บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชให้น้ำมันที่ให้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่สูงกว่าพืชน้ำมันทุกชนิดและเป็นพืชน้ำมันที่มีปริมาณการผลิตน้ำมันและการบริโภคเป็นอันดับสองของโลกรองจากถั่วเหลือง มีต้นทุนการผลิตต่ำ ความเสี่ยงต่อการเสียหายจากภัยธรรมชาติน้อย สามารถผลิตในปริมาณมากเพื่อรองรับความต้องการของประชากรที่เพิ่มขึ้นในโลกได้ จึงน่าจะมีการสนับสนุนให้มีการปลูกปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นพืชที่มีโอกาสและมีศักยภาพสูงในการจะแก้ปัญหาเศรษฐกิจของภาคใต้ได้ จึงสมควรได้รับการสนับสนุนอย่างจริงจัง อีกทั้งในอนาคตอันใกล้นี้จะต้องมีการปลูกปาล์มน้ำมันทดแทนสวนปาล์มน้ำมันเดิม และยังคาดว่าจะต้องขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันออกไปเพื่อรองรับประชากรที่เพิ่มขึ้น ปาล์มน้ำมันที่มีการเพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ทางภาคใต้ของประเทศไทยมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Elaeis guineensis* Jacq. สามารถแบ่งเป็น ๓ พันธุ์ (Type) คือ ดูรา (Dura) พิสิเฟอรา (Pisifera) และ เทเนอรา (Tenera) ในการผลิตปาล์มน้ำมันเป็นการค้าโดยทั่วไปนิยมใช้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราที่ได้จากการผสมระหว่างแม่พันธุ์ดูราและพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา เนื่องจากให้ผลผลิตน้ำมันดิบสูงกว่าพ่อแม่พันธุ์ แต่มีการนำเอาพันธุ์ที่มีมาตรฐานต่ำมาจำหน่ายให้เกษตรกรอยู่ เนื่องจากการสังเกตลักษณะของต้นกล้าปาล์มน้ำมันภายนอก ไม่สามารถแยกออกได้ว่าเป็นพันธุ์ดีหรือไม่ จนกว่าต้นปาล์มน้ำมันจะให้ผลผลิตหรือประมาณ 3 ปีหลังจากปลูก ดังนั้นจึงได้พยายามหาแนวทางในการตรวจสอบพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อที่จะใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบความแตกต่างของปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์

อลิษา และคณะ (2544) ได้เตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอของ microsatellite DNA และทำการคัดเลือกโคลนที่มีลักษณะที่เป็น microsatellite DNA ที่มีลักษณะเป็น $(CA)_n$ อย่างแท้จริงมาได้จำนวน 2 โคลน ซึ่งได้นำไปออกแบบไพรเมอร์สำหรับศึกษา microsatellite โดย กณพ และคณะ (2546) นอกจากนี้ยังได้เตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอของ microsatellite DNA และออกแบบไพรเมอร์เพิ่มเติมพบว่าเครื่องหมาย microsatellite DNA (MJT1 และ MJT2) สามารถแยกคู่ผสม 105 และ 116 ออกได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษา microsatellite DNA อย่างเดียวยังคงไม่เพียงพอที่จะแยกปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้ และมีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงในการสำรวจและพัฒนาเครื่องหมาย microsatellite DNA งานวิจัยนี้จึงค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพิ่มเติม โดยให้ความสนใจส่วนที่เป็น intron ของ single copy gene ทั้งนี้เนื่องจากส่วนที่เป็น intron ของพืชแต่ละพันธุ์โดยทั่วไปมักมี

ความหลากหลายสูงเหมาะที่จะนำมาใช้ศึกษา polymorphism ในการทดลองสามารถเพิ่มจำนวน intron ได้โดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของ exon เทคนิคนี้คือ Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC)-PCR ซึ่งมีประสิทธิภาพในการศึกษาดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายเพื่อจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชและสัตว์ได้ (Palumbi, 1995) นอกจากนั้นผลจากความพยายามที่จะค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจำแนกปาล์มน้ำมันพันธุ์ ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรามาช้านาน จากรายงานผลการวิจัยที่ผ่านมา ได้แก่ การศึกษา linkage map ด้วยเครื่องหมาย RFLPs และ RAPD เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับใช้ปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis*) ซึ่งผลจากการศึกษารายงานการวิจัยที่ผ่านมา พบว่ายังไม่สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับจำแนกปาล์มน้ำมันพันธุ์ เทเนอรา ดูรา และพิสิเฟอราได้ (Mayes *et al.*, 1997; Moretzsohn *et al.*, 2000) ต่อมาได้มีการพัฒนาเครื่องหมาย microsatellite DNA ได้จำนวนหนึ่งซึ่งคาดว่าน่าจะพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่จะแยกชนิดของปาล์มน้ำมันได้ (Billotte *et al.*, 2001) แต่ปัจจุบันก็ยังไม่มีใครนำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวมาใช้งานจริง จึงอาจสรุปได้ว่าการปรับปรุงพันธุ์ของปาล์มนั้นมีความซับซ้อน เกิดการผสมกันไปมากจนยากที่จะหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมมาใช้งาน ประกอบกับในการผลิตเมล็ดพันธุ์ในปัจจุบันผู้ผลิตต่างก็ทราบประวัติต้นที่ใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์อยู่แล้วการใช้เครื่องหมายที่สามารถแยก ดูรา เทเนอรา และ พิสิเฟอรา ภายในคู่ผสมเดียวกันก็นับว่าเพียงพอแล้ว แต่การหาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับผลผลิตน่าจะเป็นประโยชน์มากกว่า ในการศึกษานี้จึงได้เริ่มศึกษาจากยีนของเอนไซม์ Acetyl CoA carboxylase (ACCase) ซึ่งเป็นตัวควบคุมการสร้างกรดไขมัน ทั้งนี้เนื่องจากพบรายงานว่าในการศึกษาในเมล็ดเรพพบว่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACCase เพิ่มขึ้นควบคู่กับปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้น (Turnham and Northcote, 1983) และจากการศึกษาโดย Madoka และคณะ (2002) พบว่าการเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีน *accD* ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของ ACCase มีผลให้มีการเพิ่มปริมาณเมล็ดและปริมาณน้ำมันในยาสูบจึงน่าสนใจที่จะทำการศึกษาในปาล์มน้ำมันบ้าง

ตรวจเอกสาร

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้าม ใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในวงศ์ปาล์ม (Palmae หรือปัจจุบันเปลี่ยนเป็น Arecaceae) สกุล *Elaeis* และเป็นพืชยืนต้นที่สามารถให้ผลผลิตทะลายได้ตลอดปี เริ่มจากปาล์มมีอายุได้ ประมาณ 2 ปีครึ่งหลังจากปลูก โดยเฉลี่ยแต่ละต้นควรจะให้ทะลายได้อย่างน้อยหนึ่งทะลายต่อเดือน และสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตทะลายได้นานกว่า 25 ปี พันธุ์ที่นิยมปลูกของปาล์มน้ำมันคือ *Elaeis guineensis* Jacq. (ธีระ และคณะ, 2546)

1. พันธุ์ปลูกปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้นผสมข้ามประเภทที่มีช่อดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน แต่ช่วงเวลาการออกดอกจะไม่พร้อมกัน เป็นพืชดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 32 พืชนี้จัดอยู่ในสกุล *Elaeis* ซึ่งสามารถ แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ *E. guineensis, E. oleifera* และ *E. odora* คือ

1.1. ***E. guineensis*** เป็นปาล์มน้ำมันชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นพันธุ์ปลูกที่นิยมปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในประเทศต่างๆ ในทวีปแอฟริกาบริเวณตอนกลางและตะวันตกของทวีป อาจเรียกปาล์มน้ำมัน พวกนี้ว่า African oil palm พันธุ์หรือสายพันธุ์ของปาล์มน้ำมันชนิดนี้สามารถจำแนกออกได้ 3 พันธุ์ (types) คือ ดูรา เทเนอรา และฟิสิเฟอรา โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะความหนาของกะลาปาล์ม การปรากฏของเส้นใยสีน้ำตาลบริเวณเนื้อปาล์มชั้นนอกรอบๆ กะลาและความหนาของเนื้อนอกปาล์ม ลักษณะที่แตกต่างดังกล่าว โดยเฉพาะความหนาของกะลา และการปรากฏของเส้นใยสีน้ำตาล พบว่าถูกควบคุมด้วยยีนเพียงคู่เดียว โดยลักษณะผลปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูราถูกควบคุม ด้วยยีนเด่น 1 คู่ (Sh^+Sh^+) ลักษณะผลปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอราถูกควบคุมด้วยยีนพันธุ์ทาง 1 คู่ (Sh^+Sh^-) และลักษณะผลปาล์มน้ำมันพันธุ์พิสิเฟอราถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ (Sh^-Sh^-) ปาล์มน้ำมันพันธุ์พิสิเฟอรา เป็นพันธุ์ที่ไม่ปลูกกันเป็นการค้า เนื่องจากช่อดอกตัวเมียมีโอกาสเป็นหมันสูง ผลมีขนาดเล็กและให้ผลผลิตต่ำ แต่มีข้อดีตรงที่ลักษณะของกะลาบาง จึงนิยมใช้เป็นพ่อพันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธ์ โดยใช้ผสมกับแม่พันธุ์ดูราเพื่อผลิตลูกผสม ปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา ดังนั้นพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า คือ พันธุ์ดูรา และเทเนอรา โดยเฉพาะพันธุ์เทเนอรามีการปลูกกันอยู่อย่างกว้างขวางในปัจจุบัน เนื่องจากให้ผลผลิตน้ำมันและลักษณะต่างๆ หลายอย่างที่ดีกว่าพันธุ์ดูรา

1.2. *E oleifera* (เดิม คือ *E.melanococca* หรือ *Corozo oleifera)* กลุ่มพันธ์ปาล์มน้ำมันพวกนี้มีถิ่นกำเนิดอยู่แถบประเทศต่างๆ ทางภาคเหนือของลุ่มแม่น้ำอะเมซอนของทวีปอเมริกาใต้ยาวติดต่อไปถึงทวีปอเมริกาบริเวณประเทศคอสตาริกา อาจเรียกปาล์มน้ำมันพวกนี้ว่า American oil palm ไม่นิยมปลูกเป็นการค้า เนื่องจากมีการเจริญเติบโตช้า ผลมีขนาดเล็กและให้ผลผลิตน้ำมันต่ำกว่าปาล์มน้ำมันชนิด *E.guineensis* อย่างไรก็ตามได้มีการอาศัยลักษณะได้เปรียบบางประการในกลุ่มพันธุ์พวกนี้ เช่น ต้นเตี้ย การเจริญเติบโตช้า เป็นต้น เพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ปลูกในกลุ่ม *E.guineensis* โดยสร้างเป็นพันธุ์ลูกผสมข้ามชนิด (*E.guineensis* × *E.oleifera)* ปัจจุบันลูกผสมที่ได้อยู่ระหว่างการปลูกทดสอบในต่างประเทศ

1.3. *E. odora* (ชื่อเดิมคือ *Barcella odora)* มีรายงานพบปาล์มน้ำมันพวกนี้บริเวณเดียวกับ *E.oleifera* คือ แถบลุ่มแม่น้ำอะเมซอน บทบาทและความสำคัญของปาล์มน้ำมันในกลุ่มนี้ยังไม่มีรายงาน

2. พันธุ์ปาล์มน้ำมันในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันที่ปลูกได้ดีในประเทศแถบร้อนชื้นที่อยู่ในช่วงเส้นละติจูด 20 องศาเหนือ-ใต้ เป็นพืชน้ำมันที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ จึงทำให้มีศักยภาพสูง สำหรับปาล์มน้ำมันที่ปลูกในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในระยะเริ่มต้น มีกำเนิดมาจากต้นปาล์มดูราเพียง 4 ต้น ที่ปลูกในสวนพฤกษชาติโบกอ (Bogor botanical garden) เมื่อปี พ.ศ. 2391 หลังจากการนำเข้าไปปลูกในประเทศมาเลเซียในเวลาต่อมา ซึ่งรู้จักกันในชื่อพันธุ์ เดลี ดูรา ซึ่งมีการปลูกกันอย่างกว้างขวางในยุคต้นๆ ของการปลูกปาล์มน้ำมันเชิงการค้าในประเทศอินโดนีเซีย โดยสายพันธุ์ปลูกต่างๆ ได้รับการพัฒนามาจากการผสมระหว่าง ดูรา × ดูรา ภายหลังจากที่มีการค้นพบว่าความหนาของกะลาในผลปาล์มถูกควบคุมด้วยยีนเพียงคู่เดียว และสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรม ในปี พ.ศ. 2484 ได้มีการพัฒนาพันธุ์ปลูกปาล์มน้ำมันจากการผสมระหว่าง ดูรา × เทเนอรา (ระหว่างปี พ.ศ. 2484 – 2503) และสุดท้ายพันธุ์ปลูกที่ใช้กันได้เปลี่ยนมาเป็นพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่าง ดูรา × พิสิเฟอรา เกือบทั้งหมด (ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2503 ที่จังหวัดสตูล โดยมีพื้นที่ปลูกเพียง 1,600 ไร่ และมีการขยายตัวของพื้นที่ปลูกอย่าง รวดเร็วนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520 เป็นต้นมา ในปี พ.ศ. 2544 มีพื้นที่ปลูกรวมทั้งหมดไม่ต่ำกว่า 1.8 ล้านไร่ พันธุ์ปลูกปาล์มน้ำมันที่ปลูกในประเทศไทยเกือบทั้งหมดมีการนำเมล็ดพันธุ์เข้ามาจากต่างประเทศ โดยเฉพาะในช่วงก่อนปี พ.ศ. 2530 พันธุ์ปลูกส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสมเทเนอราที่นำเข้ามาจากประเทศมาเลเซีย และมีเกษตรกรจำนวนไม่น้อยที่มีการปลูกปาล์มน้ำมันโดยเก็บเมล็ดจากโคนต้น

ปาล์มลูกผสมเทเนอรา มาปลูกทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตปาล์มน้ำมันและส่งผลกระทบทำให้ต้นทุนในการผลิตของเกษตรกรสูงขึ้น ปัจจุบันแหล่งเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันหลักที่ไทยนำเข้ามาจากต่างประเทศอยู่ในทวีปอเมริกากลาง (เช่น ประเทศคอสตาริกา) และจากอีกหลายประเทศในทวีปแอฟริกา นอกจากนี้ยังมีหน่วยราชการ (กรมวิชาการเกษตร) และบริษัทเอกชนได้ผลิตเมล็ดพันธุ์ปาล์มขึ้นเองในประเทศ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดอีกหลายประการ เช่น ประวัติและที่มาของเชื้อพันธุ์พ่อแม่ ระยะเวลาในการทดสอบศักยภาพในชั่วลูก และปริมาณพื้นที่ใช้ในการทดสอบ เป็นต้น

3. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นปาล์มน้ำมัน

3.1 ราก

ปาล์มน้ำมันมีระบบรากแบบรากฝอย ประกอบด้วยรากชุดต่างๆ ประมาณ 4 ชุด รากชุดแรกที่อยู่ในระดับแนวนอนยาว 3-4 เมตร รากชุดแรกที่อยู่ในระดับแนวดิ่งยาว 1-2 เมตรจากผิวดิน สำหรับรากชุดที่สอง สาม และสี่ จะเกิดเรียงตามลำดับ โดยทั่วไปรากจะเกิดมากและสามารถดูดซับน้ำและธาตุอาหาร ที่ปาล์มสามารถนำมาใช้ประโยชน์ที่ระดับความลึกประมาณ 30-50 เซนติเมตร

3.2 ลำต้น

มีลักษณะเป็นต้นเดี่ยวตั้งตรง ไม่มีกิ่งแขนง ประกอบด้วยข้อและปล้องที่ถี่มากแต่ละข้อมีทางใบเวียนรอบต้น มีเนื้อเยื่อเจริญเฉพาะตรงปลายยอด 2-3 ปีแรกจะมีทางใบอยู่ติดกับลำต้นมากกว่า 40 ทางใบ จากนั้นแล้วจึงจะมีการเจริญทางด้านการสูงขึ้นเรื่อย ๆ ลำต้นมีข้อสั้นๆ เป็นที่เกิดของใบ เวลาตัดทางใบจะเห็นตอใบเวียนรอบต้น ความสูงอาจจะสูงถึง 15-18 เมตร มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น 45-60 เซนติเมตร

3.3 ใบ หรือทางใบ

ใบ หรือทางใบประกอบด้วย แกนทางใบ ก้านใบ ใบย่อย เกิดจากการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญเฉพาะตรงปลายยอด ซึ่งจะมีจุดกำเนิดตาใบอยู่มากกว่า 50 ตา ในปาล์มที่มีอายุ 5-6 ปี จำนวนใบ หรือทางใบที่ผลิตได้แต่ละปีประมาณ 30-40 ทางใบ หลังจากนั้นจะลดลงเหลือประมาณ 20-25 ทางใบต่อปี โดยลักษณะของทางใบปาล์มจะเรียงอยู่บนลำต้นอย่างเป็นระเบียบ มีลักษณะเป็นเกลียวทั้งวนขวา และวนซ้าย

3.4 ช่อดอก

ช่อดอกปาล์มน้ำมันเกิดจากตาดอกที่บริเวณทางใบที่ติดกับต้น ตาดอกอาจพัฒนาเป็นได้ทั้งช่อดอกตัวเมียและช่อดอกตัวผู้ ดังนั้นปาล์มน้ำมันจึงมีทั้งช่อดอกตัวเมียและช่อดอกตัวผู้ในต้นเดียวกัน แต่เกิดในตำแหน่งของทางใบที่แตกต่างกัน บางครั้งในปาล์มน้ำมันที่มีอายุน้อยอาจจะพบช่อดอกผสมหรือกะเทย ในปาล์มน้ำมันที่มีอายุประมาณ 8 ปี ช่อดอกตัวเมียหนึ่งๆ ประกอบด้วยช่อดอกย่อยประมาณ 110 ช่อดอกย่อย ส่วนช่อดอกตัวผู้หนึ่งๆ ประกอบด้วยช่อดอกย่อยประมาณ 160 ช่อดอกย่อย

3.5 ผล เมล็ด

หลังจากช่อดอกตัวเมียได้รับการผสม ประมาณ 5.5-8 เดือนก็สามารถเก็บเกี่ยวได้ โดยทั่วไปผลิตทะลายปาล์มที่ได้ไม่ควรต่ำกว่า 12 ทะลายต่อปี น้ำหนักต่อหนึ่งทะลายประมาณ 10-30 กิโลกรัม จำนวนผลทั้งหมดต่อทะลายรวมแล้วประมาณ 500-4,000 ผลปาล์มประกอบด้วยเปลือกผลชั้นนอก เนื้อปาล์มชั้นนอก (Mesocarp) กะลา เนื้อปาล์มชั้นใน (Kernel) และเอ็มบริโอ ส่วนผลและเมล็ดที่มีให้น้ำมันมี 2 ส่วนคือส่วนแรกจากเปลือกผลชั้นนอก และเนื้อปาล์มชั้นนอก ส่วนที่สองจากเนื้อปาล์มชั้นใน และเอ็มบริโอ โดยส่วนแรกนิยมนำมาบริโภค ส่วนที่สองนิยมใช้เพื่อการอุปโภค

4. ประโยชน์ของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันที่สามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ทั้งที่เป็นอาหาร (Food) และที่มิใช่อาหาร (Non-food) หรือ มีประโยชน์ทั้งด้านการบริโภคและอุปโภคนั่นเอง ความหลากหลายของการใช้ประโยชน์ เช่น ใช้น้ำมันปาล์มโอเลอีน (olein palm oil) ทำอาหารในครัวเรือน หรือใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ที่ต้องมีการทอด เนยเทียม ไอศกรีม ขนมขบเคี้ยว และลูกกวาด ครีมเทียมประเภทต่างๆ สบู่และผงซักฟอก และ อุตสาหกรรมโอเลโอเคมีคอล (oleochemical) ซึ่งรวมถึงการผลิตเชื้อเพลิง (เมทานอล) เพื่อใช้กับเครื่องยนต์ เป็นต้น

เครื่องหมายพันธุกรรม (Genetic marker)

ประกอบด้วยเครื่องหมายในระดับโปรตีนและระดับดีเอ็นเอ (Judd *et al.*, 1999) ปัจจุบันพบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมเหล่านี้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตสามารถนำมาหาความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของพืชได้มากยิ่งขึ้น (Sunnucks, 2000) เพราะในการจำแนกพันธุ์พืชปกติแล้วจะสังเกตจากลักษณะภายนอก (Morphology) เช่น ลักษณะดอก ใบ ลำต้น และผล แต่บางครั้งก็เกิดความผิดพลาดได้ในกรณีที่สายพันธุ์มีความใกล้เคียงกัน ในกรณีของสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันนั้นมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากและมีระยะการติดดอกจนถึงออกผลค่อนข้างนานจึงเสียเวลาหากตรวจสอบด้วยลักษณะภายนอก

1. เครื่องหมายในระดับโปรตีน

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบโปรตีนในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ชี้ให้เห็นว่า ยีนของโปรตีนนั้นๆ มีวิวัฒนาการมาจากยีนเดียวกันที่มีอยู่ในบรรพบุรุษร่วมของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น เช่น

ไอโซไซม์ (Isozymes) คือ อัลโลไซม์ (Allozyme) เป็นเอนไซม์ที่ถูกควบคุมโดยยีนเพียงตำแหน่งเดียว (Unilocus) แต่ให้ลักษณะของข้อมูล หรือ รูปแบบที่หลากหลาย (Multiple allele) เป็นเทคนิคที่เปรียบเทียบความหลากหลายของแถบเอนไซม์หรือ โปรตีนที่เป็นไอโซไซม์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุมากน้อยแตกต่างกันทำให้มีความสามารถในการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับขนาดและประจุไฟฟ้าโดยรวมของโปรตีนนั้นๆ ซึ่งในแต่ละไอโซไซม์อาจจะมี สองแถบหรือมากกว่า โดยได้มีการนำไอโซไซม์มาใช้ในการศึกษาลักษณะเฉพาะในระดับประชากรและระดับตระกูลของพืช (Rick and Tanksley, 1983)

2. เครื่องหมายในระดับดีเอ็นเอ

การตรวจสอบระดับดีเอ็นเอมีบทบาทเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมโดยตรง และเป็นวิธีที่ตรงที่สุดในการวัดการถ่ายทอดทางพันธุกรรมร่วมกัน จากบรรพบุรุษร่วมกันของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นรหัสในการสังเคราะห์โปรตีน หรือเอนไซม์ที่จะทำให้เกิดลักษณะที่แตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดของพืชก็ได้ และไม่ขึ้นกับชนิดเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต ฤดูกาลและสภาพแวดล้อม ทั้งยังสามารถตรวจสอบได้จากส่วนของยีนที่เป็นรหัสในการสังเคราะห์โปรตีน (Coding) และส่วนที่ไม่ใช่ยีน (Non-coding) การตรวจสอบระดับดีเอ็นเอในพืชนั้น สามารถศึกษาจีโนม (Genome) 3 แหล่งด้วยกัน คือ จากคลอโรพลาสต์ ไมโตคอนเดรีย และจากนิวเคลียส (Soltis *et al.*, 1992) คลอโรพลาสต์เป็นออร์แกเนล (Organelle) ที่พบเฉพาะในพืชเท่านั้น ลักษณะของดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์ มีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างคงที่ มีความคล้ายคลึงกันสูง จึงนิยม

ศึกษาเพื่อตรวจสอบความเหมือนและแตกต่างในระดับประชากร และหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในพืช ส่วนไมโตคอนเดรียพบได้ทั้งในพืชและสัตว์มีขนาดใหญ่กว่าในคลอโรพลาสต์ และการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอมีความแปรผัน แหล่งสุดท้ายคือนิวเคลียส ซึ่งมีดีเอ็นเอขนาดใหญ่ และซับซ้อนมากที่สุดโดยดีเอ็นเอส่วนใหญ่ในเซลล์มีปริมาณประมาณ 90% ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ ตัวอย่างเครื่องหมายในระดับดีเอ็นเอ เช่น

2.1 Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดที่แสดงความแปรผันทางพันธุกรรมเนื่องจากการเพิ่มหรือขาดหายไปของจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือเกิดจากการเพิ่มหรือลดจำนวนนิวคลีโอไทด์ระหว่างจุดตัดจำเพาะ โดยผลจากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะในจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะให้แบบแผนดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน สามารถนำไปใช้ตรวจสอบพันธุ์ ทำแผนที่พันธุกรรม (Genetic mapping) ประเมินความหลากหลายของพันธุกรรม (Germplasm evaluation)

2.2 Random Amplified Polymorpyic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคที่ใช้กันมากในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล และ ระดับประชากรพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1990 เพื่อบอกถึงความแตกต่างในเรื่องการมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน (Polymorphism) ระหว่างพืชแต่ละต้น โดยใช้ไพรเมอร์เดี่ยวที่มี 10 นิวคลีโอไทด์ ที่ไม่มีการเรียงลำดับที่แน่นอนในการเพิ่มจำนวนผลผลิต PCR ที่เกิดจากการที่ไพรเมอร์จะจับกับ Genomic DNA แบบสุ่มทำให้ ผลผลิต PCR ที่ได้จึงเป็นแบบสุ่ม (Edward, 1998) ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน โดยดูจากการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบสีบน gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย ethidium bromide (Williums *et al.*, 1990; Rath *et al.*, 1998; Prathepha 2000)

2.3 Amplification Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นวิธีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่พัฒนามาจากเทคนิค RFLPs สำหรับการหาความหลากหลายของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ หนึ่งหรือหลายไพรเมอร์ ในการเพิ่มจำนวนผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค PCR เพื่อหาความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิตเช่น ในปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis* Jacq.) มีการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปาล์มที่มาจากประเทศต่างๆ 4 ประเทศด้วยเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR*I และ *Mse*I พบว่ามีแบบที่เป็น polymorphic 88% จากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด

และผลการศึกษาพบว่ามีความใกล้เคียงกันในระดับประชากรของปาล์มน้ำมันแต่ละประเทศ (Kularatne *et al.*, 2000)

2.4 ไมโครแซตเทลไลท์ (Microsatellite) หรือ Short Tandem Repeat (STR) หรือ Simple Sequence Repeats (SSRs) เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำซ้อนกันบนสายดีเอ็นเอ โดยทั่วไปมีประมาณ 1-6 คู่นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีความแตกต่างกันของจำนวนซ้ำในแต่ละหน่วย repeated และมีความเป็น polymorphic สูง และจากการศึกษาพบว่าไมโครแซตเทลไลท์มีการกระจายตัวอยู่ในจีโนมสูง มีปริมาณมาก และมีความหลากหลายสูง จึงมีการนำมาใช้เป็นเครื่องหมายระดับโมเลกุล (Garland *et al.*, 1999)

Hamilton และคณะ (1999) ได้ศึกษาการใช้ SNX linker เพื่อคัดเลือกไมโครแซตเทลไลท์ โดย สกัดดีเอ็นเอจากพืช นกเพนกวิน และ Primate มาทำการย่อยดีเอ็นเอด้วย mung bean nuclease (MBN) เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอกับ SNK linker นำไปเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR เพื่อเตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอ โดยคัดเลือกดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยตัว 5′ biotinylated oligonucleotide ที่จับอยู่กับ steptavidin-coated magnetic bead เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแล้วเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR อีกครั้ง และโคลนเข้า pBlue-script® II SK (+) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* XL1-Blue MRF′ แล้วคัดเลือกเฉพาะ positive clone ที่สามารถจะ hybridize กับ biotinylated oligonucleotide มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อทดสอบ พบว่าจะให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic DNA ที่แตกต่างกับในแต่ละชนิดสิ่งมีชีวิตได้ วิธีการหาไมโครแซทเทลไลท์นี้สามารถพัฒนาร่วมกับการศึกษา linkage mapping การศึกษาพันธุศาสตร์ระดับประชากร ตลอดจนความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Perera และคณะ (1999) ได้จำแนกไมโครแซตเทลไลท์ โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจจับ $(AC)_{13}$ เพื่อคัดเลือกไมโครแซตเทลไลท์ เมื่อได้ชิ้นส่วนที่ต้องการจึงโคลนเข้า LambdaZap phage vector และตรวจสอบอีกครั้งด้วยการไฮบริไดซ์กับ $(AC)_{13}$ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อออกแบบไพรเมอร์ แล้วนำไปใช้ตรวจสอบความหลากหลายของประชากรมะพร้าว (*Cocos nucifera L.*)ในศรีลังกา

2.5 EPIC (Exon-Primed Intron-Crossing) – PCR เป็นเทคนิคที่เลือกศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน intron หรือ non-coding region เป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนมากของยีนที่มีความสำคัญต่อกลไกทางด้านชีวเคมีของเซลล์ โดยออกแบบไพรเมอร์จากส่วนอนุรักษ์ในบริเวณ exon หรือ coding region ของยีนนั้นสำหรับใช้ทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนผลผลิต PCR ในบริเวณ intron หรือ non-coding region ที่ต้องการขึ้นมาทำการศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ เพื่อจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชและสัตว์ เทคนิค EPIC-PCR มีประสิทธิภาพมากในการศึกษาดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย (Palumbi, 1995; Hare, 2001) โดยยีนที่เลือกมาทำการศึกษาจะเป็นยีนที่เพียงหนึ่งซ้ำ หรือเลือกยีนที่มีจำนวนซ้ำน้อย จึงง่ายในการวิเคราะห์ข้อมูลและมีประสิทธิภาพในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ เช่น

Bailey และ Doley (1999) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ Intron ใน MADS-box gene ของ *pistillata* locus ในตัวอย่างที่ได้จาก *Sphaerocardamum* species กับ Brassicacea ใน species อื่นๆ เปรียบเทียบผลที่วิเคราะห์จาก nrDNA (nuclear ribosomal DNA), ITS (Internal Transcribed Spacer) และ intron ของ chloroplast *trnL* และเพื่อการศึกษาความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการที่ผ่านมาภายใน *Sphaerocardamum* species ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอสำหรับพืชในกลุ่ม Brassicacea ทำให้พบว่าความแตกต่างของ pairwise และ informative characters ในส่วน *pistillata* intron (0.6–30.8%, 284 characters) และ ITS (0–24%, 94 characters) จะสูงกว่าใน chloroplast *trnL* intron (0–4.2%, 17 characters) และเมื่อเปรียบเทียบในลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างในกลุ่ม *Sphaerocardamum* พบว่ามีระดับความแตกต่างและ informative characters ต่ำทั้งในส่วน *trnL* intron (0–2.4%, 1 character) และ nrDNA ITS (0–2.5%, 2 characters) แต่เมื่อพิจารณาในส่วน *pistillata* intron พบว่ามีความแปรปรวนมากกว่า (0.15–3.7%, 19 characters) และผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน *pistillata* intron พบว่าตัวอย่างแต่ละ species มีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกันสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างออกจากกันได้ซึ่งผลจากการศึกษาส่วน *pistillata* locus ครั้งนี้คาดว่าน่าจะนำไพรเมอร์ที่ได้ไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ในพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่นๆ ได้เช่นเดียวกัน

Ishikawa และคณะ (2002) ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้เทคนิค EPIC-PCR จากส่วน cDNA ของยีน PgiC (cytosolic phosphoglucose isomerase) จาก *Dryopteris caudipinna* โดยไพรเมอร์ที่ได้ คือ 14F/16R สามารถที่จะจำแนกเฟินแต่ละชนิดได้ในระดับ families ของ *Dryopteridaceae*, *Thelypteridaceae* และ *Woodsiaceae* โดยผลผลิต PCR ที่ได้จะประกอบด้วย 2 intron คือ 534 และ 1000 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นได้ออกแบบไพรเมอร์ใหม่ คือ 14F/15R และ 15F/16R จากการทดสอบพบว่าไพรเมอร์15F/16R สามารถใช้ในการศึกษาประชากรของ *Arachniodes standishii* (*Dryopteridaceae*)ได้

Sanjur และคณะ (2002) ทำการศึกษาพืชในตระกูลแตง (*Cucurbita*) เช่น squashes, pumpkins และ yellow-flowered gourds โดยการใช้เทคนิค EPIC-PCR ศึกษา intron 2 ที่อยู่ระหว่าง exon B และ exon C ของ ยีน *nad1* dehydrogenase ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งผลที่ได้นี้จัดเป็นข้อมูลพื้นฐานชิ้นหนึ่งที่มีการนำข้อมูลของยีนในไมโทคอนเดรียมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ในระดับ

inter-specific และ intra-specific โดยในการศึกษาครั้งได้ทำหาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อการศึกษาต้นกำเนิดของ *Cucurbita* ผลที่ได้ทำให้ทราบว่าพืชที่มีการผสมเกิดเป็นพืชชนิดใหม่ที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นที่เป็นพันธุ์ดั้งเดิม และจากผลการศึกษา phylogenetic พบว่า *Cucurbita argyrosperma* น่าจะมีต้นกำเนิดมาจาก *C sororia*probably (Mexican gourd) ซึ่งอยู่ทางตะวันตกเฉียงใต้ของเม็กซิโกในขณะที่ต้นกำเนิดของ *C. moschata* ยังไม่ทราบแน่นอน แต่จากผลข้อมูลดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียที่ได้ทำให้คาดเดาได้ว่าน่าจะมีต้นกำเนิดในทางตอนเหนือของอเมริกาใต้ และ *C. andreana* ที่พบในโบลีเวียเป็นบรรพบุรุษของ *C. maxima* และจากข้อมูลดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียที่ได้ก็ให้ผลยืนยันว่าพืชในกลุ่ม *C. pepo* มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในแต่ละ sub-species คือ *C. pepo* subsp. *Ovifera* น่าจะมีต้นกำเนิดมาจากทางตะวันออกของอเมริกาเหนือแล้วแพร่ขยายไปยังทางตะวันออกเฉียงเหนือของเม็กซิโกแต่ยังไม่สามารถสรุปถึงต้นกำเนิดของ *C. pepo* subsp. *Pepo* ได้ชัดเจนนักแต่คาดว่าจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. pepo* subsp. *fraterna* ที่พบอยู่ทางตอนใต้ของเม็กซิโก

การศึกษาพันธุกรรมระดับโมเลกุลของปาล์มน้ำมันในต่างประเทศ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่ให้น้ำมันและมีความสำคัญในการอุปโภคและบริโภค ดังนั้นในต่างประเทศได้ศึกษาพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันก็เพื่อที่จะทำการปรับปรุงพันธุ์ปาล์ม และคัดเลือกพันธุ์ปาล์มให้ได้ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีผลผลิตสูง ต้านทานโรค และพยายามที่จะใช้ความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์ม เพื่อที่จะได้ข้อมูลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต่อไป ตัวอย่างการศึกษาพันธุกรรมปาล์มน้ำมันในต่างประเทศได้แก่

Shah และคณะ (1994) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในทวีปแอฟริกาด้วยไพรเมอร์ 9 ชนิด แบบแผนดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดอยู่ในช่วง 0.2-2.3 Kb แต่ไม่สามารถที่จะบอกความจำเพาะของแต่ละประชากรได้ แต่บอกได้ว่าประชากรกลุ่มที่ 5 จากประเทศ แซร์ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด ในขณะที่ประชากรกลุ่มที่ 2 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยที่สุด

Jack และคณะ (1995) ทำการศึกษา RFLP ในลูกผสมที่ได้จาก *E. guineensis* X *E. olifera* ด้วยตัวตรวจจับที่เตรียมจากคลอโรพลาส์ดีเอ็นเอพบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในลูกผสมแต่ไม่พบใน *E. guineensis* และ *E. olifera* ทั้งหมด 106 แถบ และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีแถบดีเอ็นที่พบเฉพาะใน *E. guineensis* แต่ไม่พบใน *E. olifera* ทั้งหมด 16 แถบทำให้แยกความแตกต่างระหว่าง *E. guineensis* และ *E. olifera* ได้

Chowdhury และ คณะ (1997) ศึกษา promoter Emu, Ubi1, AC1, 35S และ Adh1 ที่จะมีผลต่อการแสดงออกของ beta-Glucuronidase (GUS) ในเนื้อเยื่อแคลลัส ใบปาล์มจากต้นอ่อนและต้นที่โตเต็มที่ ด้วยวิธี histochemistry และ fluorometry พบว่า promoter Emu และ Ubi1 จะมีผลต่อการแสดงออกของ GUS มากกว่า promoter อื่นๆ ในทุกตัวอย่างที่ทำการทดลอง โดย promoter Adh1 จะมีผลต่อการแสดงออกของ GUS น้อยที่สุด และเมื่อพิจารณาเฉพาะ promoter Emu และ Ubi1 ในแต่ละเนื้อเยื่อ พบว่าในเนื้อเยื่อแคลลัส promoter Emu จะมีผลต่อการแสดงออกของ GUS มากกว่า promoter Ubi1 ส่วนในใบของต้นอ่อนและต้นที่โตเต็มที่พบว่า promoter Ubi1 จะมีผลต่อการแสดงออกของมากกว่า promoter Emu ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า promoter Emu เหมาะสำหรับการศึกษาการแสดงของยีนที่สนใจในเนื้อเยื่อแคลลัสปาล์มน้ำมัน ส่วน promoter Ubi1 เหมาะที่จะนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนที่สนใจในใบปาล์มน้ำมัน

Mayes และคณะ (1997) ได้พัฒนาเทคนิค RFLPs เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis*) สำหรับช่วยในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้ในการศึกษาประชากรปาล์มน้ำมันจำนวน 98 ต้น ด้วยดีเอ็นเอตรวจจับ 84 ชนิด พบว่าสามารถตรวจสอบได้ 103 loci โดย 97 RFLP loci มีความสัมพันธ์กันใน 24 กลุ่ม เมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง 97 RFPL loci กับลักษณะกะลา (Shell thickness), *Sh* locus เพื่อสร้าง linkage map ด้วย MAPMAKER พบว่าเมื่อพิจารณาจากประชากรทั้งหมด (98 ต้น) ตัวตรวจจับ pOPgSP1282 มีตำแหน่งอยู่ใกล้กับ *Sh* locus มากที่สุดคืออยู่ห่างเพียง 9.9 cM แต่เมื่อศึกษาในอีกกลุ่มประชากรคือกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันที่ได้จากคู่ผสม A137/30 x E80/29 (45 ต้น) พบว่าใน linkage map ตัวตรวจจับ pOPgSP1282 มีตำแหน่งอยู่ห่างจาก *Sh* locus 6.6 cM

Kularatne และคณะ (2000) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis*) จำนวน 687 ต้น จาก 11 ประเทศ โดยใช้เทคนิค AFLP กับไพรเมอร์ 8 ชนิด พบว่าจะให้แถบดีเอ็นเอ 377 แถบ มีลักษณะที่เป็น polymorphic 93.4 % โดยปาล์มน้ำมันจากประเทศคาเมรูน มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด และ ตัวอย่างปาล์มเดลี ดูรา มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ความหลากหลายภายในประชากร (55%) มากกว่าความหลากหลายระหว่างประชากร (45%) ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประเทศ (71%) มากกว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประเทศ (29%) รูปแบบการจัดกลุ่มประชากรยังคงเหมือนเดิม ผลการศึกษาเดนโดรแกรมแสดงให้เห็นว่าเดลี ดูราน่าจะมีจุดกำเนิดมาจากประเทศไนจีเรียเป็นจุดกำเนิดปาล์มน้ำมันและค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมจะลดลงไปในประเทศใกล้เคียง

Morezsohn และคณะ (2000) ได้ทำ RAPD เพื่อศึกษาแบบแผน linkage ของ shell thickness locus ในปาล์มน้ำมัน ซึ่งประกอบด้วย 2 allele คือ sh^+ และ sh^- มีลักษณะการแสดงออกแบบ

Codominant ในการทำ RAPD ใช้ไพรเมอร์ 308 ชนิด กับตัวอย่างที่ได้จากการทำ psuedo-cross ระหว่าง เทเนอรากับพิสิเฟอรา รุ่นที่1 พบว่า มีไพรเมอร์ 121 ชนิด ที่ให้ลักษณะเป็น polymorphism คิดเป็น 1.66 polymorphism ต่อไพรเมอร์ โดยพบ 48 ไพรเมอร์ที่กระจายอยู่ใน 16 linkage group (449.3 cM) และ อีก 42 ไพรเมอร์ที่กระจายอยู่ใน 12 linkage group (399.7 cM) และเมื่อทำการทดลองเพิ่มโดยใช้ไพรเมอร์ชุดใหม่ 174 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ R11-1282 และ T19-1046 อยู่ระหว่าง sh^+ locus ใน linkage group 4 โดยมีระยะห่างจาก sh^+ locus กับไพรเมอร์ R11-1282 และ T19-1046 เป็น 17.5 cM และ 23 cM ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้คาดว่าจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาพัฒนา genetic linkage เพื่อปรับปรุงพันธุ์ปาล์ม และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์ปาล์มต่อไป

Rafii และคณะ (2000) เก็บข้อมูลพันธุกรรมจากประเทศประเทศคาเมรูน และแซร์พบว่าปาล์มจากประเทศประเทศคาเมรูน ชนิดดูราและเทเนอราให้ผลผลิตทะลายปาล์มน้ำมันสด 11.65-68.79 กิโลกรัม/ต้น/ปี และ 65.12-121.88 กิโลกรัม/ต้น/ปี โดยมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่าง intra-class ของ full-sib และ half-sib ของผลผลิตทะลายปาล์มสดที่ได้ อยู่ในช่วง 22.84-26.22% และ 11.21-12.98% ตามลำดับ ส่วนที่พบในประเทศแซร์ ปาล์มชนิดดูราและเทเนอราให้ผลผลิตทะลายปาล์มน้ำมันสด 67.79-105.98กิโลกรัม/ต้น/ปี และ 64.62-128.70 กิโลกรัม/ต้น/ปีตามลำดับ

Rajanaidu และคณะ (2000) ได้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม ทั้งภายในและระหว่างประชากรในธรรมชาติของปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis*) ที่ได้เก็บรวบรวมจากหลายประเทศโดยใช้เทคนิค RAPD และ RFLPs ในการศึกษาประชากรของ *E. guineensis* จำนวน 176 กลุ่ม ประชากรของ *E. oleifera* จำนวน 47 กลุ่ม และ เดลี ดูรา 1 กลุ่ม ในการศึกษาเทคนิค RAPD จะใช้ไพรเมอร์ทั้งสิ้น 20 ชนิด พบว่า จะให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 2,285 แถบ ซึ่งเป็น monomorphic 11.4% และ polymorphic 88.6% ค่าเฉลี่ยของความหลากหลายภายในประชากรมีค่า 53% และค่าเฉลี่ยของความหลากหลายระหว่างประชากรมีค่า 47% ส่วนการศึกษาใน *E. oleifera* ส่วนใหญ่จะเป็น monomorphic ในด้านการศึกษา RFLPs จะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด และ hybridize กับตัวตรวจจับ 4 ชนิด พบว่าประชากรจากประเทศไนจีเรียมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุดซึ่งคาดว่าประเทศไนจีเรียจะเป็นศูนย์กลางความหลากหลายของปาล์มน้ำมัน

Shah และ Cha (2000) ศึกษาปาล์มน้ำมันสองชนิดคือ *E. guineensis* และ *E. oleifera* ที่มีต้นกำเนิดมาจากทวีปแอฟริกาและ อเมริกาใต้ ตามลำดับ เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า ปาล์มทั้งสองชนิดมีองค์ประกอบของกรดไขมันแตกต่างกันคือ ปาล์มชนิด *E. guineensis*, เทเนอรา เนื้อเยื่อ kernel ส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วย lauric acid (48%) และ myristic acid (18%) ในเนื้อเยื่อ mesocarp จะมี palmitic acid (40%), stearic acid (5%), oleic acid (38%) และ linolenic acid (11%) ส่วนชนิด

E. oleifera พบว่าในเนื้อเยื่อ mesocarp จะมีปริมาณ oleic acid เพิ่มเป็น 60% และมีปริมาณ palmitic acid ลดลงตามสัดส่วนของ oleic acid ที่เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณน้ำมันที่พบใน *E. oleifera* ยังคงมีน้อยกว่าที่พบใน *E. guineensis*, เทเนอรา (Berger and Ong, 1985; Rao *et al.*, 1989) จึงได้ทำการศึกษาลักษณะการแสดงออกของยีนในระหว่างกระบวนการสร้างน้ำมันของปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค differential display ในปาล์มน้ำมันชนิด *E. oleifera* และ *E. guineensis*, เทเนอรา โดยศึกษาการแสดงออกของ mRNA ที่ต่างกันในผลปาล์มอายุ 15 สัปดาห์ ในการทดลองได้ทำการคัดเลือกและอธิบายลักษณะของ cDNA เพียงหนึ่งโคลนที่เป็น mesocarp specific และ species specific สำหรับ *E.oleifera* โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับเอนไซม์ sesquiterpene synthase และเมื่อศึกษา mRNA ด้วย Northern hybridization และใช้ตัวตรวจจับพบว่ายีน sesquiterpene synthase มีการแสดงออกเฉพาะในเนื้อเยื่อ mesocarp ของ *E. oleifera* ที่มีอายุ 5-20 สัปดาห์ แต่ไม่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อ mesocarp ของ *E. guineensis*, เทเนอรา รวมทั้งเนื้อเยื่อ kernel ใบ และรากจากทั้ง *E. oleifera* และ *E. guineensis*

Billotte และคณะ (2001) ได้ศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอกับปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis*) โดยใช้วิธี hybridization based capture (ใช้ ไบโอตินติดฉลากกับไมโครแซทเทลไลท์ตรวจจับและ streptavidin ซึ่งจับกับเม็ดแม่เหล็ก) ได้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ 21 คู่ใช้ในการศึกษาขนาดของ allele และ ประเมิน heterozygosity ใน *E. guineensis* กับ *E. oleifera* SSR จะแยกกันตามกฎของเมนเดลทำให้ผู้ผสมพันธุ์ปาล์มน้ำมันสามารถใช้ SSR สำหรับทำแผนที่พันธุกรรม และหายีนที่สัมพันธ์กับรุ่นต่อๆ ไป ที่เป็น intra หรือ inter-specific นอกจากนี้ SSR ยังสามารถบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรธรรมชาติของ *E. guineensis* และ *E. oleifera* นอกจากนี้ SSR จะให้ความหลากหลายของ allele สูงคาดว่าจะมีศักยภาพในการแยกชนิดของปาล์มน้ำมันได้

Hayati และคณะ (2004) ศึกษาจากตัวอย่างปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis*) จาก 723 ตัวอย่างใน 26 กลุ่มประชากรจาก 10 ประเทศในทวีปแอฟริกา และตัวอย่างเดลีดูรา จำนวน 1 ตัวอย่าง มาศึกษาความแปรปรวนของ allele จำนวน 7 loci ที่ได้จากการทำ Isozyme ด้วยเอนไซม์ทั้งหมด 6 ระบบเอนไซม์ พบว่ามี polymorphic เฉลี่ย 54.5% ต่อ loci (0.99 criterion) มีค่าเฉลี่ยเป็น 1.80 alleles ต่อ locus และมีค่า effective number เป็น 1.35 alleles ต่อ locus มี mean ของ ค่า heterozygosity เป็น 0.184 โดยมีค่าจริงตั้งแต่ 0.109 (ประชากรกลุ่มที่ 8 ในประเทศเซเนกอล) ถึง 0.261 (ประชากรกลุ่มที่ 29 ในประเทศคาเมรูน) มีค่าความแตกต่างในประชากรทั้งหมดค่อนข้างสูง (F_{ST}=0.301) ทำให้ระบุได้ว่ามีลักษณะพันธุกรรมที่แตกแยกออกไปมากทั้งนี้อาจจะเป็นผลมาจากที่ทำการศึกษาในกลุ่มประชากรที่หลากหลายมาก ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรมีค่าเฉลี่ย 0.113 มีค่าต่ำสุดเป็น 0.000 และมีค่าสูงสุดเป็น 0.568 มีค่า gene flow ในระหว่างประชากรปาล์มน้ำมันต่ำ (Nm =

0.576) จากเดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย UPGMA สามารถแบ่งตัวอย่างได้เป็น 3 cluster คือกลุ่มตัวอย่างที่ได้ประเทศเซเนกอล และ ซิเอรา ลีโอเน และอีก 2 cluster คือกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากประเทศมาดากัสการ์ และกลุ่มตัวอย่างที่มาจากประเทศ แองโกลา, คาเมรูน, สาธารณรัฐคองโก, กานา, แทนซาเนีย, ไนจีเรีย และ กินี และจากการศึกษาพบว่าตัวอย่างเดลี ดูรามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับประชากรกลุ่มที่ 6 มาจาก ประเทศ กินี มากที่สุด

การศึกษาพันธุกรรมระดับโมเลกุลของปาล์มน้ำมันในประเทศไทย

การศึกษาพันธุกรรมระดับโมเลกุลของปาล์มน้ำมันในประเทศไทยเพื่อจำแนกปาล์มน้ำมันแต่ละชนิดออกจากกัน

อมรรัตน์ และคณะ (2535) ได้ศึกษาความแตกต่างในาระดับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสามพันธุ์ คือดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา พบว่า แบบแผนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของ ดูราและเทเนอรา มีความแตกต่างกันเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoR*I โดยเมื่อทำการ hybridize แบบแผนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอที่ย่อยด้วย *EcoR*I กับ ตัวตรวจจับที่เตรียมจากคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของ *Petunia hybrida* (P8) พบว่าแถบที่เกิดจากเทเนอรามีขนาดใหญ่กว่าที่เกิดจากดูราเล็กน้อย และแถบทั้งสองต่างมีขนาดใกล้เคียงกับ 9.4 Kb เมื่อทำ cloning จากคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของดูราและเทเนอรา เพื่อสุ่มหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันดังกล่าว พบว่าโคลนที่ได้ยังไม่สมบูรณ์ และไม่สามารถโคลนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 9.4 Kb มีแต่จากการสุ่มหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของเทเนอรา (TSK) ที่ hybridize กับ P8 ได้ พบว่า TSK 67 (โคลนที่ 67) อาจจะประกอบด้วยดีเอ็นเอที่น่าสนใจ ถึงแม้จะมีขนาดไม่ถึง 9.4 Kb แต่ก็เป็นโคลนที่ hybridize ได้ดี กับ probe P8 ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดและการศึกษาต่อเพิ่มเติมโดยละเอียดอาจเป็นทางนำไปสู่การสร้าง specific DNA probe เพื่อคัดเลือกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยเฉพาะสายพันธุ์เทเนอราในอนาคต

อลิษา และคณะ (2543) จึงได้เริ่มงานวิจัยโดยทำการเตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอของ microsatellite DNA ด้วยตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานีที่มีการนำเชื้อพันธุ์มาจาก Costa Rica มีการเตรียมพ่อ-แม่พันธุ์ที่ทราบประวัติแน่นอน ซึ่งสามารถสำรวจได้โดยการใช้ตัวตรวจจับที่เป็น $(CA)_n$ repeat ได้โคลนที่มีลักษณะเป็น microsatellite DNA ที่แท้จริงซึ่งได้นำไปออกแบบไพรเมอร์สำหรับการศึกษา microsatellite DNA ที่มีความจำเพาะมากขึ้นโดยกณพ และคณะ (2544) คือ ไพรเมอร์ MJT1 และ MJT2 ซึ่งให้ polymorphic band 75% และ monomorphic band 25% สามารถจำแนกปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105 และ 116 ได้แต่ก็ยังไม่เพียงพอที่จะจำแนกความแตกต่างของปาล์มน้ำมันแต่ละชนิดได้ดังนั้น จึงได้การศึกษา polymorphic DNA ของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค

RAPD และ EPIC-PCR โดยผลการศึกษาด้วยเทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ UBC 731 ไปทดสอบกับตัวอย่างปาล์มน้ำมันพบว่าไพรเมอร์ UBC 731 ให้ polymorphic band 60% และ monomorphic band 40% สามารถจำแนกปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105 และ 110 และศึกษาเมื่อศึกษา polymorphic DNA ของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค EPIC-PCR ด้วยไพรเมอร์ CAMXIF และ CAMXIR ที่ออกแบบมาจากยีน Calmodulin พบว่าให้ polymorphic band 85% และ monomorphic band 15% สามารถจำแนกปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105 และ 116 ออกจากกันได้

เอนไซม์ Malate synthase (MS)

เอนไซม์ Malate synthase (L-malate glyoxylate-lyase: CoA-acetylating) มีรหัสสามัญคือ E.C.4.1.3.2 เป็นเอนไซม์ในวัฏจักร glyoxylate ภายใน glyoxysome ในพืชโดยเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน acetyl-CoA ซึ่งส่วนหนึ่งในกระบวนการ gluconeogenesis เพื่อทำการสลายไขมันและคาร์โบไฮเดรตที่สะสมไว้เพื่อให้ได้พลังงานเพื่อการเจริญเติบโต ภายใต้สภาวะที่มีแสง ซึ่งพบว่า MS มีปริมาณการแสดงออกมากในระหว่างการงอก และหลังการงอกของเมล็ดพืช รวมทั้งเมล็ดพืชให้น้ำมันด้วยเช่นกัน (Eastmond *et al.*, 2000; Pua *et al.*, 2003) มีการศึกษาโครงสร้างของยีน MS ใน *Cucumis sativus* พบว่าเป็น single copy มีส่วนของ exon ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1700 นิวคลีโอไทด์ และประกอบด้วยส่วนของ intron จำนวน 3 ส่วน ที่มีขนาด 423, 383 และ 73 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ (Graham *et al.*, 1989)

การศึกษาโครงสร้างของยีน MS ในปาล์ม *Acanthophoenix rubra* พบว่าเป็น single copy ประกอบด้วย 4 exon ขนาด 48, 326, 331 และ 412 นิวคลีโอไทด์ และมี 3 intron คือขนาด 1057, 67 และ 134 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ ดังนั้นจึงคาดเดาได้ว่ายีน MS ไม่ใช่ยีนที่เป็น large multigene family (Lewis and Doyle, 2001)

เอนไซม์ Acetyl CoA carboxylase (ACCase)

เอนไซม์ ACCase มีชื่อสากลคือ Acetyl-CoA: carbon dioxide ligase (ADP-forming) (Luo *et al.*, 1989) หรือ Acetyl-CoA: biocarbonate ligase (ATP) (Charles and Cherry, 1986) มีรหัสสามัญคือ E.C.6.4.1.2 เอนไซม์ ACCase จัดเป็นไบโอตินเอนไซม์ (biotin enzyme) เพราะมีปริมาณไบโอตินในเอนไซม์สูงและถูกยับยั้งได้โดยอะวิดิน (avidin) (Wakil and Gibson, 1960; Nikolau *et al.*, 2003) และได้มีการศึกษาเอนไซม์ ACCase ที่จัดได้ว่าเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันและไขมันที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ โดยมีการทำให้เอนไซม์ ACCase บริสุทธิ์จาก

เนื้อเยื่อสัตว์ชนิดต่าง ๆ จากพืชหลายชนิด ยีสต์ (yeast) และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เพื่อศึกษาโครงสร้าง น้ำหนักโมเลกุล หน่วยย่อย (subunit) การควบคุมและกลไกการทำงานของเอนไซม์

1. การสังเคราะห์กรดไขมัน

การสังเคราะห์กรดไขมันอาศัย 2 ขั้นตอน คือ (1) เป็นการเปลี่ยน Acetyl-CoA เป็น malonyl-CoA โดยอาศัย ACCase (2) การเปลี่ยนแปลง Acetyl-CoA และ Malonyl-CoA ไปเป็นกรดปาล์มิติค โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ Fatty Acid Synthetase (FAS) ขั้นตอนที่หนึ่งและที่สองประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อยหลายปฏิกิริยา แต่ละปฏิกิริยามีเอนไซม์จำเพาะเป็นตัวเร่ง (ดังแสดงในภาพที่ 1.1) ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ ACCase ถือเป็นขั้นตอนควบคุมวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันและไขมันที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ และฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ทั้งนี้เพราะเป็นปฏิกิริยาแรกของวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน ดังนั้นปัจจัยใดที่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ ACCase ก็จะมีผลต่อปริมาณ malonyl-CoA และต่อการสังเคราะห์กรดไขมันและไขมันตามลำดับ (Lane *et al.*, 1974)

2. โครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ ACCase ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ

2.1 เอนไซม์ ACCase ที่พบในแบคทีเรีย

เอนไซม์ ACCase ของ *E. coli* เป็น heteromeric ACCase ประกอบด้วย เอนไซม์ไบโอติน คาร์บอกซิเลส (Biotin Carboxylase; BC), Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP) และเอนไซม์ คาร์บอกซิล ทรานซ์เฟอเรส (Carboxyl Transferase; CT) สองหน่วยย่อย (ดังภาพ 1.2) ซึ่งร่วมกันเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่คาร์บอนซิลเข้าสู่ Acetyl-CoA เอนไซม์ไบโอตินคาร์บอกซิเลสเร่งปฏิกิริยาการเกิดพันธะระหว่าง HCO_3 กับ ไบโอตินใน BCCP มีน้ำหนักโมเลกุล 98 กิโลดาลตัน เป็นไดเมอร์ ที่มีหน่วยย่อย 2 หน่วยที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยมีน้ำหนัก 51 กิโลดาลตัน เอนไซม์คาร์บอกซิล ทรานซ์เฟอเรส มีน้ำหนักโมเลกุล 130 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วย ($\alpha_2\beta_2$) แต่ละคู่หน่วยย่อยที่เหมือนกัน (หน่วยย่อย α และ β) มีน้ำหนัก 35 และ 30 กิโลดาลตันตามลำดับ) ทั้งเอนไซม์ไบโอตินคาร์บอนซิเลส และเอนไซม์คาร์บอกซิล ทรานเฟอเรส และโปรตีน BCCP ซึ่งมีไบโอตินจับต่ออยู่ในหมู่พรอสเธติค โดยใช้หมู่คาร์บอกซิลข้างเคียง (side chain carboxyl group) เกิดพันธะโควาเลนต์ (covalent) แบบ amide กับหมู่ E–NH_2 ของกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ของโปรตีน BCCPในขณะที่ BCCP มีน้ำหนักโมเลกุล 44 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (22 กิโลดาลตัน) ที่เหมือนกันแต่ละหน่วยย่อยมีไบโอติน 1 หมู่จับติดอยู่ (Li and Cronan, 1993; Cronan and Waldrop, 2002; James and Cronan, 2004)

$$CH_3COS\text{-}CoA + HCO_3 + ATP \xrightarrow{ACCase} HOOCCH_2COS\text{-}CoA + ADP + Pi \quad (1)$$

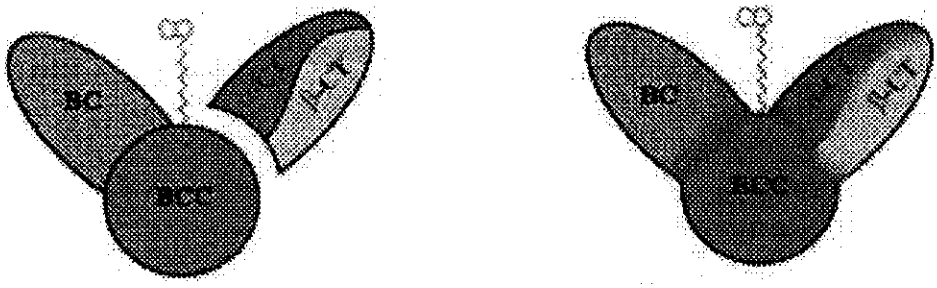
Acetyl-CoA Malonyl-CoA

$$CH_3COS\text{-}CoA + 7HOOCCH_2COS\text{-}CoA + 14NADPH + 14H^+ \xrightarrow{FAS}$$

$$CH_3CH_2(CH_2CH_2)_3CH_2COOH + 8CoA\text{-}SH + 14NADP^+ + 6H_2O \quad (2)$$

Palmitic acid

ภาพที่ 1.1 แสดงขั้นตอนการเปลี่ยนแปลง Acetyl-CoA และ Malonyl-CoA ไปเป็นกรดปาล์มิติค ด้วย ACCase (Acetyl CoA carboxylase) และ FAS (Fatty Acid Synthetase)



heteromeric ACCase homomeric ACCase

ภาพที่ 1.2 แสดงแผนผังรูปแบบโครงสร้างของเอนไซม์ ACCase ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิต มี 2 แบบคือ heteromeric ACCase และ homomeric ACCase โดย BCC คือ Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP), BC คือ เอนไซม์ไบโอตินคาร์บอกซิเลส และ α-CT และ β-CT คือเอนไซม์คาร์บอกซิล ทรานซ์เฟอเรส คือหน่วยย่อย α และ β ตามลำดับ

2.2 เอนไซม์ ACCase ที่พบในสัตว์

ได้มีการศึกษาเอนไซม์ ACCase จากเนื้อเยื่อสัตว์ชนิดต่าง ๆ เช่น ตับหนูและไก่ และต่อมน้ำนมของหนูและกระต่าย เป็นต้น พบว่าเอนไซม์ ACCase ของสัตว์ต่างจากของแบคทีเรียและของพืชคือเป็น homomeric เอนไซม์ ACCase (ดังภาพ 1.2) ที่ทำให้บริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อสัตว์ต่าง ๆ จะถูกแยกออกมาเป็นสายยาวมีน้ำหนักในช่วง 400-800 กิโลดาลตัน และเป็นรูปแบบของเอนไซม์ที่มีแอคทิวิตี (active) (Guchhait *et al.*, 1974; Lane *et al.*, 1974) โพลิเมอร์ (polymer) ของเอนไซม์ ACCase ของสัตว์ประกอบด้วยโครงสร้างย่อยที่เรียกว่าโพรโตเมอร์ (protomer) ซึ่งแยกออกจากกันได้และไม่มีแอคทิวิตี (inactive) โพรโตเมอร์มีน้ำหนัก 230 กิโลดาลตัน เป็นหน่วยย่อยซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ BC, BCCP และ CT ดังนั้นหน่วยย่อยโพรโตเมอร์จึงเป็นโปรตีนสายเดี่ยวที่มีหลายหน้าที่ (multifunctional protein) แต่ละหน่วยย่อยของโพรโตเมอร์มีหนึ่งโมล (mole) ของไบโอตินจับอยู่ (Manning *et al.*,1976; Song and Kim, 1981)

2.3 เอนไซม์ ACCase ที่พบในพืช

ในพืช ACCase มีโครงสร้างของเอนไซม์ที่ต่างกัน (structurally distinct) 2 รูปแบบคือ Homomeric หรือ multifunctional ACCase พบในไซโตพลาสซึมของพืช มีรูปแบบเดียวกับที่พบในยีสต์และสัตว์ (Schulte *et al.*, 1997) ซึ่งจะเป็นสายไพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่มีตำแหน่ง (domain) ที่จะเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ BC, BCCP และ CT มีขนาดมากกว่า 200 กิโลดาลตัน ในสภาวะธรรมชาติ (native) จะอยู่ในภาพ dimer (Gornicki *et al.*, 1993) มีขนาดประมาณ 500 กิโลดาลตัน ส่วน heteromeric หรือ multisubunit ACCase (ดังภาพ 1.2) พบได้ในพลาสติดของพืชเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยโปรตีนหลายหน่วยย่อยที่มีการรวมตัวกัน (Dissociable protein) เป็นเอนไซม์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ (active) คล้ายกับที่พบใน *E. coli* คือแยกเป็นหน่วยย่อยก็ยังคงเร่งปฏิกิริยาได้ (Kannangara และ Stumpt 1972) Multifunctional ACCase มีความเสถียรมากกว่าแม้จะไม่อยู่ในสภาพที่เป็นสายโพลีเปปไทด์สายเดียว ในขณะที่ multisubunit ACCase จะมีความเสถียรก็ต่อเมื่อมีการรวมตัวกันของแต่ละหน่วยย่อยแล้ว เอนไซม์ Multisubunit ACCase ที่พบในพลาสติดของพืชประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย (subunits) คือ Biotin Carboxylase (BC; *accC*), Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP; *accB*), Carboxyl Transferase alpha subunit (α-CT; *accA*) และ Carboxyl Transferase beta subunit (β-CT หรือ AccD; *accD*) โดยยีน *accD* เป็นยีนในจีโนมของพลาสติดในขณะที่ยีนอื่นๆ พบอยู่ในจีโนมของนิวเคลียสของเซลล์ (Egli *et al.*, 1993; Gornicki *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, .1995; Ke *et al.*, 2000; Cronal *et al.*, 2002; Madoka *et al.*, 2002; Nikolau *et al.*, 2003) และพบว่า BCCP จับอยู่ในไทลาคอยด์ ขณะที่ไบโอติน คาร์บอกซิเลสและคาร์บอกซิล

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ทรานซ์เฟอเรส พบในส่วนของเหลว (stroma) ภายในคลอโรพลาสต์ (Kannangara และ Stumpt, 1972) จากการศึกษาเอนไซม์ ACCase ของผักโขมและถั่วลันเตา พบว่าเอนไซม์ ACCase เป็นเอนไซม์ควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมันในพลาสติด ทั้งนี้เพราะไม่สามารถตรวจหาปริมาณ malonyl-CoA ในคลอโรพลาสต์ที่เก็บไว้ในที่มืด แต่ปริมาณ malonyl-CoA เพิ่มขึ้นหลายเท่าในที่มีแสงและพบว่าอัตราการสังเคราะห์กรดไขมันถูกกระตุ้นให้เกิดมากขึ้นในที่มีแสงด้วย แต่ความเข้มข้นของ Acetyl-CoA ลดลงควบคู่กับความเข้มข้นของ malonyl-CoA ที่เพิ่มขึ้นและอัตราการสังเคราะห์กรดไขมันที่เพิ่มขึ้น ผลงานวิจัยนี้เป็นหลักฐานยืนยันโดยตรงว่า เอนไซม์ ACCase ควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมันในผักโขมและถั่วลันเตา (Post-Beittenmiller *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าการสังเคราะห์กรดไขมันของผักโขมในที่มีแสงเพิ่มขึ้น 5–8 เท่า เทียบกับในที่มืด เมื่อการสังเคราะห์กรดไขมันในใบผักโขมลดลงเป็นผลจากการย้ายพืชจากที่มีแสงไปไว้ในที่มืด (Browse *et al.*, 1981) Turnham และ Northcote (1982) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมไขมันและแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACCase ในเอมบริโอ (embryo) ปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสองพันธุ์ (JH และ JB. 20.1C) ในพันธ์ JH พบแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACCase เพิ่มขึ้นก่อนการเพิ่มปริมาณไขมันในเซลล์เอมบริโอไม่นาน ส่วนในสายพันธ์ JB. 20.1C ปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้นกับการเพิ่มแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACCase เกิดควบคู่กัน จำนวนหยดน้ำมันที่ได้จากการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์ (light microscopy) สอดคล้องกับปริมาณไขมันและแอคทิวิตีของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น ต่อมา Turnham และ Northcote (1983) ได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACCase กับการสะสมไขมันในระหว่างการเจริญเติบโตของเมล็ดเรพ (*Brassica napus*) เริ่มจากการเก็บเมล็ดหลังจากมีการผสมเกสร นำมาสกัดหาปริมาณไขมันและเอนไซม์ ACCase พบว่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACCase เพิ่มขึ้นควบคู่กับปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงตั้งแต่วันที่ 18 จนมีค่าสูงสุดในวันที่ 22 หลังจากนั้น ปริมาณไขมันมีค่าคงที่ แต่แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACCase เริ่มลดลงจนต่ำสุดในวันที่ 34 เมื่อศึกษาการสะสมไขมันในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรน์อิเล็กตรอน (electron microscopy) เพื่อดูจำนวนหยดน้ำมัน (oil droplet) ที่เกิดขึ้นในเซลล์ พบว่าตั้งแต่วันที่ 5 จนถึงวันที่ 16 ไม่มีหยดน้ำมัน เริ่มพบหยดน้ำมันบ้างในวันที่ 17 และมีมากในช่วงวันที่ 24-32 ผลการวิจัยนี้เป็นการยืนยันว่าเอนไซม์ ACCase มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไขมันในเมล็ดที่กำลังพัฒนา ผลการศึกษาเหล่านี้ จึงพอสรุปได้ว่าเอนไซม์ ACCase มีบทบาทต่อการสังเคราะห์กรดไขมันในเมล็ดเรพที่กำลังพัฒนา และในเอมบริโอของปาล์มน้ำมัน

2.4 ความแตกต่างของขนาดหน่วยย่อยที่พบใน Homomeric ACCase ที่พบในพืช

จากการศึกษาขนาดหน่วยย่อย BC, BCCP, α-CT และ β-CT ใน Homomeric ACCase ที่ได้จากการแยกใน *Pisum satiuvm* L cv Little Marvel พบว่ามีขนาด 51 38 97 และ 86 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในขณะที่ในใบยาสูบมีขนาด 49, 32, 90 และ 53 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Thelen and Ohlrogge, 2002; Madoka *et al.*, 2002) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแต่ละหน่วยย่อยของ multisubunit ACCase จะมีขนาดแตกต่างกัน และแต่ละหน่วยย่อยที่พบในแต่ละชนิดของพืชก็จะมีขนาดแตกต่างกัน แต่ก็จะมีตำแหน่งอนุรักษ์ที่สามารถจะพบได้ในพืชส่วนใหญ่ เช่นในหน่วยย่อย BC (monomer) จะมีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน มีส่วนอนุรักษ์ที่พบได้ในพืชทุกชนิดคือ คือ GGGGXG และยังมีส่วนที่อนุรักษ์คือตำแหน่งการจับของ ATP (ATP-binding site) และตำแหน่งการจับของ CO_2 (CO_2 fixaton site) ส่วนหน่วยย่อย BCCP (monomer) จะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของพืชคือมีขนาดตั้งแต่ 22-37 กิโลดาลตัน (Sasaki *et al.*, 1993; Elborough *et al.*, 1996; Reverdatto *et al.*, 1999; Thelen *et al.*, 2001) มีบริเวณที่เป็นส่วนอนุรักษ์ที่เรียกว่า biotin-binding site อยู่ทางด้านปลาย COOH ของสายโพลีเปปไทด์ หน่วยย่อย α-CT จะมีขนาดแตกต่างกันไปไม่แน่นอนเช่นเดียวกับหน่วยย่อย BCCP คือมีสายโพลีเปปไทด์ขนาดตั้งแต่ 690-875 อะมิโน ส่วนใน *E. coli* มีขนาดเพียง 319 อะมิโน โดยมีส่วนอนุรักษ์อยู่ด้านปลาย NH_2 และมีความเหมือนกับหน่วยย่อย α-CT ที่พบใน *E. coli* ซึ่งคาดว่าเป็นบริเวณที่เกิดการจับของ Acetyl-CoA (Acetyl-CoA binding site) หรือมีบทบาททางโครงสร้างบางอย่างในขณะที่ทางปลาย COOH ไม่ค่อยมีความเหมือน และมีความแตกต่างกันมากในพืชแต่ละชนิด และหน่วยย่อยสุดท้ายคือ β-CT มีตำแหน่งการจับของ carboxyl-biotin (carboxybiotin binding site) และพบว่าขนาดของ β-CT แตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของพืชโดยปกติแล้วจะมีขนาดมากกว่าที่พบในแบคทีเรียสองเท่าคือมีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน (Nikolau *et al.*, 2003) เมื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโนของหน่วยย่อย β-CT ใน *Nicotiana tabacum* พบว่า มีกรดอะมิโนจำนวน 512 ชนิด น้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณได้เป็น 58.47 กิโลดาลตัน ในขณะที่ *Glycine max* มีกรดอะมิโนจำนวน 590 ชนิด น้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณได้เป็น 67.142 กิโลดาลตัน ผลการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของหน่วยย่อย β-CT พบว่ามีตำแหน่งที่เป็นเมทไทโอนีนตัวแรกที่พบในพืชแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน (Kozaki *et al.*, 2000) อีกทั้งพบว่าลำดับกรดอะมิโนของ β-CT ทางด้าน NH_2 นั้นมีความหลากหลายและแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของพืช ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเกิด proteolysis หลังจากการแปลรหัสอะมิโน ซึ่งอาจจะมีกระบวนการ post-translational ก่อนที่จะมีการจับกับ α-CT ได้เป็น CT complex ($\alpha_2\beta_2$) ก่อนที่จะมีการมาจับ BC-BCCP complex ให้ได้เป็น multisubunit ACCase ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ จึงทำให้มีลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย NH_2 ที่

แตกต่างกัน (Reverdatto *et al.*, 1999) และพบว่าลำดับกรดอะมิโนทางด้าน COOH ประมาณ 300 อะมิโนของ β-CT ที่พบในพืช มีความเหมือนกับและแบคทีเรีย ซึ่งในการศึกษาการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนใน *Glycine max* และ *E. coli* พบว่ามีตำแหน่งที่เกิดการจับกับเป็น dimer กับของแต่ละ monomer ของ CT อยู่ในรูปแบบที่เป็น $\alpha_2\beta_2$ (CT complex) ได้เช่นเดียวกันกับหน่วยย่อย CT ใน multisubunit ACCase ที่พบได้ในแบคทีเรียและพลาสติดของพืชชนิดต่างๆ ยกเว้นพืชตระกูล Graminae อื่นๆ (Sasaki *et al.*, 1995; Sasaki *et al.*, 1997; Kozaki *et al.*, 2000; Cronan and Waldrop, 2002; Nikolau *et al.*, 2003; Choi-Rhee and Cronan, 2003) เมื่อศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CT ขณะที่รวมตัวกับ หน่วยย่อย BC และ BCCP (BC-BCCP complex) ได้เป็น multi-subunit ACCase พบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH 7-8 ทั้งนี้อาจจะเป็นผลจากการรวมตัวกับ BC-BCCP complex ทำให้ลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไปจึงส่งผลให้ค่า pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของ CT เปลี่ยนแปลงไปอยู่ในช่วง pH 7-8 (Kozaki *et al.*, 2000) จากศึกษาของ Sasaki และคณะ (1993) พบว่าแอนติบอดีที่เตรียมจากสายโอลิโกเปปไทด์ของ β-CT ที่แยกมาได้จากถั่ว (pea) สามารถที่จะทำให้เกิด immunoprecipitation ของโปรตีน β-CT ในคลอโร พลาสต์ที่แยกมาจากใบถั่ว และเป็นผลทำให้ระดับการเร่งปฏิกิริยา (activity) ของ ACCase ลดลง และการศึกษาในสิ่งมีชีวิตพบว่าทำให้เกิดการตกตะกอนร่วมกับโปรตีนชนิดอื่น (Co-precipitate) อีกสองชนิดคือ BC และ BCCP ที่มีขนาด 35 และ 91 กิโลดาลตันตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า CT complex มีความสามารถในการจับ BC-BCCP complex (Shorrosh *et al.*, 1995) มีการศึกษาทดลองส่งผ่าน (transgenic) *Arabidopsis*-multifunctional ACCase เข้าไปในพลาสติดของ *Brassica napus* พบว่ามีปริมาณน้ำมันในเมล็ดเรพ เพิ่มขึ้น 5% (Roesler *et al.*, 1997) และจากการศึกษาในยาสูบพบว่าการเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีน *accD* ในระดับการ transcription จะมีผลให้เกิดการให้มีระดับการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่อยู่ในจีโนมของนิวเคลียสของเซลล์เพิ่มขึ้นและเพิ่มการเร่งปฏิกิริยาของ multi-subunit ACCase ในพลาสติดนั้นคือเมื่อระดับของ multi-subunit ACCase เพิ่มขึ้นทำให้มีปริมาณ Malonyl-CoA มากขึ้นและส่งผลให้มีการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์กรดไขมันมากขึ้น (Davis *et al.*, 2000) จากศึกษาของ Madoka และคณะ (2002) พบว่าการเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีน *accD* มีผลให้มีการเพิ่มปริมาณเมล็ดในยาสูบ โดยในพืชจะมีกรดไขมันที่มีการผลิตขึ้นมาก็มีการเก็บสะสมอยู่ในส่วนของเมล็ดในรูปของน้ำมันจึงอาจจะสรุปได้ว่าปริมาณการแสดงออกของยีน *accD* จะมีผลทำให้ปริมาณผลผลิตน้ำมันที่ได้ต่อต้นมีมากขึ้นด้วย นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าระดับของ multi-subunit ACCase ซึ่งจะมีเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแสงและจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มืดทั้งนี้จะเป็นผลมาจากระดับการเร่งปฏิกิริยาของ β-CT ซึ่งระดับการเร่งปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับ ระดับ pH Mg^{2+} adenine ภายใน stroma ของคลอโรพลาสต์ และสารที่เป็น thiol-

reducing ที่เกิดจากการกระตุ้นของแสง นอกจากนี้ β-CT จะถูกควบคุมได้ด้วยโปรตีนที่สามารถเกิดปฏิริยา phosphorylation หรือ dephosphorylation นอกจากนี้พบว่า β-CT จะไม่เสถียรและเสียสภาพได้ง่ายหากอยู่ในสภาพอิสระเพียงหน่วยย่อยเดี่ยว (Sasaki *et al.*,1995; Savage and Ohlrogge, 1999; Kozaki *et al.*, 2000 ; Nikolau *et al.*, 2003)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน Intron ของยีน Malate Synthase (MS) ด้วยเทคนิค EPIC-PCR เพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันแต่ละชนิด
2. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และ การแสดงออกของยีน Acetyl CoA carboxylase (ACCase) หน่วยย่อย เบต้า-คาร์บอกซิลทรานซ์เฟอเรส (*accD*) และ โคลนหน่วยย่อยไบโอติน คาร์บอกซิเลส (*accC*) ในปาล์มน้ำมัน