นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาความแปรปรวนและความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

สายชล จันมาก จรัสศรี นวลศรี และ ธีระ เอกสมทราเมษฐ์

Abstract

Junmag, S., Nualsri, C. and Eksomtramage, T.

Genetic variation and phylogenetic relationships in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) based on RAPD analysis

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(3) : 473-485

The genetic variability and phylogenetic relationships in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) were studied using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Leaf samples of 151 plants were collected from different areas in southern Thailand. DNA from the leaf samples was isolated using CTAB buffer and screened by decamer oligonucleotide primers. Among the total of 160 primers screened, 7 primers (OPB-08, OPR-11, OPT-06, OPT-19, OPAB-01, OPAB-09 and OPAB-14) were chosen to analyse for genetic variation in 151 individuals representing 52 dura, 60 tenera and 39 pisifera. Two hundred and nine amplified fragments were obtained from 7 primers with an average of 29.85 RAPD markers per primer. A dendrogram showing genetic similarities among oil palm was constructed based on polymorphic bands using UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average). Cluster analysis was performed using the SPSS program, which revealed four major clusters: 1) dura, tenera and pisifera from Paorong Oil Palm Company, Oil Palm Research Center, dura and tenera from private plantation in Krabi, and dura from Thepa Research Station;

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

[1]วท.ม.(พืชศาสตร์), [2]Ph.D.(Agronomy-Plant Breeding), ผู้ช่วยศาสตราจารย์, [3]Docteur de Universite (Plant Breeding), รองศาสตราจารย์, ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: ncharass@yahoo.com

รับต้นฉบับ 5 กรกฎาคม 2547 รับลงพิมพ์ 10 ตุลาคม 2547

2) dura and tenera from Thai Boonthong Company, pisifera and tenera from Thepa Research Station, dura, tenera and pisifera from Klong Hoi Khong Research Station; 3) and 4) dura and tenera from Univanit Company, respectively. In general, a similarity index showed relatively high levels of 0.6 or greater.

Key words : oil palm, RAPD, genetic variation

บทคัดย่อ

สายชล จันมาก จรัสศรี นวลศรี และ ธีระ เอกสมทราเมษฐ์

การศึกษาความแปรปรวนและความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(3) : 473-485

การศึกษาความแปรปรวนและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) โดยทำการเก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันจำนวนทั้งสิ้น 151 ต้น จากแหล่งปลูกสำคัญต่าง ๆ ทางภาคใต้ของประเทศไทย ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบโดยใช้สารละลาย CTAB และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างสุ่มโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี จากการทดสอบด้วยไพรเมอร์จำนวนทั้งสิ้น 160 ไพรเมอร์ ทำการคัดเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างระหว่างพันธุ์ และให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนจำนวน 7 ไพรเมอร์ คือ OPB-08 OPR-11 OPT-06 OPT-19 OPAB-01 OPAB-09 และ OPAB-14 หลังจากนั้นจึงนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันจำนวน 151 ต้น โดยแยกเป็นพันธุ์ดูรา 52 ต้น พันธุ์เทเนอรา 60 ต้น และพันธุ์พิสิเฟอรา 39 ต้น ผลการศึกษาพบว่า จากจำนวนไพรเมอร์ 7 ชนิดที่ทำการทดสอบ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 209 แถบ เฉลี่ย 29.85 แถบ/ไพรเมอร์ นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างปาล์มน้ำมันทั้งหมดที่ได้มาสร้างเดนโดรแกรมเพื่อหาความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) โดยใช้โปรแกรม SPSS พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มปาล์มน้ำมันได้เป็น 4 กลุ่มด้วยกันคือ 1) ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอราจากบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์ม และจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูราและเทเนอราจากสวนเกษตรกรจังหวัดกระบี่ ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูราจากสถานีวิจัยเทพา 2) ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา และเทเนอราจากบริษัทไทยบุญทอง ปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา และพิสิเฟอราจากสถานีวิจัยเทพา ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอราจากสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง 3) และ 4) ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา และพันธุ์เทเนอราจากบริษัทยูนิวานิช ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันทั้งสามพันธุ์ที่ทำการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีค่าตั้งแต่ 0.6 ขึ้นไป

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่งของโลก ปริมาณการผลิตและการบริโภคจัดอยู่ในอันดับสองรองลงมาจากถั่วเหลือง เป็นพืชที่มีศักยภาพสูง เหมาะที่จะเป็นแหล่งผลิตน้ำมันสำหรับการอุปโภคและบริโภค เนื่องจากปาล์มน้ำมันให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงกว่าพืชน้ำมันทุกชนิด ประเทศผู้ผลิตและส่งออกน้ำมันปาล์มรายใหญ่ที่สุดของโลกในปัจจุบันคือประเทศมาเลเซีย สำหรับประเทศไทย พบว่าปัจจุบันสามารถผลิตน้ำมันได้เป็นอันดับ 5 ของโลก จากข้อมูลปี 2541 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันประมาณ 1.4 ล้านไร่ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ให้ผลผลิตแล้วประมาณ 1.13 ล้านไร่ เป็นผลผลิตปาล์มสดทั้งหมดประมาณ 2.46 ล้านตัน/ปี และสกัดเป็นน้ำมันปาล์มดิบได้ประมาณ 3.5 แสนตัน/ปี (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, 2543) ซึ่งปริมาณดังกล่าวไม่เพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศที่มีความต้องการถึงปีละ 4.4 แสนตัน/ปี อย่างไรก็ตาม การผลิตปาล์มน้ำมันในประเทศก็สามารถลดการนำเข้าน้ำมันปาล์มจากต่างประเทศได้ถึงปีละ 7,000-8,000 ล้านบาท พื้นที่

ปลูกปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่อยู่ในเขตจังหวัดทางภาคใต้ และสามารถขยายพื้นที่ปลูกได้อีกมาก ซึ่งทำให้ความต้องการเมล็ดพันธุ์เพิ่มตามไปด้วย ปัญหาหลักอย่างหนึ่งในการผลิตปาล์มน้ำมันคือพันธุ์ที่ใช้ปลูก โดยปาล์มน้ำมันที่ใช้ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันคือพันธุ์เทเนอรา ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ดูราและพันธุ์พิสิเฟอรา แม้ว่าในปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมได้เอง แต่ก็ยังไม่เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร จึงยังคงมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากต่างประเทศ เช่น มาเลเซีย คอสตาริกา และบางประเทศในทวีปแอฟริกา โดยเฉพาะประเทศมาเลเซียซึ่งมีนโยบายกีดกันการส่งออกเมล็ดพันธุ์ดี จึงมีการลักลอบนำเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันเข้ามายังประเทศไทย ซึ่งอาจมีพันธุ์ไม่ดีปะปนเข้ามาด้วย นอกจากนี้ แม้ว่าพันธุ์ที่นำเข้ามาจะเป็นพันธุ์ลูกผสมเทเนอราจริง แต่ก็เป็นพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงให้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศผู้ผลิต ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับพื้นที่ปลูกในประเทศไทย ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีความแตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นต้องปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันใช้เองในประเทศอย่างต่อเนื่อง ซึ่งขั้นตอนในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต้องอาศัยความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชและการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีตามต้องการ หลังจากนั้นจึงทำการผสมข้ามระหว่างพันธุ์พ่อแม่ที่คัดเลือกไว้ และทดสอบลูกผสม (progeny test) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกพ่อแม่อีกครั้ง ดังนั้นการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ปลูกในประเทศไทยจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง แต่การอาศัยลักษณะทางสัณฐานของพืชหรือข้อมูลในรุ่นลูกเพียงอย่างเดียวยังมีข้อจำกัด การใช้เทคนิคระดับดีเอ็นเอคือ เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD) ช่วยให้การศึกษาทางพันธุกรรมมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การคัดเลือกพันธุ์อย่างแม่นยำและสามารถร่นระยะเวลาของโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้สั้นลงได้

ปาล์มน้ำมันมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Elaeis guineensis* Jacq. เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบทวีปแอฟริกาใต้ พันธุ์ที่นิยมปลูกคือพันธุ์เทเนอรา ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์แม่ดูราและพันธุ์พ่อพิสิเฟอรา ประชากรปาล์มน้ำมันเกือบทั้งหมดที่ใช้เป็นฐานพันธุกรรมสำหรับปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเพื่อการค้าในปัจจุบันค่อนข้างมีฐานพันธุกรรมแคบ กลุ่มประชากรที่นิยมใช้ เช่น Deli, Yangambi, La Me, AVROS, Binga, Ekona และ Calabar (Rosenquist, 1982; กรมวิชาการเกษตร, 2541) แม้ปาล์มน้ำมันมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกาใต้ แต่ปัจจุบันมีการปลูกเป็นการค้าในหลายประเทศ ทั้งทวีปแอฟริกาและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งในประเทศไทย โดยการนำเข้ามาของหม่อมเจ้าอมรสมานลักษณ์ กิติยากร เริ่มมีการปลูกปาล์มน้ำมันครั้งแรกที่อำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา ต่อมาในปี พ.ศ. 2511 รัฐบาลเริ่มให้การสนับสนุนการปลูกปาล์มน้ำมันในภาคใต้โดยมีการปลูกเป็นการค้าครั้งแรกที่จังหวัดกระบี่และสตูล หลังจากนั้นมีการขยายพื้นที่ปลูกมากขึ้น ความต้องการต้นกล้าปาล์มน้ำมันจึงเพิ่มขึ้นอย่างมาก ด้วยความไม่แน่ใจในต้นพันธุ์ที่ลักลอบนำเข้ามาจากต่างประเทศรวมทั้งลูกผสมที่ผลิตเองภายในประเทศยังต้องมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เชื้อพันธุกรรมที่มีอยู่จึงมีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันในอนาคต การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีอยู่ในประเทศจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น

การศึกษาความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชอาจทำได้โดยสังเกตจากลักษณะสัณฐาน แต่ลักษณะเหล่านั้นในกลุ่มปาล์มน้ำมันค่อนข้างใกล้เคียงกันมาก โดยเฉพาะในกลุ่มเดียวกัน การคัดเลือกโดยอาศัยผลผลิตเป็นหลักยังคงมีปัญหา เนื่องจากผลกระทบจากสภาพแวดล้อมเป็นผลให้การศึกษาผิดพลาดได้ ดังนั้นการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอจึงมีความจำเป็น และสามารถใช้เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) มาใช้เพื่อการจำแนกหรือตรวจสอบพันธุ์พืช รวมถึงการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มพืช โดยอาศัยหลักการของความจำเพาะเจาะจงของดีเอ็นเอ เครื่องหมายโมเลกุลจึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ที่เฉพาะกับพืชแต่ละพันธุ์ระยะแรกมีการใช้ไอโซไซม์ซึ่งเป็นการตรวจสอบระดับโปรตีน อย่างไรก็ตามการใช้ไอโซไซม์ยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เช่นมีอิทธิพลจากสภาพแวดล้อม ระยะการเจริญเติบโตของพืช ทำให้แยกความแตกต่างได้น้อย (Claros *et al*., 2000; Degani *et al*., 2001) ต่อมามีการพัฒนาเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นการศึกษาความ

แตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มีข้อเสียคือ ต้องใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจำนวนมาก และต้องมีคุณภาพดี ถ้าติดฉลากโพรบด้วยสารกัมมันตรังสีก็อาจมีอันตราย จึงต้องทำด้วยความระมัดระวัง นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูง เสียเวลามาก เนื่องจากประกอบด้วยหลายขั้นตอนจึงค่อนข้างยุ่งยากทางกรรมวิธี (Kaundun *et al*., 2000) หลังจากมีการค้นพบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ มีการพัฒนาเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลใหม่ๆ โดยอาศัยหลักการทำงานของพีซีอาร์อีกหลายเทคนิค เช่น อาร์เอพีดี (RAPD) เอเอฟแอลพี (AFLP) และไมโครแซทเทลไลท์ หรือเอสเอสอาร์ (SSR) เป็นต้น เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่มีผู้นิยมใช้มาก เนื่องจากตรวจสอบผลการวิเคราะห์ได้ง่าย และรวดเร็ว (Williams *et al*., 1990)

อาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA) เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการทำงานของพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นประมาณ 10 เบส เพียงชนิดเดียวที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random primer) ซึ่งไม่จำเพาะกับยีนใด แล้วนำมาแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เทคนิคอาร์เอพีดีทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยประมาณ 25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา (Winter and Kahl, 1995) มีรายงานการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิด เช่น พืชสกุลลางสาด (สุวิมล, 2544) กาแฟ (Lashermes *et al*., 1996) ส้ม (Machado *et al*., 1996; Filho *et al*., 1998) มะกอก (Cortes *et al*., 2001; Balaj *et al*., 2001) มะพร้าว (Ashburner *et al*., 1997) และปาล์มน้ำมัน (Shah *et al*., 1994; กณพ, 2546) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนกความแตกต่างของพันธุ์พืชที่ต้านทานแมลง (Jeon *et al*., 1999) ต้านทานโรค (Boora *et al*., 1998) การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของลูกผสม (Balester and Vicente, 1998) การทำแผนที่ยีน (Cristofani *et al*., 1999) และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืช และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (สมศักดิ์ และคณะ, 2538)

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ปลูกในแหล่งปลูกสำคัญในภาคใต้ของประเทศไทยโดยการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี รวมทั้งศึกษาถึงความสัมพันธ์ของประชากรพันธุ์ปาล์มน้ำมันสำหรับการคัดเลือกพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ทำการเก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูราเทเนอราและพิสิเฟอรา จากสถานที่ต่างๆ จำนวน 151 ต้น (Table 1) ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมันที่สุ่มเก็บมาโดยใช้สารละลาย สกัดดีเอ็นเอ CTAB ซึ่งดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1990) ใช้ตัวอย่างปาล์มประมาณ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักสด ตัดชิ้นส่วนใบเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่งที่แช่เย็น แล้วเติมไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นจึงทำการบดจนตัวอย่างพืชละเอียดเป็นผง นำมาใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟขนาด 2 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย CTAB (1% PVP-40, 1.4 mM NaCl, 20 mM Na_2EDTA pH 8.0, 2% CTAB) ปริมาตร 1 มล. ก่อนสกัดดีเอ็นเอเติม β-mercaptoethanol เข้มข้น 2% เติมสารละลายดังกล่าวใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟ เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุก 15 นาที นำมาเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใสหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยไอโซโพรพานอล 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% 2 ครั้ง วางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM Na_2EDTA pH 7.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่สกัดไว้ที่อุณหภูมิ -30ºC จนกว่าจะนำมาใช้

ทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA) โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล SeaKem (FMC Bio-

Table 1. Sources and number of oil palm leaf samples collected for RAPD analysis.

Varieties/Sources	Number of varieties		
	Dura	Tenera	Pisifera
Oil palm research center, Department of Agriculture Surat Thani	9 (Dsu)	15 (Tsu)	17 (Psu)
Thaiboonthong company, Surat Thani	3 (Dtb)	4 (Ttb)	-
Univanit company, Krabi	8 (Dun)	4 (Tun)	-
Private plantation, krabi	5 (Dgo)	10 (Tgo)	-
Paorong oilpalm company, Nakhon Si Thamarat	7 (Dpa)	8 (Tpa)	9 (Ppa)
Research station of Faculty of Natural Resources, PSU at Thepa, Songkhla	10 (Dte)	10 (Tte)	5 (Pte)
Research station of Faculty of Natural Resources, PSU at Klong Hoi Khong, Songkhla	10 (Dkl)	9 (Tkl)	8 (Pkl)
	52	**60**	**39**
Total		**151**	

product, USA) เข้มข้น 0.7% ใช้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE (Tris, Glacial acetic acid, Na_2EDTA 0.5 M pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบดังนี้คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ บัฟเฟอร์ปริมาณ 2 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTP) เข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ Taq polymerase 1.5 ยูนิต ตั้งอุณหภูมิเป็น 3 ระดับคือ อุณหภูมิเริ่มต้นใช้อุณหภูมิ 95ºC เป็นเวลา 1 นาที ในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายใช้อุณหภูมิ 37ºC เวลา 1 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใช้อุณหภูมิ 72ºC เวลา 2 นาที จำนวนทั้งสิ้น 39 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 95ºC 1 นาที 37ºC 1 นาที และ 72ºC 10 นาทีอีก 1 รอบ นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกขนาดดีเอ็นเอ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสโดยใช้ตัวกลางอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.75% ในสารละลาย TBE (0.45 M Tris, 0.45 M Boric acid, 10 mM Na_2EDTA pH 8.0) ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละต้น

การคัดเลือกไพรเมอร์

ทำการทดสอบไพรเมอร์ขนาด 10 เบส จำนวน 160 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA-01-20 OPB-01-20 OPC-01-20 OPD-01-20 OPR-01-20 OPT-01-20 OPAA-01-20 และ OPAB-01-20 ในเบื้องต้นคัดเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอราชัดเจน โดยใช้ตัวอย่างพันธุ์ดูรา เทเนอราและพิสิเฟอราจากสถานีวิจัยคลองหอยโข่งพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง แล้วทำการคัดเลือกไพรเมอร์รอบที่สองโดยใช้ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา จากสถานีวิจัยคลองหอยโข่งพันธุ์ละ 8 ตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลชัดเจนที่สุด และนำมาใช้ตรวจสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างที่สุ่มเก็บมา ศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้วิเคราะห์ผล แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นภายในปาล์มน้ำมันพันธุ์เดียวกันและระหว่างพันธุ์ทั้งตัวอย่างต้นที่เก็บจากแหล่งเดียวกันและจากคนละแหล่ง

การศึกษาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

หาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในกลุ่ม และระหว่างกลุ่มของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการ

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้ โดยแปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นแบบ binary คือป้อนข้อมูลเป็น 1 กรณีที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ 0 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบ ณ บริเวณเดียวกัน วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอในรูปของความคล้ายหรือ Similarity Index ตามวิธีของ Jaccard (1908) สร้างเดนโดรแกรมโดยใช้วิธี UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) จากโปรแกรม SPSS

ผลการทดลอง

ทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้ง 3 พันธุ์ โดยทดสอบไพรเมอร์ขนาด 10 เบส จำนวน 160 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) จำนวน 65 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกัน 63 ไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ไม่ให้แถบดีเอ็นเอเลยจำนวน 12 ไพรเมอร์ และจำนวน 20 ไพรเมอร์ที่ให้ผลไม่ชัดเจน จากจำนวน 65 ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ พบว่ามีไพรเมอร์ที่ให้ผลชัดเจนที่สุดจำนวน 7 ไพรเมอร์ คือ OPB-08 OPR-11 OPT-19 OPT-06 OPAB-01 OPAB-09 และ OPAB-14 และนำมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มทั้งหมด 151 ต้น จากการทดสอบพบว่าให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 209 แถบ เฉลี่ย 29.85 แถบต่อไพรเมอร์ 117 แถบ (55.98%) เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน และอีก 92 แถบ (44.01%) เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความแตกต่างกัน ไพรเมอร์ OPAB-09 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด 36 แถบ ไพรเมอร์ OPT-06 และ OPR-11 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดเท่ากับ 27 แถบ (Table 2) แถบดีเอ็นเอมีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 200-3500 คู่เบส ตัวอย่างรูปแบบของแถบดีเอ็นเอดังแสดงใน Figure 1

จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา โดยทำการวิเคราะห์แยกแต่ละพันธุ์ ให้ผลดังนี้

ในกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูราจำนวน 52 ต้น จากเดนโดรแกรม (Figure 2A) สามารถแยกกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ พันธุ์ดูราจากสถานีวิจัยเทพา (Dte) พันธุ์ดูราจากบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์ม (Dpa) พันธุ์ดูราจากบริษัทไทยบุญทอง (Dtb) พันธุ์ดูราจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี (Dsu) พันธุ์ดูราจากสวนเกษตรกรจังหวัดกระบี่ (Dgo) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พันธุ์ดูราจากบริษัทยูนิวานิช (Dun) กลุ่มที่ 3 ได้แก่ พันธุ์ดูราจากสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง (Dkl) เมื่อเปรียบเทียบดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่าคู่ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ Dte 01 กับ Dte 02 ส่วนคู่ที่มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ Dun 04 กับ Dkl 09

ในกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอราจำนวน 60 ต้น สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Figure 2B) คือ กลุ่ม

Table 2. List of the 7 primers and their sequences that produced RAPD polymorphisms among 151 accessions of oil palm including dura tenera and pisifera

primer	sequences	Total bands (No.)	Polymorphic bands (No.)	Monomorphic bands (No.)
OPB-08	GTCCACACGG	30	20	10
OPR-11	GTAGCCGTCT	27	14	13
OPT-19	GTCCGTATGG	30	13	17
OPT-06	CAAGGGCAGA	27	19	8
OPAB-01	CCGTCGGTAG	30	17	13
OPAB-09	GGGCGACTAC	36	21	15
OPAB-14	AAGTGCGACC	29	13	16
	Total	209	117	92

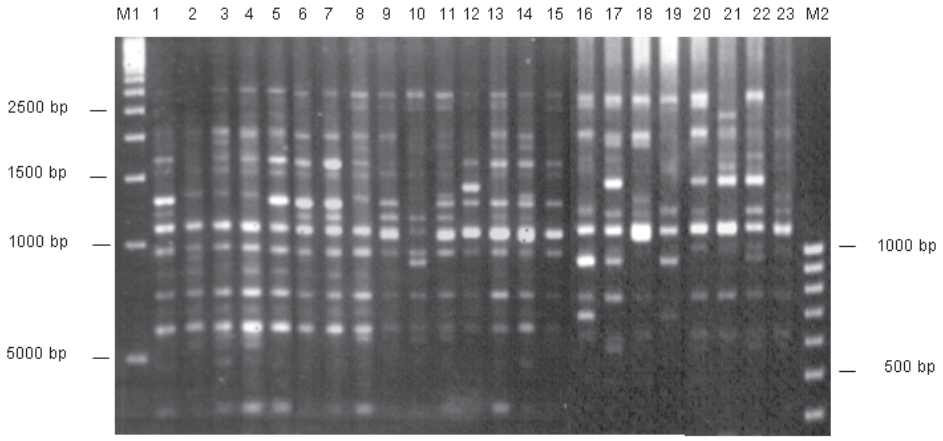

Figure 1. RAPD profile of accessions from Oil palm Research Center, Department of Agriculture, Surat Thani province using primer OPAB-01. Lane 1-8 are dura, lane 9-15 are tenera, lane 16-23 are pisifera. M1 and M2 are ladder DNA 500 bp and 100 bp, respectively.

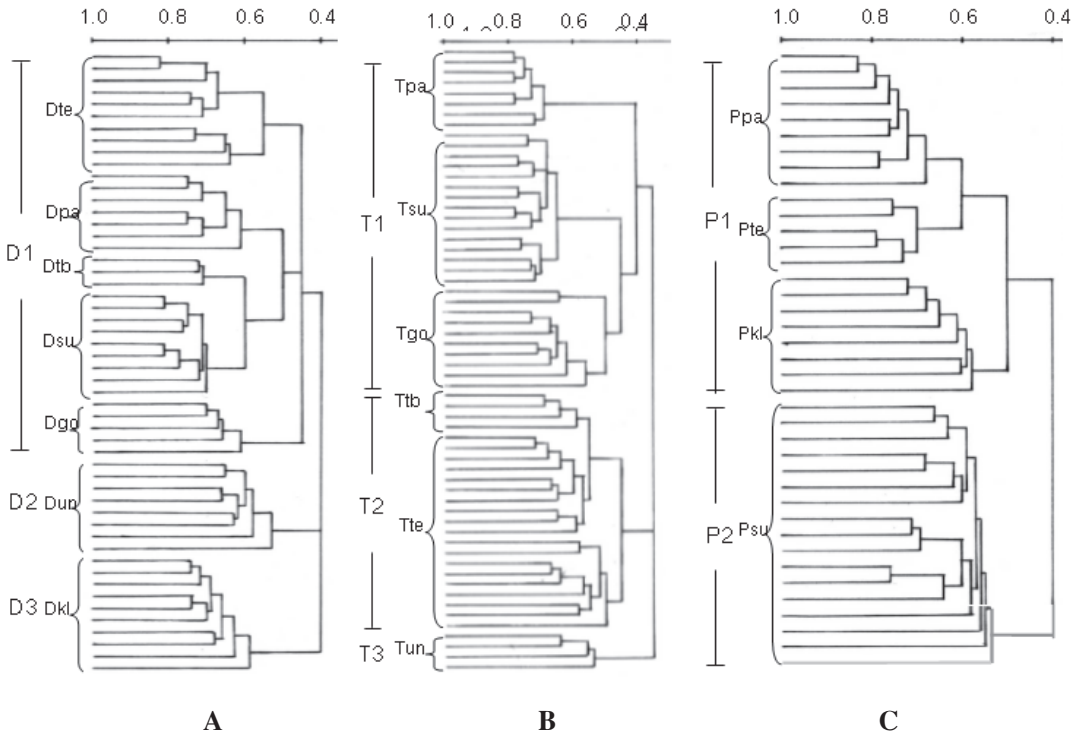

Figure 2. Dendrogram illustrating genetic relatedness among 52 duras (A) 60 teneras (B) and 39 pisiferas (C) generated by the UPGMA cluster analysis based on RAPD bands. Scale shown is Jaccard's coefficient of similarity. (Abbreviations are indicated in Table 1)

ที่ 1 ได้แก่ พันธุ์เทเนอราจากบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์ม (Tpa) พันธุ์เทเนอราจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี (Tsu) พันธุ์เทเนอราจากสวนเกษตรกรจังหวัดกระบี่ (Tgo) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พันธุ์เทเนอราจากบริษัทไทยบุญทอง (Ttb) พันธุ์เทเนอราจากสถานีวิจัยเทพา (Tte) พันธุ์เทเนอราจากสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง (Tkl) กลุ่มที่ 3 ได้แก่ พันธุ์เทเนอราจากบริษัทยูนิวานิช (Tun) เมื่อเปรียบเทียบดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่าคู่ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ Tpa 05 กับ Tpa 06 และ Tsu 06 กับ Tsu 07 ส่วนคู่ที่มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ Tte 08 กับ Tgo 08

ในกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันพันธุ์พิสิเฟอราจำนวน 39 ต้น สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม (Figure 2C) คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ พันธุ์พิสิเฟอราจากบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์ม (Ppa) พันธุ์พิสิเฟอราจากสถานีวิจัยเทพา (Pte) พันธุ์พิสิเฟอราจากสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง (Pkl) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พันธุ์พิสิเฟอราจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี (Psu) เมื่อเปรียบเทียบดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่าคู่ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ Ppa 05 กับ Ppa 07 ส่วนคู่ที่มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ Pkl 02 กับ Psu 14

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดรวมทั้ง 3 พันธุ์ จำนวนทั้งสิ้น 151 ต้น จากเดนโดรแกรม พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันได้เป็น 4 กลุ่ม (Figure 3) คือ

กลุ่มที่ 1 (G1) ได้แก่ พันธุ์ปาล์มน้ำมันทุกพันธุ์จากบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์ม (Ppa, Tpa, Dpa) และจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี (Dsu, Tsu, Psu) พันธุ์ดูราและเทเนอราจากสวนเกษตรกรจังหวัดกระบี่ (Dgo, Tgo) และพันธุ์ดูราจากสถานีวิจัยเทพา (Dte)

กลุ่มที่ 2 (G2) ได้แก่ พันธุ์เทเนอรา และพันธุ์ดูราจากบริษัทไทยบุญทอง (Ttb, Dtb) พันธุ์พิสิเฟอรา และเทเนอราจากสถานีวิจัยเทพา (Pte, Tte) และทั้งสามพันธุ์จากสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง (Dkl, Pkl, Tkl)

กลุ่มที่ 3 (G3) ได้แก่ พันธุ์ดูราจากบริษัทยูนิวานิช (Dun)

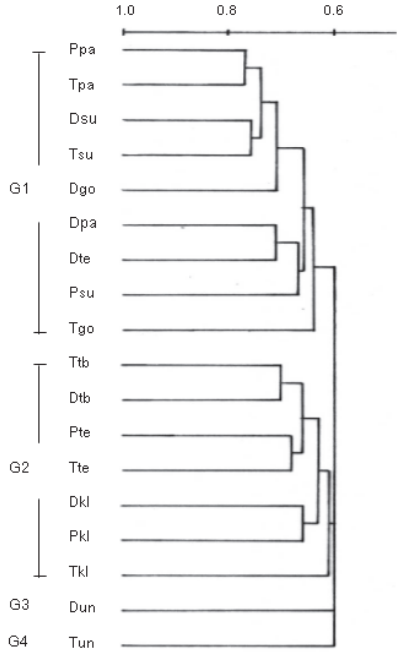

Figure 3. Dendrogram illustrating genetic relatedness among 151 oil palm accessions generated by the UPGMA cluster analysis based on RAPD bands. Scale shown is Jaccard's coefficient of similarity. (Abbreviations are indicated in Table 1)

กลุ่มที่ 4 (G4) ได้แก่ พันธุ์เทเนอราจากบริษัทยูนิ-วานิช (Tun)

เปรียบเทียบดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมพบว่า คู่ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ พันธุ์ดูรากับพันธุ์เทเนอราจากบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์ม มีค่าเท่ากับ 0.777 ส่วนคู่ที่มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ พันธุ์เทเนอราจากบริษัทยูนิวานิชกับพันธุ์เทเนอราจากสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง มีค่าเท่ากับ 0.587 (Table 3)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากไพรเมอร์ 7 ไพรเมอร์ที่ทำการทดสอบ ให้แถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 27-36 แถบต่อไพรเมอร์ นับว่าค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้ พบว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอใดที่เฉพาะเจาะจงเพียงพอที่จะใช้จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้ อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์เพียง 7 ไพรเมอร์อาจยังไม่เพียงพอ เนื่องจากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นการจับของดีเอ็นเอแบบสุ่ม ขึ้นอยู่กับว่าไพรเมอร์จะไปจับตรงตำแหน่งใดของจีโนม ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ไพรเมอร์ไปจับอาจแตกต่างกัน ดังนั้นการใช้ไพรเมอร์จำนวนมากขึ้นทำให้เกิดการสุ่มจับดีเอ็นเอตรงตำแหน่งต่างๆ ได้มากขึ้น (ธีระชัย และนฤมล, 2543) Shah และคณะ (1994) พยายามจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคเดียวกันนี้หาแถบดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมความหนาของกะลา ซึ่งเชื่อกันว่าถูกควบคุมโดยยีนเพียงคู่เดียวคือ Sh^+ (หรือยีน D) จากผลการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 1252 คู่เบส โดยไพรเมอร์ OPR-11 และขนาด 1046 คู่เบสของไพรเมอร์ OPT-19 มีความใกล้ชิดกับยีน Sh^+ ซึ่งสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันพันธุ์พิสิเฟอราออกจากพันธุ์ดูราและเทเนอรา แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูราและเทเนอราได้ แม้จะไม่สามารถหาแถบดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายในการแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ แต่เทคนิคอาร์เอพีดีก็มีประสิทธิภาพเพียงพอในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน (Moretzsohn *et al*., 2002)

ผลจากการวิเคราะห์และการสร้างเดนโดรแกรมเพื่อดูความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ พบว่าพันธุ์ดูราที่สุ่มศึกษาส่วนใหญ่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน จึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ยกเว้นพันธุ์ดูราจากบริษัทยูนิวานิช และจากสถานีวิจัยคลองหอยโข่งที่จัดอยู่คนละกลุ่ม (Figure 2A) เมื่อพิจารณาระหว่างพันธุ์เทเนอราด้วยกัน (Figure 2B) พบว่าพันธุ์เทเนอราจากบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์ม และศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานีมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เทเนอราจากแหล่งอื่น (ไม่

Table 3. Mean values of genetic similarity among oil palm accessions from different sources.

	Dpa	Tpa	Ppa	Dsu	Tsu	Psu	Dgo	Tgo	Dte	Tte	Pte	Dtb	Ttb	Dkl	Tkl	Pkl	Dun	Tun
Dpa	1																	
Tpa	0.732	1																
Ppa	0.749	0.777	1															
Dsu	0.738	0.760	0.772	1														
Tsu	0.734	0.756	0.773	0.762	1													
Psu	0.668	0.691	0.707	0.696	0.692	1												
Dgo	0.677	0.709	0.726	0.715	0.711	0.635	1											
Tgo	0.682	0.705	0.721	0.710	0.706	0.641	0.649	1										
Dte	0.718	0.741	0.757	0.746	0.742	0.677	0.685	0.691	1									
Tte	0.678	0.700	0.717	0.706	0.702	0.636	0.655	0.650	0.686	1								
Pte	0.716	0.738	0.755	0.744	0.740	0.674	0.683	0.688	0.724	0.684	1							
Dtb	0.714	0.736	0.753	0.742	0.738	0.672	0.691	0.686	0.722	0.682	0.695	1						
Ttb	0.689	0.712	0.728	0.717	0.713	0.648	0.656	0.662	0.704	0.657	0.720	0.693	1					
Dkl	0.700	0.722	0.739	0.728	0.724	0.658	0.677	0.672	0.708	0.688	0.706	0.704	0.679	1				
Tkl	0.649	0.672	0.688	0.677	0.673	0.608	0.626	0.622	0.658	0.617	0.655	0.653	0.629	0.639	1			
Pkl	0.673	0.696	0.712	0.701	0.697	0.632	0.650	0.646	0.684	0.641	0.679	0.677	0.653	0.663	0.613	1		
Dun	0.663	0.685	0.702	0.691	0.687	0.621	0.640	0.635	0.671	0.631	0.669	0.667	0.642	0.653	0.602	0.626	1	
Tun	0.647	0.670	0.686	0.675	0.671	0.606	0.624	0.620	0.656	0.615	0.653	0.651	0.627	0.637	0.587	0.611	0.600	1

ได้แสดงข้อมูล) โดยพันธุ์เทเนอราจากสวนเกษตรกรในจังหวัดกระบี่มีความความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงที่สุด การที่พันธุ์เทเนอราจากบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์ม และจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานีมีความแปรปรวนทางพันธุ-กรรมในแต่ละกลุ่มประชากรน้อย เพราะว่าทั้งบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์ม และศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานีต่างก็มีต้นพ่อและแม่พันธุ์เป็นของตนเอง ซึ่งต่างก็ได้รับการคัดเลือกมาจากต้นที่ดีในแต่ละกลุ่มประชากรเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน ดังนั้นเมื่อนำมาผลิตลูกผสมซึ่งก็คือพันธุ์เทเนอราต้นลูกผสมที่ได้จึงมีลักษณะใกล้เคียงกันมาก โดยเฉพาะพันธุ์เทเนอราที่สุ่มศึกษาจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี คือ ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 และลูกผสมสุราษฎร์ธานี 2 ซึ่งทั้งสองคู่ผสมมีพันธุ์แม่เดียวกันคือ Deli (รหัสพันธุ์คือ C2120: 184D) ต่างกันเฉพาะพันธุ์พ่อพิสิเฟอราเท่านั้น โดยลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 ใช้พันธุ์พ่อ Calabar ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 2 ใช้พันธุ์พ่อ La Me (อรรัตน์ และคณะ, 2544) ส่วนพันธุ์เทเนอราจากสวนเกษตรกรในจังหวัดกระบี่ สถานีวิจัยเทพา และสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง มีการนำเข้ามาจากประเทศมาเลเซียโดยไม่ทราบแหล่งที่มาของพ่อแม่พันธุ์แน่นอน และไม่ได้มีการรับรองพันธุ์อย่างชัดเจนเพื่อการนำเข้า ดังนั้นที่มาของพันธุ์ลูกผสมอาจมาจากกลุ่มพ่อแม่จากหลายกลุ่มประชากร ทำให้พันธุกรรมมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก เมื่อพิจารณาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันพันธุ์พิสิเฟอราพบว่าพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันพันธุ์พิสิเฟอราจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานีมีความแปรปรวนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์พิสิเฟอราจากแหล่งอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากประชากรกลุ่มนี้ได้มาจากแหล่งต่างๆ กันทั้งหมด 7 แหล่งด้วยกันคือ SP 540 (BM119), DAMI T, Ekona population (Lobe Cameroon), IRHO- La Me program (Ivory Coast), พันธุ์เทเนอราจากประเทศไนจีเรีย, Yangambi และพันธุ์เทเนอราจากประเทศแทนซาเนีย (อรรัตน์ และคณะ, 2544)

จากเดนโดรแกรมที่ได้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปาล์มน้ำมันทั้งสามสายพันธุ์คือพันธุ์ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรารวมกัน พบว่าส่วนใหญ่พันธุ์เทเนอราจะมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพันธุ์ดูรามากกว่าพันธุ์พิสิเฟอรา ยกเว้นกลุ่มประชากรจากบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์มและสถานีวิจัยเทพาที่พบว่าพันธุ์เทเนอรามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพันธุ์พิสิเฟอรามากกว่าพันธุ์ดูรา สำหรับบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์มจากการสอบถามเจ้าของสวนสามารถอธิบายได้ว่า เนื่องจากพันธุ์พิสิเฟอราใช้เป็นพันธุ์พ่อในการสร้างลูกผสมได้มาจากการสกัดสายพันธุ์โดยการผสมระหว่างพันธุ์เทเนอราและเทเนอรา (T X T) ส่วนปาล์มน้ำมันจากสถานีวิจัยคลองหอยโข่งนั้น ความสัมพันธ์จะแตกต่างจากประชากรกลุ่มอื่น เพราะพบว่าพันธุ์ดูรามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพันธุ์พิสิเฟอรามากกว่าพันธุ์เทเนอรา ซึ่งก็เป็นไปได้เพราะประชากรกลุ่มนี้ทั้งหมดได้จากเมล็ดลูกผสมเทเนอราที่เก็บรวบรวมจากต้นที่ดีต้นละ 10 เมล็ดจากแหล่งปลูกสำคัญของภาคใต้ เช่น จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี กระบี่ ตรัง สตูล เป็นต้น ดังนั้นต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดดังกล่าวจึงมีการกระจายตัวในอัตรา 1:2:1 (ดูรา:เทเนอรา:พิสิเฟอรา) (สุจินต์ และคณะ, 2530) ซึ่งแหล่งที่มาของพันธุ์เทเนอรามาจากหลายแหล่งด้วยกันไม่ทราบแหล่งที่มาแน่ชัดแต่พบว่าส่วนใหญ่นำเข้ามาจากประเทศมาเลเซีย ดังนั้นค่าของดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุ-กรรมอาจมีความแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประชากรที่ถูกสุ่มมาศึกษา

เมื่อพิจารณาความแตกต่างจากแหล่งที่มาของตัวอย่างที่ศึกษาในครั้งนี้ พบว่ากลุ่มปาล์มน้ำมันจากบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์มมีความใกล้ชิดกับพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานีมากกว่าแหล่งอื่น จากประวัติประชากรของพ่อแม่พันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานีที่ใช้ทั้งหมดได้นำเข้ามาจากบริษัท ASD (Agriculture Service and Development) ประเทศคอสตาริกาแล้วได้ทำการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธี Reciprocal Recurrent Selection (อรรัตน์ และคณะ, 2544) ตามประวัติประชากรกลุ่มนี้บริษัท ASD ได้รวบรวมไว้ตั้งแต่ปี คศ.1968 โดยการแลกเปลี่ยนจากแหล่งต่างๆ จากหลายประเทศ เช่น Chemera Hairison และ PORIM (สถาบันวิจัยปาล์มน้ำมันแห่งชาติมาเลเซีย) ประเทศมาเลเซีย DAMI ประเทศปาปัวนิวกินี Lobe ประเทศคาเมรูน, ประเทศไอเวอรีโคท และประเทศแซร์ (Escobar and Blaak, 1990 อ้างโดย อรรัตน์ และคณะ, 2544) จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าพันธุ์เทเนอราที่นำมาสกัดสายพันธุ์พิสิเฟอราของบริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์ม อาจจะมีแหล่งพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน

เพราะฐานพันธุกรรมของพ่อพันธุ์จากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานีส่วนหนึ่งก็นำเข้ามาจากประเทศมาเลเซีย (จาก PORIM) นอกจากนี้แล้วประเทศมาเลเซียเองมีความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันมายาวนาน ปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอราที่ปลูกเป็นการค้าในประเทศแถบเอเซียในปัจจุบัน เชื่อว่ามาจากต้นแม่พันธุ์ดูราเพียง 4 ต้น ซึ่งมีผู้นำเข้ามาจากประเทศมอร์ริเชียส และนำมาปลูกไว้ที่สวนพฤกษศาสตร์ประเทศอินโดนีเซียตั้งแต่ปี ค.ศ. 1848 จึงทำให้ฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ หากเทียบกับพันธุ์ปาล์มน้ำมันในแถบทวีปแอฟริกา ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดดั้งเดิมของปาล์มน้ำมัน (Hartley, 1977) ระยะหลัง PORIM จึงมีการนำเข้าพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากแอฟริกา และอเมริกาใต้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์เช่นกัน (Shah *et al*., 1994)

สำหรับปาล์มน้ำมันจากสวนเกษตรกรแถบจังหวัดกระบี่จากการสอบถาม พบว่าได้นำเชื้อพันธุ์มาจากหลายแหล่งด้วยกัน โดยนำเข้ามาจากประเทศแถบอเมริกาใต้คือประเทศคอสตาริกา และประเทศแซร์ บางส่วนได้พันธุ์มาจากกองทุนปาล์มน้ำมันประเทศมาเลเซีย จากการสืบประวัติของพันธุ์ปาล์มน้ำมันของบริษัทไทยบุญทอง สถานีวิจัยเทพา และสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง พบว่าทั้งหมดเป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากประเทศมาเลเซีย แต่ไม่ทราบแหล่งที่มาชัดเจน ส่วนประชากรปาล์มน้ำมันจากบริษัทยูนิวานิชพันธุ์ดูราที่นำมาศึกษาครั้งนี้สุ่มจากแปลงแม่พันธุ์ดูราที่บริษัทนำเข้ามาปลูกชุดแรกๆ ในขณะที่พันธุ์เทเนอราเป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากประเทศแถบอเมริกาใต้คือ ประเทศแซร์ น่าสนใจตรงที่ประชากรสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก และมีความแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามการศึกษาในพืชบางชนิด เช่น มะกอกพบว่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของตัวอย่าง พืชที่มาจากแหล่งเดียวกันไม่จำเป็นต้องมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่าพืชที่เก็บจากแหล่งที่ห่างไกลกว่า (Caraffa *et al*., 2002) ทำนองเดียวกัน จากการทดลองของ Moretzsohn และคณะ (2002) ซึ่งได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในกลุ่ม *E. oleifera* แถบแม่น้ำอะเมซอน พบว่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันกลุ่มดังกล่าวนี้ไม่ได้ขึ้นอยู่กับระยะทางความใกล้ไกลของพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง นอกจากนี้การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิด พบว่าให้ผลสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น สามารถแยกกลุ่มพริกที่มีผลใหญ่ออกจากกลุ่มพริกที่มีผลขนาดเล็กได้ (Paran *et al*., 1998) สำหรับการทดลองในปาล์มน้ำมันการพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำได้ยาก เนื่องจากลักษณะใกล้เคียงกัน ดังนั้นการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบระดับความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพันธุ์พ่อแม่ก่อนที่จะนำมาผลิตลูกผสม และใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่เพื่อใช้ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ ช่วยลดขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม การใช้เครื่องหมายโมเลกุลมีด้วยกันหลายวิธี ถ้าสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันจะทำให้การปรับปรุงพันธุ์มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม การคัดเลือกในกลุ่มประชากร *E. guineensis* ซึ่งมีฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ความก้าวหน้าในการคัดเลือกอาจจะน้อย วัตถุประสงค์หลักของการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันคือต้านทานโรค เพิ่มผลผลิตน้ำมัน มีอัตราการเจริญเติบโตช้าหรือลักษณะต้นเตี้ย และมีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ซึ่งอาจต้องหาลักษณะดังกล่าวนี้จากพันธุ์ปาล์มน้ำมันในกลุ่ม *E. oleifera* เพราะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าปาล์มน้ำมันในกลุ่ม *E. guineensis* (Barcelos *et al*., 2002) และมีคุณภาพน้ำมันดีกว่า Moretzsohn และคณะ (2000) กล่าวว่าการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันในกลุ่ม *E. guineensis* โดยนำมาผสมข้ามกับปาล์มน้ำมันในกลุ่ม *E. oleifera* นั้นจะช่วยเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมให้พืชในกลุ่ม *E. guineensis* ทำให้สามารถทำการคัดเลือกและปรับปรุงลักษณะสำคัญที่ต้องการ และพัฒนาพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้ดียิ่งขึ้น

สรุป

จากการศึกษาความแปรปรวนของประชากรปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ในเบื้องต้นทดสอบกับไพรเมอร์ขนาด 10 เบส จำนวน 160 ชนิด (OPA-01-20, OPB-01-20, OPC-01-20, OPD-01-20, OPR-01-20, OPT-01-20, OPAA-01-20 และ OPAB-01-20) พบว่า

มีไพรเมอร์ 7 ชนิดได้แก่ OPB-08, OPR-11, OPT-06, OPT-19, OPAB-01, OPAB-09 และ OPAB-14 สามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอราได้ และเมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจากตัวอย่างต้นที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA จากโปรแกรม SPSS สามารถแบ่งกลุ่มปาล์มน้ำมันตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ปาล์มน้ำมันทั้งสามพันธุ์จากบริษัทเปารงค์ และจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา และเทเนอรา จากสวนเกษตรกรในจังหวัดกระบี่ ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูราจากสถานีวิจัยเทพา กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา และเทเนอรา จากบริษัทไทยบุญทอง ปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา และพิสิเฟอรา จากสถานีวิจัยเทพา ปาล์มน้ำมันทั้งสามพันธุ์จากสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูราจากบริษัทยูนิวานิช และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ พันธุ์เทเนอราจากบริษัทยูนิวานิช จากค่าเฉลี่ยดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าส่วนใหญ่มีค่ามากกว่า 0.6 แสดงว่าประชากรปาล์มน้ำมันมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

คำขอบคุณ

งานวิจัยได้รับการสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาทบวงมหาวิทยาลัย ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณ คุณอรรัตน์ วงศ์ศรี สถาบันวิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี บริษัทเปารงค์ออยล์ปาล์ม บริษัทไทยบุญทอง บริษัทยูนิวานิช และโกล้ง สำหรับตัวอย่างพืชและข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กณพ ลิขิตขจรนุวัฒน์. 2546. การศึกษาพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์, RAPD และ EPIC. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

กรมวิชาการเกษตร. 2541. คำแนะนำการปลูกปาล์มน้ำมันอย่างถูกต้องและเหมาะสม. กรุงเทพฯ: เบสิกเกียร์.

ธีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์. 2543. เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์พริก. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1:6-10.

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 2543. การประชุมระดมความคิดอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันครบวงจรระหว่างวันที่ 16-18 ธันวาคม 2543. ณ โรงแรมลักษณาธานี อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี. 94 หน้า.

สุจินต์ จินายน ประเสริฐ ชิตพงศ์ พรชัย เหลืองอาภาพงค์ ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และ สมปอง เตชะโต. 2530. ภาวะปัญหา และแนวทางการแก้ไขการขาดแคลนต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีในประเทศไทย. ว. สงขลานครินทร์ 9: 105-110.

สมศักดิ์ อภิสิทธิวานิช สุมน มาสุธน ประดิษฐ์ พงค์ทองคำ เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2538. การตรวจหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวในสกุล *Oryza* โดยเทคนิค RAPD. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 29: 454-461.

สุวิมล กลศึก. 2544. การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมและแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู (*Lansium domesticum* Correa) โดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรรัตน์ วงศ์ศรี ศิริชัย มามีวัฒนะ ดำรง พงค์มานะวุฒิ เกริกชัย ธนรักษ์ สุพร ฆังคมณี สุรกิตติ ศรีกุล พิพัฒน์ เซี่ยงหลิว สุนีย์ นิเทศพัตรพงค์ วิชณีย์ ออมทรัพย์สิน สมาน ดิษดี ชาย โฆรวิส และ นคร สาระคุณ. 2544. การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันและพันธุ์แนะนำ. เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการปาล์มน้ำมันแห่งชาติ ครั้งที่ 2. ณ โรงแรมธรรมรินทร์ธนา จ.ตรัง วันที่ 31 กรกฎาคม - 1 สิงหาคม 2544.

Ashburner, G.R., Thompson, W.K. and Halloran, G.M. 1997. RAPD analysis of South Pacific coconut palm population. Crop Sci. 37: 992-997.

Balaj, A., Trujillo, I., Rosa, R.D.L. and Rallo, L. 2001. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphism markers in an olive germplasm bank. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126: 64-71.

Balester, J. and Vicente, C.D. 1998. Determination of F1 hybrid seed purity in pepper using PCR-based. Euphytica 103: 223-226.

Barcelos, E., Amblard, P., Berthaud, J. and Sequin. M. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. Pcsq. Agropcc. Bras. Brasilia. 37: 1105-1114.

Boora, K.S., Frederiksen, R. and Magill, C. 1998. DNA-based markers for a recessive gene conferring anthracnose resistance in sorghum. Crop Sci. 38: 1708-1709.

Caraffa, V.B.D., Giannettini, J., Gambotti, C. and Maury, J. 2002. Genetic relationship between cultivated and wild olives of *Corsica* and *Sardinia* using RAPD markers. Euphytica 123: 263-271.

Claros, M.G., Crespillo, R.M., Aguilar, L. and Canovas, F.M. 2000. DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive-tree (*Olea europaea* L.). Euphytica 116: 131-142.

Cortes, F.S., Paz, B.S. Iniguez, A. and Liacer, G. 2001. Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126: 7-12.

Cristofani, M., Machado, M.A. and Grattapaglia, D. 1999. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex.Tan. and *Poncirus trifoliate* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. Euphytica 90 : 25-32.

Degani, C., Rowland, L.J., Saunders, J.A., Hokanson, S.C., Ogden, E.L., Goldhirsh, A.G. and Galletta, G.J. 2001. A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs and pedigree data. Euphytica 117: 1-12.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Filho, H.D.C., Machado, M.A., Targon, M.L.P.N., Moreira, M.C.P.Q.D.G. and Pompeu Jr, J. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. Euphytica 102: 133-139.

Hartley, C.W.S. 1977. The Oil Palm. London: Longman.

Jaccard, P. 1908. Nouvellers recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44: 223-270.

Jeon, Y.H., Ahn, S.N., Choi, H.C., Hahn, T.R. and Moon, H. P. 1999. Identification of a RAPD marker linker linked to a brown planthopper resistance gene in rice. Euphytica 107: 23-28.

Kaundun, S.S., Zhyvoloup, A. and Park, Y.G. 2000. Evaluation of genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) accessions using RAPD markers. Euphytica 155: 7-16.

Lashermes, P., Trouslot, P., Anthony, F., Combes, M.C. and Charrier, A. 1996. Genetic diversity for RAPD marker between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. Euphytica 87: 59-64.

Machado, M.A., Filho, C., Targon, M.L.P.N. and Pompeu, Jr. 1996. Genetic relationship of mediterraneans (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD marker. Euphytica 92: 321-326.

Moretzsohn, M.C., Ferreira, M.A., Amaral, Z.P.S., Coelho, P.J.A.,Grattapaglia, D. and Ferreira, M. E. 2002. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon Forest. Euphytica 124: 35-45.

Moretzsohn, M.C., Nunes, C.D.M., Ferreira, M.E. and Grattapaglis, D. 2000. RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis*). Theor. Appl. Genet. 100: 63-70.

Paran, I., Aftergoot, E. and Shifriss, C. 1998. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. Euphytica 99: 167-173.

Rosenquist, E.A. 1982. Performance of identical oil palm progenies in different environments. **In** The Oil Palm in Agriculture in the Eighties. (eds. Pushparajah E. and Chew, P.S.) pp. 131-143. Kuala Lumpur: The Incorporated Society of Planters.

Shah, F.H., Rashid, O., Simons, A.J. and Dunsdon, A. 1994. The utility of RAPD markers for the determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis quineensis*). Theor. Appl. Genet. 89: 713-718.

Williams, J.G.K., Kubelik, R.A., Livak, J.K., Rafalski, A.J. and Tingey, V.S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.

Winter, P. and Kahl, G.1995. Molecular marker technologies for plant improvement. World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 438-448.