แบบรายงานเรื่องเต็ม ผลงานวิจัยที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

1. **ชุดโครงการ** แผนงานวิจัยและพัฒนาปาล์มน้ำมัน
2. **โครงการวิจัย** โครงการวิจัยปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน
3. **ชื่อการทดลองย่อย (ภาษาไทย)** การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอ
   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Molecular study of Genetic Diversity in Oil Palm
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน นางสาวอรรัตน์ วงศ์ศรี สังกัด ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

นางนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอและตรวจวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล มีจุดประสงค์เพื่อช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน จากการทดลองได้ทำการคัดเลือก SSR Markers 13 ตำแหน่ง ที่สามารถให้ความแตกต่างของประชากรปาล์มน้ำมัน 10 กลุ่มพันธุ์คือ Deli Dura, AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me พบว่ากลุ่มพันธุ์พ่อ ที่มีความแตกต่างจากกลุ่มพันธุ์แม่และพันธุ์พ่ออื่นๆ มากที่สุดคือ La Me รองลงมาได้แก่ Calabar, Nigeria, Tanzania และ Ghana กลุ่มพันธุ์ AVROS มีพันธุกรรมคล้ายพันธุ์แม่ Deli Dura มากที่สุด รองลงมาคือ DAMI นอกจากนั้นได้ศึกษาพันธุกรรมของประชากร Deli Dura และลูกผสมต่างสปีชีส์ของ *Elaeis guineensis* กับ *E.oleifera* โดยใช้ SSR Markers 32 ตำแหน่งเพิ่มเติม ข้อมูลที่ได้สามารถใช้จำแนกกลุ่มพันธุ์ทั้งหมดออกจากกันได้ และพบว่า ไพรเมอร์ mEgCIR3428, mEgCIR3519 และ mEgCIR0874 เพียงพอที่จะใช้จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1-8 ได้ สำหรับการวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมันทำการอ่านและเปรียบเทียบลำดับนิวคลี โอไทด์ของยีน MADS-box ทั้งชนิดดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอราของ 10 กลุ่มพันธุ์ดังกล่าวข้างต้นจำนวน 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 ที่พบได้พัฒนาไพรเมอร์และโพรบจำนวน 4 ชุด สำหรับตรวจสอบชนิดของปาล์มน้ำมันได้แม่นยำและรวดเร็วด้วยเครื่อง Real-time PCR และพัฒนาไพรเมอร์ที่ใช้กับเครื่อง PCR ทั่วไป เพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจควบคุมคุณภาพต้นกล้าปาล์มน้ำมันและคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับการศึกษาลักษณะต้นเตี้ยในปาล์มน้ำมัน ได้ข้อมูลลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสูง คือ ยีน *Ga20ox-2* ในปาล์มต้นเตี้ย *E.oleifera* ลูกผสมต่างสปีชีส์ของ *E.guineensis* กับ *E.oleifera* และพบลำดับเบสที่หายไปในส่วนปลายยีน *Ga20ox-2* ซึ่งคาดว่ามีความสัมพันธ์กับความสูงของลูกผสมระหว่าง Deli dura กับ Dumpy AVROS

Abstract

The genetic diversity studies and shell type analysis of oil palm are achieved by molecular marker. Thirteen SSR markers loci were selected to identify 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 highest genetic distance 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, these SSR markers were reselected for investigating the genetic differentiation between 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, three primers, mEgCIR3428, mEgCIR 3519 and mEgCIR 0874, are sufficient to be used as markers for identifying Surat Thani 1-8 oil palm varieties. For analysis of oil palm shell type, 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 population 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 primers 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. The genetic study of dwarfism in oil palm were carried out by sequencing and multiple alignment of *Ga20ox-2* gene from *E. oleifera* and hybrids between Deli dura and Dumpy AVROS. *Ga20ox-2* was known to control plant height. The results showed that there are 9 deleted nucleotides in 3’ non coding region of hybrids, which were thought to participate with dwarfism of these tree.

คำนำ

อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มมีอัตราการขยายตัวที่ค่อนข้างสูงโดยมีการเพิ่มปริมาณของพื้นที่การปลูกปาล์มน้ำมันจาก 69,625 ไร่ในปี 2520 เป็น 4.5 ล้านไร่ ให้ผลผลิต 12.37 ล้านตัน ในปี 2556 รัฐบาลมีเป้าหมายในการขยายพื้นที่การปลูกให้ได้ 10 ล้านไร่ ภายในปี 2572 เพื่อให้ได้ผลปาล์ม 25 ล้านตันหรือน้ำมันปาล์มดิบ 4.5 ล้านตัน ทั้งนี้ ปาล์มน้ำมันมีส่วนแบ่งทางการผลิตสูงสุดถึงร้อยละ 73 ของอุตสาหกรรมน้ำมันพืชของไทย (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) จากการวิเคราะห์ผลผลิตปาล์มน้ำมันของไทยต่อไร่ ต่อปี พบว่าผลผลิตค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับผลผลิตของประเทศมาเลเซีย ดังนั้น การปรับปรุงพัฒนาสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้มีผลผลิตสูง ตลอดจนใช้ต้นกล้าพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ดีได้มาตรฐาน สามารถที่จะระบุประสิทธิภาพของการผลิตน้ำมันรวมถึงการจำแนกและตรวจสอบพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน จึงเป็นเรื่องสำคัญระดับต้นในการเพิ่มผลผลิต

ปาล์มน้ำมันที่ใช้ปลูกมีด้วยกัน 2 ชนิดคือ *Elaeis guineensis* Jacg มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ได้แก่ประเทศกาน่า ไนจีเรีย แคเมอรูนและเอวารีโคสต์ เป็นต้น ให้ผลผลิตทะลายปาล์มสูงแต่สูงเร็ว เป็นพันธุ์การค้าของไทยส่วนใหญ่ในปัจจุบัน สำหรับ *Elaeis oleifera* พบมากในแถบอเมริกากลางและใต้ ให้ผลิตไม่สูง แต่มีลักษณะต้นเตี้ย การใช้ประโยชน์คือการนำไปสร้างลูกผสมกับ *E.guineensis* เพื่อทำให้ลูกผสมมีต้นเตี้ยลง (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

นอกจากนี้ ปาล์มน้ำมันสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มตามลักษณะของผลได้เป็น 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 นิยมปลูกเป็นต้นแม่พันธุ์ คือ Deli dura

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

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

ข้อมูลเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันสำหรับปรับปรุงพันธุ์

1. แหล่งพันธุ์ของประชากรแม่พันธุ์ หรือเรียก ดูรา

1.1 Deli Dura ทั่วโลกนิยมใช้เป็นต้นแม่ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ แหล่งพันธุ์เดิมมีอยู่ 4 ต้นในแอฟริกา ได้ถูกนำไปปลูกที่สวนพฤกษศาสตร์ เมืองเดลิ ประเทศอินโดนีเซีย เมื่อปี1848 หลังจากนั้นนำไปปลูกที่เกาะสุมตรา ส่วนหนึ่งปลูกที่เมืองเดลิ ซึ่งคัดได้พันธุ์ที่มีลักษณะดี จึงเรียกชื่อว่า เดลิ ดูร่า ตามชื่อเมืองในปี1922 จากนั้นเริ่มเป็นที่รู้จักกันมากขึ้น เมื่อนำไปปลูกเป็นการค้าในเกาะสุมาตรา ลักษณะสำคัญของพันธุ์คือให้ผลทะลายสดดีและสม่ำเสมอ ผลผลิตน้ำมันสูง

1.2 Dumpy Dura ได้จากการผสมต้นของปาล์มน้ำมันที่เมือง Serdang มาเลเซีย มีลักษณะเด่น คือ ต้นเตี้ยกว่าลูกผสมอื่น ลำต้นและทะลายใหญ่ ให้ผลผลิตสูง ต้านทานโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) (Rosenguist, 1985)

2. แหล่งพันธุ์ของประชากรพ่อพันธุ์หรือเรียก ฟิสิเฟอรา แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้

2.1 AVROS เป็นกลุ่มพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์ โดยสถาบัน AVROS ได้รับมาจากส่วนพฤกษศาสตร์ EALA ประเทศแซร์ คัดเลือกได้สายพันธุ์ที่เด่น เรียกว่า SP 540 ใช้เป็นพ่อพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ และผลิตเมล็ดลูกผสม Deli x AVROS แพร่หลายที่สุด ในปี 1935 สถาบัน AVROS ได้ผลิตลูกผสม Deli x SP 540 ซึ่งให้ผลดีกว่า Deli Dura ที่ปลูกเป็นการค้า ในขณะนั้น และลูกผสมนี้ยังคงลักษณะให้ผลผลิตดี มีความสม่ำเสมอ ใช้ปลูกในทวีปเอเชียและแอฟริกา ลูกผสม Deli x AVROS มีลักษณะสูงเร็ว กะลาบาง ผลเป็นรูปไข่ ให้ผลผลิตน้ำมันสูง ลักษณะต่างๆ ค่อนข้างสม่ำเสมอ

2.2 Yangambi เป็นกลุ่มพันธุ์พ่อที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกับ AVROS มีถิ่นกำเนิดในประเทศแซร์ ทวีปแอฟริกา ดังนั้นลักษณะลูกผสมที่มีพันธุ์พ่อกลุ่ม Yangambi มีลักษณะคล้ายลูกผสมที่มีพันธุ์พ่อจากกลุ่ม AVROS

2.3 La Me เป็นกลุ่มพันธุ์ที่ปรับปรุงพันธุ์ที่เมือง LA ME ประเทศไอวอรีโคสต์ ทวีปแอฟริกา ลักษณะของลูกผสมที่มีพ่อพันธุ์เป็นกลุ่ม La Me จะมีต้นเตี้ย ผลเล็ก มีลักษณะเป็นรูปหยดน้ำ ทะลายมีขนาดเล็ก กะลาหนากว่าลูกผสมอื่นๆ ขนาดเมล็ดในเล็ก แต่เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง ลักษณะเด่น คือ ก้านทะลายยาว ทำให้เก็บเกี่ยวง่าย สถาบัน CIRAD (IRHO) ประเทศไอวอรีโคสต์ ผลิตลูกผสม Deli x La Me จำหน่าย

2.4 Ekona เป็นกลุ่มพันธุ์ที่ความต้านทาน *Fusarium Wilt.* ลักษณะลำต้นเตี้ย ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง (น้อยกว่า AVROS เล็กน้อย) ปัจจุบันใช้เป็นแหล่งพ่อพันธุ์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ในประเทศคอสตาริก้า ซึ่งผลิตลูกผสม Deli x Ekona จำหน่าย

2.5 Calabar กลุ่มพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดเดิมจาก CALABAR ประเทศไนจีเรียทวีปแอฟริกา ลูกผสมที่ใช้ Calabar เป็นพ่อพันธุ์ พบว่าเจริญเติบโตได้ดีในสภาพฝนตกชุก ความชื้นสูง และมีแดดน้อย ลักษณะสีผลเป็นแบบ virescans คือผลดิบมีสีเขียวและเปลี่ยนเป็นสีส้มเมื่อสุก ปัจจุบันมีแหล่งปรับปรุงพันธุ์ในคอสตาริก้าผลิตลูกผสม Deli x Ghana จำหน่าย

2.6 Tanzania เมล็ดปาล์มน้ำมันได้จากต้นปาล์ม 6 ต้น ณ เมือง Kigoma ประเทศ Tanzania มีลักษณะเด่นคือ กะลาบางมาก (Alvarado and Sterling, 2005)

3. กลุ่มประชากรพันธุ์พ่ออื่นๆ ได้แก่ Ghana, Nigeria, และ DAMI (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้นอายุยืน มีช่วงเวลาที่สามารถเก็บเกี่ยวผลได้ตั้งแต่อายุต้น 3-20 ปี ปาล์มน้ำมัน *E.guineensis* ที่นิยมปลูกในเชิงพาณิชย์นั้นมีความสูงเพิ่มเฉลี่ยปีละ 30-90 เซนติเมตร ทำให้ต้นปาล์มอายุมากมีลักษณะสูงและยากต่อการเก็บเกี่ยวผลปาล์ม ดังนั้น ปาล์มที่มีลักษณะต้นเตี้ย จึงเป็นที่ต้องการและเป็นจุดประสงค์หลักอย่างหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์ม นอกจากนี้ ปาล์มที่มีลักษณะเตี้ยยังมีข้อดี คือมีทางใบที่สั้นลง ทำให้สามารถปลูกในระยะชิดกว่าปาล์มทั่วไปได้

ลักษณะต้นเตี้ย (Dwarf) เกิดจากการขยายและแบ่งตัวของเซลล์พืชที่ผิดปกติหรือช้าลง ซึ่งปรากฏการณ์นี้จะถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนพืชที่สังเคราะห์ในต้นตามธรรมชาติ จากงานวิจัยในข้าวซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นเดียวกับปาล์ม ฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลิน (GA) และบลาสสิโนสเตอรอยด์ (BR) มีความเกี่ยวข้องกับความสูงของต้นข้าว (Ikeda *et al.,*2001; Itoh *et al.,*2002; Sakamoto *et al.,*2004; Hong *et al.,*2005a) พืชมีลักษณะต้นเตี้ยที่เกิดจากความผิดปกติเกี่ยวกับ GA มีรายงานว่าเกิดจากความผิดปกติของเอนไซม์ GA20oxidase ซึ่งทำงานอยู่ในกระบวนการ hydroxylation ของ ent-Gibberellene ทำให้พืชไม่สามารถสังเคราะห์ active GA ได้ ยีนที่ควบคุมโปรตีนนี้คือ *GA20x-2* และมักจะแสดงออกมากในใบพืช ข้าวพันธุ์IR8 ที่มีลักษณะต้นเตี้ย ไวในการตอบสนองต่อ GA จากภายนอกและให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *sd1* ซึ่งต่อมาถูกพบว่าคือยีน *GA20x-2* (Ashikari *et al.,*2002) นอกจากยีน *GA20x-2* แล้ว การกลายพันธุ์ของยีน *slr1* ที่มี DELLA conserved domain และควบคุมโปรตีน slr (หรือ GAI, RGA, RGL ใน Arabidopsis thaliana) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการรับและสื่อสารของ GA ก็มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความสูงของต้นข้าว (Ikeda *et al.,*2001 *et al.,*2001และ Itoh *et al.,*2002) ข้าวที่มีโปรตีน GAI ผิดปกตินั้นสูงกว่าต้นข้าวปกติและตอบสนองต่อ GA จากภายนอกได้น้อยลง

ในปาล์มน้ำมัน มีรายงานการพบตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะต้นเตี้ย(Pootakham *et al*., 2015) จากแผนที่โลคัสลักษณะถ่ายทอดเชิงปริมาณ (quantitative trait locus, QTL) ที่เกี่ยวข้องกับความสูงของปาล์มน้ำมัน คาดว่ายีน *GAI* และ *GA2ox2* ทำหน้าที่ควบคุมความสูงของประชากรปาล์มน้ำมันลูกผสมระหว่าง Deli dura กับ Dumpy AVROS (Golden Tenera)

สำหรับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปาล์มน้ำมัน ประเทศมาเลเซียและสหราชอาณาจักร เป็นผู้ริเริ่มนำมาใช้ในช่วงปี 1990 เพื่อการจำแนกโคลนและการทำแผนที่ทางพันธุกรรม โดยนำเทคนิค RFLP และ RAPD มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันทั้ง*E.guineensis* และ*E.oleifera.* Maizura *et al.* (2004) รายงานว่าได้ใช้โมเลกุล เครื่องหมายชนิด RFLP ในการจำแนกปาล์มน้ำมัน 359 ตัวอย่างพันธุ์ ที่มีแหล่งกำเนิดใน 11 ประเทศของทวีปอัฟริกา ได้แก่ Nigeria, Cameroon, Congo DR, Tansania, Angola, Senegal, Serra Leone, Guinea, Ghana, Madagas car และ Gambia โดยมี Deli Dura เป็นพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ พบว่าประชากร Deli Dura ตรวจพบ alleles น้อยกว่าปาล์มอื่นๆถึง 36 alleles แสดงถึงความผันแปรทางพันธุกรรมมีน้อยกว่า และยังพบว่าประชากร Nigeria มีความหลากหลาย ในรูปของ alleles ต่อ locus มากสุด มีความแตกต่างทาง

พันธุกรรมถึง 67.2% จึงอาจกล่าวได้ว่า Nigeria เป็นศูนย์กลางความหลากหลายของ wild oil palm นอกจากนี้ Mayer *et al.* (2001) ได้ใช้ 157 RFLP marker ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันพบว่า ในทวีปเอเชียนั้น พันธุ์ Deli Dura มีความแตกต่างจากกลุ่ม AVROS อย่างเด่นชัด

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR (Simple Sequence Repeat) หรือ SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) ในปาล์มน้ำมัน พบได้ทั้งmono-, di-, tri-, tetra-และ pentanucleotide repeat การกระจายตัวของ SSR motif พบในทุกๆความยาวของยีน 7.7 kb AG/CT เป็น dinucleotide repeat ที่พบมากสุดประมาณ 67% ขณะที่พบ AT, AC/GT และ CG จำนวน 21, 11, และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับ AAG/CTT เป็น trinucleotide repeat ที่พบมากสุดจำนวน 23 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย AGG/CCT (13%), CCG/CGG (11%) และ AAT/ATT (11%) นอกนั้นพบน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ โดยAGT/ATC พบน้อยสุดคือ 4 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของ tetranucleotide repeat พบ ACAT/ATGT จำนวน 36 เปอร์เซ็นต์ และ AAAT/ATTTจำนวน 29 เปอร์เซ็นต์ (Low *et al.,* 2008)

Billotte *et al.* (2001) ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล 21 คู่ โดยใช้นิวเคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน (GA), (GT) และ(CCG) จากฐานพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันพบว่าสามารถแยกปาล์มน้ำมัน *E.guineensis* ออกจากกัน *E.oleifera* และปาล์มชนิดอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน

Ting *et al.* (2010) พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจากฐานข้อมูล EST ของปาล์มน้ำมัน จำนวน 722 คู่ พบกลุ่มเครื่องหมายที่เป็น dinucleotide repeat มากที่สุดถึง 47.60% เมื่อใช้ทดลองกับ *E.guineensis* และ *E.oleifera* จำนวน 135 ตัวอย่าง พบว่าโมเลกุลเครื่องหมาย 14 คู่ ให้ alleles ที่แตกต่างกันทั้งหมด 101 alleles สามารถแยกประชากรทั้งสองกลุ่มออกจากกันได้

สนิปส์ (Single Nucleotide Polymorphisms –SNPs เป็นการแปรปรวนของลำดับเบสหนึ่งตัวในตำแหน่งหนึ่งๆในจีโนมิคดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอเป้าหมายที่เกิดการกลายพันธุ์แบบแทนที่ (Substitution) เพียงหนึ่งตำแหน่ง ไม่ใช่ว่าจะสามารถเรียกความแตกต่างของลำดับเบส เพียง 1 เบสในแต่ละตำแหน่งว่าเป็นสนิปส์เสมอไป จากโครงการจีโนมมนุษย์ได้มีการกำหนดเงื่อนไขว่า ความแตกต่างของลำดับเบส ณ ตำแหน่งใดๆ จะถือเป็นสนิปส์ก็ต่อเมื่อพบในประชากรมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ แต่หากพบน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ จะถือเป็นการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) ปกติจะพบสนิปส์ในทุกๆ 100-300 เบสในจีโนมนุษย์ โดยทุกๆ 2 ใน 3 ของสนิปส์ จะพบการแทนที่ของ C (cytosine) ด้วย T (thymine)

สนิปส์ เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่พบหนาแน่นที่สุดในจีโนมของมนุษย์ คาดว่าประกอบด้วยสนิปส์ 1.42 ล้านสนิปส์ กล่าวคือจะพบสนิปส์ทุกๆ 1.9 กิโลเบส สำหรับในข้าวโพดพบสนิปส์ทุกๆ 70 คู่เบส ข้าวสาลีพบสนิปส์ทุกๆ 20 คู่เบส Jehan and Lakhanpaul (2006) ประมาณว่าในพืช เฉลี่ยพบสนิปส์ทุกๆ 200-500 คู่เบส การที่สนิปส์มีจำนวนมากและมีความแปรผันที่เสถียรใน

จีโนมของสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ สนิปส์จึงเหมาะที่จะใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในจีโนมมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ RFLP, AFLP และ SSR (Liu J *et al.,* 2012)

การตรวจสอบและจำแนกพันธุกรรมด้วยสนิปส์ สามารถทำได้โดย

- Electrophoretic assays เป็นการวัดความแตกต่าง โดยดูจากระยะ การเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single strand) ใน sequencing gel โดยการใช้เทคนิค เอสเอสซีพี (SSCP), ดีจีจีอี (DGGE)

- Temperature Modulated Heteroduplex Assay (TMHA) ในบางครั้งเรียก Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) เป็นเครื่องสำหรับตรวจวัด mismatch ของ homo duplexes และ heteroduplexes แยกความแตกต่างเนื่องจาก heteroduplexes จะมีหนึ่งนิวคลีโอไทด์ที่จับคู่ผิด (mismatch)

- Fluorescence Resonance Energy Transfer Based Method วิธีนี้ใช้พื้นฐานการตรวจ แบบเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Real time PCR)

- เทคนิคอื่นๆ ได้แก่ ASH (Allele Specific Hybridization), ASA (Allele Specific Amplification) ปัจจุบันเริ่มมีการใช้เทคโนโลยีสนิปส์หรือ “SNPology” ในมนุษย์และสัตว์บางชนิด ถึงแม้สนิปส์จะเป็นเทคโนโลยีที่ทรงประสิทธิภาพ แต่สำหรับการใช้ประโยชน์ในพืชแล้วยังมีไม่มาก ทั้งนี้เพราะมีการพัฒนาเครื่องหมายสนิปส์เฉพาะในพืชสำคัญๆ เท่านั้น เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ และ sugar beet เท่านั้น (Rafalski, 2002) เนื่องจากต้นทุนในการพัฒนาเครื่องหมาย สนิปส์นั้นสูงมาก และถึงแม้ว่าต่อไปเครื่องหมายสนิปส์จะสามารถพัฒนาจน ใช้ได้กับพืชสำคัญๆ แต่ในพืชที่ไม่ใช่พืชเศรษฐกิจหลักเครื่องหมายโมเลกุลชนิด เอเอฟแอลพี (AFLP) และเอสเอสอาร์ (SSR) ก็ยังคงเป็นเครื่องหมายสำคัญสำหรับใช้ศึกษาทางพันธุกรรมต่อไป

จากร่างแผนยุทธศาสตร์ปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มจะมีการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำ มันปีละ 2.5 แสนไร่ ปลูกทดแทนสวนปาล์มน้ำมันเก่า 0.3 แสนไร่ และปลูกทดแทนยางพารา 1.0 แสนไร่ รวม 3.8 แสนไร่ คิดเป็นความต้องการต้นกล้า 9,500,000 ต้น/ปี (25 ต้น/ไร่) หรือคิดเป็นเมล็ดงอก 11,400,000 เมล็ด/ปี (30 เมล็ด/ไร่) จึงมีผลทำให้ความต้องการต้นกล้าปาล์มพันธุ์ดีมีสูงและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้มีผู้นำกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้มาตรฐาน หรือเก็บจากโคนต้นไปขายให้ เกษตรกรซึ่งมีการปะปนของต้นปาล์มชนิดดูราและพิสิเฟอรา กว่าเกษตรกรจะทราบว่าพันธุ์ปาล์มที่ปลูกไม่ได้มาตรฐานให้ผลผลิตต่ำ ก็ต่อเมื่อปาล์มน้ำมันที่ปลูกเจริญเติบโตเกือบ 3 ปีกระทั่งติดผล ทำให้เกษตรกรได้ผลผลิตต่ำ (ผลผลิตทะลายสดลดลง 15-35 เปอร์เซ็นต์) นอกจากผลผลิตลดลงแล้ว เกษตรกรยังต้องเสียเวลาปลูกทดแทนใหม่

ในระยะที่ผ่านมายังไม่มีเทคนิคในการตรวจความตรงตามพันธุ์และไม่มีวิธีการคัดแยกต้นแม่ดูราออกจากประชากรลูกผสมเทเนอราในระยะกล้าต้องรอจนติดผล เพื่อให้เกษตรกรได้กล้าพันธุ์ดีมาปลูก กรมวิชาการเกษตรได้แก้ไขปัญหาข้างต้นโดยการออกประกาศกรมฯ จดทะเบียนผู้ผลิตและ

จำหน่าย ต้นกล้าปาล์มน้ำมันเพื่อสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ ในกรณีเกิดปัญหาเกษตรกรซื้อต้น กล้าปาล์มไม่ได้มาตรฐานมาปลูก (ซึ่งต้องรอจนปาล์มน้ำมันติดผลอย่างน้อย 3 ปี) ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคตรวจสอบความตรงตามพันธุ์และชนิดของปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าจึงเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างยิ่งเพื่อช่วยในการควบคุมคุณภาพของต้นกล้าปาล์มน้ำมันตามพรบ.พันธุ์พืช พ.ศ.2518 (ฉบับที่ 2 พ.ศ.2541)

ปาล์มน้ำมันเป็นไม้ยืนต้นมีอายุยืน การปรับปรุงพันธุ์จึงทำได้ช้ามาก ในแต่ละรอบของการปรับปรุงพันธุ์ต้องใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 10 – 12 ปี การนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ นอกจากจะสามารถลดระยะเวลาในการคัดเลือกพันธุ์แล้ว ยังสามารถช่วยในการศึกษาและจำแนกความแตกต่าง หรือความหลากหลายของประชากรที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ด้วย งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ (๑) เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันที่รวบรวมไว้ในศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี (๒) ค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกปาล์มน้ำมันชนิดดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอราในระยะต้นกล้า (๓) ค้นหาความแตกต่างภายในยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความสูงของต้นปาล์มน้ำมัน

อุปกรณ์และวิธีการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. ตัวอย่างเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมัน ที่รวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 693 ตัวอย่างพันธุ์และพันธุ์ปาล์มน้ำมันของเอกชน 63 ตัวอย่างพันธุ์ รวม 756 ตัวอย่างพันธุ์ ประกอบด้วย

1.1 ประชากรที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ (Deli Dura) 246 ตัวอย่างพันธุ์

1.2 ประชากรที่ใช้เป็นต้นพ่อพันธุ์ (Pisifera) 151 ตัวอย่างพันธุ์ ประกอบด้วย AVROS, Calabar, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Tanzania, DAMI และ Yangambi

1.3 ประชากรลูกผสมเทเนอรา (Tenera) พันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 - 8 รวม 74 ตัวอย่างพันธุ์

1.4 ประชากรปาล์มน้ำมันต้นเตี้ย *Elaeis oleifera* และลูกผสมระหว่าง *E.guineensis x E.oleifera* จำนวน 222 ตัวอย่างพันธุ์

1.5 ประชากรปาล์มน้ำมันของบริษัทเอกชน 63 ตัวอย่างพันธุ์

2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่งบดพร้อมสาก, เครื่องปั่นเหวี่ยง, อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ฯลฯ

3. micro pipette ขนาดต่างๆ พร้อม Pipette tip

4. micro centrifuge tube ขนาด 1.5 และ 0.2 มิลลิลิตร

5. เครื่อง PCR (Gene Amp 9700)

6. เครื่อง StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems®)

7. เครื่อง Spectrophotometer

8. เครื่อง gel documentation

9. เครื่องอ่านลำดับพันธุกรรม ABI for Genetic Analyzer 377 และ 310

10. สารเคมี/วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

10.1 SSR primer ที่ติดฉลากฟลูออเรสเซนต์

10.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ เช่นไนโตรเจนเหลว, แอลกอฮอล์,คลอโรฟอร์ม, CTAB (Hexadecyl trimetylammonium bromide)

10.3 สารเคมีใช้ในขบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ dNTPs, PCR buffer, Tag DNA polymerase, primers ฯลฯ

10.4 สารเคมีที่ใช้ในการอ่านลำดับพันธุกรรมดีเอ็นเอ

10.5 ชุดสกัด Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific)

10.6 TaqMan® Genotyping Assay

10.7 TaqMan® MGB probes and primer

<u>วิธีการ</u>

I. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

1. การคัดเลือก SSR primer ในการจำแนกและวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุ์ปาล์มน้ำมัน มีขั้นตอน ดังนี้

1.1 สกัดดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน 36 ตัวอย่าง โดยการสุ่มเลือกจากประชากรปาล์มน้ำมัน 10 กลุ่ม (กลุ่ม Deli Dura ที่ใช้เป็นพันธุ์แม่ 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) ซึ่งมีการดัดแปลงเล็กน้อยโดยหทัยรัตน์ และคณะ (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 เมื่อครบเวลา เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) 700 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในหลอดโดยวิธี กลับหลอดไปมา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน 500 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตท 50 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำการล้างตะกอน 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลาย ตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (1 mM Na_2 EDTA 10 m M Tris-Hcl pH 8.0) จำนวน 50 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่ได้มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Spectrophotometer

1.2 การทำปฏิกิริยา PCR หรือการขยายยีนในหลอดทดลอง นำ SSR primer (Billotte *et al*. 2005) 100 คู่ ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ที่ปลาย 5' นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้ดีเอ็นเอ ในข้อ 1.1 เข้มข้น 50 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 forward และ reverse เข้มข้น 0.25 mM, Tag DNA polymerase 0.5 unit ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ul ด้วยเครื่อง Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 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 รอบและ 72^{0}C 7 นาที 1 รอบ

1.3 การวิเคราะห์ผลิตผล นำผลิตผล PCR ในข้อ 1.2 จำนวน 1 µl ไปแยกขนาดด้วยเครื่อง ABI prism 310 และ 377 วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Genescan และ Genotyper ตามเอกสารแนะนำการใช้คู่มือของบริษัทที่ผลิตเครื่องมือ (Anonymous, 1997) เลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิต PCR ชัดเจนและมี allele ที่แตกต่างกัน (polymorphic)

2. จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

2.1 สกัดดีเอ็นเอ ของประชากรปาล์มน้ำมันที่ปลูกรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีและพันธุ์ปาล์มของบริษัทเอกชน รวม 713 ตัวอย่างพันธุ์ โดยสกัดดีเอ็นเอตามวิธีข้อ 1.1

2.2 การขยายยีนในหลอดทดลองและการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1 เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 ng/ul ใช้เป็นแม่พิมพ์สำหรับการขยายยีนในหลอดทดลองใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการในหลอดทดลอง โดยมีองค์ประกอบและสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับข้อ 1.2 จากนั้นแยกขนาดของผลผลิต PCR ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 หรือ 377 Genetic for Analyzer วิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Genotyper วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันโดยการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (Cluster Analysis) และสร้าง Dendrogram หรือ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม SPSS.

II. การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน

การศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสในจีโนมิคดีเอ็นเอบริเวณเป้าหมายที่เกิดการกลายพันธุ์แบบแทนที่ (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 ทำการสกัดดีเอ็นเอ ของใบปาล์มตามวิธี ในข้อ 1.1 ซึ่งดัดแปลงจาก Agrawal *et al*. (1992)

2.1 การทำปฏิกิริยา PCR ขยายยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมัน

จากการรายงานของ Singh *et al.* (2013) พบว่ายีนที่ควบคุมกะลาของปาล์มน้ำมัน มีความคล้ายคลึงกัน (homologous) กับยีน seedstick ที่จัดอยู่ในกลุ่มยีน MADS-box จึงได้ใช้ไพรเมอร์ ในบริเวณอนุรักษ์ของยีนนี้ (Conserved region) ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอบริเวณนี้ของปาล์มน้ำมันทุกพันธุ์ ไปขยายยีน (amplified) บริเวณ MADS-box ของปาล์มน้ำมันทั้ง 129 ตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอไว้แล้ว โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด 20 ul ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมัน 50 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 และตั้งสภาวะ การทำงานของเครื่องPCR ดังนี้ 95°C 7 นาที 1 รอบ 94 °C 30 วินาที 55 °C 30 วินาทีและ 72 °C 30 วินาที จำนวน 30 รอบและ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที อีก 1 รอบ นำผลผลิตของ PCR ที่ได้แยกด้วยอิเล็กโตรโพรีซีส โดยใช้ 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting temperature agarose ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Star® (Cambrex Bio science, USA) นำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง Gel Documentation ตัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการแยกดีเอ็นเอเป้าหมายออกจาก agarose โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN , Germany)

2.2 การอ่านลำดับดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) ของยีน MADS-box

ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ในข้อ 2.1 นำไปทำการอ่านลำดับพันธุกรรม หรือลำดับเบส 2 ครั้งต่อแถบดีเอ็นเอ โดยอ่านลำดับเบสในทิศทาง forward primer และ reverse primer เพื่อ ยืนยันผลและได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องโดยใช้เครื่อง ABI for Genetic Analyzer 377 และ 310

2.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างดีเอ็นเอมากกว่า 2 เส้น (Multiple Sequence Alignment)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MADS-box ที่อ่านได้ในข้อ 2.2 มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์(เบส) โดยใช้โปรแกรม Clustal W2 โดยเปรียบเทียบทีละกลุ่มพันธุ์ เมื่อพบตำแหน่งของเบสตั้งแต่หนึ่งตัวขึ้นไปมีการเปลี่ยนแปลง(mutation) ในแต่ละชนิดของปาล์มน้ำมัน ทำการตรวจสอบจุดนั้นๆเพื่อยืนยันซ้ำ โดยดูจากกราฟของลำดับนิวคลีโอไทด์ (electropherogram) อีกครั้งหนึ่ง เมื่อพบตำแหน่งสนิปส์ แล้วนำข้อมูลของสนิปส์และนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปมาออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

III. การตรวจสนิปส์เพื่อวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมัน ด้วยเครื่อง Real Time PCR

3.1 การออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจสนิปส์

การออกแบบไพรเมอร์และโพรบ ใช้โปรแกรมของ TaqMan probe and primer chemistry and design ของ Applied Biosystems ซึ่งแต่ละตำแหน่งของสนิปส์จะออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ ขนาบข้างสนิปส์นั้นและออกแบบโพรบที่มีความยาว 13 คู่เบส 2 เส้น ที่เป็นคู่สมกันกับบริเวณรอบ ๆ สนิปส์ (ยกเว้นตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เป็นสนิปส์) โพรบเส้นแรกติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์สี VIC ที่ปลาย 5’ ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งสนิปส์เหมือนลำดับเบสของปาล์มน้ำมัน ต้นแม่ดูราและ

ปลาย 3’ ของโพรบติดฉลากด้วย Quencher และ Minor Groove Binder (MGB) สำหรับโพรบอีกเส้นหนึ่งจะคล้ายโพรบตัวแรก แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งสนิปส์จะเหมือนกับลำดับเบสของต้นพ่อพิสิเฟอราและติดฉลากที่ปลาย 5’ เป็นสี FAM ที่ต่างจากสีโพรบตัวแรก ทำการสั่งโพรบ และไพรเมอร์จากบริษัท Applied Biosystems สหรัฐอเมริกา และตรวจด้วยเครื่อง Real time PCR หากนำดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ดูรามาตรวจโพรบที่ตำแหน่งสนิปส์เหมือนต้นแม่ดูราเท่านั้นที่จะจับกับดีเอ็นเอของดูราได้ เมื่อมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ สี VIC ทางปลาย 5’ จะถูกตัด (Hydrolysis) ออกห่างจาก Quencher ที่อยู่ปลาย 3’ของโพรบ ทำให้ปรากฏเส้นกราฟสีเหลืองของ VIC เพิ่มขึ้นตามจำนวนก็อปปี้ของสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่ และตามจำนวนรอบของ PCR ที่เพิ่มขึ้น ถ้าตรวจดีเอ็นเอของพันธุ์ลูกผสมเทเนอราต้องให้ผลเป็นกราฟ 2 เส้นทั้งของพันธุ์แม่และพ่อ

3.2 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

นำดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันชนิดต่างๆ ทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB จากข้อ 2.1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจวิเคราะห์สนิปส์บนเครื่อง Real time PCR ด้วยไพรเมอร์และ TaqMan® MGB probes ที่ออกแบบไว้ในข้อ 3.1 โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้ 2x TaqMan® Genotyping master mix 5 ไมโครลิตร 20x Assay primer and probe 0.25 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมัน 1 ไมโครลิตรและน้ำกลั่นสำหรับ PCR 3.7 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง StepOnePlus™ Real time PCR (Applied Biosystems®, USA) โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้ 95 °C 30 วินาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95°C 20 วินาที และ 60°C 60 วินาที จำนวน 50 รอบ ค่าของสีฟลูออเรสเซนต์จะถูกบันทึกไว้ตามจำนวนรอบที่ทำPCR การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งสนิปส์จะสร้าง Allelic Discrimination ของตัวอย่างด้วยโปรแกรม StepOne ™ V 2.3 ซึ่ง allele ของพันธุ์แม่ชนิดดูราจะอยู่ที่แกน X และ Allele ของพันธุ์พ่อชนิดพิสิเฟอราจะอยู่แกน Y ลูกผสมจะอยู่กึ่งกลางระหว่างแกนทั้งสองพันธุ์ปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีที่นำมาตรวจวิเคราะห์ครั้งนี้ทราบกลุ่มพันธุ์และชนิดของปาล์มแล้ว การตรวจสนิปส์ครั้งนี้จึงถือเป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบของสนิปส์ตำแหน่งต่างๆ ด้วย

3.3 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันของบริษัทเอกชน

ได้ทำการเก็บตัวอย่างพันธุ์ปาล์มน้ำมันของบริษัทเอกชน ได้แก่ บริษัท อาร์ แอนด์ ดี เกษตรพัฒนา, บริษัทโกลเด้นเทเนอรา, บริษัทยูนิวานิชน้ำมันปาล์ม จำกัด และบริษัททักษิณปาล์ม จำกัด ซึ่งปลูกที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี จำนวน 60 ตัวอย่าง นำใบมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามข้อ 1.1 ตรวจชนิดของปาล์มน้ำมัน โดยใช้วิธีเดียวกันข้อ 3.2 แต่เลือกใช้ไพรเมอร์และโพรบตามตำแหน่งสนิปส์ที่ตรวจสอบได้จากประวัติพันธุ์ของแต่ละบริษัท และทดลองใช้ไพรเมอร์และโพรบตำแหน่งอื่นๆ ตรวจวิเคราะห์ด้วย

IV. การพัฒนาวิธีการตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันให้รวดเร็วขึ้น

ใบปาล์มน้ำมันที่โตเต็มที่แล้วการบดให้ละเอียดนั้นค่อนข้างยาก ต้องเสียเวลาบดและใช้แรงงานในขั้นตอนนี้มาก จึงจะได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพดี เพื่อให้การตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น จึงได้นำชุดสกัดสำเร็จรูปมาใช้ร่วมกับเทคนิค Nested PCR ดังวิธีการต่อไปนี้

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ ตัดปลายใบปาล์มน้ำมันให้มีขนาดประมาณ 1.5x1.5 เซนติเมตร ใส่ในถุงพลาสติก เติมน้ำกลั่นผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 300 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ค้อนหรือด้ามกรรไกรขูดใบปาล์มจากภายนอกถุงจนได้น้ำสีเขียว ดูดน้ำสีเขียว 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 ดูดน้ำใสใส่หลอดใหม่หรือเก็บไว้ในหลอดเดิมโดยไม่ให้ขุ่น สำหรับใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

4.2 การทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้เทคนิค Nested PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ MADS–box โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ของยีนนี้คือ 5’-TTGCTTTTAATTTTGCTTGAATACC-3’ และ 5’-TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC-3’ โดยมีปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 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 PCR Gene Amp 9700 โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 98°C 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 98°C 5 วินาที 58°C 30 วินาที ที่ 72°C 20 วินาที จำนวน 25 รอบ และ 72°C 1 นาที 1 รอบ ทำปฏิกิริยา PCR เช่นนี้อีก แต่เพิ่มรอบการขยายยีนเป็น 30, 35 และ40 รอบ ตามลำดับ

4.3 การตรวจวิเคราะห์สนิปส์แยกชนิดของปาล์มน้ำมัน ด้วย Real time PCR โดยนำผลผลิตจาก Nested PCR ข้อ 4.2 มาเจือจาง 500 เท่า (ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ผสมน้ำสำหรับทำ PCR 499 ไมโครลิตร) จากนั้นเตรียมปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับข้อ 3.1 โดยใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางไว้ 1 ไมโครลิตรเป็นแม่พิมพ์ องค์ประกอบของปฏิกิริยาและการตั้งเครื่องทำเช่นเดียวกับข้อ 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 ตัวสุดท้ายทางปลาย 3’เป็นตำแหน่งสนิปส์และเปลี่ยนอีก 2 ตำแหน่งถัดมา ให้จับกับพันธุ์ที่เป็นชนิดดูรา ออกแบบไพรเมอร์ 3 เส้นลักษณะเดียวกัน แต่ทำการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ใหม่ของไพรเมอร์ 3 ตัวสุดท้ายทางปลาย 3’ ให้จับกันกับตำแหน่งสนิปส์ของปาล์มน้ำมันชนิดพิสิเฟอราอีก 3 เส้น ทำเช่นนี้ทุกตำแหน่งรวมออกแบบและสังเคราะห์ forward primer 24 เส้น สำหรับ reverse primer ทำการออกแบบไว้คนละตำแหน่งโดยให้ผลผลิตของ PCR ของชนิดดูรา สั้นกว่าของชนิดพิสิเฟอรา เพื่อที่จะได้ตรวจสอบเทเนอราได้ง่ายขึ้น โดยใช้ agarose gel electrophoresis ทั่วไป

VI. การค้นหาตำแหน่ง SNPs ภายในยีน Ga20ox-2 ของลูกผสมกลับระหว่าง *Elaeis oleifera* และ *Elaeis guineensis*

5.1 สกัดดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ประชากรปาล์มน้ำมันลูกผสมกลับระหว่าง *E. oleifera* และ *E. guineensis* ที่มีลักษณะเตี้ย คือ Eagle 3 ตัวอย่าง, Aztage 3 ตัวอย่าง, Tition 3 ตัวอย่าง, Emerald 3 ตัวอย่าง, Nemo 3 ตัวอย่าง, Tornado 3 ตัวอย่าง, Compacta x Ekona 10 ตัวอย่าง, Ekona x Shot 5 ตัวอย่าง, Compacta x Ghana 4 ตัวอย่าง, Compacta x Nigeria 3 ตัวอย่าง, Golden Tenera 3 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างที่นำมาศึกษา จำนวน 43 ตัวอย่าง

5.2 ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับลำดับเบสของยีน *Ga20ox-2* บริเวณ exon 1, 2 และ 3 จำนวน 6 คู่ ทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างปาล์มน้ำมันโดยสุ่มจากตัวอย่างข้อ 5.1 มา 6 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ 1 คู่ต่อหนึ่งปฏิกิริยาคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดีมา 2 คู่เพื่อใช้ในการอ่านลำดับเบสของยีน *Ga20ox-2*

5.3 การทำปฏิกิริยา PCR หรือการขยายยีนในหลอดทดลอง นำไพรเมอร์ 2 คู่

(Forward1) 5’-CAAATGGAACCAACTCCCACCTCC-3’,

(Reverse1) 5’-TCGCCGATGTGATGACAAGAGC-3’และ

(Forward3) 5’-GCCCTATCAAATGGCCGGTACAAG-3’,

(Reverse 3) 5’-GCAGGGCATCACATGACTGAGCCTT-3’

นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้ดีเอ็นเอ ในข้อ 5.1 เข้มข้น 50 ng เป็นแม่พิมพ์ ซึ่งมีองค์ประกอบและสภาวะการทำปฏิกิริยาPCR ดังนี้คือ Tris – HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, gelatin 0.01%, dNTP 1.6 mm ใช้ไพรเมอร์ forward และ reverse เข้มข้น 0.25 mM, Tag DNA polymerase 0.5 unit ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ul ด้วยเครื่อง Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้ 95^0C 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94^0C 30 วินาที 55 ^{0}C 30 วินาที 72^0C 30 วินาที 30 รอบและ 72^0C 7 นาที 1 รอบ นำผลผลิตของ PCR ที่ได้แยกด้วยอิเล็กโตรโพรีซีส โดยใช้ 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting temperature agarose ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Star® (Cambrex Bio science, USA) นำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Gel Documentation ตัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการแยกดีเอ็นเอเป้าหมายออกจาก agarose โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN , Germany)

5.4 การอ่านลำดับดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) ของยีน *Ga20ox-2*

ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ในข้อ 5.3 นำไปทำการอ่านลำดับพันธุกรรม หรือ ลำดับเบส 2 ครั้งต่อแถบดีเอ็นเอ โดยอ่านลำดับเบสในทิศทาง forward primer และ reverse primer เพื่อยืนยันผลและได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง โดยใช้เครื่อง ABI for Genetic Analyzer 377 และ 310

5.5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างดีเอ็นเอมากกว่า 2 เส้น (Multiple Sequence Alignment)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Ga20ox-2* ที่อ่านได้ในข้อ 5.4 มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (เบส) โดยใช้โปรแกรม Clustal W2 โดยเปรียบเทียบทีละกลุ่มพันธุ์ เมื่อพบตำแหน่งของเบสตั้งแต่หนึ่งตัวขึ้นไปมีการเปลี่ยนแปลง (mutation) หรือช่วงลำดับเบสที่หายไประหว่าง *E.oleifera,* Deli dura ลูกผสมกลับระหว่าง *E.oleifera*และ *E.guineensis* ทำการตรวจสอบจุดนั้นๆ เพื่อยืนยันซ้ำโดยดูจากกราฟของลำดับนิวคลีโอไทด์ (electropherogram) อีกครั้ง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

I. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

1. การคัดเลือก SSR primer

ในการจำแนกและวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากการสุ่มเลือกปาล์มน้ำมัน 36 ตัวอย่าง จากประชากรที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ (Deli Dura) และประชากรที่เป็นพ่อพันธุ์ (Pisifera) มาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ ที่เหมาะสมในการใช้ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน พบว่ามีไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในกลุ่มต่างๆ นี้มีจำนวนมาก จึงทำการคัดเลือก primer ที่ดีที่สุดไว้ 13 คู่ ได้แก่ mEgCIR0074, mEgCIR0173, mEgCIR0804, mEgCIR3428, mEgCIR3641, mEgCIR3643, mEgCIR3698, mEgCIR0874, mEgCIR2215, mEgCIR2577, mEgCIR3519, mEgCIR3593 และ mEgCIR3755 เกณฑ์การคัดเลือกโดยดูจากจำนวน alleles หรือแถบดีเอ็นเอที่พบมากกว่าในปฏิกิริยาขยายยีนในหลอดทดลอง (PCR) ซึ่งที่พบมีตั้งแต่ 2 ถึง11 แถบหรือ alleles

2. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ไพรเมอร์ ที่คัดเลือกไว้ 13 คู่ จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากรปาล์มน้ำมันที่เป็นพ่อและแม่พันธุ์ในการผลิตปาล์มน้ำมันลูกผสม 471 ต้นของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ทำให้ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 6,123 ข้อมูล ในจำนวนนี้มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากร Deli Dura ที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ 246 ต้น ประชากร ที่ใช้เป็นต้นพ่อ (Pisifera) กลุ่มต่างๆ 151 ต้น และกลุ่มประชากรเทเนอรา (Tenera) ที่ส่งเสริมให้ปลูกเป็นการค้า (สุราษฎร์ธานี 1 -8) 74 ต้น พบว่าในจำนวนไพรเมอร์ 13 คู่ที่ใช้ ให้ alleles หรือแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันถึง 95 แถบ โดยที่แต่ละไพรเมอร์ให้ alleles ที่ต่างกันหรือมีความผันแปรตั้งแต่ 5 –11 แถบ หรืออาจกล่าวว่าโดยเฉลี่ยแต่ละไพรเมอร์ให้ alleles ที่ต่างกันถึง 7 แบบ โดยที่ไพรเมอร์ mEgCIR0874 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันมากสุดถึง 11 แบบ ซึ่งมีขนาด ตั้งแต่ 215, 217, 221, 231, 235, 237, 239, 247, 249, 255 และ 257 คู่เบส รองลงมาคือไพรเมอร์ mEgCIR0804 และ mEgCIR2215 ที่ให้แถบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันถึง 10 และ 9 แถบตามลำดับ ขณะที่ไพรเมอร์ mEgCIR3698 ให้ alleles หรือแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันน้อยสุดเพียง 5 แถบ คือขนาด 164, 166, 172, 174 และ 182 คู่เบส

เป็นที่น่าสังเกตว่าไพรเมอร์เกือบทั้งหมดให้ขนาดของ alleles ที่ต่างกันเพียง 2 คู่เบสเท่านั้น เช่นไพรเมอร์ mEgCIR0074 ให้ alleles ที่ต่างกัน 7 แบบ ที่มีขนาด ความยาวตั้งแต่ 118, 120, 122, 124, 126, 128 และ 130 คู่เบส การที่ alleles ส่วนใหญ่มีความยาวต่างกันเพียง 2 คู่เบส ทำให้ผู้ที่จะนำไพรเมอร์นี้ไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันต้องระมัดระวังในการอ่านค่า มิเช่นนั้นจะผิดพลาดได้ง่าย สำหรับขนาดและจำนวน alleles ที่พบในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอครั้งนี้แสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2 ซึ่งจะพบว่าแต่ละตำแหน่งของไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ให้ผลผลิตPCR ที่มี heterozygosity ต่ำ หรือหมายความว่าตำแหน่งเหล่านี้ขนาดของ alleles พ่อกับแม่เท่ากัน (homozygous) เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นไพรเมอร์ mEgCIR0173และmEgCIR0804 สำหรับตารางที่ 3 เป็นตารางสรุปขนาดของ alleles ที่ได้จากไพร์เมอร์ 13 คู่ เป็นประชากรแม่พันธุ์ (Deli Dura) และประชากรพ่อพันธุ์ 10 กลุ่ม ข้อมูล alleles นี้สามารถคะเน alleles ของลูกผสมชนิด Tenera ได้จึงมีประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา ตัวอย่างเช่น เมื่อดูแถวแรก primer mEgCIR0074 จะพบว่าประชากรที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์เฉพาะกลุ่ม Tanzania มีแถบดีเอ็นเอที่พบในปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้เพียง 1 แถบคือ ขนาด 122 คู่เบส ขณะที่แม่พันธุ์ Deli Dura ใน primer เดียวกันให้แถบดีเอ็นเอเดียวเช่นกัน คือ ขนาด 120 คู่เบส ดังนั้นลูกผสม Tenera ที่ได้จากคู่ผสมนี้จะมีแถบดีเอ็นเอ 120 และ 122 คู่เบส ซึ่งอาจใช้เป็นแถบเอกลักษณ์ของคู่ผสมนี้ได้ด้วย และจากตารางที่ 3 เมื่อดูความแตกต่างภายในประชากรแต่ละกลุ่ม จะพบว่า primer ทั้ง 13 คู่นี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของประชากร Deli Dura ได้เลย ยกเว้นไพรเมอร์ mEgCIR0804 ที่มี alleles ต่างกัน 195 และ 201 คู่เบส สำหรับประชากรพ่อพันธุ์กลุ่มอื่นที่มีความผันแปรน้อยภายในกลุ่ม ได้แก่ ประชากร Calabar, Tanzania และ Yangambi นอกนั้นมีความผันแปรภายในประชากรค่อนข้างสูง ดังเช่นประชากร AVROS ตัวอย่างเช่น เมื่อทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย primer mEgCIR2215 ให้แถบ ดีเอ็นเอต่างกันถึง 4 แถบ คือ 100, 118, 120 และ 124 โดยในแต่ละแถบยังมีการกระจายตัว คือ ส่วนหนึ่งมีแถบและอีกส่วนหนึ่งไม่มีแถบ ฉะนั้น การใช้ไพรเมอร์ร่วมกันหลายๆ ไพรเมอร์จึงจะทำให้สามารถจำแนกกลุ่มพันธุ์ของปาล์มน้ำมันได้ อย่างไรก็ตามเมื่อนำพ่อและแม่ของสุราษฎร์ธานี 1 – 8 มาตรวจสอบ alleles จากตารางที่ 3 พบว่าใช้ไพรเมอร์อย่างน้อย 3 คู่ คือ mEgCIR3428, mEgCIR3519 และ mEgCIR0874 เพียงพอที่จะจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1–8 ได้ สำหรับในกรณีที่มีความผันแปรภายในประชากรแต่ละพันธุ์อาจต้องใช้ไพรเมอร์อื่นร่วมด้วย คือ primer mEgCIR0804, mEgCIR3643 และmEgCIR3593 แต่เนื่องจาก mEgCIR3519 และ mEgCIR0874 ได้ขนาดของ alleles ใกล้เคียงกัน จึงอาจต้องมีการออกแบบปรับเปลี่ยนขนาดของ alleles ใหม่

ข้อมูลจากการการศึกษาความหลากหลายทางพันธุ์กรรมครั้งนี้ถูกเก็บไว้ในโปรแกรมเอกซ์เซล โดยเก็บในรูปขนาดความยาวและจำนวน alleles แต่ข้อมูลในรูปเอกซ์เซลนี้จะมีความยุ่งยากในการสืบค้นข้อมูล จึงได้พัฒนาระบบฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันขึ้น เพื่อรองรับการสืบค้น แก้ไข หรือเพิ่มเติมข้อมูล เช่น พันธุ์ใหม่ๆ และไพรเมอร์ที่เพิ่มขึ้นหรือเปรียบเทียบ alleles ระหว่างพันธุ์ได้ นอกจากนั้นยังนำข้อมูลนี้ไปศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้ โดยการนำไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม แล้วนำไปเขียน Phylogenetic

tree หรือ dendrogram ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าสามารถแบ่งประชากรปาล์มน้ำมันออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม A และ B ซึ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากกว่า 90% จะเห็นว่าในกลุ่ม A ประกอบด้วยพันธุกรรมของประชากร La Me ซึ่งความแตกต่างภายในประชากรขึ้นกับคู่ผสมคือ IRH 618 : 158T self กับ IRH618 : 26T self สำหรับกลุ่ม B สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย C กับ D ซึ่งมีความต่างกันทางพันธุกรรม 70เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่ม C มีประชากร Nigeria และCalabar ซึ่งมาจากคู่ผสมเดียวกันหรือพันธุกรรมใกล้กัน แต่มีชื่อต่างกัน ทั้งนี้ เนื่องมาจากถูกนำไปพัฒนาและคัดเลือกจากคนละสถานที่ คือ ที่เมืองCalabar, Aba, Ufama และ Benin ในประเทศไนจีเรีย (Rosenquist, 1985) ในกลุ่ม D ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อยที่มีพันธุกรรมระหว่างกลุ่มย่อยแตกต่างกันมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ โดยที่กลุ่ม E มีประชากรกลุ่มYangambi แยกจาก Ghana และ Nigeria ในกลุ่มย่อย F ประกอบด้วยประชากร AVROS, Tanzania และDAMI ซึ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม 20 เปอร์เซ็นต์ หรือค่อนข้างใกล้ชิดกัน กลุ่มสุดท้ายคือ กลุ่มย่อย G ที่ประกอบด้วยประชากร Ekona, AVROS (คู่ผสม HC129:933T self) และประชากร Deli Dura ที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ก็ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย เป็นที่น่าสังเกตว่าประชากร Nigeria และ AVROS เมื่อวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม จะพบว่าถูกจัดอยู่ใน 2 กลุ่มคือกลุ่ม C กับ G และF กับ G ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นผลมาจากพันธุกรรมของพ่อและแม่ที่ต่างกันมาก

จากภาพที่ 1 แสดงว่าความสัมพันธ์ของประชากรปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์สำหรับผสมกันประชากรแม่พันธุ์ที่เป็น Deli Dura ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มร่วมกับประชากรพ่อ ประชากร Deli Dura จะมีความคล้ายกับประชากรในกลุ่ม AVROS มากที่สุดรองลง มาได้แก่ DAMI ฉะนั้นในการจะสร้างลูกผสมเทเนอรา ที่ได้จากการผสมต้นแม่ชนิด Deli Dura กับต้นพ่อพิสิเฟอรา ให้มีฐานพันธุกรรมที่กว้าง ต้องผสมพ่อแม่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากๆ คือการผสม Deli Dura กับ La Me รองลงมา คือ 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 mEgCIR0804 ให้ alleles ที่ต่างกัน 2 ขนาด คือ 195 และ 201 คู่เบส จะพบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของประชากรต้นแม่ได้เลย จึงได้เลือกไพรเมอร์ชุดใหม่ สำหรับแยกความแตกต่างของประชากร Deli Dura อย่างเดียวพบว่า primer 19 คู่ สามารถให้ polymorphic ของประชากร Deli Dura ได้ดีที่สุด ได้แก่ mEgCIR0246, mEgCIR0280, mEgCIR0445, mEgCIR0521, mEgCIR2332, mEgCIR3286, mEgCIR3298, mEgCIR3311, mEgCIR3383, mEgCIR3402, mEgCIR3555, mEgCIR3653, mEgCIR3655, mEgCIR3668, mEgCIR3684, mEgCIR3691, mEgCIR3705, mEgCIR3813 และ mEgCIR3869 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 7 คู่ (mEgCIR0246, mEgCIR0445,

mEgCIR3286, mEgCIR3298, mEgCIR3684, mEgCIR3691 และ mEgCIR3869) ให้ alleles ต่างกัน 3 แบบ ส่วนไพรเมอร์อื่นๆให้ alleles ที่ต่างกันเพียง 2 แบบเท่านั้นและส่วนใหญ่ให้ค่า heterozygosity ค่อนข้างต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดเหล่านี้ไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มและทำ dendrogram (ไม่ได้แสดงภาพของผล) โดยใช้โปรแกรม SPSS พบว่า ฐานพันธุกรรมของ Deli Dura ระหว่างประชากรที่มีพ่อแม่ต่างกันจะมีความแตกต่างกันค่อนข้างสูง 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

นอกจากนั้นยังพบว่าที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีมีการรวบรวมพันธุ์ลูกผสมข้ามชนิดหรือระหว่างสปีชีส์ (Interspecific hybridization) ระหว่างปาล์มน้ำมันพันธุ์แม่ Deli Dura (*Elaeis guineensis*) กับ *E.oleifera* ซึ่งมีพันธุกรรมต้นเตี้ยจำนวน 12 คู่ผสม งานวิจัยนี้จึงได้ทำการสุ่มมาทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอคู่ผสมละ 1 สายพันธุ์ โดยใช้ primer ชุดเดียวกัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกพันธุ์ และใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาเปรียบเทียบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับกลุ่มพันธุ์ Deli Dura พบว่าลูกผสม *E.guineensis* x *E.oleifera* มีความคล้ายคลึงกับกลุ่มพันธุ์ Deli Dura (CH133 x 1288D SELF) มากที่สุด และในปี 2555 ได้นำพันธุ์ปาล์มต้นเตี้ยและลูกผสมดังกล่าวที่รวบรวมไว้มาจัด ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพิ่มเติม สำหรับใช้ประโยชน์ในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์ปาล์ม น้ำมันต้นเตี้ยต่อไป โดยจัดทำลายพิมพ์ DNA ของประชากรปาล์มน้ำมัน *E.guineensis* x *E.oleifera* จำนวน 150 ตัวอย่างพันธุ์และปาล์มน้ำมันต้นเตี้ย (*E.oleifera*) จำนวน 32 ตัวอย่างพันธุ์ รวม 182 ตัวอย่างพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์เพิ่มเติมอีก 32 คู่ และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลหาความหลากหลายทางพันธุกรรม และสามารถแยกความแตกต่างของประชากรปาล์มน้ำมัน พบแถบดีเอ็นเอหรือ alleles ที่มีความแตกต่างกัน 175 alleles รวมข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกลุ่มนี้มี 5,824 ข้อมูล (records) ซึ่งได้ถูกนำไปเพิ่มในฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันรวมทั้งสิ้น 13,771 ข้อมูล เพื่อใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์อย่างเป็นระบบต่อไป

II. การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน

จากการสกัดดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันทั้งสามชนิดคือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา จำนวน 10 กลุ่ม พันธุ์ รวม 129 ตัวอย่างพันธุ์ แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อขยายยีนในหลอดทดลองของยีน MADS – box โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ (Conserved region) พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลผลิต PCR ชัดเจน ความยาวเท่ากันคือ 537 คู่เบส เมื่อนำผลผลิตของ PCR นี้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้งสองทิศทางคือ ทาง forward primer และ reverse primer แล้วนำผลที่ได้มาตรวจสอบยืนยัน ความถูกต้องของสาย

นิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องนี้ไปทำการเปรียบเทียบกันมากกว่า 2 สาย (Multiple sequence alignment) พบว่าบริเวณของยีน MADS – box มีตำแหน่งสนิปส์ หรือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงไป 5 แห่ง คือ นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 220, 256, 272, 279 และ 308 ซึ่งแต่ละตำแหน่งเหล่านี้ยังสามารถบ่งชี้ชนิดของปาล์มน้ำมันในแต่กลุ่มได้ ดังนี้

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 และพิสิเฟอราของปาล์มตระกูลเหล่านี้จะมีนิวคลีโอไทด์เป็น C ดังนั้น เทเนอราซึ่งเป็นheterozygous 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

5. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์สุดท้ายที่พบ คือ 308 (SNP_{LaAv}) เป็นตำแหน่งสนิปส์ ที่กลุ่มพันธุ์ Deli Dura ปาล์มชนิดดูราของ La Me และAVROS เป็น C และพิสิเฟอราของกลุ่มเหล่านี้เป็น A ฉะนั้น เทเนอราของกลุ่มนี้จึงเป็น C/A ดังแสดงในภาพที่ 2 จากภาพ ตำแหน่งในสายนิวคลีอิกแอซิคใดๆ ที่ผันแปรมีนิวคลีโอไทด์ 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 ได้ทำการตรวจสอบยืนยันซ้ำจากกราฟ ของสายนิวคลีโอไทด์ (electropherogram) ที่ได้จากการอ่านลำดับพันธุ์กรรมของดีเอ็น (DNA Sequencing) แสดงในภาพที่ 3 (a)-(e) และในตารางที่ 4 ได้แสดงข้อมูลตำแหน่งสนิปส์ ที่ใช้ในการตรวจชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ ได้แก่ Deli Dura, DAMI, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Tanzania, Yangambi, AVROS และ Calabar ชนิดของผล (Fruit Type) และจำนวน ตัวอย่างที่นำไปอ่านลำดับพันธุกรรม

Singh *et al.*(2013) ได้รายงานว่า พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (SNP) 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งแรกเป็นของ Congo (AVROS) และ Tanzania สอดคล้องกับตำแหน่ง SNP_{TaYa} ของการศึกษาครั้งนี้ แต่แตกต่างกันตรงที่การศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของ AVROS ในตำแหน่งนี้ กลับพบในตำแหน่ง SNP_{LaAv} สำหรับสนิปส์ตำแหน่งที่สองพบในกลุ่มพันธุ์ Nigeria สอดคล้องตรงกับตำแหน่ง SNP_{ENGC} ของรายงานฉบับนี้ ซึ่งจากการทดลองนี้ มีการพบว่าตำแหน่งนี้ นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (SNP) ของ Nigeria แล้ว ยังพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์กลุ่ม Ekona Ghana และ Calabar ด้วย อนึ่งจากผลของการ อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน MADS-box ครั้งนี้ พบตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มเติมอีก 3 แห่ง ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกยัง

ไม่เคยมีรายงานมาก่อน คือ SNP_{Tan} SNP_{DA} และ SNP_{LaAv} สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมันได้

Singh *et al.*(2013) ได้กล่าวถึงเหตุผลเพิ่มเติมว่าการเปลี่ยนแปลงของหนึ่งนิวคลีโอไทด์ ในส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนนั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Leucine เป็น proline และ lysine เป็น asparagines ที่ในบริเวณ Conserved DNA binding และ dimerization domain ของยีน MADS-box และคาดว่ากรดอะมิโน ตัวใหม่ไม่สามารถจะจับตัวกับโปรตีนนั้น เพื่อสร้างกะลา (Shell) ของปาล์มน้ำมัน จึงทำให้ผลชนิดพิสิเฟอราไม่มีกะลา การทดลองครั้งนี้จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ ในช่วงที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดเปลี่ยนเป็นลำดับโปรตีน (Protein sequence) โดยใช้โปรแกรม ExPASy พบว่าตำแหน่งสนิปส์หรือตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของ codon ในบริเวณ MADS-box ยีนของปาล์มน้ำมันที่พบ 5 แห่ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนทุกตำแหน่ง ดังแสดงในภาพที่ 4

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

III. การตรวจวิเคราะห์แยกชนิดของปาล์มน้ำมัน โดย Real Time PCR

3.1 ออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจสนิปส์ ออกแบบไพรเมอร์ และโพรบสำหรับตำแหน่งสนิปส์ที่พบแต่ละตำแหน่ง โดยใช้โปรแกรม TaqMan 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 ไม่ได้ทำการออกแบบโพรบและไพรเมอร์ ไว้เพราะสามารถใช้ไพรเมอร์และโพรบของ SNP_{TaYa} ได้เช่นกัน ดังภาพที่ 5 เป็นการแสดง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 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 ตัวอย่างพันธุ์ที่ทราบประวัติพันธุ์และมีการพิสูจน์ทราบแล้วว่าเป็นปาล์มน้ำมันชนิดใดบ้าง เพื่อยืนยันความใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบไว้ตามข้อ 3.1 ผลการตรวจวิเคราะห์จาก Allelic Discrimination ให้ข้อมูลชนิดของพันธุ์เป็น ดูรา พิสิเฟอรา และ เทเนอรา ถูกต้องทุกพันธุ์ จากภาพที่ 6 (a) เป็นการตรวจปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ AVROSโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบของ SNP_{LaAv} (C/A) ใน Amplification plot จะเห็นว่า

สีฟลูออเรสเซนต์ VIC กับ FAM จะขึ้นให้เห็นในรอบที่ 24-26 ของเครื่อง Real Time PCR เมื่อทำการวิเคราะห์ผลใน Discrimination plot ก็ให้ผลที่ถูกต้อง ในภาพที่ 6 (b) เป็นผลการตรวจวิเคราะห์ปาล์มน้ำมันของ Tanzania และ La Me โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบ SNP_{TaYa} (A/T) และ SNP_{LaAv}(C/A) ตามลำดับ แต่เมื่อลองใช้ไพรเมอร์และโพรบ SNP_{Da} (C/G) มาตรวจประชากรทั้ง 2 กลุ่ม จะพบการกระจายของ allele ใน Allele Discrimination plot กระจัดกระจายไม่สามารถอ่านผลได้

3.3 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันบริษัทเอกชน

ผลการใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้น มาตรวจปาล์มของบริษัทเอกชน ได้แก่ บริษัท โกลเด้น เทเนอรา จำกัด, บริษัทยูนิวานิช น้ำมันปาล์ม จำกัดและบริษัท ทักษิณปาล์ม ซึ่งปลูกไว้ที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี จำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่าพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้งหมดเป็นชนิดเทเนอรา แต่การเก็บตัวอย่างครั้งนี้พบปาล์มสายพันธุ์ Compact ของบริษัท อาร์แอนด์ ดี เกษตรพัฒนา ซึ่งยังไม่เคยมีประวัติพันธุ์ จึงจะต้องนำตัวอย่างมาศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

IV. ผลการพัฒนาวิธีการตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันให้รวดเร็วขึ้น

ผลจากการตัดปลายใบเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 1.5x1.5 เซนติเมตร ใส่ถุงที่มีน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร แล้วใช้ค้อนขูดใบปาล์มน้ำมันจากภายนอกถุงให้น้ำเป็นสีเขียวอ่อน แล้วดูดใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตรที่มี Dilution buffer อยู่ 18ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำน้ำใสส่วนบนไปทำ PCR พบว่าได้ผลผลิต PCR การสกัดดีเอ็นเอ จากใบปาล์มวิธีนี้สะดวกและรวดเร็วมาก ได้ทดลองนำน้ำใสส่วนบน ที่สกัดได้ไปตรวจวิเคราะห์ชนิดของปาล์ม โดยใช้ไพรเมอร์กับโพรบที่ออกแบบไว้บนเครื่อง Real time PCR ปรากฏว่าไม่มีผลผลิตของ PCR เลย แม้จะตั้งเครื่อง Real time PCR ถึง 50 รอบแล้วก็ตาม ดังนั้น จึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้อย่างรวดเร็วข้างต้น 1 ไมโครลิตร ไปทำ Nested PCR ก่อน โดยใช้ ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ซึ่งสามารถจะขยายยีนในส่วนที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ได้ทุกพันธุ์ ก่อนจำนวน 25, 30, 35 และ 40 รอบ จากนั้นเจือจางผลผลิตของ PCR 500 เท่า จึงนำไปตรวจวิเคราะห์ ชนิดของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบไว้ สำหรับตรวจสนิปส์ ปรากฏว่าการทำ Nested PCR 35 กับ 40 รอบ ตรวจพบผลผลิต PCR เร็วมากในรอบที่ 14-18 แต่เมื่อวิเคราะห์ผลใน Allelic Discrimination plot พบว่าผลการวิเคราะห์กระจัดกระจายไม่สามารถสรุปผลได้ แต่การทำ Nested PCR 30 รอบ ให้ผลดีที่สุดไม่แตกต่างจากการใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธี CTAB การพัฒนาวิธีการตรวจนี้ ทำให้ผู้ปฏิบัติทำงานได้สะดวกรวดเร็วขึ้นมาก

V. การพัฒนาวิธีตรวจสนิปส์เพื่อแยกชนิดของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่อง PCR ทั่วไป

จากการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสนิปส์ทั้ง 4 แห่ง เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน เมื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์พบว่าสามารถตรวจสนิปส์ได้ดี 3 ตำแหน่ง ดังนี้

ตำแหน่ง SNP_{DA} ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ Mut218-D-F1 5′CGGCAGGTCACTTTCTGCAA**GC** 3′,Mut218-D-R1 5′GCTTGGCCATAGAACAAATGAAGC 3′ และ Mut218-P-F1 5′CGGCAGGTCACTTTCTGCAA**GG** 3′, Mut218-P-R5′TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC 3′ ไพรเมอร์คู่แรกในตำแหน่งนี้ให้ผลผลิตของ PCR ขนาด 200 คู่เบส กับปาล์มน้ำมัน DAMI ชนิดดูราและเทเนอรา ไม่ให้ผลกับพิสิเฟอรา ไพรเมอร์คู่ที่สอง

ให้ ผลผลิต PCR ขนาด 276 คู่เบส กับปาล์มน้ำมัน DAMI ชนิด พิสิเฟอรา กับ เทเนอรา แต่ไม่ได้ให้ผลกับดูรา ดังแสดงในภาพที่ 7 (a)

ตำแหน่ง SNP_{TAYA} ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ Mut106-D-F3 5′GCCGAAATGGACTGCTGAAG**TAA** 3′ Mut106-D-R1 5′GCTTGGCCATAGAACAAATGAAGC 3′ และ Mut106-P-F1 5′GCCGAAATGGACTGCTGAAG**GAT** 3′ Mut106P-P-R 5′ TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC 3′ โดยที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ นี้ สำหรับตรวจสนิปส์ของปาล์มน้ำมัน Tanzania กับ Yangambi โดยที่ไพรเมอร์คู่แรกให้ผลผลิต PCR ขนาด 172 คู่เบส กับ ดูรา และ เทเนอรา และ ไพรเมอร์คู่ที่สองให้ผลผลิต PCR กับ พิสิเฟอรา กับ เทเนอรา ขนาด 264 คู่เบส แสดงในภาพที่ 7 (b) สำหรับสนิปส์ในตำแหน่ง SNP_{LaAv} และ SNP_{ENGC} การออกแบบไพรเมอร์ เพื่อตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ PCR ทั่วไปยังไม่สำเร็จต้องทำการทดสอบปรับสภาวะการทำ PCR หรือออกแบบไพรเมอร์ คู่ใหม่เพิ่มเติมต่อไป

VI. การค้นหาตำแหน่ง SNPs ภายในยีน Ga20ox-2 ของ *Elaeis oleifera* , Deli dura และลูกผสมกลับระหว่าง *Elaeis oleifera* และ *Elaeis guineensis*

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสมากกว่า 2 ชุด โดยเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง *E.oleifera,* Deli dura และลูกผสมกลับระหว่าง *E.oleifera* และ *E.guineensis* พบว่าระหว่าง *E.oleifera* และ Deli dura มีลำดับเบสที่แตกต่างกัน 20 จุดภายในบริเวณ exon ที่ 1 และ 2 ดังภาพที่ 8 สำหรับลูกผสมกลับระหว่าง *E.oleifera* และ *E.guineensis* ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส พบว่าลูกผสมกลับ เหล่านี้มีลำดับเบสของยีน *Ga20ox-2* คล้าย Deli dura เกือบทั้งหมด

นอกจากนี้ ผลจากการเปรียบเทียบลำดับเบสมากกว่า 2 ชุด โดยเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง *E. oleifera,* Deli dura, ลูกผสมกลับระหว่าง *E.oleifera* และ *E.guineensis* และปาล์มต้นเตี้ยลูกผสมระหว่าง Deli dura กับ Dumpy AVROS (Golden Tenera) พบว่า ในส่วนปลายบริเวณยีน *Ga20ox-2* นั้น ลูกผสมกลับระหว่าง *E.oleifera* และ *E.guineensis* มีลำดับเบสคล้าย Deli dura เกือบทั้งหมด แต่ในปาล์ม Golden Tenera มีลำดับเบส 9 ตำแหน่งที่หายไป ดังภาพที่ 9 ซึ่งลำดับเบสที่หายไปนี้ไม่พบในปาล์มน้ำมันต้นเตี้ย *E.oleifera* หรือลูกผสมกลับระหว่าง *E.oleifera* และ *E.guineensis* จึงคาดได้ว่าลำดับเบสที่หายไปเกิดขึ้นเฉพาะในปาล์มน้ำมันพันธุ์ Dumpy AVROS และเกี่ยวข้องกับลักษณะเตี้ยของ Golden Tenera

ทั้งนี้ ตำแหน่งที่หายไปข้างต้นอยู่ในบริเวณปลาย 3’ของ mRNAของยีน *Ga20ox-2* และพบว่าเป็นส่วนที่ไม่ถูกแปรรหัส (3’ non coding region) โดยทั่วไป ในบริเวณนี้จะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแปรรหัสโดย miRNA และการควบคุมความเสถียรของmRNA เพื่อพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่ง 9 เบสที่หายไปในยีน *Ga20ox-2* ของปาล์มน้ำมันต้นเตี้ย Golden Tenera กับลักษณะต้นเตี้ยของปาล์มน้ำมันนี้ต้องมีการศึกษาตัวอย่างในปริมาณที่มากขึ้นต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite จำนวน 13 คู่ที่เหมาะสำหรับใช้จำแนก และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นพ่อและต้นแม่รวม 10 กลุ่มพันธุ์ (Deli Dura, AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me) พบว่า La Me มีพันธุกรรมที่แตกต่างจากประชากรกลุ่มอื่นๆ มากที่สุด รองลงมาได้แก่ Calabar, Nigeria, Tanzania และ Ghana สำหรับกลุ่ม AVROS มีพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกับ Deli Dura ที่ใช้เป็นประชากรแม่มากสุด รองลงมาคือ DAMI แต่เครื่องหมายโมเลกุล 13 คู่นี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างภายในประชากรแม่พันธุ์ Deli Dura ได้ จึงค้นหาเครื่องหมาย โมเลกุลเพิ่มเติมอีก 19 คู่ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอภายในประชากร Deli Dura ได้ถึง 44 alleles นอกจากนี้ยังได้เครื่องหมายโมเลกุลอีก 32 คู่ในการศึกษา ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันต้นเตี้ยที่เป็นลูกผสมระหว่างสปีชีส์ (*E.guineensis x E.oleifera*) จำนวน 182 ตัวอย่างพันธุ์ ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 13,771 ข้อมูล แสดงในรูปความยาว alleles ถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสำหรับใช้ในการสืบค้นจำแนกตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ และใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ได้

จากการใช้เทคนิคสนิปส์ตรวจสอบยีน MADs-box สำหรับแยกชนิดของปาล์มน้ำมันพบสนิปส์ 5 ตำแหน่งที่สามารถจำแนกประชากรแม่พันธุ์ดูรา พ่อพันธุ์พิสิเฟอรา และลูกผสมเทเนอราทั้งหมดที่ศึกษาได้ดังนี้คือ สนิปส์ SNP_{ENGC} (T/C), SNP_{TaYa} (A/T), SNP_{DA} (C/G), SNP_{LaAv} (C/A) และ SNP_{Tan} (C/ G) สำหรับสนิปส์ 3 ตำแหน่งหลังเป็นการค้นพบครั้งแรกในการศึกษานี้

นอกจากนั้นยังประสบความสำเร็จในการออกแบบโพรบและไพร์เมอร์สำหรับตรวจสอบปาล์มน้ำมันชนิดดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา โดยใช้เครื่อง Real-Time PCR ตลอดจนได้ไพร์เมอร์ 2 คู่ที่ใช้กับเครื่อง PCR ทั่วไป

สำหรับการศึกษาลักษณะพันธุกรรมต้นเตี้ยของปาล์มน้ำมันนั้น ได้ทำการค้นหาลำดับเบสของยีน *Ga20ox-2*ที่มีความแตกต่างระหว่าง *E.oleifera,* Deli dura, ลูกผสมกลับระหว่าง *E.oleifera* และ *E.guineensis* และปาล์มต้นเตี้ย Golden Tenera พบว่าความแตกต่างของลำดับเบสภายในยีน *Ga20ox-2* มีจำนวนไม่มาก ทั้งนี้ ปาล์มต้นเตี้ยลูกผสมระหว่าง Deli dura กับ Dumpy AVROS (Golden

Tenera) มีช่วงลำดับเบสที่หายไป 9 เบสบริเวณปลายยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะเตี้ย ซึ่งต้องมีการพิสูจน์โดยใช้ตัวอย่างในปริมาณที่มากขึ้นต่อไป

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ใช้เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพกล้าพันธุ์ปาล์มน้ำมันรองรับ พรบ. คุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ.2542 โดยคัดแยกต้นดูราออกจากลูกผสมเทเนอรา

2. สร้างแปลงพันธุ์พ่อชนิด พิสิเฟอรา ซึ่งได้จากการผสมข้ามระหว่างต้นเทเนอราด้วยกัน จะได้ต้นปาล์มน้ำมันชนิด ดูรา เทเนรา และพิสิเฟอรา ในอัตรา 1:2:1 คละกัน แต่เดิมต้องนำไปปลูกหมด เพราะการแยกชนิดทำไม่ได้ในระยะต้นกล้า ต้องตรวจสอบเมื่อติดผลแล้วเท่านั้น ทำให้สิ้นเปลืองเนื้อที่ แรงงาน และค่าใช้จ่ายตลาดจนเวลาในการดูแลรักษา และต้นพ่อพันธุ์พิสิเฟอราอยู่กระจัดกระจายการรวบรวมเกสรทำได้ยาก แต่ถ้าใช้เทคโนโลยีที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถเลือกต้น พิสิเฟอราที่มีเพียง 25% ทำให้สามารถนำไปปลูกติดกันประหยัดทั้งเนื้อที่ แรงงาน งบประมาณ และการดูแลรักษา

3. เทคนิคการตรวจสอบความตรงตามพันธุ์และตรวจลูกผสม Tenera ในระยะกล้าสามารถ ใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ กรณีมีการฟ้องร้องเรื่องชนิดของกล้าพันธุ์และความตรงตามพันธุ์ได้

4. ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายของปาล์มน้ำมันสำหรับใช้สืบค้นในการจำแนกพันธุ์ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์

5. ได้ข้อมูลไพรเมอร์จำเพาะและลำดับเบสของยีน *Ga20ox-2* ของปาล์มน้ำมันพันธุ์ต่างๆ สำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของลักษณะต้นเตี้ยในปาล์มน้ำมัน

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. โครงการวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 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. 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. International Union of Pure and Applied Chemistry : 8-1 – 8-33.

Ashikari,M., A. Sasaki, M. Ueguchi-Tanaka, H. Itoh, A. Nishimura, S. Datta, Ishiyama,K. Saito Tamio, M. Kobayashi, S. Khush Gurdev, H. Kitano , M. Matsuoka.2002.Loss-of-function of a Rice Gibberellin Biosynthetic Gene, GA2O oxidase (GA20ox-2), Led to the Rice 'Green Revolution.Breeding science.52(2) :142-143.

Billotte N, Risterucci AM, Barcelos E, Noyer JL, Amblard P, Baurens FC (2001) Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) microsatellite
markers. Genome 44:413–425

Billotte N, Æ N. Marseillac, Æ A.-M. Risterucci, B. Adon Æ , P. Brottier Æ, F.-C. Baurens, Æ R. Singh, A. Herra´ n Æ, H. Asmady Æ, C. Billot Æ, P. Amblard,T. Durand-Gasselin Æ, B. Courtois Æ, D. Asmono, S. C. Cheah Æ W. Rohde Æ E. Ritter Æ and A. Charrier 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). Theor Appl Genet (2005) 110: 754–765 หรือ Received: Published online: 26 January 2005 Springer-Verlag 2005

Hong, Z., M. Ueguchi-Tanaka, S. Fujioka, S. Takatsuto, S. Yoshida, Y. Hasegawa, M. Ashikari, H. Kitano and M. Matsuoka.2005a.The Rice brassinosteroid-deficient dwarf2 mutant, defective in the rice homolog of Arabidopsis DIMINUTO/DWARF1, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, dolichosterone. Plant cell.17(8):2243-54.

Ikeda, A., M. Ueguchi-Tanaka, Y. Sonoda, H. Kitano, M. Koshioka, Y. Futsuhara, M. Matsuoka and J. Yamaguchi.2001. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8.Plant Cell. 13(5):999-1010.

Itoh, H., M. Ueguchi-Tanaka, Y. Sato, M. Ashikari and M. Matsuoka.2002.The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. Plant Cell.14(1):57-70.

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 (*Elaieis 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. Rajanaidn, A.H. Zakri and S.C. Cheah. 2004. Assessment of Genetic Diversity in Oil Palm (*Elaieis 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.

Orum H1, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O and Stanley C. 1993. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. Nucleic Acids Res. (23):5332-6.

Pootakham, W., N. Jomchai, P.Ruang-Areerate, JR. Shearman, C. Sonthirod, D. Sangsrakru, S. Tragoonrung, S. Tangphatsornruang. 2015. Genome-wide SNP discovery and identification of QTL associated with agronomic traits in oil palm using genotyping-by-sequencing (GBS). *Genomics*.105:288-95.

Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. 2002. Curr Opin Plant Biol. (2):94-100.

Rosenquist, 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

Sakamoto, T., K. Miura, H. Itoh, T. Tatsumi, M. Ueguchi-Tanaka, K. Ishiyama, M. Kobayashi, GK. Agrawal, S. Takeda, K. Abe, A. Miyao, H. Hirochika, H. Kitano, M.

Ashikari and M. Matsuoka.2004.An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol*.134(4):1642-53.

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.

Ting NC, Zaki NM, Rosli R, Low ET, Ithnin M, Cheah SC, Tan SG and Singh R. 2010. SSR mining in oil palm EST database: application in oil palm germplasm diversity studies. J. Genet 89 (2):135-45.