บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของภาคใต้มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกา การปลูกพืชชนิดนี้มีมานาน โดยเริ่มปลูกครั้งแรกตั้งแต่ก่อนสงครามโลกครั้งที่สอง ความต้องการน้ำมันปาล์มภายในประเทศไทยในปี 2544 มีมากถึง 700,000 ตัน และคาดว่าจะมีมากขึ้นเป็นลำดับ ซึ่งตัวเลขนี้ยังไม่รวมถึงความต้องการในต่างประเทศ มาเลเซียเองซึ่งเป็นประเทศที่ผลิตน้ำมันปาล์มมากที่สุดในโลก ก็ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตได้มากไปกว่าที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากขาดพื้นที่เพาะปลูก ในขณะที่ประเทศไทยยังมีพื้นที่ที่เหมาะสมในการปลูกปาล์มน้ำมันได้อีก แต่เราก็ประสบปัญหาอื่นแทน คือการขาดพันธุ์ที่ดี ในปี 2530 ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จึงได้นำเชื้อพันธุ์ที่ทราบประวัติแน่นอนมาจากประเทศคอสตาริกาและทำการผลิตเมล็ดพันธุ์อย่างมีระบบ เพื่อแจกจ่ายปาล์มพันธุ์ดีให้แก่เกษตรกร อย่างไรก็ตามปัญหาการลักลอบนำเมล็ดพันธุ์ปลอมซึ่งส่วนใหญ่เป็นดูราหรือพิสิเฟอรามาปลอมปนกับเทเนอราก็มิได้หมดสิ้นไป ดังนั้นหากเราสามารถตรวจสอบการปลอมปนดังกล่าวได้เสียแต่เนิ่นๆ ก็จะเป็นการลดการสูญเสียของเกษตรกรที่จะต้องดูแลพันธุ์ไม่ดีไปอีกอย่างน้อย 3 ปีกว่าจะให้ผลผลิตที่สามารถตรวจสอบพันธุ์ได้ ในปี 2535 อมรรัตน์ พงศ์ดารา และคณะ ได้เริ่มต้นศึกษาความเป็นไปได้ที่จะตรวจสอบพันธุ์ปาล์มด้วยดีเอ็นเอ แต่การทำงานครั้งนั้นไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากไม่ทราบประวัติที่แน่นอนของตัวอย่างพืชที่นำมาวิเคราะห์ และมีความเข้าใจคลาดเคลื่อนว่าดูราเทเนอราและ พิสิเฟอรา เป็นปาล์มน้ำมันที่ต่างชนิดกัน หากแต่ในความเป็นจริง ต่างเป็นชนิดเดียวกันแต่คนละแบบ คือ ดูรามียีนควบคุมความหนากะลาลักษณะเด่น พิสิเฟอรามียีนควบคุมความหนากะลาลักษณะด้อย ส่วนเทเนอราเป็นลูกผสมของดูราและพิสิเฟอราซึ่งให้ลักษณะที่ดีของทั้งสอง นอกจากนั้นในการผสมและเตรียมเมล็ดพันธุ์ก็มีวิธีการที่

แตกต่างไปจากพืชชนิดอื่น การที่จะหาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อระบุว่าเป็นปาล์มน้ำมันแบบใดทำได้ยาก ในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงได้พัฒนาเทคนิคใหม่โดยเตรียมเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี และได้กำหนดให้ใช้ตัวอย่างจากคู่ผสมเดียวกันในการวิเคราะห์เพื่อลดความแปรปรวน แล้วเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันแต่ละแบบ ในคู่ผสมเดียวกันเพื่อคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic DNA) ไปศึกษาและทดสอบต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. ปาล์มน้ำมัน

1.1 อนุกรมวิธาน

ปาล์มน้ำมัน (oil palm) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกา เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledon) จัดอยู่ในตระกูลปาล์ม (Family Palmae) มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Elaeis guineensis* Jacq.

Division Spermatophyta

Subdivision Angiosperms

Class Monocotyledonae

Order Palmales

Family Palmae

Subfamily Cocosoideae

Genus Elaeis

Species *Elaeis guineensis* Jacq.

1.2 พันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันที่พบประกอบด้วย 3 ชนิด คือ

1. *Elaeis oleifera* มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้แถบลุ่มน้ำอเมซอน ในอดีตไม่นิยมปลูกเป็นการค้า แต่ปัจจุบันมาเลเซียเริ่มให้ความสมใจนำมาทำเป็นลูกผสม

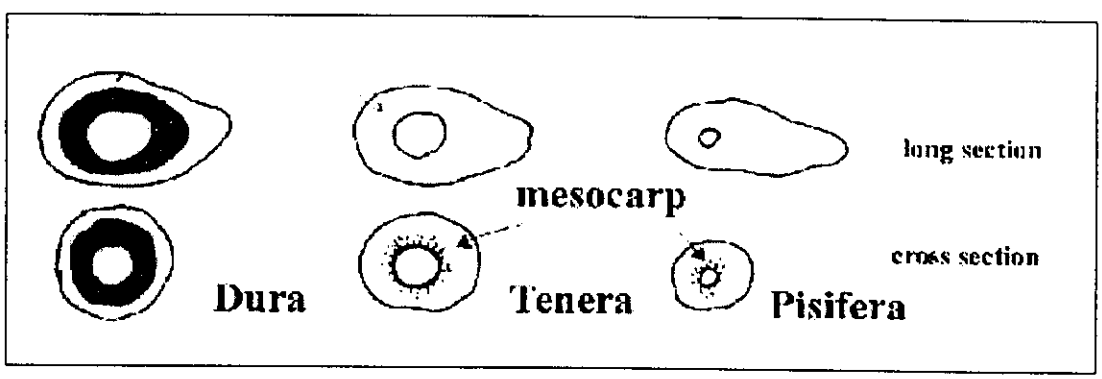
2. *Elaeis odora* พบบริเวณเดียวกับ *Elaeis oleifera*

3. *Elaeis guineensis* มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกาโดยเฉพาะฝั่งตะวันตก นิยมนำมาปลูกเพื่อการค้า สามารถจำแนกได้เป็น 3 type โดยพิจารณาจากลักษณะความหนาของกะลาในผลปาล์มเป็นลักษณะสำคัญเพื่อแยกความแตกต่างของแต่ละ type คือ

- เดลี ดูรา (Deli Dura) เป็นดูราที่ดีพบในตะวันออกไกล มีชั้น mesocarp ประมาณ 35-50% ของน้ำหนักผล มีกะลาหนาประมาณ 2-8 มิลลิเมตร ไม่มีเยื่อรอบกะลา มีน้ำมันประมาณ 17-18% ของน้ำหนักผล และมี kernel ขนาดใหญ่

- พิสิเฟอรา (Pisifera) มีชั้น mesocarp ประมาณ 90% มีกะลาบางหรือไม่มี มีน้ำมันน้อยกว่า ดูรา และมี kernel ขนาดเล็ก จำนวนทะลายน้อยและช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมัน

- เทเนอรา (Tenera) เป็นพันธุ์ผสมระหว่างดูราและพิสิเฟอรา โดยใช้พิสิเฟอราเป็นพ่อพันธุ์ และดูราเป็นแม่พันธุ์ มีชั้น mesocarp ประมาณ 60-95% และจะพบเส้นใยในชั้น mesocarp มีกะลาหนาปานกลาง และมีน้ำมันประมาณ 22-24% ของน้ำหนักผล



ภาพประกอบ 1 ลักษณะโครงสร้างภายในของผลปาล์มพันธุ์ต่างๆ

Figure 1 Morphology of oil palm fruit

ที่มา : ผาสุก กุลละวณิชย์ และคณะ, 2531

ความหนาของกะลาถูกควบคุมโดยยีนสามารถมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปยังชั่วต่อไปได้และคาดว่าถูกควบคุมโดยยีน 1 คู่ ลักษณะกะลาหนาเป็นลักษณะเด่น (homozygous DD) ลักษณะกะลาบางมากหรือไม่มีกะลาเป็นลักษณะด้อย (homozygous dd) การผสมระหว่างต้นดูรากับต้นพิสิเฟอราจะให้ลูกผสมเทเนอรา (Dd) ซึ่งมีลักษณะกะลาบาง เปลือกนอกต่อผลและเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่อทะลายสูงกว่าดูรา

1.3 การใช้ประโยชน์น้ำมันปาล์ม

น้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม สามารถนำมาใช้แปรรูปได้โดยการกลั่นให้บริสุทธิ์ การทำให้ไขมันหรือกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเปลี่ยนเป็นไขมันและกรดไขมันที่อิ่มตัว และการแยกองค์ประกอบของกรดไขมัน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมน้ำมันสำหรับการบริโภคและอุปโภคมากมาย ดังจะได้กล่าวต่อไปนี้ (นครสาระคุณ และคณะ, 2541)

1.3.1 ด้านการบริโภค

น้ำมันปรุงอาหาร ตามปกติน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้องจะมีการแยกออกเป็นสองส่วน คือ น้ำมันส่วนใสหรือโอเลอีน ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 65-70 และน้ำมันส่วนที่ข้นหรือสเตียรีน ซึ่งมีอยู่ร้อยละ 30-35 น้ำมันปรุงอาหารได้จากการนำเอาน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์มาแยกส่วน เอาเฉพาะน้ำมันส่วนใสออกมา โดยกระบวนการแยกส่วนซึ่งมีอยู่หลายวิธี

มาการีนหรือเนยเทียม สมบัติทางกายภาพเหมาะกับการทำมาการีน คือมีลักษณะเป็นของแข็งละลายได้รวดเร็วเมื่อสัมผัสลิ้น โดยทั่วไปในเชิงอุตสาหกรรมมักใช้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ร้อยละ 60 น้ำมันเมล็ดในร้อยละ 30 และน้ำมันสเตียรีนอีกร้อยละ 10

เนยขาว น้ำมันปาล์มที่ฟอกบริสุทธิ์สามารถแปรรูปให้เป็นเนยขาวได้ โดยทำให้เย็นตัวอย่างฉับพลันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

นมข้นหวาน น้ำมันปาล์มถูกใช้เป็นส่วนผสมของนมข้นหวาน เนื่องจากมีคุณสมบัติเหมาะสมหลายอย่าง เช่น ไม่มีกลิ่น

ไอศกรีม ในการผลิตไอศกรีมใช้น้ำมันปาล์มผสมร่วมกันน้ำมันมะพร้าวอย่างละครึ่ง

ครีมเทียมหรือนมเทียม มักใช้น้ำมันปาล์มสเตียรีนเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิต

1.3.2 ด้านการอุปโภค

สบู่ น้ำมันปาล์มสามารถนำมาใช้ผลิตสบู่ได้ โดยใช้น้ำมันปาล์มสเตียรีนร้อยละ 40 น้ำมันปาล์มร้อยละ 40 และน้ำมันเมล็ดในปาล์มหรือน้ำมันมะพร้าวร้อยละ 10

อุตสาหกรรมโอลิโอเคมีคอลเป็นอุตสาหกรรมที่ใช้เทคโนโลยีขั้นสูงและละเอียดอ่อน โดยการนำกรดไขมันอิสระ (Palm Fatty Acid Distilled; PFAD) เป็นส่วนที่ได้มาขั้นตอนสุดท้ายของการกลั่นบริสุทธิ์แบบกายภาพ โดยที่กรดนี้จะมีความบริสุทธิ์สูงประมาณร้อยละ 95 ถ้าหากนำไปแยกส่วนเป็นกรดต่างๆ ออกมาได้ จะสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดเพื่อป้อนโรงงานอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์ที่สำคัญมีดังนี้

กรดสเตียริก ใช้ในอุตสาหกรรมยางรถยนต์ พลาสติก เครื่องสำอาง เทียนไข ส่วนประกอบของแคลเซียมคาร์บอเนต ซีเมนต์กันน้ำ จารบี และน้ำมันหล่อลื่น

กรดโอเลอิก ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เภสัชกรรม จารบี น้ำมันหล่อลื่น สิ่งทอ

กรดลอริก ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเคมี

กรดไมริสติก ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

กรดไขมัน ใช้ในอุตสาหกรรมสบู่ จารบี

อัลไคล เรซิน (alkyl resin) ใช้ในอุตสาหกรรมสี

กรดลิโนเลอิก นำไปใช้เป็นยาฉีดลดไข้ในเส้นเลือด

1.3.3 อาหารสัตว์

ในการผลิตอาหารสัตว์ซึ่งต้องการไขมันและวิตามินเป็นส่วนผสม มักนิยมใช้น้ำมันสเตียรีนผสมกับอาหารสัตว์

2. ประวัติปาล์มน้ำมันภายในประเทศ

การปลูกปาล์มน้ำมันเป็นการค้าในประเทศ เริ่มปลูกครั้งแรกก่อนสงครามโลกครั้งที่ 2 โดยหม่อมเจ้าอมรสมานลักษณ์ กิติยากร ในเนื้อที่ประมาณ 1,000 ไร่ ที่ตำบลบ้านปริก อำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา ต่อมาสวนปาล์มน้ำมันนี้ได้หยุดกิจการไป

ปาล์มน้ำมันได้รับการส่งเสริมในรูปของบริษัทเพื่อเป็นการค้าอย่างจริงจังในปี พ.ศ. 2510 ซึ่งในขณะนั้นมีโครงการปลูกปาล์มอยู่ 2 โครงการ คือ โครงการนิคมสร้างตนเองพัฒนาภาคใต้ จังหวัดสตูล เนื้อที่ปลูก 20,000 ไร่ และโครงการบริษัทอุตสาหกรรมน้ำมันและสวนปาล์มจำกัด ตำบลปลายพะเยา อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ เนื้อที่ปลูก 20,000 ไร่ หลังจากนั้นทั้ง 2 โครงการประสบความสำเร็จ ก็มีผู้สนใจมากขึ้นและมีบริษัทปลูกปาล์มน้ำมันเกิดขึ้นอีกหลายแห่ง ในขณะเดียวกันรัฐบาลได้ส่งเสริมให้เกษตรกรรายย่อยปลูกตามสหกรณ์นิคมต่างๆ ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ทำให้การขยายตัวเป็นไปอย่างรวดเร็ว จึงมีการส่งเสริมให้ปลูกเป็นการค้าประกอบกับปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและมีศักยภาพในการแข่นขันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นทั้งด้านการผลิตและการตลาด เนื่องจากในอดีตประเทศไทยไม่สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้ ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้น กรมวิชาการเกษตรจึงได้มอบหมายให้ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี สถาบันวิจัยพืชสวนรับผิดชอบโครงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ในระยะแรกลักษณะงานเป็นการทดสอบลูกผสมจากประเทศแซร์ และปาปัวนิวกินี และศึกษาคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่ที่ได้จากประเทศมาเลเซียแต่ไม่ได้ดำเนินการต่อเนื่อง ประกอบกับในปี 2530 ได้รับการสนับสนุนจาก UNDP/FAO ในการจัดซื้อเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันจากบริษัท ASD (Agriculture Service and Development) ประเทศคอสตาริก้า ทวีปอเมริกากลางเพื่อมาดำเนินการโครงการวิจัยและพัฒนาปาล์มน้ำมันแห่งประเทศไทย (THA/84/007) เชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันเหล่านี้ บริษัท ASD ได้รวบรวมไว้ตั้งแต่ ค.ศ. 1968 โดยการแลกเปลี่ยนจากแหล่งต่างๆ หลายประเทศ ได้แก่ Chermara Harrisons และ PORIM ประเทศมาเลเซีย, Dami ประเทศปาปัวนิวกินี, Socfin และ AVROS ประเทศอินโดนีเซีย, Lobe ประเทศแคเมอรูน, ประเทศไอวอรี่ โคสต์ และประเทศแซร์ (Escobar and Blaak, 1990 อ้างโดย อรรัตน์ วงศ์ศรี และคณะ, 2544)

หลักการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันของโครงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันของประเทศไทย ใช้วิธีการ Reciprocal Recurrent Selection ซึ่งจะต้องคัดเลือกพ่อ-แม่และทดสอบรุ่นลูกทุกรอบๆ ละประมาณ 10 ปี เพื่อกลั่นกรองพันธุ์ที่ดีอยู่แล้วให้ดีขึ้นกว่าเดิม หรือเพื่อเพิ่มลักษณะดีอย่างอื่นที่ต้องการเสริมเข้าไป

3. เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker)

ในการจำแนกพันธุ์พืชปกติแล้วจะสังเกตุจากลักษณะภายนอก เช่น ลักษณะดอก ใบ ลำต้น และผล แต่บางครั้งก็เกิดความผิดพลาดได้ในกรณีของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ต้องให้ผู้ชำนาญจึงสามารถแยกได้ ในกรณีของปาล์มน้ำมัน ระยะเวลาจนออกดอกติดผลค่อนข้างยาวนาน จึงเสียเวลามากกว่าที่จะตรวจสอบได้ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลสามารถจะตรวจสอบได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าถึงต้นที่โตเต็มที่ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่ระดับโปรตีนถึงระดับดีเอ็นเอ เช่น ไอโซไซม์, RFLP, Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP), RAPD, มินิแซทเทลไลท์, ไมโครแซทเทลไลท์, AFLP และ EPIC เป็นต้น

3.1 ไมโครแซตเทลไลท์ (Microsatellite)

ไมโครแซตเทลไลท์ หรือ Simple Sequence Repeats (SSRs) เป็นดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยเบสซ้ำๆ โดยทั่วไปมีจำนวนเบสประมาณ 1-6 คู่เบส ซึ่งมีความแตกต่างกันของจำนวนซ้ำในแต่ละ repeated unit และมีความเป็น polymorphic สูง ไมโครแซตเทลไลท์ มีการกระจายตัวอยู่ในจีโนมสูง และมีปริมาณมาก นอกจากนี้ยังมีความหลากหลายสูง ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นเครื่องหมายระดับโมเลกุล (Garland, *et al.*, 1999) ถึงแม้ว่าค่าใช้จ่ายในการศึกษาจะสูงก็ตาม แต่ไมโครแซทเทลไลท์ก็ให้ข้อมูลมาก มีการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เช่น

Lagercrantz และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาความแตกต่างของไมโครแซตเทลไลท์ระหว่างพืชและสัตว์ พบว่า ไมโครแซตเทลไลท์ในพืชมีน้อยกว่าสัตว์ 5 เท่า และพบว่า พืชส่วนใหญ่จะมีไมโครแซตเทลไลท์ที่มีลำดับเป็น AA/TT, AT/TA, และ CT/GA ที่ซ้ำๆ กัน

Ostrander และคณะ (1992) ได้ใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการหา polymorphism จาก SSRs ชนิด $(AC)_{15}$, $(GT)_{18}$, $(AC)_{23}$ และ $(AC)_{18}(AT)(AC)_3$ พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดเฉลี่ย 500 bp และนำเข้า phagemid เพื่อออกแบบไพรเมอร์และศึกษาว่าเกิด polymorphic band หรือไม่ ในอนาคตไพรเมอร์ที่ได้จะใช้ในการแบ่งกลุ่มสุนัขลูกผสม หากมีการนำวิธีนี้ร่วมกับการหาลำดับเบสจะมีประโยชน์มากสำหรับ STSs และ การพัฒนาแผนที่ยีนต่อไป

Kijas และคณะ (1994) ได้ศึกษาการแยกไมโครแซตเทลไลท์ของส้มด้วย streptavidin-coated magnetic particles โดยตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *MboI* หลังจากนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะแถบดีเอ็นเอซึ่งมีขนาด 300-1,500 bp และเชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM™ –3Z เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ แล้วจึงนำดีเอ็นเอที่ได้มาคัดเลือกไมโครแซตเทลไลท์โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจจับชนิด $(TAA)_8$ ซึ่งติดฉลากด้วยไบโอตินที่สามารถจับกับ streptavidin-coated magnetic bead ได้ ดังนั้นสิ่งที่ติดกับ bead คือดีเอ็นเอที่เป็น ไมโครแซตเทลไลท์ ชะดีเอ็นเอที่ติดกับ bead ออกมาและเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วเชื่อมดีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM -3Z นำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* JM109 และตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอตรวจจับชนิด $(TAA)_8$ อีกครั้งก็จะได้ไมโครแซทเทลไลท์ที่ต้องการ วิธีการนี้จึงเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพที่จะสามารถประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ

Edwards และคณะ (1996) ได้คัดเลือกไมโครแซตเทลไลท์โดยย่อย genomic DNA ด้วยเอนไซม์ *RsaI* และนำไปเชื่อมกับ *Mlu*I adapter นำดีเอ็นเอที่ได้ไปไฮบริไดซ์กับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ ที่ตรึงอยู่บนเมมเบรน ชะดีเอ็นเอออกมาและเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ตัดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ *Mlu*I หลังจากนั้นเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pUC 19 และนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH 10B™ หาลำดับเบสในดีเอ็นเอลูกผสมและสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 15 ชนิด พบว่า 13 ชนิด มี

ประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวน polymorphic band ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด การศึกษาที่ได้มีประโยชน์ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ และ การปรับปรุงพันธุ์

Fischer และ Bachmann (1998) ได้คัดเลือกไมโครแซตเทลไลท์ของหอมโดยสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากใบหอม ทำให้บริสุทธิ์ ตัดดีเอ็นเอที่ได้ด้วย *Rsa*I แล้วนำไปเชื่อมกับ adapter เตรียม streptavidin-coated magnetic bead โดยติดฉลากไมโครแซทเทลไลท์ที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจจับทำปฏิกิริยาด้วยไบโอติน และนำไปให้จับกับ streptavidin bead นำชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อม adapter แล้วมา denature และให้ชิ้นดีเอ็นเอทำปฏิกิริยากับ bead หลังจากนั้นชะชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ออกมา และนำไปเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ใช้ *Mlu*I ตัดบริเวณ adapter และเชื่อมเข้าดีเอ็นเอพาหะ หลังจากนั้นจึงนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้า *E. coli* XL1-Blue Strain Cells เลี้ยงใน LB agar และสกัด ดีเอ็นเอลูกผสม หาลำดับเบสโดยใช้ Model 377 Fluorescent Sequencer และออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Designer PCR™ ไพรเมอร์ที่ได้นำมาทำพีซีอาร์กับหอม 14 ชนิด และ shallet 5 ชนิดจะเกิดแถบประมาณ 1-2 แถบ และได้นำแถบนั้นไปหาลำดับเบสเพื่อยืนยันว่าเป็นไมโครแซทเทลไลท์จริง

Hamilton และคณะ (1999) ได้ศึกษาการใช้ linker เพื่อคัดเลือกไมโครแซตเทลไลท์ โดยสกัดดีเอ็นเอจากพืช นกเพนกวิน และ primate มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ได้ด้วย mung bean nuclease (MBN) เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอกับ SNX linker และนำไปเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ คัดเลือกดีเอ็นเอที่ต้องการต่อด้วย 5′biotinylated oligonucleotide ที่จับกับ streptavidin-coated magnetic bead เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจึงเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ อีกครั้งและต่อเข้ากับ pBlue-script® II SK(+) หลังจากนั้นจึงนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้า *E. coli* XL1-Blue MRF′ เลี้ยงเชื้อที่ได้ให้เกิดเป็นโคโลนี และย้ายลงแผ่นไนลอนเมมเบรน และ ไฮบริไดซ์ ด้วย biotinylated oligonucleotide เลือกเฉพาะ positive clone มาทำ พีซีอาร์ โดยใช้ T7 และ T3 primer นำมาหาลำดับเบสด้วย Model 373XL หรือ 377XL Fluorescent Sequences และนำมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อทดสอบ พบว่าจะให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic DNA ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ วิธีการหาไมโครแซทเทลไลท์นี้สามารถพัฒนาร่วมกับ การศึกษา linkage mapping การศึกษาพันธุศาสตร์ระดับประชากร ตลอดจนความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Perera และคณะ (1999) ได้จำแนกไมโครแซตเทลไลท์ โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจจับชนิด $(AC)_{13}$ เพื่อคัดเลือก เมื่อได้ชิ้นส่วนที่ต้องการจึงโคลนเข้า LambdaZap phage vector และตรวจสอบอีกครั้งด้วยการไฮบริไดซ์กับ $(AC)_{13}$ และหาลำดับเบสเพื่อออกแบบไพรเมอร์ๆ ที่ได้นำไปใช้ตรวจสอบความหลากหลายของประชากรมะพร้าวในศรีลังกา

Perera และคณะ (2000) ทำการศึกษาโดยวิธีการเดียวกับการทดลองของ Perera และคณะ (1999) แต่ ไพรเมอร์ ที่ได้นำไปตรวจสอบความหลากหลายของมะพร้าวพันธุ์ต่างๆ ของโลก

Rivera และคณะ (1999) ได้ศึกษาไมโครแซตเทลไลท์ของมะพร้าว (*Cocos nucifera*) โดยทำห้องสมุดดีเอ็นเอ พบว่า 75% ของห้องสมุดดีเอ็นเอมีไมโครแซตเทลไลท์ ซึ่ง 64% ของไมโครแซตเทลไลท์เป็น dinucleotide (GA/CT, CA/GT และ GC/CG) 6% เป็น trinucleotide จากการใช้ตัวอย่างมะพร้าว 20 ชนิด พบไมโครแซตเทลไลท์ 38 ชนิด

Thanh และคณะ (1999) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมข้าวโดยใช้ไพรเมอร์ของไมโครแซทเทลไลท์ 14 ชนิด ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไมโครแซทเทลไลท์เกือบทุกไพรเมอร์ จะให้ polymorphic สามารถตรวจพบอัลลีลทั้งหมด 41 อัลลีล ดังนั้นโดยเฉลี่ย 1 loci จึงมี 2.9 อัลลีล เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์โดยใช้วิธี Jaccard's coefficients จะทราบความสัมพันธ์ของข้าวพันธุ์ต่างๆ ว่ามีความสัมพันธ์กันเพียงไร

3.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) หรือ Arbitrary Primed PCR (AP-PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้กันมากในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล และระดับประชากร ในการทำพีซีอาร์ ปกติแล้วจะใช้ไพรเมอร์ ที่มีความแตกต่างกันสองชนิดในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอแต่สำหรับ RAPD นั้นเป็นเทคนิคที่ใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวเป็นทั้ง reverse primer และ forward primer โดยไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดสั้นๆ ประมาณ 5-10 เบส ซึ่งไพรเมอร์จะจับกับ genomic DNA แบบสุ่มทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนจึงเป็นแบบสุ่ม (Edward, 1998) แล้วแยกผลจากการทำพีซีอาร์ ที่

ได้ด้วย gel electrophoresis (Prathepha, 2000; Rath, *et al.*, 1998; William, *et al.*, 1990) วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็วและง่ายในการจำแนกสายพันธุ์ (Dettori, 2000) อีกทั้งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย (Sedra, *et al.*, 1998; William, *et al.*, 1990) การใช้ RAPD มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษา genetic distance (William, *et al.*, 1990) และยังมีความสามารถในการแยกสิ่งมีชีวิตทั้ง inter & intraspecific (Ruas, *et al.*, 1999) มีการใช้ประโยชน์จากเทคนิค RAPD ในการศึกษาสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น

การศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เช่น white clover (Joyce, *et al.*, 1999), งา (Bhat, *et al.*, 1999), มัสตัด (Rabbani, *et al.*, 1998), ชา (Kaundum, *et al.*, 2000), ส้ม (Filho, *et al.*, 1998), พลัม (Shimada, *et al.*, 1999; Sedra, *et al.*, 1998) , *Cymbidium* (Obara-Okeyo and Kako, 1998), *Dendroseris* (Esselman, *et al.*, 2000), มะพร้าว (Ashburner, *et al.*, 1997) และ มันเทศ (Sagredo, *et al.*, 1998)

การจำแนกและหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเช่นการศึกษาใน common beans (Maciel, *et al.*, 2001), สน (Nkongolo, *et al.*, 2002), ข้าว (Ko, *et al.*, 1994), ยางนา (Rath, *et al.*, 1998), วอลนัท (Nicese, *et al.*, 1998), แพร์ (Teng, *et al.*, 2001), สตรอเบอร์รี่ (Degani, *et al.*, 1998), พรุน (Casas, *et al.*, 1999) และ ข้าวฟ่าง (Dahlberg, *et al.*, 2002)

การทำแผนที่ยีน เช่น กะหล่ำปลี (Kuginuki, *et al.*, 1997) และ แมลงหวี่ (Laayouni, *et al.*, 2000)

Moretzsohn และคณะ (2000) ได้ศึกษา RAPD ที่สัมพันธ์กับลักษณะความหนาของกะลาในปาล์มน้ำมันโดยทดลองใช้ไพรเมอร์ 308 ชนิด พบเครื่องหมายที่เหมาะสม 121 ชนิด และให้ polymorphic เฉลี่ย 1.66 แถบต่อไพรเมอร์ ซึ่งมีไพรเมอร์เพียงสองชนิดที่มีความใกล้ชิดกับยีน *Sh* คือ R11-1282 ซึ่งอยู่ห่างจากยีน *Sh* 17.5 cM และ T19-1046 อยู่ห่างจากยีน *Sh* 23.9 cM การศึกษานี้มีประโยชน์ในการพัฒนา genetic linkage และใช้คัดเลือกปาล์มน้ำมันก่อนที่จะติดผล

Shah และคณะ (1994) ใช้เทคนิค RAPD บอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในทวีปแอฟริกา โดยไพรเมอร์ 9 ชนิด จะให้ polymorphic band

อยู่ในช่วง 0.2-2.3 kb แต่ไม่สามารถบอกความจำเพาะของแต่ละประชากรได้ แต่จะให้ข้อมูลเพียงประชากรกลุ่มที่ 5 จากประเทศแซร์มีความหลากหลายที่สุด และ ประชากรกลุ่มที่ 2 จากประเทศแซร์มีความหลากหลายน้อยที่สุด

3.3 Exon-Primed Intron Crossing (EPIC)

เป็นเทคนิคที่เลือกศึกษาการเรียงลำดับเบสของยีนที่มีความสำคัญต่อกลไกทางชีวเคมีของเซลล์ ซึ่งยีนเหล่านี้มักมี exon ที่ conserve ดังนั้นจึงสามารถออกแบบไพรเมอร์เพื่อทำ พีซีอาร์ จากบริเวณ conserve แล้วเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ intron ซึ่งลำดับเบสบริเวณนี้คือ noncoding region จะมีความแปรปรวนมากกว่า coding region (Hare, 2001) เทคนิค EPIC มีประสิทธิภาพมากที่จะให้ลำดับดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย (Palumbi and Baker, 1994) อีกทั้งยีนที่ศึกษานี้เนื่องจากมีจำนวนซ้ำน้อยจึงง่ายต่อการศึกษาและยังมีศักยภาพในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Strand, *et al.*, 1997) ตัวอย่างของยีนที่ถูกเลือกใช้กับเทคนิค EPIC ได้แก่

ยีน Alcohol dehydrogenase (*Adh*) ใช้สร้างเอนไซม์ glycolytic ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นใน anaerobic metabolism (Cummings and Clegg, 1998; Morton, *et al.*,1996) มีการถอดรหัสเมื่อเกิดสภาวะขาดออกซิเจนหรือสภาวะหนาวเย็น ในพืชตระกูลปาล์มจะพบไอโซไซม์ 3 ชนิด ยีน *Adh* ประกอบด้วย 10 exon และ 9 intron มีขนาด 1,146 bp (Morton, *et al.*,1996)

ยีน Calmodulin (*Cal*) เป็นยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการส่งเสริมกระบวนการ elongation แต่ไม่ส่งเสริมกระบวนการเริ่มต้นของการเกิดการแปลรหัส (translation) ของ mRNA (Sonnemann, *et al.*, 1993), ส่งเสริมการแบ่งนิวเคลียสภายในเซลล์ (Ohya and Anraku, 1989), กระตุ้นการทำงานของ calmodulin-dependent protein kinase II (Glazewski, *et al.*, 1996), กระตุ้นให้เกิดการ depolymerization ใน microtubule (Lee and JWolff, 1982) เมื่อเกิดการถอดรหัส (transcription) จะให้ RNA สองขนาด ยีนนี้ประกอบไปด้วย 5 exon ซึ่งชิ้นแรกจะมีขนาด 49 bp จากปลาย 5′ untranslated และชิ้นต่อไปจะอยู่ห่างออกไปเป็นช่วงๆ ถึง 16 kb (Smith, 1987; Doyle, 1990; Hanson-

Painton, 1992) ในมนุษย์จะพบยีนชนิดนี้ 3 ชุด ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 14 (*CALM1*), โครโมโซมคู่ที่ 2 (*CALM2*) และ โครโมโซมคู่ที่ 19 (*CALM3*) (Fischer, *et al.*, 1988)

ยีน Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*G3pdh*) เป็นยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของรากขณะน้ำท่วม, เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเครียดเมื่อมีออกซิเจนต่ำ (Sivalinganna and Martin, 1998), เกี่ยวข้องกับ endocytosis ของ membrane protein, เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในการแปลรหัส, เกี่ยวข้องกับการขนส่ง tRNA (function in glycolysis)

4. การศึกษาดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน

Rajanaidu และคณะ (2000) ได้เก็บรวบรวมพันธุ์ปาล์มน้ำมันจาก 11 ประเทศ และได้ศึกษาปริมาณการผลิตน้ำมัน, ส่วนประกอบของกรดไขมัน, สรีรวิทยา, ความสูง, ปริมาณคาโรทีน และ วิตามินอี นอกจากนั้นยังได้ใช้เทคนิค RFLP, AFLP, RAPD และไอโซไซม์ เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันทั้งในและต่างกลุ่ม เพื่อเป็นแนวทางในการอนุรักษ์และวางแผนการเก็บรวบรวมพันธุ์

Cochard และคณะ (2000) ทำการรวบรวมปาล์มน้ำมันจาก 4 แหล่ง ประกอบด้วย 17 กลุ่มประชากร เพื่อศึกษาลักษณะที่แสดงออก ปาล์มน้ำมันที่รวบรวมถูกใช้เพื่อสร้างประชากรใหม่ และเป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมไว้ โดยเก็บรวบรวมไว้ในภูมิประเทศเดิม และได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น RFLP, พีซีอาร์ เป็นต้น

Billotte และคณะ (2001) ได้คัดเลือกไมโครแซทเทลไลท์ชนิด $(GA)_n$, $(GT)_n$ และ $(CCG)_n$ จากปาล์มน้ำมัน (*Elaeis quineensis*) โดยใช้วิธี hybridization based capture ไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้จำนวน 21 ชนิด ถูกใช้ในการศึกษาขนาดของอัลลีล และประเมิน heterozygosity ในกลุ่มประชากร *E. quineensis* กับ *E. oleifera* SSRs จะแยกกันตามกฎของเมนเดลทำให้นักปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันสามารถใช้ SSRs สำหรับทำแผนที่ยีน รวมทั้งค้นหายีนที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะสำคัญในรุ่นลูก ทั้งที่เป็น intra-specific หรือ inter-specific นอกจากนี้ SSRs ยังสามารถบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรดั้งเดิมของ *E. quineensis* และ *E. oleifera*

Kularatne และคณะ (2000) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis quineensis*) จำนวน 687 ต้น จาก 11 ประเทศ โดยใช้เทคนิค AFLP กับไพรเมอร์ 8 ชนิด พบว่าให้แถบดีเอ็นเอ 377 แถบ ซึ่งเป็น polymorphic 93.4 % โดยปาล์มน้ำมันจากประเทศคเมรูน มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด และ เดลี ดูรา มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยที่สุด, ความหลากหลายภายในประชากร (55%) มีมากกว่าความหลากหลายระหว่างประชากร (45%), ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันภายในประเทศ (71%) มีมากกว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประเทศ (29%) รูปแบบการจัดกลุ่มประชากรยังคงเหมือนเดิม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าประเทศไนจีเรียเป็นแหล่งกำเนิดปาล์มน้ำมันและค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมจะลดลงไปในประเทศใกล้เคียง

Rajanaidu และคณะ (2000) ได้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม ทั้งภายในและระหว่างประชากรในธรรมชาติของปาล์มน้ำมัน (*E. quineensis*) ที่ได้เก็บรวบรวมจากหลายประเทศโดยใช้เทคนิค RAPD และ RFLP มีการศึกษาในประชากรของ *E. quineensis* 176 กลุ่ม, ประชากรของ *E. oleifera* 47 กลุ่ม และ เดลี ดูรา 1 กลุ่ม ในการศึกษา RAPD ได้ใช้ไพรเมอร์ทั้งสิ้น 20 ชนิด พบว่า ให้ชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 2,285 แถบ ซึ่งเป็น monomorphic 11.4% และ polymorphic 88.6% ค่าเฉลี่ยของความหลากหลายภายในประชากรมีค่า 53% และค่าเฉลี่ยของความหลากหลายระหว่างประชากรมีค่า 47% ส่วนการศึกษาใน *E. oleifera* ส่วนใหญ่จะเป็น monomorphic ในด้านการศึกษา RFLP ได้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด และ ไฮบริไดซ์ กับดีเอ็นเอตรวจจับ 4 ชนิด พบว่าประชากรจากประเทศไนจีเรียมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุดจึงคาดว่าประเทศไนจีเรียน่าจะเป็นศูนย์กลางความหลากหลายของปาล์มน้ำมัน

Mayes และคณะ (1997) ได้พัฒนาเทคนิค RFLP เพื่อใช้ในการทำเครื่องหมายยีนในปาล์มน้ำมัน (*E. quineensis*) เพื่อใช้ในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ประชากร 98 ต้น และตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอตรวจจับ 84 ชนิดที่เป็น low copy สามารถตรวจสอบได้ 103 loci โดย 97 loci มีความสัมพันธ์กับประชากร 24 กลุ่ม มีการทำแผนที่ประชากรโดยใช้การผสมตัวเองเพื่อศึกษาการแยกกันของลักษณะกะลาได้ แต่ไม่

สามารถ mapping ยีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอื่นๆ จากการใช้ RFLP ทำให้ทราบว่า ยีน *Sh* อยู่ตำแหน่ง 9.8 cM และ 6.6 cM (A137/30×E80/29)

วัตถุประสงค์

1. โคลนและศึกษาการเรียงลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน
2. ออกแบบและนำไพรเมอร์ของไมโครแซทเทลไลท์ไปสำรวจดีเอ็นเอของพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ผลิตโดยศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี
3. ศึกษาแบบแผนดีเอ็นเอของพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ผลิตโดยศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี ด้วยเทคนิค EPIC
4. ศึกษาแบบแผนดีเอ็นเอของพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ผลิตโดยศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี ด้วยเทคนิค RAPD
5. สามารถจำแนกปาล์มน้ำมันจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานีได้