส ไพรเมอร์ 13 คู่นี้ จึงไม่เพียงพอที่จะใช้แยกความแตกต่างของประชากร Deli Dura ได้ จึงได้คัดเลือกไพรเมอร์ชุดใหม่ สำหรับแยกความแตกต่างของประชากรเฉพาะกลุ่ม Deli Dura โดยเลือกตัวแทนทั้งหมด 96 ต้น มาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่า ไพรเมอร์ ทั้งหมด 19 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอ หรืออัลลิลที่มีความแตกต่างกัน 44 แบบ สอดคล้องกับรายงานของ Mayer *et al.* (2001) ที่พบว่า ในประชากร Deli Dura ตรวจพบ อัลลิลน้อยกว่าปาล์มอื่น ๆ ถึง 36 อัลลิล แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่น้อยกว่า พบว่า มีไพรเมอร์ 7 คู่ (mEgCIR0246, mEgCIR0445, mEgCIR3286, mEgCIR3298,

mEgCIR3684, mEgCIR3691 และ mEgCIR3869) ให้อัลลีล ต่างกัน 3 แบบ ไพรเมอร์อื่น ๆ ให้อัลลีล ที่ต่างกันเพียง 2 แบบเท่านั้น และส่วนใหญ่ให้ค่า heterozygosity ค่อนข้างต่ำ ดังแสดงใน Table 2 สำหรับประชากรพ้อพันธุ์กลุ่มอื่นที่มีความผันแปร น้อยภายในกลุ่ม ให้แถบดีเอ็นเอเพียง 1-2 แบบ ได้แก่ ประชากร Calabar, Tanzania และ Yangambi ข้อมูลอัลลีลในแต่ละตำแหน่งที่ ปรากฏใน Table 3 นอกจากเป็นประโยชน์ในการ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและ ระหว่างประชากรแล้ว ยังสามารถใช้ในการตรวจสอบพันธุ์แม่ พ่อ และลูกผสมได้ การตรวจสอบผสมพันธุ์ สุราษฎร์ธานี 1 ที่ได้จากการผสมระหว่างแม่ ที่เป็น Dali dura กับ พ่อที่เป็น Calabar จะมี ไพรเมอร์ mEgCIR 0074 ให้แถบดีเอ็นเอทั้ง 2 แถบขนาด 120 และ 130 คู่เบส และพบว่า ใช้ไพรเมอร์ อย่างน้อย 3 คู่ คือ mEgCIR3428, mEgCIR3519 และ mEg CIR0874 เพียงพอที่จะ จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน สุราษฎร์ธานี 1-8 ได้ สำหรับในกรณีที่มีความผันแปรภายในประชากร แต่ละพันธุ์อาจต้องใช้ไพรเมอร์ร่วมกันหลาย ๆ ไพรเมอร์ จะสามารถเพิ่มความแม่นยำในการ จำแนกพันธุ์ของปาล์มน้ำมันได้

เมื่อนำข้อมูลนี้ไปเขียน Phylogenetic tree หรือ dendrogram ดังแสดงใน Figure 1 พบว่า สามารถแบ่งประชากรปาล์มน้ำมันออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม A และ B ซึ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากกว่า 90% ในกลุ่ม A ประกอบด้วยพันธุกรรมของประชากร La Me ซึ่งความแตกต่างภายในประชากรขึ้นกับคู่ผสม คือ IRH 618 : 158T self กับ IRH618 : 26T self สำหรับกลุ่ม B แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย C กับ D ซึ่งมีความต่างกันทางพันธุกรรม 70% ใน กลุ่ม C มีประชากร Nigeria และ Calabar ซึ่งมา

จากคู่ผสมเดียวกัน แต่มีชื่อต่างกัน เนื่องจากถูกนำไปพัฒนาและคัดเลือกต่างสถานที่กัน คือ ที่เมือง Calabar, Aba, Ufama และ Benin ในประเทศ ไนจีเรีย (Rosenquist, 1985) ข้อมูลจากไพรเมอร์ ชุดนี้ สามารถจำแนกประชากรปาล์มน้ำมันต้นแม่ ชนิด Deli Dura ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่ม ที่มีพันธุกรรมจาก HC 133:1288 D self และ กลุ่มที่มีพันธุกรรมจาก C2120:184D, C 2120: 184D x DAM564:693D และ C2120:184D x MAR559:113D สอดคล้องกับประวัติพันธุ์ของ ปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นแม่ชนิด Deli Dura พบว่า นำมาจากแอฟริกาเมื่อปี 2391 และคัดเลือกมา จากปาล์ม 4 ต้น ที่ปลูก ณ สวนพฤกษศาสตร์ เมือง Deli ต่อมามีการผสมกับปาล์มน้ำมันกลุ่ม อื่น ๆ เพื่อขยายฐานพันธุกรรมกว้างขึ้น ความ สัมพันธ์ของประชากร ปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์ สำหรับผสมกับประชากรแม่พันธุ์ที่เป็น Deli Dura พบว่า มีความคล้ายกับประชากรพ้อพันธุ์ในกลุ่ม AVROS มากที่สุด รองลงมาได้แก่ Ekona (Figure 1)

2. เครื่องหมายโมเลกุลสปีส์เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน

จากการสกัดดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันทั้ง สามชนิดคือ ดุรา ฟิสเฟอรา และเทนอรา จำนวน 10 กลุ่มพันธุ์ รวม 129 ตัวอย่าง พบว่า ทุก ตัวอย่างให้ผลผลิต PCR ชัดเจน ความยาวเท่ากัน คือ 537 คู่เบส เมื่อนำผลผลิตของ PCR ไปอ่าน ลำดับพันธุกรรม แล้วนำมาเปรียบเทียบมากกว่า 2 สาย (Multiple sequence alignment) พบว่า บริเวณของยีน MADS – box มีตำแหน่งสปีส์ หรือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลง 5 ตำแหน่ง คือ นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 220, 256, 272, 279 และ 308 ซึ่งแต่ละตำแหน่งสามารถ

Table 1 Size and number of alleles per locus (Primer) and actual heterozygosity of oil palm Deli Dura, different male parent populations, DOA's recommended oil palm varieties (Surat Thani 1-8) of 246, 151 and 74 plants

No.	Primer	Size of alleles (Base pair)	No. of alleles	Heterozygosity
1	mEgCIR0074	118, 120, 122, 124, 126, 128 , 130	7	0.13
2	mEgCIR0173	112, 114, 118, 134 , 140	5	0.09
3	mEgCIR08044	191, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209 , 211	10	0.09
4	mEgCIR3428	157, 159, 165, 167, 169, 171 , 181	7	0.11
5	mEgCIR3641	167, 171, 175, 183, 185, 187 , 197	7	0.26
6	mEgCIR3643	134, 136, 144, 146, 148 , 154	6	0.16
7	mEgCIR3698	164, 166, 172, 174 , 182	5	0.10
8	mEgCIR0874	215, 217, 221, 231, 235, 237, 239, 247, 249, 255 257	11	0.14
9	mEgCIR2215	100, 112, 114, 116, 118, 120, 124, 128 , 130	9	0.25
10	mEgCIR2577	71, 87, 89, 93, 103, 105 , 107	7	0.26
11	mEgCIR3519	216, 222, 232, 234, 240, 242 , 250	7	0.23
12	mEgCIR3593	146, 152, 154, 162, 168, 172 , 174	7	0.05
13	mEgCIR3755	230, 238, 246, 250, 256, 258 , 262	7	0.19
Total			95	

The samples were amplified with 13 SSR primers.

Table 2 Size and number of alleles per locus and actual heterozygosity of 96 plants from Deli Dura female parent collected from Surat Thani oil palm Research Center

No.	Primer	Size of alleles (Base pair)	No. of alleles	Heterozygosity
1	mEgCIR0246	261, 265, 291	3	0.55
2	mEgCIR0280	214, 246	2	0.49
3	mEgCIR0445	352, 362, 366	3	0.47
4	mEgCIR0521	131, 137	2	0.23
5	mEgCIR2332	220, 236	2	0.34
6	mEgCIR3286	120, 130, 138	3	0.19
7	mEgCIR3298	110, 130, 146	3	0.45
8	mEgCIR3311	100, 108	2	0.67
9	mEgCIR3383	185, 199	2	0.38
10	mEgCIR3402	193, 215	2	0.18
11	mEgCIR3555	237, 259	2	0.26
12	mEgCIR3653	118, 122	2	0.29
13	mEgCIR3655	181, 191	2	0.36
14	mEgCIR3668	117, 141	2	0.36
15	mEgCIR3684	90, 94, 106	2	0.32
16	mEgCIR3691	174, 184, 188	3	0.38
17	mEgCIR3705	166, 176	2	0.25
18	mEgCIR3813	160, 168	2	0.45
19	mEgCIR3869	130, 140, 144	3	0.50
Total			44	

The data were derived by 19 SSR primers.

Table 3 Summary of alleles size and allele numbers obtained from 471 oil palm samples in 10 population types

Primer	Alleles size (Base pair)	Female parent		male parent							
		Deli Dura	AVROS	Carabur	Dani	Ekona	Gilana	La Me	Nigeria	Tamania	Yangambi
mFgC1R0074	118	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
	120	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
	122	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	124	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	126	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	128	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	130	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
mFgC1R0173	112	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	114	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
	116	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
	134	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	140	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
mFgC1R0804	191	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	195	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	197	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	199	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	201	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
	203	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	205	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	207	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	209	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
mFgC1R3428	157	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	159	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	165	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	167	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	169	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	181	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
mFgC1R3641	167	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
	171	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	175	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
	183	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	185	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	187	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
mFgC1R3643	134	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
	136	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	144	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
	146	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	148	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
mFgC1R3698	164	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
	166	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	172	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
	174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	182	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-
mFgC1R0874	215	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	217	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	221	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	231	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	235	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	237	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	239	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	247	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	249	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
mFgC1R2215	255	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	257	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	100	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
	112	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
	114	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
	116	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	118	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
	120	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
mFgC1R2577	124	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	128	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	130	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	71	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	87	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	89	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
	93	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
	103	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
mFgC1R3519	105	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	107	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	216	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	222	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
	232	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	234	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
mFgC1R3593	240	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	242	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	250	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
	146	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
	152	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	154	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
mFgC1R3755	162	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	166	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	172	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	174	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	230	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	238	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
mFgC1R3755	246	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
	250	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	262	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

annotation + = present
- = absent

The samples were amplified with 13 SSR primers.

บ่งชี้ชนิดของปาล์มน้ำมันในแต่ละกลุ่มได้ ดังนี้ (Table 4)

1. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 220 (SNP_{Tan}) ปาล์มน้ำมัน Deli Dura และชนิดตูราของ Tanzania มีนิวคลีโอไทด์เป็น C ขณะที่ชนิดฟิลิเฟอร่าของ Tanzania มีนิวคลีโอไทด์เป็น G สำหรับชนิดเทเนอร่าของ Tanzania จะเป็น heterozygous ที่ตำแหน่งนี้ คือมีนิวคลีโอไทด์ทั้งสองแบบ

2. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 256 (SNP_{DA}) พบว่า ชนิดตูราของ Deli Dura และ DAMI Dura, DAMI Pisifera และ DAMI Tenera มีนิวคลีโอไทด์เป็น C, G, และ C/G ตามลำดับ

3. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 272 (SNP_{ENG}) พบว่า ชนิดตูราของ Deli Dura, Ekona, Nigeria, Ghana และ Calabar มีนิวคลีโอไทด์เป็น T เหมือนกัน และฟิลิเฟอร่าของปาล์มตระกูลเหล่านี้จะมีนิวคลีโอไทด์เป็น C ดังนั้น เทเนอร่า ซึ่งเป็น heterozygous ของปาล์มเหล่านี้จะเป็น T/C

4. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 279 (SNP_{TaYa}) ชนิดตูราของ Deli Dura, Tanzania และ Yangambi จะมีนิวคลีโอไทด์เป็น A และเปลี่ยนเป็น T เมื่อเป็นฟิลิเฟอร่า ฉะนั้น เทเนอร่าของ Tanzania และ Yangambi จะมีทั้ง 2 นิวคลีโอไทด์ คือ A/T

5. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 308 (SNP_{LaAv}) เป็นตำแหน่งสปีส์ ที่กลุ่มพันธุ์ Deli Dura ชนิดตูราของ La Me และ AVROS เป็น C และฟิลิเฟอร่าของกลุ่มเหล่านี้เป็น A ฉะนั้น เทเนอร่าของกลุ่มนี้ จึงเป็น C/A ดังแสดงใน Figure 2 ตำแหน่งในสายนิวคลีโอติกแอซิกใด ๆ ที่ผันแปรมีนิวคลีโอไทด์ 2 แบบ ในตำแหน่งเดียวกันจะถูกแทนที่ด้วย IUB codes หรือ IUPAC notation โดย C/G จะถูกแทนที่ด้วยอักษร S (strong), A/C

จะถูกแทนที่ด้วย M (aMino), A/T จะถูกแทนที่ด้วย W (weak) และ C/T จะถูกแทนที่ด้วย Y (pYrimidine) (IUPAC-IUB, 1970)

การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ทั้ง 5 ตำแหน่งดังกล่าวข้างต้น ได้ทำการตรวจสอบยืนยันซ้ำจากกราฟของสายนิวคลีโอไทด์ ที่ได้จากการอ่านลำดับพันธุกรรมของดีเอ็นเอ (Figure 2 a-e) และใน Table 4 แสดงข้อมูลตำแหน่งสปีส์ที่ใช้ในการตรวจชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ชนิดของผล (Fruit Type) และจำนวนตัวอย่างที่นำไปอ่านลำดับพันธุกรรม Singh *et al.* (2013) ได้รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (SNP) 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งแรกเป็นของ Congo (AVROS) และ Tanzania สอดคล้องกับตำแหน่ง SNP_{TaYa} ของการศึกษาครั้งนี้ แต่แตกต่างกันที่การศึกษาครั้งนี้พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของ AVROS ในตำแหน่ง SNP_{LaAv} และสปีส์ตำแหน่งที่สองพบในกลุ่มพันธุ์ Nigeria สอดคล้องตรงกับตำแหน่ง SNP_{ENG} นอกจากนี้มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (SNP) ของ Nigeria แล้ว ยังพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ กลุ่ม Ekona Ghana และ Calabar ด้วย ผลของการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน MADS-box พบตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มเติมอีก 3 แห่ง คือ SNP_{Tan} SNP_{DA} และ SNP_{LaAv} ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรก สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมันได้

3. ตรวจวิเคราะห์แยกชนิดของปาล์มน้ำมัน โดย Real Time PCR

3.1 ออกแบบไพรเมอร์และโพรบ สำหรับตรวจสปีส์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ และโพรบ ซึ่งติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ VIC กับ FAM

Table 4 Summary of 5 SNPs positions for genotyping oil palm *SHELL* type, data were generated from nucleotide sequences of MADS-box gene from 10 oil palm populations, total 129 plant samples

Type	Fruit Type	No. of samples	SNP _{Tan}	SNP _{DA}	SNP _{ENG}	SNP _{TaYa}	SNP _{LaAV}	reference
Deli Dura	Dura	6	C	C	T	A	C	This study
Dami	Dura	3	G	C	T	A	C	
	Pisifera	3	G	G	T	A	C	
	Tenera	3	G	C/G	T	A	C	
Ekona	Dura	3	G	C	T	A	C	This study
	Pisifera	3	G	C	C	A	C	
	Tenera	4	G	C	T/C	A	C	
Ghana	Dura	4	G	C	T	A	C	This study
	Pisifera	4	G	C	C	A	C	
	Tenera	3	G	C	T/C	A	C	
La Me	Dura	13	G	C	T	A	C	This study
	Pisifera	13	G	C	T	A	A	
	Tenera	11	G	C	T	A	C/A	
Nigeria	Dura	3	G	C	T	A	C	Singh <i>et al.</i> 2013
	Pisifera	3	G	C	C	A	C	
	Tenera	3	G	C	T/C	A	C	
Tansania	Dura	4	C	C	T	A	C	1. Singh <i>et al.</i> 2013 2. This study
	Pisifera	4	G	C	T	T	C	
	Tenera	4	C/G ²	C	T	A/T ¹	C	
Yangambi	Dura	3	G	C	T	A	C	This study
	Pisifera	3	G	C	T	T	C	
	Tenera	2	G	C	T	A/T	C	
AVROS	Dura	4	G	C	T	A	C	This study
	Pisifera	4	G	C	T	A	A	
	Tenera	4	G	C	T	A	C/A	
Calabar	Dura	5	G	C	T	A	C	This study
	Pisifera	5	G	C	C	A	C	
	Tenera	5	G	C	T/C	A	C	

ของสปีส์ทั้ง 4 ตำแหน่ง คือ SNP_{DA} , SNP_{ENG} , SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAv} สำหรับ SNP_{Tan} ที่ใช้ตรวจสปีส์ของปาล์มน้ำมันกลุ่ม Tanzania ไม่ได้ทำการออกแบบไว้ เพราะสามารถใช้ไพรเมอร์และโพรบ ของ SNP_{TaYa} ได้การติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ของโพรบ ทั้ง 2 สายที่ปลาย 5' ด้วยสี VIC และ FAM ขณะที่ปลาย 3' ของโพรบติดด้วย Quencher ซึ่งจะเป็นส่วนควบคุมไม่ให้สี VIC และ FAM มีการแสดงออกถ้ายังติดอยู่กับสายโพรบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโพรบทั้ง 2 สายจะเหมือนกันทุกประการ ยกเว้นที่ตำแหน่งสปีส์ (Figure 3)

3.2 การตรวจแยกชนิดปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดของปาล์มจำนวน 129 ตัวอย่าง เพื่อยืนยันความใช้ได้ของไพรเมอร์ และโพรบ ที่ออกแบบไว้ตามข้อ 3.1 พบว่าตรวจวิเคราะห์จาก Allelic Discrimination ให้ข้อมูลชนิดของพันธุ์เป็น ดุรา พิสีเฟอร์รา และเทเนอรา ถูกต้องทุกพันธุ์ การตรวจปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ AVROS โดยใช้ไพรเมอร์ และโพรบ ของ SNP_{LaAv} (C/A) ใน Amplification plot จะเห็นกราฟสีฟลูออเรสเซนต์ VIC กับ FAM ในรอบที่ 24-26 ของเครื่อง Real Time PCR โดยกราฟสี FAM ใช้ตรวจสปีส์ของพันธุ์แม่ (Deli dura) และกราฟสี VIC ใช้ตรวจสปีส์ของพันธุ์พ่อพิสีเฟอร์รา ถ้าพันธุ์ที่ตรวจเป็นเทอนารา จะได้กราฟ 2 เส้นของสี FAM และ VIC เมื่อทำการวิเคราะห์ผลใน Discrimination plot ก็จะได้แสดงผลเป็นจุด ใกล้แกน Y หมายถึงพันธุ์แม่ Deli dura จุดที่ใกล้แกน X แทนพันธุ์ พ่อ และถ้าตัวอย่างส่งตรวจเป็น tenera Discrimination plot จะแสดงจุดตรงกลางระหว่างแกน X และ Y จาก 129 ตัวอย่างที่ทราบชนิดของพันธุ์แล้ว เมื่อมาตรวจด้วยไพรเมอร์

และโพรบที่ออกแบบไว้ ให้ผลที่ถูกต้องทุกตัวอย่าง (Figure 4 a)

การตรวจวิเคราะห์ปาล์มน้ำมันของ Tanzania และ La Me โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบ SNP_{TaYa} (A/T) และ SNP_{LaAv} (C/A) ให้ผลถูกต้อง ดังแสดงใน Figure 4 (b) การใช้ไพรเมอร์และโพรบ SNP_{Da} (C/G) ตรวจประชากร ทั้ง 2 กลุ่ม จะพบการกระจายของอัลลีล ใน Allele Discrimination plot กระจายไม่สามารถอ่านผลได้

3.3 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันบริษัทเอกชน

ผลการใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้น ตรวจปาล์มของบริษัทเอกชนพบว่า พันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้งหมดเป็นชนิดเทเนอรา แต่พบปาล์มสายพันธุ์ Compact ของบริษัท อาร์ แอนด์ ดี เกษตรพัฒนา ซึ่งยังไม่เคยมีประวัติพันธุ์ จึงจะต้องนำตัวอย่างมาศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การวิจัยนี้ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite จำนวน 13 คู่ ที่เหมาะสำหรับใช้จำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นพ่อแม่และต้นแม่ 10 กลุ่มพันธุ์ (Deli Dura, AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me) รวมทั้งพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1-8 และพบว่า พันธุ์ La Me มีพันธุกรรมที่แตกต่างจากประชากรกลุ่มอื่น ๆ มากที่สุด รองลงมาได้แก่ Calabar, Nigeria, Tanzania และ Ghana สำหรับกลุ่ม AVROS มีพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกับ Deli Dura ที่ใช้เป็นประชากรแม่มากที่สุด รองลงมาคือ Ekona แต่เครื่องหมายโมเลกุล 13 คู่นี้ไม่สามารถแยกความ

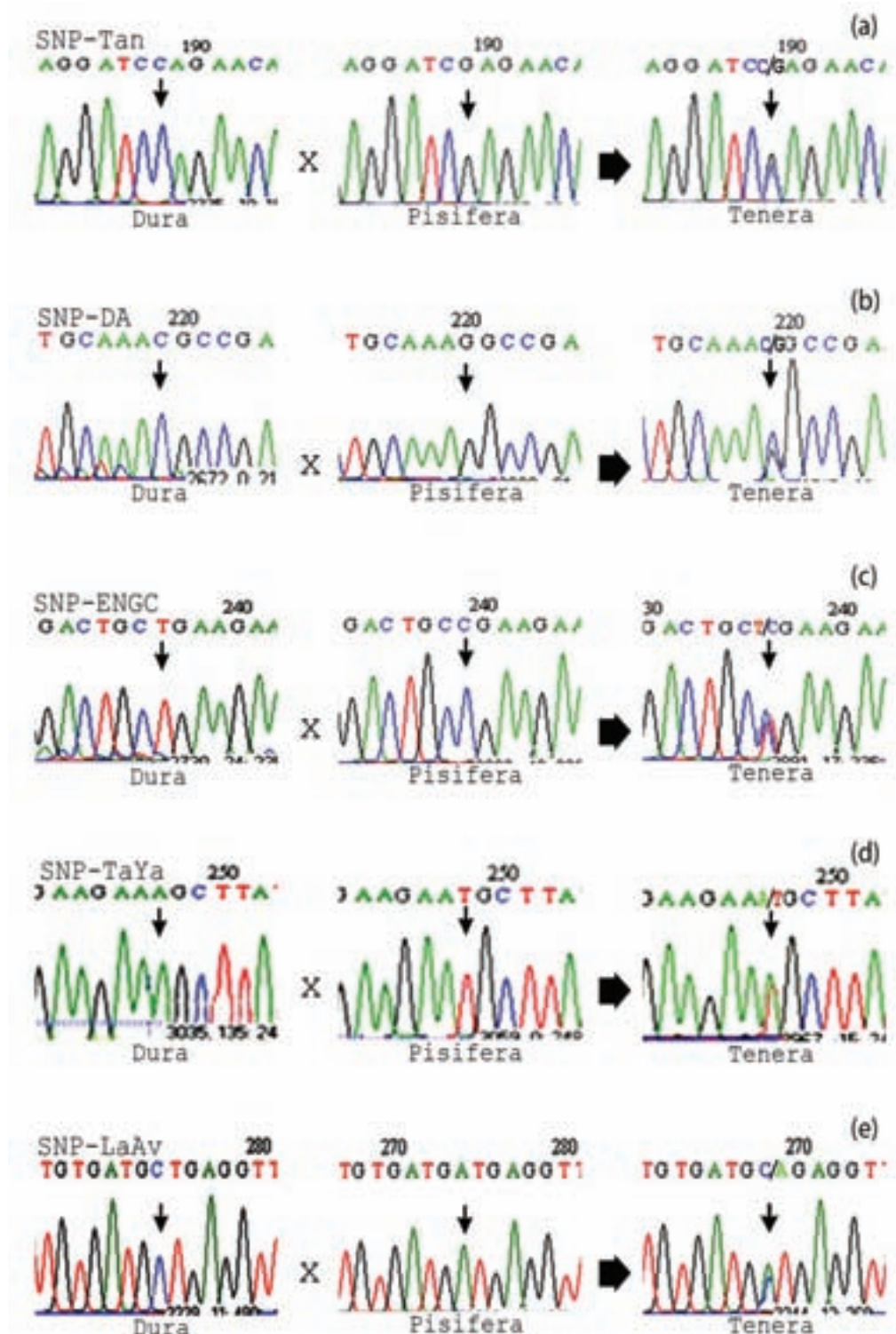


Figure 2 The electropherogram of MADS-box gene sequences of each SNP position showed a nucleotide substitution (black arrow) between dura and pisifera oil palm, (a) SNPTan (C/G); (b) SNPDA (C/G); (c) SNPENG C (T/C); (d) SNPTaYa (A/T); (e), SNPLaAV (C/A). Two electropherogram peaks at the same position were observed in tenera sequences

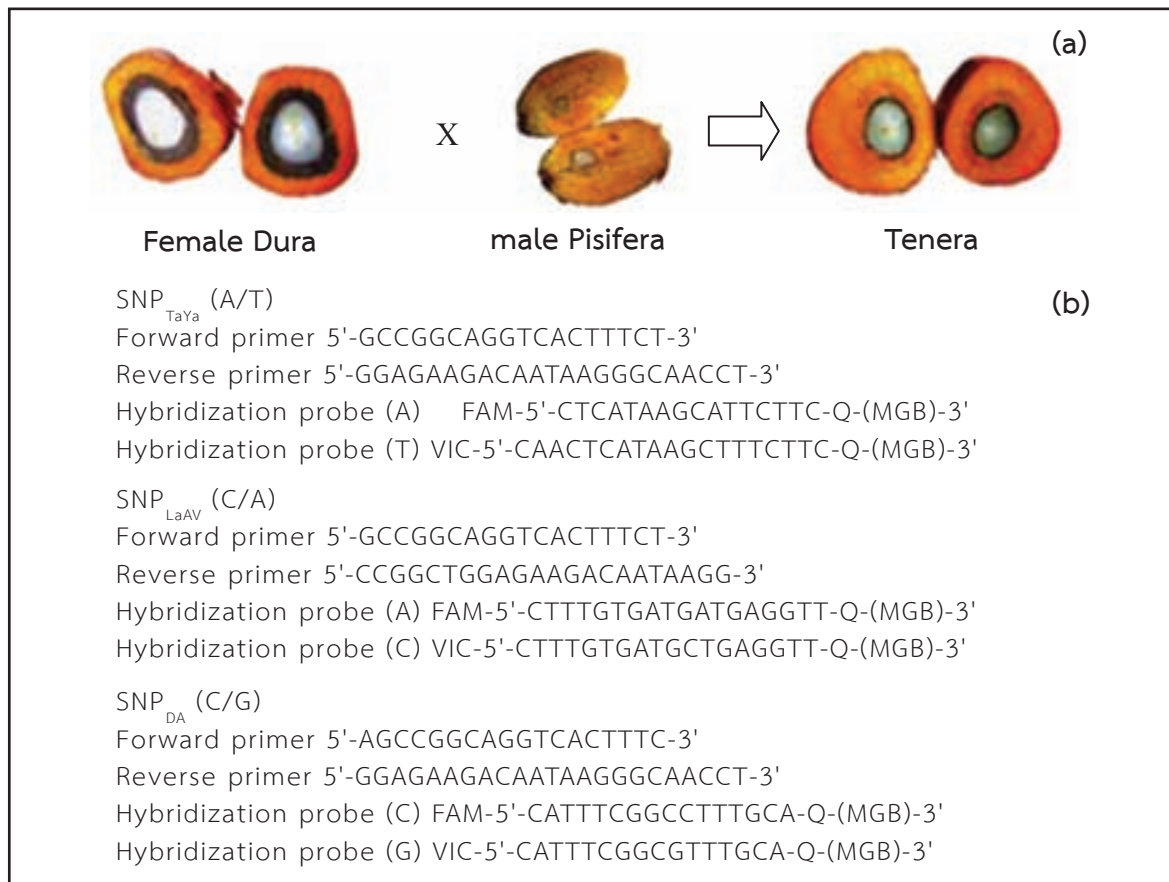


Figure 3 Probes and primers used in SNP genotyping analysis for determining oil palm *SHELL* type. (a) Showed the *SHELL* type of commercial hybrid tenera (Thin) derived from cross between female dura (Thick) and male pisifera (no *SHELL*). (b) Two specific hybridization probes were designed from polymorphic nucleotide of each SNP position (highlighted in yellow). The probe was separately labeled by fluorescent dye FAM® or VIC® color at the 5' end. Quencher (Q) and Minor Groove binder (MGB) were incorporated at the 3' end of all probes

แตกต่างภายในประชากรแม่พันธุ์ Deli Dura ได้ จึงค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติมอีก 19 คู่ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอภายในประชากร Deli Dura ได้ถึง 44 อัลลีล สำหรับใช้จำแนกตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ได้

จากการใช้เทคนิคสปีดตรวจสอบยีน MADs-box สำหรับแยกชนิดปาล์มน้ำมันพบ สปีด 5 ตำแหน่งที่สามารถจำแนกประชากรแม่

พันธุ์ดुरา พ่อพันธุ์ฟิลิเฟอรา และลูกผสมเทเนอรา ทั้งหมดที่ศึกษาได้ดังนี้คือ สปีด SNP_{ENG} (T/C), SNP_{TaYa} (A/T), SNP_{DA} (C/G), SNP_{LaAv} (C/A) และ SNP_{Tan} (C/G) สำหรับสปีด 3 ตำแหน่ง หลังเป็นการค้นพบครั้งแรกของประเทศไทย

นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการ ออกแบบไพรเมอร์ และโพรบ สำหรับตรวจสอบ ปาล์มน้ำมันชนิด ดुरา ฟิลิเฟอรา และเทเนอรา โดยใช้เทคนิค Real-Time PCR ในการตรวจสอบ

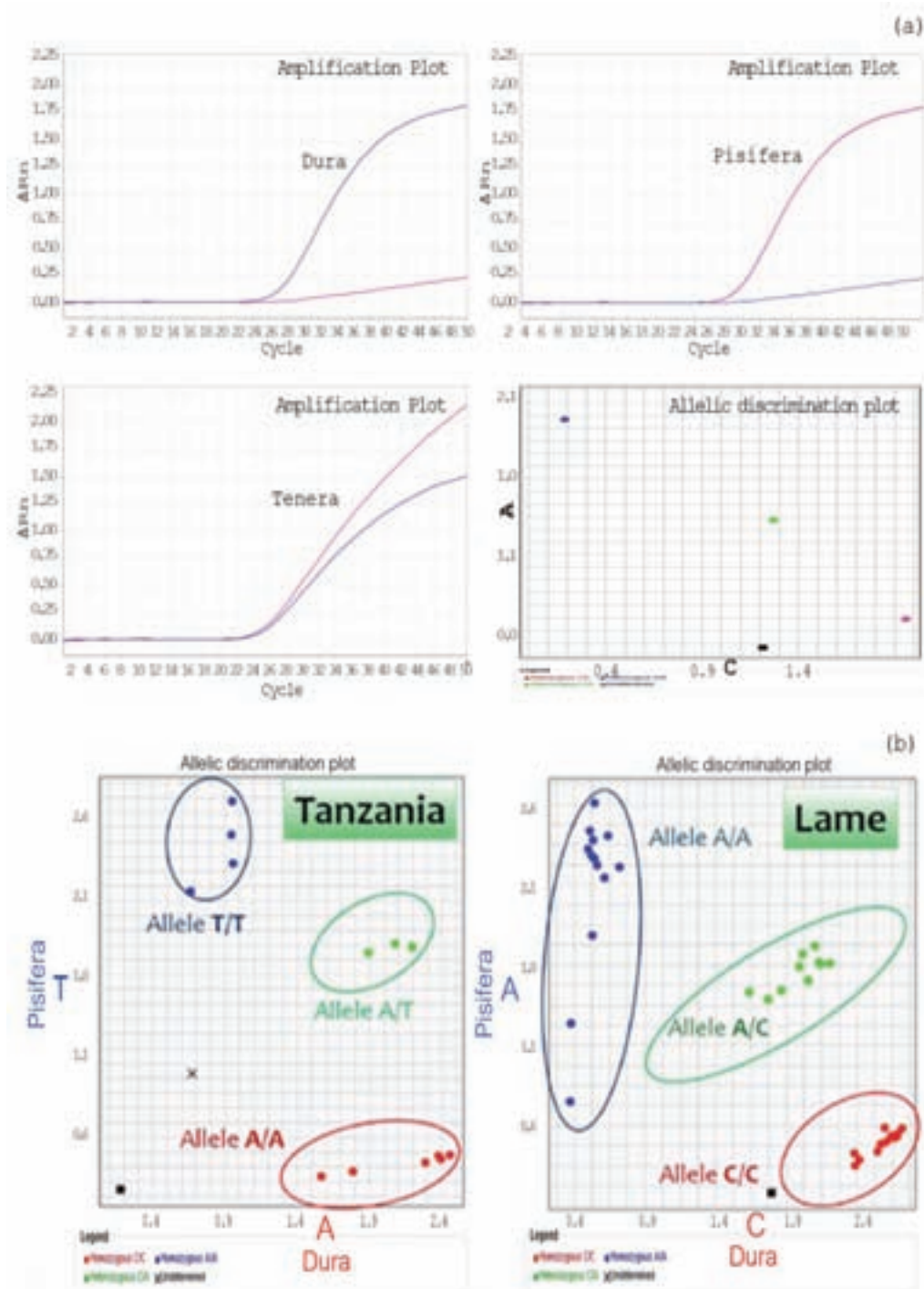


Figure 4 (a) The result of *SHELL* type detection on AVROS samples (dura, pisifera and tenera) by primer and probe designed from SNPLaAv nucleotide sequence. The amplification and allelic discrimination plot were generated by real time PCR. (b) The discrimination plots generated by real time PCR showed oil palm *SHELL* type detection of Tanzania and La Me samples

ความตรงตามพันธุ์ในระยะกล้าแล้วยังสามารถใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ กรณีมีการฟ้องร้องเรื่องชนิดของกล้าพันธุ์ และความตรงตามพันธุ์ได้

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2547. *เอกสารวิชาการปาล์ม น้ำมัน*. โรงพิมพ์ดอกเบญจ กรุงเทพฯ. 188 หน้า.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556. *ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร : ปาล์มน้ำมัน*. การผลิตสินค้าการเกษตรที่สำคัญ แหล่งที่มา: <http://www.oac.go.th/download/prcai/jarmerop/Palm.pdf>, สืบค้นเมื่อ ธ.ค. 2557.
- หทัยรัตน์ อุไรรงค์ อรุณรัตน์ วงศ์ศรี บุญเรือน เรื่องพิเศษ พงศ์ศักดิ์ รวยอารี และ ประสาน สืบสุข. 2548. *โครงการวิจัยขยายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 โดยใช้เทคนิค AFLP*. โรงพิมพ์ดอกเบญจ กรุงเทพฯ. 30 หน้า.
- Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Chkerospondias asillaris*. *BioLect. Biodiv. Lett.* 2 : 19-24.
- Alvarado, A. and F. sterling. 2005. Shesstoleramt oil palm vaicties. *ASD al Palm Papers* 28:5-20.
- Anonymous. 1997. Gene Scan Reference Guide Chemistry Reference for The ABI Prism 377 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems. Division of Perkin – Elmer. *Int. Union of Pure and Appl. Chem.* : 8-1 – 8-33.
- Billotte N, A.M. Risterucci , E. Barcelos, J.L. Noyer, P. Amblard and F.C. Baurens. (2001) Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) microsatellite markers. *Genome* 44:413–425.
- Billotte N, N. Marseillac, A.-M. Risterucci, B. Adon , P. Brottier, F.-C. Baurens, R. Singh, A. Herra n, H. Asmady, C. Billot, P. Amblard, T. Durand-Gasselin , B. Courtois, D. Asmono, S. C. Cheah W. Rohde E. Ritter and A. Charrier 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Theor. Appl. Genet.* 110: 754–765
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). 1970. Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their constituents. *Biochem. J.* 120(3):449-54.
- Mayer J. and Corley. 2001. The use of molecular marker to investigate the genetic structure of oil palm breeding program. *Heredity* 85 (3): 288-293.
- Rafalski A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant. Biol.* (2):94-100.
- Rosenquist, E.A.1985. The genetic base of Oil Palm breeding populations. *In*. Proceeding of International Workshop on oil palm Germplasm

- and Utilization. Palm oil Petrarch Institute of Malaysia. PI2756.
- Singh, R., E.T. Low, L.C. Ooi, M. Ong-Abdullah, N.C. Ting, J. Nagappan, R. Nookiah, M.D. Amiruddin, R. Rosli, MA. Manaf, K.L. Chan, M.A. Halim, N. Azizi, N. Lakey, S.W. Smith, M.A. Budiman, M. Hogan, B. Bacher, A. Van Brunt, C. Wang, JM. Ordway, R. Sambanthamurthi and R.A. Martienssen. 2013. The oil palm *SHELL* gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. *Nature* 500(7462):340-344.