

เครื่องหมายโมเลกุลในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม
และตรวจสอบปลั่มน้ำมันลูกผสมชนิดเทนเอร่า

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

หทัยรัตน์ อุไรรงค์^{1/}

อรรรัตน์ วงศ์ศรี^{2/}

นัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ^{1/}

HATHAIRAT URAIRONG^{1/}

ORN RAT WONGSRI^{2/}

NAIYANATE JAROENSANTI TANAKA^{1/}

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 has the most genetical 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 diversity of Deli Dura populations as well as the progenies derived from inter-specific hybridization between *Elaeis guineensis* and *E. oleifera*. The obtained data are efficient to differentiate all oil palm populations. Moreover, the primers mEgCIR3428, mEgCIR3519 and mEgCIR0874, were sufficient to be used as markers in identifying Surat Thani 1-8 oil palm varieties. For analysis of oil palm shell type, the MADS-box gene of 129 samples 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_{ENG} (T/C) in Ekona Ghana Calabar and Nigeria, SNP_{TaYa} (A/T) in Tanzania Yangambi, SNP_{DA} (C/G) in DAMI, SNP_{LaAv} (C/A) in La Me and AVROS, SNP_{Tan} (C/G) in Tanzania. The obtained data of SNPs loci were used to generate 4 sets of primers and probes for accurately and rapidly determining oil palm shell type with real-time PCR 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.

Key-words : Molecular Markers, Genetics Diversity, Oil Palm Hybrid Tenera

¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology Research and Development)

² ศูนย์วิจัยปลั่มน้ำมันสุราษฎร์ธานี (Surat Thani Oil palm Research Center)



บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ได้ทำการคัดเลือก SSR Markers 13 ตำแหน่ง ที่สามารถให้ความแตกต่างของประชากรปาล์มน้ำมัน 10 กลุ่มพันธุ์คือ Deli Dura, AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me พบว่ากลุ่มพันธุ์พ่อที่มีความแตกต่างจากกลุ่มพันธุ์แม่และพันธุ์พ่ออื่น ๆ มากที่สุดคือ La Me รองลงมาได้แก่ Calabar, Nigeria, Tanzania และ Ghana กลุ่มพันธุ์ AVROS มีพันธุกรรมคล้ายพันธุ์แม่ Deli Dura มากที่สุด รองลงมาคือ DAMI นอกจากนี้ได้ศึกษาพันธุกรรมของประชากร Deli Dura และลูกผสมต่างสปีชีส์ของ *Elaeis guineensis* กับ *E. oleifera* โดยใช้ SSR Markers 32 ตำแหน่งเพิ่มเติม ข้อมูลที่ได้สามารถใช้จำแนกกลุ่มพันธุ์ทั้งหมดออกจากกันได้และพบว่าไพรเมอร์ mEgCIR3428, mEgCIR3519 และ mEgCIR0874 เพียงพอที่จะใช้จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1-8 ได้ สำหรับการวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมัน ทำการอ่านและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MADS-box ทั้งชนิดคูรา พิสิเฟอร์า และเทนอราของ 10 กลุ่มพันธุ์ดังกล่าวข้างต้นจำนวน 129 ตัวอย่าง พบสปีชีส์ที่สามารถแยกชนิดของปาล์มน้ำมันได้ คือ SNP_{ENG} (T/C) ใน Ekona Ghana Nigeria และ Calabar, SNP_{TaYa} (A/T) ใน Tanzania Yangambi, SNP_{DA} (C/G) ใน DAMI, SNP_{LaAv} (C/A) ใน La Me และ AVROS, SNP_{Tan} (C/G) ใน Tanzania จากข้อมูล SNP ที่พบ ได้พัฒนาไพรเมอร์และโพรบจำนวน 4 ชุด สำหรับตรวจสอบชนิดของปาล์มน้ำมันได้แม่นยำและรวดเร็ว ด้วยเครื่อง Real-time PCR และพัฒนาไพรเมอร์ที่ใช้กับเครื่อง PCR ทั่วไป เพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจควบคุมคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมันและคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำหลัก : เครื่องหมายโมเลกุล ความหลากหลายทางพันธุกรรม ปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทนอรา

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 สามารถที่จะระบุประสิทธิภาพของการผลิตน้ำมัน รวมถึงการจำแนกและตรวจสอบพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน จึงเป็นเรื่องสำคัญระดับต้นในการเพิ่มผลผลิตปาล์มน้ำมันสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มตามลักษณะของผลได้เป็น 3 ชนิด คือ คูรา พิสิเฟอร์า และเทนอรา ซึ่งเป็นผลมาจากยีนควบคุมความหนาของกะลา (*SHELL* gene) 1 คู่ ดังนั้นคือ คูรา (Dura) มียีน



ควบคุมลักษณะเด่น (homozygous dominance, Sh^+Sh^+) ลักษณะผลมีกะลาหนา 2 – 8 มิลลิเมตร ไม่มีวงเส้นประสีดาอยู่รอบกะลา มีชั้นเปลือกนอกบาง 35–60% ของน้ำหนักผล นิยมปลูกเป็นต้นแม่พันธุ์ คือ Deli dura

พิลีเฟอรา (Pisifera) ยีนควบคุมลักษณะผลแบบนี้เป็นลักษณะด้อย (homozygous recessive, Sh^-Sh^-) ลักษณะผลไม่มีกะลา มีข้อเสีย คือ ช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมัน (abortion) ซึ่งทำให้ผลฝ่อลีบ ทะลายเล็ก เนื่องจากผลไม่พัฒนา ผลผลิตทะลายต่ำมาก ไม่ใช้ปลูกเป็นการค้าแต่ใช้เป็นต้นพ่อพันธุ์

เทนอรา (Tenera) เป็นพันธุ์ทาง (heterozygous, Sh^+Sh^-) เกิดจากการผสมข้ามระหว่างคูราและพิลีเฟอรา ลักษณะผลมีกะลาบาง ตั้งแต่ 0.5– 4 มิลลิเมตร มีวงเส้นประสีดาอยู่รอบกะลา มีชั้นเปลือกนอกมาก 60-90% ของน้ำหนักผล ปาล์มน้ำมันชนิดเทนอรา เป็นปาล์มที่ใช้ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันที่สูงกว่าชนิดอื่น (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

จากร่างแผนยุทธศาสตร์ปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์ม จะมีการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันปีละ 2.5 แสนไร่ ปลูกทดแทนสวนปาล์มน้ำมันเก่า 0.3 แสนไร่ และปลูกทดแทนยางพารา 1.0 แสนไร่ รวม 3.8 แสนไร่ คิดเป็นความต้องการต้นกล้า 9,500,000 ต้น/ปี (25 ต้น/ไร่) หรือคิดเป็นเมล็ดคงเหลือ 11,400,000 เมล็ด/ปี (30 เมล็ด/ไร่) จึงมีผลทำให้ ความต้องการต้นกล้าปาล์มพันธุ์ดีมีสูงและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้มีผู้นำกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้มาตรฐาน หรือเก็บจากโคนต้นไปขายให้เกษตรกร ซึ่งมีการปะปนของต้นปาล์มชนิดคูราและพิลีเฟอรา กว่าเกษตรกรจะทราบว่าพันธุ์ปาล์มที่ปลูกไม่ได้มาตรฐานให้ผลผลิตต่ำ ก็ต่อเมื่อปาล์มน้ำมันที่ปลูกเจริญเติบโตเกือบ 3 ปี กระทั่งติดผลทำให้เกษตรกรได้ผลผลิตต่ำ (ผลผลิตทะลายลดลง 15-35 เปอร์เซ็นต์) นอกจากผลผลิตลดลงแล้วเกษตรกรยังต้องเสียเวลาปลูกทดแทนใหม่ ในระยะที่ผ่านมายังไม่มีเทคนิคในการตรวจสอบความตรงตามพันธุ์และไม่มีวิธีการคัดแยกต้นแม่คูราออกจากประชากรลูกผสมเทนอราในระยะกล้าต้องรอจนติดผลเพื่อให้เกษตรกรได้กล้าพันธุ์ดีปลูก กรมวิชาการเกษตรได้แก้ไขปัญหาข้างต้นโดยการออกประกาศกรมฯ จดทะเบียนผู้ผลิตและจำหน่ายต้นกล้าปาล์มน้ำมันเพื่อสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ ในกรณีเกิดปัญหาเกษตรกรซื้อต้นกล้าปาล์มไม่ได้มาตรฐานมาปลูก (ซึ่งต้องรอจนปาล์มน้ำมันติดผล) ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคตรวจสอบความตรงตามพันธุ์และชนิดของปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้า จึงเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อช่วยในการควบคุมคุณภาพของต้นกล้าปาล์มน้ำมันตาม พรบ.พันธุ์พืช พ.ศ. 2518 (ฉบับที่ 2 พ.ศ.2541) แต่เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นไม้ยืนต้นมีอายุยืน การปรับปรุงพันธุ์จึงทำได้ช้ามาก ในแต่ละรอบของการปรับปรุงพันธุ์ต้องใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 10 – 12 ปี การนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้จึงสามารถลดระยะเวลาในการคัดเลือกพันธุ์แล้ว ยังสามารถช่วยในการศึกษาและจำแนกความแตกต่างหรือความหลากหลายของประชากรที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ด้วย งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันที่รวบรวมไว้ในศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกปาล์มน้ำมันชนิดคูรา พิลีเฟอรา และเทนอราในระยะต้นกล้า



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมัน ที่รวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 653 ตัวอย่างพันธุ์และพันธุ์ปาล์มน้ำมันของเอกชน 60 ตัวอย่างพันธุ์ รวม 713 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 ประชากรลูกผสมเทเนรา (Tenera) พันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 - 8 รวม 74 ตัวอย่างพันธุ์

1.4 ประชากรปาล์มน้ำมันต้นเดี่ยว *Elaeis oleifera* และลูกผสมระหว่าง *E.guineensis* x *E.oleifera* จำนวน 182 ตัวอย่างพันธุ์

1.5 ประชากรปาล์มน้ำมันของบริษัทเอกชน 60 ตัวอย่างพันธุ์

2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร้งบดพร้อมสาก, 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 เช่น ไนโตรเจนเหลว, แอลกอฮอล์, คลอโรฟอร์ม, CTAB (Hexadecyl trimethylammonium bromide)

10.3 สารเคมีใช้ในขบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ dNTPs, PCR buffer, Tag DNA polymerase 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



วิธีการ

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 กลุ่มละ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me) การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการของ Agrawal *et al.* (1992) ซึ่งมีการดัดแปลงเล็กน้อยโดยหัทธรัตน์และคณะ (2548) ดังนี้ นำตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน 2 กรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดด้วยโกร่งให้ละเอียดพร้อมกับไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างที่บดแล้วใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติมนั้บัฟเฟอร์สกัด (Extraction buffer) (2xCTAB; 2% (w/v) Cetyl trimethyl ammonium bromide, 1.4 M NaCl, 50 mM Na₂ EDTA, 100 mM Tris-HCl (PH8.0) และ 2 มิลลิลิตร 2-mercaptoethanol) ปริมาณ 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที โดยเขย่าหลอดทุก 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) 700 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในหลอดโดยวิธีกลับหลอดไปมา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ใส่น้ำในส่วนบน 500 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตต 50 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำการล้างตะกอน 2 ครั้ง ดังที่ไว้ให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (1 mM Na₂ EDTA 10 mM Tris-HCl pH 8.0) จำนวน 50 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่ได้มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Spectrophotometer

1.2 การทำปฏิกิริยา PCR หรือการขยายยีนในหลอดทดลอง นำ SSR primer (Billotte *et al.* 2005) 100 คู่ ติดฉลากด้วยสี่ฟลูออเรสเซนซ์ที่ปลาย 5' นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้ดีเอ็นเอ ในข้อ 1.1 เข้มข้น 50 ng เป็นแม่พิมพ์ ซึ่งมีองค์ประกอบและสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้คือ Tris – HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 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°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94°C 30 วินาที 55 °C 30 วินาที 72°C 30 วินาที 35 รอบ และ 72°C 7 นาที 1 รอบ

1.3 การวิเคราะห์ผลผลิต นำผลผลิต 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 ของประชากรปาล์มน้ำมันที่ปลูกรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และพันธุ์ปาล์มของบริษัทเอกชน รวม 713 ตัวอย่างพันธุ์ โดยสกัดดีเอ็นเอตามวิธีข้อ 1.1

2.2 การขยายยีนในหลอดทดลองและการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1 เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 ng/ul ใช้เป็นแม่พิมพ์สำหรับการขยายยีนในหลอดทดลองใช้ไพรเมอร์ ที่คัดเลือกได้จากข้อ 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. การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน

การศึกษานี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสในจีโนมดีเอ็นเอ บริเวณเป้าหมายที่เกิดการกลายพันธุ์แบบแทนที่ (Substitution) เพียงหนึ่งตำแหน่ง โดยใช้พันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้งสามชนิด คือ พันธุ์แม่ชนิดคูรา พันธุ์พ่อชนิดพิลีเฟอร่าและพันธุ์ลูกผสมชนิดเทนเอร่าของ 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 การทำปฏิกิริยา PCR ขยายยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมัน

จากการรายงานของ Singh *et al.* (2013) พบว่ายีนที่ควบคุมกะลาของปาล์มน้ำมันมีความคล้ายคลึงกัน (homologous) กับยีน seedstick ที่จัดอยู่ในกลุ่มยีน MADS-box จึงได้ใช้ไพรเมอร์ในบริเวณอนุรักษ์ของยีนนี้ (Conserved region) ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอบริเวณนี้ของปาล์มน้ำมันทุกพันธุ์ไปขยายยีน (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 MgCl₂ 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 PCR 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 นำผลผลิตของ PCR ที่ได้แยก



ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting temperature agarose ข้อมแถบดีเอ็นเอ ด้วย Gel Star[®] (Cambrex Bio science, USA) นำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง Gel Documentation ตัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการแยกดีเอ็นเอเป้าหมายออกจาก 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)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 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 TaqMan probe and primer chemistry and design ของ Applied Biosystems ซึ่งแต่ละตำแหน่งของสนิปส์จะออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ ขนานข้างสนิปส์นั้นและออกแบบโพรบที่มีความยาว 13 คู่เบส 2 เส้น ที่เป็นคู่สมกันกับบริเวณรอบๆ สนิปส์ (ยกเว้นตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เป็นสนิปส์) โพรบเส้นแรกติดฉลาก ด้วยฟลูออเรสเซนต์สี VIC ที่ปลาย 5' ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งสนิปส์เหมือนลำดับเบสของปาล์มน้ำมันต้นแม่ดูรา และปลาย 3' ของโพรบติดฉลากด้วย Quencher และ Minor Groove Binder (MGB) สำหรับโพรบอีกเส้นหนึ่งจะคล้ายโพรบตัวแรก แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งสนิปส์ จะเหมือนกับลำดับเบสของต้นพ่อพิลีเฟอรา และติดฉลากที่ปลาย 5' เป็นสี FAM ที่ต่างจากสีโพรบตัวแรก ทำการสังเคราะห์และไพรเมอร์จากบริษัท Applied Biosystems สหรัฐอเมริกา และตรวจด้วยเครื่อง Real time PCR หากนำดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ดูรามารวมกับโพรบที่ตำแหน่งสนิปส์เหมือนต้นแม่ดูราเท่านั้นที่จะจับกับดีเอ็นเอของดูราได้ เมื่อมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ สี VIC ทางปลาย 5' จะถูกตัด (Hydrolysis) ออกห่างจาก Quencher ที่อยู่ปลาย 3' ของโพรบ ทำให้ปรากฏเส้นกราฟสีเหลืองของ VIC เพิ่มขึ้นตามจำนวนก๊อปปี้ของสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ และตามจำนวนรอบของ PCR ที่เพิ่มขึ้น ถ้าตรวจดีเอ็นเอของพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา ต้องให้ผลเป็นกราฟ 2 เส้นทั้งของพันธุ์แม่และพ่อ



3.2 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

นำดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันชนิดต่างๆ ทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB จากข้อ 2.1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใช้เป็นแม่พิมพ์ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจวิเคราะห์สปีส์บนเครื่อง Real time PCR ด้วยไพรเมอร์ และ 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 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นสำหรับ PCR 3.7 ไมโครลิตร เพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง StepOnePlus™ Real time PCR (Applied Biosystems®, USA) โดยมีสภาวะ การทำปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้ 95 °C 30 วินาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 °C 20 วินาที และ 60 °C 60 วินาที จำนวน 50 รอบ ค่าของสีฟลูออเรสเซนซ์ จะถูกบันทึกไว้ตามจำนวนรอบที่ทำ PCR การ วิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งสปีส์ จะสร้าง Allelic Discrimination ของตัวอย่างด้วยโปรแกรม StepOne™ V 2.3 ซึ่ง allele ของพันธุ์แม่ชนิดคูรา จะอยู่ที่แกน X และ Allele ของพันธุ์พ่อชนิด พิลิเฟอร่า จะอยู่ที่แกน Y ลูกผสมจะอยู่กึ่งกลางระหว่างแกนทั้งสอง พันธุ์ปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัย ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีที่นำมาตรวจวิเคราะห์ครั้งนี้ ทราบกลุ่มพันธุ์และชนิดของปาล์มแล้วการ ตรวจสปีส์ครั้งนี้จึงถือเป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบของสปีส์ตำแหน่ง ต่างๆ ด้วย

3.3 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันของบริษัทเอกชน

ได้ทำการเก็บตัวอย่างพันธุ์ปาล์มน้ำมันของบริษัทเอกชน ได้แก่ บริษัท อาร์ แอนด์ ดี เกษตรพัฒนา, บริษัท โกลดั้น เทเนอร่า, บริษัท ยูนิวานิช น้ำมันปาล์ม จำกัด และ บริษัท ทักษิณปาล์ม จำกัด ซึ่งปลูกที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี จำนวน 60 ตัวอย่าง นำไปมาสกัด ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB ตามข้อ 1.1 ตรวจชนิดของปาล์มน้ำมัน โดยใช้วิธีเดียวกันข้อ 3.2 แต่เลือกใช้ ไพรเมอร์และโพรบตามตำแหน่งสปีส์ที่ตรวจสอบได้จากประวัติพันธุ์ของแต่ละบริษัท และทดลอง ใช้ไพรเมอร์และโพรบตำแหน่งอื่น ๆ ตรวจวิเคราะห์ด้วย

IV. การพัฒนาวิธีการตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันให้รวดเร็วขึ้น

ใบปาล์มน้ำมันที่โตเต็มที่แล้วการบดให้ละเอียดนั้นค่อนข้างยาก ต้องเสียเวลาบดและ ใช้แรงงานในขั้นตอนนี้มาก จึงจะได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพดี เพื่อให้การตรวจชนิดของ ปาล์มน้ำมันทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น จึงได้นำชุดสกัดสำเร็จรูปมาใช้ร่วมกับเทคนิค Nested PCR ดังวิธีการต่อไปนี้

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ ตัดปลายใบปาล์มน้ำมันให้มีขนาดประมาณ 1.5x1.5 เซนติเมตร ใส่ในถุงพลาสติก เติมน้ำกลั่นผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 300 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ค้อนหรือค้อนกรรไกร ขูดใบปาล์มจากภายนอกถุงจนได้น้ำสีเขียว คูณน้ำสีเขียว 2 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ใส่ Dilution buffer (Phire Plant Direct PCR Kit ; Thermo Scientific) ไว้ 18 ไมโครลิตร ผสม



ของเหลวให้เข้ากันแล้วนำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 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' 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 โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้ 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 แต่เพิ่มรอบการขยายเป็น 30, 35 และ 40 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 เช่นเดียวกับ ข้อ 3.1 โดยใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางไว้ 1 ไมโครลิตร เป็นแม่พิมพ์ องค์ประกอบของปฏิกิริยาและการตั้งเครื่อง ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.2

V. การพัฒนาวิธีตรวจสอบสนิปส์เพื่อแยกชนิดของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่อง PCR ทั่วไป

ออกแบบไพรเมอร์ชนิด allele specific PCR primer สำหรับตรวจวิเคราะห์สนิปส์ 4 ตำแหน่ง คือ SNP_{DA}, SNP_{ENG}, SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAv} โดยการออกแบบ forward primer ตัวสุดท้ายทางปลาย 3' เป็นตำแหน่งสนิปส์และเปลี่ยนอีก 2 ตำแหน่งถัดมา ให้จับกับพันธู์ที่เป็นชนิดดูรา ออกแบบไพรเมอร์ 3 เส้นลักษณะเดียวกัน แต่ทำการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ใหม่ของไพรเมอร์ 3 ตัวสุดท้ายทางปลาย 3' ให้จับกันกับตำแหน่งสนิปส์ของปาล์มน้ำมันชนิดพิลีเฟอร่าอีก 3 เส้น ทำเช่นนี้ทุกตำแหน่งรวมออกแบบและสังเคราะห์ forward primer 24 เส้น สำหรับ reverse primer ทำการออกแบบไว้คนละตำแหน่งโดยให้ผลผลิตของ PCR ของชนิดดูรา สั้นกว่าของชนิดพิลีเฟอร่า เพื่อที่จะได้ตรวจสอบเทเนอร่าได้ง่ายขึ้น โดยใช้ agarose gel electrophoresis ทั่วไป

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

I. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

1. การคัดเลือก SSR primer ในการจำแนกและวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธู์ปาล์มน้ำมันจากการสุ่มเลือกปาล์มน้ำมัน 36 ตัวอย่าง จากประชากรที่ใช้เป็นแม่พันธู์ (Deli Dura) และประชากรที่เป็นพ่อพันธู์ (Pisifera) มาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ ที่เหมาะสมในการใช้ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน พบว่ามีไพรเมอร์ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธู์ในกลุ่มต่าง ๆ นี้มีจำนวนมาก จึงทำการคัดเลือก primer ที่ดีที่สุดไว้ 13 คู่ ได้แก่ mEgCIR0074, mEgCIR0173, mEgCIR0804, mEgCIR3428, mEgCIR3641, mEgCIR3643, mEgCIR3698, mEgCIR0874,



mEgCIR2215, mEgCIR2577, mEgCIR3519, mEgCIR3593 และ mEgCIR3755 เกณฑ์การคัดเลือก โดยดูจากจำนวน alleles หรือแถบดีเอ็นเอ ที่พบมากกว่าในการปฏิกิริยาขยายยีนในหลอดทดลอง (PCR) ซึ่งที่พบมีตั้งแต่ 2 ถึง 11 แถบ หรือ alleles

2. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ไพรเมอร์ ที่คัดเลือกไว้ 13 คู่ จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากรปาล์มน้ำมันที่เป็น พ่อและแม่พันธุ์ในการผลิตปาล์มน้ำมันลูกผสม 471 ต้น ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ทำให้ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 6,123 ข้อมูล ในจำนวนนี้มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากร Deli Dura ที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ 246 ต้น ประชากรที่ใช้เป็น ต้นพ่อ (Pisifera) กลุ่มต่าง ๆ 151 ต้น และกลุ่มประชากรเทนเอร่า (Tenera) ที่ส่งเสริมให้ปลูกเป็นการค้า (สุราษฎร์ธานี 1-8) 74 ต้น พบว่าในจำนวนไพรเมอร์ 13 คู่ที่ใช้ ให้ alleles หรือ แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันถึง 95 แถบ โดยที่แต่ละไพรเมอร์ให้ alleles ที่ต่างกันหรือมีความผันแปรตั้งแต่ 5 – 11 แถบ หรืออาจกล่าวได้ว่า โดยเฉลี่ยแต่ละไพรเมอร์ให้ alleles ที่ต่างกันถึง 7 แบบ โดยที่ไพรเมอร์ mEgCIR0874 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันมากที่สุดถึง 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 ทำให้ผู้ที่นำไพรเมอร์นี้ไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ต้องระมัดระวังในการอ่านค่า มิเช่นนั้นจะผิดพลาดได้ง่าย สำหรับขนาดและจำนวน alleles ที่พบในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ครั้งนี้แสดงไว้ใน Table 1 และ 2 ซึ่งจะพบว่าแต่ละตำแหน่งของไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ให้ผลผลิต PCR ที่มี heterozygosity ต่ำ หรือหมายความว่าตำแหน่งเหล่านี้ขนาดของ alleles พ่อกับแม่เท่ากัน (homozygous) เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นไพรเมอร์ mEgCIR0173 และ mEgCIR0804 สำหรับ Table 3 ได้สรุปขนาดของ alleles ที่ได้จากไพรเมอร์ 13 คู่เป็นประชากรแม่พันธุ์ (Deli Dura) และประชากรพ่อพันธุ์ 10 กลุ่ม ข้อมูล alleles นี้ สามารถระบุ alleles ของลูกผสมชนิด Tenera ได้จึงมีประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ลูกผสมเทนเอร่า ตัวอย่างเช่น เมื่อคูแฉกแรก primer mEgCIR0074 จะพบว่า ประชากรที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์เฉพาะกลุ่ม Tanzania มีแถบดีเอ็นเอที่พบในปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้เพียง 1 แถบคือ ขนาด 122 คู่เบส ขณะที่แม่พันธุ์ Deli Dura ใน primer เดียวกันให้แถบดีเอ็นเอเดียวกันคือ ขนาด 120 คู่เบส ดังนั้นลูกผสม Tenera ที่ได้จากคู่ผสมนี้จะมีแถบดีเอ็นเอ 120 และ 122 คู่เบส ซึ่งอาจใช้เป็นแถบเอกลักษณ์ของกลุ่มผสมนี้ได้ด้วย และจาก Table 3 เมื่อดูความแตกต่างภายในประชากรแต่ละกลุ่ม จะพบว่า primer ทั้ง 13 คู่นี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของประชากร Deli Dura ได้เลย ยกเว้นไพรเมอร์ mEgCIR0804 ที่มี alleles ต่างกัน 195 และ 201 คู่เบส สำหรับประชากรพ่อพันธุ์กลุ่มอื่นที่มีความ



ผันแปรน้อยภายในกลุ่ม ได้แก่ ประชากร Calabar, Tanzania และ Yangambi นอกนั้นมีความผันแปรภายในประชากรค่อนข้างสูง ดังเช่น ประชากร AVROS ตัวอย่างเช่น เมื่อทำลายพหิพดีเอ็นเอด้วย primer mEgCIR2215 ให้แถบดีเอ็นเอต่างกันถึง 4 แถบ คือ 100, 118, 120 และ 124 โดยในแต่ละแถบยังมีการกระจายตัวคือส่วนหนึ่งมีแถบ และอีกส่วนหนึ่งไม่มีแถบ ฉะนั้น การใช้ไพรเมอร์ร่วมกันหลายๆ ไพรเมอร์ จึงจะทำให้สามารถจำแนกกลุ่มพันธุ์ของปาล์มน้ำมันได้ อย่างไรก็ตามเมื่อนำพ่อและแม่ของสุราษฎร์ธานี 1 – 8 มาตรวจสอบ alleles จาก Table 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

ข้อมูลจากการการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมครั้งนี้ ถูกเก็บไว้ในโปรแกรม เอกซ์เซล โดยเก็บในรูปขนาดความยาวและจำนวน alleles แต่ข้อมูลในรูปเอกซ์เซลนี้มีความยุ่งยากในการสืบค้นข้อมูล จึงได้พัฒนาระบบฐานข้อมูลลายพหิพดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันขึ้น เพื่อรองรับการสืบค้น แก้ไข หรือเพิ่มเติมข้อมูล เช่น พันธุ์ใหม่ๆ และไพรเมอร์ที่เพิ่มขึ้น หรือเปรียบเทียบ alleles ระหว่างพันธุ์ได้ นอกจากนั้นยังนำข้อมูลนี้ไปศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้ โดยการนำไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม แล้วนำไปเขียน Phylogenetic tree หรือ dendrogram ดังแสดงใน Figure 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 สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย C กับ D ซึ่งมีความต่างกันทางพันธุกรรม 70% ในกลุ่ม C มีประชากร Nigeria และ Calabar ซึ่งมาจากคู่ผสมเดียวกันหรือพันธุกรรมใกล้เคียงกัน แต่มีชื่อต่างกัน ทั้งนี้ เนื่องมาจากถูกนำไปพัฒนาและคัดเลือกจากคนละสถานที่ คือ ที่เมือง Calabar, Aba, Ufama และ Benin ในประเทศไนจีเรีย (Rosenquist, 1985) ในกลุ่ม D ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อยที่มีพันธุกรรมระหว่างกลุ่มย่อยแตกต่างกันมากกว่า 40% โดยที่กลุ่ม E มีประชากรกลุ่ม Yangambi แยกจาก Ghana และ Nigeria ในกลุ่มย่อย F ประกอบด้วยประชากร AVROS, Tanzania และ DAMI ซึ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม 20% หรือค่อนข้างใกล้เคียงกัน กลุ่มสุดท้ายคือ กลุ่มย่อย G ที่ประกอบด้วยประชากร Ekona, AVROS (คู่ผสม HC129:933T self) และประชากร Deli Dura ที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ ก็ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย เป็นที่น่าสังเกตว่าประชากร Nigeria และ AVROS เมื่อวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม จะพบว่าถูกจัดอยู่ใน 2 กลุ่มคือ กลุ่ม C กับ G และ F กับ G ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นผลมาจากพันธุกรรมของพ่อและแม่ที่ต่างกันมาก



จาก Figure 1 แสดงว่าความสัมพันธ์ของประชากรปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์สำหรับผสมกันประชากรแม่พันธุ์ที่เป็น Deli Dura ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มร่วมกับประชากรพ่อพันธุ์ Deli Dura จะมีความคล้ายกับประชากรในกลุ่ม AVROS มากที่สุดรองลงมาได้แก่ DAMI ฉะนั้นในการจะสร้างลูกผสมทนเคอรา ที่ได้จากการผสมต้นแม่ชนิด Deli Dura กับต้นพ่อฟิลิปปินส์ให้มีฐานพันธุกรรมที่กว้าง ต้องผสมพ่อแม่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก ๆ คือการผสม Deli Dura กับ La Me รองลงมาคือ Calabar, Nigeria, Tanzania และ Ghana จะเห็นว่าการใช้ไพรเมอร์ 13 คู่นี้สามารถจำแนกความแตกต่างของประชากรปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นพ่อได้ดีมาก แต่เมื่อนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอขนาดและจำนวน alleles ของประชากร Deli Dura ที่ใช้เป็นต้นแม่ 246 ต้น ข้อมูลจาก Table 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 primer19 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 ส่วนไพรเมอร์อื่นๆ ให้ alleles ที่ต่างกันเพียง 2 แบบเท่านั้นและส่วนใหญ่ให้ค่า heterozygosity ค่อนข้างต่ำ ดังแสดงใน Table 2 เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดเหล่านี้ไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มและทำ dendrogram (ไม่ได้แสดงภาพของผล) โดยใช้โปรแกรม SPSS พบว่า 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 ต่อมามีการผสมกับปาล์มน้ำมันกลุ่มอื่น ๆ เพื่อขยายฐานพันธุกรรมกว้างขึ้น

นอกจากนั้นยังพบว่าที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีมีการรวบรวมพันธุ์ลูกผสมข้ามชนิดหรือระหว่างสปีชีส์ (Interspecific hybridization) ระหว่างปาล์มน้ำมันพันธุ์แม่ Deli Dura (*Elaeis*



guineensis) กับ *E.oleifera* ซึ่งมีพันธุกรรมต้นเดียวจำนวน 12 กลุ่มสม งานวิจัยนี้จึงได้ทำการสุ่มมาทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอกลุ่มละ 1 สายพันธุ์ โดยใช้ primer ชุดเดียวกัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกพันธุ์และใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาเปรียบเทียบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับกลุ่มพันธุ์ Deli Dura พบว่าลูกผสม *E.guineensis* x *E.oleifera* มีความคล้ายคลึงกับกลุ่มพันธุ์ Deli Dura (CH133 x 1288D SELF) มากที่สุด และในปี 2555 ได้นำพันธุ์ปาล์มต้นเดียวและลูกผสมดังกล่าวที่รวบรวมไว้มาจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพิ่มเติม สำหรับใช้ประโยชน์ในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต้นเดียวต่อไป โดยจัดทำลายพิมพ์ DNA ของประชากรปาล์มน้ำมัน *E.guineensis* x *E.oleifera* จำนวน 150 ตัวอย่างพันธุ์ และปาล์มน้ำมันต้นเดียว (*E.oleifera*) จำนวน 32 ตัวอย่างพันธุ์ รวม 182 ตัวอย่างพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์เพิ่มเติมอีก 32 คู่ และนำข้อมูลที่ได้ออกวิเคราะห์ผลหาความหลากหลายทางพันธุกรรม และสามารถแยกความแตกต่างของประชากรปาล์มน้ำมัน พบแถบดีเอ็นเอหรือ alleles ที่มีความแตกต่างกัน 175 alleles รวมข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกลุ่มนี้มี 5,824 ข้อมูล (records) ซึ่งได้ถูกนำไปเพิ่มในฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันรวมทั้งสิ้น 13,771 ข้อมูล เพื่อใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์อย่างเป็นระบบต่อไป

II. การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสลับเพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน

จากการสกัดดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันทั้งสามชนิดคือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทนอรา จำนวน 10 กลุ่ม พันธุ์ รวม 129 ตัวอย่างพันธุ์ แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อขยายยีนในหลอดทดลองของยีน MADS – box โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ (Conserved region) พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลผลิต PCR ชัดเจน ความยาวเท่ากันคือ 537 คู่เบส เมื่อนำผลผลิตของ PCR นี้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองทิศทาง คือ ทาง forward primer และ reverse primer แล้วนำผลที่ได้มาตรวจสอบยืนยันความถูกต้องของสายนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องนี้ ไปทำการเปรียบเทียบกันมากกว่า 2 สาย (Multiple sequence alignment) พบว่า บริเวณของยีน MADS – box มีตำแหน่งสลับหรือตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงไป 5 แห่ง คือ นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 220, 256, 272, 279 และ 308 ซึ่งแต่ละตำแหน่งเหล่านี้ยังสามารถบ่งชี้ชนิดของปาล์มน้ำมันในแต่ละกลุ่มได้ ดังนี้

1. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 220 (SNP_{Tan}) ปาล์มน้ำมัน Deli Dura และชนิดดูราของ Tanzania มีนิวคลีโอไทด์เป็น C ขณะที่ชนิดพิสิเฟอราของ Tanzania มีนิวคลีโอไทด์เป็น G สำหรับชนิดเทนอราของ Tanzania 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_{ENG}) พบว่า ดูราของ Deli Dura, Ekona , Nigeria , Ghana และ Calabar มีนิวคลีโอไทด์เป็น T เหมือนกัน และพิสิเฟอราของปาล์มตระกูลเหล่านี้จะมี นิวคลีโอไทด์เป็น C ดังนั้น เทนอรา ซึ่งเป็น heterozygous ของปาล์มเหล่านี้จะเป็น T/C



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

5. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์สุดท้ายที่พบ คือ 308 (SNP_{LaAv}) เป็นตำแหน่งสนิปส์ ที่กลุ่มพันธุ์ Deli Dura ปาล์มชนิดฐานของ La Me และAVROS เป็น C และฟิลิเฟอร่าของกลุ่มเหล่านี้เป็น A ฉะนั้น เทนอราของกลุ่มนี้จึงเป็น C/A ดังแสดงในFigure 2 จากภาพ ตำแหน่งในสายนิวคลีโอติกแอซิดใด ๆ 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 ได้ทำการตรวจสอบยืนยันซ้ำจากกราฟของ สายนิวคลีโอไทด์ (electropherogram) ที่ได้จากการอ่านลำดับพันธุกรรมของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) แสดงในFigure 3 (a)-(e) และในTable 4 ได้แสดงข้อมูลตำแหน่งสนิปส์ที่ใช้ในการตรวจชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ ได้แก่ Deli Dura, DAMI, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Tanzania, Yangambi, AVROS และ Calabar ชนิดของผล (Fruit Type) และจำนวนตัวอย่าง ที่นำไปอ่านลำดับพันธุกรรม

Singh *et al.*(2013) ได้รายงาน ว่า พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (SNP) 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งแรกเป็นของ Congo (AVROS) และ Tanzania สอดคล้องกับตำแหน่ง SNP_{TaYa} ของการศึกษาครั้งนี้ แต่แตกต่างกันตรงที่การศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของ AVROS ในตำแหน่งนี้ กลับพบในตำแหน่ง SNP_{LaAv} สำหรับสนิปส์ตำแหน่งที่สองพบในกลุ่มพันธุ์ Nigeria สอดคล้องตรงกับตำแหน่ง SNP_{ENG} ของรายงานฉบับนี้ ซึ่งจากการทดลองนี้มีการพบว่าตำแหน่งนี้ นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (SNP) ของ Nigeria แล้ว ยังพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ กลุ่ม Ekona Ghana และ Calabar ด้วย หนึ่งจากผลของการอ่านลำดับ นิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน MADS-box ครั้งนี้ พบตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มเติมอีก 3 แห่ง ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรก ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน คือ SNP_{Tan} SNP_{DA} และ SNP_{LaAv} สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมันได้

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 และคาดว่ากรดอะมิโน ตัวใหม่ไม่สามารถจะจับตัวกับโปรตีนนั้น เพื่อสร้างกะลา (Shell) ของปาล์มน้ำมัน จึงทำให้ผลชนิดฟิลิเฟอร่าไม่มีกะลา การทดลองครั้งนี้จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ ในช่วงที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดเปลี่ยนเป็นลำดับโปรตีน (Protein sequence) โดยใช้โปรแกรม ExPASy พบว่าตำแหน่ง สนิปส์หรือตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของ codon ในบริเวณ MADS-box ยีนของปาล์มน้ำมันที่พบ 5 แห่ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนทุกตำแหน่ง ดังแสดงใน Figure 4



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

III. การตรวจวิเคราะห์แยกชนิดของปลาล์มน้ำมัน โดย Real Time PCR

3.1 ออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจสนิปส์ ออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับตำแหน่งสนิปส์ที่พบแต่ละตำแหน่ง โดยใช้โปรแกรม TaqMan Probe and primer chemistry and design ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบ ซึ่งติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ VIC กับ FAM ของทั้ง 4 ตำแหน่ง คือ SNP_{DA} , SNP_{ENG} , SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAv} สำหรับ SNP_{Tan} ตรวจสนิปส์ของปลาล์มน้ำมันกลุ่ม Tanzania ไม่ได้ทำการออกแบบโพรบและไพรเมอร์ไว้เพราะสามารถใช้ไพรเมอร์และโพรบของ SNP_{TaYa} ได้เช่นกัน ดัง Figure 5 เป็นการแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ โพรบ และการติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ สี VIC และ FAM ทางด้าน 5' ของโพรบ ทั้ง 2 สาย สำหรับปลาย 3' ของโพรบติดด้วย Quencher ซึ่งจะเป็นส่วนควบคุมไม่ให้สี VIC และ FAM มีการแสดงออกถ้ายังติดอยู่กับสายโพรบ ทางทิศทางนี้ยังมี Minor groove binder (MGB) เพื่อช่วยให้สายโพรบเกาะกับ DNA helix ให้ดีขึ้น

3.2 การตรวจแยกชนิดปลาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปลาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดของปลาล์มน้ำมันที่สกัดดีเอ็นเอไว้แล้ว จำนวน 129 ตัวอย่าง พันธุ์ ที่ทราบประวัติพันธุ์และการพิสูจน์ทราบแล้วว่าเป็นปลาล์มน้ำมันชนิดใดบ้าง เพื่อยืนยันความใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบไว้ตามข้อ 3.1 ผลการตรวจวิเคราะห์จาก Allelic Discrimination ให้ข้อมูลชนิดของพันธุ์เป็น คูรา ฟิลิเพอร่า และ เทเนอร่า ถูกต้องทุกพันธุ์ จาก Figure 6 (a) เป็นการตรวจปลาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ AVROS โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบของ SNP_{LaAv} (C/A) ใน Amplification plot จะเห็นว่าสีฟลูออเรสเซนต์ VIC กับ FAM จะขึ้นให้เห็นในรอบที่ 24-26 ของเครื่อง Real Time PCR เมื่อทำการวิเคราะห์ผลใน Discrimination plot ก็ให้ผลที่ถูกต้อง ใน Figure 6 (b) เป็นผลการตรวจวิเคราะห์ปลาล์มน้ำมันของ 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 กระจายไม่สามารถอ่านผลได้



3.3 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันบริษัทเอกชน

ผลการใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้น มาตรวจปาล์มของบริษัทเอกชน ได้แก่ บริษัท โกลเด้น เทเนอรา จำกัด, บริษัทยูนิวานิช น้ำมันปาล์ม จำกัด และบริษัท ทักษิณปาล์ม ซึ่งปลูกไว้ที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี จำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่าพันธุ์ปาล์ม น้ำมันทั้งหมดเป็นชนิดเทเนอรา แต่การเก็บตัวอย่างครั้งนี้พบปาล์มสายพันธุ์ Compact ของบริษัท อาร์ แอนด์ ดี เกษตรพัฒนา ซึ่งยังไม่เคยมีประวัติพันธุ์ จึงจะได้นำตัวอย่างมาศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

IV. ผลการพัฒนาวิธีการตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันให้รวดเร็วขึ้น

ผลจากการตัดปลายใบเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 1.5x1.5 เซนติเมตร ใส่ถุงที่มีน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร แล้วใช้ค้อนขูดใบปาล์มน้ำมันจากภายนอกถุงให้น้ำเป็นสีเขียวอ่อน แล้วคลุกใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตรที่มี Dilution buffer อยู่ 18 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำน้ำใสส่วนบนไปทำ PCR พบว่าได้ผลผลิต PCR การสกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มวิธีนี้สะดวกและรวดเร็วมาก ได้ทดลองนำน้ำใสส่วนบนที่สกัดได้ไปตรวจวิเคราะห์ชนิดของปาล์มโดยใช้ไพรเมอร์กับโพรบที่ออกแบบไว้บนเครื่อง Real time PCR ปรากฏว่าไม่มีผลผลิตของ PCR เลย แม้จะตั้งเครื่อง Real time PCR ถึง 50 รอบแล้วก็ตาม ดังนั้น จึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้อย่างรวดเร็วข้างต้น 1 ไมโครลิตร ไปทำ Nested PCR ก่อน โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ซึ่งสามารถจะขยายยีนในส่วนที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ได้ทุกพันธุ์ ก่อนจำนวน 25, 30, 35 และ 40 รอบ จากนั้นจึงตรวจสอบผลผลิตของ PCR 500 เท่า จึงนำไปตรวจวิเคราะห์ ชนิดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบไว้ สำหรับตรวจสอบปาล์ม ปรากฏว่าการทำ Nested PCR 35 กับ 40 รอบ ตรวจพบผลผลิต PCR เร็วมากในรอบที่ 14-18 แต่เมื่อวิเคราะห์ผลใน Allelic Discrimination plot พบว่าผลการวิเคราะห์การจัดกระจาย ไม่สามารถสรุปผลได้ แต่การทำ Nested PCR 30 รอบ ให้ผลดีที่สุดไม่แตกต่างจากการใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธี CTAB การพัฒนาวิธีการตรวจนี้ทำให้ผู้ปฏิบัติงานได้สะดวก รวดเร็วขึ้นมาก

V. การพัฒนาวิธีตรวจสอบชนิดของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่อง PCR ทั่วไป

จากการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบชนิดปาล์มทั้ง 4 แห่ง เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน เมื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์พบว่าสามารถตรวจสอบชนิดปาล์มได้ 3 ตำแหน่ง ดังนี้ ตำแหน่ง SNP_{DA} ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ Mut218-D-F1 5' CGGCAGGTCACCTTTCTGCAAGC 3' , Mut218-D-R1 5' GCTTGGCCATAGAACAAATGAAGC 3' และ Mut218-P-F1 5' CGGCAGGTCACCTTTCTGCAAGG 3' , Mut218-P-R 5' TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC 3' ไพรเมอร์คู่แรกในตำแหน่งนี้ให้ผลผลิตของ PCR ขนาด 200 คู่เบส กับปาล์มน้ำมัน DAMI ชนิดคูราและเทเนอรา ไม่ให้ผลกับฟิลิเฟอรา ไพรเมอร์คู่ที่สองให้ ผลผลิต PCR ขนาด 276 คู่เบส กับปาล์มน้ำมัน DAMI ชนิด ฟิลิเฟอรา กับ เทเนอรา แต่ไม่ได้ให้ผลกับคูรา ดังแสดงในFigure 7 (a)

ตำแหน่ง SNP_{TAYA} ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ Mut106-D-F3 5' GCCGAAATGGACTGCTGAAGTAA 3' Mut106-D-R1 5' GCTTGGCCATAGAACAAATGAAGC 3' และ Mut106-P-F1 5' GCCGAAATGGACTGCTGAAGCAT 3' Mut106P-P-R 5' TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC 3' โดยที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ นี้ สำหรับตรวจสอบชนิด



ของปาล์มน้ำมัน Tanzania กับ Yangambi โดยที่ไพรเมอร์คู่แรกให้ผลผลิต PCR ขนาด 172 คู่เบส กับ ดุรา และ เทเนอรา และ ไพรเมอร์คู่ที่สองให้ผลผลิต PCR กับ ฟิสิเฟอรา กับ เทเนอรา ขนาด 264 คู่เบส แสดงใน Figure 7 (b) สำหรับสปีส์ในตำแหน่ง SNP_{LaAV} และ SNP_{ENGc} การออกแบบไพรเมอร์ เพื่อตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ PCR ทว่าไปยังไม่สำเร็จต้องทำการทดสอบปรับสภาวะการทำ PCR หรือออกแบบไพรเมอร์ คู่ใหม่เพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite จำนวน 13 คู่ที่เหมาะสมสำหรับใช้จำแนกและ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นพ่อและต้นแม่รวม 10 กลุ่มพันธุ์ (Deli Dura, AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me) พบว่า La Me มีพันธุกรรมที่แตกต่างจากประชากรกลุ่มอื่น ๆ มากที่สุด รองลงมาได้แก่ Calabar, Nigeria, Tanzania และ Ghana สำหรับกลุ่ม AVROS มีพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกับ Deli Dura ที่ใช้เป็นประชากรแม่มากที่สุด รองลงมาคือ DAMI แต่เครื่องหมายโมเลกุล 13 คู่นี้ไม่สามารถแยก ความแตกต่างภายในประชากรแม่พันธุ์ Deli Dura ได้ จึงค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติมอีก 19 คู่ที่ ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอภายในประชากร Deli Dura ได้ถึง 44 alleles นอกจากนี้ยังได้ เครื่องหมายโมเลกุลอีก 32 คู่ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันต้นเดี่ยวที่ เป็นลูกผสมระหว่างสปีชีส์ (*E.guineensis* x *E.oleifera*) จำนวน 182 ตัวอย่างพันธุ์ ข้อมูลความ หลากหลายทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 13,771 ข้อมูล แสดงในรูปความยาว alleles ถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน สำหรับใช้ในการสืบค้น จำแนก ตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ และใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ได้

จากการใช้เทคนิคสปีส์ตรวจสอบยีน MADs-box สำหรับแยกชนิดของปาล์มน้ำมัน พบสปีส์ 5 ตำแหน่งที่สามารถจำแนกประชากรแม่พันธุ์ดุรา พ่อพันธุ์ฟิสิเฟอรา และลูกผสมเทเนอรา ทั้งหมดที่ศึกษาได้ดังนี้คือ สปีส์ SNP_{ENGc} (T/C), SNP_{TaYa} (A/T), SNP_{DA} (C/G), SNP_{LaAV} (C/A) และ SNP_{Tan} (C/G) สำหรับสปีส์ 3 ตำแหน่งหลังเป็นการค้นพบครั้งแรกในการศึกษานี้

นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการออกแบบโพรบและไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบ ปาล์มน้ำมันชนิด ดุรา ฟิสิเฟอรา และเทเนอรา โดยใช้เครื่อง Real-Time PCR ตลอดจนไพรเมอร์ 2 คู่ที่ใช้กับ เครื่อง PCR ทัวไป

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ใช้เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพกล้าพันธุ์ปาล์มน้ำมันรองรับ พรบ.คุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ.2542 โดยคัดแยกต้นดูราออกจากลูกผสมเทเนอรา
2. สร้างแปลงพันธุ์พ่อชนิด ฟิสิเฟอรา ซึ่งได้จากการผสมข้ามระหว่างต้นเทเนอรา ด้วยกัน จะได้ต้นปาล์มน้ำมันชนิด ดุรา เทเนอรา และฟิสิเฟอรา ในอัตรา 1:2:1 คละกัน แต่เดิมต้องนำไปปลูกหมด



เพราะการแยกชนิดทำได้ไม่ได้ในระยะต้นกล้า ต้องตรวจสอบเมื่อติดผลแล้วเท่านั้น ทำให้สิ้นเปลืองเนื้อที่
แรงงานและค่าใช้จ่ายตลาดจนเวลาในการดูแลรักษา และต้นพ่อพันธุ์พืชเฟอร่าอยู่กระจัดกระจาย การ
รวบรวมเกสรทำได้ยาก แต่ถ้าใช้เทคโนโลยีที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถเลือกต้นพืชเฟอร่าที่มีเพียง
25% ทำให้สามารถนำไปปลูกติดกันประหยัดทั้งเนื้อที่ แรงงาน งบประมาณ และการดูแลรักษา

3. เทคนิคการตรวจสอบความตรงตามพันธุ์และตรวจลูกผสม Tenera ในระยะกล้าสามารถใช้
ใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ กรณีมีการฟ้องร้องเรื่องชนิดของกล้าพันธุ์และความตรงตามพันธุ์ ได้

4. ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายของปาล์มน้ำมัน สำหรับใช้สืบค้นใน
การจำแนกพันธุ์ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการปาล์มน้ำมัน. โรงพิมพ์ดอกเบญจ กรุงเทพฯ. 188 หน้า
สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร : ปาล์มน้ำมัน. 2556 การผลิตสินค้า
การเกษตรที่สำคัญ แหล่งที่มา: [http://www.oac.go.th/download /prcai/jarmerop/Palm.pdf](http://www.oac.go.th/download/prcai/jarmerop/Palm.pdf),
สืบค้นเมื่อ ธ.ค. 2557
- หทัยรัตน์ อุไรรงค์ อรรถรัตน์ วงศ์ศรี บุญเรือน เรื่องพิเศษ พญศักดิ์ รวยอารี และ ประสาน สืบสุข.
2548. โครงการวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 โดยใช้เทคนิค
AFLP. โรงพิมพ์ดอกเบญจ กรุงเทพฯ. 30 หน้า.
- Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Chkerospondias*
asillaris. BioLect. Biodiv. Lett. 2 : 19-24.
- Alvarado, A. and F. sterling. 2005. Shesstoleramt oil palm vaicties. ASD al Palm Papers 28:5-20
- Anonymous. 1997. Gene Scan Reference Guide Chemistry Reference for The ABI Prism 377
Genetic Analyzer PE Applied Biosystems. Division of Perkin – Elmer. International Union
of Pure and Applied Chemistry : 8-1 – 8-33.
- 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
- 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. Rajanaidn, A.H. Zakri and S.C. Cheah. 2004. 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.
- 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.
- 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
- 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.



Table 1 Size and number of alleles per locus (Primer) and actual heterozygosity of oil palm Deli Dura, different male parent populations, DOA's recommended oil palm varieties (Surat Thani 1-8) of 246, 151 and 74 plants, respectively. The samples were amplified with 13 SSR primers.

No.	Primer	Size of alleles (Base pair)	No. of alleles	Heterozygosity
1	mEgCIR007	118, 120, 122, 124, 126, 128 , 130	7	0.13
2	mEgCIR017	112, 114, 118, 134 , 140	5	0.09
3	mEgCIR080	191, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209 , 211	10	0.09
4	mEgCIR342	157, 159, 165, 167, 169, 171 , 181	7	0.11
5	mEgCIR364	167, 171, 175, 183, 185, 187 , 197	7	0.26
6	mEgCIR364	134, 136, 144, 146, 148 , 154	6	0.16
7	mEgCIR369	164, 166, 172, 174 , 182	5	0.10
8	mEgCIR087	215, 217, 221, 231, 235, 237, 239, 247, 249, 255 257	11	0.14
9	mEgCIR221	100, 112, 114, 116, 118, 120, 124, 128 , 130	9	0.25
10	mEgCIR257	71, 87, 89, 93, 103, 105 , 107	7	0.26
11	mEgCIR351	216, 222, 232, 234, 240, 242 , 250	7	0.23
12	mEgCIR359	146, 152, 154, 162, 168, 172 , 174	7	0.05
13	mEgCIR375	230, 238, 246, 250, 256, 258 , 262	7	0.19
Total			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 respectively.

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



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

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

annotation + = present
- = absent



Dendrogram using Ward Method Rescaled Distance Cluster Combine

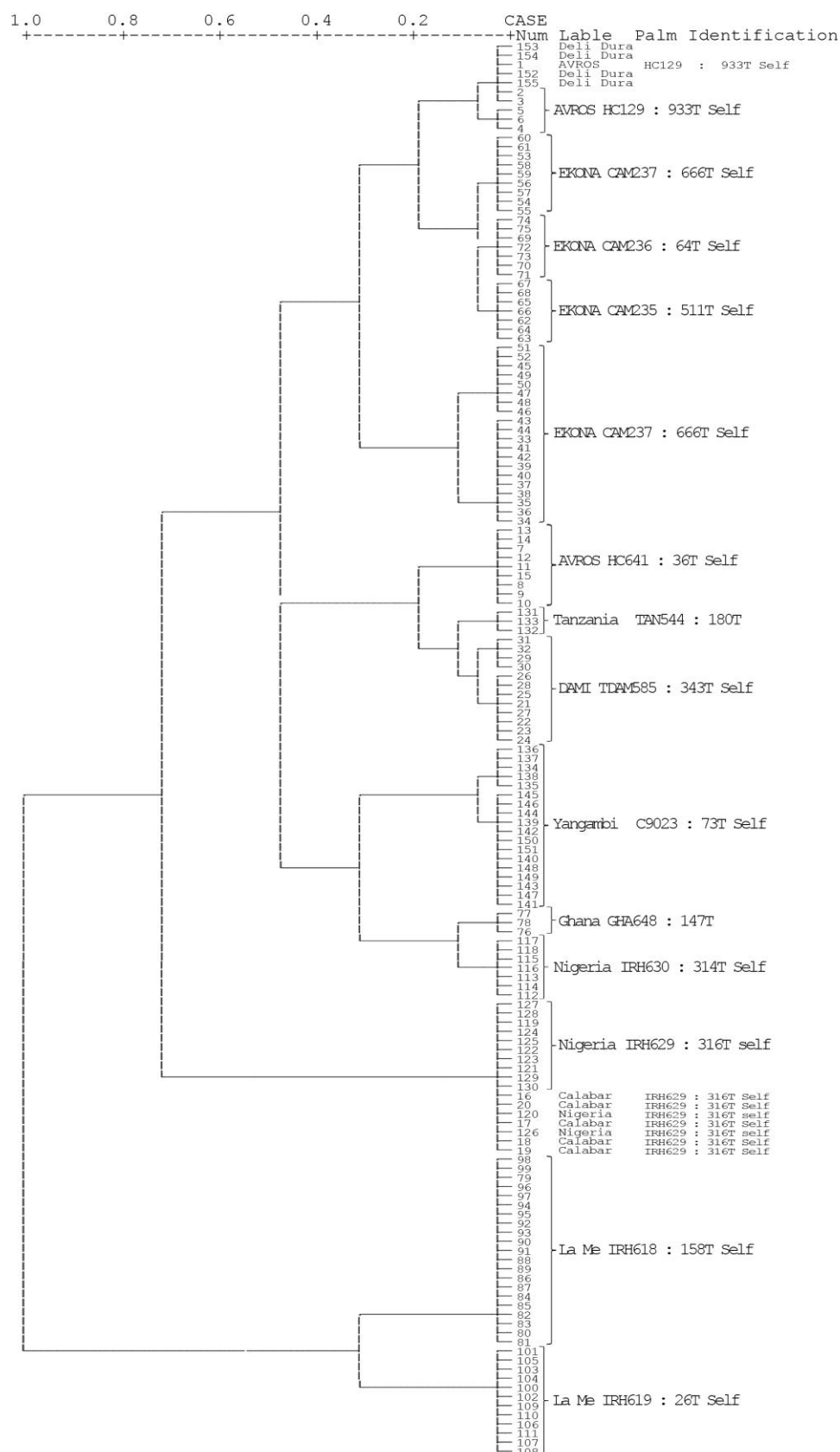


Figure 1 The genetic relationship of 151 samples from 9 distinct male parent populations included 4 samples of Deli Dura female parent, use as breeding materials. The dendrogram was generated by similarity matrix data of 13 SSR primers.



Note: C/G = S (Strong-3H bonds), A/C = M (aMimo), A/T = W (Weak-2H bonds), C/T = Y (pYrimidine)

ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557



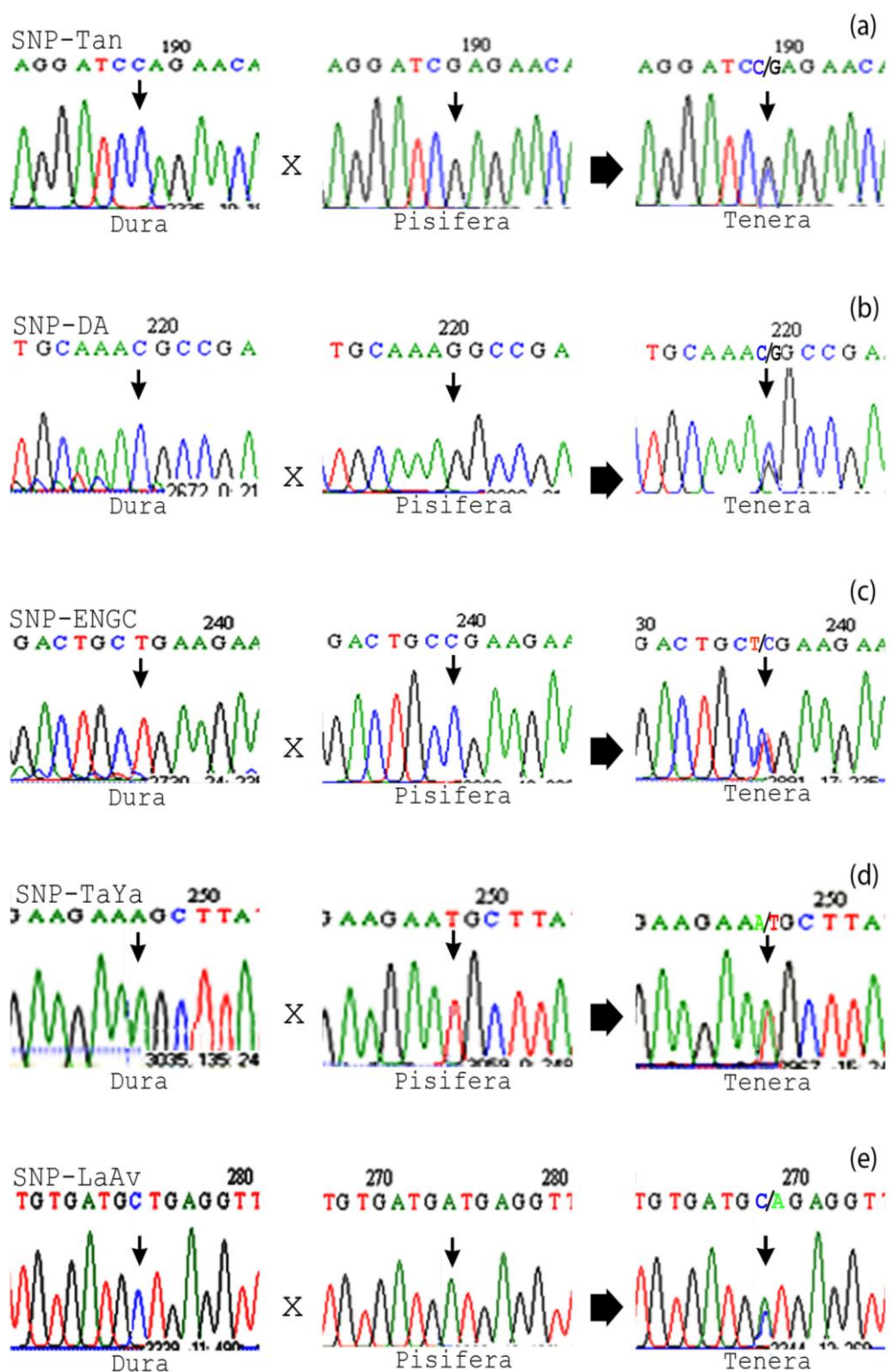


Figure 3 The electropherogram of MADS-box gene sequences of each SNP position showed a nucleotide substitution (black arrow) between dura and pisifera oil palm, (a) SNP_{Tan} (C/G); (b) SNP_{DA} (C/G); (c) SNP_{ENG} (T/C); (d) SNP_{TaYa} (A/T); (e), SNP_{LaAV} (C/A). Two electropherogram peaks at the 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 _{ENG}	SNP _{TaYa}	SNP _{LaAV}	reference
Deli Dura	Dura	6	C	C	T	A	C	
Dami	Dura	3	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	3	G	G	T	A	C	
	Tenera	3	G	C/G	T	A	C	
Ekona	Dura	3	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	3	G	C	C	A	C	
	Tenera	4	G	C	T/C	A	C	
Ghana	Dura	4	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	4	G	C	C	A	C	
	Tenera	3	G	C	T/C	A	C	
La Me	Dura	13	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	13	G	C	T	A	A	
	Tenera	11	G	C	T	A	C/A	
Nigeria	Dura	3	G	C	T	A	C	Singh <i>et al.</i> 2013
	Pisifer	3	G	C	C	A	C	
	Tenera	3	G	C	T/C	A	C	
Tansania	Dura	4	C	C	T	A	C	1. Singh <i>et al.</i> 2013 2. This study
	Pisifer	4	G	C	T	T	C	
	Tenera	4	C/G²	C	T	A/T¹	C	
Yangambi	Dura	3	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	3	G	C	T	T	C	
	Tenera	2	G	C	T	A/T	C	
AVROS	Dura	4	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	4	G	C	T	A	A	
	Tenera	4	G	C	T	A	C/A	
Calabar	Dura	5	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	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 4 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; (C)AG = Q (Glutamine), (C)GC = R (Arginine), C(T)G = L (Leucine), AA(A) = K (Lysine), G(C)T = A (Alanine)
Pisifera; (G)AG = E (Glutamic acid), (G)GC = G (Glycine), C(C)G = P (Proline), AA(T) = N (Asparagines), G(A)T = D (Aspartic acid)

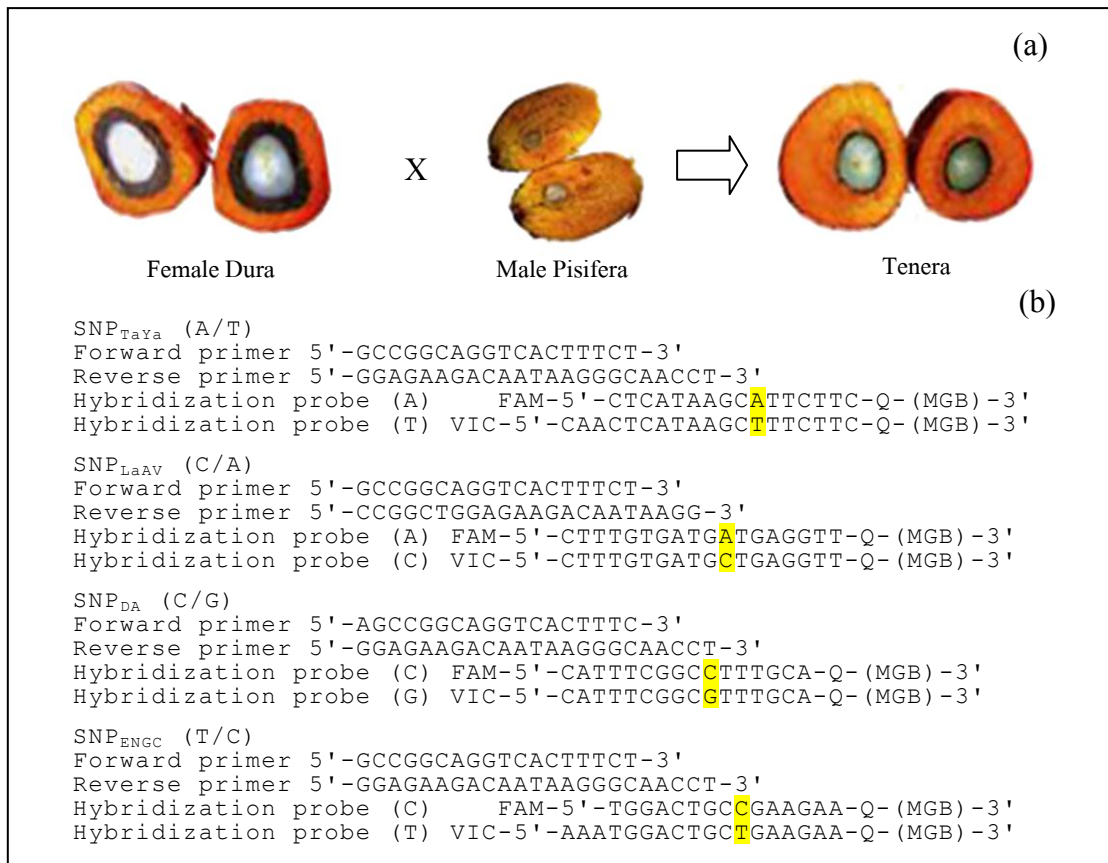


Figure 5 Probes and primers used in SNP genotyping analysis for determining oil palm shell type. (a) Showed the shell type of commercial hybrid tenera (Thin) derived from cross between female dura (Thick) and male pisifera (no shell). (b) Two specific hybridization probes were designed from polymorphic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

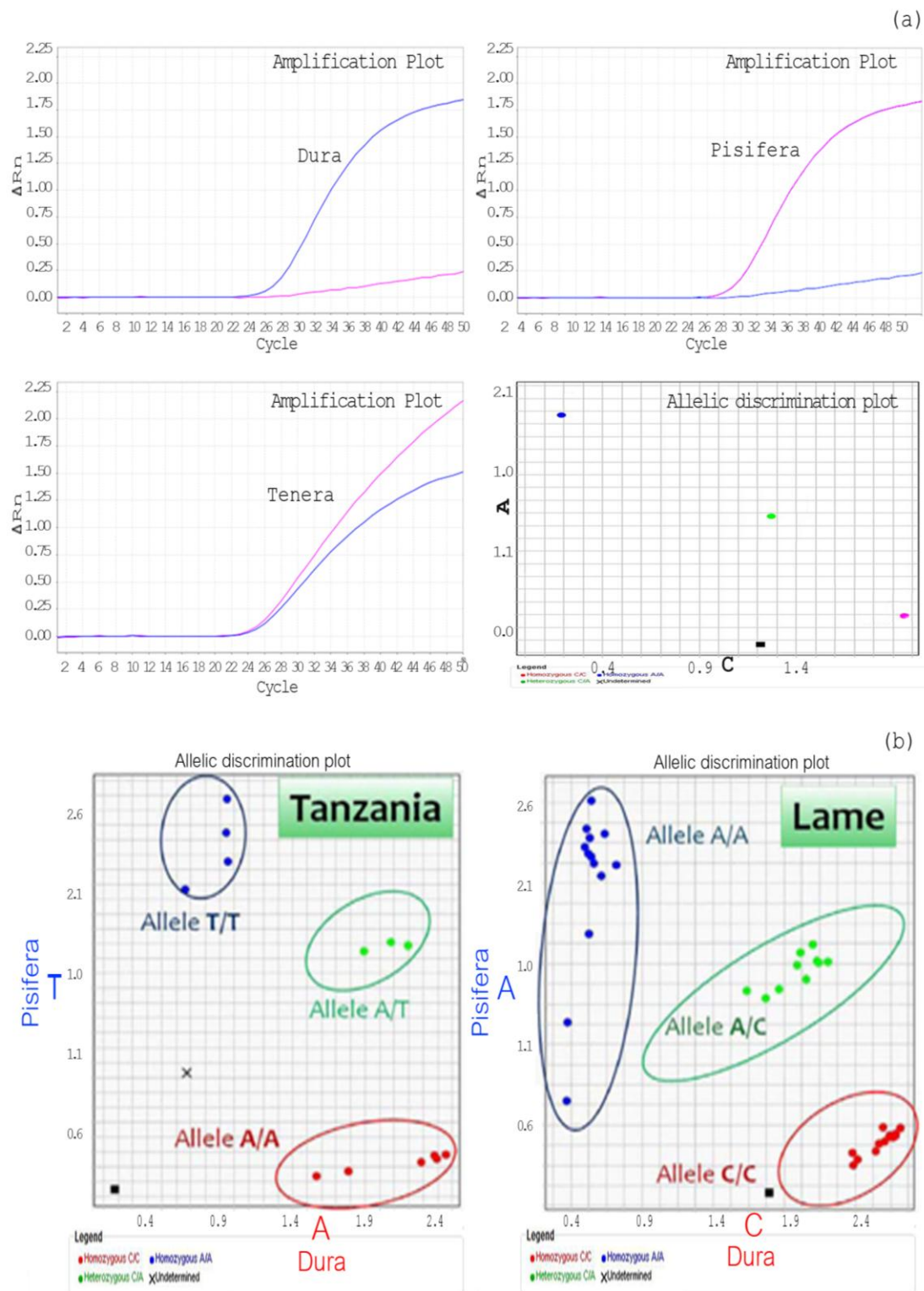


Figure 6 (a) The result of shell type detection on AVROS samples (dura, pisifera and tenera) by primer and probe designed from SNP_{LaAv} nucleotide sequence. The amplification and allelic discrimination plot were generated by real time PCR. (b) The discrimination plots generated by real time PCR showed oil palm shell type detection of Tanzania and La Me samples.



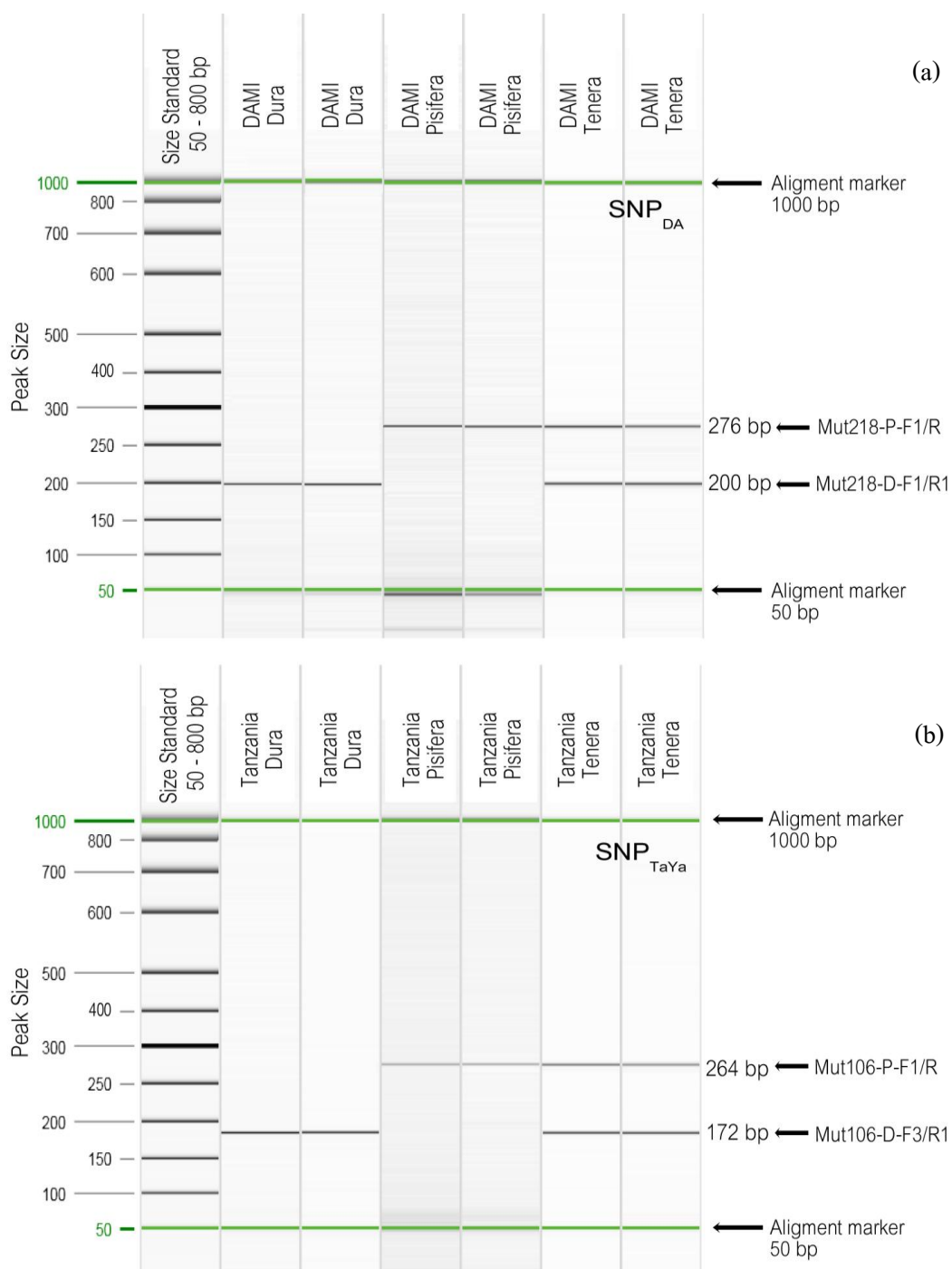


Figure 7 The detection of oil palm shell types by allelic specific primers. (a) The primer Mut218-D-F1/R1 gave the positive amplification (200 bp) in DAMI dura and DAMI tenera, while primer Mut218-P-F1/R gave the positive amplification (276 bp) in DAMI pisifera and DAMI tenera. (b) The primer Mut106-D-F3/R1 gave the positive amplification (172 bp) in Tanzania dura and Tanzania tenera, while primer Mut106-P-F1/R gave the positive amplification (264 bp) in Tanzania pisifera and Tanzania tenera.

