



การวิเคราะห์ยีนลักษณะปริมาณที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตปาล์มน้ำมันโดยใช้
เครื่องหมาย Intron Length Polymorphism

โดย

นางสาวโสณิชา อุกุมพร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การวิเคราะห์ยีนลักษณะปริมาณที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตปาล์มน้ำมันโดยใช้
เครื่องหมาย Intron Length Polymorphism

โดย

นางสาวโสณิชา อุทุมพร



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์



QTL Analysis for Oil Palm Yield using Intron Length Polymorphism

BY

Miss Sonicha U-thoomporn



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2016
COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวโสณิชา อุทุมพร

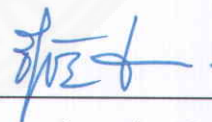
เรื่อง

การวิเคราะห์ยีนลักษณะปริมาณที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมาย Intron Length Polymorphism

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

เมื่อ วันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2559

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(รองศาสตราจารย์ ดร. อีระชัย ธนานันต์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์



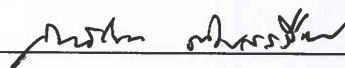
(รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



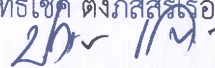
(อาจารย์ ดร. ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ดร. สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง)

คณบดี



(รองศาสตราจารย์ ปกรณ์ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ยีนลักษณะปริมาณที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต ปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมาย Intron Length Polymorphism
ชื่อผู้เขียน	นางสาวโสณิชา อุทุมพร
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ
ปีการศึกษา	2559

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันมีความต้องการใช้น้ำมันจากพืชในปริมาณที่สูงมากขึ้น ดังนั้นปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) จึงเป็นพืชที่สำคัญอย่างมากทางเศรษฐกิจ เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่สามารถให้น้ำมันในปริมาณที่มากเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่สามารถให้น้ำมันชนิดอื่นๆ ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่น่าคิดว่าส่งผลต่อปริมาณน้ำมันที่ได้จากปาล์มน้ำมันคือการพัฒนาเป็นช่อดอกที่สมบูรณ์และการกำหนดการพัฒนาเป็นดอกเพศผู้หรือดอกเพศเมีย ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สำคัญดังกล่าวคือ ยีนกำหนดเพศและยีน MADs box สำหรับในงานวิจัยนี้จะทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ILP (Intron Length Polymorphism) จากยีนที่ในกลุ่มของ MADs box และยีนกำหนดเพศโดยเปรียบเทียบ 37 และ 13 Expressed Sequence Tags (ESTs) ของยีนใน MADs box และยีนกำหนดเพศกับลำดับเบสจีโนมของปาล์มน้ำมันตามลำดับ ซึ่งจากไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ทั้งหมดจำนวน 139 คู่ไพรเมอร์ เมื่อนำไปตรวจสอบจีโนมไทป์ในตัวอย่างปาล์มน้ำมัน 41 ตัวอย่าง เพื่อใช้ในการประเมินประสิทธิภาพและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าสามารถให้โพลิมอร์ฟิซึมทั้งหมด 74 เครื่องหมาย โดยมีค่าเฉลี่ย polymorphism information content (PIC) และมีค่าเฉลี่ยของจำนวนแอลลีลเท่ากับ 0.34 และ 3.26 ตามลำดับ จากเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปสร้างแผนที่พันธุกรรมของปาล์มน้ำมันลูกผสม 208 ตัวอย่าง ที่สร้างไว้ก่อนหน้านี้ได้จำนวน 13 เครื่องหมาย ที่ออกแบบจากยีน 11 ยีน ซึ่งพบว่าอยู่บนลิงค์เกจที่ 3, 4, 8, 11, 12, และ 16 และจากนั้นนำแผนที่ทางพันธุกรรมที่ได้ไปวิเคราะห์ QTL ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตปาล์มน้ำมัน โดยพบว่าเครื่องหมาย AGL2-2-3 บนลิงค์เกจที่ 3 ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่พัฒนามาจากยีน

MADs box สัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักระบายของปาล์มน้ำมันและพบว่าเครื่องหมายมีอิทธิพลต่อความแปรปรวนพีโนไทป์ 11.6% ดังนั้นเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยสามารถนำไปใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมเพื่อใช้ประโยชน์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ: ปาล์มน้ำมัน, ยีน MADs box, ยีนกำหนดเพศ, เครื่องหมายไอแอลพี, ลักษณะปริมาณ



Thesis Title	QTL Analysis for Oil Palm Yield using Intron Length Polymorphism
Author	Miss Sonicha U-thoomporn
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Major Field/Faculty/University	Department of Biotechnology Faculty of Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Kittipat Ukoskit
Academic Years	2016

ABSTRACT

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) is the most crucial source of vegetable oil and fat, and can produce more quantitative of oil than others oil crop. The important factors of oil palm fruit production are the development of male and female inflorescences and sex determination. MADs box genes and sex determination genes are essential since they are related to development of oil palm inflorescences and sex determination. In this study, 139 Intron Length Polymorphism (ILP) markers were developed by aligning 37 and 13 Expressed Sequence Tags (ESTs) of MADs box and sex determination genes, respectively, with the genomic sequence of oil palm. Of the 139 ILP primers designed to amplify the intronic regions, all primers successfully amplified genomic DNA with expected size products and 74 were polymorphic in 41 oil palm accessions. Polymorphism information content (PIC) and average allele number were 0.34 and 3.26 per locus, respectively. Thirteen polymorphic ILP markers developed from 11 genes were mapped in the existing oil palm linkage maps on LG3, LG4, LG8, LG11, LG12 and LG16, corresponding to the location of the gene in oil palm genome. Subsequently, the extended linkage map was used in QTL (Quantitative trait locus) mapping for traits related to oil palm yield. QTL analysis identified AGL2-2-3 developed a MAS box gene located on LG3 associated with bunch weight. The QTL explained 11.6% of the phenotypic variation. Therefore ILP

markers developed in the present study have been proved to be exploitable for genetic diversity assessment and linkage mapping which could be beneficial for oil palm breeding.

Keywords: oil palm, MADs box genes, sex determination genes, ILP, QTL



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ ด้วยความกรุณาของรองศาสตราจารย์ ดร.กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัยตลอดจนแก้ปัญหาต่างๆ และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระชัย รัตนันต์ อาจารย์ ดร. ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์ และ ดร. สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง ซึ่งได้ให้ข้อชี้แนะและคำปรึกษาต่างๆ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้ดำเนินลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้มอบทุนการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ได้ศึกษาในระดับปริญญาโท

ขอขอบคุณบริษัทโกลด์เด็นเทเนอร์ ผู้เอื้อเฟื้อตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่ใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดการศึกษาที่ผ่านมา รวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน และรุ่นพี่รุ่นน้องในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือและมิตรภาพที่ดี

ขอขอบคุณ คุณสุรียพร พุ่มเอี่ยม ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ คอยให้กำลังใจและดูแลตลอดการทำวิทยานิพนธ์นี้ และขอขอบคุณเพื่อนๆ สำหรับกำลังใจในการทำงาน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ คุณพ่อและครอบครัว ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนผู้วิจัยมาโดยตลอด

นางสาวโสณิชา อุทุมพร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.3 สถานที่ทำการวิจัย	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ปาล์มน้ำมัน	4
2.1.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic classification)	4
2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	5
2.1.2.1 ราก (Roots)	5
2.1.2.2 ลำต้น (Stem)	6
2.1.2.3 ใบ (Leaves)	6
2.1.2.4 ช่อดอก (Inflorescences)	7
2.1.2.5 ผล (Fruits)	8

2.1.2.6 เมล็ด (Seeds)	8
2.1.3 ลักษณะพันธุศาสตร์ของปาล์มน้ำมัน	9
2.1.3.1 ดุรา (Dura)	9
2.1.3.2 พิสิเฟอรา (Pisifera)	10
2.1.3.3 เทเนอรา (Tenera)	10
2.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	11
2.2.1 ยีน MADs box (MADs box genes)	11
2.2.2 ยีนกำหนดเพศ (Sex-determination genes)	22
2.3 การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน	29
2.4 เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic Markers)	30
2.4.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)	30
2.4.2 เครื่องหมายชีวเคมี (Biochemical marker)	31
2.4.3 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker)	32
2.5 เครื่องหมาย Intron Length Polymorphism (ILP) หรือ intron-flanking EST	36
2.6 ลักษณะปริมาณ (Quantitative trait loci; QTLs)	41
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	46
3.1 ปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการทดลอง	46
3.1.1 พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP	46
3.1.2 ปาล์มน้ำมันประชากรลูกผสมที่ใช้ในการทำแผนที่พันธุกรรม และใช้ในการวิเคราะห์ QTLs	48
3.2 การพัฒนาและการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP (Intron length polymorphism)	49
3.2.1 การพัฒนาเครื่องหมาย ILP	49
3.2.2 การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP	50
3.3 การสร้างแผนที่พันธุกรรมเครื่องหมาย ILP	52

3.3.1 การคัดเลือกเครื่องหมาย ILP เพื่อใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม	52
3.3.2 การตั้งชื่อเครื่องหมายโมเลกุล	52
3.3.3 การวิเคราะห์ลิงค์เกจและการเพิ่มเครื่องหมาย ILP ลงในแผนที่พันธุกรรม	53
3.3.4 การวิเคราะห์ QTLs	53
บทที่ 4 ผลการวิจัย	55
4.1 การสืบค้นข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับยีน MADs box และ ยีนกำหนดเพศ	55
4.2 การออกแบบไพรมอร์เพื่อใช้ในการพัฒนาเครื่องหมาย ILP	58
4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย ILP	63
4.4 การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP	63
4.5 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน	67
4.6 การเพิ่มเครื่องหมายลงในแผนที่ทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน	69
4.7 การวิเคราะห์ QTLs ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตปาล์มน้ำมัน	73
4.7.1 การวิเคราะห์ QTLs โดยวิธี Kruskal-Wallis (Single analysis)	73
4.7.2 การวิเคราะห์ QTLs โดยวิธี Interval mapping	74
4.7.3 การวิเคราะห์ QTLs โดยวิธี MQM analysis	75
บทที่ 5 อภิปรายผล	77
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	82
รายการอ้างอิง	83
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	109
ภาคผนวก ข	118
ภาคผนวก ค	121
ภาคผนวก ง	130

ประวัติผู้เขียน

131



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงตัวอย่างปาล์มน้ำมันจำนวน 41 ตัวอย่าง	46
4.1 แสดงรายชื่อ, แหล่งที่มาและขนาดของยีนในกลุ่ม MADs box และยีนกำหนดเพศ	55
4.2 แสดงไพรเมอร์ ILP ที่พัฒนาได้ทั้งหมด 139 คู่	59
4.3 ร้อยละการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมาย ILP ทั้ง 139 คู่ ที่ประเมินได้จากตัวอย่างปาล์มน้ำมัน 43 ตัวอย่าง	63
4.4 แสดงความแปรปรวนของแอลลีลของเครื่องหมาย ILP ที่มีโพลิมอร์ฟิซึม ระหว่างตัวอย่างปาล์มน้ำมัน 41 ตัวอย่าง	64
4.5 แสดงการวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากรลูกผสม F_1 จำนวน 208 ต้น	70
4.6 แสดงผลจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของเครื่องหมายกับจีโนมของปาล์มน้ำมันเพื่อ ตรวจสอบตำแหน่งที่อยู่บนโครโมโซม	72
4.7 ผลการวิเคราะห์ QTLs กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปาล์มน้ำมันโดยใช้วิธี Kruskal–Wallis analysis	74
4.8 ผลการวิเคราะห์ QTLs กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปาล์มน้ำมันโดยใช้วิธี Interval mapping	74
4.9 ผลการวิเคราะห์ QTLs กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปาล์มน้ำมันโดยใช้วิธี MQM analysis และค่า LOD score ที่ได้จากการวิเคราะห์ Permutation test	75

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะส่วนประกอบของปาล์มน้ำมัน (<i>E. guineensis</i> Jacq.)	5
2.2 แสดงถึงช่อดอกเพศผู้และช่อดอกเพศเมียของปาล์มน้ำมัน	7
2.3 พันธุ์ดูราของปาล์มน้ำมัน	9
2.4 พันธุ์พิลีเฟอราของปาล์มน้ำมัน	10
2.5 พันธุ์เทอเนอราของปาล์มน้ำมัน	11
2.6 แสดงการแสดงออกของยีน <i>OsMADS29</i> ที่มีผลต่อลักษณะของเมล็ดข้าว	16
2.7 แสดงหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาโครงสร้างดอกซึ่งอยู่ในกลุ่มของ ABCDE model	19
2.8 แสดงลักษณะดอกปาล์มที่เป็นแมนเทิล (mantled)	21
2.9 แสดงการทำงานของยีน <i>lds</i> ซึ่งขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีน <i>Ts4</i>	25
2.10 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการกำหนดเพศของช่อดอกในปาล์มน้ำมัน	26
2.11 การทำงานของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศในข้าวโพด	28
2.12 แสดงการเปรียบเทียบจีโนม เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ILP	38
4.1 แสดงเดนโดแกรม (dendrogram) ที่วิเคราะห์จากเครื่องหมาย ILP 74 เครื่องหมาย ด้วยวิธี unweight pair-group method with arithmetic means (UPGMA) ในตัวอย่างปาล์มน้ำมันจำนวน 43 ตัวอย่าง	68
4.2 แสดงตำแหน่งของทั้ง 13 เครื่องหมาย เมื่อนำไปสร้างแผนที่พันธุกรรมร่วมกับแผนที่พันธุกรรมของ Ukoskit et al. (2014)	71
4.3 แสดงค่า LOD เครื่องหมาย AGL2-2-3 ที่อยู่บนลิงค์เกจที่ 3 จากการวิเคราะห์ MQM analysis	76

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่มีศักยภาพในการแข่งขันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น ทั้งด้านการผลิตและการตลาด เนื่องจากเป็นพืชที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงที่สุดทำให้มีต้นทุนการผลิตและราคาต่ำกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น นอกจากนี้ น้ำมันปาล์มยังเป็นน้ำมันพืชที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย ทั้งในสินค้าอุปโภคและบริโภค รวมทั้งในด้านพลังงานทดแทน ทำให้มีความต้องการใช้น้ำมันอุปโภคและบริโภคทั้งในด้านอาหารและพลังงานเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งพบว่าความต้องการใช้น้ำมันปาล์มโลกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในอัตราเฉลี่ย 0.13 ต่อปี (อาริยา, 2554) ดังนั้นส่วนแบ่งการผลิตน้ำมันปาล์มต่อน้ำมันพืชทั้งโลกจึงมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วจนเป็นอันดับ 1 ของโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 เป็นต้นมา โดยในปี พ.ศ. 2551 มีผลผลิตน้ำมันปาล์มทั้งโลก 43.12 ล้านตัน ประเทศในกลุ่มสมาชิกอาเซียนที่เป็นผู้ผลิตสำคัญคือ อินโดนีเซียและมาเลเซีย โดยทั้ง 2 ประเทศผลิตน้ำมันปาล์มรวมกันเท่ากับ 86% ของผลผลิตโลก อีกทั้งยังเป็นประเทศผู้นำในการส่งออกน้ำมันปาล์มในตลาดโลกโดยส่งออกรวมกันเท่ากับ 89% ของปริมาณส่งออกโลก คือ 33.62 ล้านตัน (ธีระ, 2558) สำหรับในไทยนั้น ในปี พ.ศ. 2551 ไทยผลิตน้ำมันปาล์มดิบได้รวม 1.45 ล้านตัน ในจำนวนนี้ประมาณ 60% เป็นวัตถุดิบเข้าโรงงานกลั่นน้ำมันเพื่อผลิตเป็นน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ได้ประมาณ 0.90 ล้านตัน โดยนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 เป็นต้นมา ไทยเริ่มมีการส่งออกน้ำมันปาล์มดิบออกต่างประเทศ และไม่มี การนำเข้าน้ำมันปาล์มจากต่างประเทศเลย ยกเว้นในปี พ.ศ. 2554 มีการนำเข้าน้ำมันปาล์มแยกไขจากประเทศมาเลเซียในเดือนมกราคม จำนวน 30,000 ตัน และกุมภาพันธ์จำนวน 30,000 ตัน ทั้งนี้เนื่องจากเกิดภาวะขาดแคลนน้ำมันปาล์มบริโภคภายในประเทศอย่างรุนแรง (ธีระ, 2558)

เนื่องจากในปัจจุบันนี้ความต้องการผลผลิตน้ำมันจากปาล์มน้ำมันมีสูงมากขึ้นทั้งในด้านการบริโภคและพลังงานทดแทนซึ่งปาล์มน้ำมันสามารถนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลได้อย่างมีประสิทธิภาพเพราะให้พลังงานที่มีศักยภาพสูงไม่แตกต่างจากน้ำมันปิโตรเลียมมากนัก ก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่า มีราคาถูกกว่าน้ำมันปิโตรเลียม จึงต้องมีการปลูกต้นปาล์มน้ำมันมากขึ้นเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภคและบริโภคที่เพิ่มขึ้น (ประเสริฐ, 2550) ดังนั้นพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ที่เกษตรกรเลือกนำมาปลูกต้องเป็นพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ดีจึงจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพและลดต้นทุนในการผลิตตลอดอายุการเก็บเกี่ยวของปาล์มน้ำมันได้

ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี หมายถึง พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ผ่านกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตทะลายและผลผลิตน้ำมัน/หน่วยระยะเวลาสูง และสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในแหล่งปลูกได้ดี รวมทั้งมีลักษณะทางการเกษตรอื่นๆ ที่เหมาะสม เช่น มีการเจริญเติบโตด้านความสูงช้า ความยาวใบไม่สั้นหรือยาวเกินไป ลำต้นอวบสมบูรณ์ จำนวนดอกเพศเมีย ความหนาของกะลา ความสมบูรณ์ของการพัฒนาดอกเพศผู้และเพศเมีย เป็นต้น (ธีระ, 2558) โดยเพื่อให้ได้พันธุ์ปาล์มที่ดีจึงมีการคัดเลือกพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์มให้มีลักษณะที่ดีตามต้องการ โดยพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่นิยมปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันจัดเป็นพันธุ์ลูกผสมแบบเทเนอรา ที่ต้องผ่านกระบวนการปรับปรุงพันธุ์แล้ว ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชผสมข้ามเช่นเดียวกับข้าวโพด ดังนั้นวิธีการต่างๆ ในการปรับปรุงพันธุ์ของข้าวโพดจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับปาล์มน้ำมันได้ เช่น การคัดเลือกแบบวงจร (recurrent selection, RS) และการผสมทดสอบ เป็นต้น แต่เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้นและมีลักษณะหลายประการคล้ายคลึงกับการปรับปรุงพันธุ์สัตว์เกี่ยวกับเทคนิคในการคัดเลือก เช่น ความสำคัญของการทดสอบพ่อพันธุ์ในสัตว์เปรียบเทียบได้กับการทดสอบพ่อพันธุ์พิลีเฟอราของปาล์มน้ำมัน การคัดเลือกที่ต้องอาศัยหลายลักษณะร่วมกันหรือดัชนีการคัดเลือก (selection index) และการใช้ระยะเวลายาวนานในการปรับปรุงพันธุ์ในแต่ละรอบ (cycle) เพื่อการผลิตพันธุ์ลูกผสม ดังนั้นการคัดเลือกพันธุ์ปาล์มน้ำมันจึงมีการผสมผสานวิธีการทั้งที่ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดและการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ไว้ด้วยกัน (Soh and Chow, 1993; Soh, 1994; Soh et al., 2003)

จากการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันนั้นมีความสำคัญอย่างมากเพื่อให้ได้พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ดีตามต้องการแต่ข้อเสียที่เป็นปัญหาสำคัญที่สุดสำหรับกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ก็คือ ระยะเวลาในการดำเนินงาน โดยในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์จนได้พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะที่ดีจะต้องใช้เวลาค่อนข้างมา ซึ่งสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันนั้นจะใช้เวลาโดยประมาณ 25 ปีขึ้นไป จึงมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือก (Marker-assisted selection) เพื่อใช้ในการช่วยคัดเลือกปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะที่ดีที่ต้องการซึ่งจะสามารถช่วยลดระยะเวลาในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาเครื่องหมายยีนชนิด Intron Length Polymorphism (ILP) จากยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของดอกปาล์มน้ำมัน (MADs box genes) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของดอกและยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศของดอกในปาล์มน้ำมัน ภายใต้สมมุติฐานว่ายีนทั้งสองกลุ่มเป็นยีนที่สำคัญต่อผลผลิตของปาล์มน้ำมัน เครื่องหมาย ILP ที่

พัฒนาได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมาย และนำไปสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ QTL ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะผลิตปาล์มน้ำมัน โดยเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะผลิตจากการวิเคราะห์ QTL จะสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้

1.2 วัตถุประสงค์

- (1) เพื่อพัฒนาเครื่องหมาย ILP ของยีนที่ใช้ในการสร้างหรือกำหนดเพศของดอกในปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis*)
- (2) เพื่อนำเครื่องหมาย ILP ไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis*)
- (3) เพื่อสร้างแผนที่พันธุกรรมเครื่องหมาย ILP
- (4) เพื่อใช้เครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาได้ในการวิเคราะห์ลักษณะ QTL ที่เกี่ยวข้องกับผลิตปาล์มน้ำมัน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- (1) สามารถนำเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาได้มาใช้ช่วยคัดเลือกปาล์มน้ำมันที่มีอัตราส่วนเพศสูงและดอกปาล์มน้ำมันที่สมบูรณ์
- (2) ทำให้ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

1.4 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการจีโนมพืช 403-6 อาคารบรรยายรวม 5 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต และ ห้างหุ้นส่วนจำกัด โกลด์เด็นเทเนอร์ฯ เลขที่12/9 ถ.หน้าพลับพลา ต.กระเปาะใหญ่ อ.เมือง จ.กระบี่ 81000

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปาล์มน้ำมัน

2.1.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic classification)

Class: Angiospermae

Subclass: Monocotyledon

Order: Palmales

Family: Arecaceae

Sub-family: Arecoideae

Genus: *Elaeis*

Species: *guineensis*

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Elaeis guineensis*

ชื่อสามัญ: African oil palm หรือ Macaw fat

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocot) ซึ่งมีดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่แยกดอกแต่อยู่ภายในต้นเดียวกัน (monoecious) (Lee et al., 2015) โดยพืชในสกุล *Elaeis* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 สปีชีส์ คือ

1. *Elaeis guineensis* Jacq. ปาล์มน้ำมันในกลุ่มนี้มีชื่อสามัญว่า African oil palm โดยชื่อสามัญที่ถูกตั้งขึ้นเนื่องจากพบว่ามีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกาตอนกลางและตะวันตก (Jin et al., 2016) ในปัจจุบันนี้เป็นพันธุ์ที่ใช้ปลูกเพื่อการค้า คำว่า *Elaeis* มีความหมายตรงกับคำ *elaion* ซึ่งแปลว่า น้ำมัน ส่วนคำว่า *guineensis* มีความหมายว่า แหล่งรวบรวมอยู่ที่ประเทศ Guinea แอฟริกาตะวันตก ลักษณะของปาล์มน้ำมัน *E. guineensis* ที่สำคัญคือ ให้ผลผลิตทะลายสูง มีน้ำหนักผล เปลือกนอกต่อผลและผลผลิตน้ำมันสูง (เอกชัย, 2548)

2. *Elaeis oleifera* (American oil palm) เดิมเรียก *E. melanococca* หรือ Corozo ซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ทางภาคเหนือของกลุ่มน้ำอะเมซอนในอเมริกาใต้ยาวติดต่อไปถึงอเมริกากลางและคอซตาริกา โดยจะมีลักษณะต้นเตี้ยและต้านทานต่อโรคตาเน่า (Lethal bud rot) เเปอร์เซ็นต์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (unsaturated fatty acid) ค่าไอโอดีนสูง (iodine value) ประมาณ

77-78% (Singh et al., 2013) รวมทั้งมีวิตามินเอและวิตามินอีสูง แต่ไม่นิยมปลูกเป็นการค้า เนื่องจากมีการเจริญเติบโตช้า ผลขนาดเล็ก และให้ปริมาณน้ำมันต่ำกว่าปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis*) อย่างไรก็ตามได้มีการอาศัยลักษณะดีบางประการในกลุ่ม เพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ซึ่งพบว่าพวกนี้สามารถผสมข้าม *E. guineensis* ได้และให้เมล็ดที่ไม่เป็นหมัน (เอกชัย, 2548)



ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะส่วนประกอบของปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis* Jacq.) จาก www.wikipedia.com

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

2.1.2.1 ราก (Roots)

ปาล์มน้ำมันมีระบบรากเป็นรากฝอย รากของปาล์มแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ รากอ่อนจะงอกออกมาเป็นรากแรกหลังจากการงอกของเมล็ดปาล์ม เรียกรากนี้ว่า Radicle เมื่อต้นกล้าอายุได้ประมาณ 2 - 4 เดือนรากอ่อนจะหยุดเจริญเติบโตและหายไป และรากที่เกิดขึ้นทดแทนหลังจากรากชุดแรก โดยมีลักษณะเป็นรากที่เกิดจากฐานของลำต้นรูปกรวยเรียกรากนี้ว่า ระบบรากฝอย ระบบรากฝอยประกอบด้วยรากทั้งหมด 4 ชุด คือ 1) รากชุดแรก (Primary roots) เป็นรากที่เกิดจากลำต้นรูปกรวยมีการเจริญเติบโต 2 ลักษณะคือ แนวตั้งและแนวระดับ บริเวณส่วนกลางของรากจะทำหน้าที่ดูดน้ำและแร่ธาตุ (Lambourne, 1935) และยังทำหน้าที่ช่วยลำต้นด้วย 2) รากชุดที่สอง (Secondary roots) เป็นรากที่เกิดจากรากแรกและจะเกิดจากในแนวระดับมากกว่าราก

แรกในแนวตั้ง 3) รากชุดที่สาม (Tertiary roots) โดยจะเป็นรากที่เกิดจากรากที่สอง และ 4) รากชุดที่สี่ (quaternary roots) เป็นรากที่อาจพบหรือไม่พบในปาล์มน้ำมันได้ ถ้ามีการเจริญหรือพัฒนาจะพัฒนามาจากรากชุดที่สาม (ธีระ, 2558)

2.1.2.2 ลำต้น (Stem)

ลำต้นมีลักษณะตั้งตรง ในระยะแรกของการพัฒนา ฐานของลำต้นมีรูปร่างแบบกรวยหัวกลับ (inverted cone) และมีการสร้างรากชุดแรกจากฐานของลำต้นทั้งใต้พื้นดินและเหนือพื้นดินเล็กน้อย ลำต้นจะมีฐานใบติดอยู่ รอยแผลที่ฐานใบติดกับลำต้นคือ ข้อของลำต้น และส่วนที่อยู่ระหว่างข้อคือ ปล้องของลำต้น ลำต้นปาล์มน้ำมันมีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (apical meristem) เช่นเดียวกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วไป แต่ไม่มีเนื้อเยื่อเจริญทางด้านข้าง (lateral meristem) หน้าทีของลำต้นคือ ชูใบรับแสงเพื่อสังเคราะห์อาหาร ลำเลียงน้ำและอาหารผ่านกลุ่มมัดท่อน้ำและท่ออาหารภายในลำต้น ระบบเนื้อเยื่อลำเลียงประกอบด้วยกลุ่มมัดท่อน้ำและท่ออาหารจำนวน 20,000 หน่วย เป็นเนื้อเยื่อที่มีชีวิตได้แก่ โพลเอม (phloem) ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายอาหารจากด้านบนลงด้านล่าง ส่วนระบบเนื้อเยื่อลำเลียงภายนอกประกอบด้วยเส้นใยที่ไม่มีชีวิตจำนวนมากทำหน้าที่เคลื่อนย้ายน้ำและแร่ธาตุจากรากขึ้นด้านบน (วิภาวี, 2553) โดยทั่วไปลำต้นมีความสูงเพิ่มขึ้นประมาณ 35 - 60 เซนติเมตร ต่อปี ขึ้นกับสภาพแวดล้อมและพันธุกรรม ปาล์มน้ำมันมีความสูงได้มากกว่า 30 เมตร และมีอายุยืนนาน มากกว่า 100 ปี แต่การปลูกปาล์มน้ำมันเป็นการค้า ไม่ควรมีความสูงเกิน 15 - 18 เมตร หรือ อายุประมาณ 25 ปี (Lee et al., 2015)

2.1.2.3 ใบ (Leaves)

ใบของปาล์มน้ำมันเป็นใบประกอบซึ่งมีลักษณะคล้ายรูปขนนก (pinnate) ประกอบด้วยแกน ทางใบ ก้านใบ และใบย่อย ซึ่งเกิดจากการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของลำต้นซึ่งมีความสามารถในการที่จะผลิตใบได้มากกว่า 50 ใบ ระยะแรกในการพัฒนาใบจะใช้เวลานานค่อนข้างมากซึ่งแต่ละใบอาจใช้ระยะเวลาถึง 2 ปี ทางใบ (rachis) ของปาล์มน้ำมันประกอบด้วยเส้นใยที่แข็งแรงจำนวนมากมีความยาวถึง 8 เมตร โดยด้านข้างของทางใบทั้งสองด้านเป็นที่ตั้งของใบประกอบย่อยในตำแหน่งที่ตรงข้ามกันบนทางใบ สำหรับก้านใบก้านใบ (petiole) มีลักษณะสั้นกว่าทางใบแต่มีขนาดใหญ่กว่า และใบย่อย (leaflets) เกิดจากการแตกของใบที่ติดกันในระหว่างการยึดตัวของแกนใบของยอดตรงตำแหน่งหน้าด้านข้างของทางใบ โดยจะมีจำนวนใบอยู่ในช่วง 150-250 คู่ ในแต่ละปีนั้นจำนวนใบของปาล์มน้ำมันอยู่ระหว่าง 30-40 ใบ เมื่อทางใบมีอายุ 5-6 ปี หลังจากนั้นจะลดลงเป็น 20-25 ใบ แต่สำหรับทางใบของปาล์มน้ำมันจะติดอยู่กับลำต้นเป็นเวลานานโดยบางครั้งพบว่าติดอยู่กับลำต้นเป็นเวลาถึง 20 ปี และไม่หลุดออกจากลำต้น (Corley and Tinker, 2008)

2.1.2.4 ช่อดอก (Inflorescences)

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้ามดอกเนื่องจากช่อดอกเพศผู้และดอกเพศเมียของปาล์มน้ำมันอยู่แยกช่อดอกแต่อยู่ภายในต้นเดียวกัน (monoecious) ช่อดอกพัฒนาจากตาบริเวณซอกของทางใบซึ่งมีโอกาสพัฒนาไปเป็นช่อดอกเพศผู้หรือช่อดอกเพศเมียก็ได้ (Beirnaert, 1935) ซึ่งการเลือกเพศนั้นจะต้องมีการกำจัดและพัฒนาอวัยวะบางส่วน ซึ่งการพัฒนาเพศเมียในช่อดอกเพศผู้จะใช้กระบวนการแท้ง ในขณะที่การพัฒนาเกสรเพศผู้ก็จะมีการพัฒนาต่อเพื่อให้สมบูรณ์ ในช่อดอกเพศเมียนั้นเกสรเพศผู้จะเกิดการแท้งขณะที่เกสรเพศเมียจะมีการพัฒนาต่อจนสมบูรณ์ แต่ในบางครั้งพบว่ามีการพัฒนาเป็นช่อดอกกะเทยซึ่งมีทั้งดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่รวมกัน (hermaphrodite) (Wu et al., 2007) ซึ่งการพัฒนาเป็นเพศผู้หรือเพศเมียของตาดอก (sex differentiation) จะเกิดขึ้นในช่วง 20 เดือนก่อนดอกบาน (Durand-Gasselín et al., 1999) โดยช่อดอกจะมีโอกาสพัฒนาเป็นช่อดอกเพศเมียมากกว่าพัฒนาเป็นช่อดอกเพศผู้หากต้นปาล์มอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ช่อดอกของปาล์มน้ำมันแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

ช่อดอกตัวเมีย (female inflorescences) มีลักษณะเป็นแบบ spike ที่มีความยาวประมาณ 24-45 เซนติเมตร และประกอบด้วยช่อดอกย่อยที่บริเวณโคนช่อดอกมีปริมาณหนาแน่นมากกว่าบริเวณปลาย จำนวน 12-30 ช่อดอกย่อย ส่วนในช่อดอกย่อยจะประกอบด้วยดอกตัวเมียประมาณ 1,000 ดอก และสำหรับปาล์มน้ำมันที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ช่อดอกเพศเมียจะมีช่อดอกย่อยประมาณ 110 ช่อ และมีดอกเพศเมียประมาณ 4,000 ดอก

ช่อดอกตัวผู้ (male inflorescences) เกิดบนก้านช่อที่ยาวกว่าช่อดอกตัวเมีย ประกอบด้วย ช่อดอกย่อย (spikelet) ที่มีรูปร่างเป็นทรงกระบอกยาวคล้ายนิ้วมือ (finger-like cylindrical spikelets) จำนวน 150 ช่อดอกย่อย ซึ่งในแต่ละช่อดอกย่อยมีดอกตัวผู้จำนวน 700-1,200 ดอก และนอกจากนี้ดอกตัวผู้มีขนาดเล็กและสั้นกว่าดอกตัวเมีย



ภาพที่ 2.2 แสดงถึงช่อดอกเพศผู้และช่อดอกเพศเมียของปาล์มน้ำมัน จาก www.thairath.co.th

ช่อดอกผสมหรือช่อดอกกะเทย (mixed or hermaphrodite inflorescence) ช่อดอกประเภทนี้จะเกิดขึ้นในบางโอกาสเท่านั้น ซึ่งพบว่ามักจะเกิดในระยะที่ปาล์มเริ่มผลิตช่อดอกใหม่หรืออายุประมาณ 3-4 ปี โดยช่อดอกประเภทนี้เป็นลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ เพราะจะทำให้ผลผลิตต่ำ ซึ่งจะประกอบด้วยช่อดอกย่อยเพศผู้และช่อดอกย่อยเพศเมียอยู่ในช่อดอก

2.1.2.5 ผล (Fruits)

หลังจากที่ช่อดอกตัวเมียถูกผสมแล้วประมาณ 5 เดือนขึ้นไป ผลปาล์มจะสุกให้ทะลายของผลที่มีรูปร่างคล้ายรูปไข่ ซึ่งการสุกของผลจะเริ่มจากฐานดอกขึ้นมา โดยประกอบด้วยผลชั้นนอกมีรูปร่างและสีหลายแบบส่วนผลชั้นในนั้นมีลักษณะแบนไม่ค่อยมีสีเพราะถูกบีบโดยผลชั้นนอก ผลที่เกิดโดยไม่มีการผสม (perthenocarpic fruits) นั้นจะมีจำนวนน้อยและผลที่ไม่ให้น้ำมัน (unfertilized fruit) มีประมาณ 500-4,000 ผล ผล (fruits) ของปาล์มน้ำมันไม่มีก้าน (sessile drupe) โดยจะมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน คือ ตั้งแต่รูปกลม รูปไข่ถึงยาวรี ความยาวของผล 2-5 เซนติเมตรและมีน้ำหนักผลมีตั้งแต่ 3 กรัม จนถึง ประมาณ 30 กรัม ซึ่งลักษณะของผลประกอบด้วยชั้นต่างๆ ดังนี้ 1. เปลือกผลชั้นนอก (pericarp) สีส้มความแตกต่างกันเนื่องจากรงควัตถุที่สร้างแตกต่างกัน 2. เปลือกผลชั้นกลาง (mesocarp or pulp) ประกอบด้วยเส้นใยที่มีน้ำมันอยู่มาก มีรงควัตถุพวก carotene ทำให้เห็นเป็นสีเหลืองเข้ม ซึ่งน้ำมันปาล์มที่ได้ส่วนใหญ่ได้มาจากการสกัดส่วนนี้ จึงถือว่าเป็นส่วนที่มีความสำคัญอย่างมากต่อผลผลิตน้ำมันจากปาล์มน้ำมัน โดยความหนาของเปลือกผลชั้นกลางจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ปลูกและความอุดมสมบูรณ์ของดิน 3. เปลือกผลชั้นใน (endocarp) เป็นชั้นในสุด มีลักษณะเป็นกะลาแข็ง ประกอบด้วยเซลล์หินจำนวนมาก ปาล์มน้ำมันบางสายพันธุ์อาจไม่มีชั้นนี้ ซึ่งอาจจะส่งผลให้ปาล์มน้ำมันเป็นหมันได้ (Singh et al., 2013)

2.1.2.6 เมล็ด (Seeds)

ประกอบด้วยกะลา (endocarp) และเนื้อใน และมีเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ที่แข็งมาก ซึ่งพัฒนามาจากส่วนของผลชั้นใน ปลายด้านหนึ่งของเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นที่ตั้งของตาจำนวน 3 ตา มีชั้นสะสมอาหารที่เรียกว่า kernel ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น fat และ oil สำหรับเอาไว้เลี้ยงต้นอ่อนระยะแรก ซึ่งชั้นนี้จะล้อมรอบแกนของคัพภะ (embryo axis) ซึ่งประกอบด้วยรากอ่อน (radical) ยอดอ่อน (plumule) และใบเลี้ยง (haustorium) (Corley and Tinker, 2008) โดยปกติเมล็ดปาล์มน้ำมันจะมีการพักตัวซึ่งจะสามารถถูกทำลายการพักตัวโดยการอบด้วยความร้อนและเมล็ดจะงอกเมื่อได้รับการกระตุ้นโดยอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมหรือเมื่อเมล็ดอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมแก่การงอก โดยขบวนการงอกจะเกิดในระยะเวลา 3-4 วันซึ่งแต่ละเมล็ดก็จะใช้เวลาในการงอกแตกต่างกัน

2.1.3 ลักษณะพันธุศาสตร์ของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacquin) มีจำนวนโครโมโซมเป็นแบบดิพลอยด์มี 32 โครโมโซมโดยมีโฮโมโลกส์โครโมโซมจำนวน 16 แท่ง ($2n=32$) ความยาวโครโมโซมอยู่ระหว่าง 1.00–3.89 μm และมีขนาดจีโนม 1.8×10^9 base pairs ซึ่งความยาวโครโมโซมของปาล์มน้ำมันสปีชีส์ *Elaeis oleifera* และ *Elaeis guineensis* ไม่แตกต่างกัน และจากจีโนมทั้งหมดจะประกอบด้วยยีนทั้งหมด 34,802 ยีน (Singh et al., 2013) ซึ่งหนึ่งในนั้นจะมียีนที่ควบคุมความหนาของกะลา 1 คู่ (single gene) ซึ่งยีนดังกล่าวจะกำหนดลักษณะความหนาของกะลาและทำให้สามารถแยกลักษณะของผลแตกต่างกันโดยสามารถแบ่งลักษณะของผลเป็น 3 ลักษณะดังนี้

2.1.3.1 ดุรา (Dura)

เป็นลักษณะที่เกิดจากการยีนที่ควบคุมเป็นลักษณะเด่น (dominant) Sh^+Sh^+ ซึ่งทำให้ผลปาล์มชนิดนี้มีลักษณะกะลาหนา 2 - 8 มิลลิเมตร ไม่มีวงเส้นประสีดำอยู่รอบกะลา มีชั้นเปลือกนอกบาง 35 - 60 % เปอร์เซ็นต์ดังนั้นจึงสามารถให้ผลผลิตน้ำมันดิบต่ำ (Jin et al., 2016)



ภาพที่ 2.3 พันธุ์ดุราของปาล์มน้ำมัน จาก “The oil palm SHELL gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK,” โดย R. Singh, E. T. L. Low, L. C. L. Ooi, M. Ong-Abdullah, N. C. Ting, J. Nagappan, ... & K. L. Chan, 2013, *Nature*, 500(7462).

2.1.3.2 พิสิเฟอรา (Pisifera)

เป็นลักษณะที่เกิดจากยีนที่ควบคุมเป็นลักษณะด้อย (recessive) Sh^-Sh^- โดยมีลักษณะผลไม่มีกะลาหรือบางครั้งอาจมีกะลาบางมาก ช่อดอกตัวเมียมี 2 ลักษณะ คือ female fertile และ female infertile ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าต้นพิสิเฟอราที่มีการพัฒนาของผลมาจากช่อดอกแบบ female infertile นั้นจะมีทะลายฝ่อและมีลำต้นใหญ่มาก ส่วนต้นพิสิเฟอราที่มีการพัฒนาของผลมาจากช่อดอกแบบ female fertile พบว่าผลอาจมีลักษณะเนื้อในขนาดเล็กปรากฏในบางผล (Tang, 1971) แต่พันธุ์ปาล์มน้ำมันนี้จะมีช่อดอกตัวเมียส่วนใหญ่เป็นหมัน (abortion) ทำให้ผลมีลักษณะผลฝ่อลีบ ทะลายเล็กเนื่องจากผลไม่มีการพัฒนาดังนั้นจึงทำให้ผลผลิตต่ำมากหรือไม่มีผลผลิตทรงต้นมักจะใหญ่ เนื่องจากเป็นหมัน และนอกจากนี้ยังไม่นิยมใช้ปาล์มน้ำมันพันธุ์พิสิเฟอราในการปลูกทางการค้า



ภาพที่ 2.4 พันธุ์พิสิเฟอราของปาล์มน้ำมัน จาก “The oil palm SHELL gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK,” โดย R. Singh, E. T. L. Low, L. C. L. Ooi, M. Ong-Abdullah, N. C. Ting, J. Nagappan, ... & K. L. Chan, 2013, *Nature*, 500(7462).

2.1.3.3 เทเนอร์ (Tenera)

เป็นลักษณะที่เกิดจากยีนที่ควบคุมเป็นลักษณะพันธุทาง (heterozygous) Sh^+Sh^- โดยลักษณะผลจะมีกะลาบางประมาณ 0.5 - 4 มิลลิเมตร มีวงเส้นประสีดำอยู่รอบกะลา มีชั้นเปลือกนอกหนาประมาณ 60 - 90 % ซึ่งส่งผลทำให้ผลปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร์านั้นสามารถให้ผลผลิตน้ำมันได้ดี นอกจากนี้จึงเป็นพันธุ์เป้าหมายหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์



ภาพที่ 2.5 พันธุ์เทอเนอราของปาล์มน้ำมัน จาก “The oil palm SHELL gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK,” โดย R. Singh, E. T. L. Low, L. C. L. Ooi, M. Ong-Abdullah, N. C. Ting, J. Nagappan, ... & K. L. Chan, 2013, *Nature*, 500(7462).

2.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

2.2.1 ยีน MADs box (MADs box genes)

ยีน MADs box คือยีนที่มีลำดับอนุรักษ์สูงซึ่งจะประกอบไปด้วยยีนหลายยีนทำงานร่วมกัน (MADs-box gene family) (Schwarz-Sommer et al., 1990) อย่างเช่นกลุ่มของยีน MADs box ในอะราบิโดพซิส (*Arabidopsis thaliana*) (Parenicova et al., 2003) จะมียีนที่เป็นสมาชิกมากถึง 107 ยีน จะเห็นได้ว่ายีน MADs box นั้นจะต้องมียีนหลายยีนประกอบกันเพื่อทำหน้าที่ต่างๆ (Adam et al., 2005) กลุ่มของยีน MADs box ส่วนใหญ่จะแปลรหัสเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ transcription factor ซึ่งถูกพบครั้งแรกเป็น DNA binding protein ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 60 ลำดับ ซึ่งบริเวณนี้จะเรียกว่า MADs-box domain (Shore and Sharrocks, 1995) โดยจะอยู่ที่ปลาย N-terminal ของโปรตีน (Arora et al., 2007) ซึ่งเป็นส่วนที่มีความอนุรักษ์สูง นอกจากนี้ยังเป็นส่วนที่ใช้ในการจดจำ (Busi et al., 2003) และเป็นส่วนในการจับกับดีเอ็นเอ (West et al., 1999)

โดยยีน MADs box จะพบในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอ (Eukaryote) เช่น ยีสต์, แมลง (Shore and Sharrocks, 1995), ฟังไจ (Passmore et al., 1988), สัตว์ (Norman et al., 1988) และพืช (Yanofsky et al., 1990; Schwarz-Sommer et al., 1990) โดยถูกพบครั้งแรกในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งถูกตั้งชื่อว่ายีน *AGR80* (Dubois et al., 1987) แต่ยังไม่ถูกบันทึกว่าเป็นหนึ่งในยีนของ MADs box และหลังจากนั้นมีการค้นพบยีน MADs box ในสิ่งมีชีวิตมากขึ้นจึงตั้งชื่อกลุ่มยีนจากยีนที่ค้นพบในสิ่งมีชีวิตต่างๆโดยคำว่า MADs มาจากชื่อยีนในกลุ่ม MADs box

ที่ถูกรวบรวมนี้ M มาจากยีนที่ชื่อ *MCM1* ซึ่งเป็นยีนที่พบใน *Saccharomyces cerevisiae* (Schwarz-Sommer et al., 1990) นอกจากนี้ยีน *MCM1* ยังพบในพืชและประกอบด้วยยีนที่ทำงานร่วมกัน 13 subfamilies ซึ่งถือว่าเป็นส่วนสำคัญต่อ MADs family อย่างมาก (Fan et al., 2013), A มาจากยีน *AGAMOUS* ในอระราชิตอพซิส, D มาจากยีน *DEFICIENS* ในดอกลินม้งกร (*Antirrhinum majus*) และ S มาจากยีน *SRF* ในมนุษย์ (*Homo sapiens*) (Schwarz-Sommer et al., 1990) MADs-box family สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ type I ประกอบด้วยยีน *ARG80/SRF*-like ของสัตว์และฟังไจ แต่สำหรับในพืชเรียกว่ากลุ่มยีน M-type และ type II ประกอบด้วยยีน *MEF2*-like ของสัตว์และยีสต์ ส่วนในพืชคือกลุ่มยีน MIKC-type (Arora et al., 2007) โดยเฉพาะ MADs box family ชนิดที่ 2 หรือกลุ่มยีน MIKC-type จะเกี่ยวข้องกับการทำงานหลักๆในพืช โดยยีนนี้จะผลิตโปรตีนที่เป็น transcription factors ซึ่งมีโครงสร้างหลักที่ประกอบด้วย 4 โดเมน คือ 1. The MADs (M-) domain เป็นบริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 30 ลำดับ ซึ่งส่วนนี้เป็นส่วนที่มีความอนุรักษ์สูงโดยจะเกี่ยวข้องกับการเข้าจับกับดีเอ็นเอ (DNA binding) และ dimerization 2. the intervening (I-) domain จะมีความอนุรักษ์ต่ำ 3. The keratin-like (K-) domain ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 70 ลำดับ ซึ่งความอนุรักษ์ปานกลาง โดยทั้งสองโดเมนนี้จะเกี่ยวข้องกับการ heterodimerization และ 4. the variable C-terminal (C-) domain เป็นส่วนที่มีความแปรผันสูง (Münster et al., 1997; Adam et al., 2005; Arora et al., 2007; Cho et al., 1999; Riechmann et al., 1997; Fan et al., 1997)

การทำงานจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการพัฒนาส่วนต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตซึ่งการทำงานของยีน MADs box จะมีหน้าที่ที่แตกต่างกันในแต่ละสิ่งมีชีวิต สำหรับในพืชยีน MADs box มีความสำคัญอย่างมากต่อการพัฒนาของพืช เช่น การควบคุมการพัฒนาดอก, การพัฒนาราก, การพัฒนา gametophyte, การสุกของผล, การควบคุมการบานของดอกไม้ (Fan et al., 2013) การพัฒนาดอกโดยควบคุมการเจริญของเนื้อเยื่อดอกและอวัยวะส่วนต่างๆของดอก (Coen and Meyerowitz, 1991; Davies and Schwarz-Sommer, 1994; Weigel and Meyerowitz, 1994), การพัฒนาผล, การเจริญเติบโตของอวัยวะต่างๆของลำต้นและการพัฒนาเอ็มบริโอ (Heck et al., 1995; Rounsley et al., 1995; Gu et al., 1998; Ferrándiz et al., 2000; Liljegen et al., 2000) เป็นต้น จากการศึกษาการทำงานของยีน MADs box นั้นพบครั้งแรกว่าเกี่ยวข้องกับการพัฒนาดอกในพืชซึ่งถูกเรียกว่า floral homeotic genes โดยเป็นกลุ่มยีนที่ถูกนำมาศึกษาในเรื่องของ transcription factor genes ในพืชมากที่สุด (Arora et al., 2007) โดยยีน MADs box จะสร้าง transcription factors ซึ่งจะมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการพัฒนาของดอกในระยะต่างๆรวมถึงการพัฒนาอวัยวะต่างๆของดอกและการทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยจะส่งผลทำให้ดอกมีความ

หลากหลายอีกด้วย (Yamaguchi and Hirano, 2006; Weigel and Meyerowitz, 1994; Okada and Shimura, 1994; Theissen and Saedler, 1995; Rounsley et al., 1995)

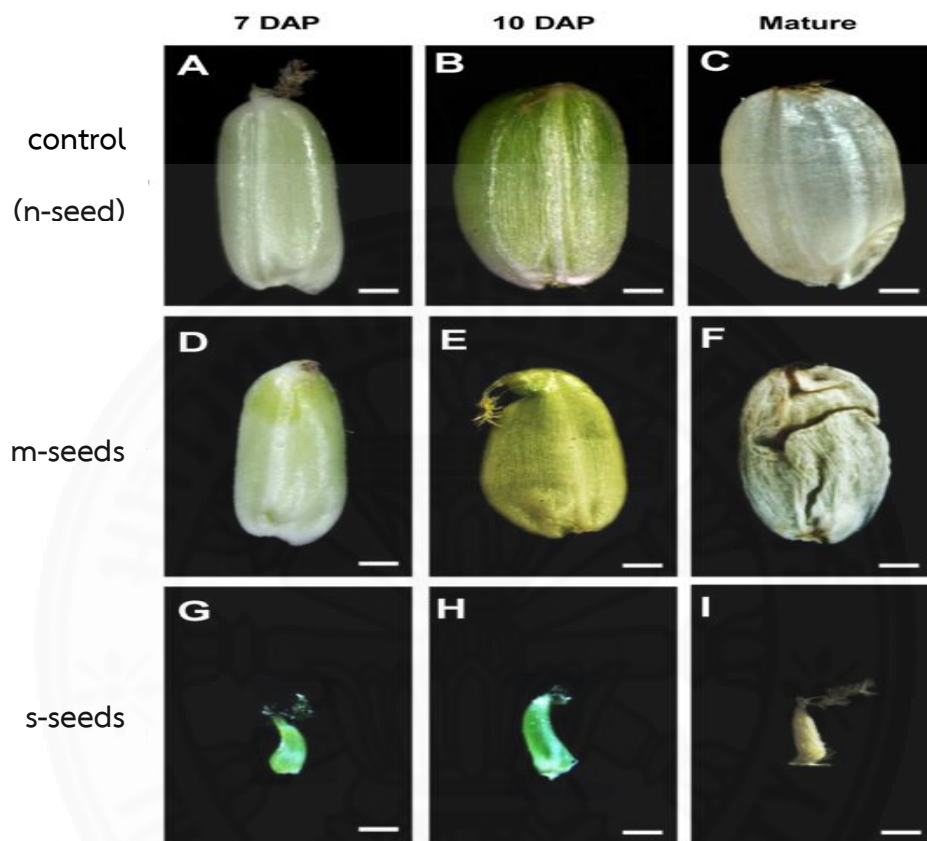
จากความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาดอกทำให้มีการสร้างโมเดลต้นแบบเรียกว่า ABCDE model เป็นโมเดลที่ใช้อธิบายการพัฒนาอวัยวะส่วนต่างๆของดอกโดยศึกษาการทำงานของยีนในอะราบิโดพซิสและดอกลินินมังกร (Coen and Meyerowitz, 1991; Colombo et al., 1995; Pelaz et al., 2000) ซึ่งจะอธิบายการทำงานของกลุ่มยีน MADs box ในการพัฒนาโครงสร้างดอก โดย ABCDE model นั้นจะแยกกลุ่มของยีนออกเป็นกลุ่มทั้งหมด 5 กลุ่ม โดยใช้หน้าที่หรือตามการควบคุมการแสดงออกของยีนในการจัดกลุ่มดังนี้ 1) ยีนในกลุ่ม A 2) ยีนในกลุ่ม B 3) ยีนในกลุ่ม C และ 4) ยีนในกลุ่ม D โดยการแสดงออกของยีนแต่ละกลุ่มนั้นอาจจะมีการทำงานเพียงกลุ่มเดียวในการพัฒนาหรือทำงานร่วมกันของกลุ่มยีนหลายกลุ่มก็ได้ หากอธิบายการทำงานของยีนโดยแบ่งตามอวัยวะส่วนของดอก คือ กลีบเลี้ยง (sepal), กลีบดอก (petal), เกสรตัวผู้ (stamen) และ เกสรตัวเมีย (pistill) โดยกลุ่มของยีน A จะเกี่ยวข้องกับการพัฒนากลีบเลี้ยง การพัฒนากลีบดอกจะเกิดจากการทำงานร่วมกันยีน A, B และ C สำหรับกลุ่มของยีน B, C และ E จะทำงานร่วมกันเพื่อพัฒนาเกสรเพศผู้ และเกสรเพศเมียจะเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน C และ E และกลุ่มของยีน C, D และ E จะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของรังไข่ (Adam et al., 2007b; Angenent and Colombo, 1996; Pelaz et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีการอธิบายเกี่ยวกับการทำงานอย่างจำเพาะของแต่ละกลุ่มโดยการแสดงออกของยีนในกลุ่ม A จะจำเพาะต่อการพัฒนากลีบเลี้ยงและกลีบดอก, ยีนในกลุ่ม B จะเกี่ยวข้องกับการพัฒนากลีบดอกและเกสรเพศผู้, ยีนในกลุ่ม C เพียงกลุ่มเดียวจะทำหน้าที่พัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (Alwee et al., 2006) และยีนในกลุ่ม D ทำหน้าที่พัฒนารังไข่ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (Colombo et al., 1995; Angenent and Colombo 1996; Theissen et al., 2000) และนอกจากนี้ยังมียีนในกลุ่ม E ที่แสดงออกเกี่ยวกับอวัยวะของดอก (Theissen et al., 2000) นั่นก็คือการพัฒนาในส่วนของกลีบดอก, เกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย (Pelaz et al., 2000) มีการศึกษาการทำงานของยีนต่างๆใน ABCDE model ของพืชหลายชนิด

เช่น Yamaguchi and Hirano (2006) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่อยู่ในกลุ่มของ MADs box ในข้าวเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน พบการแสดงออกของยีน *OsMADS14* แบบ Ectopic expression โดยจะกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาดอกจากกระบวนการพัฒนารากในระยะแรกของการพัฒนา หรือในบางครั้งอาจเกิดการพัฒนาดอกในแคลลัสโดยไม่การเจริญเติบโตของลำต้น (Jeon et al., 2000) ยีน *OsMADS18* จะแสดงออกในราก, ใบ, ช่อดอกและดอก และมีการแสดงออกจะมีระดับสูงสุดในระยะสืบพันธุ์ (Fornara et al., 2004; Masiero et al., 2002) *OsMADS18* มีการแสดงออกทุกบริเวณในดอก (Pelucchi et al., 2002) และมีการแสดงออกที่มาก

เกิน (overexpression) เมื่อถูกกระตุ้นในระยะแรกในการพัฒนาดอกซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการพัฒนา axillary shoot meristem (Fornara et al., 2004) ซึ่งทั้งสองยีนนั้นมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีน *APETALA1 (AP1)* ของอะราบิโดพซิสเป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม MADs box ซึ่งพบว่ามี การแสดงออกอย่างจำเพาะในบริเวณกลีบเลี้ยงและกลีบดอก และยังมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีน *CAULIFLOWER (CAL)* และ *FRUITFUL (FUL)* (Kempin et al., 1995; Ferrandiz et al., 2000) โดยยีน *FUL* นั้นเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาผลและช่อดอก (Yamaguchi and Hirano, 2006) ซึ่งยีนทั้งหมดนั้นไม่สามารถจัดกลุ่มใน ABCDE model ได้ เนื่องจากมีการทำงานที่ค่อนข้างหลากหลาย จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsMADS2* และ *OsMADS4* ในข้าวพบว่าทั้งสองยีนมีการแสดงออกที่ต่างกันเล็กน้อย โดย *OsMADS4* มีการแสดงออกในเกสรเพศผู้และโลติคูลส์ (lodicules) ส่วนยีน *OsMADS2* ก็มีการแสดงออกทั้งใน โลติคูลส์ (lodicules) และเกสรตัวผู้เช่นกันแต่ต่างกันที่ยีน *OsMADS2* มีการแสดงออกในโลติคูลส์ (lodicules) มากกว่าในเกสรตัวผู้ (Kyojuka et al., 2000) ซึ่งยีนทั้งสองมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีน *APETALA3 (AP3)* และ *PISTILLATA (PI)* โดยเป็นยีน MADs box ที่จัดอยู่ในกลุ่ม B ซึ่งมีการแสดงออกอย่างจำเพาะในกลีบดอกและอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเป็น orthologs กับยีน *DEF* และ *GLO* ในดอกลิ้น (Coen and Meyerowitz, 1991) จากการศึกษาพบว่าการทำงานของยีนในกลุ่ม B มีความอนุรักษ์ในข้าว (Nagasawa et al., 2003) สำหรับยีน *OsMADS3* และ *OsMADS58* มีการแสดงออกในวงเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียซึ่งคล้ายกับการทำงานของยีนในกลุ่ม C ของพวกพืชใบเลี้ยงคู่แท้ (eudicot) และยังมีอีกว่ายีน *OsMADS58* จะมีการทำงานในการพัฒนาเกสรตัวผู้ปกติในดอกปกติทั่วไปแต่จะทำให้เกสรตัวเมียมีลักษณะผิดปกติหากมีการแสดงออกที่ผิดปกติ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายีนนี้มีส่วนในการพัฒนาดอกและทำให้เกสรตัวเมียมีลักษณะปกติ นอกจากนี้ยีนในกลุ่ม C ของพืชชนิดอื่นๆ เช่น *Arabidopsis AGAMOUS (AG)* และ *Antirrhinum PLENA (PLE)* มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของเกสรตัวเมียและตัวผู้, ควบคุมการพัฒนาเนื้อเยื่อของดอกและควบคุมการทำงานของยีนในกลุ่ม A ในทางลบด้วย (Coen and Meyerowitz, 1991) จากการศึกษาการทำงานของกลุ่มยีน D พบว่ายีนในกลุ่มนี้จะควบคุมการแสดงออกในข้าวซึ่งจะส่งผลกระทบต่อจำนวนและตำแหน่งของรังไข่ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย โดยพบ 2 ยีนที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้และมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกันคือยีน *OsMADS13* และ *OsMADS21* ยีน *OsMADS13* มีการแสดงออกในรังไข่และผนังเซลล์ชั้นในของเกสรตัวเมีย (Lopez-Dee et al., 1999) นอกจากนี้ยีน *OsMADS13* ของข้าวและยีน *FBP7* ของพิทูเนีย (petunia) มี MADS-domain proteins ที่สัมพันธ์กันและยังพบว่ามีการทำงานคล้ายกันซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนารังไข่ และยังมีวิวัฒนาการกับยีน *Arabidopsis SEEDSTICK (STK)*, *FBP7* และ *FBP11* ซึ่งถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม D โดยจะควบคุมการแสดงออกในรังไข่อย่างจำเพาะ (Colombo et al., 1995; Pinyopich et al., 2003)

สำหรับยีนในกลุ่ม B นั้นก็ได้รับความสนใจเนื่องจากการค้นพบยีนที่เป็นเครือญาติกับยีนในกลุ่ม B จึงตั้งชื่อ *Bsister genes* โดยพบทั้งในพืชจำพวกแองจิโอสเปิร์ม (angiosperms) และจิมโนสเปิร์ม (gymnosperms) (Becker et al., 2002) การทำงานของยีนในกลุ่ม B จะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และในพืชพวกแองจิโอเปิร์มจะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาดอก แต่สำหรับยีนในกลุ่ม *Bsister* ถูกพบว่ามีแสดงออกในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (รังไข่และผนังเกสรตัวเมีย) และในการพัฒนาเมล็ด (Yamada et al., 2009; de Folter et al., 2006; Nesi et al., 2002) นอกจากนี้ลำดับเบสของยีนในกลุ่ม *Bsister* ยังมีความอนุรักษ์สูงและมีบทบาทที่สำคัญในการพัฒนารังไข่และเมล็ดซึ่งเป็นหน้าที่ที่อนุรักษ์มาเป็นเวลาโดยประมาณ 300 ล้านปี (Yang et al., 2012) จากที่กล่าวมาจึงทำให้ในปี 2012 Yang และคณะ ได้ทำการศึกษาการทำงานของยีนที่อยู่ในกลุ่ม *Bsister* ในข้าว ซึ่งก็คือยีน *OsMADS29* โดยจากการศึกษาพบว่ายีน *OsMADS29* มีการแสดงออกในการพัฒนารังไข่และเมล็ด เนื่องจากผู้วิจัยได้ทำการลดการแสดงออกของยีน *OsMADS29* เพื่อศึกษาถึงผลที่เกิดขึ้นพบว่าเกิดการแท้งและ/หรือทำให้เมล็ดเหี่ยวซึ่งจะทำให้ไม่มีการกระตุ้นให้สร้างแป้งในเอนโดสเปิร์ม นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *OsMADS29* ที่ลดลงจะมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาเมล็ดข้าวและควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นๆอีกด้วย ผู้วิจัยได้ทำการประเมินข้อมูลการพัฒนาของข้าวโดยใช้สถิติพบว่าโดยทั่วไปจะมีอัตราการแท้งเพียง 9% เท่านั้น แต่หากมีการทำงานของยีน *OsMADS29* ที่ต่ำจะส่งผลทำให้เมล็ดมีความผิดปกติ 100% รวมถึงจะทำให้เมล็ดเหี่ยวซึ่งจะส่งผลทำให้มีการสร้างแป้งในเอนโดสเปิร์มน้อย 66% และมีโอกาสที่เมล็ดจะแท้งสมบูรณ์ก่อน 7 วัน 34% (ภาพที่ 2.6) จึงสามารถสรุปได้ว่าถึงแม้ว่าจะพบการแสดงออกของยีน *OsMADS29* ในระยะแรกของการพัฒนารังไข่ซึ่งสอดคล้องจากสมมติฐานว่าสมาชิกใน *Bsister subfamily* นั้นมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เพศหญิง (Becker et al., 2000) แต่การแสดงออกที่ลดลงของยีน *OsMADS29* ก็ไม่มีผลต่อการพัฒนาของรังไข่แต่จะส่งผลต่อยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนารังไข่ เช่นยีน *OsMADS21* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม D และจะมีผลต่อการพัฒนาเมล็ดทำให้เมล็ดแท้งหรือเหี่ยวซึ่งทำให้การพัฒนาเอนโดสเปิร์มและการกระตุ้นการสร้างแป้งในเมล็ดต่ำ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับยีนที่อยู่ในกลุ่ม *Bsister* ซึ่งเกี่ยวกับการพัฒนารังไข่ เช่นยีน *ABS (ARABIDOPSIS BSISER)* มีการแสดงออกที่บริเวณผนังชั้นในของรังไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว (Mizzotti et al., 2012) จากการศึกษาพบว่ากรณีที่เมล็ดมีการกลายพันธุ์ของยีน *ABS* นั้นจะส่งผลทำให้การผลิตสปีดผิดปกติและไม่มี การสร้างผนังชั้นในของรังไข่ในเมล็ดซึ่งบ่งบอกถึงว่ายีน *ABS* ควบคุมการกระตุ้น anthocyanidin และกระตุ้นพัฒนาผนังเซลล์ชั้นใน (Nesi et al., 2002; Kaufmann et al., 2005) และมีรายงานพบว่ายีน *ABS* มีหน้าที่เหมือนกับยีนในกลุ่ม D ซึ่งก็คือยีน *SEEDSTICK (STK)* หากถูกทำให้กลายพันธุ์

โดยการ double mutants จะไม่แสดงลักษณะในชั้น endothelium และทำให้เกิดการผลิตแป้งจำนวนมากใน embryo sac ซึ่งส่งผลทำให้เมล็ดมีจำนวนน้อยลง (Mizzotti et al., 2012)



ภาพที่ 2.6 แสดงการแสดงออกของยีน *OsMADS29* ที่มีผลต่อลักษณะของเมล็ดข้าว จาก “Live and Let Die-The B sister MADS-Box Gene *OsMADS29* Controls the Degeneration of Cells in Maternal Tissues during Seed Development of Rice (*Oryza sativa*),” โดย X. Yang, F. Wu, X. Lin, X. Du, K. Chong, L. Gramzow, ... & Z. Meng, 2012, *PLoS One*, 7(12).

นอกจากนี้ยีน *SEEDSTICK* จะควบคุมการพัฒนารังไข่ร่วมกับยีน *SHATTERPROOF 1 (SHP1)* และ *SHATTERPROOF 2 (SHP2)* (Pinyopich et al., 2003) หากยีนทั้งสามคือ STK, SHP1 และ SHP2 เกิดการกลายพันธุ์ทำให้ integuments กลายเป็น carpelloid structures (Robinson-Beers et al., 1992; Modrusan et al., 1994; Reiser et al., 1995) และทำให้เกิดการหยุดการพัฒนา female gametophyte หลังจากเกิดกระบวนการ megalporogenesis (Brambilla et al., 2007; Battaglia et al., 2008) นอกจากนี้จะส่งผลทำให้

ก้านของรังไข่มีขนาดใหญ่กว่าลักษณะปกติและไม่มีการพัฒนาของเมล็ด (Pinyopich et al., 2003) แล้วยังพบว่าการทำงานร่วมกันระหว่างยีน STK และ SEPALLATA 3 (SEP3) จะควบคุมระบบสืบพันธุ์และยังเป็น transcription factor ของยีน gene VERDANDI (VDD) (Mizzotti et al., 2012) ซึ่งเป็นยีนที่จะควบคุมการพัฒนาเซลล์ใน female gametophyte (Matias-Hernandez et al., 2010)

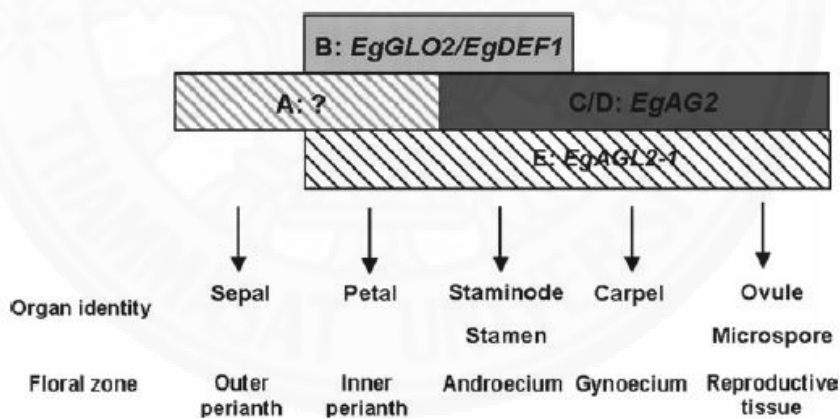
นอกจากจะมีการศึกษาการทำงานของยีน MADs box ในข้าวแล้วก็ยังมีการศึกษาในพืชผลอีกด้วย อย่างเช่นงานวิจัยของ Yao et al. (1999) ได้ทำการศึกษาการทำงานของยีน MADs box ในแอปเปิล (*Malus domestica*) ทั้งหมด 7 ยีน คือ *MdMADS5*, *MdMADS6*, *MdMADS7*, *MdMADS8*, *MdMADS9*, *MdMADS10* และ *MdMADS11* โดยยีนเหล่านี้จะแสดงออกต่างกันในผลและอวัยวะต่างๆในผลดังนี้ ยีน *MdMADS5* จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกหลังจากมีการถ่ายละอองเรณู 1 อาทิตย์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าผลจากการปฏิสนธิจะใช้เวลาประมาณหนึ่งสัปดาห์ (Williams, 1965) โดยจะมีการแสดงออกอย่างมากใน cortex และเปลือกแต่แสดงออกน้อยใน core ซึ่งการแสดงออกใน cortex และเปลือกสอดคล้องกับการแสดงออกในกลีบเลี้ยงและกลีบดอก พบการแสดงออกของยีน *MdMADS6* และ *MdMADS7* ใน cortex และเปลือกของแอปเปิลในระดับสูงกว่า core ถึงแม้ว่าระดับการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญจะถูกพบในเนื้อเยื่อ core ก็ตาม สำหรับการแสดงออกของยีน *MdMADS8* และ *MdMADS9* มีการแสดงออกสูงใน core และ cortex แต่แสดงออกน้อยในเปลือกและยังพบว่ามีการแสดงออกจะสูงในผลหลังจากที่มีการถ่ายละอองเรณูและหลังจากนั้นจะลดลงทีละน้อยจึงเป็นไปได้ว่ายีน *MdMADS8* และ *MdMADS9* มีบทบาทในการพัฒนาผลแอปเปิลในระยะแรก นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *MdMADS8* and *MdMADS9* มีความคล้ายกับการแสดงออกของยีน *AGL2* ในอะราบิโดพซิส (Ma et al., 1991) การแสดงออกของยีน *MdMADS10* ในรังไข่และเปลือกเมล็ดของแอปเปิลถูกพบโดยวิธี *in situ* hybridization techniques (Yao et al., 1999) *MdMADS10* อาจจะมีบทบาทที่สำคัญในการพัฒนารังไข่และเมล็ด เนื่องจากการพัฒนาของเมล็ดมีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญต่อการพัฒนาผล (Gillaspy et al., 1993) ดังนั้นการแสดงออกของยีน *MdMADS10* จึงมีอิทธิพลต่อการพัฒนาผลเช่นกันและจากการศึกษาลำดับโปรตีนของ *MdMADS10* พบว่ามีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับโปรตีนของ *FBP7* และ *AGL11* ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการพัฒนารังไข่และเมล็ด (Angenent et al., 1995; Colombo et al., 1995; Colombo et al., 1997; Rounsley et al., 1995) *MdMADS10* mRNA ถูกพบได้แค่ที่ fruit core ที่เป็นส่วนที่พัฒนามาจากเนื้อเยื่อของรังไข่และประกอบด้วยเมล็ด ในขณะที่การแสดงออกของยีน *MdMADS10* สามารถตรวจสอบได้แค่ใน core แต่การแสดงออกของยีน *MdMADS11* มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อของผลทั้งสามชนิด ยีน *MdMADS11* มีระดับและรูปแบบในการแสดงออกที่คล้ายกันใน

ระยะแรกๆของการพัฒนาดอกและผลแต่ในเนื้อเยื่อของผลนั้นมีความแตกต่างกันช่วงของการแสดงออกมีบทบาทที่ต่างกันในการพัฒนาแอปเปิล

นอกจากนี้มีการศึกษาการทำงานของยีน MADs box โดย Busi และคณะในปี 2003 ซึ่งจะศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม MADs box จำนวน 6 ยีน พบว่ายีน *TAG1*, *TDR4* และ *TDR6* มีการแสดงออกในการพัฒนาดอก โดยเฉพาะยีน *TAG1* จะมีการแสดงออกจากอย่างจำเพาะในเกสรเพศผู้และเพศเมียในระยะแรกๆ และจะมีการลอรทส์มากขึ้นตามขนาดดอกที่เจริญเติบโตมากขึ้นและพบการแสดงออกในรังไข่ในระยะที่มีการพัฒนาดอก ที่ระยะการบานของดอกไม้ยีน *TAG1* มีการแสดงออกในรังไข่และเกสรตัวผู้ 4 วันหลังจากมีการบานของดอกและยังมีการแสดงออกจำกัดใน endothelium ที่บริเวณผนังของรังไข่และมีการแสดงออกใน vascular bundles โดยจะมีการแสดงออกอย่างสูงในผนังของเกสรตัวผู้อีกด้วย สำหรับยีน *TDR6* มีการแสดงออกทั้งในการพัฒนาดอกและพัฒนาผลแต่มีการแสดงออกมากในการพัฒนาผล และพบว่า *TDR4* mRNA ถูกกระตุ้นในดอกที่โตเต็มที่โดยพบการแสดงออกในผนังชั้นในของรังไข่, เกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย นอกจากนี้ยังพบอีกว่า *TDR4*, *TAGL2*, *TAGL11* และ *TAGL1* ยีนเหล่านี้สามารถกระตุ้นการแสดงออกได้ในผนังรังไข่หลังจากเกิดกระบวนการบานของดอก ยีน *TAGL2* มีการแสดงออกในระยะการบานของดอกและจะมีการแสดงออกมากหลังจากการบานของดอก ซึ่งยีน *TAGL2* จะมีการแสดงออกจนกระทั่งการพัฒนาเมล็ดสมบูรณ์ โดยยีน *TAGL2* มีการแสดงออกในผนังชั้นในของรังไข่ในระยะการบานของดอกและมีการแสดงออกเล็กน้อยใน pericarp หลังจากมีการปฏิสนธิ นอกจากนี้ยีน *TAGL2* จะมีการแสดงออกอย่างจำกัดบริเวณ endothelium ในการพัฒนาเมล็ดและ vascular bundles ที่ระยะที่สอง สำหรับยีน *TAGL11* จะมีการแสดงออกคล้ายกับการแสดงออกของยีน *FBP7/1* ซึ่งจะแสดงออกในการพัฒนาดอกไม่ในระยะท้ายในบริเวณผนังชั้นในของรังไข่ของการพัฒนาเมล็ด (Colombo et al., 1995) การแสดงออกของยีน *FBP11* และ *FBP7* ไม่เพียงแต่แสดงออกในรังไข่เท่านั้นแต่จะมีการแสดงออกหลังกระบวนการปฏิสนธิ (Colombo et al., 1997) ดังนั้นยีน *FBP7/11* และ *TAGL11* จึงจัดอยู่ในกลุ่ม D ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนารังไข่และเมล็ด (Colombo et al., 1995) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่ายีน MADS box เกี่ยวข้องกับการพัฒนาผลและเมล็ดในมะเขือเทศ สำหรับการพัฒนาผลจะแบ่งเป็น 3 ระยะ คือ 1. จะเกี่ยวข้องกับการเริ่มพัฒนาไปเป็นผลและการจะตัดสินใจว่าจะพัฒนาต่อหรือจะเกิดการแท้ง 2. เป็นระยะสั้นๆที่จะเริ่มหลังจากการบานของดอก (anthesis) จะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการพัฒนาเนื้อเยื่อ 3. จะเริ่มหลังจากที่มีการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตจนกลายเป็นผลสมบูรณ์ (Gillaspy et al., 1993) นอกจากนี้การพัฒนาผลและเมล็ดนั้นจะมีการพัฒนาต่อจากการพัฒนาดอกโดยจะขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของกระบวนการปฏิสนธิและการถ่ายละอองเรณูอีกด้วย จากที่กล่าวมาข้างนี้ในกลุ่ม MADs

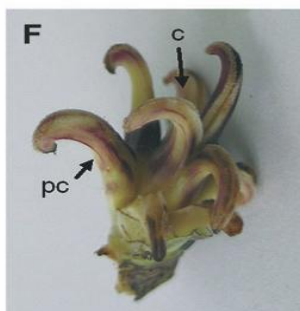
box ไม่เพียงแต่จะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาดอกเป็นส่วนใหญ่แล้วจึงเกี่ยวข้องกับการพัฒนาผลอีกด้วย และนอกจากนี้การแสดงออกของยีนในกลุ่ม MADs box ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาดอกก็ส่งผลถึงการพัฒนาผลอีกด้วย

สำหรับในปาล์มน้ำมัน Adam et al. (2007b) ได้ศึกษาการควบคุมการพัฒนาโครงสร้างดอกปาล์มน้ำมันของยีนที่อยู่ในกลุ่มของยีน MADs box ทั้งหมด 12 ยีน ซึ่งพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาดอกของปาล์มน้ำมันนั้นคือ *EgSQUA1* (SQUAMOSA subfamily), *EgAGL2-1* (AGL2 subfamily), *EgGLO2* (GLOBOSA subfamily), *EgDEF1* (DEFICIENS subfamily), และ *EgAG2* (AGAMOUS subfamily) และได้ทำการสรุปหน้าที่ของยีนดังกล่าวทั้งหมดดังนี้ ยีน *EgGLO2* และ *EgDEF1* จัดอยู่ในกลุ่มยีน B ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการพัฒนาของกลีบดอกและเกสรเพศผู้ ยีน *EgAG2* จัดอยู่ในกลุ่มของยีน C และ D ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเกสรเพศผู้ เกสรเพศเมีย และรังไข่ และยีน *EgAGL2-1* จัดอยู่ในกลุ่มของยีน E จะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของกลีบดอก เกสรเพศผู้ เกสรเพศเมีย และรังไข่ สำหรับยีน *EgSQUA1* นั้นยังไม่สามารถทราบได้แน่ชัดว่าเกี่ยวข้องกับการพัฒนาดอกในปาล์มน้ำมันส่วนใดเป็นพิเศษ ดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 แสดงหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาโครงสร้างดอกซึ่งอยู่ในกลุ่มของ ABCDE model จาก “Functional characterization of MADs box genes involved in the determination of oil palm flower structure,” โดย H. Adam, S. Jouannic, Y. Orioux, F. Morcillo, F. Richaud, Y. Duval, & J. W. Tregear, 2007b, *Journal of experimental Botany*, 58(6), p. 1245-1259.

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษากำหนดการแสดงออกของยีนทั้ง 5 ยีนในดอกปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะปกติเปรียบเทียบกับดอกที่มีลักษณะเป็นแมนเทิล (mantled) ซึ่งดอกลักษณะแมนเทิลนั้นสามารถพบได้หากเกิดการ ทำงานที่ผิดปกติของยีน MADs box โดยดอกที่มีลักษณะผิดปกติจะเรียกว่า แมนเทิล (mantled) (Corley et al., 1986) (ภาพที่ 2.8) ลักษณะแมนเทิลถูกพบครั้งแรกโดย Corley (Corley et al., 1986) ซึ่งลักษณะนี้เป็นลักษณะที่ผิดปกติของผลที่มีความหลากหลาย โดยจะเกิดการ สร้างโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายกับเกสรเพศเมียแทนเกสรเพศผู้ในดอก ซึ่งการเกิดแมนเทิลจะส่งผลกระทบต่อการผลิตน้ำมันในปาล์มน้ำมันเนื่องจากจะกระตุ้นใน mesocarp ของผลนั้นผลิตน้ำมันต่ำหรือในกรณีที่รุนแรงจะทำให้ดอกเป็นหมัน (Rival, 2000; Rival and Parveez, 2005) การเกิดแมนเทิลในดอกเพศผู้จะส่งผลทำให้ไม่มีการพัฒนาเกสรเพศผู้ ส่วนในดอกเพศเมียของปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะเป็นแมนเทิลจะเกิดการ พัฒนาโครงสร้างไปเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า "pseudocarpel" ซึ่งจากการพัฒนาเป็นโครงสร้างดังกล่าวจะทำให้ดอกเป็นหมันโดยการเจริญเติบโตทุกระยะรวมถึงการพัฒนาาระบบสืบพันธุ์ระยะแรกจะมีการพัฒนาเหมือนดอกปกติแต่การพัฒนาจะเริ่มแตกต่างจากดอกปกติเมื่อเริ่มมีการพัฒนาเกสรเพศเมียส่งผลให้เกสรเพศเมียไม่มีรังไข่ประกอบอยู่ด้วยจึงทำให้เป็นหมันไม่สามารถปฏิสนธิเกิดผลต่อไปได้ (Adam et al., 2007b) ลักษณะแมนเทิลนั้นถูกพบครั้งแรกในปาล์มน้ำมันที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Corley et al., 1986) และอาจส่งผ่านลักษณะทางการแบ่งแบบไมโอซิส ถึงแม้ว่าความหลากหลายของฟีโนไทป์ที่เกิดลักษณะแมนเทิลจะมีโอกาสเกิดเพียง 5% แต่ก็มี ความแปรผันมากและไม่สามารถทำนายการเกิดขึ้นได้จะขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ของต้นแม่และสภาวะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Jones et al., 1995; Eeuwens et al., 2002) มีการศึกษาเกี่ยวกับยีนในกลุ่ม MADs box ที่ทำให้เกิดลักษณะแมนเทิล โดยพบว่าการเกิดดอกที่เป็นแมนเทิลเกี่ยวข้องกับกับการเปลี่ยนแปลงยีนในดอก ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานที่มีความผิดปกติของยีนในกลุ่ม B หรือเกิดการกลายพันธุ์ของยีนในกลุ่ม B (Adam et al., 2007b) ซึ่งการควบคุมการแสดงออกของลักษณะแมนเทิลจะค่อนข้างมีความอนุรักษ์ในการทำงานของยีนในกลุ่ม B (Alwee et al., 2006) นอกจากนี้การเกิดแมนเทิลจะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อหนึ่งหรือหลายฮอร์โมนโดยมีการแสดงออกที่แตกต่างกันตามการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อออกซินอีกด้วย (Morcillo et al., 2006)



ภาพที่ 2.8 แสดงลักษณะดอกปาล์มที่เป็นแมนเทิล (mantled) (pc : pseudocarpel) จาก “Functional characterization of MADs box genes involved in the determination of oil palm flower structure,” โดย H. Adam, S. Jouannic, Y. Orioux, F. Morcillo, F. Richaud, Y. Duval, & J. W. Tregear, 2007b, *Journal of experimental Botany*, 58(6), p. 1245-1259.

Adam et al. (2007b) พบว่ายีน *EgAGL2-1* ไม่มีการแสดงออกในดอกปาล์ม น้ำมันที่มีลักษณะเป็นแมนเทิลทั้งในดอกเพศผู้และดอกเพศเมีย ซึ่งจะเห็นได้ว่ายีน *EgAGL2-1* เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเกสรเพศผู้และเพศเมีย ลักษณะแมนเทิลไม่เพียงแต่จะทำให้ปริมาณน้ำมันที่ได้จากปาล์มน้ำมันลดลงเท่านั้นแต่ยังทำให้สูญเสียการลงทุนทางด้านไปโอเทค, แรงงาน และ พื้นที่เพาะปลูก ดังนั้นการตรวจสอบลักษณะแมนเทิลในปาล์มนั้นกลายเป็นขั้นตอนที่ได้รับความสนใจอย่างมากในงานปรับปรุงพันธุ์อย่างหนึ่ง (Jaligot et al., 2010) นอกจากนี้จะมีการศึกษายีน MADs box ในการควบคุมลักษณะแมนเทิลในปาล์มน้ำมันแล้วยังมีการศึกษาการทำงานของยีนในกลุ่ม MADs box สำหรับการควบคุมลักษณะอื่นๆอีก เช่น การศึกษาของ Singh และคณะ ในปี 2013 สนใจยีน *SEEDSTICK (STK)* ซึ่งอาจรู้จักในอีกชื่อหนึ่งคือ *AGAMOUS-LIKE 11* ในอะราบิดอพซิสที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนารังไข่และเมล็ด (Pinyopich et al., 2003, Favaro et al., 2003) จากการศึกษาพบว่าหากยีน *SEEDSTICK* เกิดการกลายพันธุ์จะส่งผลต่อการพัฒนารังไข่และเมล็ดทำให้เกิดลักษณะผิดปกติได้ ในอะราบิดอพซิสยีน *SHATTERPROOF (SHP1)* และ *STK* อยู่ในกลุ่มยีน C และ D ตามลำดับ ทั้งสองยีนจะสามารถถอดรหัสได้ transcription factors ซึ่งควบคุมการแสดงออกต่างกันในรังไข่, เมล็ด และกะลา (Dinneny and Yanofsky, 2005) นอกจากนี้ในมะเขือเทศยังมียีนที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีน *SHP1* ซึ่งทำงานคล้ายกับยีน *SHP1* โดยจะควบคุมเกี่ยวกับการขยายตัวของผลใน endocarp (Vrebalov et al., 2009) และในพีช (peaches) รวมถึงพีชที่ผลมีเมล็ดเดี่ยวอีกด้วย สำหรับในปาล์มน้ำมันผู้วิจัยพบว่ายีน *SHP1* และ *STK* มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีน *SHELL* ในปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้ยังมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีน *OsMADS13* ซึ่งเกี่ยวข้องกับ

การควบคุมการพัฒนารังไข่เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ดอกเพศเมียจะเป็นหมัน (Dreni et al., 2007) ผู้วิจัยพบว่าหากยีน *SHELL* เกิดการกลายพันธุ์จะเกิดการขัดขวางหรือทำลายการเข้าจับแบบ heterodimerization ซึ่งส่งผลทำให้เกิดลักษณะเด่นเหนือพ่อแม่ในพันธุ์เทอเนอราของปาล์มน้ำมัน (Favaro et al., 2003; Huang et al., 1996) ซึ่งคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาผลและกลีบในปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้งานของ Adam และคณะในปี 2007 ได้ศึกษาการทำงานของยีนในกลุ่ม MADs box พบว่าการที่ปาล์มน้ำมันแต่ละต้นมีลักษณะของกลีบดอกและกลีบเลี้ยงที่แตกต่างกันเกิดจากการทำงานของยีน MADs box gene ผู้วิจัยสามารถตรวจสอบการทำงานของยีน *EgDEF1* ได้ในบริเวณกลีบดอกของดอกเพศเมียแต่ไม่พบในกลีบเลี้ยง สำหรับในดอกเพศผู้พบการทำงานที่บริเวณเกสรเพศผู้ โดยพบอีกว่าการแสดงออกของยีน *EgDEF1* จะสัมพันธ์กับการเกิดแมนเทิลในดอก ยีน *EgGLO2* จะมีการแสดงออกคล้ายกับ *EgDEF1* เนื่องจากอยู่ในกลุ่มของ B เหมือนกัน ความแตกต่างระหว่างกลีบเลี้ยงและกลีบดอกของปาล์มน้ำมันเกิดจากการแสดงออกของยีนในกลุ่ม E ซึ่งก็คือยีน *EgAGL2-1* และพบการแสดงออกของยีน *EgAG2* ทั้งในรังไข่และเกสรเพศเมียในระยะการพัฒนาช่วงแรกของดอกและการแสดงออกของยีน *EgSQUA1* เกี่ยวกับการพัฒนาในส่วนของช่อดอกและดอก นอกจากนี้ยีน *EgSQUA1* ยังเกี่ยวกับการแสดงออกของลักษณะความสูงของปาล์มน้ำมันด้วยการกลายพันธุ์ของกลุ่มยีน MADs box ไม่เพียงแต่เกิดการเปลี่ยนแปลงเฉพาะอวัยวะของดอกเท่านั้น แต่เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโครงสร้างของช่อดอกซึ่งการแสดงออกในช่อดอกเพศผู้กับช่อดอกเพศเมียก็มีการแสดงออกที่ต่างกันและผลอีกด้วย (Hepworth et al., 2006; Adam et al., 2005)

2.2.2 ยีนกำหนดเพศ (Sex determination genes)

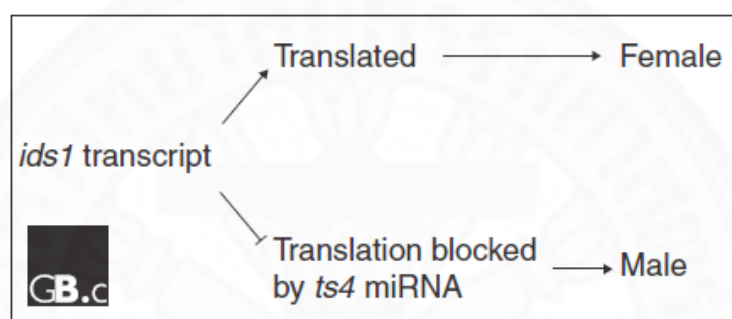
ระบบการกำหนดเพศ (sex determination system) คือ ระบบทางชีววิทยาที่ใช้ในการระบุเพศในสิ่งมีชีวิต (Khan, 2014) โดยจากการระบุเพศนั้นทำให้เกิดการพัฒนาเพศของสิ่งมีชีวิตไปเป็นเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย โดยการกำหนดเพศ (Sex determination) จะเกิดขึ้นระหว่างวงจรชีวิตของสิ่งมีชีวิตซึ่งเกิดการพัฒนาสองอวัยวะหรือสร้างเซลล์แกมมิตสองชนิด (Juarez and Banks, 1998) สำหรับการกำหนดเพศในพืชดอกจะถูกควบคุมในหลายๆจุดจากการทำงานร่วมกันของยีนหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาดอก การกำหนดเพศจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมจากยีนและโครโมโซม, การถ่ายทอดลักษณะจากรุ่นสู่รุ่นโดยกระบวนการ DNA methylation และ small RNAs และการควบคุมด้วยฮอร์โมน (Aryal and Ming, 2014) สำหรับพืชสปีชีส์ dioecious อย่างเช่น *Althea officinalis* and *Sagittaria latifolia* จะมีระบบ active-Y system ในการกำหนดเพศซึ่งจะส่งผลต่อการพัฒนาเพศผู้และกตการพัฒนาเพศเมีย (Bracale et al., 1991; van Nigtevecht, 1966) สปีชีส์ของ *Humulus* และ *Rumex* มีระบบ X-to-autosome ratio system ซึ่งจะส่งผลต่อ

จำนวนโครโมโซม X ในจีโนมโดยจำนวนของโครโมโซม X เกี่ยวข้องและมีผลต่อการกำหนดเพศ (Jacobsen, 1957; Parker and Clark, 1991) นอกจากนี้จะใช้โครโมโซมเพศในการกำหนดเพศแล้วยังมีสปีชีส์อื่นๆอีกที่การพัฒนาดอกไม่สมบูรณ์เพศ (unisexual flower) ถูกควบคุมโดยโครโมโซมร่างกายในการกำหนดเพศ (Dellaporta and Calderon-Urrea, 1993) กระบวนการกำหนดเพศในพืชดอกจะคัดเลือกเพศจากการแก่งของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียหรืออวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของดอกสมบูรณ์เพศ (hermaphrodite flower) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับการพัฒนาแกมมีต (ไข่และสเปิร์ม) อีกด้วย (Irish and Nelson, 1989) ซึ่งคล้ายกับการกำหนดเพศในพืชสปีชีส์ monoecious เช่น ข้าวโพด (*Zea mays*) เป็นต้น โดยจะต้องมีการกำจัดและพัฒนาอวัยวะบางส่วน ซึ่งการพัฒนาเพศเมียในช่อดอกเพศผู้จะใช้กระบวนการแก่งในขณะที่การพัฒนาเกสรเพศผู้ในช่อดอกเพศผู้ก็จะมีการพัฒนาต่ออย่างสมบูรณ์และในช่อดอกเพศเมียนั้นเกสรเพศผู้จะไม่มีการพัฒนาขณะที่เกสรเพศเมียจะมีการพัฒนาต่อจนสมบูรณ์ (Wu et al., 2007) กระบวนการเหล่านี้เป็นกระบวนการที่ถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมและการกลายพันธุ์ของยีนหลายๆยีน โดยจะทำให้เกิดการกำหนดเพศในพืชซึ่งยีนกำหนดเพศหลายๆยีนที่เกี่ยวข้องที่ถูกพบ เช่น ยีน *TASSELSEED (Ts)*, *DWARF (D)*, and *SILKLESS (SK)* เป็นต้น (Dellaporta and Calderon-Urrea, 1994, DeLong et al., 1993) มีการศึกษาเกี่ยวข้องกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศในข้าวโพดมากมาย โดยจากการศึกษาพบว่ากลุ่มยีน *TASSELSEED (Ts)* จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการกำหนดเพศโดยจะทำให้มีการพัฒนาเกสรเพศผู้และทำให้เกสรเพศเมียแก่งหรือลดการแสดงออกของเกสรเพศเมียในช่อดอกเพศผู้ (Juarez and Banks, 1998) ซึ่งถ้าหากเกิดการกลายพันธุ์ของกลุ่มยีน *TASSELSEED* จะทำให้เกสรเพศเมียมีการพัฒนาในช่อดอกเพศผู้ (Nickerson and Dale, 1955) อย่างเช่น ยีน *TASSELSEED2 (Ts2)* ในข้าวโพดจะทำให้ อวัยวะเพศเมียแก่งในระหว่างการพัฒนาช่อดอกเพศผู้แต่การกลายพันธุ์ของยีน *Ts2* จะส่งผลทำให้มีการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียในช่อดอกเพศผู้ (DeLong et al., 1993) ซึ่งทำให้เกิดการพัฒนาช่อดอกเพศเมียแทนที่ช่อดอกเพศผู้ (Kim et al., 2007) สำหรับในการพัฒนาช่อดอกเพศเมียนั้นไม่พบการแสดงออกของยีน *Ts2* (Juarez and Banks, 1998) ยีน *Ts2* จะถอดรหัสได้โปรตีนซึ่งเป็นเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 336 ลำดับ โดยที่ปลาย C-terminal คือ short-chain dehydrogenase / reductase (SDR) domain และปลาย N-terminal จะประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 50 ลำดับ (DeLong et al., 1993; Oppermann et al., 2003; Filling et al., 2002) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สำหรับการแก่งของเกสรเพศเมียในช่อดอกเพศผู้ โดยจะแสดงออกใน subepidermal cells ของเกสรตัวเมียบอกก่อนที่การแก่งจะเกิดขึ้น (DeLong et al., 1993) และยังมีบทบาทในกระบวนการเมตาบอลิซึมของฮอร์โมน (hormone metabolism) โดยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนในการพัฒนาดอกซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาเกสรเพศเมียและการแสดงออกทาง

เพศ (Kinney et al., 2003) และการควบคุมการแสดงออกของยีน *Ts2* คือยีน *TASSELSEED1 (Ts1)* และการทำงานร่วมกันของยีน *Ts2* และยีน *Ts1* เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์เกสรเพศเมียในดอกเพศผู้ (Adam et al., 2011) กระบวนการแท้งของเกสรเพศเมียเกิดจากการทำงานของยีน *Ts2* และยีน *Ts1* (Dellaporta and Calderon-Urrea, 1994; Irish et al., 1994) การกลายพันธุ์ของทั้งสองจะทำให้ไม่เกิดการแท้งของเกสรเพศเมียทั้งในช่อดอกเพศผู้และในช่อดอกเพศเมียที่อยู่ด้านล่างของลำต้นอีกด้วย (Li et al., 1997) นอกจากนี้ในปี 2006 Malcomber และ Kellogg ได้อธิบายเพิ่มเติมอีกว่า การกลายพันธุ์ของยีน *Ts1*, *Ts2*, และ *Ts5* จะส่งผลต่อการพัฒนาเพศเมียในช่อดอกเพศผู้และการพัฒนาช่อดอกเพศเมียบริเวณด้านล่างของลำต้น โดยจะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเพศเมียและยับยั้งการพัฒนาเพศผู้ ไม่เพียงแต่ยีน *Ts1*, *Ts2*, และ *Ts5* ในกลุ่มยีน *TASSELSEED* ที่ส่งผลต่อลักษณะของเพศเท่านั้นแต่ยีน *Ts4* และ *Ts6* ก็เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเพศเช่นกัน (Juarez and Banks, 1998) นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของยีน *Ts4* และ *Ts6* ยังสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *Ts1* และยีน *Ts2* อีกด้วย (Irish et al., 1994) การพัฒนาดอกจะเริ่มจากพัฒนาดอกให้มีทั้งเพศผู้และเพศเมียในดอกเดียวกันแต่ภายหลังจะมีการควบคุมไม่ให้เกิดการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ในช่อดอกเพศเมียและทำให้เกิดการแท้งของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียในช่อดอกเพศผู้ (Cheng et al., 1983) โดยการกลายพันธุ์ของยีน *Ts4* จะทำให้เกสรเพศเมียไม่เกิดการแท้งและอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ไม่พัฒนาส่งผลให้มีการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียอย่างสมบูรณ์ในช่อดอกเพศผู้ นอกจากนี้ยีน *Ts4* ยังจะให้มีการแตกกิ่งอย่างผิดปกติของช่อดอกอีกด้วย (Chuck et al., 2007) สำหรับยีน *Ts6* เมื่อเกิดการกลายพันธุ์จะส่งผลให้มีการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียและแทรกแซงรูปแบบการแตกกิ่งของช่อดอกเช่นกัน (Irish, 1997) จะเห็นได้ว่ายีน *Ts4* และ *Ts6* เกี่ยวข้องกับการพัฒนาอวัยวะของดอกทั้งในช่อดอกเพศผู้และเพศเมีย โดยจะทำให้เพศผู้มีความผิดปกติแต่ในเพศเมียมีการพัฒนาอย่างปกติและทำให้ช่อดอกเป็นหมัน (Irish and Nelson, 1989) ซึ่งยีน *Ts4* และ *Ts6* นั้นจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการถอดรหัส (transcription) แต่จะไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมน (hormone biosynthesis) (Hartwig et al., 2011) นอกจากนี้ยีนในกลุ่ม *TASSELSEED* ที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศแล้วยีน *silkless (sk1)* ก็เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศเช่นกัน ยีน *sk1* เกี่ยวข้องกับการแท้งของเกสรเพศเมียและเพศผู้และมีหน้าที่สำคัญอย่างมากในการพัฒนาเกสรเพศเมียในช่อดอกเพศเมีย (Jones et al., 1925) ยีน *sk1* ยังจะขัดขวางการพัฒนา styles ในช่อดอกเพศเมียและทำให้การพัฒนาเพศผู้เกิดขึ้นอย่างปกติบนช่อดอกเพศผู้อีกด้วย ซึ่งหากยีนเกิดการกลายพันธุ์จะยังคงทำให้มีการพัฒนา styles ในช่อดอกเพศเมียแต่จะทำให้การพัฒนาเพศผู้ไม่สมบูรณ์บนช่อดอกเพศผู้ (Irish and Nelson, 1989) และจะขัดขวางการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมียซึ่งทำให้เกสรเพศเมียแท้ง (Veit et al., 1991;

Irish and Nelson 1993; Calderon-Urrea and Dellaporta 1999) นอกจากนี้ยีน *sk1* ยังมีหน้าที่ชัดเจนวิธีในการกระตุ้นการทำงานของยีน *Ts2* ด้วย (Adam et al., 2011)

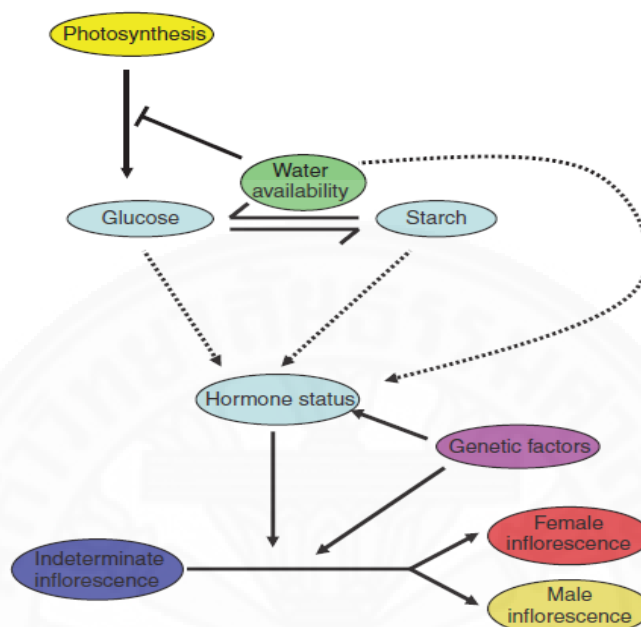
ยีนที่เกี่ยวข้องกับยีนกำหนดเพศอีกหนึ่งยีนคือยีน *indeterminate spikelet1 (ids1)* จะถอดรหัสได้โปรตีนคล้ายกับยีน *APETALA2* ซึ่งทำหน้าที่ในการพัฒนาดอกและการแตกกิ่ง (Chuck et al., 2007) ยีน *ids1* จะถูกควบคุมการแสดงออกโดยยีน *Ts4* (DeLong et al., 1993) ซึ่งสามารถอธิบายการกำหนดเพศของยีน *ids1* ได้จากภาพที่ 2.9 ในดอกที่มีการทำงานของยีน *Ts4*



ภาพที่ 2.9 แสดงการทำงานของยีน *Ids* ซึ่งขึ้นอยู่กับ การแสดงออกของยีน *Ts4* จาก “MicroRNA, sex determination and floral meristem determinacy in maize,” โดย J. A. Banks, 2008, *Genome biology*, 9(1), p. 1.

ปกติจะสามารถถอดรหัสจากยีน *Ts4* ได้อาร์เอ็นเอจากนั้นอาร์เอ็นเอของยีน *Ts4* จะไปขัดขวางการถอดรหัสจากอาร์เอ็นเอของยีน *ids1* จะทำให้มีการพัฒนาช่อดอกไปเป็นช่อดอกเพศผู้ แต่หากยีน *Ts4* เกิดการกลายพันธุ์จะทำให้ไม่มีการถอดรหัสได้อาร์เอ็นเอมาขัดขวางการถอดรหัสอาร์เอ็นเอของยีน *Ts4* จะส่งผลทำให้เกิดการพัฒนาช่อดอกเพศเมีย นอกจากนี้จะเกิดการขัดขวางของอาร์เอ็นเอจากยีน *Ts4* แล้วยีน *ids1* ยังสามารถเกิดการกลายพันธุ์ได้จากการแทรกของ transposon ในอินทรอนต่างๆที่อยู่ในยีนทำให้ถอดรหัสได้โปรตีนที่มี binding site ผิดปกติทำให้ไม่สามารถจับกับอาร์เอ็นเอของยีน *Ts4* ได้ (Banks, 2008) นอกจากนี้ยีน *glossy15 (gl15)* ในข้าวโพดนั้นหากมีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนใบในข้าวโพดและยังเกี่ยวข้องกับการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์อีกด้วย (Lauter, 2005) จากที่กล่าวมานั้นจะเห็นได้ว่ามีหลายยีนที่ทำงานหรือมีการแสดงออกที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศโดยตรงซึ่งนอกจากยีนเหล่านั้นแล้วยังมีการศึกษาถึงยีนที่แสดงออกเกี่ยวกับการกระตุ้นการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพื่อใช้ในการกำหนดเพศเนื่องจากภาพ 2.10 จะเห็นได้ว่านอกจากปัจจัยทาง

พันธุกรรมที่มีความสำคัญต่อการกำหนดเพศแล้วฮอร์โมนยังมีความสำคัญอีกด้วย จึงมีคันทายินที่ เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศโดยอ้อมซึ่งจะกระตุ้นเกี่ยวกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนในการกำหนดเพศ

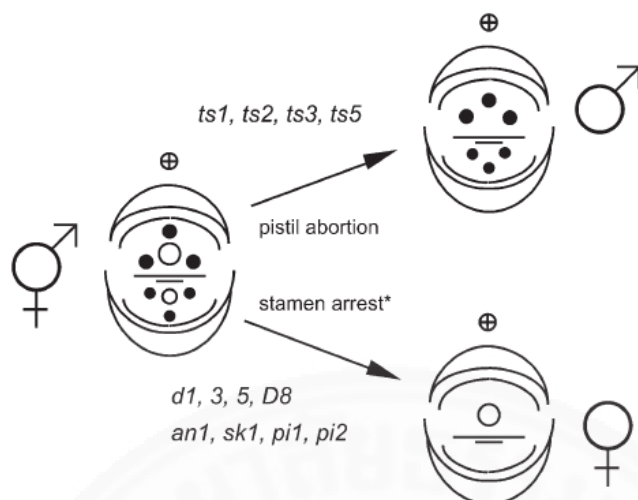


ภาพที่ 2.10 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการกำหนดเพศของช่อดอกในปาล์มน้ำมัน จาก “Environmental regulation of sex determination in oil palm: current knowledge and insights from other species,” โดย H. Adam, M. Collin, F. Richaud, T. Beulé, D. Cros, A. Omoré, ... & J. W. Tregear, 2011, *Annals of botany*, 108(8), p 1529-1537.

ฮอร์โมนจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเพศในพืชโดยฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน (Gibberellin) และฮอร์โมนเอทิลีน (ethylene) ส่วนฮอร์โมนออกซิน (Auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) จะสัมพันธ์กับการควบคุมการกำหนดการพัฒนาส่วนต่างๆพืชในพืชหลายๆชนิด (Irish and Nelson, 1989) ในข้าวโพดฮอร์โมนจิบเบอเรลลินจะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาดอกเพศเมียในช่อดอกเพศผู้แต่จะมีการแสดงออกที่ลดลงสำหรับดอกเพศผู้ในดอกเพศเมีย (Banks, 2008) และจากการลดลงของระดับฮอร์โมนจิบเบอเรลลินมีการลดลงขีดขวางการแทงช่อดอกเพศผู้ในช่อดอกเพศเมีย ส่งผลให้มีการพัฒนาดอกเพศผู้ในช่อดอกเพศเมีย (Bensen et al., 1995) ซึ่งยีนที่จะควบคุมระดับฮอร์โมนจิบเบอเรลลินคือยีน *dwarf (d)* โดยพบว่าหากยีน *d* มีการกลายพันธุ์จะทำให้กระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินลดลงหรือในบางครั้งก็อาจจะยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินได้ (Lebel-Hardenack and Grant, 1997) ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีน *d* ที่ทำให้ปริมาณจิบเบอเรลลิน

ดลงโดยจะส่งผลทำให้มีการพัฒนาช่อดอกเพศเมียลดลงแต่สำหรับการพัฒนาเกสรเพศผู้จะมีการพัฒนาปกติ (Irish and Nelson, 1989) นอกจากนี้อิทธิพลของฮอร์โมนจิบเบอเรลลินที่มีต่อการกำหนดเพศในข้าวโพดยังจะพัฒนาอับละอองเรณู (anther) ในช่อดอกเพศเมียอีกด้วย (Dellaporta and Calderon-Urrea, 1994) โดยยีนที่อยู่ในกลุ่มของยีน *d* ที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศคือยีน *d1*, *d2*, *d3*, *d5* และ *d8* (Phinney, 1984) นอกจากกลุ่มของยีน *d* แล้วก็ยังมีอีกหนึ่งยีนที่เกี่ยวข้องคือยีน *anther-ear (an)* ซึ่งจะมีหน้าที่คล้ายกับยีน *d* โดยส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินซึ่งทำให้มีการสร้างฮอร์โมนจิบเบอเรลลินลดลงหรือยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ (Phinney et al., 1961) โดยยีน *an1* จะผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ *ent-kaurene* ซึ่งเป็น intermediate ในกระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน (Lebel-Hardenack and Grant, 1997) และจากการกลายพันธุ์ของยีน *an1* จะส่งผลต่อการพัฒนาเพศในช่อดอกเพศเมียและดอกเพศผู้จากระดับฮอร์โมนจิบเบอเรลลินที่สังเคราะห์ได้และนอกจากจะเกี่ยวกับการกำหนดเพศแล้ว Bensen et al. (1995) ยังพบว่าอีกการกลายพันธุ์ของยีน *an1* จะเกี่ยวข้องกับการลดความสูงของพืชอีกด้วย (Adam et al., 2011) นอกจากฮอร์โมนจิบเบอเรลลินแล้วในข้าวโพดฮอร์โมน brassinosteroid และ jasmonate จะทำงานร่วมกันในการกวดการพัฒนาของดอกเพศผู้ (Acosta, et al., 2009; Hartwig et al., 2011) ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศในพืชอื่นนอกจากข้าวโพดได้ถูกพบหลายชนิด เช่น วิถีเมตาบอลิกของไซโตไคนิน (cytokinin metabolic pathway) เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศขององุ่น (*Vitis vinifera*) (Fechter et al., 2002), ฮอร์โมนจิบเบอเรลลินในแตงกวาจะทำให้ช่อดอกเพศเมียกลายเป็นช่อดอกเพศผู้ (Lebel-Hardenack and Grant, 1997) และยังกระตุ้นการแสดงออกของดอกเพศเมียของ *Cannabis sativa* และ *Spinacia oleracea* (Chalilakhyan, 1979) เป็นต้น

จากที่กล่าวมาการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศทั้งที่มีการแสดงออกในกาหนดเพศโดยตรงและยีนที่แสดงออกโดยการควบคุมฮอร์โมนในการกำหนดเพศ ส่วนใหญ่นั้นจะมีการศึกษาอย่างมากในข้าวโพด ดังนั้นการกำหนดเพศในพืชและโดยเฉพาะพืชสืบเชื้อ monoecious จะใช้ข้าวโพดเป็นพืชต้นแบบในการศึกษา ในปี 2007 Kim และคณะ ได้อธิบายเกี่ยวกับยีนกำหนดเพศในข้าวโพดดังภาพที่ 2.11 โดยผู้วิจัยได้อธิบายว่าการกำหนดเพศในข้าวโพดยีน *ts1*, *ts2*, *ts3* และ *ts5* จะทำให้อวัยวะเพศเมียเกิดการแท้งแล้วเกิดการพัฒนาช่อดอกเพศผู้ในขณะที่ยีน *d1*, *d3*, *d5*, *d8* *an1*, *sk1*, *pi1* และ *pi2* จะควบคุมการแสดงออกของอวัยวะเพศผู้แล้วทำให้เกิดการพัฒนาเพศเมียแทน



ภาพที่ 2.11 การทำงานของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศในข้าวโพด จาก “Cell cycle arrest of stamen initials in maize sex determination,” โดย J. C. Kim, H. Laparra, A. Calderón-Urrea, J. P. Mottinger, M. A. Moreno, & S. L. Dellaporta, 2007, *Genetics*, 177(4), p. 2547-2551.

นอกจากจะมีการศึกษาในข้าวโพดแล้วยังมีการศึกษายีนกำหนดเพศในพืชอื่นอีก เช่น ในเมล่อน (*Cucumis melo*) การกำหนดเพศจะถูกควบคุมด้วยแอลลีลที่แตกต่างกัน 2 โลไซ คือ แอลลีลของ andromonoecious (a) และแอลลีลของ gynoeceous (g) (Poole and Grimball, 1939) Boualem et al. (2008) พบว่ายีนเด่นแอลลีล a หรือเรียกอีกอย่างว่ายีน *CmACS-7* จะถอดรหัสได้ ethylene biosynthesis enzyme ซึ่งจะกดการพัฒนาเพศผู้ในดอกเพศเมียเมื่อยีนถูกกระตุ้นให้ทำงาน ส่วนในดอกเพศผู้ยีน *CmACS-7* จะถูกกดการแสดงออกโดยยีน *CmWIP1* ซึ่งจะทำให้มีการพัฒนาเกสรเพศผู้อย่างปกติ (Boualem et al., 2008, Martin et al., 2009) การแสดงออกของยีน *CmWIP1* ทำให้เกสรเพศเมียเกิดการแท้ง แต่เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *CmWIP1* โดยการแทรกตัวของ transposon บริเวณโปรโมเตอร์ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดกระบวนการ DNA methylation ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CmWIP1* (Martin et al., 2009) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงจากการพัฒนาเพศผู้ไปเป็นเพศเมีย Martin et al. (2009) สำหรับยีนด้อยแอลลีล g จะทำให้เกิดการพัฒนาของดอกเพศเมียแทนดอกเพศผู้ในเมล่อนที่มีดอกไม่สมบูรณ์เพศ (Martin et al., 2009) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการกำหนดเพศในเมล่อนเกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างยีน *CmACS-7* และยีน *CmWIP1* โดยจะส่งผลต่อการพัฒนาทั้งในดอกเพศผู้ (andromonoecious), ดอกเพศเมีย (Gynoeceous) และดอกสมบูรณ์เพศ (hermaphrodite) นอกจากนี้เมล่อนแล้วยังพบยีน

gynomonoecious sex form1 (gsf1) ใน *Tripsacum dactyloides* ซึ่งเป็นพืชที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับข้าวโพด โดยพบว่ายีน *gsf1* จะมีหน้าที่คล้ายกับยีน *Ts2* ในข้าวโพด (Li et al., 1997) การกลายพันธุ์ของยีน *gsf1* จะขัดขวางการแทงของเกสรเพศเมียในช่อดอกเพศผู้ ซึ่งการพัฒนาของเกสรเพศเมียในช่อดอกเกี่ยวข้องกับการควบคุมการพัฒนาของเกสรเพศผู้ในระยะที่แตกต่างกันอีกด้วย (Li et al., 1997)

สำหรับการกำหนดเพศในปาล์มน้ำมันนั้นจะเกิดในปาล์มน้ำมันที่โตเต็มที่ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างช่อดอกเพศผู้และช่อดอกเพศเมียในระหว่างการเจริญเติบโตซึ่งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญ 4 ปัจจัยคือ สิ่งแวดล้อม (น้ำ, สภาวะเครียด), เมตาบอลิก, ระดับฮอร์โมนและพันธุกรรม (Adam et al., 2007) หากต้นปาล์มน้ำมันอยู่ในสภาวะเครียดหรือได้รับปริมาณที่น้อยจะส่งผลกระตุ้นให้มีการพัฒนาช่อดอกเพศผู้มากกว่าช่อดอกเพศเมียและทำให้ช่อดอกเพศเมียมีโอกาสเกิดการแทงได้สูงกว่าสภาวะปกติ (Hartley, 1988, Adam et al., 2011, Jones, 1997)

2.3 การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันมี 2 วิธีหลักๆ คือ

1) วิธีการประยุกต์การคัดเลือกแบบวงจร (modified recurrent selection, MRS)

วิธีการนี้ใช้กันมากในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันของประเทศมาเลเซีย ในอดีตการปรับปรุงพันธุ์ภายในประชากรโดยการคัดเลือกแบบวงจรมีการใช้กันอย่างกว้างขวางในปาล์มน้ำมันเดลี ดูรา เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ใช้ปลูกกันเป็นการค้าในขณะนั้นและยังไม่มีปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราที่จะนำมาใช้ในการผลิตลูกผสมเทอเนอรา รวมทั้งยังมีการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรมน้อย แต่ภายหลังจากที่การปรับปรุงพันธุ์เริ่มมุ่งเน้นในการผลิตลูกผสมเทอเนอรา และมีการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรมมากขึ้น การปรับปรุงระหว่างประชากรจึงมีบทบาทสำคัญและถูกนำมาใช้ในทุกโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ โดยได้แยกประชากรปาล์มน้ำมันออกเป็น 2 กลุ่มประชากร ได้แก่ กลุ่มแม่พันธุ์ คือ ประชากรดูรา และกลุ่มพ่อพันธุ์ คือ ประชากรเทอเนอราที่นำเข้ามาจากประเทศไนจีเรียเพื่อนำมาผลิตพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา (ธีระ, 2558) ซึ่งจะคัดเลือกต้นพันธุ์พ่อพิสิเฟอรา จากการผสมตัวเองของเทอเนอรา, คู่ผสมแบบ เทอเนอรา x เทอเนอรา, เทอเนอรา x พิสิเฟอรา, พิสิเฟอรา x พิสิเฟอรา หรือการผสมตัวเองของพิสิเฟอรา และคัดเลือกต้นพันธุ์แม่ดูรา จากการผสมตัวเองของดูรา หรือคู่ผสมแบบ ดูรา x ดูรา ทำการผสมพันธุ์เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์คู่ผสม คัดเลือกพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่จากผลการทดสอบลูกผสม (progeny test) และคัดเลือกต้นพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ตามเกณฑ์มาตรฐานสำหรับผลิตเมล็ดพันธุ์

(seed production) ในช่วงเวลาเดียวกันคัดเลือกสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในรอบถัดไป โดยพิจารณาผลจากการปรับปรุงพันธุ์รอบแรก ที่มีความสามารถในการรวมตัวทั่วไปของยีน (general combining ability) และความสามารถในการรวมตัวเฉพาะของยีน (specific combining ability) ทำการผสมพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีอยู่เดิม หรือนำเข้ามาใหม่ (New introduction) เพื่อขยายฐานพันธุกรรมให้กว้างขึ้น (Hardon, 1970; วิภาวี, 2553)

2) วิธีการประยุกต์การคัดเลือกแบบวงจรในสองประชากรพร้อมกัน (modified reciprocal recurrent selection, MRRS)

วิธีการนี้ใช้กันมากในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันของหลายประเทศในทวีปแอฟริกา เช่น โกตดิวัวร์ ไนจีเรีย เป็นต้น (Sparnaaij, 1969) รวมทั้งประเทศในอินโดนีเซีย โดยวิธีการนี้ได้ประยุกต์มาจากวิธีการคัดเลือกแบบวงจรในสองประชากรพร้อมกันในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด (Comstock et al., 1949) ซึ่งสามารถศึกษาอิทธิพลของความสามารถในการรวมตัวทั่วไปและความสามารถในการรวมตัวเฉพาะของเชื้อพันธุกรรมได้ จากผลการผสมข้ามระหว่างปาล์มน้ำมันเดลี ดูรา กับแอฟริกันเทอเนอราและฟิสเฟอรา พบว่าลูกผสมที่ได้มีผลผลิตสูงขึ้น ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันทั้งสองกลุ่ม (ธีระ, 2558)

2.4 เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic Markers)

เครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) คือ เครื่องหมายหรือตัวชี้วัดที่สามารถระบุความแตกต่าง หรือจำแนกลักษณะปรากฏ (phenotype) และลักษณะทางพันธุกรรม (genetics) ของสิ่งมีชีวิตได้ เครื่องหมายทางพันธุกรรมดังกล่าวต้องสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกรุ่นหลานได้ (ศุภมิตร, 2012) โดยจุดประสงค์หลักเพื่อใช้ตรวจสอบฟีโนไทป์หรือพื้นฐานทางพันธุกรรมสำหรับการประเมินความแปรผันทางพันธุกรรม (Singh et al., 2014) เครื่องหมายทางพันธุกรรมมีการนำมาใช้มาอย่างยาวนานโดยเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดแรกที่ถูกนำมาใช้งานปรับปรุงพันธุ์พืชคือ เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological markers) แต่ในปัจจุบันเครื่องหมายทางพันธุกรรมสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทได้แก่ (Semagn et al., 2006)

2.4.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)

เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาเป็นเครื่องหมายชนิดแรกที่ใช้การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยดูจากความแตกต่างของลักษณะภายนอกทางสัณฐานหรือทางสรีรวิทยา เช่น รูปร่าง, น้ำหนัก, สี, ผิว, ลักษณะของใบ, ลักษณะหนาม และอื่นๆ เป็นต้น (Khanam et al., 2012) ที่ถูก

ควบคุมด้วยยีนที่เชื่อมโยงกับยีนที่สนใจ (linkage gene) โดยเฉพาะการแสดงออกของยีนนั้นต้องไม่ได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมจะทำให้ผลการศึกษามีความแม่นยำมากขึ้น ตัวอย่างการใช้ประโยชน์เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยามาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงในสภาวะแวดล้อมต่างๆ (Staub et al., 1996) เป็นต้น ถึงแม้ว่าเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาสามารถใช้คัดเลือกได้ง่ายและทำได้รวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามการใช้ลักษณะสัณฐานเพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถทำได้ในสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้หรือมีสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะที่สิ่งแวดล้อมมีผลต่อการเจริญเติบโต (Khanam et al., 2012) ดังนั้นการอธิบายลักษณะที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญจะต้องอ้างอิงถึงข้อมูลของเพดติกรีและสภาวะสิ่งแวดล้อมด้วย (Staub et al., 1996) นอกจากนี้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยานั้นมีจำนวนจำกัดการในแสดงออกโดยลักษณะที่ขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมนั้นในบางครั้งไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างพันธุ์แท้ (Homozygous) และพันธุ์ทาง (Heterozygous) ได้และมีการแสดงออกเฉพาะในบางระยะของการพัฒนาหรือบางเนื้อเยื่อ ทำให้ตรวจสอบผลผลิตพลาดได้ดังนั้นการใช้เครื่องหมายสัณฐานวิทยาในบางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษเท่านั้น (สุรินทร์, 2552; กมล, 2555)

2.4.2 เครื่องหมายชีวเคมี (Biochemical marker)

เครื่องหมายชีวเคมีหรือเครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เป็นเครื่องหมายที่มีการพัฒนาถัดจากเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นการตรวจสอบโดยใช้ความแตกต่างของตำแหน่งการเรียงตัวของกรดอะมิโนของสารละลายโปรตีน (soluble protein) ของสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกันหรือสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน (Al-Samarai and Al-Kazaz, 2015) เช่น ไอโซไซม์ หมายถึงโมเลกุลโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันแต่มีลำดับกรดอะมิโนต่างกันอาจทำให้ประจุแตกต่างกันหรือน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างด้วยวิธี Electrophoresis (Markert and Møller, 1959) ดังนั้นในพืชต่างจีโนไทป์อาจมีไอโซไซม์ต่างกันทำให้มีจำนวนหรือตำแหน่งของแถบสีต่างกันเนื่องจากปฏิกิริยาเร่งของเอนไซม์นั้นมีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาชีวเคมี ซึ่งจะสามารถทำให้รู้ตำแหน่งของเอนไซม์ที่จำเพาะบนเจลโดยเกิดจากการทำหน้าที่อย่างเหมาะสมระหว่างสารตั้งต้นและโคแฟกเตอร์นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้จะทำให้เกิดสีต่างกันเมื่อผลผลิตที่ได้ต่างกันโดยผลผลิตที่เกิดสีจะปรากฏบนเจลในลักษณะแถบแบน (Staub et al., 1996) สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพีซีโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้คือเป็นเครื่องหมายชนิดข่มร่วม (codominant) และใช้ค่าใช้จ่ายไม่สูง นอกจากนี้ยังรวมถึงสาร Secondary metabolites ได้ถูกนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายชีวเคมีด้วย (Jonah et al., 2011) อย่างเช่น anthocyanins, phenolics เป็นต้น ยังถูกใช้เป็นเครื่องหมายชนิดแรกที้นำไปแยกความ

แตกต่างกันระหว่างพืชอีกด้วย (Grover and Sharma, 2016) การวิเคราะห์ secondary metabolites เป็นวิธีที่จากวิเคราะห์ที่พืชผลิตออกมาโดยวิธีศึกษาจะง่ายแต่มีความหลากหลายสูง (Joshi et al, 2011) ข้อจำกัดคือยีนที่ตรวจสอบได้มีจำนวนไม่มากยีนนั้นต้องมีการแสดงออกจึงสามารถศึกษาได้ซึ่งขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมและเนื้อเยื่อและระยะของการเจริญเติบโต นอกจากนี้ไอโซไซม์ โลไซ (isozyme loci) มีจำนวนน้อยซึ่งเกิดจากกระบวนการตกแต่งหลังแปลรหัส (post-translational modifications) (Staub et al., 1982) ซึ่งการนำไปใช้ค่อนข้างจำกัดเนื่องจากโปรตีนและไอโซไซม์ไม่ใช่สารพันธุกรรมแต่ก็คือผลผลิตของยีนเท่านั้น ดังนั้นสิ่งแวดล้อมจะมีผลต่อเครื่องหมายชีวเคมี (Al-Samarai and Al-Kazaz, 2015) และที่สำคัญคือไอโปรตีนและไอโซไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ในเวลาจำกัดไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้นาน

2.4.3 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker)

เครื่องหมายโมเลกุลหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่งหรือในระดับต่าง สปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งหนึ่งๆบนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552) ซึ่งความหลากหลายที่เกิดขึ้นเกิดจากการกลายพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมในบริเวณที่สนใจนั่นเอง (Al-Samarai and Al-Kazaz, 2015)

สิ่งที่ทำให้พืชแต่ละต้นหรือแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันนั้นก็คือดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอจะม้วนแพ็คตัวเป็นโครโมโซมเพื่อเข้าคู่กันโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซมจะควบคุมการแสดงออกลักษณะในพืช (Semagn et al., 2006) จีโนมดีเอ็นเอ (DNA; Deoxyribo nucleic acid) เป็นสารพันธุกรรมที่กำหนดรหัสชีวิตของสิ่งมีชีวิต ซึ่งความแตกต่างของการจัดเรียงตัวของเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ได้แก่ อะดีนีน (adenine) ควอนีน (guanine) ไซโตซีน (cytosine) และ ไทมิน (thymine) มีผลทำให้เกิดความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดหรือแต่ละสายพันธุ์โดยจะมีรหัสพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์ ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดหรือสายพันธุ์ได้

ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ได้เข้ามามีบทบาทในงานด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เนื่องจากการจัดกลุ่มหรือการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาทำได้ยากโดยเฉพาะพืช ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึง (สรพงศ์, 2554) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มี

ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ดังนั้นจึงใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (varietal identification) นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่มีจุดประสงค์เพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีตามที่ต้องการเรียกว่า การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection, MAS) ซึ่งเป็นวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการคัดเลือกจากฟีโนไทป์เนื่องจากการคัดเลือกจากจีโนไทป์โดยตรง (สุริพร, 2546) เครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นสามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตจึงมีส่วนช่วยประหยัดเวลา ลดแรงงาน ลดต้นทุนและพื้นที่ในการเพาะปลูกได้ตั้งนั้นงานปรับปรุงพืชซึ่งเป็นหัวใจสำคัญในการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ให้มีผลผลิตสูงขึ้นและเป็นที่ต้องการของเกษตรกรจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการคัดเลือกและแยกความแตกต่างของลักษณะเหล่านั้นจึงทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอหรือเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามามีบทบาทและเพิ่มความสำคัญมากขึ้น (สรพวงค์, 2554) นอกจากนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอยังได้รับความนิยมอย่างมากในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (genetic diversity) อีกด้วย (Mondini et al., 2009; จุฑาพร, 2555)

การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular biology) ซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือ “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA Fingerprinting) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นหมายถึงแบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆนั้นเองโดย ความแปรผันหรือความหลากหลายที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากการแทรก (insertion) การขาดหาย (deletion) เปลี่ยนตำแหน่ง (translocations) การดuplications และ การกลายพันธุ์ (mutant) จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้สามารถตรวจสอบและวัดการเปลี่ยนแปลงหรือการแปรผันต่างๆได้จากอวัยวะส่วนต่างของสิ่งมีชีวิต อย่างเช่น เลือด, เนื้อเยื่อ, ใบ และอื่นๆ เป็นต้น (Singh et al., 2014) ซึ่งจะสามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบได้และประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถแบ่งออกตามวิธีการพัฒนาเครื่องหมายจากบริเวณที่สนใจได้ 3 ประเภทคือ 1. พัฒนาบริเวณโครโมโซมที่มีลักษณะเด่นๆหรือแอลลีลที่มีความจำเพาะ 2. บริเวณดีเอ็นเอที่รู้ตำแหน่งบนจีโนม 3. ยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของลักษณะ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการระบุตัวอย่างที่สนใจหรือเซลล์ที่มีสารพันธุกรรมที่นำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายและนำมาใช้เป็นโพลบเพื่อเป็นเครื่องหมายในนิวเคลียส, โครโมโซมหรือโลคัส (King and Stansfield, 1990, Semagn et al., 2006)

แต่สำหรับการแบ่งประเภทของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้โดยทั่วไปนั้นจะแบ่งตามวิธีตรวจสอบเครื่องหมายโดยสามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ 3 ประเภท คือ (Gupta et al., 1999)

1. Hybridization-based DNA marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาเป็นเครื่องหมายแรกโดยเครื่องหมายที่ถูกพัฒนาขึ้นคือ เครื่องหมาย restriction fragment length polymorphism (RFLP) เพื่อใช้ในการสร้างแผนที่โมเลกุลของจีโนมมนุษย์ (Botstein et al., 1980) RFLP เป็นเครื่องหมายที่จะสามารถตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่มีความยาวแตกต่างกันที่เกิดจากการตัดจีโนมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Grover and Sharma, 2016) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเขาของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) ตัวอย่างได้แก่เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) และลายพิมพ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide fingerprinting) (Tanksley et al., 1989; McCouch and Tanksley, 1991; Kochert, 1994; Gupta et al., 1999)

2. PCR-based marker เป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวดีเอ็นเอหรือเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction (PCR) technique) ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟพีดี (RAPD marker) เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (AFLP marker) (Vos et al., 1995), และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) หรือ เอสเอสอาร์ (SSR marker) (Brown et al., 1996, Powell et al., 1996) เป็นต้น

3. DNA chip and sequencing-based DNA marker เช่น single nucleotide polymorphisms (SNPs) คือ โพลิมอร์ฟิซึมที่จำเพาะซึ่งเกิดจากความแตกต่างของลำดับเบสเพียงหนึ่งลำดับเท่านั้น (substitution, deletion or insertion) ถึงแม้ว่าสัดส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนของจีโนมที่เป็นส่วน non-coding แต่ก็มีความสำคัญซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดการกลายพันธุ์ (mutant) ในยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคหรือการแสดงออกของลักษณะที่สนใจ (Grover and Sharma, 2016)

ปัจจุบันมีการคิดค้นสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นมากมายหลายชนิดมีการใช้อักษรย่อชื่อของเทคนิคอย่างหลากหลายในบางกรณีมีอักษรย่อของเทคนิคต่างกันแต่เป็นเทคนิควิธีเดียวกันทำให้เกิดความสับสนสำหรับผู้เริ่มทำงานวิจัยทางด้านนี้ ดังนั้นการจัดกลุ่มชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหมาะสมจะทำให้ผู้ที่สนใจทางด้านนี้ทำความเข้าใจได้ง่ายขึ้นโดยอาศัยพื้นฐานทางพันธุศาสตร์ของความแตกต่างระหว่างการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วม (codominant) และแบบข่มสมบูรณ์

(complete dominant) ดังนั้นจึงทำให้สามารถจัดกลุ่มชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอได้สองกลุ่มที่แสดงจีโนไทป์ของการถ่ายทอดพันธุกรรมที่แตกต่างกัน คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วม (codominant marker) เป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างของจีโนไทป์ในตำแหน่งที่จำเพาะของจีโนม จำนวนแถบดีเอ็นเอจะมีจำนวนไม่มาก เช่น RFLP, SSR เป็นต้น ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มสมบูรณ์ (dominant marker) เป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างของจีโนไทป์ในตำแหน่งไม่จำเพาะแต่กระจายทั่วจีโนม ดังนั้นจำนวนแถบเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีจำนวนมาก (multiple dominant marker) ขึ้นกับชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิด เช่น เครื่องหมาย AFLP (Vos et al., 1995), RAPD เป็นต้น แต่ถ้าพิจารณาระดับโมเลกุลความแตกต่างของจีโนไทป์หรือการเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) สามารถแบ่งกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอได้สองแบบคือ แบบแรกเป็นความแตกต่างของลำดับเบส (sequence polymorphism) ในกรณีนี้เป็นความแตกต่างที่เกิดจากการแทรก (insertion) การขาดหาย (deletion) การแทนที่ (substitution) ของเบส แบบที่สองเป็นความแตกต่างของจำนวนลำดับเบสซ้ำ (repeated sequence) (กิตติพัฒน์, 2548)

ถึงแม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลจะมีทั้งข้อดีและข้อเสียแต่ในหลายปีที่ผ่านมาได้มีการนำเครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ มาใช้ศึกษาในงานวิจัยทั้งในพืชและสัตว์ก็มีมากขึ้น (Gupta et al., 1999) เช่น ใช้ในการระบุ germplasm, การตรวจพันธุกรรม, การคัดแยกเซลล์ที่มีเวกเตอร์ลูกผสม (transformants), การศึกษาการจัดการจีโนม, การวิเคราะห์วิวัฒนาการ, และอื่นๆ (Rafalski et al., 1996) เนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์และตอบสนองในงานวิจัยทางพันธุศาสตร์ได้มากขึ้น เช่น สามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อประเมินความหลากหลายลักษณะทางพันธุกรรม, ใช้ในการระบุพ่อแม่ (parentage determination), การประเมินระยะห่างทางพันธุกรรม (estimation of genetic distance), การวินิจฉัยชนิดของคร่อมแฝด (twin zygosity determination and freemartinism), การระบุเพศในระยะเอ็มบริโอ (sexing of preimplantation embryos), การตรวจโรค (disease carrier identification), การพัฒนาเครื่องหมายช่วยคัดเลือก (marker-assisted selection), สามารถใช้เครื่องหมายในการตรวจหาสิ่งมีชีวิตทั้งในพืชและในสัตว์ที่เกิดจากการผสมข้าม เป็นต้น (Singh et al., 2014) นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุลยังมีวิธีในการตรวจสอบหรือการศึกษาที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก ราคาประหยัดและมีจำนวนมากอีกด้วย ในปัจจุบันการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ประโยชน์ในงานวิจัยทางด้านพืชมีความสำคัญมากและมีวิวัฒนาการมากขึ้น (Joshi et al., 2011) ซึ่งการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการช่วยคัดเลือกสำหรับการปรับปรุงพันธุ์จะทำให้การคัดเลือกมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Bueren et al., 2010; Joshi et al., 2011) โดยจะนำเครื่องหมายโมเลกุลไปใช้ในการติดตามและหาตำแหน่งยีนที่สนใจในจีโนมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์และเครื่องหมายเหล่านี้จะสัมพันธ์กับ

ลักษณะต้านทานโรคในพืชซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาได้จะมีศักยภาพสูงในการปรับปรุงพันธุ์ (Miah et al, 2013) ซึ่งปัจจุบันนี้มีข้อมูลลำดับเบสของทั้งจีโนมในสิ่งมีชีวิตมากขึ้นทำให้การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบริเวณยีนที่สนใจหรือบริเวณที่อยู่ใกล้เคียงกับยีนที่สนใจก็สามารถทำได้มากขึ้น (Poczai et al, 2013) โดยผู้วิจัยจะเลือกพัฒนาเครื่องหมายที่อยู่ใกล้ๆกับยีนมากๆ เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมักจะมีแนวโน้มอยู่ใกล้กันในระดับถัดๆไปด้วยการพัฒนาเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งการที่รู้ตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่บนโครโมโซมและรู้เครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับยีนที่จำเพาะนั้นสามารถทำให้สร้างแผนที่ทางพันธุกรรมได้และจากแผนที่ที่สร้างได้นั้นจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ก็คือไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะที่สนใจกับยีนซึ่งเรียกว่า quantitative trait loci (QTLs) โดยในการพัฒนานั้นไม่ควรจะพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในยีนที่มีการทำงานทั่วไปกล่าวคือ ทำงานเหมือนกันในแต่ละสิ่งมีชีวิตและในยีนที่ไม่มีปฏิกิริยาทางชีววิทยา นอกจากนี้ยังควรจะพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในบริเวณที่เป็นจุดเด่นในจีโนมอีกด้วย (Semagn et al., 2006) มีเครื่องหมายโมเลกุลหลายๆชนิดถูกนำมาใช้สำหรับปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (Rival, 2007) อย่างเช่นงานของ Billotte et al. ในปี 2005 และ ปี 2010 ที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันเพื่อวิเคราะห์ QTL (quantitative trait loci) กับลักษณะที่สนใจ นอกจากนี้ Putri et al. ได้ทำการประเมินความแปรผันและความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในปี 2010 เป็นต้น (Taepayoon et al., 2015)

2.5 เครื่องหมาย Intron Length Polymorphism (ILP) หรือ intron-flanking EST

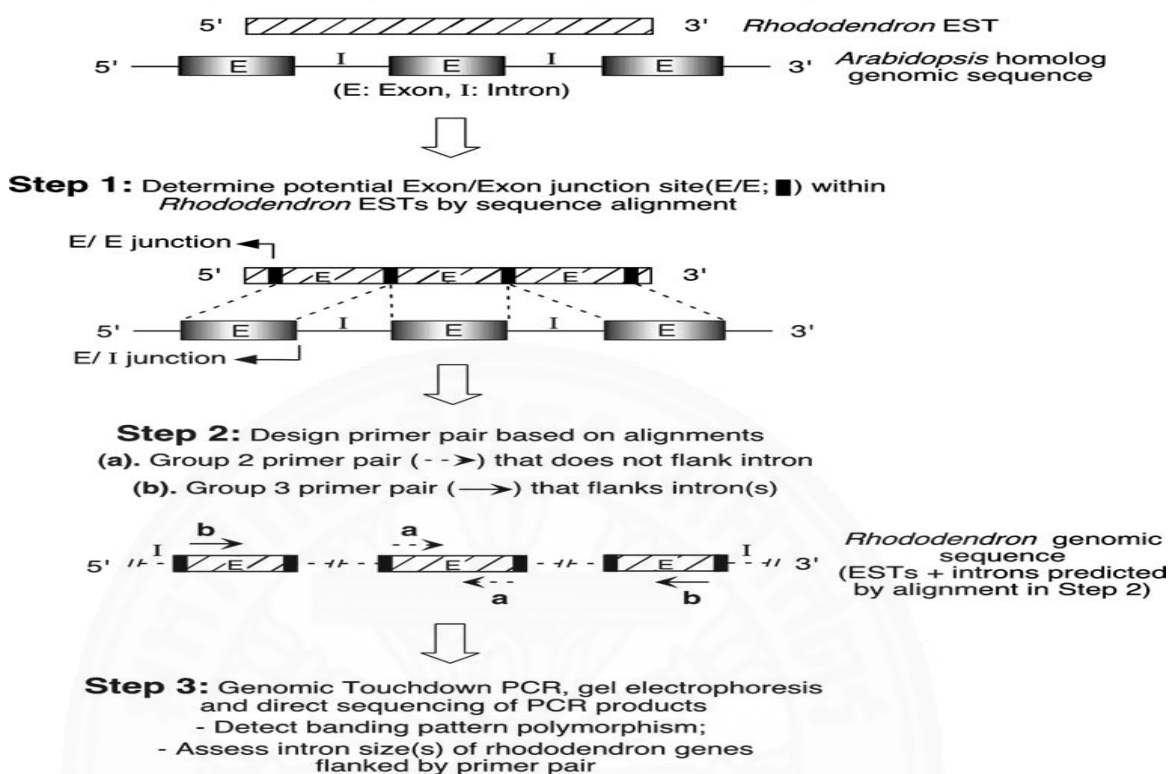
เครื่องหมายโมเลกุลหรือเครื่องหมายพันธุกรรมนั้นมีความสำคัญต่อการทำงานวิจัยต่างๆ และการปรับปรุงพันธุ์อย่างมาก (Gupta et al., 2012) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆขึ้นมาเพื่อใช้ในงานวิจัยเช่น restriction fragment length polymorphism (RFLP; Botstein et al., 1980), random amplified polymorphic DNA (RAPD; Williams et al., 1990, Welsh and McClelland 1990), inter simple sequence repeat (ISSR; Zietkiewicz et al., 1994), microsatellite or simple sequence repeat (SSR; Tautz and Renz 1984) and amplified fragment length polymorphism (AFLP; Vos et al., 1995) และเครื่องหมายโมเลกุล Intron Length Polymorphism หรือเรียกสั้นๆว่า ILP ซึ่งในบางครั้งอาจพบว่ามีชื่ออื่นๆอีก เช่น Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) (Lessa, 1992; Slade et al., 1993), Intron-flanking EST-PCR (Hui et al., 2005) และ conserved-intron scanning primers (CISP) เป็นต้น เป็นเครื่องหมายโมเลกุลอีกชนิดหนึ่งที่ได้มีการนำมาใช้ประโยชน์ในงานวิจัยต่างๆเช่นกัน โดยในการพัฒนาเครื่องหมาย

ILP นั้นได้รับแนวคิดมาจากโครงสร้างพื้นฐานของยีนที่จะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นลำดับเอ็กซอน หรือ coding sequences และส่วนที่เป็นลำดับอินทรอน หรือ non-coding sequences (Braglia et al., 2010) ซึ่งข้อดีของลำดับอินทรอนในแง่ของเครื่องหมายโมเลกุลคือลำดับอินทรอนมีความอนุรักษ์ต่ำจึงทำให้มีความแปรปรวนสูงในสิ่งมีชีวิตทั้งในปศุสัตว์เดียวกันและต่างสปีชีส์ ดังนั้นจึงสามารถทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมได้ และในขณะเดียวกันลำดับเอ็กซอนที่อยู่ขนานข้างกับลำดับอินทรอนก็มีความอนุรักษ์สูงในสิ่งมีชีวิต (Gupta et al., 2012) จึงเหมาะสมที่จะนำลำดับมาพัฒนาเป็นไพรเมอร์ต่อไป

อินทรอนเป็นลำดับดีเอ็นเอที่พบในยีนหรือคือส่วนที่เรียกว่า non-coding sequences ซึ่งเป็นส่วนที่เมื่อเกิดการถอดรหัส (transcription) กลายเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) แล้วจะถูกตัดออกในกระบวนการ pre-mRNA processing ทำให้ไม่มีการแปลรหัส (translation) ในส่วนของอินทรอนไปเป็นโปรตีน และเนื่องจากไม่มีการแปลรหัส (translation) ส่วนนี้ไปเป็นโปรตีนจึงทำให้ลำดับของอินทรอนมีความอนุรักษ์ต่ำ ดังนั้นจึงเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่ายกว่าบริเวณลำดับเอ็กซอน นอกจากนี้สำหรับในยูคาริโอตนั้นจะพบลำดับอินทรอนเป็นจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วจีโนมและที่สำคัญมีความหลากหลายสูงอีกด้วย (Jaikishan et al., 2015) โดยจะพบว่าจำนวนอินทรอนจะมีมากขึ้นในสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการมากขึ้น สำหรับพืชชั้นสูงพบว่าในหนึ่งยีนจะพบจำนวนอินทรอนโดยประมาณ 5-6 อินทรอนและมีความยาวโดยเฉลี่ย 250 ลำดับเบส (Braglia et al., 2010) ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอตจะมีความเหมาะสมมากกว่าสิ่งมีชีวิตที่เป็นโพรคาริโอต

เครื่องหมาย ILP สามารถพัฒนาได้จากลำดับ EST ซึ่งก็คือลำดับดีเอ็นเอในส่วนของยีนที่มีเพียงลำดับดีเอ็นเอที่จะถูกแปลเป็นลำดับโปรตีนต่อไปหรือนั่นก็คือลำดับยีนที่มีเพียงเอ็กซอนเท่านั้น โดยจะออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะเจาะจงกับบริเวณที่เป็นเอ็กซอน ซึ่งแต่ละเอ็กซอนนั้นจะเป็นลำดับที่ได้จากลำดับ EST ที่นำมาเปรียบเทียบกับลำดับจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อต้องการหารตำแหน่งเอ็กซอนในยีนที่มีทั้งลำดับเอ็กซอนและอินทรอนในยีนนั้นๆ จากนั้นโดยจะออกแบบคู่ไพรเมอร์ให้จำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งของคู่เอ็กซอนที่คร่อมระหว่างส่วนของอินทรอน (intron) สำหรับที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณอินทรอน การออกแบบไพรเมอร์ควรออกแบบไพรเมอร์ให้มีระยะห่างจากตำแหน่งที่เป็นซึ่งได้จากการทำนาย ประมาณ 25 เบส ทั้งทางด้านปลาย 5' และปลาย 3' (ภาพที่ 2.12) เนื่องจากบริเวณรอยต่อดังกล่าวลำดับดีเอ็นเอมักจะมี ความแปรปรวนสูงและเพื่อหลีกเลี่ยงความผิดพลาดในการที่ไพรเมอร์จะไปจับบริเวณตำแหน่งที่เป็นส่วนเชื่อมต่อกับอินทรอนกับเอ็กซอน (Hui et al., 2005)

Primer pair design and PCR product analysis



ภาพที่ 2.12 แสดงการเปรียบเทียบจีโนม เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ILP จาก “Intron-flanking EST-PCR markers: from genetic marker development to gene structure analysis in *Rhododendron*,” โดย W. Hui, F. Yan, & A. Rajeev, 2005, *Theoretical and Applied Genetics*, 111, p. 1347-1356.

intron length polymorphism (ILP) นั้นเป็นเครื่องหมายที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมมาก ซึ่งในการตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย ILP ก็สามารถทำได้ง่ายโดยวิธีพีซีอาร์ที่เรียกว่า exon-primed intron-crossing PCR (EPIC-PCR) (Wang et al., 2006) และยังสามารถศึกษาและพัฒนา กับหลายสิ่งมีชีวิตมาแล้วเช่น ถั่วเหลือง (Shu et al., 2010), ข้าว (Wang et al., 2005), มะเขือเทศ (Wang et al., 2010), ถั่วอัลฟาฟา (Choi et al., 2004) และข้าวฟ่างหางหมา (Gupta et al., 2011) ซึ่งให้ผลที่แสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายมาก (Lessa, 1992; Corte-Real et al., 1994; Daguin and Borsa, 1999) ซึ่งโพลิมอร์ฟิซึมหรือความหลากหลายที่ได้จากลำดับอินทรอนนั้นเกิดจากการที่ยีนมีการเพิ่มหรือ/และขาดหายไปของลำดับเบสทำให้อินทรอนมีขนาดไม่เท่ากัน ซึ่งการเพิ่มหรือ/และขาดหายไปของลำดับเบสอาจไม่ได้เกิดเพียงครั้งเดียวต่อหนึ่งอินทรอนแต่อาจเกิดขึ้นได้หลายครั้งภายในอินทรอนเดียว แต่ในบางครั้งการเพิ่มหรือ/และขาดหายไปของลำดับเบสก็อาจส่งผล

ทำให้โพลิมอร์ฟิซึมลดลงได้ (Wang et al., 2006) นอกจากนี้โพลิมอร์ฟิซึมหรือความหลากหลายที่ได้จากอินทรอนก็เกิดจากลำดับเบสที่แตกต่างกันหนึ่งลำดับในอินทรอนหรือที่เรียกว่า SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Jaikishan et al., 2015) ได้เช่นกัน ซึ่งก่อนหน้านี้การพัฒนาเครื่องหมาย ILP และการนำเครื่องหมาย ILP มาใช้ในการศึกษาอาจไม่ได้รับความสนใจเหตุเพราะการพัฒนาเครื่องหมาย ILP สามารถทำได้อย่างจำกัดเนื่องจากลำดับ EST ที่ใช้ในการพัฒนาอาจพบได้แค่บางยีนหรือบางสิ่งมีชีวิตเท่านั้นทำให้ข้อมูลอาจมีไม่เพียงพอต่อการพัฒนาเครื่องหมาย ILP หรืออาจทำให้สามารถพัฒนาเครื่องหมายได้จำนวนน้อย แต่ในปัจจุบันสามารถพัฒนาได้มากขึ้นเนื่องจากมีการรวบรวมทำเหมืองข้อมูลของลำดับ EST ในแต่ละสิ่งมีชีวิตมากขึ้นและมีการทำเหมืองข้อมูลของเครื่องหมาย ILP โดยพัฒนาจากจีโนมของพืชต้นแบบคือ ข้าวและอะราบิโดพซิสอีกด้วย (Yang et al., 2007) นอกจากนี้เครื่องหมาย ILP ยังมีข้อดีหลายประการที่เหมาะสมต่อการนำมาพัฒนา ได้แก่

1. ILP มีความจำเพาะต่อยีน (gene specific), เป็นเครื่องหมายแบบข่มร่วม (codominant), มีความหลากหลายสูง, เป็นกลาง (neutral), มีความแม่นยำ (accuracy) และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลที่เหมือนเดิมได้ (reproducible) ซึ่งจากข้อดีดังกล่าวทำให้เครื่องหมาย ILP มีคุณสมบัติดีในการเป็นเครื่องหมายโมเลกุลซึ่งเหมาะสมต่อการนำมาศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตได้โดยใช้พีซีอาร์ในการตรวจสอบซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย (Muthamilarasan et al., 2014)

2. สามารถหลีกเลี่ยงการโคลน (cloning) หรือการหาลำดับเบส (sequencing) บริเวณยีนที่เป็นอินทรอนได้ (Corte-Real et al., 1994)

3. เนื่องจากบริเวณเอ็กซ์ซอนมีความอนุรักษ์ (conserve) ระหว่างสปีชีส์มากกว่าบริเวณอินทรอน ดังนั้นการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณเอ็กซ์ซอนจึงมีโอกาสเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตลูกผสมต่างสายพันธุ์ได้ดีกว่าเทคนิคอื่น

4. เครื่องหมาย ILP ให้ผลดีในการถ่ายโอนกับหลายสปีชีส์ในจีนัสเดียวกันหรือสามารถใช้ได้กับสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกันได้ (Muthamilarasan et al., 2014) Saisug และ Ukoskit (2013) ได้ทำการพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากยีนของมันสำปะหลังแล้วนำเครื่องหมาย ILP ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) พบว่าเครื่องหมาย ILP ที่ได้พัฒนาขึ้นนั้นสามารถทำพีซีอาร์สำเร็จได้ 67% และเมื่อนำมาประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP พบว่ามีค่า polymorphism information content (PIC) เท่ากับ 0.35 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า PIC ของเครื่องหมาย EST-SSR ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.37 จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าเครื่องหมาย ILP มีค่า PIC ใกล้เคียงกับเครื่องหมาย EST-SSR จึงสรุปได้ว่าเครื่องหมาย ILP สามารถให้ผลดีถึงแม้ว่าจะพัฒนา

เครื่องหมายจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันก็ตาม ดังนั้นเครื่องหมายชนิดนี้จึงมีประโยชน์และให้ผลดีในการใช้เครื่องหมายเดียวกันข้ามสปีชีส์และข้ามสกุลของสิ่งมีชีวิต

5. เครื่องหมาย ILP มีโอกาสทำพีซีอาร์สำเร็จได้มากกว่าเครื่องหมายชนิดอื่นๆ เนื่องจากในการออกแบบจะต้องรู้ลำดับเบสของบริเวณที่ต้องการจะออกแบบเครื่องหมายและลำดับที่นำมาออกแบบไพรเมอร์นั้นเป็นบริเวณเอ็กซอนที่มีความอนุรักษ์สูงทำให้ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้แม่นยำมากขึ้นในบริเวณที่ต้องการทั้งในสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันหรือในสปีชีส์ต่างกันแต่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน (Wang et al., 2006) ดังนั้นจึงมีโอกาสมากในการทำพีซีอาร์สำเร็จ เช่น ในงานของ Li et al. (2011) ได้ทำการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของยางพาราโดยใช้เครื่องหมาย ILP ที่เกี่ยวข้องกับโรคเปลือกแห้งของยางพารา โดยพัฒนาเครื่องหมาย ILP ทั้งหมด 102 เครื่องหมาย พบว่าผลสำเร็จของการทำพีซีอาร์และอัตราการให้โพลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย ILP คือ 97.06 % และ 61.62 % ตามลำดับ ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวได้สรุปว่า เครื่องหมาย ILP สามารถทำพีซีอาร์สำเร็จได้มากกว่าเครื่องหมายที่ถูกออกแบบโดยใช้วิธีแบบดั้งเดิมถึง 28-30%

6. ในการวิเคราะห์ QTL (Quantitative trait loci) หรือการพัฒนาเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (Marker-assisted selection) โดยส่วนใหญ่จะนิยมใช้เครื่องหมาย Amplified fragment length polymorphism (AFLP), restriction fragment length polymorphism (RFLP), and simple sequence repeat (SSR) ในการวิเคราะห์หรือศึกษา ซึ่งในการศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะนั้นจะทำได้ยากเพราะผลการศึกษาที่ได้นั้นจะไม่สามารถรู้ว่าเครื่องหมายนั้นๆคือยีนอะไรหรือพบว่าเครื่องหมายนั้นไม่สัมพันธ์กับลักษณะเนื่องจากไม่ใช่ลำดับของยีน (Liu et al., 2012)

ซึ่งการที่เครื่องหมาย ILP ได้รับความสนใจหรือความนิยมมากขึ้นเนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมาย AFLPs, SSR และ RFLP แล้วพบว่าเครื่องหมาย ILP วิธีการตรวจสอบที่ง่ายกว่า, สามารถทำได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่า, มีความแม่นยำสูง, ถึงแม้ว่าผู้วิจัยจะใช้เครื่องหมายจำนวนน้อยก็สามารถวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Braglia et al., 2010) นอกจากนี้เครื่องหมาย ILP ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาต่างๆได้อีกมากมาย เช่น การศึกษาพันธุกรรมของประชากร (population genetics surveys) (Corte-Real et al., 1994; Daguin and Borsa 1999), การแยกความแตกต่างของพันธุ์ (cultivar identification) (Shimada et al., 2009), การสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม (construction of genetic linkage map) (Shang et al., 2010), การทำแผนที่ยีน (gene mapping) (Wydner et al., 1994) และการวิเคราะห์วิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) (Shu et al., 2010)

2.6 ลักษณะปริมาณ (Quantitative trait loci; QTLs)

ลักษณะปริมาณ (quantitative traits) คือ ลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายยีนหรืออาจเกิดจากการแสดง ออกของแอลลีลในตำแหน่งต่างๆทำให้เกิดความแปรผันของลักษณะปริมาณ (Barton, 1990, Mukai and Cockerham, 1977, Robertson, 1985, Lamkey and Lee, 1993) ซึ่งสิ่งแวดล้อมนั้นมีอิทธิพลส่งผลต่อการแสดงออกของลักษณะปริมาณด้วย โดยลักษณะฟีโนไทป์ของลักษณะปริมาณมีการกระจายตัวแบบต่อเนื่อง (discontinuous variation) จัดเป็นหมวดหมู่ไม่ได้ หรือเมื่อนำข้อมูลฟีโนไทป์มาทดสอบทางสถิติจะพบว่ากราฟมีลักษณะโค้งปกติ (normal distribution) เช่น ลักษณะความสูง, การต้านทานโรค, ปริมาณผลผลิต, การทนแล้ง เป็นต้น และที่สำคัญการวิเคราะห์การถ่ายทอดพันธุกรรมลักษณะปริมาณต้องอาศัยการวิเคราะห์ทางสถิติ เนื่องจากทำการศึกษาในประชากรขนาดใหญ่และมีความซับซ้อน จากการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอและความก้าวหน้าในการทำแผนที่ทางพันธุกรรมจีโนมทำให้มีการนำแผนที่ทางพันธุกรรมที่สร้างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอมาศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งต่างๆบนโครโมโซมและความแปรปรวนของลักษณะปริมาณ ซึ่งเรียกว่า QTL (quantitative trait loci) โดยขั้นตอนหลักที่ใช้ในการวิเคราะห์ QTL มี 6 ขั้นตอนดังนี้ (Sehgal et al., 2016)

(1) เลือกพ่อแม่ที่มีลักษณะที่สนใจแตกต่างกันมากๆ เพื่อนำมาผสมกันแล้วจะทำให้ได้ลูกที่มีลักษณะที่สนใจมีความแปรผันสูง ซึ่งหากใช้พ่อแม่ที่มีความแปรผันหรือมีความหลากหลายต่ำหรือมีความแตกต่างกันน้อยจะทำให้ค่าเฉลี่ยฟีโนไทป์ไม่แตกต่างกัน

(2) นำพ่อแม่ที่คัดเลือกมาผสมกันเพื่อให้ลูกที่มีความแปรผันสูงหรือมีความหลากหลายสูงในการสร้างประชากรลูกผสม

(3) เก็บข้อมูลฟีโนไทป์ของลักษณะที่สนใจจากตัวอย่างประชากรลูกผสมที่คัดเลือก เช่น ลักษณะสัณฐานวิทยา, ลักษณะทางการเกษตร, ลักษณะการเกิดโรคต่างๆ, การทนแล้ง และอื่นๆ

(4) สร้างข้อมูลจีโนไทป์ของประชากรลูกผสมจากเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความหลากหลายหรือมีโพลิมอร์ฟิซึม

(5) สร้างแผนที่ทางพันธุกรรม

(6) ใช้แผนที่ทางพันธุกรรมที่สร้างขึ้นวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะที่สนใจโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ

ตัวอย่างประชากรที่ใช้ในการวิเคราะห์ QTL และอัตราการกลายพันธุ์ของลักษณะนั้นมีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ QTL อย่างมาก (Melchinger et al., 1998) โดยเฉพาะหากจำนวนตัวอย่างมีจำนวนน้อยเกินไปจะทำให้เกิด bias-free sampling ซึ่งจะส่งผลทำให้ผลที่ได้การวิเคราะห์ QTL

เกิดการผิดพลาดหรือได้ผลที่มีประสิทธิภาพต่ำ (Billotte et al., 2010) หรือหากเกิด sampling errors จะไม่สามารถตรวจสอบ Genetic effects ใน QTL ได้ (Lande and Thompson, 1990) ซึ่งหากยังใช้ตัวอย่างที่มีจำนวนน้อยก็จะส่งผลทำให้ประสิทธิภาพยิ่งลดลง ดังนั้นในการวิเคราะห์ QTL จำเป็นต้องใช้จำนวนตัวอย่างให้มากที่สุดเท่าที่จะสามารถทำได้โดยต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการทำงาน ซึ่งชนิดของตัวอย่างประชากรลูกผสมที่มักจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์มีทั้งหมด 5 ประเภทคือ 1) Double haploid lines (DHLs) เป็นลูกผสมที่เกิดจากการนำละอองเรณูของลูก F₁ ไปทำให้เกิดการดับเบิลโครโมโซม 2) Backcross (BC) population เป็นลูกผสมที่เกิดจากลูก F₁ ลูกผสมกลับด้วยพ่อหรือแม่ 3) F₂ population เป็นลูกผสมที่เกิดจากการนำลูก F₁ มาผสมกันเอง 4) F_{2:3}/F_{2:4} lines เป็นลูกผสมที่เกิดจากการนำลูก F_{3/4} ผสมกับลูก F₂ ซึ่งสามารถเรียกอีกอย่างว่า F₂ families 5) Recombinant inbred lines (RILs) เป็นลูกผสมที่เกิดจากการนำลูก F₂ มาผสมตัวเองจากนั้นก็นำลูกในรุ่นถัดไปมาผสมตัวเองต่อไปเรื่อยๆ (Sehgal et al., 2016)

การทำแผนที่ยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ควบคุมลักษณะปริมาณ (QTL mapping) หรือการวิเคราะห์ QTL ต้องอาศัยแผนที่ทางพันธุกรรมในการวิเคราะห์ (Billotte et al., 2010) ซึ่งแผนที่จะต้องมีการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอครอบคลุมทั้งจีโนมโดยการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นควรมีความหนาแน่นพอสมควร วิธีการทำแผนที่เพื่อหาตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะปริมาณใช้วิธีเดียวกับการทำแผนที่ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบลักษณะที่สนใจในประชากรที่ใช้ทำแผนที่ บันทึกข้อมูลควบคู่กับผลการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอจากนั้นวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ จะได้แผนที่ที่แสดงตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอในบริเวณต่างๆ ของจีโนมที่มีผลต่อลักษณะ QTL ที่ต้องการศึกษา (วิภาวี, 2553) ทั้งบริเวณที่มีผลต่อลักษณะมาก (major gene) และที่มีผลน้อย (minor gene) ซึ่งสามารถเลือกเครื่องหมายในบริเวณดังกล่าวไปช่วยในการคัดเลือกลักษณะ (marker assisted selection) ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (สุรินทร์, 2552) โดยวิธีที่นิยมใช้ในการสร้างแผนที่ QTL คือวิธีที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่ออกแบบหรือพัฒนาจากยีนที่สนใจโดยตรงเพื่อนำมาสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ QTL ซึ่งวิธีนี้อาจได้แผนที่ทางพันธุกรรมที่หนาแน่นไม่มากแต่เป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์ QTL ได้อย่างมีคุณภาพเนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้พัฒนามาจากยีนโดยตรงจะทำให้รู้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่สนใจได้ โดยวิธีนี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับลักษณะที่ซับซ้อนซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนหลายยีนในพืชหลายชนิด เช่น ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus urophylla*) (Gion et al., 2000), ต้นสน (*Pinus taeda*) (Neale et al., 2002) และ black cottonwood (*Populus trichocarpa*) (Wegrzyn et al., 2010) โดยใช้เครื่องหมายจะถูกออกแบบจากยีนที่เกี่ยวข้องมาวิเคราะห์ QTL กับลักษณะคุณสมบัติของเนื้อไม้ นอกจากนี้ยังใช้เครื่องหมายสลับที่สัมพันธ์กับยีนที่เกี่ยวข้อง

กับ carbohydrate metabolism มาวิเคราะห์ QTL ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะคุณภาพน้ำตาลและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตใน sugar beet อีกด้วย (Tisné et al., 2015) ซึ่งวิธีในการวิเคราะห์ QTL นั้นสามารถแบ่งออกเป็น 4 วิธี คือ

1. Single-Marker Analysis (Point Analysis) เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการตรวจสอบหา QTL ที่สัมพันธ์กับเครื่องหมายโดยจะพิจารณาความสัมพันธ์กับลักษณะครึ่งหนึ่งเครื่องหมาย สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์จะใช้สถิติอย่างง่ายเช่น t-test หรือ F-test ค่านัยสำคัญ (significant value) จะบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะที่สนใจหรือบ่งชี้ว่า QTL นั้นอยู่ตำแหน่งไหนบนโครโมโซมซึ่งใกล้เคียงกับเครื่องหมายใด ข้อดีของการวิเคราะห์ QTL โดยวิธีนี้นั้นก็คือไม่จำเป็นต้องใช้แผนที่ทางพันธุกรรม แต่ข้อเสียก็คือการวิเคราะห์อาจทำให้เกิดความผิดพลาดทำให้ตรวจสอบพบว่าเครื่องหมายกับลักษณะมีความสัมพันธ์ต่อกันซึ่งแท้จริงแล้วไม่มีความสัมพันธ์และวิธีนี้ยังมีประสิทธิภาพต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆอีกด้วย (Sehgal et al., 2016)

2. Interval Mapping by Maximum Likelihood หรือ QTL interval mapping เป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ QTL มากที่สุด เนื่องจากวิธีนี้เป็นการพิจารณาหา QTL โดยเปรียบเทียบตำแหน่งของเครื่องหมาย 2 ตำแหน่งในโครโมโซมในการวิเคราะห์และยังทดสอบโดยใช้วิธีของ maximum likelihood ทำให้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำในการตรวจสอบมากขึ้นแต่วิธีนี้จำเป็นต้องใช้แผนที่ทางพันธุกรรมในการวิเคราะห์ด้วย (Sehgal et al., 2016)

3. Composite Interval Mapping เป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับในการวิเคราะห์ QTL เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์ QTL โดยพิจารณาเครื่องหมายทั้งจีโนมเพื่อนำมาเปรียบเทียบหาเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจ (Jansen and Stam 1994; Utz and Melchinger 1996; Zeng 1994) นอกจากวิธีนี้จะต้องใช้แผนที่ทางพันธุกรรมในการวิเคราะห์แล้วยังใช้โคแฟกเตอร์ (cofactors) ซึ่งก็คือเครื่องหมายที่อยู่บนจีโนมซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีตรวจสอบแล้วว่า QTL สูงในการวิเคราะห์อีกด้วย ซึ่งการใช้โคแฟกเตอร์นี้ทำให้การวิเคราะห์ CIM มีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพสูงกว่าการวิเคราะห์แบบ Interval Mapping และแบบ Single-Marker Analysis (Sehgal et al., 2016)

Marker-assisted selection (MAS) คือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจที่จะช่วยค้นหาฟีโนไทป์ที่ต้องการเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ซึ่งจะช่วยเพิ่มความแม่นยำและประสิทธิภาพในการคัดเลือกพืชที่มีลักษณะที่ต้องการ (Lee et al., 2015) นอกจากนี้ยังช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์พืชทำให้ระยะเวลาในการทำงานสั้นลง เช่น ปาล์มน้ำมัน อีกด้วย (Collard and Mackill 2008) ซึ่งลักษณะของพืชที่สำคัญต่อเศรษฐกิจส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะ

ปริมาณ เช่น องค์ประกอบของผลผลิต (Rance et al., 2001, Singh et al., 2008, Billotte et al., 2010) ค่าไอโอดีนและองค์ประกอบของไขมัน (Singh et al., 2009) เป็นต้น ดังนั้นเทคนิคการวิเคราะห์ QTL จึงมีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์อย่างมาก เนื่องจากสามารถทำให้เข้าใจถึงกลไกทางโมเลกุลในการควบคุมลักษณะที่สนใจและจากการวิเคราะห์อาจจะทำให้ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจหรือลักษณะที่สนใจได้ทำให้สามารถนำเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือกต่อไปได้ (Takagi et al., 2013) อย่างเช่น Madhusudhana และ Patil ในปี 2012 ได้ทำการวิเคราะห์ QTL กับลักษณะความสูงในข้าวฟ่างโดยใช้แผนที่ทางพันธุกรรมที่สร้างจากเครื่องหมาย SSR ในตัวอย่างประชากร recombinant inbred line (RIL) จำนวน 168 ตัวอย่าง ที่เกิดจากการผสมระหว่างข้าวฟ่างต้นเตี้ยและต้นสูง โดยผลจากการวิเคราะห์ QTL พบว่าเครื่องหมาย SSR ที่ออกแบบจากยีน Dw2 (Dwarf2) และ Dw3 (Dwarf3) ที่อยู่บน 2 โครโมโซมคือเครื่องหมาย SBI-06 และ SBI-07ตามลำดับ สัมพันธ์กับความแปรผันของความสูงถึง 41 % นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบอีกว่าตำแหน่งของลักษณะดอกข้าวฟ่างที่อยู่บนโครโมโซมยังสัมพันธ์กับลักษณะความสูงอย่างมีนัยสำคัญถึง 22% Nagai et al. (2014) ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ QTL ที่เกี่ยวข้องกับการยืดยาวของข้อปล้องที่สัมพันธ์กับการทำงานของ gibberellin ในข้าวทนนน้ำลึก (deepwater rice) พบ QTL ที่สัมพันธ์กับลักษณะความยาวของข้อปล้องทั้งหมด 2 ตำแหน่ง คือ บนโครโมโซม 3 และ 9 โดยโครโมโซมที่ 3 สัมพันธ์ลักษณะปล้องสั้นและโครโมโซมที่ 9 สัมพันธ์กับลักษณะจำนวนของข้อปล้อง นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสามารถวิเคราะห์ QTL แล้วพบว่าลักษณะความยาวของปล้องนั้นมีความสัมพันธ์กับโครโมโซมที่ 2 และ 4 ในระยะ early vegetative stage อีกด้วย (Nagai et al., 2012) และนอกจากนี้ Luo et al. (2013) ยังได้ทำการศึกษาการวิเคราะห์ QTL ของลักษณะจำนวนดอกข้าวต่อช่อดอก (spikelets per panicle; SPP) ซึ่งก่อนหน้านี้มีการพบ QTL ของลักษณะ SPP แล้วในข้าวพันธุ์ป่า (Thomson et al., 2003; Suh et al., 2005; Onishi et al., 2007) ซึ่งผู้วิจัยได้พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะบนโครโมโซมที่ 5 และ 10 และการศึกษาได้แสดงว่าข้าวพันธุ์ป่ามีแอลลีลที่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นและลดลงของจำนวน SPP เป็นต้น

สำหรับในปาล์มน้ำมันมีการศึกษาวิเคราะห์ QTL เพื่อหาความสัมพันธ์กับลักษณะต่างๆ มากมาย เช่น องค์ประกอบของผลผลิต (Rance et al., 2001; Billotte et al., 2010; Jeenor and Volkaert, 2014) องค์ประกอบของไขมัน (Singh et al., 2009; Montoya et al., 2013), อัตราส่วนเพศ (Ukoskit et al., 2014), embryogenesis (Ting et al., 2013) และอื่นๆ โดยมีการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันนั้นได้ถูกสร้างขึ้นครั้งแรกในปี 1997 (Lee et al. 2015) โดยใช้เครื่องหมาย RFLP และต่อมาในปี 2005 แผนที่ทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันที่ถูกสร้างขึ้นจาก

เครื่องหมาย SSR จำนวน 255 เครื่องหมายและเครื่องหมาย AFLP จำนวน 688 เครื่องหมาย ถูกนำมาวิเคราะห์ QTL กับลักษณะกะลา, ผลผลิต และองค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันปาล์ม (Wang et al., 2012; Lee et al., 2015) อย่างในงานของ Lee et al. (2015) ได้ทำการสร้างแผนที่พันธุกรรมของปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมาย SSR และ SNPs แล้วนำเครื่องหมายที่ได้ไปวิเคราะห์ QTL mapping เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะความสูงของปาล์มน้ำมัน พบว่าเครื่องหมาย eg2209 และ EGEMS0023 บนลิงค์เกทที่ 5 มีความสัมพันธ์กับลักษณะของความสูง ซึ่งเครื่องหมายทั้งสองนั้นส่งผลต่อความหลากหลายของฟีโนไทป์ถึง 51% โดยผู้วิจัยได้สรุปว่าเครื่องหมายทั้งสองอาจจะมีบทบาทเกี่ยวกับความสูงของปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้ยังพบว่าหากเครื่องหมาย eg2209 ให้แอลลีลในตัวอย่างปาล์มน้ำมันเป็นโฮโมไซกัส (ll) ต้นปาล์มจะมีความสูงเฉลี่ย 139.4 เซนติเมตร แต่ถ้ามีแอลลีลเป็นเฮเทอโรไซกัสต้นปาล์มจะมีความสูงเฉลี่ย 135.1 เซนติเมตร นอกจากนี้ Ukoskit et al. (2014) ก็ได้สร้างแผนที่พันธุกรรมของปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมาย GSSRs, EST-SSRs, และ AFLPs เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ QTL mapping ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะอัตราส่วนเพศและลักษณะที่เกี่ยวข้อง และพบว่าลิงค์เกทที่ 8 นั้นมีความสัมพันธ์กับลักษณะอัตราส่วนเพศและจำนวนดอกของเพศผู้ และในปี 2013 Jennor และคณะพัฒนาเครื่องหมาย SSR จำนวน 97 เครื่องหมาย, เครื่องหมายซึ่งออกแบบจากยีนที่สนใจจำนวน 93 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย snip ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีนอีก 12 เครื่องหมาย ในการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของลูกผสมปาล์มน้ำมันจำนวน 190 ตัวอย่าง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ QTL ที่สัมพันธ์กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปาล์มน้ำมัน โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์ที่เครื่องหมายสัมพันธ์กับลักษณะนั้นอยู่ในช่วง 12.4% - 54.5% ซึ่งเครื่องหมายที่ออกแบบจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิพิด (lipid biosynthesis) นั้นมีความสัมพันธ์กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตหลายลักษณะซึ่งสามารถนำเครื่องหมายดังกล่าวมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายคัดเลือกต่อไปได้ นอกจากนี้ Montoya et al. (2013) ได้ศึกษาวิเคราะห์ QTL กับลักษณะองค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สร้างจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 362 เครื่องหมายในการวิเคราะห์ โดยพบ QTL ทั้งหมด 19 เครื่องหมายที่สัมพันธ์กับองค์ประกอบไขมันของน้ำมันปาล์ม จะเห็นได้ว่ามีงานวิจัยหลายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ QTL ที่สัมพันธ์กับลักษณะต่างในปาล์มน้ำมันมากมายโดยเฉพาะลักษณะที่เกี่ยวข้องกับเศรษฐกิจ เนื่องจากการวิเคราะห์ QTL นั้นสามารถนำเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์ลักษณะที่สนใจนั้นผู้วิจัยคาดหวังว่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือกในงานปรับปรุงพันธุ์และนอกจากนี้ยังช่วยให้เข้าใจถึงการแสดงออกของยีนที่มีผลต่อลักษณะปริมาณที่สนใจอีกด้วย

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

3.1 ปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP

ตัวอย่างปาล์มน้ำมันในส่วนนี้ได้มาจาก ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ศวป.สฎ.) จำนวน 41 ต้น โดยเป็นพันธุ์ AVROS จำนวน 5 ตัวอย่าง, พันธุ์ Calabar-AVROS จำนวน 1 ตัวอย่าง, พันธุ์ Ghana-AVROS จำนวน 2 ตัวอย่าง, พันธุ์ La Me-AVROS จำนวน 2 ตัวอย่าง, พันธุ์ Yangambi-AVROS จำนวน 1 ตัวอย่าง, พันธุ์ Calabar จำนวน 4 ตัวอย่าง, พันธุ์ DAMI จำนวน 6 ตัวอย่าง, พันธุ์ Deli Dura จำนวน 8 ตัวอย่าง, พันธุ์ Ghana จำนวน 3 ตัวอย่าง, พันธุ์ Ghana-Yangambi จำนวน 1 ตัวอย่าง, พันธุ์ Kazemba จำนวน 1 ตัวอย่าง, พันธุ์ Nigeria จำนวน 5 ตัวอย่าง, พันธุ์ Tanzania จำนวน 1 ตัวอย่าง และพันธุ์ Yangambi จำนวน 1 ตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่พัฒนาได้เมื่อใช้ในปาล์มน้ำมันต่างสปีชีส์ นอกจากนี้ยังศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมของปาล์มน้ำมันใน clone B และ clone D ด้วย

ตารางที่ 3.1 แสดงตัวอย่างปาล์มน้ำมันจำนวน 41 ตัวอย่าง

No.	Accession	Pedigree	Source	Fruit Type
1	101/2D	AVROS	ศวป.สฎ.	Dura
2	101/177D	AVROS	ศวป.สฎ.	Dura
3	101/93P	AVROS	ศวป.สฎ.	Pisifera
4	101/49	AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
5	101/386	AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
6	109/300D	Calabar	ศวป.สฎ.	Dura
7	109/286P	Calabar	ศวป.สฎ.	Pisifera

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

No.	Accession	Pedigree	Source	Fruit Type
8	109/319P	Calabar	ศวป.สฎ.	Pisifera
9	109/298T	Calabar	ศวป.สฎ.	Tenera
10	122/1446T	Calabar-AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
11	116/182D	DAMI	ศวป.สฎ.	Dura
12	116/179P	DAMI	ศวป.สฎ.	Pisifera
13	116/206P	DAMI	ศวป.สฎ.	Pisifera
14	116/116T	DAMI	ศวป.สฎ.	Tenera
15	116/233T	DAMI	ศวป.สฎ.	Tenera
16	141/1345T	DAMI	ศวป.สฎ.	Tenera
17	65/239D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
18	67/740D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
19	67/791D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
20	69/903D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
21	76/120D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
22	79/339D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
23	89/1853D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
24	91/1617D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
25	114/198D	Ghana	ศวป.สฎ.	Dura
26	114/172P	Ghana	ศวป.สฎ.	Pisifera

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

No.	Accession	Pedigree	Source	Fruit Type
27	114/175T	Ghana	ศวป.สฎ.	Tenera
28	125/154T	Ghana-AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
29	133/1433T	Ghana-AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
30	140/102T	Ghana-Yangambi	ศวป.สฎ.	Tenera
31	KB/68D	Kazemba	ศวป.สฎ.	Dura
32	129/1426T	La Me-AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
33	138/319T	La Me-AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
34	110/760D	Nigeria	ศวป.สฎ.	Dura
35	110/763D	Nigeria	ศวป.สฎ.	Dura
36	110/444P	Nigeria	ศวป.สฎ.	Pisifera
37	110/65T	Nigeria	ศวป.สฎ.	Tenera
38	110/66T	Nigeria	ศวป.สฎ.	Tenera
39	159/398T	Tanzania	ศวป.สฎ.	Tenera
40	112/427T	Yangambi	ศวป.สฎ.	Tenera
41	132/1415T	Yangambi-AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera

3.1.2 ปาล์มน้ำมันประชากรลูกผสมที่ใช้ในการทำแผนที่ยีนและใช้ในการวิเคราะห์ QTL

ปาล์มน้ำมันในส่วนนี้ใช้ปาล์มน้ำมันลูกผสมแบบ double pseudo-testcross (Grattapaglia and Sederoff, 1994) ที่เกิดจากการผสมระหว่าง clone B และ clone D เป็นปาล์มน้ำมัน พันธุ์เทอเนอราทั้งสองพันธุ์ได้ประชากรลูกจำนวน 208 ต้น ตัวอย่างปาล์มน้ำมันทั้งหมด

นี้ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก บริษัท โกลเด้นเทอเนร่า จำกัด ประกอบด้วย พันธุ์สุรา 45 ต้น พันธุ์พิสิเพอรา 55 ต้น และพันธุ์เทอเนอรา 108 ต้น และได้ทำการเก็บข้อมูลของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตปาล์มน้ำมันที่จะใช้ในการวิเคราะห์ QTL ทั้งหมด 6 ลักษณะ คือ จำนวนทะลาย (Bunch number; BN), จำนวนผลต่อทะลาย (Fresh fruit bunch yield; FFB), น้ำหนักทะลาย (Bunch weight; BW), จำนวนช่อดอกเพศผู้ (Male inflorescence number; MN), จำนวนช่อดอกเพศเมีย (Female inflorescence number; FN), จำนวนช่อดอกทั้งหมด (Total inflorescence; TI) และ อัตราส่วนเพศ (Sex ratio; SR)

3.2 การพัฒนาและการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP (Intron length polymorphism)

3.2.1 การพัฒนาเครื่องหมาย ILP

ค้นหารวบรวมรายชื่อยีนที่อยู่ในยีน MADs box และยีนกำหนดเพศของปาล์มน้ำมัน แล้วนำรายชื่อยีนที่ได้ทำการรวบรวมไปทำการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีนที่รวบรวม โดยเลือกเป็นลำดับ EST (Expressed sequence tag) ของปาล์มน้ำมันจากฐานข้อมูล NCBI แล้วนำข้อมูล EST ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของจีโนม เพื่อหาตำแหน่งของ EST ในแต่ละยีนที่อยู่ในจีโนมโดยใช้โปรแกรม BLAST เพื่อนำไปใช้หาตำแหน่งของอินทรอนในการออกแบบไพรเมอร์ต่อไป จากการทำการเปรียบเทียบ EST กับจีโนมของปาล์มน้ำมันแล้ว จะพบตำแหน่งของอินทรอนที่ปรากฏบนจีโนม จากนั้นจะนำตำแหน่งที่ได้ไปออกแบบไพรเมอร์โดยจะออกแบบไพรเมอร์บริเวณลำดับเบสที่ขนาบข้างอินทรอนที่ต้องการซึ่งคือ ลำดับเอ็กซอน และเพื่อให้เห็นตำแหน่งบริเวณเอ็กซอนและอินทรอนชัดเจน เพื่อช่วยในการคัดเลือกลำดับเบส EST ที่ต้องการ จะใช้โปรแกรม Geneseqer (Brendel *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับเบส EST กับจีโนมของปาล์มที่ได้มาจากการทำ BLAST แล้วผลที่ได้จะเห็นบริเวณเอ็กซอนกับอินทรอนชัดเจน ทำให้สามารถคัดเลือกลำดับเบส EST ได้ดียิ่งขึ้น ในการเลือกลำดับเบสเพื่อไปออกแบบไพรเมอร์นั้น จะเลือกลำดับเบส EST ให้จำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งของเอ็กซอนที่คร่อมอยู่ระหว่างส่วนของอินทรอน โดยจะเลือกลำดับเบส EST ให้มีระยะห่างจากตำแหน่ง splice site ประมาณ 15-25 เบส ทั้งปลายด้าน 5' และปลาย 3' เพื่อหลีกเลี่ยงความผิดพลาดในการจับของไพรเมอร์ เมื่อทำการเลือกลำดับเบสที่ต้องการแล้วซึ่งจะเลือกลำดับเบส EST ประมาณ 15-20 เบส จากนั้นนำไปออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม PRIMER3 (Rozen and Skaletsky, 2000) แล้วเลือกคู่ไพรเมอร์ที่มีสภาวะที่ต้องการ จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้ไปตรวจสอบความจำเพาะ (E-PCR) โดยนำไปเปรียบเทียบกับทั้งจีโนมของ

ปาล์มซึ่งใช้โปรแกรม BLAST เพื่อทดสอบว่าไพรเมอร์ที่ได้นั้นมีตำแหน่งที่จับจำเพาะหรือจับเพียงตำแหน่งเดียวบนจีโนมและจับกับจีโนมในบริเวณที่ต้องการหรือไม่

3.2.2 การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP

นำ ILP ไพรเมอร์ที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้มาเพิ่มปริมาณจีโนมมิกตีเอ็นเอกับตัวอย่างปาล์มน้ำมันจำนวน 41 ตัวอย่าง โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์จะมีการเตรียมปริมาตรรวมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ซีนตีเอ็นเอต้นแบบ 4 นาโนกรัม, 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร (20 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$), 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$, 2 มิลลิโมลาร์ dNTPs, คู่ไพรเมอร์อย่างละ 5 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 2.5 Unit แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนที่ปลอดภัย (dd. H_2O) ให้มีปริมาตร 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิในการทำพีซีอาร์ประกอบด้วยอุณหภูมิ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที และ 94 °C นาน 3 นาที ตามด้วยรอบอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 35 รอบ ที่ 94 °C นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 °C นาน 30 วินาที ตรวจสอบผลเบื้องต้นด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 2% agarose gel electrophoresis แล้วนำไปวิเคราะห์หาโพลิมอर्फิซึมใน 4.5% polyacrylamide gel electrophoresis แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรท จากนั้นอ่านผลและวิเคราะห์โพลิมอर्फิซึมในตัวอย่างปาล์มน้ำมัน

ทำการวิเคราะห์โพลิมอर्फิซึมเพื่อการศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่พัฒนาได้ โดยทดสอบการวิเคราะห์หลากหลายทางพันธุกรรมปาล์มน้ำมัน *E. guineensis* ที่รวบรวมจากสถานีวิจัยต่าง ๆ ที่สำคัญของโลก จำนวน 41 ตัวอย่าง พารามิเตอร์ที่ศึกษาประกอบด้วย

1) การวิเคราะห์จำนวนแอลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (number of alleles per locus) โดยนับจำนวนแอลลีลที่ศึกษาทั้งหมดทุกตำแหน่ง แล้วนำมาหารด้วยจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายทั้งหมดที่ทำการศึกษา

$$n = \frac{\sum n_i}{K}$$

โดย K = จำนวนโลไซ

n_i = จำนวนแอลลีลในแต่ละโลกัส

2) การวิเคราะห์ค่า PIC (Polymorphism information content) เป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่แสดงความหลากหลายของแอลลีลของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i^2 p_j^2$$

เมื่อ p เป็นความถี่ของแอลลีลอื่นเอที่ j ของเครื่องหมายที่ i (Bostein *et al.*, 1980)

3) การวิเคราะห์เฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) หมายถึงความถี่ของเฮเทอโรไซโกซิตีต่อยีน 1 ตำแหน่ง จะคำนวณทั้งค่าจริง (H_0) และค่าคาดหวัง (H_e) โดยที่ค่า H_0 (observe heterozygosity) คือ สัดส่วนของเฮเทอโรไซกัสจีโนไทป์เฉลี่ยต่อตำแหน่ง คำนวณได้จากข้อมูลจริง

H_e (expected heterozygosity) เป็นค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการคำนวณ โดยตั้งสมมุติฐานว่าประชากรนั้นอยู่ในสภาพสมดุลทางพันธุกรรม ดังนั้นค่าคาดหวังความถี่ของเฮเทอโรไซโกต = $1 - (p^2 + q^2)$ เมื่อความถี่จีโนไทป์โฮโมไซโกต $p^2 + q^2$ และสามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง H_0 และ H_e โดยวิธีทดสอบไคส-แควร์ ($X^2 = (H_0 - H_e)_2 / H_e$) เพื่อทดสอบความเบี่ยงเบนจากสมดุลทางพันธุกรรมของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg principle)

4) การวิเคราะห์ค่าความหลากหลายของยีน (Gene diversity)

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i^2 p_j^2$$

เมื่อ k = จำนวนประชากร

p_i = ความถี่ของแอลลีล i^{th} ในโลกัส

f = สัมประสิทธิ์การ inbreeding

ซึ่งจากข้อ 1 ถึง 4 จะทำการคำนวณหาโดยใช้โปรแกรม Power marker (Liu and Muse, 2004)

5) การวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ใช้ข้อมูลการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอแบบ co-dominant เพื่อหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic similarity) (Jaccard, 1901) เพื่อสร้าง dendrogram โดยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc ver2.02 (Rohlf, 1998)

3.3 การสร้างแผนที่พันธุกรรมเครื่องหมาย ILP

3.3.1 การคัดเลือกเครื่องหมาย ILP เพื่อใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม

นำ ILP ไพร์เมอร์ที่ออกแบบและสังเคราะห์ทั้งหมดมาเพิ่มปริมาณจีโนมมิกดีเอ็นเอกับตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่สุ่มมาจากตัวอย่างประชากรปาล์มน้ำมันลูกผสม 208 ตัวอย่าง จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมทั้งตัวอย่าง clone B และ clone D เป็นจำนวน 12 ตัวอย่าง เพื่อคัดกรองหาไพร์เมอร์ที่ให้โพลิมอร์ฟิซึม หากพบว่าไพร์เมอร์นั้นสามารถให้โพลิมอร์ฟิซึมได้ก็จะนำไพร์เมอร์มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับตัวอย่างประชากรลูกผสมทั้ง 208 ตัวอย่างเพื่อใช้ในการเพิ่มไพร์เมอร์เข้ากับแผนที่ทางพันธุกรรมของ Ukoskit *et al.* (2014) และใช้แผนที่ทางพันธุกรรมดังกล่าวในการวิเคราะห์ QTL ต่อไป โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์จะมีการเตรียมปริมาตรรวมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 20 ไมโครลิตร (อ้างอิงการเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามข้อ 3.2.3)

3.3.2 การตั้งชื่อเครื่องหมายโมเลกุล

ชื่อเครื่องหมายโมเลกุลตั้งโดยใช้จำนวนแอลลีล ในแต่ละเครื่องหมาย ตามด้วยแหล่งของแอลลีลที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมจาก clone B, clone D หรือ จากทั้ง clone B และ clone D คือ X โดยที่

- B คือ จากการผสมแบบ $ao \times oo$ มีอัตราส่วน 1:1 และจีโนไทป์แบบ 1 แอลลีล หรือจากการผสมแบบ $ab \times aa$ มีอัตราส่วน 1:1 และจีโนไทป์แบบ 2 แอลลีล,

- D คือ จากการผสมแบบ $oo \times ao$ มีอัตราส่วน 1:1 และจีโนไทป์แบบ 1 แอลลีล หรือจากการผสมแบบ $aa \times ab$ มีอัตราส่วน 1:1 และจีโนไทป์แบบ 2 แอลลีล

-X คือ จากการผสมแบบ $ao \times ao$ มีอัตราส่วน 3:1 และจีโนไทป์แบบ 1 แอลลีล, จากการผสมแบบ $ab \times ab$ มีอัตราส่วน 1:2:1 และจีโนไทป์แบบ 2 แอลลีล หรือจากการผสมแบบ $ab \times ac$ มีอัตราส่วน 1:1:1:1 และจีโนไทป์แบบ 3 แอลลีล และจากการผสมแบบ $ab \times cd$ มีอัตราส่วน 1:1:1:1 และจีโนไทป์แบบ 4 แอลลีล

ตามด้วยชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลและรหัสของไพรเมอร์ ตัวอย่างเช่น 2XGLO1 เป็นเครื่องหมายที่มี 2 แอลลีล จีโนไทป์แบบ $ab \times ab$ และรหัสไพรเมอร์ GLO1

3.3.3 การวิเคราะห์ลิงค์เกจและการเพิ่มเครื่องหมาย ILP ลงในแผนที่พันธุกรรม

สร้างแผนที่พันธุกรรมใช้การวิเคราะห์แบบ double pseudo-test cross (Grattapaglia and Sederoff, 1994, pp. 1121–1137) โดยกำหนดเครื่องหมายโมเลกุล ดังนี้

- เครื่องหมายที่ทั้งพ่อและแม่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสและมี 4 แอลลีล การกระจายตัวในลูกมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 1:1:1:1 คือ $abxcd$
- เครื่องหมายที่ทั้งพ่อและแม่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสและมี 3 แอลลีล การกระจายตัวในลูกมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 1:1:1:1 คือ $abxac$
- เครื่องหมายที่ทั้งพ่อและแม่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสและมี 2 แอลลีล การกระจายตัวในลูกมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 1:2:1 คือ $abxab$ และการกระจายตัวในลูกมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 3:1 คือ $hkxhk$
- เครื่องหมายที่แม่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส การกระจายตัวในลูกมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 1:1 คือ $abxaa$ และแถบดีเอ็นเอที่มีการปรากฏเฉพาะในแม่ การกระจายตัวในลูกมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 1:1 คือ $lmxll$
- เครื่องหมายที่พ่อมีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส การกระจายตัวในลูกมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 1:1 คือ $aaxab$ และแถบดีเอ็นเอที่มีการปรากฏเฉพาะในพ่อ การกระจายตัวในลูกมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 1:1 คือ $nnxnp$

โดยจะนำเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาขึ้นมาเพิ่มลงในแผนที่พันธุกรรมใน clone B และ clone D ของ Ukoskit *et al.* (2014) ด้วยโปรแกรม JoinMap Version 3.0 (Stam and Van Ooijen, 1995) โดยใช้ค่า LOD ต่ำสุด 4.0 และสูงสุด 10.0 ซึ่งเครื่องหมาย ILP ที่จะนำมาเพิ่มลงในแผนที่พันธุกรรมนั้นจะต้องเป็นเครื่องหมายที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมในตัวอย่างประชากรลูกผสมปาล์มน้ำมันจำนวน 208 ตัวอย่าง

3.3.4 การวิเคราะห์ QTLs

ใช้แผนที่พันธุกรรมของ Ukoskit *et al.* (2014) ที่เพิ่มเครื่องหมาย ILP ที่ได้แล้วในการวิเคราะห์ QTLs ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตปาล์มน้ำมัน โดยเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ของประชากรลูกผสมทั้งหมดจำนวน 208 ต้น จาก ห้างหุ้นส่วนจำกัด โกลเด็นท์เทอเนร่า จำกัด ในปี พ.ศ. 2552 และ 2558 ในการทดลองนี้ใช้เครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาจากยีน MADs box และยีนกำหนด

เพศซึ่งมีโพลิมอร์ฟิซึมในตัวอย่างประชากรลูกผสมจำนวน 208 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ QTLs กับลักษณะทุกลักษณะ การวิเคราะห์ QTL mapping โดยใช้ Kruskal–Wallis nonparametric rank-sum test (KW) และ multiple QTL analysis model (MQM) ด้วยโปรแกรม MapQTL version 4.0 (Van Ooijen et al. 2002) ซึ่งขั้นตอนของ KW จะถูกใช้เพื่อทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะปริมาณที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.01$ ถ้าค่านัยสำคัญของ QTL ถูกตรวจพบด้วย KW จะได้รับการทดสอบแล้วว่าเป็นปัจจัยที่เป็นไปได้โดยใช้ตัวเลือกการเลือกปัจจัยอัตโนมัติใน MapQTL ตัวเลือกนี้ถูกออกแบบเพื่อปรับกับการตรวจสอบสมมติฐานของ QTL โดยใช้ MQM เพื่อกำหนดค่า LOD ของ genome-wide (α_G) และ chromosome-wide (α_C) ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ 1,000 permutations ถูกดำเนินการเพื่อใช้บอกระดับค่านัยสำคัญ ซึ่ง QTLs จะถูกพิจารณาค่านัยสำคัญ เมื่อค่า LOD สูงกว่า genome-wide threshold หรือ significance thresholds ซึ่งทั้ง 2 ค่าที่พบพร้อมกันเพื่อ chromosome-wide LOD threshold (Ukoskit et al., 2014)

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การสืบค้นข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับยีน MADs box และ ยีนกำหนดเพศ

เมื่อทำการค้นหายีนกำหนดเพศและยีน MADs box จากวารสารที่มีการศึกษายีนทั้งสองกลุ่ม โดยจะเลือกยีนที่มีการศึกษาถึงการแสดงออกและหน้าที่ของยีนในวารสารนั้นที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศและ MADs box หรือยีนที่อยู่ในกลุ่มของยีนกำหนดเพศและยีน MADs box เมื่อคัดเลือกยีนที่ต้องการแล้ว จากนั้นนำยีนที่คัดเลือกไปสืบค้นหาลำดับ EST จากฐานข้อมูล NCBI ซึ่งสามารถพบยีนได้ทั้งหมด 50 ยีน แบ่งออกเป็นเป็นยีนกำหนดเพศจำนวน 13 ยีนและยีน MADs box จำนวน 37 ยีน ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงรายชื่อ, แหล่งที่มาและขนาดของยีนในกลุ่ม MADs box และยีนกำหนดเพศ

MADs box genes	Abbreviation	References	Size of genes
<i>GLOBOSA1</i>	<i>GLO1</i>	Adam <i>et al.</i> , 2007	10,985
<i>GLOBOSA2</i>	<i>GLO2</i>	Adam <i>et al.</i> , 2007	24,104
<i>AGAMOUS1</i>	<i>AG1</i>	Adam <i>et al.</i> , 2007	28,546
<i>AGAMOUS2</i>	<i>AG2</i>	Adam <i>et al.</i> , 2007	13,468
<i>AGAMOUS-Like2-1</i>	<i>AGL2-1</i>	Adam <i>et al.</i> , 2007	34,002
<i>AGAMOUS-Like2-2</i>	<i>AGL2-2</i>	Adam <i>et al.</i> , 2006	24,479
<i>AGAMOUS-Like2-3</i>	<i>AGL2-3</i>	Adam <i>et al.</i> , 2006	37,063
<i>AGAMOUS-Like2-4</i>	<i>AGL2-4</i>	Adam <i>et al.</i> , 2006	21,243
<i>AGAMOUS-Like2-5</i>	<i>AGL2-5</i>	Adam <i>et al.</i> , 2006	7,621
<i>AGAMOUS-Like6-1</i>	<i>AGL6-1</i>	Kim <i>et al.</i> , 2013	3,388

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

MADs box genes	Abbreviation	References	Size of genes
<i>SQUAMOSA2</i>	<i>SQUA2</i>	Adam <i>et al.</i> , 2007	16,789
<i>SQUAMOSA3</i>	<i>SQUA3</i>	Adam <i>et al.</i> , 2007	45,214
<i>DEFICIENS1</i>	<i>DEF1</i>	Adam <i>et al.</i> , 2007	6,675
<i>sativa MADS</i>	<i>STMADS11</i>	Adam <i>et al.</i> , 2006	12,408
<i>Elaeis guineensis MADS3</i>	<i>EgMADS3</i>	Alwee <i>et al.</i> , 2006	23,699
<i>Elaeis guineensis MADS4</i>	<i>EgMADS4</i>	Alwee <i>et al.</i> , 2006	10,014
<i>Elaeis guineensis MADS5</i>	<i>EgMADS5</i>	Alwee <i>et al.</i> , 2006	21,243
<i>Elaeis guineensis MADS8</i>	<i>EgMADS8</i>	Alwee <i>et al.</i> , 2006	34,002
<i>Elaeis guineensis MADS9</i>	<i>EgMADS9</i>	Alwee <i>et al.</i> , 2006	32,775
<i>Elaeis guineensis MADS11</i>	<i>EgMADS11</i>	Alwee <i>et al.</i> , 2006	12,587
<i>Elaeis guineensis MADS12</i>	<i>EgMADS12</i>	Alwee <i>et al.</i> , 2006	10,403
<i>Elaeis guineensis MADS14</i>	<i>EgMADS14</i>	Alwee <i>et al.</i> , 2006	45,214
<i>Elaeis guineensis AD1</i>	<i>EgAD1</i>	Beulé <i>et al.</i> , 2011	5,898
<i>Elaeis guineensis RING1</i>	<i>EgRING1</i>	Beulé <i>et al.</i> , 2011	13,034
<i>Elaeis guineensis FB1</i>	<i>EgFB1</i>	Beulé <i>et al.</i> , 2011	9,794
<i>Elaeis guineensis PHOS1</i>	<i>EgPHOS1</i>	Beulé <i>et al.</i> , 2011	34,909
<i>GT119493</i>	<i>GT119493</i>	Beulé <i>et al.</i> , 2011	750
<i>GT119578</i>	<i>GT119578</i>	Beulé <i>et al.</i> , 2011	1,619
<i>GT119987</i>	<i>GT119987</i>	Beulé <i>et al.</i> , 2011	570

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

MADs box genes	Abbreviation	References	Size of genes
<i>GT120040</i>	<i>GT120040</i>	Beulé <i>et al.</i> , 2011	4,339
<i>GT120266</i>	<i>GT120266</i>	Beulé <i>et al.</i> , 2011	1,642
<i>GT120324</i>	<i>GT120324</i>	Beulé <i>et al.</i> , 2011	1,538
<i>GT120344</i>	<i>GT120344</i>	Beulé <i>et al.</i> , 2011	1,336
<i>GT120393</i>	<i>GT120393</i>	Beulé <i>et al.</i> , 2011	1,020
Sex-determination genes	Abbreviation	References	Size of genes
<i>Tasselseed 1</i>	<i>TS1</i>	<i>Kim et al.</i> , 2007	15,448
<i>anther ear 1</i>	<i>AN1</i>	<i>Kim et al.</i> , 2007	26,774
<i>Alcohol Dehydrogenase1</i>	<i>Adh1</i>	<i>Kinney et al.</i> , 2003	19,655
<i>indeterminate spikelet1</i>	<i>lds1</i>	<i>Chuck et al.</i> , 2007	19,234
<i>Isopentenyltransferase-1</i>	<i>lpt1</i>	<i>Lindner et al.</i> , 2014	47,004
<i>APETALA2</i>	<i>AP2</i>	<i>Chuck et al.</i> , 2007	6,097
<i>Glossy15</i>	<i>Glossy15</i>	<i>Lauter et al.</i> , 2005	82,351
<i>Dwarf1</i>	<i>D1</i>	<i>Kim et al.</i> , 2007	31,277
<i>Dwarf2</i>	<i>D2</i>	<i>Kim et al.</i> , 2007	31,142
<i>Dwarf3</i>	<i>D3</i>	<i>Kim et al.</i> , 2007	37,946
<i>Dwarf8</i>	<i>D8</i>	<i>Kim et al.</i> , 2007	20,442
<i>Cucumber sativus-1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 1</i>	<i>CS-ACS1</i>	<i>Mathooko et al.</i> , 1999	56,902

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

MADs box genes	Abbreviation	References	Size of genes
<i>Cucumber sativus-1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2</i>	CS-ACS2	Mathooko et al., 1999	56,902

และเมื่อได้ลำดับ EST ของยีนต่างๆแล้วจะนำลำดับ EST ของแต่ละยีนมาเปรียบเทียบกับจีโนมของปาล์มน้ำมันโดยใช้โปรแกรม BLAST เพื่อค้นหาอินทรอนของยีนแต่ละยีนโดยสามารถพบจำนวนอินทรอนของแต่ละยีนได้แตกต่างกัน สามารถพบจำนวนอินทรอน ของแต่ละยีนโดยเฉลี่ยจำนวน 3.5 อินทรอนต่อยีน จากการค้นหาอินทรอนในยีน MADs box สามารถพบจำนวนอินทรอนได้มากที่สุดจำนวน 5 อินทรอน จาก 9 ยีน คือยีน *GLO1*, *GLO2*, *AGL2-3*, *AGL2-4*, *EgMADS8*, *EgMADS*, *EgMADS11*, *EgMADS12* และ *GT120266* และจำนวนอินทรอนที่น้อยที่สุดที่พบจากยีน MADs box จะมีจำนวน 1 อินทรอน จาก 7 ยีน คือยีน *AG1*, *AG2*, *AGL2-6*, *DEF*, *STMADS11*, *GT119472* และ *GT119493* สำหรับอินทรอนที่พบในยีนกำหนดเพศพบยีนที่มีจำนวนอินทรอนมากที่สุด 8 อินทรอน จากยีน 3 ยีน คือยีน *TS1*, *AN1* และ *D2* และพบจำนวนอินทรอนที่น้อยที่สุดจำนวน 1 อินทรอน จากยีน 5 ยีน คือยีน *D1*, *D8*, *CS-ACS1*, *EgAD1*, *EgRING1* และ *EgPHOS1* โดยยีนในกลุ่ม MADs box ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือยีน *AGAMOUS-Like2-2* ซึ่งมีขนาด 6,333 นิวคลีโอไทด์ และยีนที่มีขนาดเล็กที่สุดคือยีน *GT119987* โดยมีขนาด 570 นิวคลีโอไทด์ สำหรับยีนในกลุ่มยีนกำหนดเพศที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือยีน *anther ear 1* มีขนาด 12,539 นิวคลีโอไทด์ และยีนที่มีขนาดเล็กที่สุดคือยีน *CS-ACS1* ซึ่งมีขนาด 683 นิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 4.1)

4.2 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการพัฒนาเครื่องหมาย ILP

จากการค้นหาลำดับ EST ของยีนและรวบรวมยีนที่เกี่ยวข้องกับ MADs box และยีนกำหนดเพศ แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับ EST กับจีโนมของปาล์มน้ำมันเพื่อหาบริเวณอินทรอนจากยีนทั้ง 50 ยีนซึ่งสามารถค้นหาอินทรอนได้ทั้งหมดจำนวน 163 อินทรอน และนำมาออกแบบไพรเมอร์บริเวณเอ็กซอนให้ครอบคลุมบริเวณอินทรอน พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 139 คู่ โดยแบ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน MADs box ทั้งหมด 96 คู่ และไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน

กำหนดเพศทั้งหมด 43 คู่ ดังตาราง 4.2 โดยเครื่องหมายทั้งหมดจะถูกนำไปเพิ่มปริมาณตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์เพื่อใช้ในการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาขึ้นได้, ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันและใช้ในการวิเคราะห์ QTL ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปาล์มน้ำมันต่อไป

ตารางที่ 4.2 แสดงไพรเมอร์ ILP ที่พัฒนาได้ทั้งหมด 139 คู่

No.	Primers	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Tm (°C)	Product
1	GLO1-1	AGCTCCGGCAAGATGTC	AGTTATGCTGGTACCTCTCG	56	157
2	GLO1-2	AGTTATGCTGGTACCTCTCG	CTGGCAAGAAGCTCTG	55.8	466
3	GLO1-3	CTGGCAAGAAGCTCTG	TTTCTTGATCCGGTCTG	56	160
4	GLO1-4	TTTCTTGATCCGGTCTG	AAGAAAGAGAATGACAACAT	52	183
5	GLO1-5	AAGAAAGAGAATGACAACAT	CAGTGAGTTCAGATCCTC	56	157
6	GLO2-1	CAGTGAGTTCAGATCCTC	CCTCCAGAATGGTCTCAT	55.8	162
7	GLO2-2	CCTCCAGAATGGTCTCAT	TCTTCTTGAGCTTCTTCA	56	456
8	GLO2-3	TCTTCTTGAGCTTCTTCA	AGAGGAGAACAAGCATCTGAC	56	159
9	GLO2-4	AGAGGAGAACAAGCATCTGAC	CCAGTCCCTTACATTTGCATC	58.1	163
10	GLO2-5	CCAGTCCCTTACATTTGCATC	GGGAAGATGTCCGAGTA	56	624
11	AG1	CATCTCCCCTTCTCCAC	GTGCAGCTACCTCTTG	60	263
12	AG2	CTCCTCCACTTTCCCATCTT	GGCCGATCCAGCGTAG	58.1	256
13	AGL2-1-1	ATGCAACTATGGTGCTCCG	GCACGTGCTTTTAGTTTCAAG	56	820
14	AGL2-1-2	ACGTGCTGAAGCCTTAC	CTCCTTGCTGCTGAGTG	62	219
15	AGL2-1-3	TGCAGATCTTCAACGAAAG	TTTATTGGCCTCACATAGCA	61.2	414
16	AGL2-1-4	AGGCCAATAAAAGTCTAAGG	ACTTGCTGCTGACCA	55.8	242
17	AGL2-2-1	TAAAAGCACGTGTTGAAGC	TGCTGAGTGGACCCAA	58.1	231
18	AGL2-2-2	TGCTTGATCAGCTTGACG	TTTTGTTGGCCTCACATAGC	60	414
19	AGL2-2-3	ATGTGAGGCCAACAAAAG	ACTTGCTGCTGACCA	58.1	162

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

No.	Primers	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	T _m (°C)	Product
20	AGL2-3-1	GCACGTGTTGAAGCATTAC	TGCTGAGTGGCCCTA	56	202
21	AGL2-3-2	TTGAGCGGCAACTAGA	CAAGTTGATCGAGCATGTAT	56	406
22	AGL2-3-3	TGCAGATCTTCAACGAAGG	AGGCGCTGCAGCAAT	56	934
23	AGL2-4-1	GAAGCTGCTGCTCCG	CTCTTGCCTTCAGCCTCA	56	932
24	AGL2-4-2	GGCAAGAGTTGAGTTTCTG	TACTTAGTGGGTCCAAGT	56	245
25	AGL2-4-3	GCTCGATCAGCTTTGTG	TTTGTTCCTGCATCTCT	52.7	935
26	AGL2-4-4	ATGCAGGAAACAAACAGAT	CAATTGGAGGGGATTTTG	53.9	153
27	AGL2-4-5	CAGCCATTGGCATGT	CCTCCGTTTGGCTGG	53.9	165
28	AGL2-5-1	GAACAAGTGTGCAAGAAGTAAA	TATCCATGACCACTGGAGGG	56	551
29	AGL2-5-2	GAGGAATTCTTCCAGCCATTG	TCTCCTTTGTTTACTGGTCT	56	167
30	AGL6-1	TCTTGGAGAAATAAATAAGCAGC	CAAGATCCTTGAATGGCTCTAA	56	234
31	SQUA2-1	GCAGAAAGAGCCCTTGTAGA	CCTTGGACCTTAGTTCACCAT	56	184
32	SQUA2-2	GAACAAAGGTCCAAGGTCG	GTTCTTTAAATGTCAAAGATTCAAG	56	152
33	SQUA3-1	TATTCAAATGCGGAAAAAGCTC	CAACCTTAGATTTAGTTCACC	56	186
34	SQUA3-2	ATCTAAGGTTGAGGCTCT	GCGCTAAGGAGTCAAGT	56	146
35	SQUA3-3	GGCTTGAGAGTGCTTTGAGA	CCGAAGCTCAGCAATTGAATC	56	292
36	SQUA3-4	TGCAAGAGCAGAATTGC	TTCGCAGTGTGGATGT	56	166
37	DEF1	TGAAGCTCACAAAAATTTACTGC	ATCCACAAAACCATAAACTGGG	56	195
38	STMADS11	GTAGAAAGAAAAGAGATCCG	CCTTATCTGAATCTTCTCCCT	56	319
39	Ts1-1	CGATCTCATCAGAAGGCAAG	AATTGGGTGATCATTTGAAGT	53.9	363
40	Ts1-2	TCTACGGTCCGCCTGAATCT	CCGGTCAACAAATGGGAGGT	53.9	319
41	Ts1-3	CCATGCCTAACATGGCACTT	AACTCATCGTCGCGCAGC	56	581
42	Ts1-4	ATGATACCCCTGACATCATA	AGCAGTTGCAATCACCC	56	278

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

No.	Primers	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	T _m (°C)	Product
43	Ts1-5	GATTGATCAAGTCTAATCCTTC	AATGGATCCTCCGCTC	56	252
44	Ts1-6	AGGCCTCCAACCAATACAG	AGACTTATTCTCCTATCCTCC	56	682
45	Ts1-7	GGGTCCAACCCACCAG	GCCCTTAGCTCCTTCAA	56	336
46	An1-1	GCGTCGTCGCGCTAA	GAAGGGAAGGCGATCTCA	56	200
47	An1-2	TCCTGCGTTGCAAGAT	TCCCAGTCCAAGTCAAG	52	222
48	An1-3	GAGCAACGAGAGGTGCCTCAA	CAGCCCACATGTGCTCGAA	56	186
49	An1-4	CCTTGGAACTCCCGGTAT	CTAGAATTCCTTGCCCAACAA	56	184
50	An1-5	TGTGGATGACACGGC	TCCCAGTGACTGCTTG	52	251
51	An1-6	GCGGATGACGTTTGGATT	GGCAAGCTCCAGATACAC	56	159
52	An1-7	CAGGCACTCCATCAGGT	CGGCTGCCAGAAAATAGG	61.2	233
53	Adh1-1	GACCAGACGCTGCTACA	GCATTGGAAATGTTTCCGTC	56	407
54	Adh1-2	GTCATTGTGTGCGTTATGTA	CGCTCTCAAGTGCCAT	56	268
55	lds1-1	GCAAGTTAAGAAGAGCAGAAG	ATCGCAGCTCGATCATA	56	455
56	lds1-2	GAGTTGACGCTGACATCAAT	GGTCACCCCTCTGTATTTTG	56	243
57	lds1-3	CGCATGGGACAATTCCTT	GGGCTCAAAGTTGGTAAC	56	510
58	lds1-4	AAGGAGAGTTGCTTACTGAG	GAATTGGATGCCCATGGA	56	217
59	lpt-1	GTCGCGTCTGGCGAT	TCAATGGTGCCAGGAG	56	238
60	lpt-2	CGTCCGTGGAATTCACTT	GGATCCTGTTTGCCGC	56	611
61	AP2-1	ATCGCCGCTCGATCA	AATACCGTGGGGTCACT	62	514
62	AP2-2	CCTAGAGCTTCTCTTGAAAT	GATGATTATGAGGAGGATCTGAA	56	205
63	AP2-3	GGATCGAAGTTGGTCACTGC	TTGACAAGTGTGGGAGATGG	56	432
64	Glossy15-1	TCGAGAAGTCCAGTACC	CCCCACGAACTTGATCG	56	588
65	Glossy15-2	TGGATGATTATGAGGAGGATCT	CGTCTAAGTACATGGACAAAT	56	181

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

No.	Primers	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	T _m (°C)	Product
66	Glossy15-3	TTTAGGGGTGTGACCTTGACAAAA	TCAGTGTTGAAGAGGCCCAGG	56	269
67	Glossy15-4	GGCTGCAATCAAGTGTCAT	AAAGGTCAAGATTGTGCTCAG	56	211
68	D1-1	TAAGCTCATGTGGTCGGAG	GCATCAGCGTTATCAACC	56	250
69	D2-1	TCTTTCCCAAGATTGATGAGTTC	TTTTCAATGCTAGCTATTTGCTTC	56	409
70	D2-2	CTTGTTCTTGGTACCCTTTC	GAGGGAATCAAGCATGTC	56	209
71	D2-3	CTTCGATGATGGCTGTCAAA	GCATCCTCTGCTGACTTC	56	211
72	D2-4	AAGTCCTTGAGTTTCACTCG	ACAACTGTGGCAATCCTTAG	56	160
73	D2-5	GGAAAACAACCCAAGATGTG	CCTTGTGTAACATAAATTCTCCA	56	204
74	D2-6	CCCATTTTTGTATCCTGAACC	CCTCCTCCACCAACATCAT	56	207
75	D2-7	GACAGCAGAAATCGAACATT	CATTGGGAGCTTCAACTCTTG	56	413
76	D3-1	TTTTGATGGATGACGACCTG	AATCCAGGGATGTTAATGGC	52	353
77	D3-2	CCATTAACATCCCTGGATTTGC	AAGATTCATGACCAGCATTGAG	56	551
78	D3-3	ATGTGGGCCACTGTGTTTCT	ACTTCTGTACCAAGTCTGAACTC	56	598
79	D8-1	GAGCATGCTGTCCGAG	AGAGGAGGAAGAGGAGG	52	329
80	CS-ACS1-1	AGGAATTAGCAACGCATCTC	GAAGATCCTTATGATGCTGTCA	56	523
81	CS-ACS2-1	CTGGGTGTTGCTTCAAATAGTTC	CCTTCAGGAGTCATTAGATGGG	56	231
82	CS-ACS2-2	AATGCGGTCAGGGTCAAAT	GCCTTGTTTCAAGACTACCAT	56	227
83	CS-ACS2-3	GACTGGGATTATGTTGACTCC	GCGTTGCTAATTCTACTCC	56	276
84	EgAD1-1	GAGCACTCTCGGCGAAT	GCACAGTTGCTTTCTCTCAA	56	298
85	EgRING1-1	CAGCAGCAGAGCTGAA	AGTCTCAGATCCCAGTC	53.9	360
86	EgFB1-1	ACCAAATCATTGGATTTCTCATCA	GCTGAATTTGCTACTGCCA	56	124
87	EgFB1-2	CTTCTCCATTAAGCGGGC	CAAGTCGCTATGATTCACCT	56	402
88	EgFB1-3	TTGGTGTCCAAGATTGTCCAT	ATCTCCCATATTTCTTCTCTCC	56	110

4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย ILP

ไพรเมอร์ ILP ทั้งหมด 139 คู่ ถูกนำมาเพิ่มปริมาณจีโนมมิกดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน จำนวน 43 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 41 ตัวอย่างรวมทั้ง clone B และ clone D) ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการให้โพลิมอร์ฟิซึมและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์พบว่าเครื่องหมายที่พัฒนาจาก MADs box และยืนยันกำหนดเพศสามารถทำพีซีอาร์สำเร็จได้ครบทุกคู่ทั้ง 139 ไพรเมอร์ และพบว่า มี 53.24% (74/139) ที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมและไม่แสดงโพลิมอร์ฟิซึม 46.76% (65/139) (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ร้อยละการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมาย ILP ทั้ง 139 คู่ ที่ประเมินได้จากตัวอย่างปาล์มน้ำมัน 43 ตัวอย่าง

	MADs box	Sex-determination	total
PCR success rate	100% (96)	100% (43)	139 (100%)
Polymorphic	56.25% (54)	46.51% (20)	53.24% (74/139)
Monomorphic	43.75% (42)	53.49% (23)	46.76% (65/139)

4.4 การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP

ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์กับตัวอย่างปาล์มน้ำมัน 43 ตัวอย่าง (รวม clone B และ clone D) กับคู่ไพรเมอร์ 139 คู่ ไพรเมอร์ โดยพบไพรเมอร์ที่สามารถแสดงโพลิมอร์ฟิซึมได้ทั้งหมด 74 เครื่องหมาย เมื่อนับแถบดีเอ็นเอแล้วนำมาประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP โดยการคำนวณหา จำนวนแอลลีล (NA; number of allele) จำนวนจีโนไทป์ (NG; number of genotype) ค่า Gene Diversity ค่า Heterozygosity (H) และค่าPIC (Polymorphism information content) พบว่ามีจำนวนแอลลีลรวมทั้ง 264 แอลลีล โดยจำนวนแอลลีลที่พบจะอยู่ในช่วง 2 ถึง 7 แอลลีล ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.26 เครื่องหมายที่ให้จำนวนแอลลีลสูงสุดจำนวน 7 แอลลีลต่อไพรเมอร์ คือ เครื่องหมาย AGL2-2-3, An1-4 และ GT120393-2 และเครื่องหมายที่ให้จำนวนแอลลีลน้อยที่สุดจำนวน 2 แอลลีล มีทั้งหมด 30 เครื่องหมาย ดังตาราง 4.4 จำนวนจีโนไทป์ที่ได้จากการวิเคราะห์พบว่ามีจำนวนจีโนไทป์ทั้งหมด 325 จีโนไทป์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.01 โดยมี

เครื่องหมาย 1 เครื่องหมาย ที่ให้จำนวนจีโนไทป์สูงที่สุดคือ 18 จีโนไทป์ ซึ่งคือเครื่องหมาย An1-4 เมื่อคำนวณค่า Gene Diversity พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.38 ซึ่งมีค่าต่ำสุดคือเครื่องหมาย M5-3 มีค่าเท่ากับ 0.047 และมีค่าสูงสุดคือเครื่องหมาย An1-4 มีค่าเท่ากับ 0.81 เมื่อคำนวณค่า Heterozygosity พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.42 ซึ่งมีค่าต่ำสุดคือเครื่องหมาย M5-3 มีค่าเท่ากับ 0.048 และมีค่าสูงสุดคือเครื่องหมาย AGL2-4-4 มีค่าเท่ากับ 0.98 และเมื่อคำนวณค่า PIC พบว่ามีค่าเฉลี่ย 0.34 ซึ่งมีค่าต่ำสุดคือเครื่องหมาย M5-3 มีค่าเท่ากับ 0.045 และมีค่าสูงสุดคือเครื่องหมาย An1-4 มีค่าเท่ากับ 0.78 ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงความแปรปรวนของแอลลีลของเครื่องหมาย ILP ที่มีโพลิมอร์ฟิซึม ระหว่างตัวอย่าง ปาล์มน้ำมัน 41 ตัวอย่าง

Marker	GenotypeNo	AlleleNo	GeneDiversity	Heterozygosity	PIC
GLO1-1	7.0000	6.0000	0.4159	0.3721	0.3822
GLO1-3	7.0000	4.0000	0.6478	0.4750	0.5840
GLO1-4	3.0000	2.0000	0.4717	0.3333	0.3604
GLO2-1	5.0000	3.0000	0.6055	0.3023	0.5276
GLO2-2	2.0000	2.0000	0.1095	0.1163	0.1035
GLO2-3	3.0000	3.0000	0.1106	0.0233	0.1065
GLO2-4	3.0000	2.0000	0.4717	0.3333	0.3604
AG2	3.0000	2.0000	0.4543	0.5116	0.3511
AGL2-1-2	3.0000	2.0000	0.1687	0.1395	0.1545
AGL2-1-3	4.0000	4.0000	0.3058	0.3488	0.2886
AGL2-1-4	3.0000	3.0000	0.2674	0.1163	0.2500
AGL2-2-1-1	3.0000	2.0000	0.2423	0.2308	0.2129
AGL2-2-1-2	5.0000	4.0000	0.2311	0.1538	0.2176
AGL2-2-3	7.0000	7.0000	0.6181	0.8250	0.5918
AGL2-3-1	5.0000	5.0000	0.1576	0.1667	0.1540
AGL2-4-1	2.0000	2.0000	0.1120	0.1190	0.1057
AGL2-4-3	3.0000	2.0000	0.0673	0.0233	0.0651

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Marker	GenotypeNo	AlleleNo	GeneDiversity	Heterozygosity	PIC
AGL2-4-4	3.0000	4.0000	0.5441	0.9767	0.4399
AGL2-4-5	3.0000	3.0000	0.5051	0.8372	0.3989
SQUA3-1	3.0000	3.0000	0.0898	0.0930	0.0878
SQUA3-2	3.0000	3.0000	0.0679	0.0698	0.0666
SQUA3-3	4.0000	4.0000	0.3888	0.4878	0.3434
SQUA3-4	3.0000	2.0000	0.3084	0.1905	0.2608
GLO2-5	2.0000	2.0000	0.2041	0.2308	0.1833
AGL2-1-1	2.0000	2.0000	0.1120	0.1190	0.1057
Ts1-1	4.0000	4.0000	0.4447	0.5714	0.3984
Ts1-2	5.0000	3.0000	0.5666	0.3750	0.4773
Ts1-3	3.0000	3.0000	0.4557	0.2439	0.4108
Ts1-4	5.0000	5.0000	0.5819	0.8000	0.5383
Ts1-5	2.0000	2.0000	0.1841	0.2051	0.1671
Ts1-7	3.0000	3.0000	0.3397	0.4000	0.3135
An1-1	3.0000	2.0000	0.4888	0.2000	0.3693
An1-3	2.0000	2.0000	0.2276	0.2619	0.2017
An1-4	18.0000	7.0000	0.8067	0.6410	0.7802
An1-5	2.0000	2.0000	0.4543	0.6977	0.3511
An1-6	4.0000	4.0000	0.4416	0.5500	0.4067
An1-7	12.0000	5.0000	0.6621	0.3810	0.6053
Adh1-1	4.0000	4.0000	0.1939	0.2093	0.1867
lds1-1	2.0000	2.0000	0.3439	0.4412	0.2847
lds1-2	4.0000	4.0000	0.2210	0.2439	0.2086
lds1-3	4.0000	3.0000	0.3023	0.1765	0.2759
lds1-4	5.0000	5.0000	0.4475	0.5500	0.4189

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Marker	GenotypeNo	AlleleNo	GeneDiversity	Heterozygosity	PIC
lpt1	6.0000	6.0000	0.4028	0.4750	0.3843
lpt2	8.0000	4.0000	0.6812	0.7838	0.6329
AP2-1	2.0000	2.0000	0.4082	0.5714	0.3249
AP2-2	4.0000	4.0000	0.6487	0.9535	0.6025
Glossy15-1	6.0000	3.0000	0.5089	0.5000	0.4519
Glossy15-2	4.0000	4.0000	0.5668	0.7632	0.5264
D2-6	4.0000	4.0000	0.3352	0.3902	0.3131
D8-1 (1)	6.0000	3.0000	0.6384	0.3235	0.5629
D8-1 (2)	2.0000	2.0000	0.3457	0.4444	0.2859
FB1-3	3.0000	3.0000	0.4373	0.5526	0.3958
PH1-1	2.0000	2.0000	0.0973	0.1026	0.0926
M4-3	3.0000	3.0000	0.3980	0.5238	0.3355
M5-1	2.0000	2.0000	0.2401	0.2791	0.2113
M5-3	2.0000	2.0000	0.0465	0.0476	0.0454
M8-2	7.0000	4.0000	0.5740	0.5714	0.5214
M8-3	5.0000	3.0000	0.5882	0.7381	0.5002
M8-4	6.0000	4.0000	0.5788	0.8571	0.4939
M9-3	3.0000	3.0000	0.4600	0.6000	0.4102
M11-3	2.0000	2.0000	0.3107	0.3846	0.2624
M12-3	2.0000	2.0000	0.2337	0.2703	0.2064
M14-1	5.0000	5.0000	0.2150	0.2326	0.2086
M14-3	4.0000	4.0000	0.1114	0.1163	0.1088
M14-4	2.0000	2.0000	0.2055	0.2326	0.1844
161-2	3.0000	3.0000	0.2603	0.2927	0.2442
161-3	3.0000	3.0000	0.5071	0.7073	0.4431

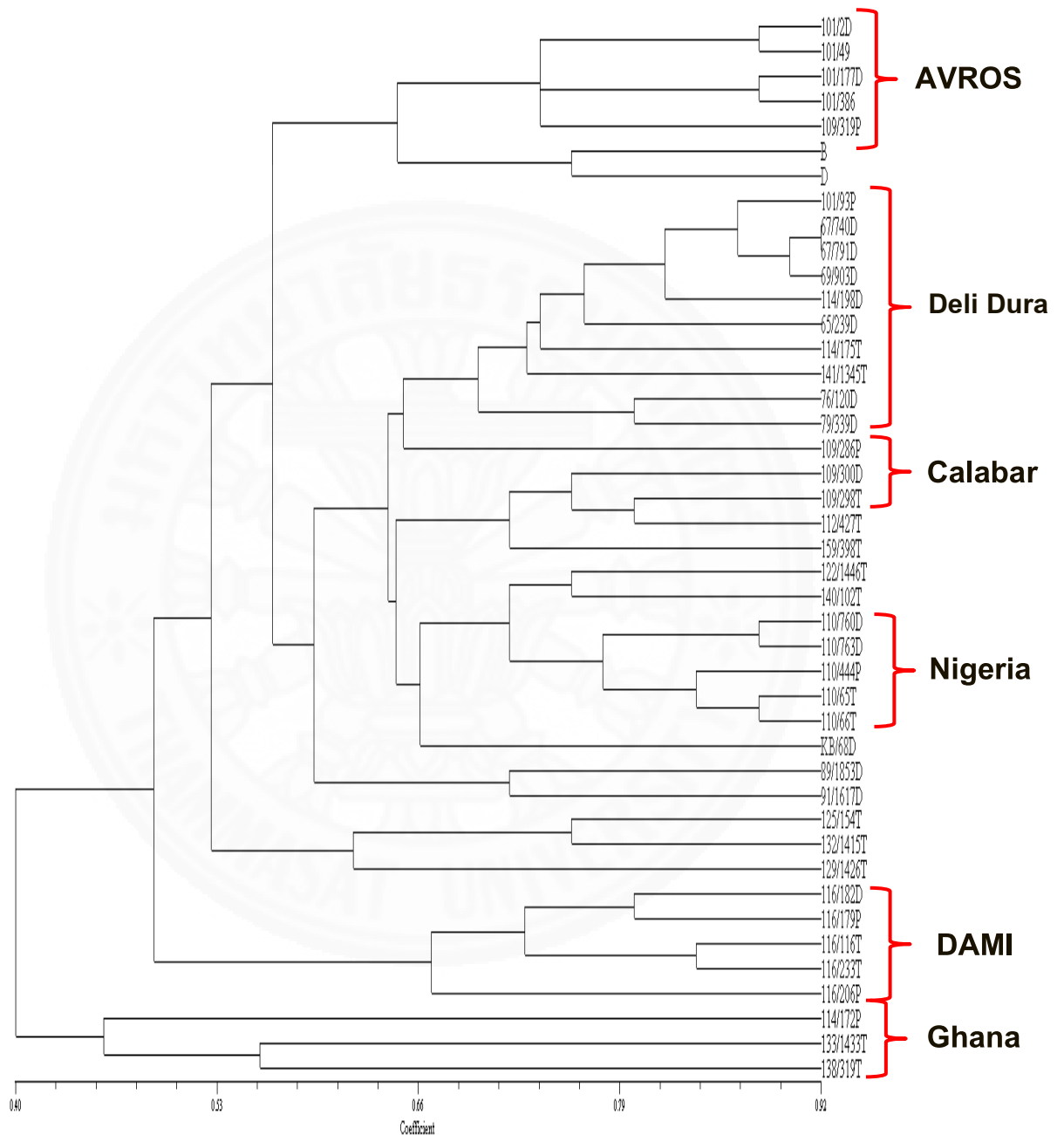
ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Marker	GenotypeNo	AlleleNo	GeneDiversity	Heterozygosity	PIC
339-1	3.0000	3.0000	0.3956	0.4884	0.3574
493-1	4.0000	4.0000	0.5714	0.8140	0.5157
578-1	2.0000	2.0000	0.1723	0.1905	0.1575
987-1	6.0000	6.0000	0.4370	0.5349	0.4085
987-2	2.0000	2.0000	0.2726	0.3256	0.2354
040-1	2.0000	2.0000	0.2712	0.3235	0.2344
266-1	4.0000	4.0000	0.3143	0.3571	0.2995
266-2	6.0000	4.0000	0.7117	0.9524	0.6606
266-3	3.0000	2.0000	0.4766	0.5676	0.3630
266-4	3.0000	2.0000	0.4950	0.6000	0.3725
324-1	3.0000	3.0000	0.3699	0.4524	0.3322
324-2	5.0000	4.0000	0.5416	0.6744	0.4900
393-1	2.0000	2.0000	0.4673	0.7442	0.3581
393-2	11.0000	7.0000	0.7915	0.7674	0.7600
Mean	4.0123	3.2593	0.3818	0.4204	0.3382
Maximum	18.0000	7.0000	0.8067	0.9767	0.7802
Minimum	2.0000	2.0000	0.0465	0.0476	0.0454

4.5 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

เครื่องหมายที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมทั้งหมด 74 เครื่องหมาย ถูกนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic similarity) และสร้างเดนโดรแกรมของตัวอย่างที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งรวมทั้ง clone B และ clone D ทั้งหมด 43 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่า สามารถจัดกลุ่มพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้สอดคล้องกับแหล่งที่มาของปาล์มน้ำมัน (ภาพที่ 4.1) คือ AVROS, Deli Dura, Calabar, Nigeria, DAMI และ Ghana และจากรูปจะเห็นได้ว่าจะมี

บางตัวอย่างของปาล์มน้ำมันไม่สามารถจัดกลุ่มได้อยู่ในกลุ่มใดได้เนื่องจากตัวอย่างเหล่านั้นเป็นพันธุ์ลูกผสม (hybrid line)


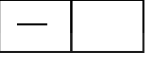





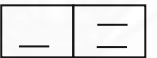

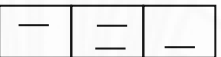




ภาพที่ 4.1 แสดงเดนโดรแกรม (dendrogram) ที่วิเคราะห์จากเครื่องหมาย ILP 74 เครื่องหมาย ด้วยวิธี unweight pair-group method with arithmetic means (UPGMA) ในตัวอย่างปาล์ม น้ำมันจำนวน 43 ตัวอย่าง

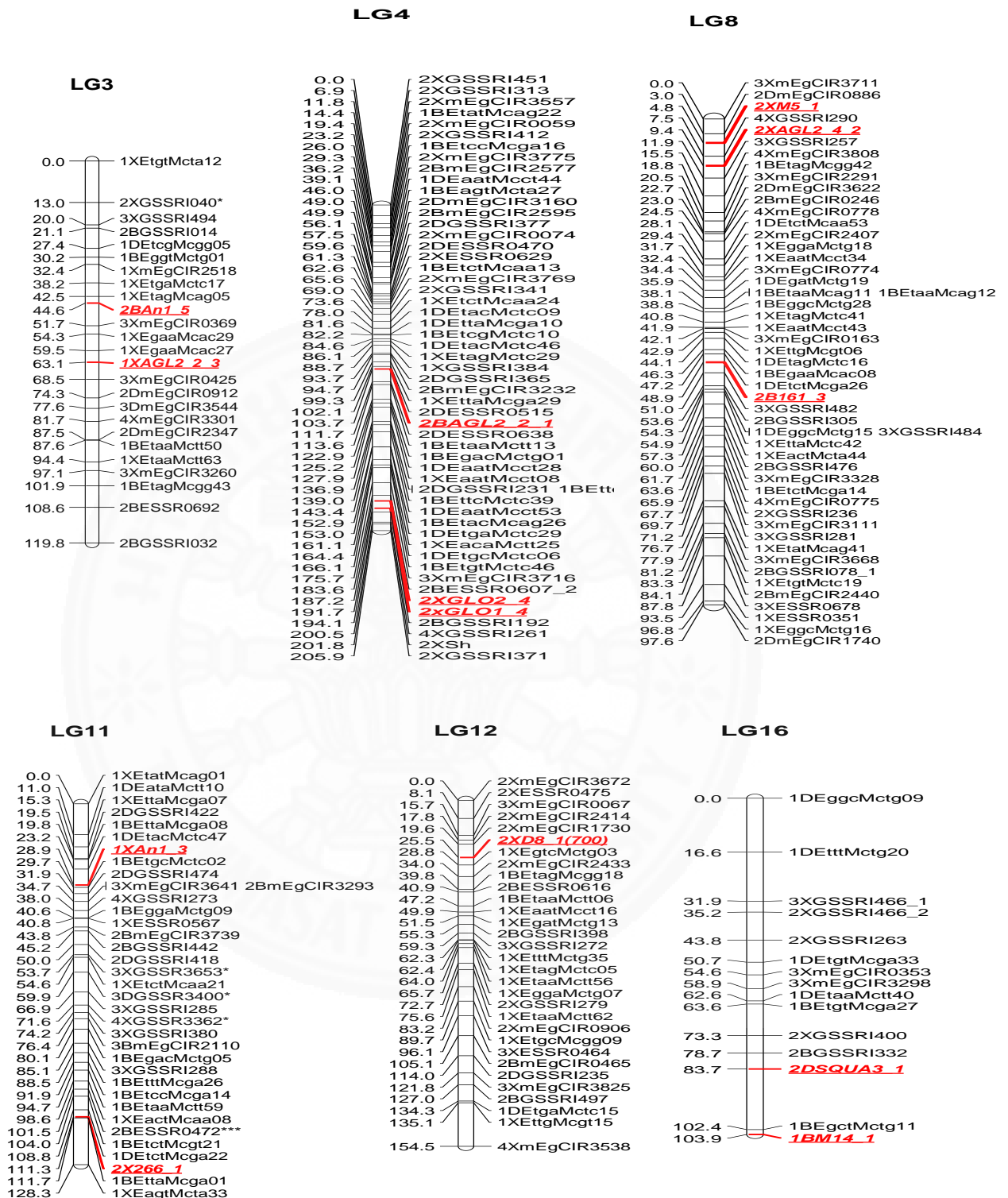
4.6 การเพิ่มเครื่องหมายลงในแผนที่ทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

เมื่อนำเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาขึ้นทั้ง 139 เครื่องหมาย มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ ตัวอย่างที่สุ่มจากประชากรลูกผสม F1 จำนวน 10 ตัวอย่างรวมทั้งพ่อ (clone B) และแม่ (clone D) จากลูกผสมทั้งหมด 208 ตัวอย่าง เพื่อค้นหาเครื่องหมายที่มีโพลิมอร์ฟิซึมที่จะนำมาเพิ่มลงในแผนที่ทางพันธุกรรมที่มีก่อนหน้าของ Ukoskit *et al.* (2014) พบว่าเครื่องหมายทุกเครื่องหมายสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้คิดเป็น 100% โดยเครื่องหมายที่พัฒนาจากยีน MADS box สามารถให้โพลิมอร์ฟิซึมจำนวน 14 เครื่องหมาย จาก 12 ยีน คิดเป็น 15.9% จากเครื่องหมายที่พัฒนาจากยีน MADS box ทั้งหมดและเครื่องหมายที่พัฒนาจากยีนกำหนดเพศมีโพลิมอร์ฟิซึมจำนวน 8 เครื่องหมาย 4 ยีน คิดเป็น 15.7% จากเครื่องหมายที่พัฒนาจากยีนกำหนดเพศทั้งหมด ซึ่งรวมเครื่องหมายที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมทั้งหมด 22 เครื่องหมาย จาก 16 ยีน คิดเป็น 15.8% จากเครื่องหมายทั้งหมด 139 เครื่องหมาย และจากเครื่องหมายที่มีโพลิมอร์ฟิซึมพบว่าเครื่องหมายที่มีอัตราส่วนคาตหมายการกระจายตัวเป็นแบบ 1:1 โดยมีเครื่องหมายที่พัฒนาจากยีน MADS box จำนวน 5 เครื่องหมาย คือ SQUA3-1, AGL2-2-1, M12-3, GT119161-3 และ M14-1 และเครื่องหมายที่ออกแบบจากยีนกำหนดเพศจำนวน 5 เครื่องหมาย คือ An1-5, lds1-3, lds1-4, D8-1(200) และ TS1-3, พบเครื่องหมายที่ออกแบบจากยีน MADS box และยีนกำหนดเพศจำนวนละ 1 ยีน มีอัตราส่วนคาตหมายการกระจายตัวแบบ 3:1 นั่นก็คือเครื่องหมาย AGL2-2-3 และ An1-3 ตามลำดับ, เครื่องหมายที่มีอัตราส่วนคาตหมายการกระจายตัวแบบ 1:2:1 พบทั้งเครื่องหมายที่ออกแบบจากยีน MADS box จำนวน 7 เครื่องหมาย คือ AGL2-4-2, GLO1-4, GLO2-4, M4-3, GT120266-1, M5-1 และ GT120393-2 และเครื่องหมายที่ออกแบบจากยีนกำหนดเพศจำนวน 2 เครื่องหมาย คือ An1-1 และ D8-1(700) และ เครื่องหมาย GT120393-1 เป็นเครื่องหมายที่ออกแบบจากยีน MADS box พบว่ามีอัตราส่วนคาตหมายการกระจายตัวแบบ 1:1:1:1 (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 แสดงการวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากรลูกผสม F_1 จำนวน 208 ต้น

Code	Segregating marker alleles	Parent genotypes	Progeny phenotype classes	Number of segregating marker loci in the cross		
		B x D	Allelic pattern and Segregation ratio	MADs box gene primers	Sex-determination primers	Total
1B	1 allele	 ao x oo	 1:1	1	1	2
1X		 ao x ao	 3:1	1	1	2
2B	2 alleles	 ab x aa	 1:1	4	4	8
2D		 aa x ab	 1:1	1	-	1
2X		 ab x ab	 1:2:1	6	2	8
3X	3 alleles	 ab x ac	 1:1:1:1	-	1	1
Total				6	16	22

จากเครื่องหมายที่สามารถให้โพลิมอร์ฟิซึมในตัวอย่างประชากรปาล์มน้ำมัน 208 ตัวอย่าง จำนวน 22 เครื่องหมาย นำมาเพิ่มลงในแผนที่ทางพันธุกรรมที่มีอยู่ก่อนหน้าของ Ukoskit และคณะในปี 2014 พบว่าสามารถเพิ่มได้เพียง 13 เครื่องหมาย จากทั้งหมด 22 เครื่องหมาย โดยเครื่องหมาย An1-5 และ AGL2-2-3 อยู่บนลิงค์เกจที่ 3, เครื่องหมาย AGL2-2-1, GLO1-4 และ GLO2-4 อยู่บนลิงค์เกจที่ 4, เครื่องหมาย AGL2-4-2, M5-1 และ GT119161-3 อยู่บนลิงค์เกจที่ 8, เครื่องหมาย An1-3 และ GT120266-1 อยู่บนลิงค์เกจที่ 11, เครื่องหมาย D8-1 อยู่บนลิงค์เกจที่ 12 และเครื่องหมาย SQUA3-1 และ M14-1 อยู่บนลิงค์เกจที่ 16 ดังรูปที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 แสดงตำแหน่งของทั้ง 13 เครื่องหมาย เมื่อนำไปสร้างแผนที่พันธุกรรมร่วมกับแผนที่พันธุกรรมของ Ukoskit et al. (2014)

จากนั้นตรวจสอบตำแหน่งของเครื่องหมายโดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของเครื่องหมายทั้ง 13 เครื่องหมายกับลำดับเบสทั้งจีโนมของปาล์มน้ำมันในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST พบเครื่องหมาย An1-5 และ AGL2-2-3 อยู่บนโครโมโซมที่ 3 ซึ่งตำแหน่งของเครื่องหมายทั้งสองคือ 51,246,918 และ 43,760,713 ตามลำดับ, เครื่องหมาย AGL2-2-1, GLO1-4 และ GLO2-4 อยู่บนโครโมโซมที่ 4 และตำแหน่งของเครื่องหมายบนโครโมโซมคือ 5,550,107, 17,595,606 และ 1,472,867 ตามลำดับ, เครื่องหมาย M5-1, AGL2-4-2 และ GT119161-3 มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 8 คือ 20,541,062, 4,107,879 และ 50,804 ตามลำดับ, เครื่องหมาย An1-3 และ GT120266-1 อยู่บนโครโมโซมที่ 11 ซึ่งมีตำแหน่งคือ 9,085,887 และ 4,309,227 ตามลำดับ, บนโครโมโซมที่ 12 พบลำดับของเครื่องหมาย D8-1 โดยมีตำแหน่งบนโครโมโซมคือ 22,667,273 และเครื่องหมาย SQUA3-1 และ M14-1 อยู่บนโครโมโซมที่ 16 และมีตำแหน่งบนโครโมโซมคือ 81,56,546 และ 7,080,200 ตามลำดับ โดยจากการเปรียบเทียบจะแสดงถึงตำแหน่งบนโครโมโซม ดังตารางที่ 4.6 ซึ่งจากผลดังกล่าวพบว่ากลุ่มลิงค์เกจที่มีการเพิ่มเครื่องหมาย ILP ทั้ง 13 เครื่องหมาย เป็นกลุ่มลิงค์เกจที่ตรงกับโครโมโซมของปาล์มน้ำมันในฐานข้อมูล

ตารางที่ 4.6 แสดงผลจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของเครื่องหมายกับจีโนมของปาล์มน้ำมันเพื่อตรวจสอบตำแหน่งที่อยู่บนโครโมโซม

เครื่องหมาย	โครโมโซม	ตำแหน่งเริ่มต้นของ เครื่องหมายบนโครโมโซม	NCBI accession
An1-5	3	51,246,918	NC_025995.1
AGL2-2-3	3	43,760,713	NC_025995.1
AGL2-2-1	4	5,550,107	NC_025996.1
GLO1-4	4	17,595,606	NC_025996.1
GLO2-4	4	1,472,867	NC_025996.1
M5-1	8	20,541,062	NC_026000.1
AGL2-4-2	8	4,107,879	NC_026000.1
GT119161-3	8	50,804	NC_026000.1
An1-3	11	9,085,887	NC_026003.1
GT120266-1	11	4,309,227	NC_026003.1
D8-1	12	22,667,273	NC_026004.1

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

เครื่องหมาย	โครโมโซม	ตำแหน่งเริ่มต้นของ เครื่องหมายบนโครโมโซม	NCBI accession
SQUA3-1	16	8,156,546	NC_026008.1
M14-1	16	7,080,200	NC_026008.1

4.7 การวิเคราะห์ QTLs ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตปาล์มน้ำมัน

เมื่อนำแผนที่ทางพันธุกรรมที่ได้ทำการเพิ่มเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาแล้วไปวิเคราะห์ QTL โดยใช้โปรแกรม MapQTL 4.0 ซึ่งวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาขึ้นกับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตปาล์มน้ำมัน โดยใช้วิธีในการวิเคราะห์ QTL 3 วิธีและให้ผล ดังนี้

4.7.1 การวิเคราะห์ QTLs โดยวิธี Kruskal-Wallis (Single analysis)

ในการวิเคราะห์ QTL โดยใช้วิธี single marker analysis จะพิจารณาเครื่องหมายที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.01$ หรือมีค่า p-value น้อยกว่า 0.01 (Ukoskit *et al.*, 2014) เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นในระดับสูงว่าเป็นความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะ โดยพบเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับลักษณะผลผลิตของปาล์มน้ำมันทั้งหมด 3 ลักษณะคือ พบเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะจำนวนดอกเพศผู้ (male inflorescences; MI) จำนวน 1 เครื่องหมาย คือ D8-1 โดยเป็นเครื่องหมายที่ออกแบบจากยีนกำหนดเพศ, มีเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะจำนวนดอกรวม (total inflorescences; TI) สองเครื่องหมาย หนึ่งเครื่องหมายออกแบบจากยีนกำหนดเพศคือ เครื่องหมาย GT119161-3 และอีกหนึ่งเครื่องหมายคือ SQUA3-1 เป็นเครื่องหมายที่ออกแบบจากยีน MADs box และพบเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักทะลาย (bunch weight; BW) คือเครื่องหมาย AGL2-2-3 ที่ออกแบบจากยีน MADs box โดยจากการวิเคราะห์จะแสดงค่านัยสำคัญและตำแหน่งของเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะต่างๆบนตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ QTLs กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปาล์มน้ำมันโดยใช้วิธี

Kruskal–Wallis analysis

Traits	LG	Marker	Position (cM)	K	BxD	Genotype class means		
						hh: 10.37	hk: 11.81	kk: 9.73
MN	12	D8-1	25.5	**	hkxhk	hh: 10.37	hk: 11.81	kk: 9.73
TI	8	GT119161-3	49.7	**	llxlm	ll: 29.91	lm: 28.12	
	16	SQUA3-1	83.7	**	nnxnp	nn: 28.43	np: 29.38	
BW	3	AGL2-2-3	61.6	**	hk x h-	kk: 6.5	h-: 7.31	

หมายเหตุ ** P<0.01

MN คือ จำนวนช่อดอกเพศผู้

TI คือ จำนวนช่อดอกทั้งหมด

BW คือ น้ำหนักทะลาย

4.7.2 การวิเคราะห์ QTLs โดยวิธี Interval mapping

สำหรับการวิเคราะห์ QTLs โดยวิธี Interval mapping เมื่อวิเคราะห์แล้วจะคัดเลือกเครื่องหมายที่มีค่า LOD score ตั้งแต่ 2.0 ขึ้นไป และจะต้องมีค่า p-value น้อยกว่า 0.01 จากการวิเคราะห์โดยวิธี kruskal-wallis analysis ซึ่งพบว่าเครื่องหมาย D8-1 ในลิงค์เกจที่ 12 และออกแบบจากยีนกำหนดเพศสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนดอกเพศผู้ (MI) โดยมีค่า LOD score เท่ากับ 2.01 ($P < 0.01$) และมีอิทธิพลต่อความแปรปรวนฟีโนไทป์ 6.1% และเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักทะลาย (BW) คือเครื่องหมาย AGL2-2-3 ในลิงค์เกจ 3 มีค่า LOD score เท่ากับ 2.39 ($P < 0.01$) โดยมีอิทธิพลต่อความแปรปรวนฟีโนไทป์ 11.6% (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ QTLs กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปาล์มน้ำมันโดยใช้วิธี

Interval mapping

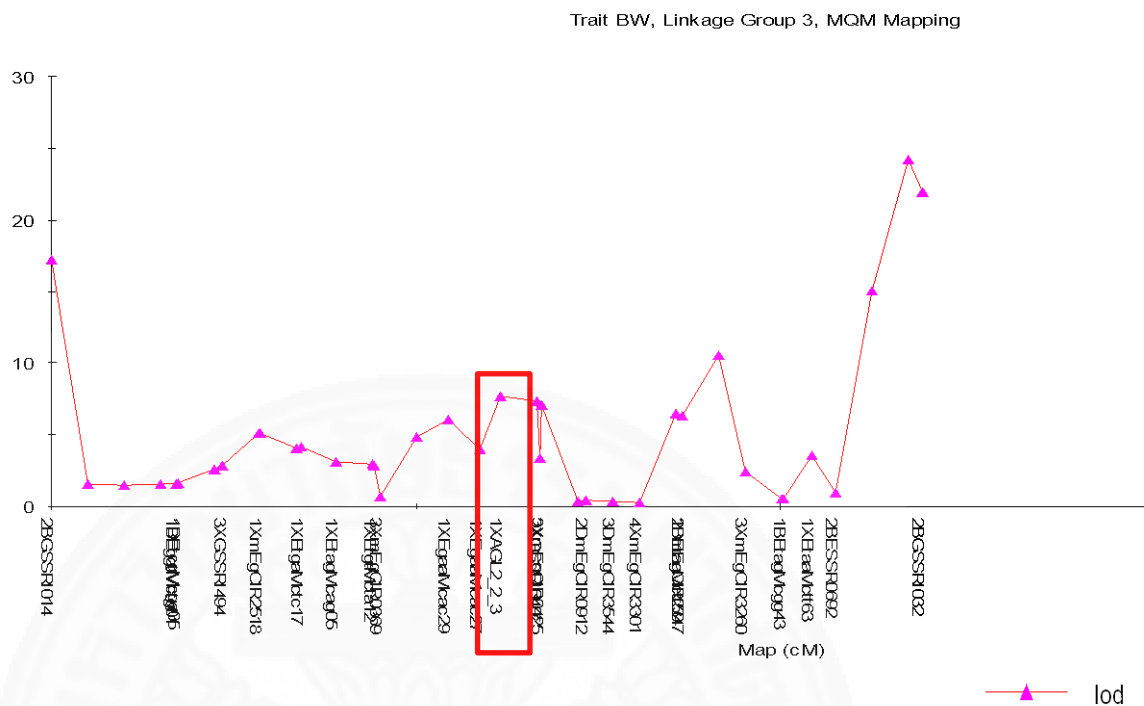
Trait	LG	Marker	Position (cM)	LOD	%expl	Genotype class means			
						ac	ad	bc	bd
MI	12	D8-1	25.5	2.01	6.1	9.80161	11.5656	12.1754	10.3560
BW	3	AGL2-2-3	61.6	2.39	11.6	8.1419	6.58	6.7507	7.108

4.7.3 การวิเคราะห์ QTLs โดยวิธี MQM analysis

จากผลการวิเคราะห์ QTL โดยวิธี Interval mapping (ตารางที่ 4.7) จะนำผลที่ได้มาคัดเลือกเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะโดยการวิเคราะห์ MQM analysis เพื่อให้ผลที่ได้มีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยพบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะจำนวนหนึ่งความสัมพันธ์กับลักษณะผลผลิตปาล์มน้ำมันซึ่งก็คือ เครื่องหมาย AGL2-2-3 โดยจะสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักทะลาย (BW) โดยจะมีตำแหน่งอยู่บนลิ้งค์เกจที่ 3 ตำแหน่งที่ 61.6 โดยจะมีค่า LOD เท่ากับ 7.71 (ภาพที่ 4.3) และยังพบอีกว่าเครื่องหมาย AGL2-2-3 จะส่งผลต่อลักษณะน้ำหนักทะลายของปาล์มน้ำมัน 11.6% และเมื่อทำการวิเคราะห์ Permutation test เพื่อดูค่า LOD score พบว่าค่า LOD score ของลิ้งค์เกจที่ 3 มีค่าเท่ากับ 3.1 และค่า LOD score ของทั้งจีโนมมีค่าเท่ากับ 4.6 (ตารางที่ 4.8) จากค่าดังกล่าวที่วิเคราะห์ได้จะนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการประเมินเครื่องหมาย AGL2-2-3 ที่ได้จากการวิเคราะห์ MQM analysis พบว่าเครื่องหมาย AGL2-2-3 มีค่า LOD score มากกว่าค่า LOD score ที่ได้จากการวิเคราะห์ Permutation test ทั้งสองค่า

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ QTLs กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปาล์มน้ำมันโดยใช้วิธี MQM analysis และค่า LOD score ที่ได้จากการวิเคราะห์ Permutation test

Trait	LG	marker	Position (cM)	LOD	%PVE	LOD α C	LOD aG	Genotype class means			
								ac	ad	bc	bd
BW	3	1XAGL2-2-3	61.6	7.71	11.6%	3.1	4.6	6.77	5.64	4.84	5.55



ภาพที่ 4.3 แสดงค่า LOD เครื่องหมาย AGL2-2-3 ที่อยู่บนลิงค์เกจที่ 3 จากการวิเคราะห์ MQM analysis

บทที่ 5

อภิปรายผล

ในปัจจุบันเทคโนโลยีสารสนเทศนั้นมีความสำคัญและส่งผลอย่างมากต่อการพัฒนาเครื่องมือทางโมเลกุลโดยเฉพาะเครื่องมือทางโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งจากการพัฒนาที่มีความก้าวหน้ามากขึ้นในปัจจุบันของเทคโนโลยีสารสนเทศทำให้มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลได้มากขึ้น อย่างในงานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง โดยจะพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากลำดับเบส EST ที่ได้จากการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูล NCBI โดยในอันดับแรกจะพิจารณาคัดเลือกยีนที่มีการศึกษาจากวารสารทางวิทยาศาสตร์แล้วพบว่ายีนนั้นเกี่ยวข้องกับกำหนดยีนในปาล์มน้ำมันและยีนที่อยู่ในกลุ่มยีน MADs box โดยจะเลือกยีนของปาล์มน้ำมันและยีนของพืชที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับปาล์มน้ำมันหรือพืชในตระกูลใกล้เคียงเดี่ยว เช่นข้าวโพด, ข้าว เป็นต้น ซึ่งจากรายชื่อยีนที่ได้ทำการคัดเลือกเพื่อเก็บข้อมูลให้ได้มากที่สุดสามารถนำมาสืบค้นหาลำดับเบส EST โดยใช้เครื่องมือทางเทคโนโลยีสารสนเทศได้จำนวน 50 EST หรือ 50 ยีน ซึ่งจากการก้าวหน้าของเทคโนโลยีทำให้สามารถค้นหาลำดับเบส EST ได้จำนวนมากเนื่องจากการวิเคราะห์หาลำดับเบสเอ็กซอนของยีนหลายยีนแล้วทำการรวบรวมเป็นฐานข้อมูลที่ใหญ่มากขึ้นในปัจจุบัน นอกจากนี้การที่เครื่องมือทางเทคโนโลยีสารสนเทศที่มีการพัฒนามากขึ้นทำให้การออกแบบเครื่องหมาย ILP สามารถทำได้ง่าย, สะดวกรวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่ายในการพัฒนา

สำหรับการออกแบบเครื่องหมาย ILP จะนำลำดับเบส EST ของยีนทั้ง 50 ยีน มาเปรียบเทียบกับจีโนมของปาล์มน้ำมันเพื่อค้นหาตำแหน่งอินทรอนสำหรับออกแบบไพรเมอร์บนลำดับเบสเอ็กซอนที่มีตำแหน่งคร่อมอยู่ระหว่างอินทรอนที่ต้องการ สำหรับการออกแบบเพื่อให้ได้เครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพควรใช้ลำดับเบสจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่จะศึกษาหรือหากไม่มีลำดับเบสจีโนมแล้วก็สามารถที่จะใช้ลำดับเบสจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงได้ สำหรับลำดับเบส EST ของสิ่งมีชีวิตที่นำมาเปรียบเทียบสามารถใช้ได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตนั้น สิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกันหรือในบางครั้งพบว่าถึงแม้จะเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการไกลกัน อย่างเช่น พืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ ก็สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยจะต้องพิจารณาจากความเหมือนของลำดับเบส หากสิ่งมีชีวิตมีวิวัฒนาการห่างกันมากขึ้นความเหมือนกันของลำดับเบสจะมีโอกาสเหมือนกันน้อยลงสำหรับในงานวิจัยได้ใช้ลำดับเบส EST มาจากทั้งของปาล์มน้ำมัน และพืชอื่นๆ เช่น ข้าวโพด เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ลำดับเบส EST ของยีนในแดงกวากอีกด้วย ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับจีโนมของปาล์มน้ำมันโดยใช้โปรแกรม BLAST แล้วพบว่ามีความเหมือนกันของลำดับเบสโดยประมาณ 80% ซึ่ง

สามารถนำไปออกแบบไพรเมอร์ได้ต่อไป สำหรับการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในปัจจุบันจะทำให้มีโอกาสสามารถพัฒนาได้ในจำนวนมากขึ้นเนื่องจากในฐานข้อมูลมีลำดับเบส EST มากขึ้น รวมทั้งข้อมูลทรานสคริปโตม (transcriptome) และลำดับเบสทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่มีเพิ่มมากขึ้น จากงานจะเห็นได้ว่าจากลำดับเบส EST ของยีนทั้ง 50 ยีน สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ได้ 139 คู่ และยังสามารถหาถึงขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ซึ่งมีความสำคัญในขั้นตอนการนับแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากจะสามารถเลือกนับแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงกับขนาดที่ได้ทำนายไว้

ในงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล ILP และนำเครื่องหมาย ILP ที่ได้มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของปาล์มน้ำมัน ซึ่งในส่วนนี้ได้ใช้ตัวอย่างปาล์มน้ำมันจำนวน 41 ตัวอย่างที่ได้จากศูนย์วิจัยปาล์มจังหวัดสุราษฎร์ธานีโดยทดสอบกับเครื่องหมาย ILP ที่ได้ออกแบบมาแล้วทั้ง 139 คู่ไพรเมอร์ พบเครื่องหมายที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมจำนวน 74 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 53.24% และมีค่า PIC เฉลี่ย 0.34 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ ขวัญใจ (2553) ซึ่งใช้ตัวอย่างที่ได้จากศูนย์วิจัยปาล์มจังหวัดสุราษฎร์ธานีจำนวน 48 ต้น โดยใช้เครื่องหมาย EST-SSRs ในการทดสอบจำนวน 374 คู่ไพรเมอร์ พบโพลิมอร์ฟิซึม 248 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 82.12% และมีค่า PIC เฉลี่ย 0.34 นอกจากนี้งานวิจัยของ Gupta และคณะ ในปี 2012 พัฒนาเครื่องหมาย ILP โดยใช้ EST จากถั่วลิ้นเต่า (*Vigna unguiculata*) แล้วนำไปเปรียบเทียบกับจีโนมของอะราบิดอปซิส ซึ่งสามารถพัฒนาเครื่องหมายได้ทั้งหมดจำนวน 100 คู่ไพรเมอร์ พบว่าสามารถทำพีซีอาร์สำเร็จ 98 คู่ไพรเมอร์ และสามารถให้โพลิมอร์ฟิซึม 45 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 45.92 % และมีค่า PIC เท่ากับ 0.34 ซึ่งจากค่า PIC ที่ได้จะเห็นได้ว่ามีค่าเท่ากัน และใกล้เคียงกับงาน Saisug และ Ukoskit (2013) ที่พัฒนาเครื่องหมาย ILP ในสบู่ดำ 59 ตัวอย่างที่รวบรวมจากประเทศต่างๆ มีค่า PIC เฉลี่ย 0.35 ซึ่งจากการเปรียบเทียบค่า PIC จะเห็นได้ว่าค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันและเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมาย ILP กับการทดลองอื่น เช่นในงานวิจัยของ Li *et al.* (2011) ซึ่งเป็นการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในยางพาราพันธุ์ปรับปรุงแล้ว 39 สายพันธุ์ ใช้ไพรเมอร์จำนวน 50 คู่ไพรเมอร์ และพบเครื่องหมายที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมจำนวน 31 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 62.0% มีค่า PIC เฉลี่ย 0.22 จากงานวิจัยของ Li *et al.* (2011) ถึงแม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์การพบโพลิมอร์ฟิซึมใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ แต่ค่า PIC เฉลี่ยในงานวิจัยนี้มีค่ามากกว่า ประสิทธิภาพของเครื่องหมาย ILP อาจแสดงผลที่ใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกันได้ขึ้นกับ จำนวนตัวอย่าง แหล่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์พืชที่ใช้ในการทดสอบ

สำหรับอัตราการให้โพลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย ILP นั้นอาจจะมีอัตราการให้โพลิมอร์ฟิซึมที่ต่ำกว่าเครื่องหมาย SSR ซึ่งจะสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ ซึ่งเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเครื่องหมาย EST-SSR กับ conserved-intron scanning primers (CISP or ILP) ในพืช

ตระกูลหญ้า (Zeid *et al.*, 2010) และ เปรียบเทียบระหว่างเครื่องหมาย gSSR และ ILP ในข้าว (Wang *et al.*, 2006) ซึ่งพบว่าในเครื่องหมาย ILP นั้นให้โพลิมอร์ฟิซึมจำนวนน้อยกว่า เมื่อเทียบกับเครื่องหมาย SSR เครื่องหมาย EST-SSR สามารถตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมที่มีความหลากหลาย เนื่องจากเป็นลำดับซ้ำหรือเป็นบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากเพิ่มขึ้นหรือลดลงของลำดับดีเอ็นเอ (Varshney *et al.*, 2005) ส่วนเครื่องหมาย ILP ตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมจาก indel ที่อยู่ในอินทรอนซึ่งอาจมีความแปรปรวนของลำดับเบสน้อยกว่าความแปรปรวนเนื่องจากเป็นลำดับซ้ำ

ในการใช้เครื่องหมาย ILP ในการจัดกลุ่มพันธุ์ปาล์มน้ำมันจำนวน 41 ตัวอย่าง รวมทั้ง clone B และ clone D พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้ 6 กลุ่มใหญ่ มีความสอดคล้องดีกับแหล่งที่มาของพันธุ์และเมื่อนำแผนภูมิที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการจัดกลุ่มไปเปรียบเทียบกับแผนภูมิของ ขวัญใจ(2553) ที่ใช้ตัวอย่างปาล์มที่มาจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานีเช่นเดียวกัน แต่ใช้เครื่องหมาย EST-SSR ในการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม พบว่าการจัดกลุ่มพันธุ์ปาล์ม ด้วยเครื่องหมาย ILP ความสอดคล้องกับแหล่งที่มาของพันธุ์ มากกว่าการจัดกลุ่มพันธุ์ปาล์มด้วยเครื่องหมาย EST-SSR และ เครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาขึ้นนั้นยังสามารถแยกสายพันธุ์ลูกผสมจากสายพันธุ์แท้ได้ดีอีกด้วย โดยผลงานวิจัยนี้คล้ายกับการทดลองของ Huang *et al.* (2010) ที่พบว่า เครื่องหมาย ILP แสดงแบ่งกลุ่มข้าวได้สอดคล้องกับชนิดพันธุ์ข้าวได้ดีกว่าเครื่องหมาย SSR

งานวิจัยนี้ได้เพิ่มเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาในแผนที่ทางพันธุกรรมของประชากรลูกผสม F₁ จำนวน 208 ต้น ที่เกิดจากการผสมระหว่าง clone B และ clone D เป็นปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) พันธุ์เทเนอร่า (Tenera) ทั้งสองพันธุ์ โดยจะประกอบด้วยเครื่องหมาย GSSRs จำนวน 210 เครื่องหมาย, เครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 28 เครื่องหมาย, เครื่องหมาย AFLP จำนวน 185 เครื่องหมาย และ *Sh* locus ซึ่งถูกสร้างไว้ก่อนแล้วโดย Ukoskit *et al.* (2014) โดยเครื่องหมาย ILP เป็นเครื่องหมายที่พัฒนาจากยีน MADS box ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นดอกที่สมบูรณ์ของปาล์มน้ำมันและยีนกำหนดเพศ จากเครื่องหมายโมเลกุล ILP ที่พัฒนาขึ้นจำนวนทั้งหมด 139 คู่ไพร์เมอร์ สามารถแสดงโพลิมอร์ฟิซึมจำนวน 22 คู่ไพร์เมอร์ในประชากรลูกผสมนี้ แต่สามารถเพิ่มลงบนแผนที่ทางพันธุกรรมได้ 13 เครื่องหมาย คิดเป็น 59.09% จากเครื่องหมายที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมจากเครื่องหมายทั้ง 13 เครื่องหมายที่สามารถเพิ่มลงบนแผนที่ทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน มี 4 เครื่องหมาย ที่พัฒนามาจากยีนเดียวกันคือ เครื่องหมาย An1-3 และ An1-5 พัฒนามาจากยีน An1 และเครื่องหมาย AGL2-2-1 และ AGL2-2-3 พัฒนามาจากยีน AGL2-2 โดยการเกิดลักษณะดังกล่าว นั้นอาจเป็นเพราะยีนทั้งสองยีนอาจเป็นยีนครอบครัว (family gene) ซึ่งมียีนสมาชิกหลายยีนในครอบครัวเดียวกันและปรากฏหลายตำแหน่งบนจีโนม ทำให้สามารถเพิ่มบนแผนที่ทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันได้บนโครโมโซมที่แตกต่างกันถึงแม้ว่าจะออกแบบมาจากยีนเดียวกัน นอกจากนี้การใช้

เครื่องหมาย ILP มาสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมยังทำให้สามารถตรวจสอบตำแหน่งของเครื่องหมายได้อย่างแม่นยำ เนื่องจากทราบลำดับเบสของเครื่องหมายที่นำมาสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมโดยนำลำดับเบสของเครื่องหมายมาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของทั้งจีโนมหรือโครโมโซมของสิ่งมีชีวิต ในการวิจัยนี้การระบุตำแหน่งของเครื่องหมาย ILP บนแผนที่พันธุกรรมมีความสอดคล้องเป็นอย่างดีแผนที่จีโนมของปาล์มน้ำมัน

จากการเพิ่มเครื่องหมาย ILP ลงบนแผนที่ทางพันธุกรรม โดยเป็นเครื่องหมายที่พัฒนาจากยีนที่สนใจทำให้การนำแผนที่ทางพันธุกรรมไปวิเคราะห์ QTL กับลักษณะที่สนใจได้ผลที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นเนื่องจากจะทำให้เข้าใจและรู้ถึงยีนที่มีผลหรือควบคุมการแสดงออกของลักษณะนั้นๆโดยตรง ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาจากยีน MADs box ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการพัฒนาดอกและผลของปาล์มน้ำมันเพื่อให้มีลักษณะที่สมบูรณ์และยีนกำหนดเพศซึ่งเกี่ยวข้องกับการกำหนดการพัฒนาดอกเป็นเพศผู้หรือเพศเมียในพืชโดยคาดว่ายีนเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศในปาล์มน้ำมันเช่นกัน ซึ่งจากการศึกษาหน้าที่ของยีนเหล่านี้พบว่าอาจจะเกี่ยวข้องกับผลผลิตที่ได้จากปาล์มน้ำมัน

โดยในงานวิจัยนี้้นำแผนที่ทางพันธุกรรมที่ได้ไปวิเคราะห์ QTL เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP กับลักษณะผลผลิตปาล์มน้ำมัน จากการวิเคราะห์ QTL โดยใช้วิธี 3 วิธี คือ Single analysis, Interval mapping และ MQM mapping และการทดสอบการมีนัยสำคัญด้วย permutation test พบว่าเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตปาล์มน้ำมันคือ เครื่องหมาย AGL2-2-3 ที่อยู่บนลิงค์เกจ 3 ซึ่งจากการวิเคราะห์ QTL ทั้ง 3 วิธี พบว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักระบายที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.01$ และมีค่า LOD score เท่ากับ 7.71 ซึ่งค่าดังกล่าวมีค่ามากกว่าค่า LOD score ของโครโมโซมที่ 3 และทั้งจีโนมซึ่งมีค่าคือ 3.6 และ 4.1 ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะน้ำหนักระบายที่สามารถวิเคราะห์ได้มีความน่าเชื่อถือและจากการวิเคราะห์ QTL ยังพบอีกว่าเครื่องหมาย AGL2-2-3 ยังมีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของน้ำหนักระบาย 11.6% สำหรับการวิเคราะห์ QTL ในงานวิจัยนี้ได้ใช้แผนที่ทางพันธุกรรมของ Ukoskit *et al.* (2014) ซึ่งแผนที่ดังกล่าวได้ถูกนำไปวิเคราะห์ QTL ของลักษณะอัตราส่วนเพศและลักษณะที่เกี่ยวข้องโดย Ukoskit *et al.* (2014) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายบนแผนที่กับลักษณะน้ำหนักระบาย ในขณะที่เมื่อเพิ่มเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ลงบนแผนที่ทางพันธุกรรมทำให้สามารถพบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย AGL2-2-3 กับลักษณะน้ำหนักระบายได้ดังที่กล่าวมาข้างต้น และเมื่อนำลำดับเบสของเครื่องหมาย AGL2-2-3 มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสจีโนมพบว่าตำแหน่งเริ่มต้นคือ 43,760,713 บนโครโมโซมที่สาม โดยในงานวิจัยของ Pootakham *et al.* (2015) ได้วิเคราะห์ลักษณะปริมาณในปาล์มน้ำมันโดยใช้แผนที่

ทางพันธุกรรมที่สร้างจากเครื่องหมาย SNP จำนวน 1,085 เครื่องหมาย ซึ่งหนึ่งความสัมพันธ์ที่ผู้วิจัยพบเป็นความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะน้ำหนักรากกับเครื่องหมาย SNP ที่อยู่บนลิงค์เกจที่ 3 เช่นเดียวกัน โดยอาจมีความเป็นไปได้ว่าบนโครโมโซมแท่งที่ 3 ของปาล์มน้ำมันนั้นจะมียีนที่ควบคุมลักษณะน้ำหนักรากหรือเกี่ยวข้องกับความแปรปรวนของลักษณะน้ำหนักรากที่เกิดขึ้นได้จากการวิเคราะห์ QTL ทำให้พบว่าเครื่องหมาย AGL2-2-3 ที่ออกแบบจากยีน MADs box อาจจะมีบทบาทสำคัญต่อน้ำหนักราก ซึ่งจากการศึกษาการทำงานของยีน *AGL2* โดย Adam *et al.* (2007a) พบว่าจะควบคุมการพัฒนา รังไข่ในดอกเพศเมียของปาล์มน้ำมัน ซึ่งยีน *AGL2* จะจัดอยู่ในกลุ่ม E ของ ABCDE model โดยยีนในกลุ่ม E จะทำงานในการพัฒนาอวัยวะของดอกและรังไข่ (Adam *et al.*, 2007b) นอกจากนี้จะพบการทำงานในปาล์มน้ำมันแล้ว Yao และคณะในปี 1999 ยังพบอีกว่ายีน *AGL2* เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเมล็ดและเอ็มบริโอในแอปเปิลอีกด้วย โดย Sung and An (1997) พบว่าการแสดงออกของยีน *AGL2* มีความคล้ายกับการแสดงออกของยีน *MdMADS1* ซึ่งพบการแสดงออกในผลของแอปเปิล และจากการศึกษาของ Yang และคณะในปี 2012 ได้ศึกษาการทำงานของยีน *OsMADS29* ซึ่งพบว่ามีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีน *AGL2* เกี่ยวข้องกับการพัฒนารังไข่และเมล็ดของข้าว ซึ่งหากมีการแสดงออกที่ลดลงหรือมีความผิดปกติจะทำให้เมล็ดมีลักษณะเหี่ยวโดยทำให้ไม่มีการกระตุ้นให้สร้างแป้งในเอนโดสเปิร์มหรือในกรณีร้ายแรงอาจทำให้เมล็ดเกิดการฝ่อลีบ

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษานี้สามารถพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากกลุ่มยีน MADs box จำนวน 37 ยีน และยีนกำหนดเพศจำนวน 13 ยีน ได้ทั้งหมด 139 เครื่องหมาย จากทั้งหมด 50 ยีน พบว่ามีเครื่องหมายที่สามารถให้โพลิมอร์ฟิซึมได้จำนวน 74 เครื่องหมายจาก ตัวอย่างปาล์มน้ำมัน 41 ตัวอย่าง เมื่อนำไปผลจีโอไทป์ที่ได้ประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP พบว่ามีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.05 ถึง 0.8 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.34 เครื่องหมาย ILP สามารถจัดกลุ่มปาล์มน้ำมันทั้ง 41 ตัวอย่าง ได้ 6 กลุ่มหลักๆ สอดคล้องกับที่มาของแหล่งพันธุ์ จากเครื่องหมายที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมใน ตัวอย่างปาล์มน้ำมันลูกผสม 208 ตัวอย่าง 22 เครื่องหมาย สามารถเพิ่มลงบนแผนที่ทางพันธุกรรมได้ มี 13 เครื่องหมาย ซึ่งเครื่องหมายที่สามารถเพิ่มลงบนแผนที่ได้คือเครื่องหมาย An1-5 และ AGL2-2-3 อยู่บนลิงค์เกจที่ 3, เครื่องหมาย AGL2-2-1, GLO1-4 และ GLO2-4 อยู่บนลิงค์เกจที่ 4, เครื่องหมาย AGL2-4-2, M5-1 และ GT119161-3 อยู่บนลิงค์เกจที่ 8, เครื่องหมาย An1-3 และ GT120266-1 อยู่บนลิงค์เกจที่ 11, เครื่องหมาย D8-1 อยู่บนลิงค์เกจที่ 12 และเครื่องหมาย SQUA3-1 และ M14-1 อยู่บนลิงค์เกจที่ 16 ตามลำดับ เมื่อนำแผนที่ทางพันธุกรรมที่ได้เพิ่มเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาได้ไปวิเคราะห์ QTL เพื่อหาความสัมพันธ์กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปาล์มน้ำมัน พบว่าเครื่องหมาย AGL2-2-3 ที่อยู่บนลิงค์เกจที่ 3 มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักทะลาย โดยมีค่า LOD score เท่ากับ 7.71 มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของน้ำหนักทะลาย 11.6% งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาเครื่องหมายยีนชนิด ILP จากยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกฟีโนไทป์สามารถนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และนำไปสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมเพื่อวิเคราะห์ QTL หาความสัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจได้ ถ้าทราบข้อมูลเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องในการแสดงออกฟีโนไทป์ และมีศักยภาพในการปรับใช้ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้ และลักษณะอื่นได้

รายการอ้างอิง

หนังสือและบทความในหนังสือ

- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. *เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์* (น. 64). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. (2558). *การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: โอ เอส พรีนติ้ง เฮาส์ จำกัด.
- เอกชัย พฤกษ์อำไพ. 2548. *คู่มือปาล์มน้ำมัน* (น. 10-59). กรุงเทพฯ: เพ็ท-แพสัน พับลิชชิ่ง
- Corley, R. H. V., & JJ Wood, B. J. (1982). *Oil palm research*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing.
- Corley, R. H. V., & Tinker, P. B. (2003). *The oil palm*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Hartley, C. W. S. (1967). *The oil palm*. London: Longmans Green.
- Hartley, C. W. S. (1988). *The oil palm*. London: Longman.
- King, R. C., & Stansfield, W. D. (1990). *A Dictionary of Genetics*. New York: Oxford University Press
- Kochert, G. (1994). *In DNA-based markers in plants*. Dordrecht: Kluwer Publishers.
- Phinney, B. O. (1961). In R. M. Klien (Ed.). *Plant Growth Regulation* (pp. 489–511). Ames: Iowa State University Press.
- Phinney, B. O. (1984). In J. B. Hillman (Ed.). *The biosynthesis and metabolism of plant hormone* (pp 17–42). Cambridge: Cambridge University Press.
- Rival, A. (2000). In S. M. Jain, P. K. Gupta, R. J. Newton (Eds.). *Somatic embryogenesis in oil palm* (pp. 249-290). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Rival, A. & Parveez, G. K. A. (2005). In F. H. Litz (Ed.). *Elaeis guineensis oil palm* (pp.113-149). UK: CABI Publishing.
- Rival, A. (2007). In E. C. Pua, M. R. Davey (Eds.). *The oil palm* (pp. 59–80). Berlin: Springer-Verlag.

Sehgal, D., Singh, R., & Rajpal, V. R. (2016). In S. Rama Rao, S. N. Raina (Eds.). *Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement* (pp. 31-59). Springer International Publishing.

บทความวารสาร

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. (2548). เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker). ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์: 1-44.

ศุภมิตร เมฆฉาย. (2555). การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์. แก่นเกษตร, 40(2) , 51-54

Acosta, I. F., Laparra, H., Romero, S. P., Schmelz, E., Hamberg, M., Mottinger, J. P., ... & Dellaporta, S. L. (2009). Tasselseed1 is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. *Science*, 323(5911), 262-265.

Adam, H., Jouannic, S., Escoute, J., Duval, Y., Verdeil, J. L., & Tregear, J. W. (2005). Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). *American Journal of Botany*, 92(11), 1836-1852.

Adam, H., Jouannic, S., Morcillo, F., Richaud, F., Duval, Y., & Tregear, J. W. (2006). MADS box genes in oil palm (*Elaeis guineensis*): patterns in the evolution of the SQUAMOSA, DEFICIENS, GLOBOSA, AGAMOUS, and SEPALLATA subfamilies. *Journal of Molecular Evolution*, 62(1), 15-31.

Adam, H., Collin, M., Richaud, F., Beulé, T., Cros, D., Omoré, A., ... & Tregear, J. W. (2011). Environmental regulation of sex determination in oil palm: current knowledge and insights from other species. *Annals of botany*, 108(8), 1529-1537.

Adam, H., Jouannic, S., Morcillo, F., Verdeil, J. L., Duval, Y., & Tregear, J. W. (2007). Determination of flower structure in *Elaeis guineensis*: do palms use the same homeotic genes as other species?. *Annals of botany*, 100(1), 1-12.

Adam, H., Jouannic, S., Orioux, Y., Morcillo, F., Richaud, F., Duval, Y., & Tregear, J. W. (2007). Functional characterization of MADS box genes involved in the

- determination of oil palm flower structure. *Journal of experimental Botany*, 58(6), 1245-1259.
- Al-Samarai, F. R., & Al-Kazaz, A. A. (2015). Molecular Markers: an Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 9(3), 118-130. DOI:10.13187/ejmb.2015.9.118
- Alwee, S. S., Van der Linden, C. G., Van der Schoot, J., De Folter, S., Angenent, G. C., Cheah, S. C., & Smulders, M. J. M. (2006). Characterization of oil palm MADS box genes in relation to the mantled flower abnormality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85(3), 331-344.
- Angenent, G. C., Franken, J., Busscher, M., van Dijken, A., van Went, J. L., Dons, H. J., & van Tunen, A. J. (1995). A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. *The Plant Cell*, 7(10), 1569-1582.
- Angenent, G. C., & Colombo, L. (1996). Molecular control of ovule development. *Trends in plant science*, 1(7), 228-232.
- Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Singh, A. K., Singh, V. P., Tyagi, A. K., & Kapoor, S. (2007). MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *Bmc Genomics*, 8(1), 1.
- Aryal, R., & Ming, R. (2014). Sex determination in flowering plants: papaya as a model system. *Plant Science*, 217, 56-62.
- Banks, J. A. (2008). MicroRNA, sex determination and floral meristem determinacy in maize. *Genome biology*, 9(1), 1.
- Barton, N. H. (1990). Pleiotropic models of quantitative variation. *Genetics*, 124(3), 773-782.
- Battaglia, R. A. F. F. A. E. L. L. A., Brambilla, V., & Colombo, L. (2008). Morphological analysis of female gametophyte development in the bel1 stk shp1 shp2 mutant. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 142(3), 643-649.
- Becker, A., Kaufmann, K., Freialdenhoven, A., Vincent, C., Li, M. A., Saedler, H., & Theissen, G. (2002). A novel MADS-box gene subfamily with a sister-group

- relationship to class B floral homeotic genes. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(6), 942-950.
- Becker, A., Winter, K. U., Meyer, B., Saedler, H., & Theißen, G. (2000). MADS-box gene diversity in seed plants 300 million years ago. *Molecular Biology and Evolution*, 17(10), 1425-1434.
- Bensen, R. J., Johal, G. S., Crane, V. C., Tossberg, J. T., Schnable, P. S., Meeley, R. B., & Briggs, S. P. (1995). Cloning and characterization of the maize An1 gene. *The Plant Cell*, 7(1), 75-84.
- Beirnaert, A. (1935). Introduction à la biologie florale du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacquin). *Serie scientifique de Institut*, 5, 3-42.
- Beulé, T., Camps, C., Debiesse, S., Tranchant, C., Dussert, S., Sabau, X., ... & Tregear, J. W. (2011). Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with the mantled homeotic flowering abnormality in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Tree Genetics & Genomes*, 7(1), 169-182.
- Billotte, N., Marseillac, N., Risterucci, A. M., Adon, B., Brottier, P., Baurens, F. C., ... & Amblard, P. (2005). Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theoretical and Applied Genetics*, 110(4), 754-765.
- Billotte, N., Jourjon, M. F., Marseillac, N., Berger, A., Flori, A., Asmady, H., ... & Cheah, S. C. (2010). QTL detection by multi-parent linkage mapping in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theoretical and Applied Genetics*, 120(8), 1673-1687.
- Bostein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.
- Boualem, A., Fergany, M., Fernandez, R., Troadec, C., Martin, A., Morin, H., ... & Purugganan, M. D. (2008). A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science*, 321(5890), 836-838.

- Bracale, M., Caporali, E., Galli, M. G., Longo, C., Marziani-Longo, G., Rossi, G., ... & Maestri, E. (1991). Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. *Plant Science*, *80*(1-2), 67-77.
- Braglia, L., Manca, A., Mastromauro, F., & Breviario, D. (2010). cTBP: a successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs. *Diversity*, *2*(4), 572-585.
- Brambilla, V., Battaglia, R., Colombo, M., Masiero, S., Bencivenga, S., Kater, M. M., & Colombo, L. (2007). Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS box factors support ovule development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *19*(8), 2544-2556.
- Brendel, V., Xing, L., & Zhu, W. (2004). Gene structure prediction from consensus spliced alignment of multiple ESTs matching the same genomic locus. *Bioinformatics*, *20*, 1157-1169.
- Brown, S. M., Szewc-McFadden, A. K., & Kresovich, S. (1996). Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. *Methods of genome analysis in plants*, 147-159.
- Busi, M. V., Bustamante, C., D'angelo, C., Hidalgo-Cuevas, M., Boggio, S. B., Valle, E. M., & Zabaleta, E. (2003). MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant molecular biology*, *52*(4), 801-815.
- van Bueren, E. L., Backes, G., De Vriend, H., & Østergård, H. (2010). The role of molecular markers and marker assisted selection in breeding for organic agriculture. *Euphytica*, *175*(1), 51-64.
- Calderon-Urrea, A., & Dellaporta, S. L. (1999). Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. *Development*, *126*(3), 435-441.
- Chailakhyan, M. K. (1979). Genetic and hormonal regulation of growth, flowering, and sex expression in plants. *American Journal of Botany*, *66*(6), 717-736.
- Cho, S., Jang, S., Chae, S., Chung, K. M., Moon, Y. H., An, G., & Jang, S. K. (1999). Analysis of the C-terminal region of *Arabidopsis thaliana* APETALA1 as a transcription activation domain. *Plant molecular biology*, *40*(3), 419-429.

- Choi, H. K., Kim, D., Uhm, T., Limpens, E., Lim, H., Mun, J. H., ... & Roe, B. A. (2004). A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics*, *166*(3), 1463-1502.
- Cheng, P. C., Greyson, R. I., & Walden, D. B. (1983). Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. *American Journal of Botany*, 450-462.
- Chuck, G., Meeley, R., Irish, E., Sakai, H., & Hake, S. (2007). The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/indeterminate spikelet1. *Nature genetics*, *39*(12), 1517-1521.
- Coen, E. S., & Meyerowitz, E. M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, *353*(6339), 31-37.
- Collard, B. C., & Mackill, D. J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *363*(1491), 557-572.
- Colombo, L., Franken, J., Koetje, E., van Went, J., Dons, H. J., Angenent, G. C., & van Tunen, A. J. (1995). The petunia MADS box gene FBP11 determines ovule identity. *The Plant Cell*, *7*(11), 1859-1868.
- Colombo, L., Franken, J., Van der Krol, A. R., Wittich, P. E., Dons, H. J., & Angenent, G. C. (1997). Downregulation of ovule-specific MADS box genes from petunia results in maternally controlled defects in seed development. *The Plant Cell*, *9*(5), 703-715.
- Comstock, R. E., Robinson, H. F., & Harvey, P. H. (1949). Breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. *Agronomy Journal*, *41*, 360-367.
- Corley, R. H. V., Lee, C. H., Law, I. M., & Wong, C. Y. (1986). Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter*, *62*(723), 233-240.
- Côte-Real, H. B. S. M., Dixon, D. R., & Holland, P. W. H. (1994). Intron-targeted PCR: a new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve populations. *Marine Biology*, *120*(3), 407-413.

- Daguin, C., & Borsa, P. (1999). Genetic characterisation of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in North West Africa using nuclear DNA markers. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 235(1), 55-65.
- Davies, B., & Schwarz-Sommer, Z. (1994). Control of floral organ identity by homeotic MADS-box transcription factors. *Cell Differentiation*, 20, 235-258.
- De Folter, S., Shchennikova, A. V., Franken, J., Busscher, M., Baskar, R., Grossniklaus, U., ... & Immink, R. G. (2006). A Bister MADS-box gene involved in ovule and seed development in petunia and Arabidopsis. *The Plant Journal*, 47(6), 934-946.
- Dellaporta, S. L., & Calderon-Urrea, A. (1993). Sex determination in flowering plants. *The Plant Cell*, 5(10), 1241-1251.
- Dellaporta, S. L., & Calderon-Urrea, A. (1994). The sex determination process in maize. *Science*, 266(5190), 1501.
- DeLong, A., Calderon-Urrea, A., & Dellaporta, S. L. (1993). Sex determination gene TASSELSEED2 of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion. *Cell*, 74(4), 757-768.
- Dinneny, J. R., & Yanofsky, M. F. (2005). Drawing lines and borders: how the dehiscent fruit of Arabidopsis is patterned. *Bioessays*, 27(1), 42-49.
- Dreni, L., Jacchia, S., Fornara, F., Fornari, M., Ouwerkerk, P. B., An, G., ... & Kater, M. M. (2007). The D-lineage MADS-box gene OsMADS13 controls ovule identity in rice. *The Plant Journal*, 52(4), 690-699.
- Dubois, E., Bercy, J., & Messenguy, F. (1987). Characterization of two genes, ARGRI and ARGRIII required for specific regulation of arginine metabolism in yeast. *Molecular and General Genetics MGG*, 207(1), 142-148.
- Durand-Gasselín, T., Noiret, J. M., Kouamé, K. R., Cochard, B., & Adon, B. (1999). Availability of quality pollen for improved oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed production. *Plantations, Recherche, Développement*, 6(4), 264-276.
- Euwens, C. J., Lord, S., Donough, C. R., Rao, V., Vallejo, G., & Nelson, S. (2002). Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the

- incidence of "mantled" flowering in clonally propagated oil palm. *Plant cell, tissue and organ culture*, 70(3), 311-323.
- Fan, C. M., Wang, X., Wang, Y. W., Hu, R. B., Zhang, X. M., Chen, J. X., & Fu, Y. F. (2013). Genome-wide expression analysis of soybean MADS genes showing potential function in the seed development. *PLoS one*, 8(4), e62288.
- Fan, H. Y., Hu, Y., Tudor, M., & Ma, H. (1997). Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *The Plant Journal*, 12(5), 999-1010.
- Favaro, R., Pinyopich, A., Battaglia, R., Kooiker, M., Borghi, L., Ditta, G., ... & Colombo, L. (2003). MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(11), 2603-2611.
- Fechter, I., Hausmann, L., Daum, M., Sørensen, T. R., Viehöver, P., Weisshaar, B., & Töpfer, R. (2012). Candidate genes within a 143 kb region of the flower sex locus in *Vitis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 287(3), 247-259.
- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R., & Yanofsky, M. F. (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development*, 127(4), 725-734.
- Ferrándiz, C., Liljegren, S. J., & Yanofsky, M. F. (2000). Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during Arabidopsis fruit development. *Science*, 289(5478), 436-438.
- Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., ... & Oppermann, U. (2002). Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25677-25684.
- Fornara, F., Pařenicová, L., Falasca, G., Pelucchi, N., Masiero, S., Ciannamea, S., ... & Kater, M. M. (2004). Functional characterization of OsMADS18, a member of the AP1/SQUA subfamily of MADS box genes. *Plant Physiology*, 135(4), 2207-2219.

- Grattapaglia, D. & Sederoff, R. (1994). Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-test cross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, 137, 1121–1137.
- Gillaspy, G., Ben-David, H., & Gruissem, W. (1993). Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell*, 5(10), 1439.
- Gion, J. M., Rech, P., Grima-Pettenati, J., Verhaegen, D., & Plomion, C. (2000). Mapping candidate genes in *Eucalyptus* with emphasis on lignification genes. *Molecular Breeding*, 6(5), 441-449.
- Grover, A., & Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 290-302.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M. F., & Martienssen, R. (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development*, 125(8), 1509-1517.
- Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C., & Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant breeding*, 118(5), 369-390.
- Gupta, P. K., & Varshney, R. K. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113(3), 163-185.
- Gupta, S., Kumari, K., Das, J., Lata, C., Puranik, S., & Prasad, M. (2011). Development and utilization of novel intron length polymorphic markers in foxtail millet (*Setaria italica* (L.) P. Beauv.). *Genome*, 54(7), 586-602.
- Gupta, S. K., Bansal, R., & Gopalakrishna, T. (2012). Development of intron length polymorphism markers in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] and their transferability to other *Vigna* species. *Molecular breeding*, 30(3), 1363-1370.
- Hardenack, S., Ye, D., Saedler, H., & Grant, S. (1994). Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. *The Plant Cell*, 6(12), 1775-1787.
- Hardon, J. J. (1970). Inbreeding in populations of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and its effect on selection. *Oléagineux*, 25, 449-56.

- Hartwig, T., Chuck, G. S., Fujioka, S., Klempien, A., Weizbauer, R., Potluri, D. P. V., ... & Schulz, B. (2011). Brassinosteroid control of sex determination in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(49), 19814-19819.
- Heck, G. R., Perry, S. E., Nichols, K. W., & Fernandez, D. E. (1995). AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. *The Plant Cell*, *7*(8), 1271-1282.
- Hepworth, S. R., Klenz, J. E., & Haughn, G. W. (2006). UFO in the Arabidopsis inflorescence apex is required for floral-meristem identity and bract suppression. *Planta*, *223*(4), 769-778.
- Huang, H., Tudor, M., Su, T., Zhang, Y., Hu, Y., & Ma, H. (1996). DNA binding properties of two Arabidopsis MADS domain proteins: binding consensus and dimer formation. *The Plant Cell*, *8*(1), 81-94.
- Huang, M., Xie, F. M., Chen, L. Y., Zhao, X. Q., Jojee, L., & Madonna, D. (2010). Comparative analysis of genetic diversity and structure in rice using ILP and SSR markers. *Rice science*, *17*(4), 257-268.
- Hui W., Yan, F., & Rajeev, A. (2005). Intron-flanking EST-PCR markers: from genetic marker development to gene structure analysis in *Rhododendron*. *Theoretical and Applied Genetics*. *111*, 1347-1356.
- Irish, E. E. (1997). Experimental analysis of tassel development in the maize mutant Tassel seed 6. *Plant physiology*, *114*(3), 817-825.
- Irish, E. E., Langdale, J. A., & Nelson, T. M. (1994). Interactions between tassel seed genes and other sex determining genes in maize. *Developmental Genetics*, *15*(2), 155-171.
- Irish, E. E., & Nelson, T. (1989). Sex determination in monoecious and dioecious plants. *The Plant Cell*, *1*(8), 737.
- Irish, E. E., & Nelson, T. M. (1993). Development of tassel seed 2 inflorescences in maize. *American journal of botany*, 292-299.
- Jacobsen, P., 1957. The sex chromosome in *Humulus L.* *Hereditas*, *43*, 357-370.

- Jaccard, P. (1901). *Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura*. 37, 547-579.
- Jaikishan, I., Rajendrakumar, P., Madhusudhana, R., Elangovan, M., & Patil, J. V. (2015). Development and utility of PCR-based intron polymorphism markers in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 18(5), 309-318.
- Jaligot, E., Adler, S., Debladis, É., Beulé, T., Richaud, F., Ilbert, P., ... & Rival, A. (2011). Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the in vitro-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of botany*, 108, 1453-1462
- Jansen, R. C., & Stam, P. (1994). High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*, 136(4), 1447-1455.
- Jeennor, S., & Volkaert, H. (2014). Mapping of quantitative trait loci (QTLs) for oil yield using SSRs and gene-based markers in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Tree genetics & genomes*, 10(1), 1-14.
- Jeon, J. S., Lee, S., Jung, K. H., Yang, W. S., Yi, G. H., Oh, B. G., & An, G. (2000). Production of transgenic rice plants showing reduced heading date and plant height by ectopic expression of rice MADS-box genes. *Molecular Breeding*, 6(6), 581-592.
- Jin, J., Lee, M., Bai, B., Sun, Y., Qu, J., Alfiko, Y., ... & Ye, J. (2016). Draft genome sequence of an elite Dura palm and whole-genome patterns of DNA variation in oil palm. *DNA Research*, 0(0), 1-7.
- Jonah, P. M., Bello, L. L., Lucky, O., Midau, A., & Moruppa, S. M. (2011). Review: the importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Global Journal of Science Frontier Research*, 11(5).
- Jones, D. F. (1925). Heritable characters of maize. *Journal of Heredity*, 16(9), 339-342.
- Jones, L. H., Hanke, D. E., & Eeuwens, C. J. (1995). An evaluation of the role of cytokinins in the development of abnormal inflorescences in oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerated from tissue culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14(3), 135-142.

- Jones, L. H. (1997). The effects of leaf pruning and other stresses on sex determination in the oil palm and their representation by a computer simulation. *Journal of theoretical biology*, 187(2), 241-260.
- Joshi, S. P., Ranjekar, P. K., & Gupta, V. S. (1999). Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science*, 77(2), 230-240.
- Juarez, C., & Banks, J. A. (1998). Sex determination in plants. *Current opinion in plant biology*, 1(1), 68-72.
- Kaufmann, K., Anfang, N., Saedler, H., & Theissen, G. (2005). Mutant analysis, protein-protein interactions and subcellular localization of the Arabidopsis Bsister (ABS) protein. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(2), 103-118.
- Kempin, S. A., Savidge, B., & Yanofsky, M. F. (1995). Molecular basis of the cauliflower phenotype in Arabidopsis. *Science*, 267(5197), 522.
- Khanam, S., Sham, A., Bennetzen, J. L., & Aly, M. A. (2012). Analysis of molecular marker-based characterization and genetic variation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 6(8), 1236.
- Kim, J. C., Laparra, H., Calderón-Urrea, A., Mottinger, J. P., Moreno, M. A., & Dellaporta, S. L. (2007). Cell cycle arrest of stamen initials in maize sex determination. *Genetics*, 177(4), 2547-2551.
- Kim, S., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2013). AGL6-like MADS-box genes are sister to AGL2-like MADS-box genes. *Journal of Plant Biology*, 56(5), 315-325.
- Kinney, M. S., Columbus, J. T., & Friar, E. A. (2003). Molecular evolution of the maize sex-determining gene TASELSEED2 in *Bouteloua* (Poaceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 29(3), 519-528.
- Kyozuka, J., Kobayashi, T., Morita, M., & Shimamoto, K. (2000). Spatially and temporally regulated expression of rice MADS box genes with similarity to Arabidopsis class A, B and C genes. *Plant and Cell Physiology*, 41(6), 710-718.
- Lamkey, K. R., & Lee, M. (1993). Quantitative genetics, molecular markers, and plant improvement. *Focused Plant Improvement*, 18-23.

- Lande, R., & Thompson, R. (1990). Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, *124*(3), 743-756.
- Lauter, N., Kampani, A., Carlson, S., Goebel, M., & Moose, S. P. (2005). microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(26), 9412-9417.
- Lebel-Hardenack, S., & Grant, S. R. (1997). Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends in Plant Science*, *2*(4), 130-136.
- Lee, M., Xia, J. H., Zou, Z., Ye, J., Alfiko, Y., Jin, J., ... & Wong, L. (2015). A consensus linkage map of oil palm and a major QTL for stem height. *Scientific reports*, *5*(8232), 1-7.
- Lessa, E. P. (1992). Rapid survey of DNA sequence variation in natural populations. *Molecular Biology and Evolution*, *9*, 323-330.
- Li, D., Blakey, C. A., Dewald, C., & Dellaporta, S. L. (1997). Evidence for a common sex determination mechanism for pistil abortion in maize and in its wild relative *Tripsacum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(8), 4217-4222.
- Li D., Xia Z., Deng Z., Liu X., Dong J. & Feng F., (2011). Development and characterization of Intron-Flanking EST-PCR Markers in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Molecular Biotechnology*, *51*, 148-159.
- Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L., & Yanofsky, M. F. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*, *404*(6779), 766-770.
- Lindner, A.C., Lang, D., Seifert, M., Podlešáková, K., Novák, O., Strnad, M., ... & von Schwartzenberg, K. (2014). Isopentenyltransferase-1 (IPT1) knockout in *Physcomitrella* together with phylogenetic analyses of IPTs provide insights into evolution of plant cytokinin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, *65*(9), 2533-2543.
- Liu, H., Lin, Y., Chen, G., Shen, Y., Liu, J., & Zhang, S. (2012). Genome-scale identification of resistance gene analogs and the development of their

- intron length polymorphism markers in maize. *Molecular breeding*, 29(2), 437-447.
- Liu, K., & Muse, S. V. (2004). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21, 2128-2129.
- Lopez-Dee, Z. P., Wittich, P., Pe, M. E., Rigola, D., Del Buono, I., Gorla, M. S., ... & Colombo, L. (1999). OsMADS13, a novel rice MADS-box gene expressed during ovule development. *Developmental genetics*, 25(3), 237-244.
- Luo, X., Ji, S. D., Yuan, P. R., Lee, H. S., Kim, D. M., Balkunde, S., ... & Ahn, S. N. (2013). QTL mapping reveals a tight linkage between QTLs for grain weight and panicle spikelet number in rice. *Rice*, 6(33), 1-10.
- Ma, H., Yanofsky, M. F., & Meyerowitz, E. M. (1991). AGL1-AGL6, an Arabidopsis gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes & Development*, 5(3), 484-495.
- Madhusudhana, R., & Patil, J. V. (2013). A major QTL for plant height is linked with bloom locus in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Euphytica*, 191(2), 259-268.
- Malcomber, S. T., & Kellogg, E. A. (2006). Evolution of unisexual flowers in grasses (Poaceae) and the putative sex-determination gene, TASSELSEED2 (TS2). *New Phytologist*, 170(4), 885-899.
- Markert, C. L., & Møller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 45(5), 753-763.
- Martin, A., Troadec, C., Boualem, A., Rajab, M., Fernandez, R., Morin, H., ... & Bendahmane, A. (2009). A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature*, 461(7267), 1135-1138.
- Masiero, S., Imbriano, C., Ravasio, F., Favaro, R., Pelucchi, N., Gorla, M. S., ... & Kater, M. M. (2002). Ternary complex formation between MADS-box transcription factors and the histone fold protein NF-YB. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26429-26435.

- Matias-Hernandez, L., Battaglia, R., Galbiati, F., Rubes, M., Eichenberger, C., Grossniklaus, U., ... & Colombo, L. (2010). VERDANDI is a direct target of the MADS domain ovule identity complex and affects embryo sac differentiation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(6), 1702-1715.
- Mathooko, F. M., Mwaniki, M. W., Nakatsuka, A., Shiomi, S., Kubo, Y., Inaba, A., & Nakamura, R. (1999). Expression characteristics of CS-ACS1, CS-ACS2 and CS-ACS3, three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit under carbon dioxide stress. *Plant and cell physiology*, 40(2), 164-172.
- Mayes, S., Jack, P. L., Corley, R. H. V., & Marshall, D. F. (1997). Construction of a RFLP genetic linkage map for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome*, 40(1), 116-122.
- McCouch, S. R., & Tanksley, S. D. (1991). Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics. *Rice Biotechnology*, (6), 109-133.
- Melchinger, A. E. (1990). Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding*, 104(1), 1-19.
- Melchinger, A. E., Utz, H. F., & Schön, C. C. (1998). Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. *Genetics*, 149(1), 383-403.
- Miah, G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Puteh, A. B., Rahim, H. A., Islam, K. N., & Latif, M. A. (2013). A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *International journal of molecular sciences*, 14(11), 22499-22528.
- Ming, R., Yu, Q., & Moore, P. H. (2007). Sex determination in papaya. *In Seminars in cell & developmental biology*, 18(3), 401-408.
- Mizzotti, C., Mendes, M. A., Caporali, E., Schnittger, A., Kater, M. M., Battaglia, R., & Colombo, L. (2012). The MADS box genes SEEDSTICK and ARABIDOPSIS

- Bsister play a maternal role in fertilization and seed development. *The Plant Journal*, 70(3), 409-420.
- Modrusan, Z., Reiser, L., Feldmann, K. A., Fischer, R. L., & Haughn, G. W. (1994). Homeotic transformation of ovules into carpel-like structures in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 6(3), 333-349.
- Mondini, L., Noorani, A., & Pagnotta, M. A. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1(1), 19-35.
- Montoya, C., Lopes, R., Flori, A., Cros, D., Cuellar, T., Summo, M., ... & Zambrano, J. R. (2013). Quantitative trait loci (QTLs) analysis of palm oil fatty acid composition in an interspecific pseudo-backcross from *Elaeis oleifera* (HBK) Cortés and oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Tree genetics & genomes*, 9(5), 1207-1225.
- Mukai, T., & Cockerham, C. C. (1977). Spontaneous mutation rates at enzyme loci in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(6), 2514-2517.
- Münster, T., Pahnke, J., Di Rosa, A., Kim, J. T., Martin, W., Saedler, H., & Theissen, G. (1997). Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6), 2415-2420.
- Muthamilarasan, M., Suresh, B. V., Pandey, G., Kumari, K., Parida, S. K., & Prasad, M. (2014). Development of 5123 intron-length polymorphic markers for large-scale genotyping applications in foxtail millet. *DNA research*, 21(1), 41-52.
- Nagai, K., Kuroha, T., Ayano, M., Kurokawa, Y., Angeles-Shim, R. B., Shim, J. H., ... & Ashikari, M. (2012). Two novel QTLs regulate internode elongation in deepwater rice during the early vegetative stage. *Breeding science*, 62(2), 178-185.
- Nagai, K., Kondo, Y., Kitaoka, T., Noda, T., Kuroha, T., Angeles-Shim, R. B., ... & Ashikari, M. (2014). QTL analysis of internode elongation in response to gibberellin in deepwater rice. *AoB Plants*, 6, 717-736.

- Nagasawa, N., Miyoshi, M., Sano, Y., Satoh, H., Hirano, H., Sakai, H., & Nagato, Y. (2003). SUPERWOMAN1 and DROOPING LEAF genes control floral organ identity in rice. *Development*, *130*(4), 705-718.
- Neale, D. B., Sewell, M. M., & Brown, G. R. (2002). Molecular dissection of the quantitative inheritance of wood property traits in loblolly pine. *Annals of Forest Science*, *59*(5-6), 595-605.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Stewart, A. J., Jenkins, G. I., Caboche, M., & Lepiniec, L. (2002). The TRANSPARENT TESTA16 locus encodes the ARABIDOPSIS BSISTER MADS domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. *The Plant Cell*, *14*(10), 2463-2479.
- Nickerson, N. H., & Dale, E. E. (1955). Tassel modifications in *Zea mays*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, *42*(3), 195-211.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., & Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell*, *55*(6), 989-1003.
- Okada, K., & Shimura, Y. (1994). Genetic analyses of signalling in flower development using *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, *26*(5), 1357-1377.
- Onishi, K., Horiuchi, Y., Ishigoh-Oka, N., Takagi, K., Ichikawa, N., Maruoka, M., & Sano, Y. (2007). A QTL cluster for plant architecture and its ecological significance in Asian wild rice. *Breeding Science*, *57*(1), 7-16.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., ... & Jörnvall, H. (2003). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-biological interactions*, *143*, 247-253.
- Pařenicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., ... & Angenent, G. C. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis* new openings to the MADS world. *The Plant Cell*, *15*(7), 1538-1551.
- Parker, J. S., & Clark, M. S. (1991). Dosage sex-chromosome systems in plants. *Plant Science*, *80*(1), 79-92.

- Passmore, S., Maine, G. T., Elble, R., Christ, C., & Tye, B. K. (1988). Saccharomyces cerevisiae protein involved in plasmid maintenance is necessary for mating of MAT α cells. *Journal of molecular biology*, 204(3), 593-606.
- Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., & Yanofsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, 405(6783), 200-203.
- Pelucchi, N., Fornara, F., Favalli, C., Masiero, S., Lago, C., Pè, E. M., ... & Kater, M. M. (2002). Comparative analysis of rice MADS-box genes expressed during flower development. *Sexual Plant Reproduction*, 15(3), 113-122.
- Pinyopich, A., Ditta, G. S., Savidge, B., Liljegren, S. J., Baumann, E., Wisman, E., & Yanofsky, M. F. (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*, 424(6944), 85-88.
- Poczai, P., Varga, I., Laos, M., Cseh, A., Bell, N., Valkonen, J. P., & Hyvönen, J. (2013). Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods*, 9(1), 1.
- Poole, C. F., & GRIMBALL, P. C. (1939). Inheritance of new sex forms in Cucumis melo L. *Journal of Heredity*, 30(1), 21-25.
- Pootakham, W., Jomchai, N., Ruang-areerate, P., Shearman, J. R., Sonthirod, C., Sangrakru, D., ... & Tangphatsornruang, S. (2015). Genome-wide SNP discovery and identification of QTL associated with agronomic traits in oil palm using genotyping-by-sequencing (GBS). *Genomics*, 105(5), 288-295.
- Powell, W., Machray, G. C., & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science*, 1(7), 215-222.
- Rance, K. A., Mayes, S., Price, Z., Jack, P. L., & Corley, R. H. V. (2001). Quantitative trait loci for yield components in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.). *Theoretical and Applied Genetics*, 103(8), 1302-1310.
- Reiser, L., Modrusan, Z., Margossian, L., Samach, A., Ohad, N., Haughn, G. W., & Fischer, R. L. (1995). The BELL1 gene encodes a homeodomain protein involved in pattern formation in the Arabidopsis ovule primordium. *Cell*, 83(5), 735-742.

- Riechmann, J. L., & Meyerowitz, E. M. (1997). MADS domain proteins in plant development. *Biological chemistry*, 378(10), 1079-1102.
- Robertson, D. S. (1985). A possible technique for isolating genic DNA for quantitative traits in plants. *Journal of Theoretical Biology*, 117(1), 1-10.
- Robinson-Beers, K., Pruitt, R. E., & Gasser, C. S. (1992). Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants. *The Plant Cell*, 4(10), 1237-1249.
- Rohlf, F. J. 1998. NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. version 2.02. Exeter Software. *Setauket*. New York.
- Rounsley, S. D., Ditta, G. S., & Yanofsky, M. F. (1995). Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell*, 7(8), 1259-1269.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist Programmers. *Methods in Molecular Biology*. 132, 365-386.
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., & Sommer, H. (1990). Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, 250(4983), 931-936.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., & Ndjioudjop, M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African journal of biotechnology*, 5(25).
- SaiSug, W., & 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 & Genomics*, 35(1), 1-12.
- Shimada, N., Nakatsuka, T., Nakano, Y., Kakizaki, Y., Abe, Y., Hikage, T., & Nishihara, M. (2009). Identification of gentian cultivars using SCAR markers based on intron-length polymorphisms of flavonoid biosynthetic genes. *Scientia horticulturae*, 119(3), 292-296.
- Shore, P., & Sharrocks, A. D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *European Journal of Biochemistry*, 229(1), 1-13.
- Shu, Y., Li, Y., Zhu, Y., Zhu, Z., Lv, D., Bai, X., ... & Guo, D. (2010). Genome-wide identification of intron fragment insertion mutations and their potential

- use as SCAR molecular markers in the soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(1), 1-8.
- Singh, R., Tan, S. G., Panandam, J. M., Rahman, R. A., & Cheah, S. C. (2008). Identification of cDNA-RFLP markers and their use for molecular mapping in oil palm (*Elaeis guineensis*). *AsPac J Mol Biol Biotechnol*, 16(3), 53-63.
- Singh, R., Tan, S. G., Panandam, J. M., Rahman, R. A., Ooi, L. C., Low, E. T. L., ... & Cheah, S. C. (2009). Mapping quantitative trait loci (QTLs) for fatty acid composition in an interspecific cross of oil palm. *BMC Plant Biology*, 9(1), 1-19.
- Singh, R., Low, E. T. L., Ooi, L. C. L., Ong-Abdullah, M., Ting, N. C., Nagappan, J., ... & Chan, K. L. (2013). The oil palm SHELL gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. *Nature*, 500(7462), 340-344.
- Singh, R., Ong-Abdullah, M., Low, E. T. L., Manaf, M. A. A., Rosli, R., Nookiah, R., ... & Azizi, N. (2013). Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. *Nature*, 500(7462), 335-339.
- Singh, U., Deb, R., Alyethodi, R. R., Alex, R., Kumar, S., Chakraborty, S., ... & Sharma, A. (2014). Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 6(2), 49-58.
- Slade, R. W., Moritz, C., Heideman, A., & Hale, P. T. (1993). Rapid assessment of single-copy nuclear DNA variation in diverse species. *Molecular Ecology*, 2(6), 359-373.
- Soh, A. C., & Chow, C. S. (1993). Index selection utilizing plot and family information in oil palm. *Elaeis*, 5(1), 27-37.
- Soh, A. C. (1994). Ranking parents by best linear unbiased prediction (BLUP) breeding values in oil palm. *Euphytica*, 76(1-2), 13-21.
- Soh, A. C., Wong, G., Hor, T. Y., Tan, C. C., & Chew, P. S. (2003). Oil palm genetic improvement. *Plant Breeding Reviews*, 22, 165-220.
- Sparnaaij, L. D. (1969). Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacquin). *Miscellaneous Papers. Landbouwhogeschool Wageningen*, 339-87.

- Staub, J. E., Kuhns, L. J., May, B. & Grun, P. (1982). Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107, 405–408.
- Staub, J. E., Serquen, F. C., & Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, 31(5), 729-741.
- Stam, p., Johan, W. van Ooijen. 1995. JoinMap™ version 3.0: Software for the calculation of genetic linkage maps. *CIP-DTA KONINKLIJKE, DEN HAAG*: Piet Stam and JohanW. van Ooijjan.
- SangNag, A., YoungChan, C., KyongHo, K., ImSoo, C., YeonGyu, K., & HungGoo, H. (2005). Mapping of QTLs for yield traits using an advanced backcross population from a cross between *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. *Korean Journal of Breeding*, 37(4), 214-220.
- Taeprayoon, P., Tanya, P., Lee, S. H., & Srinives, P. (2015). Genetic background of three commercial oil palm breeding populations in Thailand revealed by SSR markers. *Australian Journal of Crop Science*, 9(4), 281.
- Takagi, H., Abe, A., Yoshida, K., Kosugi, S., Natsume, S., Mitsuoka, C., ... & Innan, H. (2013). QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *The Plant Journal*, 74(1), 174-183.
- Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H., & Bonierbale, M. W. (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Nature Biotechnology*, 7(3), 257-264.
- Tautz, D., & Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12(10), 4127–4138.
- Theissen, G., & Saedler, H. (1995). MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. *Current opinion in genetics & development*, 5(5), 628-639.
- Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J. T., Münster, T., ... & Saedler, H. (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant molecular biology*, 42(1), 115-149.

- Thomson, M. J., Tai, T. H., McClung, A. M., Lai, X. H., Hinga, M. E., Lobos, K. B., ... & McCouch, S. R. (2003). Mapping quantitative trait loci for yield, yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza rufipogon* and the *Oryza sativa* cultivar Jefferson. *Theoretical and Applied Genetics*, *107*(3), 479-493.
- Ting, N. C., Jansen, J., Nagappan, J., Ishak, Z., Chin, C. W., Tan, S. G., ... & Singh, R. (2013). Identification of QTLs associated with callogenesis and embryogenesis in oil palm using genetic linkage maps improved with SSR markers. *PLoS One*, *8*(1), e53076.
- Tisné, S., Denis, M., Cros, D., Pomiès, V., Riou, V., Syahputra, I., ... & Cochard, B. (2015). Mixed model approach for IBD-based QTL mapping in a complex oil palm pedigree. *BMC genomics*, *16*(1), 1-12.
- Ukoskit, K., Chanroj, V., Bhusudsawang, G., Pipatchartlearnwong, K., Tangphatsornruang, S., & Tragoonrung, S. (2014). Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) linkage map, and quantitative trait locus analysis for sex ratio and related traits. *Molecular breeding*, *33*(2), 415-424.
- Utz, H. F., & Melchinger, A. E. (1996). PLABQTL: a program for composite interval mapping of QTL. *J Quant Trait Loci*, *2*(1), 1-5.
- Van Nigtevecht, G. (1966). Genetic studies in dioecious Melandrim. I. Sex-linked and sex-influenced inheritance in *M. album* and *M. dioicum*. *Genetica*, *37*, 281-306.
- Van Ooijen, J. W. (2004). Software for the calculation of QTL positions on genetic maps, MAPQTL 4.0 edn, Wageningen, Netherlands.
- Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology*, *23*(1), 48-55.
- Veit, B., Greene, B., Lowe, B., Mathern, J., Sinha, N., Vollbrecht, E., ... & Hake, S. (1991). Genetic approaches to inflorescence and leaf development in maize. *Development*, *113*(1), 105-111.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., ... & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, *23*(21), 4407-4414.

- Vrebalov, J., Pan, I. L., Arroyo, A. J. M., McQuinn, R., Chung, M., Poole, M., ... & Irish, V. F. (2009). Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato SHATTERPROOF gene TAGL1. *The Plant Cell*, *21*(10), 3041-3062.
- Wang, X., Zhao, X., Zhu, J., & Wu, W. (2006). Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*, *12*(6), 417-427.
- Wang, X., Zhao, X., Zhu, J., & Wu, W. (2006). Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*, *12*(6), 417-427.
- Wang, Y., Chen, J., Francis, D. M., Shen, H., Wu, T., & Yang, W. (2010). Discovery of intron polymorphisms in cultivated tomato using both tomato and *Arabidopsis* genomic information. *Theoretical and applied genetics*, *121*(7), 1199-1207.
- Wang, H., Smith, K. P., Combs, E., Blake, T., Horsley, R. D., Muehlbauer, G. J. (2012). Effect of population size and unbalanced data sets on QTL detection using genomewide association mapping in barley breeding germplasm. *Theor Appl Genet*, *124*, 111-24.
- Wegrzyn, J. L., Eckert, A. J., Choi, M., Lee, J. M., Stanton, B. J., Sykes, R., ... & Neale, D. B. (2010). Association genetics of traits controlling lignin and cellulose biosynthesis in black cottonwood (*Populus trichocarpa*, Salicaceae) secondary xylem. *New Phytologist*, *188*(2), 515-532.
- Weigel, D., & Meyerowitz, E. M. (1994). The ABCs of floral homeotic genes: Review. *Cell*, *78*, 203-209.
- West, A. G., & Sharrocks, A. D. (1999). MADS-box transcription factors adopt alternative mechanisms for bending DNA. *Journal of molecular biology*, *286*(5), 1311-1323.
- Williams, R. R. (1965). The effect of summer nitrogen applications on the quality of apple blossom. *Journal of Horticultural Science*, *40*(1), 31-41.
- Wu, X., Knapp, S., Stamp, A., Stammers, D. K., Jörnvall, H., Dellaporta, S. L., & Oppermann, U. (2007). Biochemical characterization of TASSELSEED 2, an

- essential plant short-chain dehydrogenase/reductase with broad spectrum activities. *Febs Journal*, 274(5), 1172-1182.
- Wydner, K. S., Sechler, J. L., Boyd, C. D., & Passmore, H. C. (1994). Use of an intron length polymorphism to localize the tropoelastin gene to mouse chromosome 5 in a region of linkage conservation with human chromosome 7. *Genomics*, 23(1), 125-131.
- Yamada, K., Saraike, T., Shitsukawa, N., Hirabayashi, C., Takumi, S., & Murai, K. (2009). Class D and B sister MADS-box genes are associated with ectopic ovule formation in the pistil-like stamens of alloplasmic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant molecular biology*, 71(1-2), 1-14.
- Yamaguchi, T., & Hirano, H. Y. (2006). Function and diversification of MADS-box genes in rice. *The Scientific World Journal*, 6, 1923-1932.
- Yang, L., Jin, G., Zhao, X., Zheng, Y., Xu, Z., & Wu, W. (2007). PIP: a database of potential intron polymorphism markers. *Bioinformatics*, 23(16), 2174-2177.
- Yang, X., Wu, F., Lin, X., Du, X., Chong, K., Gramzow, L., ... & Meng, Z. (2012). Live and Let Die-The B sister MADS-Box Gene OsMADS29 Controls the Degeneration of Cells in Maternal Tissues during Seed Development of Rice (*Oryza sativa*). *PLoS One*, 7(12), e51435.
- Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A., & Meyerowitz, E. M. (1990). The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, 346(6279), 35-39.
- Yao, J. L., Dong, Y. H., Kvarneden, A., & Morris, B. (1999). Seven MADS-box genes in apple are expressed in different parts of the fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(1), 8-13.
- Zeng, Z. B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, 136(4), 1457-1468.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.

Zeid, M., Yu, J. K., Goldowitz, I., Denton, M. E., Costich, D. E., Jayasuriya, C. T., ... & Munkvold, J. (2010). Cross-amplification of EST-derived markers among 16 grass species. *Field crops research*, 118(1), 28-35.

Zhou, R., Jia, J., & Gao, L. (2010). RGA-ILP, a new type of functional molecular markers in bread wheat. *Euphytica*, 172(2), 263-273.

วิทยานิพนธ์

กมล ทิพโชติ. 2555. การคัดเลือกถั่วลันเตาเพื่อด้านทานโรคราแป้ง. *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*.

ขวัญใจ พิพัฒน์เจริญวงศ์. 2553. การพัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR ของปาล์มน้ำมันจากเหมืองข้อมูล ESTs. *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*.

วิภาวี ชันโรจน์. 2553. แผนที่เครื่องหมายควบคุมความหนากระดาษและการวิเคราะห์ลักษณะปริมาณ (QTL) อัตราส่วนเพศในปาล์มน้ำมัน. *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*.

สื่ออิเล็กทรอนิกส์

Franz Eugen Köhler. *African oil palm (Elaeis guineensis)*. สืบค้นเมื่อวันที่ 23 ตุลาคม 2558, จาก www.wikipedia.com.

ประเสริฐ สุดใหม่. *ปาล์มน้ำมัน : ไบโอดีเซล พลังงานแห่งอนาคต : อุตสาหกรรมเพื่อทดแทนน้ำมันอย่างยั่งยืน*. สืบค้นเมื่อวันที่ 12 พฤศจิกายน 2558, จาก <http://www.oknation.net>.

ไทยรัฐออนไลน์. *ปาล์มน้ำมัน*. สืบค้นเมื่อวันที่ 23 ตุลาคม 2558, จาก www.thairath.co.th.

อาริยา จูตคง. *ปาล์มน้ำมัน วิฤติหรือโอกาส*. สืบค้นเมื่อวันที่ 23 ตุลาคม 2558, จาก <http://www.doa.go.th>.

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ตัวอย่างประชากรกลุ่มสมที่ใช้ในการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม

ตารางแสดงตัวอย่างประชากรกลุ่มสมปาล์มน้ำมันจำนวน 208 ตัวอย่าง

No.	Individuals
1	KA 37/12T
2	KA 35/4T
3	KA 38/5T
4	KA 40/7T
5	KA 36/10P
6	KA 41/7P
7	KA 48/10P
8	KA 37/7D
9	KA 45/5D
10	KA 53/4D
11	KA 34/4T
12	KA 35/3P
13	KA 37/2T
14	KA 37/5P
15	KA 37/9D
16	KA 38/1D
17	KA 38/7D
18	KA 38/10T
19	KA 41/6D
20	KA 41/8T
21	KA 42/6T
22	KA 43/3T
23	KA 43/7T

ภาคผนวก ก (ต่อ)

No.	Individuals
24	KA 43/12T
25	KA 46/5P
26	KA 47/8P
27	KA 48/3D
28	KA 48/8T
29	KA 49/1D
30	KA 49/14P
31	KA 51/14D
32	KA 52/2D
33	KA 52/3T
34	KA 52/7P
35	KA 52/13T
36	KA 34/8T
37	KA 34/9T
38	KA 34/11T
39	KA 35/8T
40	KA 36/2T
41	KA 36/5T
42	KA 36/6T
43	KA 36/8T
44	KA 36/9T
45	KA 36/11T
46	KA 37/1T
47	KA 37/6T
48	KA 37/8T
49	KA 37/10T

ภาคผนวก ก (ต่อ)

No.	Individuals
50	KA 38/2T
51	KA 38/3T
52	KA 38/4T
53	KA 38/6T
54	KA 39/1T
55	KA 39/2T
56	KA 39/4T
57	KA 39/6T
58	KA 39/8T
59	KA 40/4T
60	KA 40/5T
61	KA 40/9T
62	KA 40/10T
63	KA 40/12T
64	KA 41/3T
65	KA 41/4T
66	KA 41/5T
67	KA 41/12T
68	KA 42/3T
69	KA 42/8T
70	KA 42/10T
71	KA 42/12T
72	KA 43/6T
73	KA 43/8T
74	KA 43/11T

ภาคผนวก ก (ต่อ)

No.	Individuals
75	KA 43/13T
76	KA 44/1T
77	KA 44/2T
78	KA 44/3T
79	KA 44/4T
80	KA 44/5T
81	KA 44/7T
82	KA 44/9T
83	KA 44/12T
84	KA 45/3T
85	KA 45/4T
86	KA 45/9T
87	KA 45/10T
88	KA 45/13T
89	KA 46/1T
90	KA 46/2T
91	KA 46/3T
92	KA 46/8T
93	KA 46/10T
94	KA 47/2T
95	KA 47/4T
96	KA 47/7T
97	KA 47/10T
98	KA 48/1T

ภาคผนวก ก (ต่อ)

No.	Individuals
99	KA 48/6T
100	KA 48/7T
101	KA 48/11T
102	KA 48/12T
103	KA 48/13T
104	KA 49/2T
105	KA 49/5T
106	KA 49/7T
107	KA 49/9T
108	KA 49/12T
109	KA 49/13T
110	KA 50/5T
111	KA 50/8T
112	KA 50/11T
113	KA 51/1T
114	KA 51/2T
115	KA 51/4T
116	KA 51/5T
117	KA 51/6T
118	KA 51/7T
119	KA 51/9T
120	KA 51/11T
121	KA 51/13T
122	KA 52/5T
123	KA 52/11T
124	KA 52/14T

ภาคผนวก ก (ต่อ)

No.	Individuals
125	KA 53/1T
126	KA 53/2T
127	KA 53/6T
128	KA 53/12T
129	KA 34/1P
130	KA 34/6P
131	KA 35/1P
132	KA 35/2P
133	KA 35/5P
134	KA 35/7P
135	KA 35/10P
136	KA 36/3P
137	KA 36/4P
138	KA 37/4P
139	KA 37/11P
140	KA 38/9P
141	KA 39/9P
142	KA 40/2P
143	KA 40/3P
144	KA 40/11P
145	KA 41/2P
146	KA 41/9P
147	KA 42/7P
148	KA 42/11P
149	KA 43/4P
150	KA 43/9P

ภาคผนวก ก (ต่อ)

No.	Individuals
151	KA 45/1P
152	KA 45/2P
153	KA 45/6P
154	KA 45/8P
155	KA 45/12P
156	KA 46/6P
157	KA 46/7P
158	KA 46/12P
159	KA 47/5P
160	KA 47/6P
161	KA 47/12P
162	KA 48/2P
163	KA 48/5P
164	KA 49/8P
165	KA 49/10P
166	KA 50/3P
167	KA 50/4P
168	KA 50/6P
169	KA 50/7P
170	KA 50/12P
171	KA 51/3P
172	KA 53/7P
173	KA 53/8P
174	KA 53/9P
175	KA 34/7D
176	KA 35/6D

ภาคผนวก ก (ต่อ)

No.	Individuals
177	KA 35/11D
178	KA 36/1D
179	KA 37/3D
180	KA 38/8D
181	KA 38/11D
182	KA 39/11D
183	KA 41/1D
184	KA 41/10D
185	KA 42/2D
186	KA 42/4D
187	KA 42/5P
188	KA 43/2D
189	KA 43/5D
190	KA 43/10D
191	KA 44/6D
192	KA 44/8D
193	KA 44/10D
194	KA 44/11D
195	KA 46/9D
196	KA 46/11D
197	KA 47/3D
198	KA 48/4D
199	KA 49/4D
200	KA 49/11D
201	KA 50/13D
202	KA 51/8D

ภาคผนวก ก (ต่อ)

No.	Individuals
203	KA 51/10D
204	KA 51/12D
205	KA 52/1D
206	KA 52/4D
207	KA 53/3D
208	KA 53/5D
209	Clone B
210	Clone D

ภาคผนวก ข

รหัสยีนของแต่ละยีนทั้งหมด 50 ยีน และจำนวนอินทรอนของแต่ละยีน

ชื่อยีน	จำนวนอินทรอน
<i>GLO1</i>	5
<i>GLO2</i>	5
<i>AG1</i>	1
<i>AG2</i>	1
<i>AGL2-1</i>	4
<i>AGL2-2</i>	3
<i>AGL2-3</i>	5
<i>AGL2-4</i>	5
<i>AGL2-5</i>	3
<i>AGL2-6</i>	1
<i>SQUA2</i>	2
<i>SQUA3</i>	4
<i>DEF</i>	1
<i>STMADS11</i>	1
<i>TS1</i>	8
<i>AN1</i>	8
<i>Adh1</i>	2

ภาคผนวก ข (ต่อ)

ชื่อยีน	จำนวนอินทรอน
<i>lds1</i>	7
<i>lpt1</i>	3
<i>AP2</i>	4
<i>Glossy15</i>	5
<i>D1</i>	1
<i>D2</i>	8
<i>D3</i>	4
<i>D8</i>	1
<i>CS-ACS1</i>	1
<i>CS-ACS2</i>	3
<i>EgAD1</i>	1
<i>EgRING1</i>	1
<i>EgFB1</i>	3
<i>EgPHOS1</i>	1
<i>EgMADS3</i>	4
<i>EgMADS4</i>	4
<i>EgMADS5</i>	4
<i>EgMADS8</i>	5
<i>EgMADS9</i>	5

ภาคผนวก ข (ต่อ)

ชื่อยีน	จำนวนอินทรอน
<i>EgMADS11</i>	5
<i>EgMADS12</i>	5
<i>EgMADS14</i>	4
<i>GT119161</i>	3
<i>GT119339</i>	3
<i>GT119472</i>	1
<i>GT119493</i>	1
<i>GT119578</i>	2
<i>GT119987</i>	2
<i>GT120040</i>	2
<i>GT120266</i>	5
<i>GT120324</i>	2
<i>GT120344</i>	2
<i>GT120393</i>	2
รวม	163

ภาคผนวก ค

การมีโพลิมอร์ฟิซึมหรือไม่มีโพลิมอร์ฟิซึมของแต่ละไพรเมอร์ทั้ง 139 คู่
 ในตัวอย่างปาล์มน้ำมัน 43 ตัวอย่างและตัวอย่างปาล์มน้ำมัน 12 ตัวอย่าง โดยสุ่มจาก
 ประชากรลูกผสมปาล์มน้ำมัน 208 ตัวอย่าง จำนวน 10 ตัวอย่างรวมกับพ่อแม่

Primers	43 accessions	12 offspring
GLO1-1	✓	✗
GLO1-2	✗	✗
GLO1-3	✓	✗
GLO1-4	✓	✓
GLO1-5	✗	✗
GLO2-1	✓	✗
GLO2-2	✓	✗
GLO2-3	✓	✗
GLO2-4	✓	✓
GLO2-5	✗	✗
AG1	✗	✗
AG2	✓	✗
AGL2-1-1	✗	✗
AGL2-1-2	✓	✗
AGL2-1-3	✓	✗

หมายเหตุ ✓: Polymorphic

✗: Monomorphic

ภาคผนวก ค (ต่อ)

Primers	Polymorphism	12 offspring
AGL2-1-4	✓	✗
AGL2-2-1	✓	✓
AGL2-2-2	✗	✗
AGL2-2-3	✓	✓
AGL2-3-1	✓	✗
AGL2-3-2	✗	✗
AGL2-3-3	✗	✗
AGL2-4-1	✗	✗
AGL2-4-2	✓	✓
AGL2-4-3	✓	✗
AGL2-4-4	✓	✗
AGL2-4-5	✓	✗
AGL2-5-1	✗	✗
AGL2-5-2	✗	✗
AGL6-1	✗	✗
SQUA2-1	✗	✗
SQUA2-2	✗	✗

หมายเหตุ ✓: Polymorphic

✗: Monomorphic

ภาคผนวก ค (ต่อ)

Primers	Polymorphism	12 offspring
SQUA3-1	✓	✓
SQUA3-2	✓	✗
SQUA3-3	✓	✗
SQUA3-4	✓	✗
DEF1	✗	✗
STMADS11	✗	✗
Ts1-1	✓	✗
Ts1-2	✓	✗
Ts1-3	✓	✓
Ts1-4	✓	✗
Ts1-5	✓	✗
Ts1-6	✗	✗
Ts1-7	✗	✗
An1-1	✓	✓
An1-2	✗	✗
An1-3	✓	✓
An1-4	✗	✗

หมายเหตุ ✓: Polymorphic

✗: Monomorphic

ภาคผนวก ค (ต่อ)

Primers	Polymorphism	12 offspring
An1-5	✓	✓
An1-6	✓	✗
An1-7	✓	✗
Adh1-1	✓	✗
Adh1-2	✗	✗
lds1-1	✓	✗
lds1-2	✓	✗
lds1-3	✓	✓
lds1-4	✓	✓
lpt-1	✓	✗
lpt-2	✓	✗
AP2-1	✓	✗
AP2-2	✓	✗
AP2-3	✗	✗
Glossy15-1	✓	✗
Glossy15-2	✓	✗
Glossy15-3	✗	✗

หมายเหตุ ✓: Polymorphic

✗: Monomorphic

ภาคผนวก ค (ต่อ)

Primers	Polymorphism	12 offspring
Glossy15-4	✘	✘
D1-1	✘	✘
D2-1	✘	✘
D2-2	✘	✘
D2-3	✘	✘
D2-4	✘	✘
D2-5	✘	✘
D2-6	✓	✘
D2-7	✘	✘
D3-1	✘	✘
D3-2	✘	✘
D3-3	✘	✘
D8-1	✓	✓
CS-ACS1-1	✘	✘
CS-ACS2-1	✘	✘
CS-ACS2-2	✘	✘
CS-ACS2-3	✘	✘

หมายเหตุ ✓: Polymorphic

✘: Monomorphic

ภาคผนวก ค (ต่อ)

Primers	Polymorphism	12 offspring
EgAD1-1	x	x
EgRING1-1	x	x
EgFB1-1	x	x
EgFB1-2	x	x
EgFB1-3	✓	x
EgPHOS1-1	✓	x
EgMADS3-1	x	x
EgMADS3-2	x	x
EgMADS3-3	✓	x
EgMADS4-1	x	x
EgMADS4-2	x	x
EgMADS4-3	✓	✓
EgMADS5-1	✓	✓
EgMADS5-2	x	x
EgMADS5-3	✓	x
EgMADS8-1	x	x
EgMADS8-2	✓	x

หมายเหตุ ✓: Polymorphic

x: Monomorphic

ภาคผนวก ค (ต่อ)

Primers	Polymorphism	12 offspring
EgMADS8-3	✓	✗
EgMADS8-4	✓	✗
EgMADS9-1	✗	✗
EgMADS9-2	✗	✗
EgMADS9-3	✓	✗
EgMADS11-1	✗	✗
EgMADS11-2	✗	✗
EgMADS11-3	✓	✗
EgMADS11-4	✗	✗
EgMADS12-1	✗	✗
EgMADS12-2	✗	✗
EgMADS12-3	✓	✓
EgMADS14-1	✓	✓
EgMADS14-2	✗	✗
EgMADS14-3	✓	✗
EgMADS14-4	✗	✗
GT119161-1	✗	✗

หมายเหตุ ✓ : Polymorphic

✗ : Monomorphic

ภาคผนวก ค (ต่อ)

Primers	Polymorphism	12 offspring
GT119161-2	✓	✗
GT119161-3	✓	✓
GT119339-1	✓	✗
GT119339-2	✗	✗
GT119472-1	✗	✗
GT119493-1	✓	✗
GT119578-1	✓	✗
GT119578-2	✗	✗
GT119987-1	✗	✗
GT119987-2	✓	✗
GT120040-1	✓	✗
GT120266-1	✓	✓
GT120266-2	✓	✗
GT120266-3	✓	✗
GT120266-4	✓	✗
GT120266-5	✗	✗
GT120324-1	✓	✗

หมายเหตุ ✓: Polymorphic

✗: Monomorphic

ภาคผนวก ค (ต่อ)

Primers	Polymorphism	12 offspring
GT120324-2	✓	✗
GT120344-1	✗	✗
GT120344-2	✗	✗
GT120393-1	✓	✓
GT120393-2	✓	✓

หมายเหตุ ✓: Polymorphic

✗: Monomorphic

ภาคผนวก ง

อัตราส่วนการกระจายตัวจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมายทั้งหมด 22 เครื่องหมาย

ILP Primers	Segregation ratio
MADs box	
1BSQUA3-1	1:1
2XAGL2-4-2	1:2:1
2BAGL2-2-1	1:1
2xGLO1-4	1:2:1
2XGLO2-4	1:2:1
1XAGL2-2-3	3:1
2XM4-3	1:2:1
2X266-1	1:2:1
2XM5-1	1:2:1
2BM12-3	1:1
3X393-1	1:1:1:1
2D393-2	1:2:1
2B161-3	1:1
2BM14-1	1:1
Sex-determination	
2BAn1-5	1:1
1XAn1-3	3:1
2XAn1-1	1:2:1
2Blds1-3	1:1
2Blds1-4	1:1
2BD8-1(200)	1:1
2XD8-1(700)	1:2:1
1BTS1-3	1:1

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวโสณิชา อุทุมพร
วันเดือนปีเกิด	12 ตุลาคม 2534
ทุนการศึกษา	พ.ศ. 2557 : ทุนเรียนดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผลงานทางวิชาการ

โสณิชา อุทุมพร และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. (2016). การพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างดอกปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.). *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 24(2), 299-308.