ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 โดยใช้เทคนิค AFLP

The Utilization of AFLP Technique for Generating DNA Fingerprint of Oil Palm Suratthani 1, Suratthani 2 and Suratthani 3 Varieties

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ อรรัตน์ วงศ์ศรี[1] บุญเรือน เรืองวิเศษ
พยุงศักดิ์ รวยอารี สุภาวดี ง้อเหรียญ
กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

A study of genetic variation and variety identification among population of oilpalm Suratthani 1, Suratthani 2 and Suratthani 3 by AFLP Technique with selection of 64 combination of primers revealed that there were 23 combination of primers capable generated polymorphic DNA fingerprint. Ten combination of primers were further studied and it was found that they were capable of separating DNA fingerprint of oilpalm Suratthani 1, Suratthani 2 and Suratthani 3 giving 1,204 DNA bands of which 558 bands or 47 %, were polymorphic and the size of observed DNA fragments were between 50-484 base pairs. When using these bands to analyse genetic variation of oilpalm Suratthani 1, Suratthani 2 Suratthani 3 and parental varieties, 51 samples in total, using SPSS version 9.0 program, they could be separated into 2 groups. The first group comprised Suratthani 1 and Suratthani 2 that shared female parent and the second group Suratthani 3 and its parents. When population variation within the same group was analyzed, it was found that population of Suratthani 1 had the highest degree of variation, followed by Suratthani 2 variation of which was similar to the variation of Suratthani 3. When primer combination, E-AAG+M-CAT was separated Suratthani 1, Suratthani 2 and Suratthani 3 by AFLP technique, 4 prominent DNA bands that could differentiate oilpalm were sequenced, and only 3 pairs of specific primer i.e. PDOA1, Pcut 73 and Pcut 95 were redesigned. These 3 pairs of specific primers could be used for differentiating the 3 oilpalm varieties when large number of samples to be tested.

รหัสกิจกรรม 05-01-47-06

รหัสการทดลอง 05-01-47-0602

[1] ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี

บทคัดย่อ

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมและจำแนกพันธุ์ระหว่างประชากรลูกผสมของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 โดยใช้เทคนิค AFLP ด้วยการคัดเลือกPrimer จาก 64 คู่ พบว่า Primer ที่สามารถแยกลายพิมพ์ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันได้มีจำนวน 23 คู่ และคัดเลือก Primer จำนวน 10 คู่ มาศึกษา สามารถแยกลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1,204 แถบ พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 558 แถบ คิดเป็น 47% ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจพบมีขนาดอยู่ระหว่าง 50-484 คู่เบส เมื่อใช้จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2, 3 และพันธุ์ที่เป็นพ่อแม่รวมทั้งหมด 51 ตัวอย่างพันธุ์ โดยนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม SPSS Version 9.0 พบว่า สามารถแยกได้ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ กลุ่มพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 ซึ่งมีแม่ร่วมกัน ส่วนอีกกลุ่มคือ สุราษฎร์ธานี 3 และพันธุ์ที่เป็นพ่อแม่ และเมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากรภายในกลุ่มพันธุ์เดียวกัน พบว่า สุราษฎร์ธานี 1 มีความแปรปรวนภายในประชากรมากสุด รองลงมา ได้แก่ สุราษฎร์ธานี 2 ซึ่งมีความแปรปรวนใกล้เคียงกับสุราษฎร์ธานี 3 สำหรับการสร้าง Primer จำเพาะในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 เมื่อแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ใน Primer E-AAG+M-CAT พบแถบดีเอ็นเอที่จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ได้อย่างเด่นชัด 4 แถบ ตัดแถบทั้ง 4 นี้ไปอ่านลำดับพันธุกรรม และนำลำดับพันธุกรรมที่ได้ไปออกแบบ Primer จำเพาะได้ 3 คู่ ได้แก่ PDOA 1, Pcut 73 และ Pcut 95 ซึ่ง Primer ทั้ง 3 คู่ดังกล่าวสามารถใช้จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ในกรณีที่มีตัวอย่างพันธุ์จำนวนมากได้

คำนำ

ปาล์มน้ำมัน (Oil palm) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Elaeis guineensis* Jacq. มีถิ่นกำเนิดที่หมู่เกาะกินี ทวีปแอฟริกา แพร่กระจายพันธุ์ปลูกอยู่ในเขตภูมิอากาศร้อนชื้น ซึ่งแหล่งผลิตปาล์มน้ำมันแหล่งใหญ่ของโลกอยู่ที่ประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย และปัจจุบันมีการปลูกในหลายประเทศ คือ มาเลเซีย อินโดนีเซีย ไนจีเรีย ไทย โคลัมเบีย อินเดีย รวมไปถึงแหล่งปลูกใหม่ของประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น พม่า กัมพูชา (กรมวิชาการเกษตร, 2548) ซึ่งปาล์มน้ำมันถือว่า เป็นพืชที่มีศักยภาพในการแข่งขันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น ทั้งด้านการผลิตและการตลาด มีปริมาณสูงกว่าพืชน้ำมันอื่นๆ ส่วนแบ่งการผลิตน้ำมันปาล์มต่อน้ำมันพืชของโลก มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงอย่างต่อเนื่อง

โดยสถานการณ์การผลิตปาล์มน้ำมันในตลาดโลกพบว่า ผู้ผลิตรายใหญ่ของโลกคือ มาเลเซีย รองลงมาคือ อินโดนีเซีย ไนจีเรีย และไทย (กรมวิชาการเกษตร, 2547) ประเทศมาเลเซีย สามารถผลิตน้ำมันปาล์มในปี 2547 ได้จำนวน 13.98 ล้านตัน หรือร้อยละ 46 ของผลผลิตน้ำมันปาล์มโลก รองลงมาคือ อินโดนีเซีย และมาเลเซีย ยังเป็นผู้ส่งออกรายใหญ่ของโลก ส่วนประเทศผู้นำเข้าปาล์มน้ำมันรายใหญ่ของโลก ในปี 2547 คือ กลุ่มประเทศ EU รองลงมาคือ จีน อินเดีย และปากีสถาน ตามลำดับ

สำหรับในประเทศไทยนั้น ปาล์มน้ำมันถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีบทบาทสำคัญสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่นในประเทศ เช่น มะพร้าว ถั่วเหลือง และทานตะวัน เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่มีส่วนแบ่งการตลาดในประเทศสูงสุด โดยในปี 2540 น้ำมันปาล์มมีส่วนแบ่งการตลาดร้อยละ 65.77 และมีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมน้ำมันพืชไทย โดยก่อให้เกิดมูลค่าเพิ่มในอุตสาหกรรมที่ใช้น้ำมันพืชเป็นวัตถุดิบ ด้วยเหตุดังกล่าว จึงทำให้ความต้องการน้ำมันปาล์มในการบริโภคเพิ่มขึ้นทุกปี ดังจะเห็นได้จากพื้นที่ปลูกที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีการขยายพื้นที่ปลูกอย่างต่อเนื่อง โดยในปี 2547 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 2.19 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 3.78 ของพื้นที่ปลูกรวมทั้งโลก และเพิ่มขึ้นจากปี 2546 จำนวน 147,392 ไร่

สถานการณ์การผลิตปาล์มน้ำมันในประเทศไทยนั้นพบว่า มีผลผลิตเป็นอันดับที่ 6 ของโลก แหล่งปลูกปาล์มน้ำมันที่สำคัญได้แก่ ทางภาคใต้ของประเทศ คือ จังหวัดกระบี่ ปลูกมากที่สุดของประเทศ รองลงมาคือ สุราษฎร์ธานี และชุมพร ตามลำดับ ส่วนในภาคกลางแหล่งผลิตที่สำคัญคือ จังหวัดชลบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่กรมวิชาการเกษตรรับรองพันธุ์เป็นพันธุ์แนะนำ คือ พันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3

เนื่องจากมีการขยายพื้นที่ปลูกอย่างรวดเร็ว เพื่อตอบสนองความต้องการในการบริโภคที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งรัฐบาลได้มีนโยบายขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 6 ล้านไร่ โดยปลูกใหม่ 5 ล้านไร่ ทดแทนพื้นที่ปลูกเก่า 1 ล้านไร่ เพื่อใช้เป็นพืชทดแทนพลังงาน (พรรณนีย์, 2548) จึงมีปัญหาการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ทำให้ประเทศไทยสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท รวมไปถึงปัญหาเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันไม่ได้มาตรฐาน เนื่องจากมีการลักลอบขายเมล็ดพันธุ์ในตลาดมืด ทำให้เกษตรกรได้รับพันธุ์ที่ไม่ถูกต้องปะปนมา เมื่อนำมาปลูกจึงทำให้เกิดการกระจายพันธุ์ที่ไม่ดี อีกทั้งเกษตรกรเก็บเมล็ดจากโคนต้นมาทำการเพาะกล้าเอง ทำให้ได้พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้มาตรฐาน ให้ผลผลิตน้อย ไม่คุ้มค่า และเนื่องจากปาล์มน้ำมันต้องทำการปลูกในโรงเรือนเป็นเวลา15 - 18 เดือน จากนั้นนำมาปลูกในสภาพไร่อีก 3 ปี จึงจะให้ผลผลิตทะลายแรก ต้องใช้เวลารวมประมาณ 4 ปีกว่า จึงทราบว่าปาล์มน้ำมันที่นำมาปลูกนั้น เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตดีหรือไม่ดี ซึ่งหากเป็นพันธุ์ที่ไม่ดี เกษตรจะต้องเสียเวลา แรงงาน และเงิน ในการปลูกและ

ดูแลไปอย่างเปล่าประโยชน์ การหาวิธีตรวจสอบสายพันธุ์ปาล์มที่ถูกต้อง ในรอบแรกๆ ของการเจริญเติบโต จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ควรจะได้รับการพัฒนาให้สามารถตรวจสอบได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว เพื่อช่วยเหลือเกษตรกรผู้ปลูกปาล์มน้ำมัน ซึ่งวิธีการตรวจสอบทั่วๆ ไป ไม่สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ได้ จนกว่าปาล์มจะให้ผลผลิต เทคนิคทางชีวโมเลกุลเป็นเทคนิคที่พบว่าสามารถใช้จำแนกและตรวจสอบสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ มีความเฉพาะเจาะจง แม่นยำสูง ประหยัดเวลา และแรงงาน

เทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งในหลายๆ เทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งมีความเหมาะสมในการใช้จำแนกและตรวจสอบสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต จึงถูกเลือกเพื่อนำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งพื้นฐานของเทคนิค AFLP คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) และประสิทธิภาพของ PCR เข้าด้วยกัน แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำ PCR โดยใช้ primer คู่หนึ่งๆ ภายหลังจากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก เรียกว่า ลายพิมพ์ AFLP (AFLP fingerprint) AFLP เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ ทั้งนี้เพราะสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย ทำได้ค่อนข้างเร็ว ดังนั้นเทคนิค AFLP จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการสำรวจจีโนมพืชหรือสัตว์ที่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อน เป็นวิธีการหนึ่งที่รวดเร็วในการค้นหายีนหรือ DNA markers ที่อยู่ชิดกับลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ ช่วยให้การสร้าง saturated linkage map ประสบผลในระยะเวลาสั้น ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสของการได้ markers ที่ linked กับลักษณะสำคัญ และยังสามารถวิเคราะห์ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตใช้วิเคราะห์พันธุ์และเพศได้อีกด้วยดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมประชากรและจำแนกพันธุ์ระหว่างประชากรลูกผสมของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

ปาล์มน้ำมันจำนวน 51 พันธุ์ (ตารางที่ 1) ได้รับจากศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี แบ่งออกเป็นปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์ดี และพันธุ์ที่เป็นพ่อ แม่ ดังนี้

พันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 กับพันธุ์ที่เป็นแม่ของสุราษฎร์ธานี 1 และ 2 คือพันธุ์ที่นำมาจากแอฟริกาเมื่อปี 2391 ปลูกที่สวนพฤกษศาสตร์เมือง Deli คัดเลือกต้นที่มีลักษณะดี ให้ผลผลิตทะลายสดและน้ำมันสูงและสม่ำเสมอ มีลักษณะผล (fruit type) เป็นชนิด Dura

จึงเรียกประชากรจากแหล่งนี้ว่า Deli Dura (C2120:184D) ส่วนประชากรพ่อของสุราษฎร์ธานี 1 คือ Calabar (IRH629:316Tself) ลักษณะผลไม่มีกะลาหรือกะลาบางมาก (Pisifera type) กลุ่มพันธุ์นี้มีถิ่นกำเนิดจาก Calabar ประเทศไนจีเรีย ทวีปแอฟริกา ประชากรพ่อของสุราษฎร์ธานี 2 ได้แก่กลุ่มพันธุ์ที่เรียกว่า DAMI (DAM585:343Tself) มีแหล่งกำเนิดพันธุ์จากปาปัวนิวกินี สำหรับประชากรแม่ของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 3 เป็น Deli Dura (HC133:1288Dself) ชื่อสายพันธุ์และประชากรพ่อเรียก La Me แหล่งพันธุ์มาจากไอวอรีโคสต์ มีลักษณะเด่นคือ ต้นเตี้ย ก้านทะลายยาวทำให้เก็บง่าย ผลเล็กแต่ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง

การสกัดดีเอ็นเอ เก็บรวบรวมใบของปาล์มน้ำมันของแต่ละพันธุ์ดังกล่าวจากศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี สกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมันโดยวิธีของ Agrawal และคณะ (1992) ซึ่งมีการดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้คือ นำใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน 0.1 กรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด เติม Extraction buffer [50 mM Tris HCl pH 8.0, 1% (W/V) N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide (CTAB), 50mM Na_2EDTA และ 0.7 M NaCl] จำนวน 700 ml และเติม 2-mercaptoethanol จำนวน 3 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที เขย่าหลอดทุกๆ 10 นาที จากนั้นเติม Chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 700 µl ผสมสารละลายในหลอดให้เข้ากันโดยวิธีกลับหลอดไปมาประมาณ 5-10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน 500 µl ใส่หลอด microtube ใหม่ จากนั้นเติม 3 M Sodium acetate 50 µl และ Isopropanol 300 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปแช่ไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ตะกอนที่ก้นหลอดคือดีเอ็นเอ จากนั้นล้างตะกอน ดีเอ็นเอ 2 ครั้งด้วย 70% แอลกอฮอล์ 500 µl ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE (1 mM Na_2EDTA, 10 mM Tris-HCl pH8.0) จำนวน 50 µl นำดีเอ็นเอที่ได้วัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer

จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้วิธีการของ Vos และคณะ (1995) ในกรณีของปาล์มน้ำมันยังไม่มีข้อมูลว่า Primer combination ใดที่ดีในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงจำเป็นต้องทำการคัดเลือก Primer เป็นอันดับแรก โดยการสุ่มดีเอ็นเอของพันธุ์ปาล์มน้ำมันจำนวน 3 พันธุ์ มาวิเคราะห์ โดยใช้เทคนิค AFLP ทุกขั้นตอนจนครบ ตรวจผลของ Primer combination ไหนดีโดยการดูจากจำนวนและความคมชัดของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จึงนำ Primer combination ที่คัดเลือกไว้มาใช้ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้งหมด 51 พันธุ์ข้างต้น ซึ่งขั้นตอนการคัดเลือก Primer มีดังนี้

1. การคัดเลือกคู่ของ AFLP Primer combinations

1.1 ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย adaptor

นำดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันมาพันธุ์ละ 250 ng มาตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*R I และ *Mse* I อย่างละ 2.5 Unit ในปฏิกิริยาทั้งหมด 10 μl (10 mM Tris-acetate, 10 mM Mg acetate, 50 mM Potassium acetate และ 5 mM DTD, pH 7.5) บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์กับ *Eco*R I และ *Mse* I Adaptor (ลำดับเบสแสดงในตารางที่ 2) โดยการเตรียม Ligation Mastermix 10 μl [1 μl *Eco*R I adaptor (5-pmol/μl), 1 μl ของ *Mse* I adaptor (50 pmol/μl), T4 DNA ligase 1 unit, 10x T4 DNA ligase buffer 2 μl, 0.5 M NaCl 2 μl, 1 mg/ml BSA] นำ Ligation Mastermix เติมลงในดีเอ็นเอปาล์มน้ำมัน 4 พันธุ์ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์สมบูรณ์แล้ว (ตรวจเช็คโดยการแยกบน 1.5% agarose gel electrophoresis) บ่มปฏิกิริยาที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Preselective amplification

ทำการเจือจางดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adaptor แล้วลง 10 เท่า ด้วย TE buffer จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะชิ้นที่เชื่อมต่อกับ adaptor ที่ถูกต้องทั้ง 2 ด้าน (ด้านหนึ่งเชื่อมต่อกับ *Eco*R I Adaptor และด้านที่เหลือเชื่อมต่อกับ *Mse* I Adaptor) โดยการนำดีเอ็นเอนี้มาทำ PCR ด้วย Preselective Primer ที่มีลำดับ Nucleotide เหมือน Adaptor แต่มีการเพิ่ม Nucleotide เข้าไปที่ปลาย 3' ข้างละ 1 Nucleotide (+1) ในการทดลองนี้ใช้ Preselective Primer ที่เป็น *Eco*R I +A และ *Mse* I +C ดังแสดงในตารางที่ 2

ในการทำปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอน Preselective Amplification มีส่วนประกอบดังนี้ ใช้ดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ Adaptor เจือจางลงแล้ว 10 เท่า จำนวน 4 μl, 10x PCR buffer 2 μl (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM $MgCl_2$ และ 500 mM KCl) Taq DNA polymerase 1.2 unit (Bioline) dNTP 2 μl (5 pmole), *Eco*R I +A primer (1μM) 1 μl, *Mse* I + C primer (8.3 μM) 2 μl และเติมน้ำให้ปฏิกิริยารวมครบ 20 μl นำเข้าเครื่องทำปฏิกิริยา PCR (Gene Amp PCR System 9700) จำนวนรอบ เวลา และอุณหภูมิของแต่ละช่วงเป็นดังนี้ 72°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ ; 94°C 20 วินาที, 56°C 30 วินาที, 72°C 2 นาที จำนวน 20 รอบ ; 60°C 30 นาที จำนวน 1 รอบ

1.3 Selective amplification

เจือจางดีเอ็นเอจาก PCR Product ในขั้น Preselective amplification ลง 20 เท่า ทำปฏิกิริยา Selective amplification โดยใช้ Primer Combination ระหว่าง *Eco*R I +3 Nucleotide ที่ติดฉลากด้วยสี Fluorescent ต่างๆที่ปลาย 5' จำนวน 8 เส้น กับ *Mse* I +3 Nucleotide 8 เส้น ในการคัดเลือกครั้งนี้ใช้ Primer combination ของ *Eco*R I และ *Mse* I Selective Primer ครบ 64 คู่ (ตารางที่ 3) องค์ประกอบของปฏิกิริยามีดังนี้ ใช้ดีเอ็นเอจากขั้น Preselective amplification ที่เจือจางลง 1:20 จำนวน 3 μl, 1 μM *Eco*R I Primer-Axx 1 μl, 3 μM *Mse* I Primer-Cxx 1 μl และ AFLP core mix (PE Applied BioSystems) เติมน้ำให้ครบ 20 μl ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการนำไปทำ Touch down PCR ที่มีโปรแกรมดังนี้ 94°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ ; 94°C 20 วินาที, 66°C 30 วินาที, 72°C 2 นาที จำนวน 10 รอบ และจากนั้นลดอุณหภูมิลง 1°C ทุกๆรอบ เมื่อครบแล้วทำอีก 20 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 94°C 20 นาที 56°C 30 วินาที และ 72°C 2 นาที และ 60°C นาน 30 วินาที

จากนั้นนำ PCR Product 3 μl ไปแยกขนาดของดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง ABI Prism 377 DNA Sequencer ดีเอ็นเอที่เหลือเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อนำมาแยกขนาด โดยใช้ 6.5% manual denature polyacrylamide gel แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย Silver stain ในกรณีที่สนใจแถบดีเอ็นเอใด จะได้ตัดออกมาอ่านลำดับพันธุกรรมได้

2. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค AFLP

นำผลของ Primer combination ที่ดีโดยตรวจผลจากข้อ 1 มา 10 คู่ เพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ปาล์มน้ำมันจำนวน 51 ตัวอย่างพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับขั้นตอนการดำเนินการเช่นเดียวกับขั้นตอนการคัดเลือกคู่ของ primer ในข้อที่ 1

3. การตรวจวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3

จากการแยกขนาดของดีเอ็นเอปาล์มน้ำมัน 51 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิค AFLP ด้วยเครื่อง ABI Prism 377 DNA Sequencer จะใช้โปรแกรม GeneScan และ Genotyper (PE Applied Biosytems) ในการวิเคราะห์ข้อมูล การแสดงผลของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ตลอดจนการให้คะแนนแถบของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ในกรณีของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP จะสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง จึงพบว่าได้รูปแบบลายพิมพ์ที่มีหลายแถบ การให้คะแนนจะให้เฉพาะแถบที่เป็น Polymorphic คือ เป็นแถบที่มีความแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์พืชที่ศึกษา

โดยพันธุ์ใดมีแถบ (Present) จะให้คะแนนเป็น 1 พันธุ์ใดไม่มีแถบ (Absent) ในตำแหน่งที่ศึกษาเดียวกันนี้จะให้คะแนนเป็น 0 สำหรับแถบดีเอ็นเอที่พบในทุกพันธุ์ที่ศึกษาหรือเรียก monomorphic band จะไม่มีการให้คะแนนหรือไม่วิเคราะห์ผล

นำข้อมูลนี้มาสร้างเป็น Binary matrix นำค่าจากตารางนี้ไปคำนวณ Similarity matrix โดยใช้วิธี Unweighted Pair – Group Method Using the Arithmetic Average (UPGMA) เขียน dendrogram โดยใช้ Neiboring join tree การวิเคราะห์ทำโดยใช้โปรแกรม SPSS version 9.0

4. การสร้าง primer จำเพาะในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3

เมื่อตรวจดูชิ้นดีเอ็นเอหรือแถบดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง ABI Prism 377 DNA Sequencer พบแถบ (bands) หรือชิ้นดีเอ็นเอ (DNA fragments) ที่แสดงความแตกต่างของพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1,2 และ 3 จึงนำดีเอ็นเอที่เหลือซึ่งเก็บไว้ที่ -20°C ไปทำการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 6.5% manual denature polyacrylamide gel ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย Silver strain แล้วจึงตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของพันธุ์ปาล์มดังกล่าวมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใหม่ แล้วต่อเข้ากับ Vector pGEM-T จากนั้นจึง Transform vector ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจใส่เข้าไปใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5∝ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปทำการอ่านลำดับพันธุกรรมส่วนที่สนใจแล้วนำมาออกแบบ Specific primer ใหม่ สุดท้ายนำมาทดสอบกับดีเอ็นเอของพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 และพันธุ์ที่เป็นพ่อ แม่

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกคู่ของ AFLP Primer Combinations

จากการทดลองคัดเลือก Primer Combination จาก *Eco*R I และ *Mse* I selective primer อย่างละ 8 เส้น ใช้ร่วมกันแบบพบกันหมด สามารถรวมกันได้เป็น 64 คู่ผสม (combination primer) เมื่อทำการทดสอบโดยนำมาทำ PCR กับดีเอ็นเอพันธุ์ปาล์มน้ำมันจำนวน 3 พันธุ์ทั้ง 64 คู่ผสม เพื่อทำการคัดเลือกคู่ของ Primer ที่ดี กล่าวคือ ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มากหรือรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เข้มชัดเจนทุกแถบ ในการนำมาทดสอบทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 นั้น พบว่าคู่ Primer ที่ให้ผลดีมากและดีในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันมีทั้งหมด 23 คู่ของ Primer ได้แก่ E-ACA + M-CAT, E-ACA + M-CTA, E-ACA + M-CTT, E-ACA + M-CTG, E-AAG + M-CTG,E-AGG + M-CTG, E-ACC + M-CAG, E-AGC + M-CTG, E-ACA + M-CAC, E-ACA + M-CAA, E-ACA + M-CTC, E-ACA + M-CAG, E-ACT + M-CAC, E-ACT + M-CAA, E-AAG + M-CAT, E-AAG + M-CAC, E-AGG + M-CAT, E-ACG + M-CAC, E-AAG + M-CAG, E-AGG + M-CAC, E-AGG + M-CAA, E-ACC + M-CTG และ E-AAC + M-CAG คู่ Primer เหล่านี้สามารถนำมาทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันได้ทั้งหมด ที่เหลือพบว่าให้แถบลายพิมพ์ที่น้อยถึงไม่ขึ้นเลย ดังแสดงในตารางที่ 4

2. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค AFLP

เมื่อคัดเลือกคู่ Primer ที่ให้ผลดีมากและดีได้แล้วจำนวน 23 คู่ นำคู่ของ primer จำนวน 10 คู่ (E-ACA + M-CTA, E-ACA + M-CTG, E-AAG + M-CTG, E-AGG + M-CTG, E-ACC + M-CAG, E-AGC + M-CTG, E-ACA + M-CAG, E-AAG + M-CAT, E-AAG + M-CAT และ E-ACC + M-CTG) มาทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2, 3 และพันธุ์ที่เป็นพ่อ-แม่ของพันธุ์ทั้ง 3 รวม 51 พันธุ์ ผลการจัดทำรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2, 3 ด้วย Primer 10 คู่ดังกล่าว ในแต่ละคู่ของ primer ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด (Total No. of bands) 1,204 แถบ มีแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (Polymorphic bands) ระหว่างพันธุ์ทั้ง 3 ประมาณ 558 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างรวม 47% ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP 10 คู่ primer หรือ 10 ตำแหน่ง พบว่าในพันธุ์ปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ ได้แก่ สุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 มีแถบของดีเอ็นเอในแต่ละพันธุ์ถึง 489, 371 และ 344 แถบ เฉลี่ยคิดเป็น 48.9, 37.1 และ 34.4 แถบ/ตำแหน่ง ตามลำดับ ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจพบมีความยาวอยู่ระหว่าง 50-484 คู่เบส (ตารางที่ 5)

ในจำนวน Primer ทั้ง 10 คู่นี้ Primer ที่สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้ง 3 พันธุ์ออกจากกันได้ดีที่สุดคือ Primer E-AGC+M-CTG รองลงมาได้แก่ Primer E-ACC+M-CTG ส่วน Primer E-AAG+M-CAT ให้ความแตกต่างน้อยสุดคือ 22% ในการทดลองนี้ที่คัดเลือกคู่ของ primer จำนวน 10 คู่ จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมัน 51 พันธุ์ ถือว่าเพียงพอ เพราะจากการทดลองของ Barcelos และคณะ (2002) รายงานว่าใช้ AFLP Primer เพียง 3 คู่ ก็เพียงพอในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน 62 ตัวอย่างพันธุ์ได้

การจำแนกพันธุ์ปาล์มสุราษฎร์ธานี 1, สุราษฎร์ธานี 2 และ สุราษฎร์ธานี 3 ออกจากกันโดยใช้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่า

Primer E-ACA + M-CTA ทำให้รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ปาล์มสุราษฎร์ธานี1 และ 2 ต่างจากสุราษฎร์ธานี 3 เพราะมีแถบขนาด 186 คู่เบส ดังปรากฏในภาพที่ 1 บน ที่มีลูกศรชี้

Primer E-ACA + M-CTG สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ปาล์มสุราษฎร์ธานี 3 ออกจาก สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 ได้ เพราะพันธุ์สุราษฎร์ธานี 3 มีแถบขนาด 92 คู่เบส ขณะที่พันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 นั้นไม่มีแถบดังกล่าว ในทางตรงกันข้ามสุราษฎร์ธานี 1 และ 2 กลับมีแถบขนาด 293 คู่เบส ซึ่งสุราษฎร์ธานี 3 ไม่มี ดังปรากฏในภาพที่ 1ล่าง ที่มีลูกศรชี้

Primer E-AGG + M-CTG สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ปาล์มสุราษฎร์ธานี 3 ออกจากสุราษฎร์ธานี 1 และ 2 ได้ เพราะพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 มีแถบหรือ peak ขนาด 195 คู่เบส ส่วนสุราษฎร์ธานี 3 ไม่มีแถบดังกล่าว ดังปรากฏในภาพที่ 2 ที่มีลูกศรชี้

Primer E-ACC + M-CAG สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ปาล์มสุราษฎร์ธานี 1 และ 2 ออกจากสุราษฎร์ธานี 3 ได้ เพราะพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 มีแถบขนาด 62.11 คู่เบส ซึ่งสุราษฎร์ธานี 3 ไม่มีแถบนี้โดยสิ้นเชิง ดังปรากฏในภาพที่ 3 บน ที่มีลูกศรชี้

Primer E-AGC + M-CTG สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ปาล์มสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 ออกจากกันได้ โดยพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 เท่านั้นที่มีแถบขนาด 228.95 คู่เบส ซึ่งสุราษฎร์ธานี 3 ไม่มีแถบนี้ ในขณะที่แถบขนาด 324.54 คู่เบส พบในพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 3 แต่ไม่พบในสุราษฎร์ธานี 2 ดังปรากฏในภาพที่ 3 ล่าง ที่มีลูกศรชี้

Primer E-ACA + M-CAG สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ปาล์มสุราษฎร์ธานี 2 ออกจากสุราษฎร์ธานี 1 และ 3 ได้ โดยสุราษฎร์ธานี 2 มีแถบขนาด 135.29 และ 324.41 คู่เบส ซึ่งไม่พบในสุราษฎร์ธานี 1 และ 3 เช่นเดียวกับ Primer E-ACA + M-CTT ซึ่งสุราษฎร์ธานี 2 มีแถบขนาด 210 คู่เบส แต่สุราษฎร์ธานี 1 และ 3 ไม่มี ดังปรากฏในภาพที่ 4 บนและล่าง ที่มีลูกศรชี้

Primer E-ACC + M-CTG สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ปาล์มสุราษฎร์ธานี 3 ออกจากสุราษฎร์ธานี 1 และ 2 ได้ โดยสุราษฎร์ธานี 3 มีแถบขนาด 253.20 และ 271.82 คู่เบส เพิ่มขึ้นมาในขณะที่สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 ไม่มีแถบนี้ ดังปรากฏในภาพที่ 5 บน ที่มีลูกศรชี้

Primer E-AAC + M-CAG สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ปาล์มสุราษฎร์ธานี 2 ออกจากสุราษฎร์ธานี 1 และ 3 ได้ โดยสุราษฎร์ธานี 2 มีแถบขนาด 169.34 และ 289.92 คู่เบส เพิ่มขึ้นมาในขณะที่สุราษฎร์ธานี 1 และ 3 ไม่มีแถบนี้ ดังปรากฏในภาพที่ 5 ล่าง ที่มีลูกศรชี้

3. การตรวจวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ3

จากภาพที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ของปาล์มน้ำมันจำนวน 51 ตัวอย่างพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลจาก Primer ของเทคนิค AFLP จำนวน 10 คู่ ทำการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) ได้ตาราง Similarity matrix (แสดงในตารางที่ 6) และเขียน dendrogram โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 9.0 พบว่า พันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2, 3 และพันธุ์ที่เป็นพ่อแม่ สามารถแบ่งแยกเป็นกลุ่มได้ชัดเจนเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม a และ b กลุ่ม a จะประกอบด้วยพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และประชากรที่เป็นพ่อ แม่ และกลุ่ม b เป็นกลุ่มประชากรของพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 3 กับพันธุ์ที่เป็นพ่อ (DAMI), แม่ (Deli Dura) ซึ่งมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมประมาณ 0.4 ซึ่งน้อยกว่ากลุ่ม a ที่มีค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรม 0.8 และในกลุ่ม a สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ คือ กลุ่มย่อย c กับ d ซึ่งประกอบด้วยพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1, พันธุ์พ่อ Calabar และพันธุ์แม่ของสุราษฎร์ธานี 1 คือ Deli Dura อยู่ด้วยกัน สำหรับกลุ่มย่อย f ประกอบด้วย พันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 กับพันธุ์พ่อ คือ LAME จากการจัดกลุ่มนี้จะเห็นว่า การใช้เทคนิค AFLP สามารถระบุความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ถูกต้อง กล่าวคือ กลุ่มพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดใกล้ชิดกันมากกว่า จะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังเช่นพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 กับสุราษฎร์ธานี 2 ซึ่งมีพันธุ์แม่ร่วมกัน (Deli Dura) แต่พ่อต่างกัน จึงอยู่คนละกลุ่มย่อยตามกลุ่มย่อยของพ่อ ในทางตรงกันข้าม สำหรับพันธุ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกันเลยหรือมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมน้อย จะถูกจัดเป็นคนละกลุ่มกัน เช่น พันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 กับสุราษฎร์ธานี 3 เป็นต้น

และเมื่อทดลองนำข้อมูลชุดนี้ไปวิเคราะห์ใหม่ด้วยวิธีการเดิมแต่ตัดพันธุ์ที่เป็นพันธุ์พ่อแม่ออกไป เหลือแต่ประชากรพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี คือ สุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 เท่านั้น เพื่อดูความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มทั้ง 3 พันธุ์ ดังแสดงในภาพที่ 7 และตารางที่ 7 ในการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันพันธุ์เดียวกัน กล่าวคือ กลุ่ม a คือ พันธุ์สุราษฎร์ธานี 3 กลุ่ม b คือ พันธุ์สาราษฎร์ธานี 1 และกลุ่ม c คือ กลุ่มพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 ความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้ง

3 พันธุ์นี้มีค่าตั้งแต่ 0.01 - 1 สุราษฎร์ธานี 1 ต่างกับสุราษฎร์ธานี 3 มากที่สุดคือ 0.41 - 1 ซึ่งค่อนข้างกว้างมาก แต่เมื่อตรวจสอบดูความแปรปรวนของประชากรภายในกลุ่มพันธุ์เดียวกัน พบว่าสุราษฎร์ธานี 1 มีความแปรปรวนภายในประชากรมากสุด คือ ตั้งแต่ 0.01 - 0.66 รองลงมา ได้แก่ สุราษฎร์ธานี 2 มีความแปรปรวนใกล้เคียงกับสุราษฎร์ธานี 3 คือ 0.03 - 0.53 และ 0.02 - 0.58 ตามลำดับ จะเห็นว่าความแปรปรวนภายในประชากรปาล์มน้ำมันของแต่ละพันธุ์มีค่าสูง ทั้งนี้เพราะปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้ามโดยธรรมชาติ ฉะนั้นการศึกษาวิจัยพันธุ์ปาล์มต้องคำนึงถึงข้อนี้ให้มาก การสุ่มตัวอย่างที่จะใช้เป็นตัวแทนของประชากรควรสุ่มมาก จะได้ค่าตัวแทนที่ถูกต้องกว่า

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการใช้เทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่ดีสามารถแยกกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันได้อย่างดี และสามารถบอกความแตกต่างภายในและระหว่างประชากรปาล์มน้ำมันได้ดังกล่าวแล้ว แต่ในทางปฏิบัติ ถ้ามีพันธุ์ปาล์มน้ำมันมากๆ การใช้เทคนิคนี้ก็จะไม่สะดวกเพราะมีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลา แรงงานมาก สารเคมีที่ใช้มีราคาค่อนข้างแพงและต้องการบุคลากรที่ได้รับการฝึกฝนมาเป็นอย่างดี ประกอบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลายแถบ (30 - 100 แถบ) บางครั้งดูยากหรือไม่ชัดเจน การให้คะแนนอาจมีการลำเอียง ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาต่อโดยการหาตำแหน่งที่สามารถจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ออกจากกันได้แล้วเปลี่ยนเป็น Primer จำเพาะ (Specific Primer) เพื่อที่จะสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ ในกรณีที่มีตัวอย่าง (Sample) มากๆ ได้ เพราะจะลดขั้นตอนลงได้มาก ดังแสดงในข้อ 4

4. การสร้าง Primer ที่จำเพาะในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3

จากภาพที่ 8 เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 ที่ได้จากเทคนิค AFLP (Primer E-AAG+M-CAT) แยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย 6.5% denature polyacrylamide gel โดยใช้เครื่อง manual sequencing และย้อมแถบของดีเอ็นเอด้วย Silver Stain จะพบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกพันธุ์ปาล์มทั้ง 3 ได้อย่างเด่นชัด 4 แถบ คือ a, b, c และ d โดยที่แถบ a ปรากฏในพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1 และ 2 แต่ไม่พบในพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 3 แถบ b ในภาพที่ 8 พบเฉพาะในพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 2 เท่านั้น สำหรับแถบ c และ d มีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน จะบอกได้ว่าเป็นแถบเดียวกันได้หรือไม่ได้ก็ต่อเมื่อมีการอ่านลำดับพันธุกรรมออกมาแล้ว แถบ c พบในพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1 แถบ d พบในพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 3 ส่วนพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 2 จะไม่พบแถบทั้ง 2 นี้ จึงได้ตัดแถบดีเอ็นเอเหล่านี้นำไปอ่านลำดับพันธุกรรม พบว่า แถบ (fragment) c และ d เป็นแถบเดียวกัน ผลการอ่านลำดับพันธุกรรมจึงเหลือ 3 แถบดังนี้

PDOA 1

CCGCGGGAAT TCGATTGGTG CTCCGTGGAA CAGCTGACGG CAACTAGTCT
AAAACCCTGA ATCTGGTGGA TCAAGAAATT CTAAGAAATA TCTATGGCAC
GGAAGGGCGT TCTTCTGTCA CCGCAGTTCA GGTACATCTC TTCCAGAAAT
ACCTGTAACG TTGTTGACAC AAATACCAAG TTCCATCATG GTAAAGATAG
GATAATACTC TACATACTTT ACAATCTTTA CAACAAAAGG AGTTCAACCC
TCATGTACAG CCTGTGCCGA AATTTTGAGC CACCTGAAAT CACCGAATAG
TTTGGAGCAA CTTTACAACG GAGTGTCAGC AAGCGAGGTT ATATGAAACA
AATCAACCCC GAGGTAGTTT ACTGGCCACC AACAGCGAAA ATCCAGCCTC
CCTTAACGGG GGGGATCTAT TTTTCCAACT GGAATGGCTG GACATGTTGG
ACTTTAAAGA CATTCCAGGC AACAGTCCCA CCCTTTTTCG GGGAGAACAA
TCCGCCTCTT ACGGAGCAGG GGAGTCCGAC

Pcut 73

TTGACTGCGT ACCAATTCAA GCAATGTCTG AGGAGATGCA ATCTCTCTAC
AAGAATGAGA TATGGTGATT MGTGCAGGTT GCCATARGGG AAGGAAACCC
AGTTGGTTGT AARGTGGGTT TACCCAAATA CAAGAATGGA TCCCTTCAGA
CGCAGGGAGG TATCACGGTA CAAGGCAAGG CTAGTGGCCA AACGGATACT
CCCAGAATGG AAGGGCATCG GACCTTCAGT GAGATTTTCC TCTCGTCTGT
CATTCAGGCA TACTTCCATT AGGGTGCCAC TGAGCATCGT AGCAGTTCAA
GACTTGGAGC TAGAGCAGAT GGATGTTACT CAGGCTCATC AA

Pcut 95

TGACTGCGAC CAATTCACAA ATGAACACGA GTTGAGCTAA TCTAACAKAT
GACTGACAAT GGAGGTTTGA TGAGTTTTCY AATGATCYCC GTCAAGTCCG
AAACCTCATG ATAGAGGGAT TATATCACAC CTATAACTAT ACCAAAAAGT
TCATCCTTTT TTATTCTGCG AAATKCCACK ACATGTTGCT AGGTACACCT
GAGGATCGTG AGGAACTCAC TAGGATCATT TTCGGATCAC ATGACCTGTT
ACTCAGGACT CATCAAGGAG ACCTAG

เมื่อได้ลำดับเบสแล้วจึงใช้ลำดับเบสที่ได้นี้ไปออกแบบ Primer จำเพาะ ได้ดังนี้

PDOA 1 F 5′ - GGT GCT CCG TGG AAC AGC TG - 3′
PDOA 1 R 5′ - GGT GCT CCG TAA GAG GCG G - 3′

Pcut 73 F 5′ - GTA CGG CAC TAC TGC TCT TC - 3′
Pcut 73 R 5′ - GGT TAA GTT CGT TAC AGA CTC - 3′

Pcut 95 F 5′ - ATT GTC CAG TAC ACT AGG C - 3′
Pcut 95 R 5′ - AGT GTT TAC TTG TGC TCA A - 3′

นำลำดับเบสของ Primer ที่ออกแบบไว้ไปสังเคราะห์และนำไปทดสอบโดยการใช้ดีเอ็นเอของพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 เป็นแม่พิมพ์ในการทำ PCR พบว่าสามารถจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ดังกล่าวออกจากกันได้ ดังภาพที่ 9, 10 โดยที่เมื่อใช้ Primer PDOA 1 (ภาพที่ 9) สามารถระบุพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 2 ได้ กล่าวคือ PDOA 1 จะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 500 bp กับพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 โดยที่พันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1 และ 3 ไม่พบแถบนี้ ในขณะที่ Primer Pcut 73 (ภาพที่ 10) จะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 bp ในพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1 กับ 3 และไม่พบแถบนี้ในพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 2 ส่วน Primer Pcut 95 เมื่อทำ PCR กับพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีทั้ง 3 พันธุ์ ถ้าเป็นพันธุ์สุราษฎร์ธานี 3 จะให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ พันธุ์ที่เหลือให้แถบเดียวขนาดประมาณ 100 bp ดังภาพที่ 11 อย่างไรก็ตาม Specific primer ที่ได้นี้ต้องนำไปทดสอบกับพันธุ์ปาล์มน้ำมันชนิดต่างๆ ในหลายๆ ตระกูลเพื่อใช้เป็นข้อมูลต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. AFLP Primer ที่เหมาะสมสำหรับจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันมีทั้งหมด 23 คู่
2. การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 ใช้ Primer 10 คู่ ก็ถือว่าเพียงพอ ได้แก่ E-ACA + M-CTA, E-ACA + M-CTG, E-AAG + M-CTG, E-AGG + M-CTG, E-ACC + M-CAG, E-AGC + M-CTG, E-ACA + M-CAG, E-AAG + M-CAT, E-AAG + M-CAT และ E-ACC + M-CTG
3. ประชากรปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ที่ทำการศึกษามีความแปรปรวนค่อนข้างสูง กล่าวคือ ในพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1 มีความแปรปรวนภายในประชากรมากที่สุด รองลงมาได้แก่ สุราษฎร์ธานี 2 ซึ่งมีความแปรปรวนภายในประชากรใกล้เคียงกับสุราษฎร์ธานี 3 ซึ่งมีความแปรปรวนภายในประชากรน้อยสุด
4. สามารถออกแบบ Specific primer สำหรับใช้จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 ได้จำนวน 3 คู่ ได้แก่ PDOA 1, Pcut 73 และ Pcut 95 สำหรับใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันในกรณีที่มีตัวอย่างพันธุ์เป็นจำนวนมากได้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการ ปาล์มน้ำมัน. โรงพิมพ์ดอกเบี้ย กรุงเทพฯ. 188 หน้า.

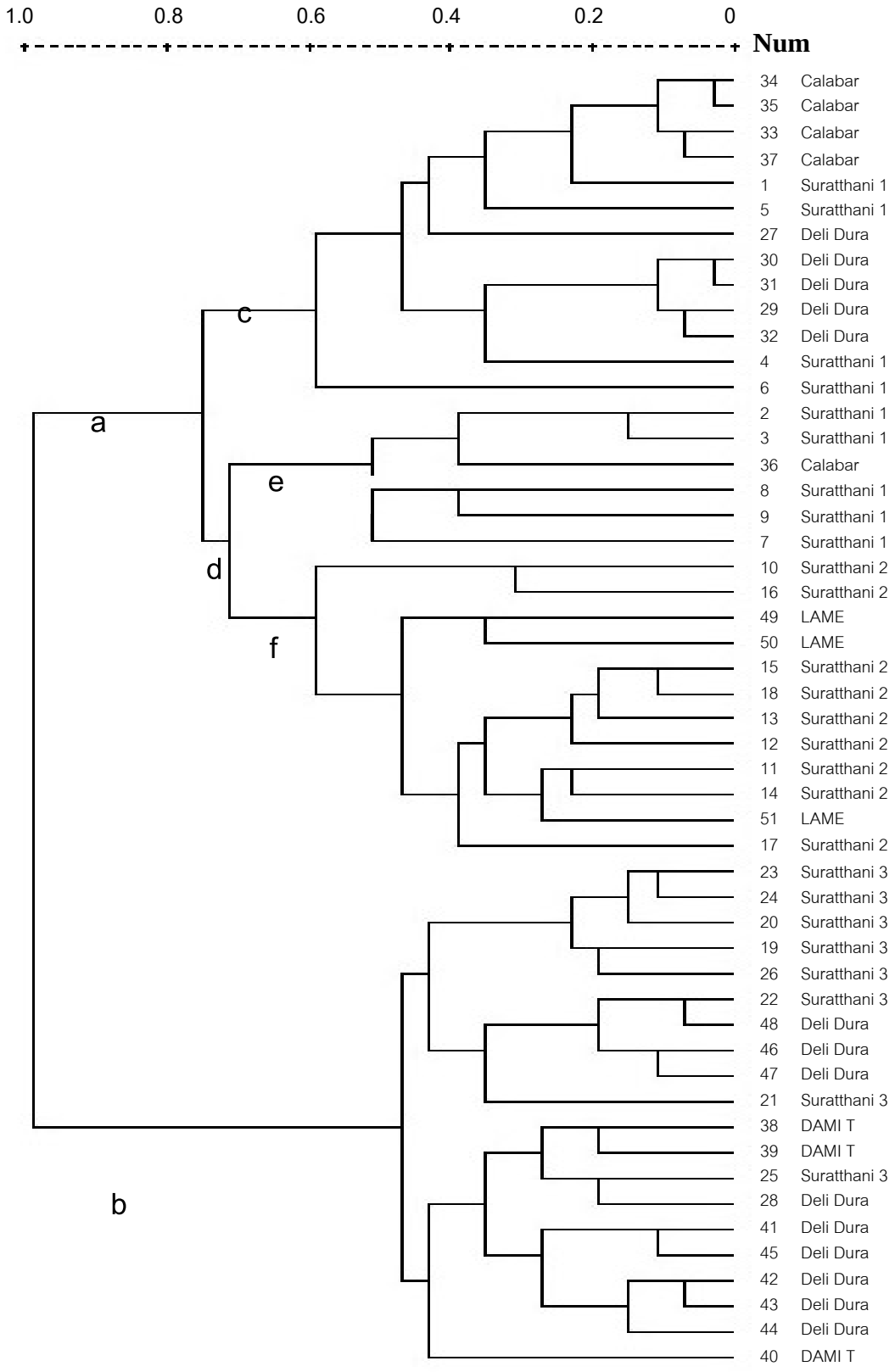
กรมวิชาการเกษตร. 2548. สถานการณ์ปาล์มน้ำมัน. ข่าวสารปาล์มน้ำมัน 1 (1) : 5-7.

พรรณนีย์ วิชชาชู. 2548. น้ำมันปาล์มกับไบโอดีเซล. จดหมายข่าวผลิใบ ก้าวใหม่การวิจัยและพัฒนาการเกษตร 7 (12) : 2-5.

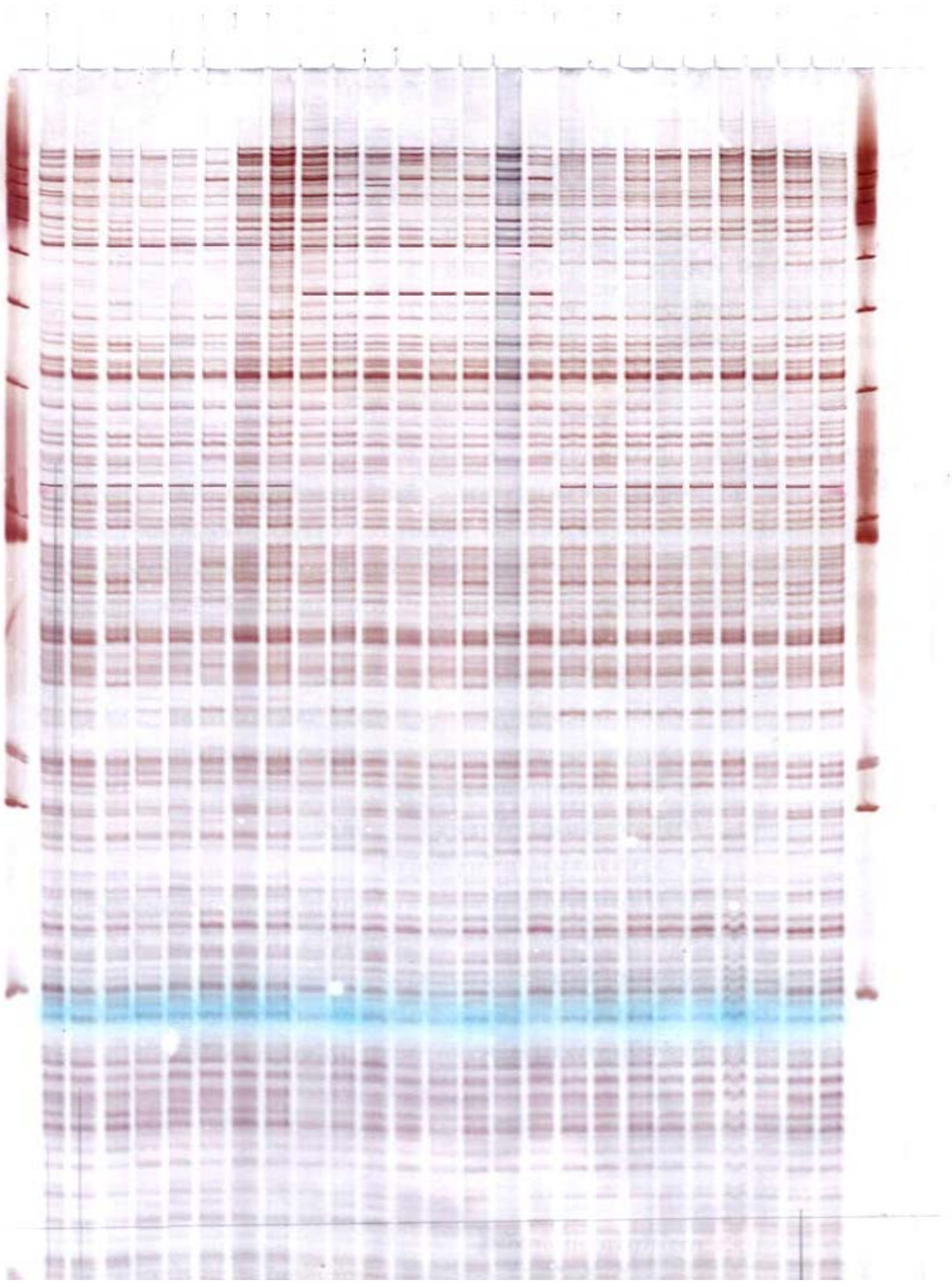
Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from Chberospondias asillaris leaves. BioLect. Biodiv. Lett. 2 : 19-24.

Barcelos, E., P. Amblard, J. Berthaud, and M. Segium. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by AFLP and AFLP molecular marker. Pesq. Agropec. Bras. 37(8) : 1105-1114.

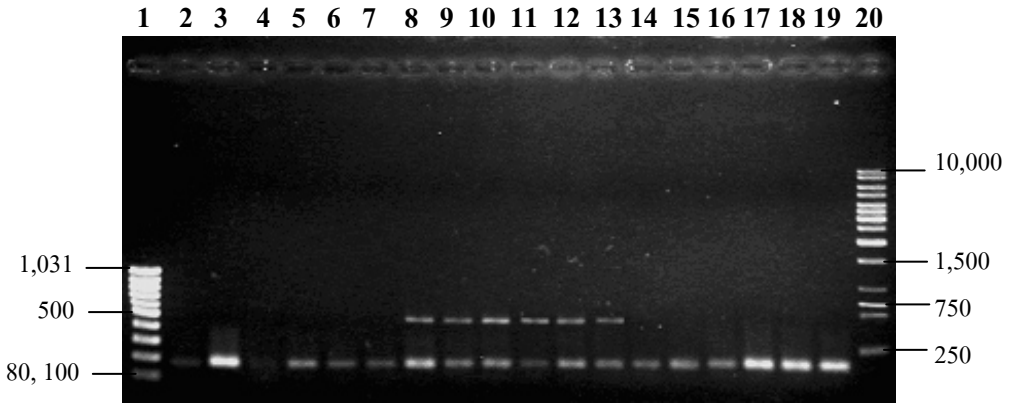
Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP : A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23 : 4407-4414.



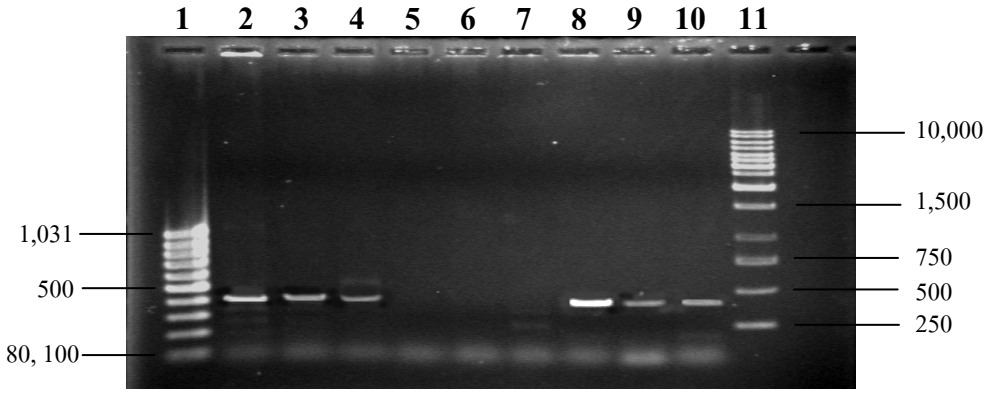
ภาพที่ 6 การจัดกลุ่ม (Dendrogram) แสดงความสัมพันธ์ของปาล์มน้ำมัน สุราษฎร์ธานี 1, 2, 3 และพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อ-แม่วิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลจาก Primer Combination 10 คู่ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 9.0



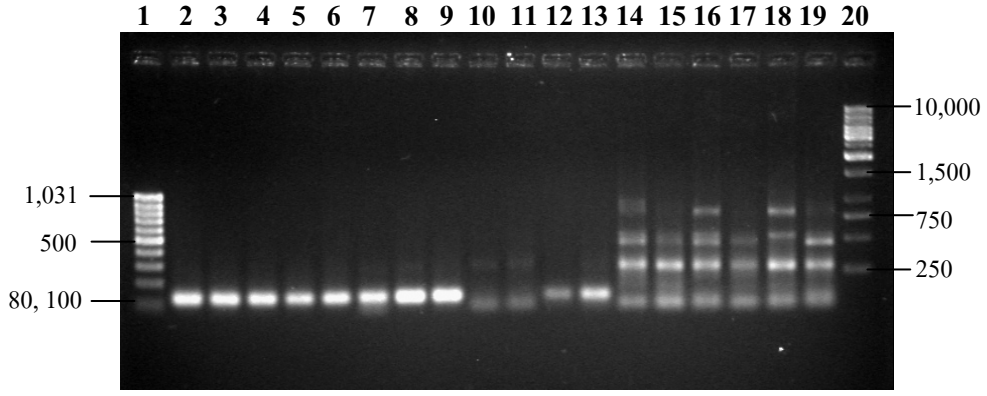
ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ ของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 2 และ 3 โดยใช้เทคนิค AFLP (ไพรเมอร์ E/AAG + M/CAT) แยกชิ้นดีเอ็นเอด้วย 6.5% denature polyacrylamide gel (manual) ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย Silver stain โดยที่ 1 - 8 = สุราษฎร์ธานี 1 9 - 16 = สุราษฎร์ธานี 2 และ 17 - 25 = สุราษฎร์ธานี 3



ภาพที่ 9 PCR product ที่ได้จาก Specific Primer PDOA1 โดยที่ 1, 20 = 100 bp, 1kb DNA Ladder
2 - 7 = สุราษฎร์ธานี 1 8 - 13 = สุราษฎร์ธานี 2 14 - 19 = สุราษฎร์ธานี 3



ภาพที่ 10 PCR product ที่ได้จาก Specific Primer Pcut 73 โดยที่ 1, 11 = 100 bp, 1kb DNA Ladder
2 - 4 = สุราษฎร์ธานี 1 5 - 7 = สุราษฎร์ธานี 2 8 - 10 = สุราษฎร์ธานี 3



ภาพที่ 11 PCR product ที่ได้จาก Specific Primer Pcut 95 โดยที่ 1, 20 = 100 bp, 1kb DNA Ladder
2 - 7 = สุราษฎร์ธานี 1 8 - 13 = สุราษฎร์ธานี 2 14 - 19 = สุราษฎร์ธานี 3