เครื่องหมายโมเลกุลในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา

Molecular Markers for Analysis of Genetics Diversity and Detection of Oil Palm Hybrid Tenera

นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์[1] นางสาวอรรัตน์ วงศ์ศรี[2] นางนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ[1]
HATHAIRAT URAIRONG ORNRAT WONGSRI NAIYANATE JAROENSANTI TANAKA

Abstract

The genetic diversity studies and shell type analysis of oil palm are achieved by molecular marker. Thirteen SSR markers loci were selected to be able to distinct 10 oil palm populations, Deli Dura, AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania and La Me. The results showed that male parent oil palm, La Me have the most genetically differentiation from other male and female parent populations, followed by Calabar, Nigeria, Tanzania and Ghana. Among male parent oil palms, AVROS has the most genetic similarity to female parent, Deli Dura followed by DAMI. In addition, the new SSR markers were reselected for investigating the genetic 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 mEgCIR 3428, mEgCIR 3519 and mEgCIR 0874, 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 included 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 populations were discovered as follow, SNP_{ENGC} (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 determining oil palm shell type accurately and rapidly with real-time PCR as well as primer for general PCR. These markers are very applicable for quality control of Tenera oil palm seedling production for reducing or eliminating Dura contamination, and distinguishing the female and male parent genotype efficiently.

----

1 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ 2 ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

ชื่อการทดลอง - การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค SSLP

- การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันระดับดีเอ็นเอ 01-09-54-01-02-00-04

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ได้ทำการคัดเลือก SSR Markers 13 ตำแหน่ง ที่สามารถให้ความแตกต่างของประชากรปาล์มน้ำมัน 10 กลุ่มพันธุ์คือ Deli Dura, AVROS,Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me พบว่ากลุ่มพันธุ์พ่อที่มีความแตกต่างจากกลุ่มพันธุ์แม่และพ่ออื่นๆมากที่สุดคือ La Me รองลงมาได้แก่ Calabar, Nigeria, Tanzania และ Ghana กลุ่มพันธุ์ AVROS มีพันธุกรรมคล้ายพันธุ์แม่ Deli Dura มากที่สุด รองลงมาคือ DAMI นอกจากนั้น ได้ศึกษาพันธุกรรมของประชากร Deli Dura และลูกผสมต่างสปีชีส์ของ *Elaeis guineensis* กับ *E.oleifera* โดยใช้ SSR Markers 32 ตำแหน่งเพิ่มเติม ข้อมูลที่ได้สามารถใช้จำแนกกลุ่มพันธุ์ทั้งหมดออกจากกันได้ และพบว่าไพรเมอร์ mEgCIR 3428, mEgCIR 3519 และ mEgCIR 0874 เพียงพอที่จะใช้จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1-8 ได้ สำหรับการวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมัน ทำการอ่านและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MADS-box ทั้งชนิดดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอราของ 10 กลุ่มพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น จำนวน 129 ตัวอย่าง พบสนิปส์ที่สามารถแยกชนิดของปาล์มน้ำมันได้ คือ SNP_{ENGC} (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 ที่พบ ได้พัฒนาไพรเมอร์และโพรบจำนวน 4 ชุด สำหรับตรวจสอบชนิดของปาล์มน้ำมันได้แม่นยำและรวดเร็ว ด้วยเครื่อง Real-time PCR และพัฒนาไพรเมอร์ที่ใช้กับเครื่อง PCR ทั่วไป เพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจควบคุมคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมันและคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำนำ

อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มมีอัตราการขยายตัวที่ค่อนข้างสูงโดยมีการเพิ่มปริมาณของพื้นที่การปลูกปาล์มน้ำมันจาก 69,625 ไร่ในปี 2520 เป็น 4.5 ล้านไร่ ให้ผลผลิต 12.37 ล้านตันในปี 2556 และทางรัฐบาลได้มีการวางเป้าหมายในการขยายพื้นที่การปลูกให้ได้ 10 ล้านไร่ ภายในปี 2572 เพื่อให้ได้ผลปาล์ม 25 ล้านตันหรือน้ำมันปาล์มดิบ 4.5 ล้านตัน ทั้งนี้ ปาล์มน้ำมันมีส่วนแบ่งทางการผลิตสูงสุดถึงร้อยละ 73 ของอุตสาหกรรมน้ำมันพืชของไทย (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556)

การวิเคราะห์ผลผลิตปาล์มน้ำมันของไทยต่อไร่ ต่อปี พบว่าผลผลิตปาล์มน้ำมันค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับผลผลิตของประเทศมาเลเซีย ดังนั้น การปรับปรุงพัฒนาสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้มีผลผลิตสูง โดยใช้ต้นกล้าพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ดีได้มาตรฐานที่สามารถระบุประสิทธิภาพของการผลิตน้ำมัน รวมถึงการจำแนกพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน จึงเป็นเรื่องสำคัญระดับต้นในการเพิ่มผลผลิต การแบ่งชนิดของปาล์มน้ำมันออกเป็นกลุ่มตามลักษณะของผลสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ซึ่งเป็นผลมาจากยีนควบคุมความหนาของกะลา (*SHELL* gene) 1 คู่ ดังนี้คือ

ดูรา (Dura) มียีนควบคุมลักษณะเด่น (homozygous dominance, Sh^+Sh^+) ลักษณะผลมีกะลาหนา 2 – 8 มิลลิเมตร ไม่มีวงเส้นประสีดำอยู่รอบกะลา มีชั้นเปลือกนอกบาง 35–60% ของน้ำหนักผล

พิสิเฟอรา (Pisifera) ยีนควบคุมลักษณะผลแบบนี้เป็นลักษณะด้อย (homozygous recessive, Sh^-Sh^-) ลักษณะผลไม่มีกะลา มีข้อเสีย คือ ช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมัน (abortion) ทำให้ผลฝ่อลีบ ทะลายเล็ก เนื่องจากผลไม่พัฒนา ผลผลิตทะลายต่ำมาก ไม่ใช้ปลูกเป็นการค้า

เทเนอรา (Tenera) เป็นพันธุ์ทาง (heterozygous, Sh^+Sh^-) เกิดจากการผสมข้ามระหว่างดูราและพิสิเฟอรา ลักษณะผลมีกะลาบาง ตั้งแต่ 0.5– 4 มิลลิเมตร มีวงเส้นประสีดำอยู่รอบกะลา มีชั้นเปลือกนอกมาก 60-90% ของน้ำหนักผล ปาล์มน้ำมันชนิดเทเนอรา เป็นปาล์มที่ใช้ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันที่สูงกว่าชนิดอื่น (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

เนื่องด้วยรัฐบาลไทยมีเป้าหมายที่จะขยายพื้นที่ปลูกให้ได้ 10 ล้านไร่ ภายในปี 2572 ดังนั้น ความต้องการต้นกล้าปาล์มพันธุ์ดีสำหรับปลูกใหม่และทดแทนต้นปาล์มที่มีอายุมากจึงได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้มีผู้นำกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้มาตรฐาน หรือเก็บจากโคนต้นไปขายให้เกษตรกร ซึ่งมีการปะปนของต้นปาล์มชนิดดูราและพิสิเฟอรา กว่าเกษตรกรจะทราบว่าพันธุ์ปาล์มที่ปลูกไม่ได้มาตรฐานให้ผลผลิตต่ำ ก็ต่อเมื่อปาล์มน้ำมันที่ปลูกใช้เวลาผ่านไปนาน 2-3 ปี จนกระทั่งติดผล ทำให้เกษตรกรได้ผลผลิตต่ำและต้องเสียเวลาปลูกทดแทนใหม่ ในระยะที่ผ่านมา กรมวิชาการเกษตรได้แก้ไขปัญหาข้างต้น โดยการออกประกาศกรมฯ จดทะเบียนผู้ผลิตและจำหน่ายต้นกล้าปาล์มน้ำมันเพื่อสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ในกรณีเกิดปัญหาเกษตรกรซื้อต้นกล้าปาล์มไม่ได้มาตรฐานมาปลูก ดังนั้น การพัฒนาเทคนิคตรวจสอบความตรงตามพันธุ์และชนิดของปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้า จึงเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อช่วยในการควบคุมคุณภาพของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นไม้ยืนต้นมีอายุยืน การปรับปรุงพันธุ์จึงทำได้ช้ามาก ในแต่ละรอบของการปรับปรุงพันธุ์ต้องใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 10 – 12 ปี การนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้จึงสามารถลดระยะเวลาในการคัดเลือกพันธุ์แล้ว และยังสามารถช่วยในการศึกษาและจำแนกความแตกต่างหรือความหลากหลายของประชากรที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ด้วย งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันที่รวบรวมไว้ในศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของประชากรเหล่านี้รวมทั้งจำแนกประชากรพ่อพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ ตลอดจนการหาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมันชนิดดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา

อุปกรณ์และวิธีการ

I. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

1. การคัดเลือก SSR primer ในการจำแนกและวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุ์ปาล์มน้ำมัน มีขั้นตอน ดังนี้

1.1 สกัดดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน 36 ตัวอย่าง โดยการสุ่มเลือกจากประชากรปาล์มน้ำมัน 10 กลุ่ม (กลุ่ม Deli Dura ที่ใช้พันธุ์แม่ 9 ตัวอย่าง นอกนั้นเป็นเชื้อพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อ 9 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการของ Agrawal *et al.* (1992) ซึ่งมีการดัดแปลงเล็กน้อยโดยหทัยรัตน์และคณะ (2548) ดังนี้ นำตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน 2 กรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดด้วยโกร่งให้ละเอียดพร้อมกับไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างที่บดแล้วใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์สกัด (Extraction buffer) (2xCTAB; 2% (w/v) Cethyl trimethyl ammonium bromide, 1.4 M NaCl, 50 mM Na_2 EDTA, 100 mM Tris-Hcl (PH8.0) และ 2 มิลลิลิตร 2-mercaptoethanol) ปริมาณ 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที โดยเขย่าหลอดทุก 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 700 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในหลอดโดยวิธีกลับหลอดไปมา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน 500 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตท(sodium acetate) 50ไมโครลิตร และโอโซ โพรพานอล (isopropanol) 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำการล้างตะกอน 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (1 mM Na_2 EDTA 10 m M Tris-Hcl pH 8.0) จำนวน 50 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่ได้นำมาวัดความเข้มข้นโดยเครื่อง Spectrophotometer แล้วแบ่งดีเอ็นเอออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกทำการเจือจางสำหรับทำการขยายยีนในหลอดทดลอง ส่วนที่สองนำไป เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไปใช้งานต่อไป

1.2 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์หรือการขยายยีนในหลอดทดลองนำ SSR primer ที่ CIRAD ได้พัฒนาขึ้น 100 คู่ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้ดีเอ็นเอ ในข้อ 1.1 เข้มข้น 60 ng เป็นแม่พิมพ์ ซึ่งมีองค์ประกอบและสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้คือ Tris – HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, gelatin 0.01%, dNTP 1.6 mm ใช้ไพรเมอร์ แต่ละตัว (forward และ Reverse) เข้มข้น 0.25 mM ใช้ Tag DNA polymerase 0.5 unit ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ul ด้วยเครื่อง thermal cycle Gene Amp 9700 โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 95^{0}C 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94^{0}C 30 วินาที 55 ^{0}C 30 วินาที 72^{0}C 30 วินาที 35 รอบ และ 72^{0}C 7 นาที 1 รอบ

1.3 การวิเคราะห์ผลิตผลพีซีอาร์ นำผลิตผลพีซีอาร์ในข้อ 1.2 จำนวน 1 µlไปแยกขนาดด้วยเครื่อง ABI prism 310 และ 377 วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Genescan และ Genotyper ตามเอกสารแนะนำการใช้คู่มือของบริษัทที่ผลิตเครื่องมือ (Anonymous, 1997) เลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ชัดเจนและมี allele ที่แตกต่างกัน (polymorphic)

2. จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

2.1 สกัดดีเอ็นเอ (ตามวิธีการในข้อ1.1) ของประชากรปาล์มน้ำมันที่ปลูกรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมัน สุราษฎร์ธานี รวม 471 พันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย

2.1.1 ประชากรปาล์มน้ำมัน *Elaeis guineensis* รวม 471 ตัวอย่างพันธุ์ ประกอบด้วย

- ประชากรที่ใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ Deli Dura จำนวน 246 ตัวอย่าง
- กลุ่มประชากรที่ใช้เป็นต้นพ่อพันธุ์ พิสิเฟอรา, DAMI, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Tanzania, Calabar และ Yangambi รวม 151 ตัวอย่าง
- กลุ่มประชากรลูกผสม เทเนอรา (Tenera) ที่กรมวิชาการเกษตรแนะนำให้เกษตรกรปลูกเป็นการค้า ได้แก่ พันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 - 8 จำนวน 74 ตัวอย่าง

2.1.2 ประชากรปาล์มน้ำมัน *Elaeis oleifera* และลูกผสม ระหว่าง *E.guineensis x E.oleifera* จำนวน 182 ตัวอย่างพันธุ์

2.2 การขยายยีนในหลอดทดลอง

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1 เจือจางให้มีความเข้มข้น 100 ng/ul ใช้เป็นแม่พิมพ์ในการขยายยีนในหลอดทดลองใช้ไพรเมอร์ ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ที่ปลาย 5' นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการในหลอดทดลอง โดยมีองค์ประกอบและสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับข้อ 1.2 จากนั้นแยกขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 หรือ 377 Genetic for Analyzer วิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Genotyper วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันโดยการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (Cluster Analysis) และสร้าง Dendrogram หรือ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม SPSS Version 16

II. การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน

การศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับในเบสจีโนมิคดีเอ็นเอ บริเวณเป้าหมายที่เกิดการกลายพันธุ์แบบแทนที่ (Substitution) เพียงหนึ่งตำแหน่ง โดยใช้พันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้งสามชนิด คือ พันธุ์แม่ชนิดดูรา พันธุ์พ่อชนิดพิสิเฟอรา และพันธุ์ลูกผสมชนิดเทเนอราของ 10 กลุ่มพันธุกรรมคือ Deli Dura , DAMI, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Tanzania, Yangambi AVROS และ Calabar จำนวน 129 ตัวอย่างพันธุ์ ทำการสกัดดีเอ็นเอของใบปาล์ม ตามวิธี ในข้อ 1.1 ซึ่งดัดแปลงจาก Agrawal *et al.* (1992)

2.1 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ขยายยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมัน

จากการรายงานของ Rajinder Singh *et al.* (2013) พบว่ายีนที่ควบคุมกะลาของปาล์มน้ำมันมีความคล้ายคลึงกัน (homologous) กับยีน seedstick ที่จัดอยู่ในกลุ่มยีน MADS-box จึงได้ใช้ไพรเมอร์ในบริเวณอนุรักษ์ของยีนนี้(Conserved region) ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอบริเวณนี้ของปาล์มน้ำมันทุกพันธุ์ได้ ไปขยายยีน (amplified) บริเวณ MADS-box ของปาล์มน้ำมันทั้ง 129 ตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอไว้แล้ว โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 20 ul ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมัน 40 ng/ul จำนวน 2 ul , 10x PCR buffer 2 ul , 4 mM dNTPs 2 ul , 50 mM $MgCl_2$ 0.6 ul , 5 Unit/ul *Tag* DNA polymerase , (Bioline ,USA) 0.2 ul , 5 mM ของคู่ไพรเมอร์ อย่างละ 0.5 ul ปรับน้ำกลั่นให้ได้ 20 ul และตั้งสภาวะการทำงานของเครื่อง พีซีอาร์ ดังนี้ 95 °C 7 นาที 1 รอบ 94 °C 30 วินาที 55 °C 30 วินาที และ 72 °C 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที อีกรอบ 1 รอบ นำผลผลิตของพีซีอาร์ที่ได้แยกด้วยอิเล็กโตรโพรีซีส โดยใช้ low melting temperature agarose 1.2 เปอร์เซ็นต์ ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Star® (Cambrex Bio science, USA) นำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง Gel Documentation ตัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้น ทำการแยกดีเอ็นเอเป้าหมาย ออกจาก Agarose โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN , Germany)

2.2 การอ่านลำดับดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) ของยีน MADS-box

ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ในข้อ 2.1 นำไปทำการอ่านลำดับพันธุกรรมหรือลำดับเบส 2 ครั้งต่อแถบดีเอ็นเอ โดยอ่านลำดับเบสในทิศทาง Forward Primer และ Reverse Primer เพื่อยืนยันผลและได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง โดยใช้เครื่อง ABI for Genetic Analyzer 377 และ 310

2.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างดีเอ็นเอมากกว่า 2 เส้น (Multiple Sequence Alignment) นำลำดับพันธุกรรมที่เป็นนิวคลีโอไทด์ของยีน MADS-box ที่อ่านได้ในข้อ 2.2 มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์(เบส) โดยใช้โปรแกรม Clustal W2 โดยเปรียบเทียบทีละกลุ่มพันธุ์ เมื่อพบตำแหน่งของเบสตั้งแต่หนึ่งตัวขึ้นไปมีการเปลี่ยนแปลง (mutation) ในแต่ละชนิดของปาล์มน้ำมัน ทำการตรวจสอบจุดนั้นๆ เพื่อยืนยันซ้ำ โดยดูจากกราฟของลำดับนิวคลีโอไทด์ (electropherogram) อีกครั้งหนึ่ง เมื่อพบตำแหน่งสนิปส์ แล้วนำข้อมูลของสนิปส์และนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไป มาออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

III การตรวจสนิปส์เพื่อวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมัน ด้วยเครื่อง Real Time PCR

3.1 การออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจสนิปส์

การออกแบบไพรเมอร์และโพรบ ใช้โปรแกรมของ TagMan probe and primer chemistry and design ของ Applied Biosystems ซึ่งแต่ละตำแหน่งของสนิปส์จะออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ ขนาบข้างสนิปส์นั้นและออกแบบโพรบที่มีความยาว 13 คู่เบส 2 เส้น ที่เป็นคู่สมกันกับบริเวณ

รอบๆสนิปส์ (ยกเว้นตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เป็นสนิปส์) โพรบเส้นแรกติดฉลาก ด้วยฟลูออเรสเซนต์สี VIC ที่ปลาย 5’ ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งสนิปส์เหมือนลำดับเบสของปาล์มน้ำมันต้นแม่ ดูรา และปลาย 3’ ของโพรบติดฉลากด้วย Quencher และ Minor Groove Binder (MGB) สำหรับโพรบอีกเส้นหนึ่งจะคล้ายโพรบตัวแรก แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งสนิปส์ จะเหมือนกับลำดับเบสของต้นพ่อพิสิเฟอรา และติดฉลากที่ปลาย 5’ เป็นสี FAM ที่ต่างจากสีโพรบตัวแรก ทำการสั่งโพรบและไพรเมอร์จากบริษัท Applied Biosystems สหรัฐอเมริกา ในการตรวจโดยเครื่อง Real time PCR หากนำดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ดูรามาตรวจโพรบที่ตำแหน่งสนิปส์เหมือนต้นแม่ดูราเท่านั้นที่จะจับกับดีเอ็นเอของดูราได้ เมื่อมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ สี VIC ทางปลาย 5’ จะถูกตัด (Hydrolysis) ออกห่างจาก Quencher ที่อยู่ปลาย 3’ของโพรบ ทำให้ปรากฏเส้นกราฟสีเหลืองของ VIC เพิ่มขึ้นตามจำนวนก็อปปี้ของสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่ และตามจำนวนรอบของพีซีอาร์ที่เพิ่มขึ้น ถ้าตรวจดีเอ็นเอของพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา ต้องให้ผลเป็นกราฟ 2 เส้นทั้งของพันธุ์แม่และพ่อ

3.2 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

นำดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันชนิดต่างๆ ทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB จากข้อ 2.1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจวิเคราะห์สนิปส์บนเครื่อง Real time PCR ด้วยไพรเมอร์ และ TagMan® MGB probes ที่ออกแบบไว้ในข้อ 3.1 โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้ 2x Tag Man® Genotyping master mix 5 ไมโครลิตร 20x Assay primer and probe 0.25 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมัน 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นสำหรับพีซีอาร์ 3.7ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง StepOnePlus™ Real time PCR (Applied Biosystems®, USA) โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้ 95 °C 30 วินาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 °C 20 วินาที และ60 °C 60 วินาที จำนวน 50 รอบ ค่าของสีฟลูออเรสเซนต์ จะถูกบันทึกไว้ตามจำนวนรอบที่ทำพีซีอาร์ การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งสนิปส์ จะสร้าง Allelic Discrimination ของตัวอย่างด้วยโปรแกรม StepOne ™ V 2.3 ซึ่ง allele ของพันธุ์แม่ชนิดดูรา จะอยู่ที่แกน X และ Allele ของพันธุ์พ่อชนิด พิสิเฟอรา จะอยู่แกน Y ลูกผสมจะอยู่กึ่งกลางระหว่างแกนทั้งสอง พันธุ์ปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีที่นำมาตรวจวิเคราะห์ครั้งนี้ ทราบกลุ่มพันธุ์และชนิดของปาล์มแล้ว การตรวจสนิปส์ครั้งนี้จึงถือเป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบของสนิปส์ตำแหน่งต่างๆ ด้วย

3.3 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันเอกชน

ได้ทำการเก็บตัวอย่างพันธุ์ปาล์มน้ำมันของบริษัทเอกชน ซึ่งปลูกที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี ของบริษัท อาร์ แอนด์ ดี เกษตรพัฒนา บริษัท โกลเด้น เทเนอรา บริษัท ยูนิวานิช น้ำมันปาล์ม จำกัด และบริษัท ทักษิณปาล์ม จำกัด จำนวน 60 ตัวอย่าง นำใบมาสกัด ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี

CTAB ตามข้อ 1.1 ตรวจชนิดของปาล์มน้ำมัน โดยใช้วิธีเดียวกันข้อ 3.2 แต่เลือกใช้ไพรเมอร์และโพรบตามตำแหน่งสนิปส์ที่ตรวจสอบได้จากประวัติพันธุ์ของแต่ละบริษัท และทดลองใช้ไพรเมอร์และโพรบตำแหน่งอื่น ๆ ลองตรวจดูด้วย

IV การพัฒนาวิธีการตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันให้รวดเร็วขึ้น

ใบปาล์มน้ำมันที่โตเต็มที่แล้วการบดให้ละเอียดค่อนข้างยาก ต้องเสียเวลาบดและใช้แรงงานในขั้นตอนนี้มาก จึงจะได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพดี เพื่อให้การตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น จึงได้นำชุดสกัดสำเร็จรูปมาใช้ร่วมกับเทคนิค Nested PCR ดังวิธีการต่อไปนี้

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ ตัดปลายใบปาล์มน้ำมันให้มีขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร ใส่ในถุงพลาสติก เติมน้ำกลั่นผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 300 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ค้อนหรือด้ามกรรไกรขูดใบปาล์มจากภายนอกถุงจนได้น้ำสีเขียว ดูดน้ำสีเขียวนี้ 2 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรที่ใส่ Dilution buffer (Phire Plant Direct PCR Kit ; Thermo Scientific)ไว้ 18 ไมโครลิตร ผสมของเหลวให้เข้ากันแล้วนำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอดใหม่ หรือ เก็บไว้ในหลอดเดิมโดยไม่ให้ขุ่น สำหรับใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ต่อไป

4.2 การทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ใช้เทคนิค Nested PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ MADS – box โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ของยีนนี้คือ 5'-TTGCTTTTAATTTTGCTTGAATACC-3' และ 5'-TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC-3' โดยมีปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ คือ ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ 2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ ในข้อ 4.1 จำนวน 1 ไมโครลิตร เติม Master Mix ในชุด Phire Plant Direct PCR Kit ให้ครบ 20 ไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง พีซีอาร์ Gene Amp 9700 โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้ 98 °C 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 98 °C 5 วินาที 58 °C 30 วินาที ที่ 72 °C 20 วินาที จำนวน 25, 30 ,35 และ 40 รอบ และ 72 °C 1 นาที 1 รอบ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เช่นนี้อีก แต่เพิ่มรอบการขยายยีนเป็น 30,35 และ40 รอบตามลำดับ

4.3 การตรวจวิเคราะห์สนิปส์แยกชนิดของปาล์มน้ำมัน ด้วย Real time PCR

นำผลผลิตจาก Nested PCR ข้อ 4.2 มาเจือจาง 500 เท่า (ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ผสมน้ำสำหรับทำพีซีอาร์ 499 ไมโครลิตร) จากนั้นเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์เช่นเดียวกับ ข้อ 3.1 โดยใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางไว้ 1 ไมโครลิตร เป็นแม่พิมพ์ องค์ประกอบของปฏิกิริยาและการตั้งเครื่อง ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.2

V การพัฒนาวิธีตรวจสนิปส์เพื่อแยกชนิดของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่อง PCR ทั่วไป

ออกแบบไพรเมอร์ชนิด allele specific PCR Primer สำหรับตรวจวิเคราะห์สนิปส์ 4 ตำแหน่ง คือ SNP_{DA}, SNP_{ENGC}, SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAV} โดยการออกแบบ Forward Primer ตัวสุดท้าย

ทางปลาย 3' เป็นตำแหน่งสนิปส์และเปลี่ยนอีก 2 ตำแหน่งถัดมา ให้จับกับพันธุ์ที่เป็นชนิดดูรา ออกแบบไพรเมอร์ 3 เส้นลักษณะเดียวกัน แต่ทำการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ใหม่ของไพรเมอร์ 3 ตัวสุดท้ายทางปลาย 3' ให้จับกันกับตำแหน่งสนิปส์ของปาล์มน้ำมันชนิดพิสิเฟอราอีก 3 เส้น ทำเช่นนี้ทุกตำแหน่งรวมออกแบบและสังเคราะห์ Forward primer 24 เส้น สำหรับ reverse primer ทำการออกแบบไว้คนละตำแหน่งโดยให้ผลผลิตของพีซีอาร์ของชนิดดูรา สั้นกว่าของชนิดพิสิเฟอรา เพื่อที่จะได้ตรวจสอบเทเนอราได้ง่ายขึ้น โดยใช้ agarose gel electrophoresis ทั่วไป

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

I การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

1. การคัดเลือก SSR primer ในการจำแนกและวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากการสุ่มเลือกปาล์มน้ำมัน 36 ตัวอย่าง จากประชากรที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ (Deli Dura) และประชากรที่เป็นพ่อพันธุ์ (Pisifera) มาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ ที่เหมาะสมในการใช้ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน พบว่ามีไพรเมอร์ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในกลุ่มต่าง ๆ นี้มีเป็นจำนวนมาก จึงทำการคัดเลือก primer ที่ดีที่สุดไว้ 13 คู่ ได้แก่ mEgCIR 0074, mEgCIR 0173, mEgCIR 0804, mEgCIR 3428, mEgCIR 3641, mEgCIR 3643, mEgCIR 3698, mEgCIR 0874, mEgCIR 2215, mEgCIR 2577,mEgCIR3519,mEgCIR 3593 และmEgCIR 3755 เกณฑ์การคัดเลือกโดยดูจากจำนวน alleles หรือแถบดีเอ็นเอ ที่พบมากกว่าในการปฏิกิริยาขยายยีนในหลอดทดลอง (พีซีอาร์) ซึ่งที่พบมีตั้งแต่ 2 ถึง11 แถบ หรือ alleles

2. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน

ผลการใช้ไพรเมอร์ ที่คัดเลือกไว้ 13 คู่ จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากรปาล์มน้ำมันที่เป็น พ่อและแม่พันธุ์ในการผลิตปาล์มน้ำมันลูกผสม 471 ต้น ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ทำให้ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 6,123 ข้อมูล ในจำนวนนี้มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากร Deli Dura ที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ 246 ต้น ประชากรที่ใช้เป็นต้นพ่อ (Pisifera) กลุ่มต่าง ๆ 151 ต้น และกลุ่มประชากรเทเนอรา (Tenera) ที่ส่งเสริมให้ปลูกเป็นการค้า (สุราษฎร์ธานี 1 -8) 74 ต้น พบว่าในจำนวนไพรเมอร์ 13 คู่ที่ใช้ ให้ alleles หรือ แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันถึง 95 แถบ โดยที่แต่ละไพรเมอร์ให้ alleles ที่ต่างกันหรือมีความผันแปรตั้งแต่ 5 – 11 แถบ หรืออาจกล่าวว่าโดยเฉลี่ยแต่ละไพรเมอร์ให้ alleles ที่ต่างกันถึง 7 แบบ โดยที่ไพรเมอร์ mEgCIR0874 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันมากสุดถึง 11 แบบ ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 215, 217, 221 231 235 237 239, 247, 249, 255 และ 257 คู่เบส รองลงมาคือไพรเมอร์ mEgCIR0804 และ mEgCIR2215 ที่ให้แถบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันถึง 10 และ 9 แถบ ตามลำดับ ขณะที่ไพรเมอร์ mEgCIR3698 ให้ alleles หรือแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันน้อยสุดเพียง 5 แถบ คือ ขนาด 164, 166, 172 174 และ 182 คู่เบส เป็นที่น่าสังเกตว่าไพรเมอร์ เกือบทั้งหมดให้ขนาดของ alleles ที่ต่างกันเพียง 2 คู่เบสเท่านั้น เช่นไพรเมอร์

mEgCIR0074 ให้ alleles ที่ต่างกัน 7 แบบ ที่มีขนาดความยาวตั้งแต่ 118, 120, 122, 124, 126, 128 และ 130 คู่เบส การที่ alleles ส่วนใหญ่มีความยาวต่างกันเพียง 2 คู่เบส ทำให้ผู้ที่จะนำไพรเมอร์นี้ไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ต้องระมัดระวังในการอ่านค่า มิเช่นนั้นจะผิดพลาดได้ง่าย สำหรับขนาดและจำนวน alleles ที่พบในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ครั้งนี้แสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2 ซึ่งจะพบว่าแต่ละตำแหน่งของไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มี heterozygosity ต่ำ หรือหมายความว่าตำแหน่งเหล่านี้ขนาดของ alleles พ่อกับแม่เท่ากัน (homozygous) เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นไพรเมอร์ mEgCIR0173 และ mEgCIR0804 สำหรับตารางที่ 3 เป็นตารางสรุปขนาดและจำนวนแถบดีเอ็นเอของ primer mEgCIR0074 จะพบว่า ประชากรที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์เฉพาะกลุ่ม Tanzania มีแถบดีเอ็นเอที่พบในปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้เพียง 1 แถบคือ ขนาด 122 คู่เบส ขณะที่แม่พันธุ์ที่เป็น Deli Dura ให้แถบดีเอ็นเอเดียวเช่นกัน คือ ขนาด 120 คู่เบส ซึ่งอาจใช้เป็นแถบเอกลักษณ์ของคู่ผสมนี้ จากตารางที่ 3 เมื่อดูความแตกต่างภายในประชากรแต่ละกลุ่ม จะพบว่า primer ทั้ง 13 คู่นี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของประชากร Deli Dura ได้เลย ยกเว้นไพรเมอร์ mEgCIR0804 ที่มี alleles ต่างกัน 195 และ 201 คู่เบส ประชากรกลุ่มอื่นที่มีความผันแปรน้อยภายในกลุ่ม ได้แก่ ประชากร Calabar, Tanzania และ Yangambi นอกนั้นมีความผันแปรภายในประชากรค่อนข้างสูง ดังเช่น ประชากร AVROS เมื่อทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย primer mEgCIR2215 ให้แถบดีเอ็นเอต่างกันถึง 4 แถบ คือ 100, 118, 120 และ 124 โดยในแต่ละแถบยังมีการกระจายตัวคือส่วนหนึ่งมีแถบ และอีกส่วนหนึ่งไม่มีแถบ ฉะนั้น การใช้ไพรเมอร์ร่วมกันหลายๆ ไพรเมอร์ จะสามารถทำให้จำแนกกลุ่มพันธุ์ของปาล์มน้ำมันได้ อย่างไรก็ตามเมื่อนำพ่อและแม่ของสุราษฎร์ธานี 1 – 8 มาตรวจสอบ alleles จากตารางที่ 3 พบว่าใช้ไพรเมอร์อย่างน้อย 3 คู่ คือ mEgCIR3428, mEgCIR3519 และ mEgCIR0874 เพียงพอที่จะจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน สุราษฎร์ธานี 1 – 8 ได้ สำหรับในกรณีที่มีความผันแปรภายในประชากรแต่ละพันธุ์อาจต้องใช้ไพรเมอร์อื่นร่วมด้วย คือ primer mEgCIR0804, mEgCIR3643 และ mEgCIR3593 แต่เนื่องจาก mEgCIR3519 และ mEgCIR0874 ได้ขนาดของ alleles ใกล้เคียงกัน จึงอาจต้องมีการออกแบบปรับเปลี่ยนขนาดของ alleles ใหม่ ข้อมูลจากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอครั้งนี้ถูกเก็บไว้ในโปรแกรมเอกซ์เซล โดยเก็บในรูปขนาดความยาวและจำนวน alleles แต่ข้อมูลในรูปเอกซ์เซลนี้จะมีความยุ่งยากในการสืบค้นข้อมูล จึงได้พัฒนาระบบฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันขึ้น เพื่อรองรับการสืบค้น แก้ไข หรือเพิ่มเติมข้อมูล เช่น พันธุ์ใหม่ๆ และไพรเมอร์ที่เพิ่มขึ้น หรือเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ได้ นอกจากนั้นยังนำข้อมูลนี้ไปศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้ โดยการนำไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม แล้วนำไปเขียน Phylogenetic tree หรือ dendrogram ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าสามารถแบ่งประชากรปาล์มน้ำมันออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม A และ B ซึ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากกว่า 90% จะเห็นว่าในกลุ่ม A ประกอบด้วยพันธุกรรมของประชากร La Me

ซึ่งความแตกต่างภายในประชากรขึ้นกับคู่ผสม คือ IRH 618 : 158T self กับ IRH618 : 26T self สำหรับกลุ่ม B

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) from 246, 151 and 74 plants, respectively. The samples were amplified with 13 SSR primers.

No.	Primer	ขนาดของ alleles (Base pair)	จำนวน alleles ที่พบ	Heterozygous
1	mEgCIR0074	118, 120, 122, 124, 126, 128 และ 130	7	0.13
2	mEgCIR0173	112, 114, 118, 134 และ 140	5	0.90
3	mEgCIR0804	191, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209 และ 211	10	0.90
4	mEgCIR3428	157, 159, 165, 167, 169, 171 และ 181	7	0.11
5	mEgCIR3641	167, 171, 175, 183, 185, 187 และ 197	7	0.26
6	mEgCIR3643	134, 136, 144, 146, 148 และ 154	6	0.16
7	mEgCIR3698	164, 166, 172, 174 และ 182	5	0.10
8	mEgCIR0874	215, 217, 221, 231, 235, 237, 239, 247, 249, 255 และ 257	11	0.14
9	mEgCIR2215	100, 112, 114, 116, 118, 120, 124, 128 และ 130	9	0.25
10	mEgCIR2577	71, 87, 89, 93, 103, 105 และ 107	7	0.26
11	mEgCIR3519	216, 222, 232, 234, 240, 242 และ 250	7	0.23
12	mEgCIR3593	146, 152, 154, 162, 168, 172 และ 174	7	0.50
13	mEgCIR3755	230, 238, 246, 250, 256, 258 และ 262	7	0.19
		รวม	95	

Table 2 Size and number of alleles per locus and actual heterozygosity of 96 plants from Deli Dura female parent. The breeding materials were collected in the area of Surat Thani oil palm Research Center. The data were derived by 19 SSR primers.

No.	Primer	ขนาดของ alleles (Base pair)	จำนวน alleles ที่พบ	Heterozygous
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	0.5
		รวม	44	

Table 3 Summary of alleles size and allele numbers obtained form 471 oil palm samples in 10 populations type. The samples were amplified with 13 SSR primers.

Primer	Alleles size (Base pair)	พันธุ์แม่	พันธุ์พ่อ								
		Deli Dura	Avros	Carabar	Dami T	Ekona	Ghana	La Me	Nigeria	Tansania	Yangambi
mEgCIR0074	118	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	120	+	+/-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
	122	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	124	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-	+
	126	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
	128	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	130	-	-	+	-	-	-	-	+/-	-	-
mEgCIR0173	112	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
	114	+	+/-	-	+	+	-	-	-	-	+
	118	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	134	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	140	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
mEgCIR0804	191	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
	195	+/-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-
	197	-	-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	-
	199	-	+/-	+	-	-	-	+/-	+/-	-	-
	201	+	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-
	203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	205	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
	207	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
	209	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	211	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
mEgCIR3428	157	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	159	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
	165	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
	167	-	-	-	-	-	+	-	+/-	-	-
	169	+	+/-	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+	-
	171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
	181	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
mEgCIR3641	167	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
	171	-	-	+	-	-	-	-	+/-	+/-	-
	175	-	+/-	-	-	+/-	+	-	-	-	+/-
	183	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
	185	+	+/-	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	-
	187	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	197	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-	+/-	+/-
mEgCIR3643	134	-	+/-	+	-	+/-	+	+/-	+/-	-	-
	136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	144	+	+/-	-	+	+/-	-	-	-	+	-
	146	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	148	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
	154	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
mEgCIR3698	164	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
	166	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	172	+	+/-	-	+/-	+	-	+/-	-	-	+
	174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	182	-	+/-	-	+/-	-	-	+/-	-	+	-
mEgCIR0874	215	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	217	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	221	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	231	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	235	+	+/-	+	+/-	-	-	-	-	-	-
	237	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	239	-	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
	247	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
	249	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	255	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	257	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
mEgCIR2215	100	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	+	-
	112	-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	+
	114	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-
	116	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	118	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	+/-	-
	120	-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-
	124	+	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
	128	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
	130	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-
mEgCIR2577	71	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	87	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	89	+	+/-	-	+	+/-	-	+	+/-	-	-
	93	+	+/-	+	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-
	103	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	105	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
	107	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mEgCIR3519	216	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
	222	-	+/-	+	+/-	+/-	-	-	+	-	+
	232	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	234	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
	240	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	242	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	250	+	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-
mEgCIR3593	146	-	-	+	-	+/-	-	-	+	-	+
	152	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	154	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	162	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	168	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	172	+	+/-	-	+	+/-	-	-	-	-	-
	174	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
mEgCIR3755	230	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	238	-	+/-	+	-	+/-	-	-	+/-	-	-
	246	+	+	+	+	+/-	-	-	+/-	-	+/-
	250	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
	262	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-

หมายเหตุ + = มีแถบ (present)
- = ไม่มีแถบ (absent)

สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย C กับ D ซึ่งมีความต่างกันทางพันธุกรรม 70% ในกลุ่ม C มีประชากร Nigeria และCalabar ซึ่งมาจากคู่ผสมเดียวกันหรือพันธุกรรมใกล้กัน แต่มีชื่อต่างกัน ทั้งนี้ เนื่องมาจากถูกนำไปพัฒนาและคัดเลือกจากคนละสถานที่ คือ ที่เมือง Calabar, Aba, Ufama และ Benin ในประเทศไนจีเรีย (Rosenguist, 1985) ในกลุ่ม D ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อยที่มีพันธุกรรมระหว่างกลุ่มย่อยแตกต่างกันมากกว่า 40% โดยที่กลุ่ม E มีประชากรกลุ่ม Yangambi แยกจาก Ghana และ Nigeria ในกลุ่มย่อย F ประกอบด้วยประชากร AVROS, Tanzania และ DAMI ซึ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม 20% หรือค่อนข้างใกล้ชิดกัน กลุ่มสุดท้ายคือ กลุ่มย่อย G ที่ประกอบด้วยประชากร Ekona, AVROS (คู่ผสม HC129:933T self) และประชากร Deli Dura ที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ ก็ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย เป็นที่น่าสังเกตว่าประชากร Nigeria และ AVROS เมื่อวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มจะพบว่าถูกจัดอยู่ใน 2 กลุ่มคือ กลุ่ม C กับ G และ F กับ G ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นผลมาจากพันธุกรรมของพ่อและแม่ที่ต่างกันมาก

จากภาพที่ 1 แสดงว่าความสัมพันธ์ของประชากรปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์สำหรับผสมกันประชากรแม่พันธุ์ที่เป็น Deli Dura ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มร่วมกับประชากรพ่อ ประชากร Deli Dura จะมีความคล้ายกับประชากรในกลุ่ม AVROS มากที่สุดรองลงมาได้แก่ DAMI ฉะนั้นในการจะสร้างลูกผสมเทเนอรา ที่ได้จากการผสมต้นแม่ชนิด Deli Dura กับต้นพ่อพิสิเฟอรา ให้มีฐานพันธุกรรมที่กว้าง ต้องผสมพ่อแม่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก ๆ คือการผสม Deli Dura กับ La Me รองลงมาคือ Calabar, Nigeria, Tanzania และ Ghana จะเห็นว่าการใช้ไพรเมอร์ 13 คู่นี้ สามารถจำแนกความแตกต่างของประชากรปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นพ่อได้ดีมาก

แต่เมื่อนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอขนาดและจำนวน alleles ของประชากร Deli Dura ที่ใช้เป็นต้นแม่ 246 ต้น ข้อมูลจากตารางที่ 3 คอลัมน์ Deli Dura เกือบทุกไพรเมอร์ ให้ alleles ขนาดเดียว ยกเว้นไพรเมอร์ mEgCIR 0804 ให้ alleles ที่ต่างกัน 2 ขนาด คือ 195 และ 201 คู่เบส จะพบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของประชากรต้นแม่ได้เลย จึงได้เลือกไพรเมอร์ชุดใหม่ สำหรับแยกความแตกต่างของประชากร Deli Dura อย่างเดียว พบว่า primer 19 คู่ สามารถให้ polymorphic ของประชากร Deli Dura ได้ดีที่สุด ได้แก่ mEgCIR 0246, mEgCIR 0280, mEgCIR 0445, mEgCIR 0521, mEgCIR 2332, mEgCIR 3286, mEgCIR 3298, mEgCIR 3311, mEgCIR 3383, mEgCIR 3402, mEgCIR 3555, mEgCIR 3653, mEgCIR 3655, mEgCIR 3668, mEgCIR 3684, mEgCIR 3691, mEgCIR 3705, mEgCIR 3813 และ mEgCIR 3869 ทำการคัดเลือกประชากร Deli Dura ที่เป็นตัวแทนทั้งหมด 96 ต้น มาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่า primer ทั้งหมด 19 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอ หรือ alleles ที่มีความแตกต่างกัน 44 แบบ สอดคล้องกับรายงานของ Mayer *et al.*(2001) ที่พบว่า ในประชากร Deli Dura ตรวจพบ alleles น้อยกว่าปาล์มอื่นๆ ถึง 36 alleles แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่น้อยกว่า พบว่ามีไพรเมอร์ 6 คู่ (mEgCIR 0246, mEgCIR 0445, mEgCIR 3286, mEgCIR 3298, mEgCIR 3691 และ mEgCIR 3869) ให้ alleles ต่างกัน 3 แบบ ส่วนไพรเมอร์อื่นๆให้ alleles ที่

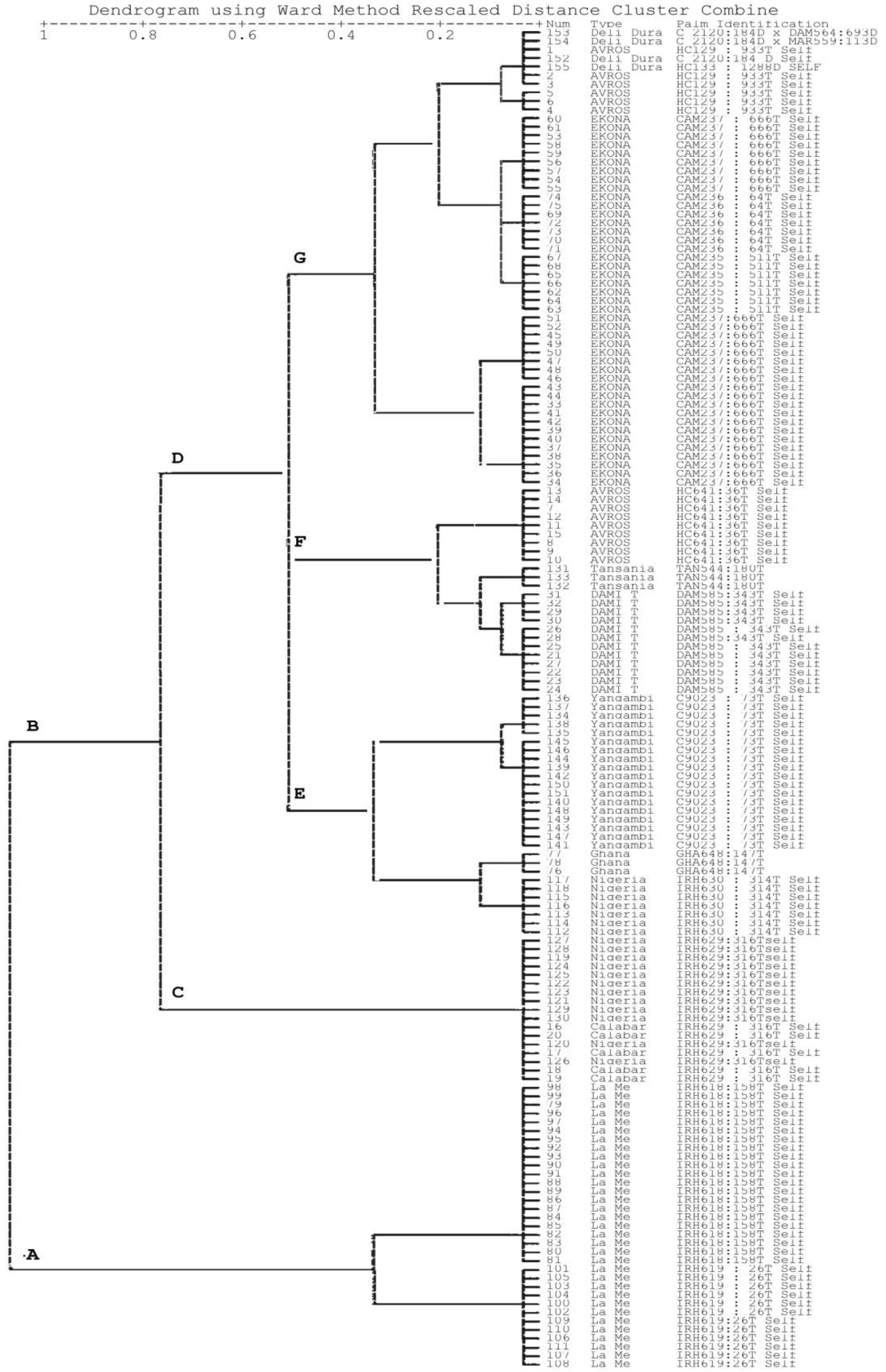

Figure 1 The genetic relationship of 151 samples from **9** distinct male parent populations included 4 samples of Deli Dura female parent, use as breeding materials. The dendrogram were generated by similarity matrix data of 13 SSR primers.

ต่างกันเพียง 2 แบบเท่านั้นและส่วนใหญ่ให้ค่า heterozygosity ค่อนข้างต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดเหล่านี้ไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มและทำ dendrogram โดยใช้โปรแกรม SPSS version 14 ดังแสดงในภาพที่ 2 จะเห็นว่า ฐานพันธุกรรมของ Deli Dura ระหว่างประชากรที่มีพ่อแม่ต่างกัน จะมีความแตกต่างกันค่อนข้างสูง และมีความแตกต่างกันน้อยภายในประชากร และไพรเมอร์ดังกล่าวนี้สามารถจำแนกประชากรปาล์มน้ำมันต้นแม่ชนิด Deli Dura ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่ม A (HC 133 : 1288 D self) และกลุ่ม B ที่ประกอบด้วยกลุ่มย่อย C (C2120 : 184D) D (C 2120 : 184D x DAM564 : 693D) และกลุ่มย่อย E (C2120 : 184D x MAR559 : 113D) สอดคล้องกับประวัติพันธุ์ของปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นแม่ชนิด Deli Dura พบว่านำมาจากแอฟริกาเมื่อปี 2391 และคัดเลือกมาจากปาล์ม 4 ต้น ที่ปลูก ณ สวนพฤกษศาสตร์ เมือง Deli ต่อมามีการผสมกับปาล์มน้ำมันกลุ่มอื่นๆเพื่อขยายฐานพันธุกรรมกว้างขึ้น

Ш การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน

จากการสกัดดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันทั้งสามชนิดคือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา จำนวน 10 กลุ่ม พันธุ์ รวม 129 ตัวอย่างพันธุ์ แล้วนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อขยายยีนในหลอดทดลองของยีน MADS – box โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ (Conserved region) พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลผลิตพีซีอาร์ชัดเจน ความยาวเท่ากันคือ 537 คู่เบส เมื่อนำผลผลิตของพีซีอาร์นี้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองทิศทาง คือ ทาง Forward primer และReverse primer แล้วนำผลที่ได้มาตรวจสอบยืนยันความถูกต้องของสาย นิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องนี้ ไปทำการเปรียบเทียบกันมากกว่า 2 สาย (Multiple sequence alignment) พบว่า บริเวณของยีน MADS – box มีตำแหน่งสนิปส์หรือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงไป 5 แห่ง คือ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 220 , 256 , 272 , 279 และ 308 ซึ่งแต่ละตำแหน่งเหล่านี้ยังสามารถบ่งชี้ชนิดของปาล์มน้ำมันในแต่กลุ่มได้ ดังนี้ คือ

1.ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 220 (SNP_{Tan}) ปาล์มน้ำมัน Deli Dura และชนิดดูราของ Tanzania มีนิวคลีโอไทด์เป็น C ขณะที่ชนิดพิสิเฟอราของ Tanzania มีนิวคลีโอไทด์เป็น G สำหรับชนิดเทเนอราของTanzania ก็จะเป็น heterozygous ที่ตำแหน่งนี้คือมีนิวคลีโอไทด์ทั้งสองแบบ

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

3. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 272 (SNP_{ENGC}) พบว่า ดูราของ Deli Dura , Ekona , Nigeria , Ghana และ Calabar มีนิวคลีโอไทด์เป็น T เหมือนกัน และพิสิเฟอราของปาล์มตระกูลเหล่านี้จะมี นิวคลีโอไทด์เป็น C ดังนั้น เทเนอรา ซึ่งเป็นheterozygous ของปาล์มเหล่านี้จะเป็น T/C

4.ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 279 (SNP_{TaYa}) ที่จุดนี้ ดูราของDeli Dura Tanzania และYangambi จะมีนิวคลีโอไทด์เป็น A และจะเปลี่ยนเป็น T เมื่อเป็นพิสิเฟอรา ฉะนั้น เทเนอราของTanzania และ Yangambi จะมีทั้ง 2 นิวคลีโอไทด์ คือ A/T

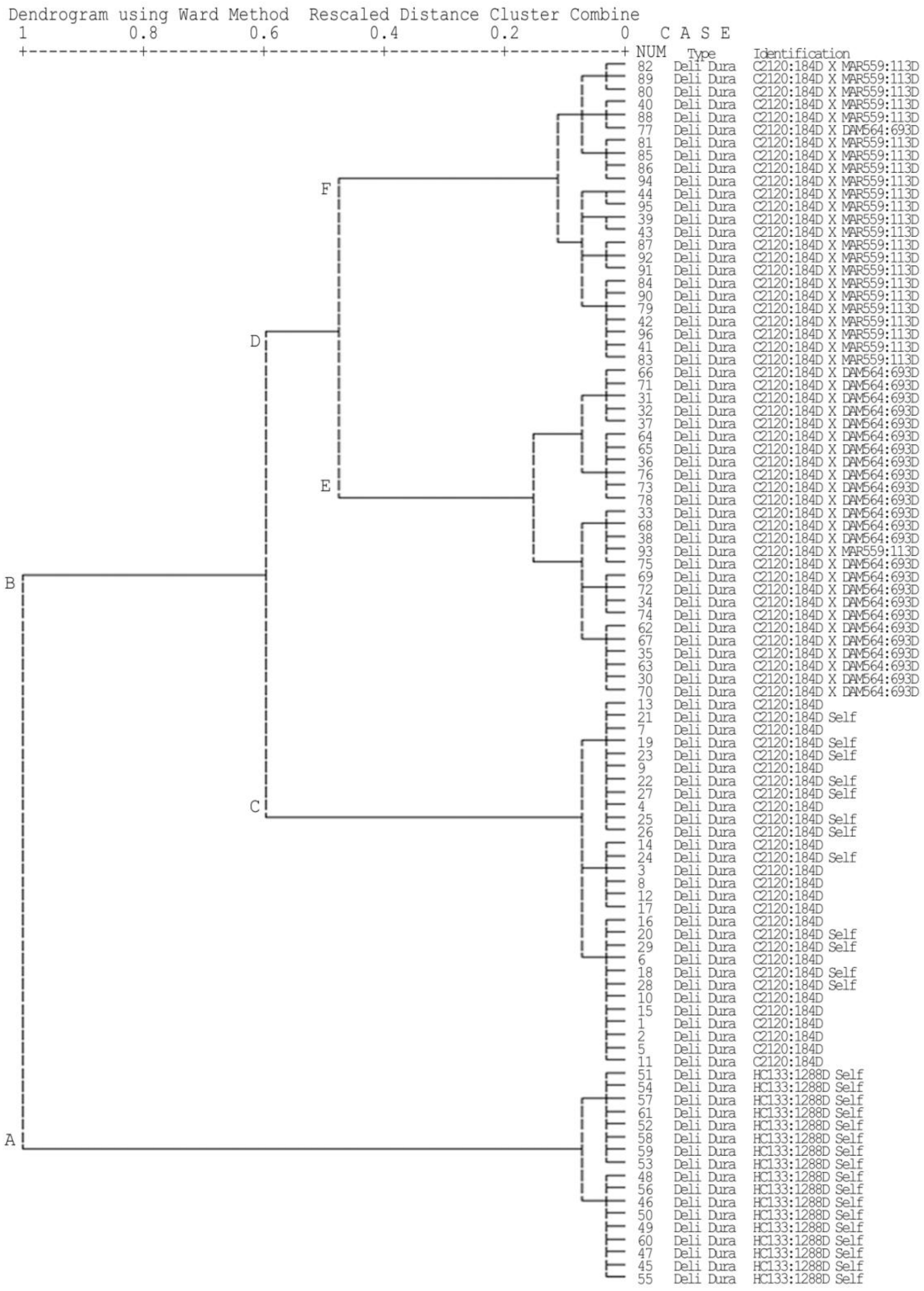

Figure 2 Unweighted pair group with arithmetic mean (UPGMA) Dendrogram reflecting genetic variation of intra-population among 96 Deli Dura plants by 19 SSR primers.

5.ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์สุดท้ายที่พบ คือ 308 (SNP_{LaAv}) เป็นตำแหน่งสนิปส์ ที่กลุ่มพันธุ์ Deli Dura ปาล์มชนิดดูราของ La Me และAVROS เป็น C และพิสิเฟอราของกลุ่มเหล่านี้เป็น A ฉะนั้น เทเนอราของกลุ่มนี้จึงเป็น C/A ดังแสดงในภาพที่ 3 จากภาพ ตำแหน่งในสายนิวคลีอิกแอซิดใดๆที่ผันแปรมีนิวคลีโอไทด์ 2 แบบ ในตำแหน่งเดียวกันจะถูกแทนที่ด้วย IUB codes หรือ IUPAC anotation โดยที่ 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 (electropherogram) ที่ได้จากการอ่านลำดับพันธุ์กรรมของดีเอ็น(DNA Sequencing) แสดงในภาพที่ 4 (a)-(e) และในตารางที่ 4 ได้แสดงข้อมูลตำแหน่งสนิปส์ที่ใช้ในการตรวจชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ ได้แก่ Deli Dura, DAMI, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Tanzania, Yangambi, AVROS และ Calabar ชนิดของผล (Fruit Type) และจำนวนตัวอย่างที่นำไปอ่านลำดับพันธุกรรม

Rajinder Singh *et al.*(2013) ได้รายงานว่า พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์(SNP) 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งแรกเป็นของ Deli Dura, AVROS และ Tanzania สอดคล้องกับตำแหน่ง SNP_{TaYa} ของการศึกษาครั้งนี้ แต่แตกต่างกันตรงที่การศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของ AVROS ในตำแหน่งนี้ กลับพบในตำแหน่ง SNP_{LaAv} สำหรับสนิปส์ตำแหน่งที่สองจากรายงานฉบับนี้พบในกลุ่มพันธุ์ Nigeria ซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่ง SNP_{ENGC} ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าตำแหน่งนี้นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (SNP) ของ Nigeria แล้ว ยังพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ กลุ่ม Ekona Ghana และ Calabar ด้วย

อนึ่งจากผลของการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนของยีน MADS-box ครั้งนี้พบตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มเติมอีก 3 แห่ง ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกคือ SNP_{Tan} SNP_{DA} และ SNP_{LaAv} นอกจากนั้น Rajinder Singh *et al.*(2013) ได้กล่าวถึงเหตุผลเพิ่มเติมว่าการเปลี่ยนแปลงของหนึ่งนิวคลีโอไทด์ ในส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนนั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน จาก Leucine เป็น proline และ lysine เป็น asparagines ที่ในบริเวณ Conserved DNA binding และ dimerization domain ของยีน MADS-box และคาดว่ากรดอะมิโนตัวใหม่ไม่สามารถจะจับตัวกับโปรตีนนั้น เพื่อสร้างกะลา (Shell) ของปาล์มน้ำมัน จึงทำให้ผลชนิดพิสิเฟอราไม่มีกะลา

การทดลองครั้งนี้จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ ในช่วงที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดเปลี่ยนเป็นลำดับโปรตีน (Protein sequence) โดยใช้โปรแกรม ExPASy พบว่าตำแหน่งสนิปส์ หรือตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของ codon ในบริเวณ MADS-box ยีนของปาล์มน้ำมันที่พบ 5 แห่ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนทุกตำแหน่ง ดังแสดงในภาพที่ 5 ดังนี้คือ

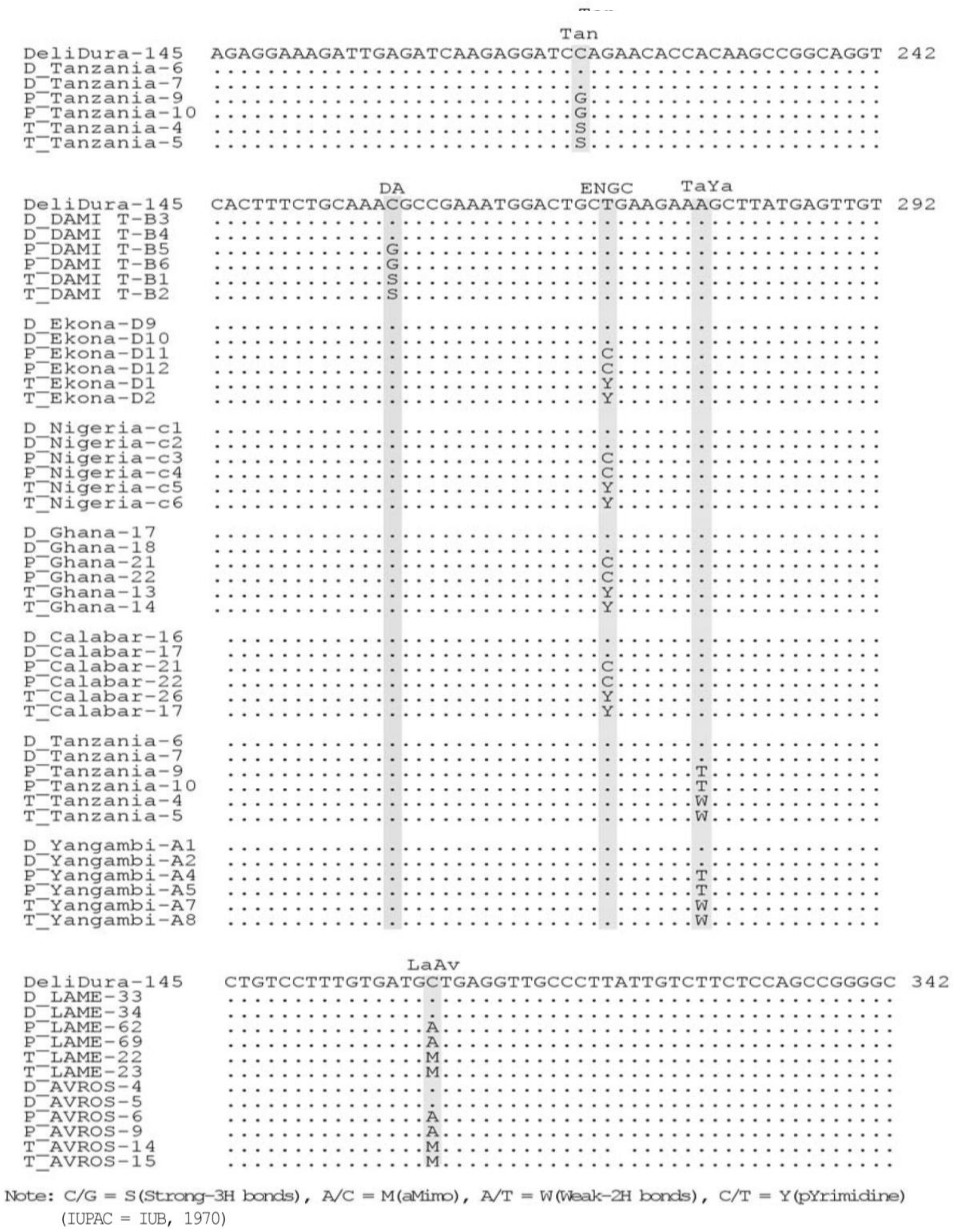

Figure 3 Multiple sequence alignment of oil palm MADS-box gene in three shell types (Dura, Pisifera, Tenera) of 10 distinct oil palm populations. The five polymorphic SNPs position were identified as follow, SNP_{Tan} ; a nucleotide "C" in Deli and Tanzania dura is substituted with nucleotide "G" in Tanzania pisifera, SNP_{DA} ; a nucleotide "C" in Deli and DAMI dura is substituted with nucleotide "G" in DAMI pisifera, SNP_{ENGC} ; a nucleotide "T" in Deli, Ekona, Nigeria, Ghana and Calabar dura is substituted with nucleotide "C" in Ekona, Nigeria, Ghana and Calabar Pisifera, SNP_{TaYa} ; a nucleotide "A" in Deli, Tanzania and Yangambi dura is substituted with nucleotide "T" in Tanzania and Yangambi Pisifera, SNP_{LaAV} ; a nucleotide "C" in Deli, La Me and AVROS dura is substituted with nucleotide "A" in La Me and AVROS Pisifera.

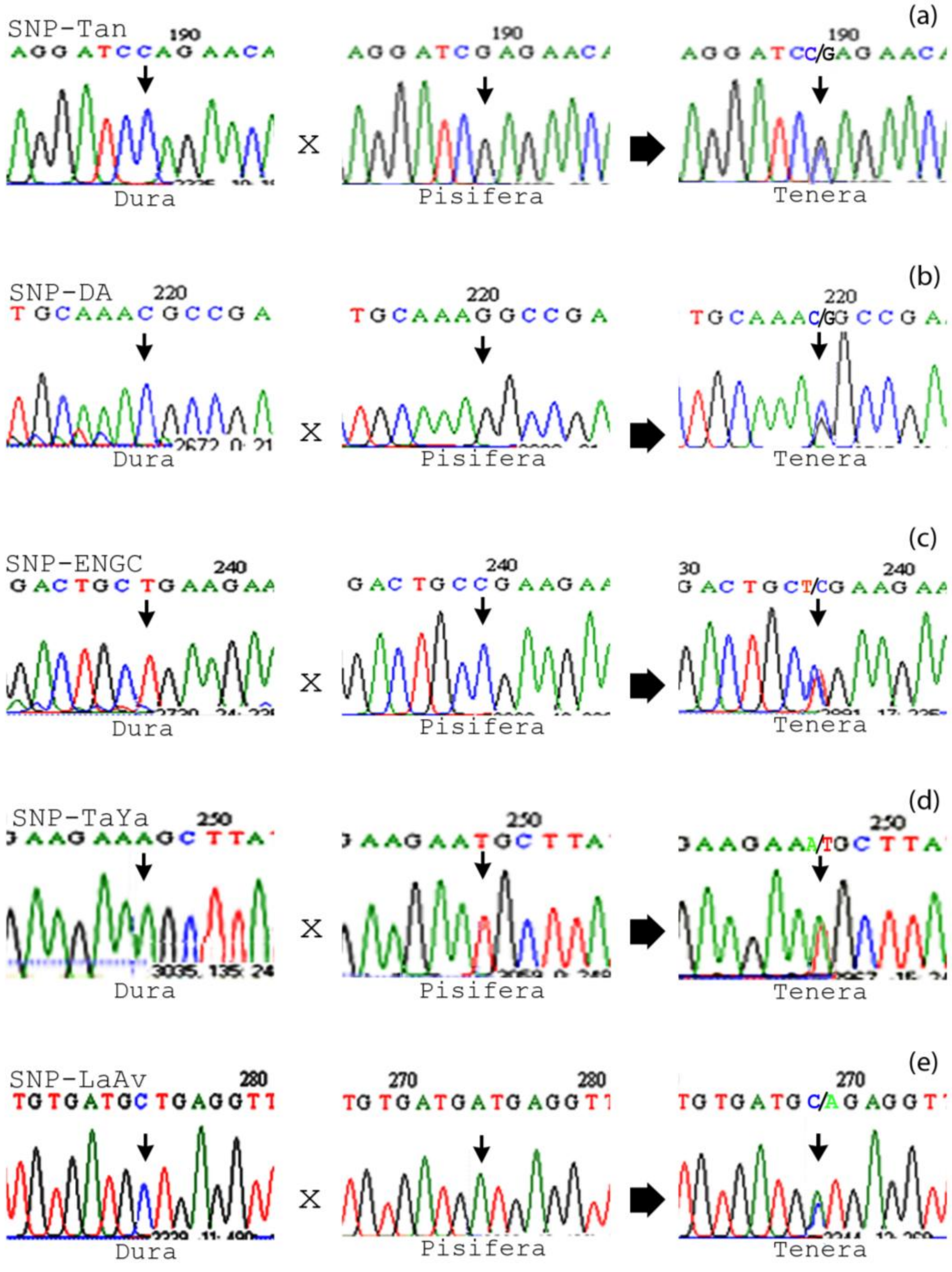

Figure 4 The electropherogram of MADS-box gene sequences of each SNP position showed a nucleotide substitution (black arrow) between dura and pisifera oil palm, (a) SNP_{Tan} (C/G); (b) SNP_{DA} (C/G); (c) SNP_{ENGC} (T/C); (d) SNP_{TaYa} (A/T); (e) , SNP_{LaAV} (C/A). Two electropherogram peaks at the same position were observed in tenera sequences.

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_{ENGC}	SNP_{TaYa}	SNP_{LaAv}
Deli Dura	Dura	6	C	C	T	A	C
Dami T	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
	Pisifera	3	G	C	C	A	C
	Tenera	4	G	C	T/C	A	C
Ghana	Dura	4	G	C	T	A	C
	Pisifera	4	G	C	C	A	C
	Tenera	3	G	C	T/C	A	C
La Me	Dura	13	G	C	T	A	C
	Pisifera	13	G	C	T	A	A
	Tenera	11	G	C	T	A	C/A
Nigeria	Dura	3	G	C	T	A	C
	Pisifera	3	G	C	C	A	C
	Tenera	3	G	C	T/C	A	C
Tansania	Dura	4	C	C	T	A	C
	Pisifera	4	G	C	T	T	C
	Tenera	4	C/G	C	T	A/T	C
Yangambi	Dura	3	G	C	T	A	C
	Pisifera	3	G	C	T	T	C
	Tenera	2	G	C	T	A/T	C
AVROS	Dura	4	G	C	T	A	C
	Pisifera	4	G	C	T	A	A
	Tenera	4	G	C	T	A	C/A
Calabar	Dura	5	G	C	T	A	C
	Pisifera	5	G	C	C	A	C
	Tenera	5	G	C	T/C	A	C

ATG	GGT	AGA	GGA	AAG	ATT	GAG	ATC	AAG	AGG	ATC	(C/G)AG	AAC
M	G	R	G	K	I	E	I	K	R	I	Q/E	N
ACC	ACA	AGC	CGG	CAG	GTC	ACT	TTC	TGC	AAA	(C/G)GC	CGA	AAT
T	T	N	R	Q	V	T	F	C	K	R/G	R	N
GGA	CTG	C(T/C)G	AAG	AA(A/T)	GCT	TAT	GAG	TTG	TCT	GTC	CTT	TGT
G	L	L/P	K	K/N	A	Y	E	L	S	V	L	C
GAT	G(C/A)T	GAG										
D	A/D	E										

Figure 5 The nucleotide sequence encoded MADS-box gene was translated to peptide sequence. A nucleotide substitution (highlighted in gray) in each codon results in amino acid change (highlighted in yellow) which related to oil palm dura and pisifera shell type, as follows;

Dura	Pisifera
(C)AG = Q (Glutamine)	(G)AG = E (Glutamic acid)
(C)GC = R (Argimine)	(G)GC = G (Glycine)
C(T)G = L (Leucine)	C(C)G = P (Proline)
AA(A) = K (Lysine)	AA(T) = N (Asparagines)
G(C)T = A (Alanine)	G(A)T = D (Aspartic acid)

(C)AG = Q (Glutamine) ⟶ (G)AG = E (Glutamic acid)

(C)GC = R (Argimine) ⟶ (G)GC = G (Glycine)

C(T)G = L (Leucine) ⟶ C(C)G = P (Proline)

AA(A)= K (Lysine) ⟶ AA(T) = N (Asparagines)

G(C)T = A (Alanine) ⟶ G(A)T = D (Aspartic acid)

การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเหล่านี้ เกิดขึ้นในบริเวณเดียวกับที่ถูกรายงานโดย Rajinder Singh *et al.*(2013) จึงสามารถวิเคราะห์ได้ว่า กรดอะมิโนตัวที่เปลี่ยนแปลงไปอยู่ในบริเวณ Conserved DNA binding และ dimerization domain ของยีน MADS-box การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกรดอะมิโนทำให้โปรตีนที่เกิดขึ้นนั้นไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ทำให้การสร้างกะลา (Shell) ของปาล์มน้ำมันเกิดความผิดปกติ เป็นผลให้ผลปาล์มน้ำมันชนิดพิสิเฟอราไม่มีกะลา (Rajinder Singh *et al.*, 2013)

III การตรวจวิเคราะห์แยกชนิดของปาล์มน้ำมัน โดย Real Time PCR

3.1 ออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจสนิปส์ ออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับตำแหน่งสนิปส์ที่พบแต่ละตำแหน่ง โดยใช้โปรแกรม TagMan Probe and primer chemistry and design ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบ ซึ่งติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ VIC กับ FAM ของทั้ง 4 ตำแหน่ง คือ SNP_{DA} , SNP_{ENGC} , SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAv} สำหรับ SNP_{Tan} ตรวจสนิปส์ของปาล์มน้ำมันกลุ่ม Tanzania ไม่ได้ทำการออกแบบโพรบและไพรเมอร์ไว้เพราะสามารถใช้ไพรเมอร์และโพรบของ SNP_{TaYa} ได้เช่นกัน ดังภาพที่ 6 เป็นการแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ โพรบ และการติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ สี VIC และ FAM ทางด้าน 5’ ของโพรบทั้ง 2 สาย สำหรับปลาย 3’ ของโพรบติดด้วย Quencher ซึ่งจะเป็นส่วนควบคุมไม่ให้สี VIC และ FAM มีการแสดงออกถ้ายังติดอยู่กับสายโพรบ ทางทิศทางนี้ยังมี Miner groove binder (MGB) เพื่อช่วยให้สายโพรบเกาะกับ DNA helix ให้ดีขึ้น

3.2 การตรวจแยกชนิดปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดของปาล์มที่สกัดดีเอ็นเอไว้แล้ว จำนวน 129 ตัวอย่างพันธุ์ ที่ทราบประวัติพันธุ์และมีการพิสูจน์ทราบแล้วว่าเป็นปาล์มน้ำมันชนิดใดบ้าง เพื่อยืนยันความใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบไว้ ผลการตรวจวิเคราะห์จาก Allelic Discrimination ให้ข้อมูลชนิดของพันธุ์เป็น ดูรา พิสิเฟอรา และ เทเนอรา ถูกต้องทุกพันธุ์ ดังแสดงในภาพ 5 เป็นผลการตรวจวิเคราะห์ปาล์มน้ำมันของ Tanzania และ La Me โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบ SNP_{TaYa} (A/T) และ SNP_{LaAv} (C/A) ตามลำดับปาล์มจากภาพกราฟเป็นการตรวจปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ AVROS โดยใช้ SNP_{LaAV} (C/A) แต่เมื่อลองใช้ไพรเมอร์และโพรบ SNP_{Da} (C/G) มาตรวจประชากรทั้ง 2 กลุ่ม

SNP_{TaYa} (A/T)

Forward primer 5'-GCCGGCAGGTCACTTTCT - 3'

Reverse primer 5'-GGAGAAGACAATAAGGGCAACCT-3'

Hybridization probe(A) FAM-5'-CTCATAAGCATTCTTC-Q-(MGB)-3'

Hybridization probe(T)VIC-5'-CAACTCATAAGCTTTCTTC-Q-(MGB)-3'

SNP_{LaAv} (C/A)

Forward primer 5'-GCCGGCAGGTCACTTTCT-3'

Reverse primer 5'-CCGGCTGGAGAAGACAATAAGG-3'

Hybridization probe(C)VIC-5'-CTTTGTGATGCTGAGGTT-Q-(MGB)-3'

Hybridization probe(A)FAM-5'-CTTTGTGATGATGAGGTT-Q-(MGB)-3'

SNP_{DA} (C/G)

Forward primer 5'-AGCCGGCAGGTCACTTTC-3'

Reverse primer 5'-GGAGAAGACAATAAGGGCAACCT-3'

Hybridization probe(C)FAM-5'-CATTTCGGCCTTTGCA-Q-(MGB)-3'

Hybridization probe(G)VIC-5'-CATTTCGGCGTTTGCA-Q-(MGB)-3'

SNP_{ENGC} (T/C)

Forward primer 5'-GCCGGCAGGTCACTTTCT-3'

Reverse primer 5'-GGAGAAGACAATAAGGGCAACCT-3'

Hybridization probe(T)VIC-5'-AAATGGACTGCTGAAGAA-Q-(MGB)-3'

Hybridization probe(C) FAM-5'-TGGACTGCCGAAGAA-Q-(MGB)-3'

Figure 6 Probes and primers used in SNP genotyping analysis for determining oil palm shell type. Two specific hybridization probes were designed from polymorphic nucleotide of each SNP position (highlighted in yellow). Each probe was labeled by fluorescent dye FAM® or VIC® color. Quencher (Q) and Minor Groove binder (MGB) were incorporated at the 3’ end of all probes.

ดังกล่าวข้างต้น จะพบการกระจายของ allele ใน Allele Discrimination plot กระจัดกระจาย ไม่สามารถอ่านผลได้ ดังภาพที่ 7 ใน Amplification plot จะเห็นว่าสีฟรูออเรสเซนต์ VIC กับ FAM จะขึ้นให้เห็นในรอบที่ 24-26 ของเครื่อง Real Time PCR เมื่อทำการวิเคราะห์ผลใน Discrimination plot ก็ให้ผลที่ถูกต้อง

3.3 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันเอกชน

ผลการใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้น มาตรวจปาล์มของบริษัทเอกชน ซึ่งปลูกไว้ที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี พบว่า สามารถตรวจชนิดของพันธุ์ปาล์มน้ำมันของบริษัท โกลเด้น เทเนอรา จำกัด บริษัทยูนิวานิช น้ำมันปาล์ม จำกัด และบริษัททักษิณปาล์ม จำนวน 60 ตัวอย่าง เป็นชนิดเทเนอราทั้งหมด แต่การเก็บตัวอย่างครั้งนี้พบปาล์มสายพันธุ์ Compact ของบริษัท อาร์ แอนด์ ดี เกษตรพัฒนา ซึ่งยังไม่เคยมีประวัติพันธุ์ จึงจะต้องนำตัวอย่างมาศึกษามาเพิ่มเติมต่อไป

IV. ผลการพัฒนาวิธีการตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันให้รวดเร็วขึ้น

ผลจากการตัดปลายใบเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 1.5x1.5 เซนติเมตร ใส่ถุงที่มีน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร แล้วใช้ค้อนขูดใบปาล์มน้ำมันจากภายนอกถุงให้น้ำเป็นสีเขียวอ่อน แล้วดูดน้ำนี้ 2 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี Dilution buffer อยู่ 18ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที น้ำใสส่วนบนที่มีดีเอ็นเอผสมอยู่สามารถนำไปทำ PCR พบว่าการสกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มวิธีนี้สะดวกและรวดเร็วมาก ได้ทดลองนำน้ำใสส่วนบนที่สกัดได้ไปตรวจวิเคราะห์ ชนิดของปาล์มโดยใช้ไพรเมอร์กับโพรบที่ออกแบบไว้บนเครื่อง Real time PCRปรากฏว่าไม่มีผลผลิตของพีซีอาร์เลย แม้จะตั้งเครื่อง Real time PCR ถึง 50 รอบแล้วก็ตาม ดังนั้น จึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้อย่างรวดเร็วข้างต้น 1 ไมโครลิตร ไปทำ Nested PCR ก่อน โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ซึ่งสามารถจะขยายยีนในส่วนที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ได้ทุกพันธุ์ ก่อน จำนวน 25, 30, 35 และ 40 รอบ จากนั้นเจือจางผลผลิตของพีซีอาร์ 500 เท่า จึงนำไปตรวจวิเคราะห์ ชนิดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบไว้ สำหรับตรวจสนิปส์ ปรากฏว่า การทำ Nested PCR 35 กับ 40 รอบ ตรวจพบผลผลิต พีซีอาร์เร็วมากในรอบที่ 14-18 แต่เมื่อวิเคราะห์ผลใน Allelic Discrimination plot พบว่าผลการวิเคราะห์กระจัดกระจาย ไม่สามารถสรุปผลได้ แต่การทำ Nested PCR 30 รอบ ให้ผลดีที่สุดไม่แตกต่างจากการใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธี CTAB การพัฒนาวิธีการตรวจนี้ทำให้ผู้ปฏิบัติทำงานได้สะดวก รวดเร็วขึ้นมาก

V การพัฒนาวิธีตรวจสนิปส์เพื่อแยกชนิดของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่อง PCR ทั่วไป

จากการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสนิปส์ทั้ง 4 แห่ง เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน เมื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์พบว่าสามารถตรวจสนิปส์ได้ดี 3 ตำแหน่ง โดยใช้คู่ของไพรเมอร์ต่อไปนี้

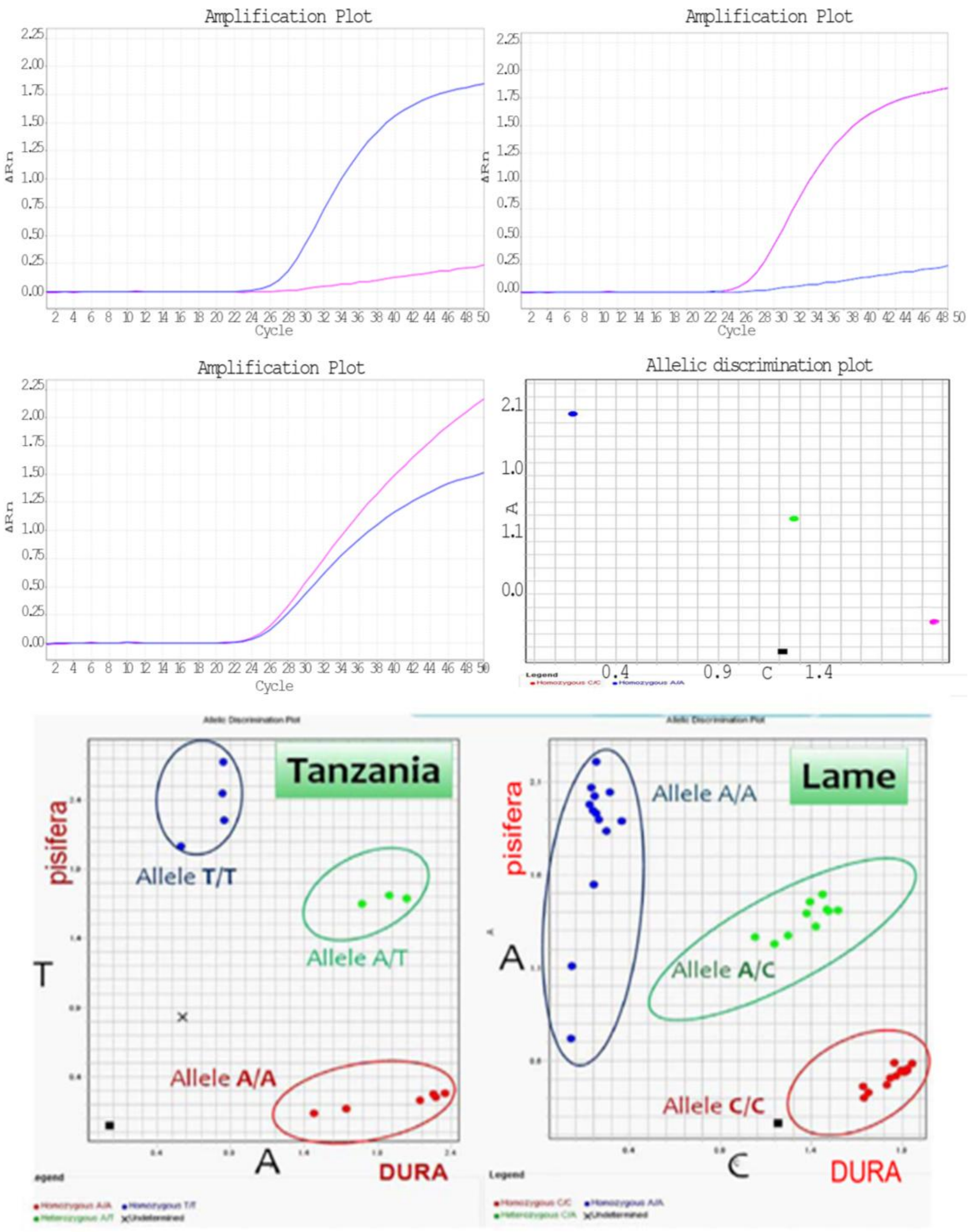

Figure 7 (a) The result of shell type detection on AVROS samples (dura, pisifera and tenera) by primer and probe designed from SNP_{LaAv} nucleotide sequence.The amplification and allelic discrimination plot were generated by real time PCR. (b) The discrimination plot **generated** by real time PCR showed showed oil palm shell type detection of Tanzania and La Me samples.

SNP_{DA} ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ

Mut218-D-F1 5' CGGCAGGTCACTTTCTGCAAGC 3'

Mut218-D-R1 5' GCTTGGCCATAGAACAAATGAAGC 3'

Mut218-P-F1 5' CGGCAGGTCACTTTCTGCAAGG 3'

Mut218-P-R 5' TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC 3'

ไพรเมอร์คู่แรกในตำแหน่งนี้ให้ผลผลิตของพีซีอาร์ขนาด 200 คู่เบส กับปาล์มน้ำมัน DAMI ชนิดดูราและเทเนอรา ไม่ให้ผลกับพิสิเฟอรา สำหรับไพรเมอร์คู่ที่สองใช้ตรวจ DAMI พิสิเฟอรา กับ เทเนอรา ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 276 คู่เบส แต่ไม่ได้ให้ผลกับดูรา

SNP_{ENGC} ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ

Mut234-D-F2 5'GCAAACGCCGAAATGGACTACT 3'

Mut234-D-R2 5'GGCCATAGAACAAATGAAGCCATA 3'

Mut234-P-F2 5'GCAAACGCCGAAATGGACTACC 3'

Mut234-P-R 5' TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC 3'

สนิปส์ตำแหน่งนี้ไพรเมอร์คู่แรก ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 179 คู่เบส กับปาล์มน้ำมัน Ekona Ghana Calabar และ Nigeria ที่เป็นชนิด ดูรา กับ เทเนอรา ไม่ให้ผลกับพิสิเฟอรา และในทางตรงกันข้ามไพรเมอร์คู่ที่สองให้ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ 261 คู่เบส กับ พิสิเฟอรา และ เทเนอรา ในตระกูลเดียวกันกับไพรเมอร์คู่แรก

SNP_{TAYA} ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ

Mut106-D-F3 5' GCCGAAATGGACTGCTGAAGTAA 3'

Mut106-D-R1 5' GCTTGGCCATAGAACAAATGAAGC 3'

Mut106-P-F1 5' GCCGAAATGGACTGCTGAAGGAT 3'

Mut106P-P-R 5' TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC 3'

โดยที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ นี้ สำหรับตรวจสนิปส์ของปาล์มน้ำมัน Tanzania กับ Yangambi โดยที่ไพรเมอร์คู่แรกให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 172 คู่เบส กับ ดูรา และ เทเนอรา และ ไพรเมอร์คู่ที่สองให้ผลผลิตพีซีอาร์กับ พิสิเฟอรา กับ เทเนอรา ขนาด 264 คู่เบส สำหรับสนิปส์ในตำแหน่ง SNP_{LaAv} การออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันโดยใช้พีซีอาร์ทั่วไปยังไม่สำเร็จต้องทำการทดสอบปรับสภาวะการทำพีซีอาร์หรือออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่เพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. ได้ข้อมูล primer ที่เหมาะสมกับการจำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นพ่อและต้นแม่ จำนวน 13 และ 19 คู่ ตามลำดับ

2.ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมัน 10 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม Deli Dura, AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI และ La Me รวมถึงปาล์มน้ำมันลูกผสมระหว่าง *E.guineensis* กับ *E. oleifera* โดยใช้ microsatellite primer

3. ปาล์มน้ำมันกลุ่ม La Me มีพันธุกรรมที่ต่างจากกลุ่มอื่นๆมากสุด

4. สามารถใช้ Primer กลุ่มนี้แยกความแตกต่างระหว่างประชากรปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1-8 และตรวจสอบสืบตระกูลพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้

5. สามารถจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมันที่เป็นดูรา พิสิเฟอราและเทเนอรา ได้แม่นยำโดยใช้เทคนิคการตรวจสอบสนิปส์กับเครื่อง Real Time PCR และเครื่อง PCR ทั่วไป

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ใช้ตรวจวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพกล้าพันธุ์ปาล์มน้ำมัน โดยคัดแยกต้นดูราออกจากลูกผสมเทเนอรา

2. สร้างแปลงพันธุ์พ่อชนิด พิสิเฟอรา ซึ่งได้จากการผสมข้ามระหว่างต้นเทเนอราด้วยกัน จะได้ต้นปาล์มน้ำมันชนิด ดูรา เทเนอรา และ พิสิเฟอรา ในอัตรา 1:2:1 คละกัน แต่เดิมต้องนำไปปลูกหมด เพราะการแยกชนิดทำไม่ได้ในระยะต้นกล้า ต้องตรวจสอบเมื่อติดผลแล้วเท่านั้น ทำให้สิ้นเปลืองเนื้อที่แรงงานและค่าใช้จ่ายตลาดจนเวลาในการดูแลรักษา และต้นพ่อพันธุ์พิสิเฟอราอยู่กระจัดกระจาย การรวบรวมเกสรทำได้ยาก แต่ถ้าใช้เทคโนโลยีที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถเลือกต้นพิสิเฟอราที่มีเพียง 25% ทำให้สามารถนำไปปลูกติดกันประหยัดทั้งเนื้อที่ แรงงาน งบประมาณและการดูแลรักษา

3. การตรวจสนิปส์สามารถใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ กรณีมีการฟ้องร้องเรื่องชนิดของกล้าพันธุ์และความตรงตามพันธุ์ เป็นต้น

4. ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายของปาล์มน้ำมัน สำหรับใช้สืบค้นในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการปาล์มน้ำมัน. โรงพิมพ์ดอกเบี้ย กรุงเทพฯ. 188 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร : ปาล์มน้ำมัน.2556 การผลิตสินค้าการเกษตรที่สำคัญ แหล่งที่มา: http://www.oac.go.th/downlood /prcai/jarmerop/Palm.pdf, สืบค้นเมื่อ ธ.ค.2557

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ อรรัตน์ วงศ์ศรี บุญเรือน เรืองวิเศษ พยุงศักดิ์ รวยอารี และ ประสาน สืบสุข. 2548. โครงการวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 โดยใช้เทคนิค AFLP. โรงพิมพ์ดอกเบี้ย 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. storling.2005.shesstoleramt oil palm Varieties 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. International Union of Pure and Applied Chemistry : 8-1 – 8-33.

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN).1970. Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their constituents. Biochem J. 120(3):449-54. หรือ http://www.biochemj.org/bj/120/0449/1200449.pdf

Jehan T and S.Lakhanpaul, 2006. Single nucleotide polymorphism (SNP) Method and applications in plant genetics : A review: Indian Journal Biotechnology. Vol 5(October) : 435-459.

L Low, E.T., H. Alias, S.H. Boon, E. M Shariff, C.Y. A Tan, L. CL Ooi, S.C. Cheah, A.R. Raha, K.L. Wan and R. Singh. 2008. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. BMC Plant Biology 8: 62.

Liu, J., S. Huang, M. Sun, S. Liu, Y. Liu, W. Wang, X. Zhang, H. Wang and W. Hua.2012. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. Plant Methods 8(1): 34.

Maizura, I., N. Rajanaidu, A.H. Zakri and S.C. Cheah. 2006. Assessment of Genetic Diversity in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Genetic Resources and Crop Evolution 53 (1): 187-195.

Mayer, Jack and Corley. 2001. The use of molecular marker to investigate the genetic structure of oil palm breeding program. Heredity 85 (3): 288-293.

Rosenguist, E.A.1985.The genetic base of oil palm breeding populations. Proceeding of International Workshop on oil palm Germplasm and Utilization. Palm oil Petrarch Institute of Malaysia. PI2756

Singh, R., ET. Low, LC. Ooi, M. Ong-Abdullah, NC. Ting, J. Nagappan, R. Nookiah, MD. Amiruddin, R. Rosli, MA. Manaf, KL. Chan, MA. Halim, N. Azizi, N. Lakey, SW. Smith,

MA. Budiman, M. Hogan, B. Bacher, A .Van Brunt, C. Wang, JM. Ordway, R. Sambanthamurthi and RA. Martienssen.2013.The oil palm SHELL gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. Nature 500(7462):340-4.