

การพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ การสร้างดอกปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Development of ILP Markers from Genes Involving in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Inflorescence

โสณิชา อุทุมพร และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Sonicha U-thoomporn and Kittipat Ukoskit*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่สำคัญ เนื่องจากมีความต้องการน้ำมันจากปาล์มเพิ่มขึ้น ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการให้ผลผลิตของปาล์มน้ำมัน คือ การพัฒนาการของดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย กลุ่มยีน MADS box เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของดอกจึงเป็นยีนที่สำคัญต่อผลผลิตของปาล์มน้ำมันในงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ILP (intron length polymorphism) จากยีนที่เกี่ยวข้องกับ MADS box โดยการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 12 expressed sequence tags (EST) ของกลุ่มยีนใน MADS box กับลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมของปาล์มน้ำมันเพื่อออกแบบไพรเมอร์เพิ่มปริมาณอินทอน จากไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบทั้งหมด 38 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ 25 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและแสดงโพลิมอร์ฟิซึมในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมัน 41 ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ย polymorphism information content (PIC) และค่าเฉลี่ยของจำนวนแอลลีล เท่ากับ 0.27 และ 3.12 ตามลำดับ และพบว่ามีเครื่องหมาย ILP จำนวน 6 เครื่องหมาย ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมในตัวอย่างประชากรปาล์มลูกผสม F_1 ที่ใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม เครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาได้นี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และมีศักยภาพในการนำไปสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้ต่อไป

คำสำคัญ : ปาล์มน้ำมัน; MADS box; เครื่องหมาย ILP; ความหลากหลายทางพันธุกรรม; แผนที่ทางพันธุกรรม

Abstract

Oil palm is a value economic crop because of increasingly uses of oil palm products. The important factor of oil palm fruit production is the development of male and female

inflorescences. MADS box genes are essential since they are related to development of oil palm inflorescences. In the present study, Intron Length Polymorphism (ILP) markers of MADS box genes were developed by aligning 12 expressed sequence tags (EST) of MADS box genes with the genomic sequence of oil palm in order to design primers for intron amplification. Of 38 ILP primers designed, 23 primers successfully amplified and were polymorphic in 41 oil palm accessions. PIC (polymorphism information content) average value and allele number were 0.27 and 3.12 per locus, respectively. Six polymorphic ILP markers showed polymorphism in mapping population. The ILP markers developed in the present study have been proved to be useful for genetic diversity assessment and linkage mapping which could be beneficial for oil palm breeding.

Keywords: oil palm; MADS box; ILP marker; genetic diversity; genetic mapping

1. บทนำ

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่ปลูกสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นทุกชนิด นอกจากนี้ต้นทุนในการผลิตน้ำมันต่อกิโลกรัมยังถูกกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นอีกด้วย จากข้อดีดังกล่าว ทำให้มีความต้องการใช้น้ำมันอุปโภคและบริโภคทั้งในด้านอาหารและพลังงานเพิ่มสูงขึ้น โดยความต้องการใช้น้ำมันปาล์มในประเทศมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในอัตราเฉลี่ยร้อยละ 0.13 ต่อปี [1] ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้มีผลผลิตสูงจึงเป็นเป้าหมายสำคัญของการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ซึ่งจะส่งผลให้สามารถผลิตน้ำมันปาล์มได้มากขึ้นในพื้นที่เพาะปลูกเท่าเดิม

ดอกของปาล์มน้ำมันมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อผลผลิตน้ำมันปาล์ม ซึ่งดอกของปาล์มน้ำมันจะต้องมีความสมบูรณ์ทั้งดอกเพศผู้และเพศเมีย การออกช่อดอกของปาล์มน้ำมันขึ้นกับปัจจัยทางพันธุกรรม อายุ และสภาพแวดล้อม โดยองค์ประกอบผลผลิตหลักของปาล์มน้ำมัน ขึ้นกับจำนวนและน้ำหนักทะลาย ที่เก็บเกี่ยวต่อเดือน [2] ซึ่งถูกกำหนดโดยอัตราส่วนเพศ (sex ratio; ดอกตัวเมียต่อจำนวนช่อดอกทั้งหมด) ปริมาณการร่วงของช่อดอกและผล อัตราส่วนโดยมวลของเนื้อ

ชั้นกลาง (mesocarp) ต่อทลายทั้งหมด [3] อัตราส่วนเพศของปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์พบว่ามีความแตกต่างกันมาก บางพันธุ์มีแต่ช่อดอกตัวผู้ ขณะที่บางพันธุ์มีแต่ช่อดอกตัวเมีย เชื่อว่าปัจจัยทางพันธุกรรมมีความสำคัญอย่างมากในการกำหนดความแตกต่างในอัตราส่วนเพศ [4] เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีอายุยาวกว่าจะทราบอัตราส่วนเพศต้องรอถึงอายุประมาณ 4 ปี การที่ไม่สามารถทราบอัตราส่วนเพศของปาล์มน้ำมันจึงเป็นปัญหาที่สำคัญในโครงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีการผสมพันธุ์และคัดเลือกลูกผสม ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศกับอัตราส่วนเพศของปาล์มน้ำมันเพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการคัดเลือกลูกผสม จึงมีประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

เครื่องหมายโมเลกุลเป็นเทคโนโลยีที่สามารถใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีทั้งเครื่องหมายชนิดที่ไม่ทราบหน้าที่ (anonymous marker) และเครื่องหมายชนิดที่เป็นยีนที่ทราบหน้าที่ในการทำงาน (functional marker) ซึ่งเครื่องหมายชนิดหลังนี้มีประโยชน์อย่างมากทั้งในด้านการศึกษาพันธุศาสตร์ และการประยุกต์ใช้เพื่อการคัดเลือกใน

การปรับปรุงพันธุ์พืช (marker assisted selection) เครื่องหมาย ILP (intron length polymorphism) [5] เป็นเครื่องหมายยีนที่พัฒนาได้ไม่ยุ่งยาก และสามารถพัฒนาได้จากยีนเป้าหมายโดยตรงจากข้อมูล expressed sequence tags (EST) ในฐานข้อมูลสาธารณะ ทั้งจากพืชที่ทำการวิจัยโดยตรง และจากพืชที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน [5,6] โดยการออกแบบคู่ไพรเมอร์ให้จำเพาะกับตำแหน่งของคูเอกซอน (exon) ที่ล้อมระหว่างส่วนของอินทรอน (intron) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EST กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม คู่ไพรเมอร์จะใช้เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอบริเวณอินทรอน โพลีเมอร์พื้ซึมที่ตรวจสอบเกิดจากความแตกต่างของความยาวของอินทรอน คุณลักษณะที่ดีของเครื่องหมาย ILP ประการแรกคือสามารถหลีกเลี่ยงการโคลน (cloning) หรือการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) บริเวณอินทรอนของยีน [7] ประการที่สองเนื่องจากบริเวณเอกซอนมีความอนุรักษ์ ระหว่างสปีชีส์ ดังนั้นการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณเอกซอนจึงมีโอกาสใช้ข้ามสปีชีส์และข้ามสกุลของสิ่งมีชีวิตได้ [6]

ในการศึกษานี้เป็นการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของดอกปาล์มน้ำมันจากกลุ่มยีน MADS box [8] ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของดอกปาล์มน้ำมัน นำเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาได้ ไปประเมินประสิทธิภาพและใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน และประเมินศักยภาพการนำไปสร้างแผนที่พันธุกรรม เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับลักษณะอัตราส่วนเพศและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตปาล์มน้ำมันได้ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการวิจัย

พันธุ์ปาล์มน้ำมันได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ศวป.สฎ.) จำนวน 41 พันธุ์ (ตารางที่ 1) เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาได้ และใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้ยังนำเครื่องหมาย ILP ไปประเมินศักยภาพเพื่อใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม โดยศึกษาโพลีเมอร์พื้ซึมของปาล์มน้ำมันพันธุ์ clone B และ clone D และตัวอย่างประชากรลูกจำนวน 10 ต้น โดยพ่อแม่พันธุ์ปาล์มน้ำมันและตัวอย่างลูกผสมที่ใช้เป็นตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมก่อนหน้านี้ [9] โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ห้างหุ้นส่วนโกลเด้นเทอเนอรั จังหัดกระบี่

ตารางที่ 1 พันธุ์ปาล์มน้ำมัน จำนวน 41 พันธุ์ ที่ใช้เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมาย ILP และใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

Source	No.
AVROS	5
Calabar	4
Calabar-AVROS	1
DAMI	6
Deli Dura	8
Ghana	3
Ghana-AVROS	2
Ghana-Yangambi	1
Kazemba	1
La Me-AVROS	2
Nigeria	5
Tanzania	1
Yangambi	1
Yangambi-AVROS	1

2.2 การพัฒนาเครื่องหมาย ILP

ค้นหารวบรวมรายชื่อยีนที่อยู่ในยีน MADS box ของปาล์มน้ำมัน [8] แล้วสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่รวบรวมได้ โดยเลือกเป็นลำดับ EST ของปาล์มน้ำมันจากฐานข้อมูล NCBI แล้วนำข้อมูล EST ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมปาล์มน้ำมันในฐานข้อมูล NCBI เพื่อหาตำแหน่งของ EST ในแต่ละยีนโดยใช้โปรแกรม BLAST และ Geneseqer [10] ในการออกแบบไพรเมอร์จะเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ให้จำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งของเอกซอนที่คร่อมอยู่ระหว่างส่วนของอินทรอน และจะเลือกลำดับให้มีระยะห่างจากตำแหน่ง splice site ประมาณ 15-25 เบส ทั้งปลายด้าน 5' และปลาย 3' เมื่อทำการเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการแล้วนำไปออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม PRIMER3 [11] จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้ไปตรวจสอบความจำเพาะ โดยนำไปเปรียบเทียบกับทั้งจีโนมของปาล์ม โดยใช้ โปรแกรม BLAST เพื่อดูความจำเพาะของการจับดีเอ็นเอของไพรเมอร์

2.3 การตรวจสอบเครื่องหมาย ILP

นำ ILP ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาเพิ่มปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 μ L ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 10 ng, 10X PCR buffer 2 μ L (20 mM Tris pH 9.0, 100 mM KCl, 3.0 mM $MgCl_2$), 25 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTPs, คู่ไพรเมอร์อย่างละ 0.2 μ M และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 Unit อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที และ 94 °C นาน 3 นาที ตามด้วยรอบอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 35 รอบ ที่ 94 °C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ตามความเหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่ นาน 1 นาที 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 °C นาน 30 วินาที

ตรวจสอบผลเบื้องต้นด้วย 2 % agarose gel electrophoresis แล้วนำไปวิเคราะห์ฟิลิเมอร์ฟิซิมใน 6 % polyacrylamide gel electrophoresis แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรท [12]

2.4 การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP

แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย ILP จะบันทึกข้อมูลแบบข่มร่วม พารามิเตอร์ที่ประเมินประกอบด้วย จำนวนแอลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง จำนวนจีโนไทป์ ค่า polymorphism information content (PIC) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity, H) ค่าความหลากหลายของยีน (gene diversity, GD) วิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Nei และ Li [13] และสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) โดยวิธี UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic means) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-PC V. 2.0 [14] สำหรับการวิเคราะห์ศักยภาพการนำไปสร้างแผนที่พันธุกรรมจะศึกษาฟิลิเมอร์ฟิซิมระหว่างปาล์มน้ำมันพันธุ์ clone B และ clone D และการกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากรลูกผสมจำนวน 10 ต้น

3. ผลการวิจัย

3.1 การสืบค้นข้อมูลยีน MADS box และการออกแบบไพรเมอร์

การสืบค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มยีน MADS box ของปาล์มน้ำมันโดยสืบค้นข้อมูลเป็นลำดับ EST จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI สามารถพบยีนทั้งหมด 14 ยีน คือ ยีน *GLO1*, *GLO2*, *AG1*, *AG2*, *AGL2-1*, *AGL2-2*, *AGL2-3*, *AGL2-4*, *AGL2-5*, *AGL2-6*, *SQUA2*, *SQUA3*, *DEF*, *STMADS11* และสามารถนำไปออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 38 คู่ไพรเมอร์

3.2 การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP

ไพรเมอร์ ILP ทั้งหมด 38 คู่ไพรเมอร์ นำมาวิเคราะห์จีโนไทป์ กับตัวอย่างปาล์มน้ำมันจำนวน 41 ตัวอย่าง เพื่อใช้ในการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน ผลการประเมินพบว่าทุกคู่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และพบว่ามี 25 คู่ไพรเมอร์ (65.79 %) ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมในตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่นำมาทดสอบ จากการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมในตัวอย่างปาล์มน้ำมัน พบว่ามีจำนวนแอลลีลรวมทั้งหมด 78 แอลลีล จำนวนแอลลีลที่พบอยู่ในช่วง 2 ถึง 7 แอลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.12 แอลลีลต่อเครื่องหมาย เครื่องหมาย AGL2-2-3 แสดงจำนวนแอลลีลสูงสุด คือ 7 แอลลีล จากการวิเคราะห์จำนวนจีโนไทป์ พบว่ามีจำนวนจีโนไทป์ทั้งหมด 91 จีโนไทป์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.64 จีโนไทป์ต่อเครื่องหมาย มีเครื่องหมาย 3 เครื่องหมาย ที่แสดงจำนวนจีโนไทป์สูง

ที่สุดคือ 7 จีโนไทป์ ได้แก่ เครื่องหมาย GLO1-1, GLO1-3 และ AGL2-2-3 เมื่อคำนวณค่า gene diversity พบว่ามีค่าระหว่าง 0.07 ถึง 0.65 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.31 โดยเครื่องหมาย GLO1-3 มีค่า gene diversity สูงสุด สำหรับค่า heterozygosity นั้นมีค่าระหว่าง 0.02 ถึง 0.98 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.30 และพบว่าเครื่องหมาย AGL2-4-4 มีค่า heterozygosity สูงที่สุด ค่า PIC มีค่าระหว่าง 0.07 ถึง 0.59 เฉลี่ย 0.27 ต่อเครื่องหมาย โดยเครื่องหมาย AGL2-2-3 มีค่า PIC สูงสุด ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างเครื่องหมาย ILP 8 เครื่องหมายที่พัฒนาจากยีน 8 ยีน คือ *GLO1-3*, *GLO2-1*, *AG2*, *AGL2-1-3*, *AGL2-2-3*, *AGL2-3-1*, *AGL-4-4*, *SQUA3-3*

3.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

นำเครื่องหมายที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมทั้งหมดจำนวน 25 เครื่องหมาย ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic similarity) และนำไปสร้างเดนโดแกรมพบว่าพันธุ์ปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการประเมินเครื่องหมาย ILP 8 เครื่องหมายที่พัฒนาจากยีน 8 ยีน พารามิเตอร์ที่ประเมินประกอบด้วย จำนวนแอลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (AN) จำนวนจีโนไทป์ (GN) ค่า polymorphism information content (PIC) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity, H) และค่าความหลากหลายของยีน (gene diversity, GD)

Marker	Accession No.	AN	GN	GD	H	PIC
GLO1-3	AF227195.1	4	7	0.65	0.48	0.58
GLO2-1	AF411848.1	3	5	0.61	0.3	0.53
AG2	AY739699.1	2	3	0.45	0.51	0.35
AGL2-1-3	AF411843.1	4	4	0.31	0.35	0.29
AGL2-2-3	AF411844.1	7	7	0.62	0.83	0.59
AGL2-3-1	AF411845.1	5	5	0.16	0.17	0.15
AGL2-4-4	AF411846.1	4	3	0.54	0.98	0.44
SQUA3-3	AF411842.1	4	4	0.39	0.49	0.34

สามารถจัดกลุ่มได้สอดคล้องกับแหล่งที่มาของปาล์ม น้ำมัน (รูปที่ 1) คือ AVROS, Deli Dura, Calabar, Nigeria, DAMI และ Ghana ส่วนปาล์มน้ำมันที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้พบว่าเป็นปาล์มน้ำมันที่เป็นพันธุ์ ลูกผสม (hybrid line)

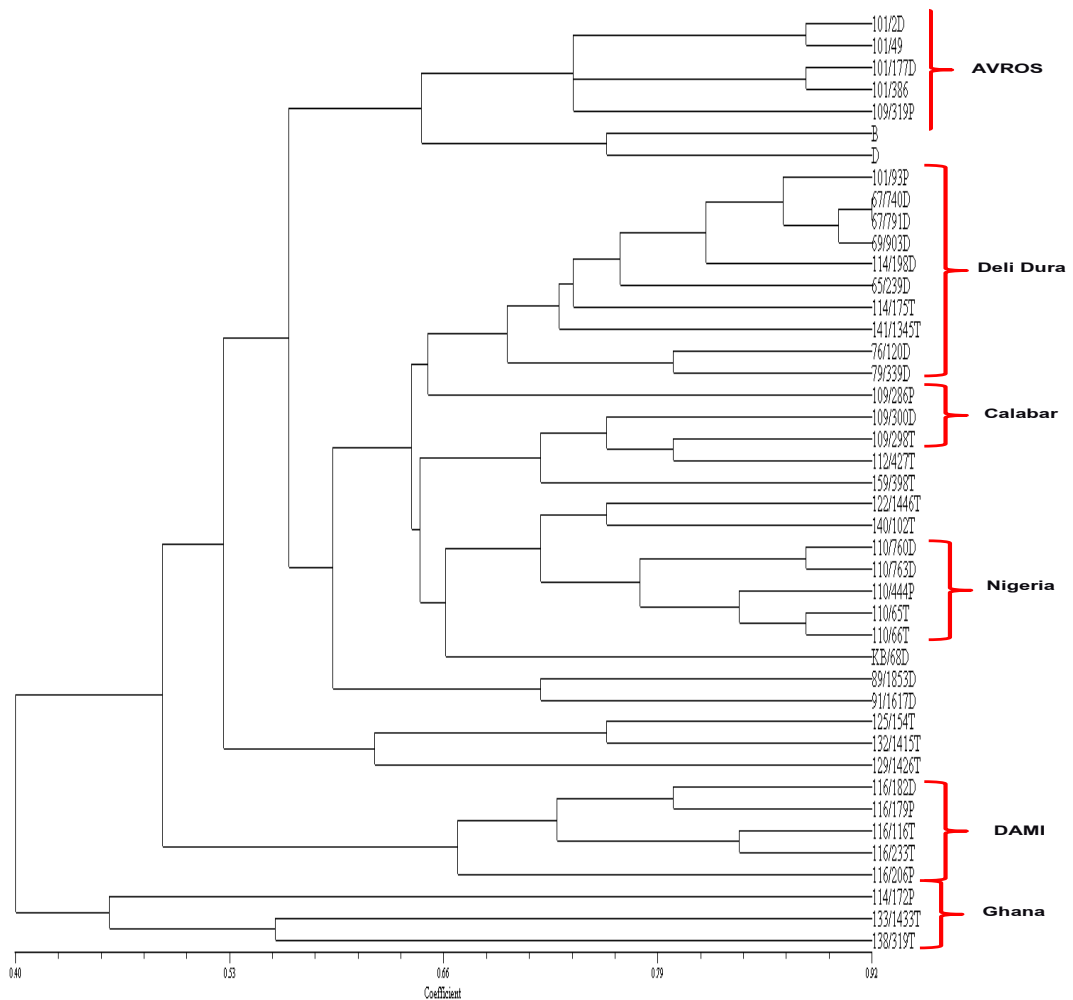
การวิเคราะห์ศักยภาพของเครื่องหมาย ILP เพื่อการนำไปสร้างแผนที่พันธุกรรมโดยศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างปาล์มน้ำมันพันธุ์ clone B และ clone D และการกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากร ลูกผสมจำนวน 10 ต้น พบว่ามี 6 เครื่องหมาย ที่พัฒนาจากยีน 6 ยีน คือ *SQUA3-1*, *AGL2-4-2*, *AGL2-2-1*, *GLO1-4*, *GLO2-4* และ *AGL2-2-3* มีอัตราส่วนคาดหวังการกระจายตัว คือ 1:1, 1:2:1, 1:1, 1:2:1, 1:2:1 และ 3:1 ตามลำดับ

4. วิจารณ์ผลการวิจัย

การพัฒนาเครื่องหมาย ILP จะออกแบบคู่ไพรเมอร์ให้อยู่บนบริเวณของเอกซอนที่ครอบคลุมส่วนของอินทรอนอย่างน้อยหนึ่งอินทรอน ซึ่งอาจมีหรือไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ SSR (simple sequence repeat) อยู่ก็ได้ การเกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณอินทรอนนี้จะมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตน้อยกว่าการเกิดที่บริเวณเอกซอน [15] เนื่องจากเป็นบริเวณที่ไม่มีรหัสพันธุกรรมอยู่ ดังนั้นจึงเป็นบริเวณที่มีโอกาสพบโพลิมอร์ฟิซึมได้มากกว่าเอกซอนซึ่งมีรหัสพันธุกรรม ทั้งนี้ประสิทธิภาพของการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมที่สามารถตรวจได้จะขึ้นกับขนาดของอินทรอน โดยอินทรอนที่มีขนาดใหญ่ มักจะมีโพลิมอร์ฟิซึมของความยาวในระดับต่ำ [16, 17] กว่าอินทรอนที่มีขนาดสั้นซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยซึ่งพบค่าสหสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญ ($r = -0.37$; $p < 0.05$) ระหว่างขนาดของอินทรอน และการเกิดโพลิมอร์ฟิซึม เหตุผลหนึ่งอาจเป็นเพราะประสิทธิภาพของ polyacrylamide gel ในการแยก

ความแตกต่างขนาดขั้นดีเอ็นเอเองมีประสิทธิภาพการแยกขนาดลดลงเมื่อขั้นดีเอ็นเอที่วิเคราะห์มีขนาดใหญ่ขึ้น ดังนั้นในการพัฒนาเครื่องหมายจึงอาจไม่สามารถพัฒนาเครื่องหมายได้ในทุกอินทรอน โดยในการวิจัยนี้สามารถพัฒนาได้ 38 อินทรอน จากจำนวนอินทรอนทั้งหมด 47 อินทรอน

งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากกลุ่มยีน MADS box ของปาล์มน้ำมัน และสามารถนำเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาได้มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของปาล์มน้ำมัน และศึกษาศักยภาพของการนำเครื่องหมาย ILP ไปสร้างแผนที่พันธุกรรมประสิทธิภาพของเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาได้ในการวิจัยนี้เมื่อนำไปทดสอบกับปาล์มน้ำมันจำนวน 41 ตัวอย่าง ที่ได้จากศูนย์วิจัยปาล์มจังหวัดสุราษฎร์ธานี ซึ่งเป็นตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่เป็นสมาชิกส่วนหนึ่งของการศึกษาเครื่องหมาย EST-SSR ของขวัญใจ (48 พันธุ์) [18] เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกันพบว่าเครื่องหมาย ILP มีความสามารถในการแสดงโพลิมอร์ฟิซึมน้อยกว่าเครื่องหมาย EST-SSR (82.2 %) และมีค่า PIC เฉลี่ยน้อยกว่า (0.34) โดยเครื่องหมายทั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพต่ำกว่าเครื่องหมาย gSSR (genomic SSR) (PIC เฉลี่ย 0.52) ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเครื่องหมาย EST-SSR กับ conserved-intron scanning primers (CISP หรือ ILP) ในพืชตระกูลหญ้า [19] และการเปรียบเทียบระหว่างเครื่องหมาย gSSR และ ILP ในข้าว [20] ซึ่งพบว่าเครื่องหมาย ILP นั้นให้โพลิมอร์ฟิซึมจำนวนน้อยกว่า เมื่อเทียบกับเครื่องหมาย EST-SSR นอกจากนี้ในการวิจัยนี้จะใช้จำนวนตัวอย่างเพื่อการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมายน้อยกว่าการวิจัยของขวัญใจ [18] จึงอาจทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยกว่าและมีผลทำให้ค่า PIC น้อยกว่าด้วย



รูปที่ 1 เดนโดแกรมที่วิเคราะห์จากเครื่องหมาย ILP 25 เครื่องหมาย ในตัวอย่างปาล์มน้ำมันจำนวน 41 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย EST-SSR จะตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมอันเนื่องมาจากความแตกต่างของจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ SSR และ/หรือ โพลิมอร์ฟิซึมจากการเพิ่ม/ขาดหาย (indel) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏภายในเอกซอนของยีน [21] ส่วนเครื่องหมาย ILP จะตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมจากการเพิ่ม/ขาดหาย ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในอินทรอนซึ่งอาจมีหรือไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ SSR อยู่ก็ได้ ดังนั้น EST-SSR จึงมีโอกาสเกิดโพลิมอร์ฟิซึมมากกว่า ILP อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาโอกาสของการพัฒนาเครื่องหมายไมเลกุล

จากยีน เครื่องหมาย ILP มีโอกาสของการพัฒนาเป็นเครื่องหมายยีนได้มากกว่าเนื่องจากสามารถพัฒนาจากยีนใดก็ได้ เพียงแค่มีข้อมูล EST และลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันหรือจากสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน เช่นในการวิจัยนี้สามารถพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากยีนทุกยีนของ MADS box ของปาล์มน้ำมันที่มีรายงาน ขณะที่เครื่องหมาย EST-SSR จะพัฒนาได้เฉพาะกับยีนที่ SSR ปรากฏภายในยีนเท่านั้น ซึ่งไม่พบ SSR ภายในยีน MADS box เหล่านี้เลย

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมาย ILP กับการวิจัยอื่น เช่น งานวิจัยของ Li และคณะ [22] ซึ่งเป็นการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในยางพารา พันธุ์ปรับปรุงแล้ว 39 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 50 คู่ไพรเมอร์ พบว่าให้โพลิมอร์ฟิซึมจำนวน 31 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 62.0 % และมีค่า PIC เฉลี่ย 0.22 งานวิจัยของ Li และคณะ [22] พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การพบโพลิมอร์ฟิซึมใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ และมีค่า PIC เฉลี่ยใกล้เคียงกันมาก แต่เมื่อเปรียบเทียบเครื่องหมาย ILP ในสับดำ 59 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจากประเทศต่าง ๆ โดย Saisug และ Ukoskit [6] มีค่า PIC เฉลี่ย 0.35 ซึ่งมากกว่าการวิจัยนี้ ดังนั้น ประสิทธิภาพของ เครื่องหมาย ILP อาจแสดงผลที่แตกต่างกันได้ ขึ้นกับจำนวนตัวอย่าง แหล่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์พืชที่ใช้ในการทดสอบ

การใช้เครื่องหมาย ILP ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน พบว่าการจัดกลุ่มพันธุ์ปาล์มน้ำมันนั้นมีความสอดคล้องกับแหล่งที่มาของพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบการจัดกลุ่มกับการวิจัยของขวัญใจ [18] โดยใช้เครื่องหมาย EST-SSR พบว่า ผลการจัดกลุ่มมีความคล้ายคลึงกัน แต่การจัดกลุ่มพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมาย ILP มีความสอดคล้องกับแหล่งที่มาของพันธุ์มากกว่าการจัดกลุ่มพันธุ์ปาล์มด้วยเครื่องหมาย EST-SSR ผลการวิจัยนี้คล้ายกับการวิจัยของ Ming และคณะ [22] ที่พบว่าเครื่องหมาย ILP แสดงการแบ่งกลุ่มข้าวได้สอดคล้องกับชนิดพันธุ์ข้าวได้ดีกว่าเครื่องหมาย SSR สำหรับพันธุ์ปาล์มน้ำมันบางที่การจัดกลุ่มไม่สอดคล้องชัดเจนกับแหล่งที่มาและไม่ใช่อปาล์มลูกผสม อาจเป็นไปได้ว่าปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้าม และพันธุ์ปาล์มที่มีการนำเข้ามาจากแหล่งอื่นอาจผ่านกระบวนการผสมข้ามพันธุ์จากแหล่งพันธุ์มาก่อนหน้าแล้ว จึงทำให้มีเชื้อพันธุกรรมจากแหล่งอื่นมาปะปนด้วย

การสร้างแผนที่พันธุกรรมเป็นงานที่สำคัญสำหรับการวิเคราะห์หาพื้นที่ควบคุมลักษณะปริมาณ ในงานวิจัยนี้พบเครื่องหมาย ILP 6 เครื่องหมาย คือ SQUA3-1, AGL2-4-2, AGL2-2-1, GLO1-4, GLO2-4 และ AGL2-2-3 ของ MADS box มีโพลิมอร์ฟิซึม และมีการกระจายตัวสอดคล้องตามกฎของเมนเดล ดังนั้น จึงมีศักยภาพที่จะนำไปสร้างแผนที่พันธุกรรมได้ โดยนำไปสร้างแผนที่ร่วมกับแผนที่พันธุกรรมที่เคยสร้างไว้ก่อนนี้ [9] ซึ่งใช้ลูกผสมประชากรเดียวกัน ดังนั้น เครื่องหมาย ILP ในแผนที่พันธุกรรมที่พัฒนาจากยีน MADS box ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นดอกตัวผู้และตัวเมียของปาล์มน้ำมัน อาจมีศักยภาพในการมีความสัมพันธ์เมื่อนำไปวิเคราะห์ QTL กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต เช่น อัตราส่วนเพศ และ น้ำหนักทลาย

5. สรุป

การพัฒนาเครื่องหมาย ILP เป็นเทคนิคที่ยังยากในการพัฒนาเครื่องหมายอื่น สามารถพัฒนาได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ EST และจีโนม ทั้งจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันหรือสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน ประสิทธิภาพของเครื่องหมาย ILP อาจมีค่า PIC ใกล้เคียงหรือน้อยกว่าเครื่องหมายอื่นอื่น เช่น EST-SSR แต่สามารถพัฒนาจากยีนใดก็ได้ ในการวิจัยนี้เครื่องหมาย ILP สามารถพัฒนาได้จากยีนทุกยีนใน MADS box และสามารถนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเครื่องหมาย ILP 6 ยีน ของ MADS box มีศักยภาพที่จะนำไปสร้างแผนที่พันธุกรรมได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการวิเคราะห์ QTL ที่สัมพันธ์กับผลผลิต

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่สนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

7. รายการอ้างอิง

- [1] อาริยา จุดคง, 2554, ปาล์มน้ำมัน วิฤติหรือโอกาส, จดหมายข่าวผลิใบ 14: 12-15.
- [2] Corley, R.H.V., Tinker P.B., 2003, The oil palm, 4th Ed., Wiley-Blackwell, Oxford, 592 p.
- [3] Corley, R.H.V., 1977, Oil Palm Yield Components and Yield Cycles, pp. 116-129, In Earp, D.A., Newall W. (Eds.), International Developments in Oil Palm, Incorporated Society of Planters, Kuala Lumpur.
- [4] Mason, T.G. and Lewin, C.J., 1925, Growth and correlation in the oil-palm (*Elaeis guineensis*), Ann. of App. Bio. 12 (4): 410-421.
- [5] Hui, W., Yan, F. and Rajeev, A., 2005, Intron-flanking EST-PCR markers: From genetic marker development to gene structure analysis in Rhododendron, Theor. Appl. Genet. 111: 1347-1356.
- [6] SaiSug, W. and Ukoskit, K., 2013, Comparative analysis of EST-derived markers for allelic variation in *Jatropha curcas* L. and cross transferability among economically important species of Euphorbiaceae, Genes Genom, 35: 1-12.
- [7] Côte-Real, H.B.S.M., Dixon, D.R. and Holland, P.W.H., 1994, Intron targeted PCR: A new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve populations, Marine Biol. 120: 407-413.
- [8] Adam, H., Jouannic, S., Morcillo, F., Verdeil, J.L., Duval, Y. and Tregear, J.W., 2007, Determination of Flower Structure in *Elaeis guineensis*: Do Palms Use the Same Homeotic Genes as other Species?, Ann. Bot. 100: 1-12.
- [9] Ukoskit, K., Chanroj, V., Bhusudswang, G., Pipatchartlearnwong, K., Tangphatsornruang, S. and Tragoonrung, S., 2014, Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) linkage map, and quantitative trait locus analysis for sex ratio and related traits, Mol. Breed. 33: 415-424.
- [10] Brendel, V., Xing, L. and Zhu, W., 2004, Gene structure prediction from consensus spliced alignment of multiple ESTs matching the same genomic locus, Bioinformatics 20: 1157-1169.
- [11] Rozen, S and Skaletsky, H., 2000, Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers, In Krawetz, S. and Misener, S. (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, New Jersey, 365-386 p.
- [12] Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, T. and Mergeai, G., 2006, Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in

- polyacrylamide gels, Biol. Agron. Soc. Env. 10: 77-81.
- [13] Nei, M. and Li, W.H., 1979, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 5269-5273.
- [14] Rohlf, F.J., 1998, NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02, Exeter Software, Setauket, New York.
- [15] Lessa, E.P., 1992, Rapid survey of DNA sequence variation in natural populations, Mol. Biol. Evol. 9: 323-330.
- [16] Comeron, J.M. and Kreitman, M., 2000, The correlation between intron length and recombination in drosophila: Dynamic equilibrium between mutational and selective forces, Genetics 156: 1175-1190.
- [17] Lynch, M., 2002, Intron evolution as a population-genetic process, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 99: 6118-6123.
- [18] ขวัญใจ พิพัฒน์เจริญวงศ์, 2553, การพัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR ของปาล์มน้ำมันจากเหมือนข้อมูล ESTs, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี, 114 น.
- [19] Zeid, M., Yu, J.K., Goldowitz, I., Denton, M.E., Costich, D.E., Jayasuriya, C.T., Saha, M., Elshire, R., Benscher, D. and Breseghello, F., 2010, Cross-amplification of EST-derived makers among 16 grass species, F. Crops Res. 118: 28-35.
- [20] Wang, X., Zhao, X., Zhu, J. and Wu, W., 2006, Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.), DNA Res 12: 417-427.
- [21] Varshney, R., Graner, A. and Sorrells, M., 2005, Genetic microsatellite markers in plants: Features and applications, Trends Biotechnol. 23: 48-55.
- [22] Li, D., Xia, Z., Deng, Z., Liu, X., Dong, J. and Feng, F., 2012, Development and characterization of intron-flanking EST-PCR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), Mol. Biotechnol. 51: 148-159.
- [23] Ming, H., Fang-min, X., Li-yun, C., Xiang-qian, Z., Jojee, L. and Madonna, D., 2010, Comparative analysis of genetic diversity and structure in rice using ILP and SSR markers, Rice Sci. 17: 257-268.