



ความหลากหลายทางพันธุกรรมประชากรของปาล์มน้ำมันในพื้นที่ อำเภอกอกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี
ด้วยเทคนิค Microsatellite

Genetic Diversity of Oil Palm Population Planting in Khokpho, Pattani
with Microsatellite Technique

จาร์ นิคม* ซัมซุรี ดอฮา และรวีเยะ อำบุเล็ง

Jaru Nikom*, Samsuree Doha and Roveeyah Ambulang

หลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา อำเภอมือง จังหวัดยะลา 95000
Biology Program Faculty of Technology Science and Agriculture, Yala Rajabhat University, Muang, Yala 95000. Thailand.

*Corresponding Author, e-mail: jaruni1984@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรสวนปาล์มน้ำมันด้วยการใช้เทคนิค Microsatellite marker โดยทำการทดสอบกับดีเอ็นเอตัวอย่างใบปาล์มอ่อน 10 ตัวอย่างจากกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันจาก อำเภอกอกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี กับไพเมอร์ 10 คู่ แล้วการตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis นำผลมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม MEGA โดยใช้สร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของวิธี UPGMA ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มประชากรได้เพียง 1 กลุ่มเท่านั้น ต่อมาใช้ โปรแกรม Arlquin ในการคำนวณ Genetic diversity โดยใช้ค่า Nucleotide diversity และค่า Haplotype diversity ค่าทั้งสองแสดงผลว่ามีความคล้ายคลึงกันของพันธุกรรมในระดับประชากรกลุ่มตัวอย่างประชากรปาล์มน้ำมันในพื้นที่ อ.กอกโพธิ์ จ. ปัตตานี จึงจะเห็นได้ว่าการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ สามารถที่จะใช้ในการทดสอบความแปรผันทางพันธุกรรมในระดับประชากรได้

คำสำคัญ : ความหลากหลายทางพันธุกรรม ปาล์มน้ำมัน เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

Abstract

The objective in this study is that observes oil palm genetic variation with Microsatellite marker technique. 10 samples of DNA extraction from young leaf in Khopho, Pattani were amplified with 10 primers and observed by agarose gel electrophoresis method. The microsatellite fragments were analyzed with MEGA program and calculated genetic diversity by Arlquin Program. The UPGMA dendrogram in these results represent genetic relationship clades in only one group. Nucleotide diversity and Haplotype diversity values indicate that non genetic variation in theses samples. From these results indicate that have not different genetic variation in population in Khopho sample. This study might show that Microsatellite marker technique able to analyze genetic variation diversity in oil palm plant population in Khopho, Pattani.

Keywords: Genetic diversity, Oil palm, Microsatellite Markers



บทนำ

อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มมีอัตราการขยายตัวค่อนข้างสูงซึ่งประเทศไทยเรากลับมีผลผลิตที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศเพื่อนบ้าน ประเทศไทยมีเป้าหมายที่จะขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันให้มากขึ้น ดังนั้นความต้องการของต้นกล้าปาล์ม น้ำมันพันธุ์ดีสำหรับการปลูกใหม่จึงค่อนข้างสูง สายพันธุ์ต้นปาล์มที่ให้ผลผลิตน้ำมันได้ดีนั้นต้องเป็นสายพันธุ์ลูกผสม ทำให้มีผู้นำกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้มาตรฐานหรือเก็บโคนต้นไปขายให้แก่เกษตรกร ซึ่งมีการปะปนของต้นปาล์มสายพันธุ์ที่ไม่ได้ผลผลิตที่ดี ไม่ดี ให้ผลผลิตต่ำ กรมวิชาการเกษตรจึงได้มีการแก้ปัญหาข้างต้นเมื่อไม่นานมานี้ โดยการออกประกาศจดทะเบียนผู้ผลิตและจำหน่ายต้นกล้าปาล์มน้ำมัน เพื่อที่จะตรวจสอบย้อนกลับได้กรณีที่เกษตรกรซื้อต้นกล้าปาล์มที่ไม่ได้มาตรฐานมาปลูก เครื่องหมายทางชีวโมเลกุลเป็นเครื่องมืออีกชนิดหนึ่งที่สามารถจะช่วยเหลือเกษตรกรในการตรวจสอบสายพันธุ์ย้อนกลับได้ เครื่องหมายทางชีวโมเลกุล (Molecular marker) เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic marker) ที่ช่วยในการจัดจำแนกที่มีความถูกต้อง และมีความแม่นยำสูง เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้ในการจัดจำแนกพืช คือ microsatellite หรือ simple sequence repeat (SSR) ในการศึกษาพืชตระกูลปาล์มน้ำมันได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค SSR ในงานที่เกี่ยวข้องกับเครื่องหมายทางพันธุกรรมอย่างแพร่หลาย (Zhou et al., 2015; Xiao et al., 2014; Tranbarger et al., 2012) การสำรวจเครื่องหมายพันธุกรรมเป็นเครื่องมือหนึ่งในการสำรวจการกระจายสายพันธุ์ของประชากรปาล์มน้ำมันที่เกษตรกรในพื้นที่สามจังหวัดชายแดนใต้เพาะปลูก สามารถเป็นฐานข้อมูลสำคัญที่จะบ่งบอกถึงความแปรปรวนของสายพันธุ์ที่จะเกิดขึ้น ความเสี่ยงต่อการกลายพันธุ์ของประชากรปาล์มน้ำมันเพื่อในเปรียบเทียบความเหมือน หรือความแตกต่างกับสายพันธุ์อื่นๆ จะทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตน้ำมันมีปริมาณ และคุณภาพที่ดีที่สุดในการแนะนำให้แก่เกษตรกรปลูก การนำเทคโนโลยีการใช้เครื่องหมาย DNA มาทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชปาล์มน้ำมัน จะสามารถแยกความแตกต่างของพันธุกรรมพืชตั้งแต่ในระดับประชากร (Population) ระดับชนิด (Species) หรือ ระดับสายพันธุ์ (Breeding Lines) ได้ ซึ่งสภาพแวดล้อมภายนอกต่างๆ ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ จะช่วยประหยัดเวลา พื้นที่เพาะปลูก แรงงาน ค่าใช้จ่าย ตลอดจนลดทอนความยุ่งยากต่างๆ ของกระบวนการลง ช่วยเพิ่มรายได้แก่เกษตรกรได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

ในการศึกษาครั้งนี้ เราจะทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างประชากรปาล์มที่ปลูกอยู่ในพื้นที่สามจังหวัดชายแดนภาคใต้ ด้วยเทคนิคการประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางชีวโมเลกุล เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางสายพันธุ์ที่สำคัญเพื่อการวางแผนการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีการผลิตน้ำมันดีขึ้น จากการศึกษาวิจัยนำมาซึ่งประโยชน์ในการศึกษาลักษณะของความหลากหลายทางพันธุกรรมในพื้นที่ อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี และเป็นการส่งเสริมการเพาะปลูกขยายพันธุ์ปาล์ม น้ำมันซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจต่อไป ดังนั้นการพัฒนาสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันและชนิดต้นกล้าที่ให้ผลผลิตได้มากและทนต่อสภาพแวดล้อมเพื่อให้มีน้ำมันเพียงพอต่อความต้องการของประชากรและเป็นผลผลิตที่มีคุณภาพ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การใช้เทคนิคเครื่องหมายไมโครแซเทลไลท์ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมปาล์มน้ำมันของตัวอย่างประชากรปาล์มใน อ.โคกโพธิ์ จ.ปัตตานี

วิธีดำเนินการวิจัย

สกัดดีเอ็นเอตัวอย่างใบปาล์มอ่อนในพื้นที่อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี ด้วยชุดสกัด Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit จากนั้นนำ Genomic DNA มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ 10 คู่ แสดงในตารางที่ 1 (Zhou et al., 2015) มีส่วนผสมดังต่อไปนี้ $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTP 200 mM, Primer 0.5 μM และ Taq Polymerase 2 U แล้วนำใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยโปรแกรมดังต่อไปนี้ ขั้นตอน Denature 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน Annealing 58.4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที และขั้น Extension 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 วินาที

หลังจากนั้นทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis แล้วนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ผลจากการทำ Gel Electrophoresis มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) ด้วยโปรแกรม MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม Arlequin

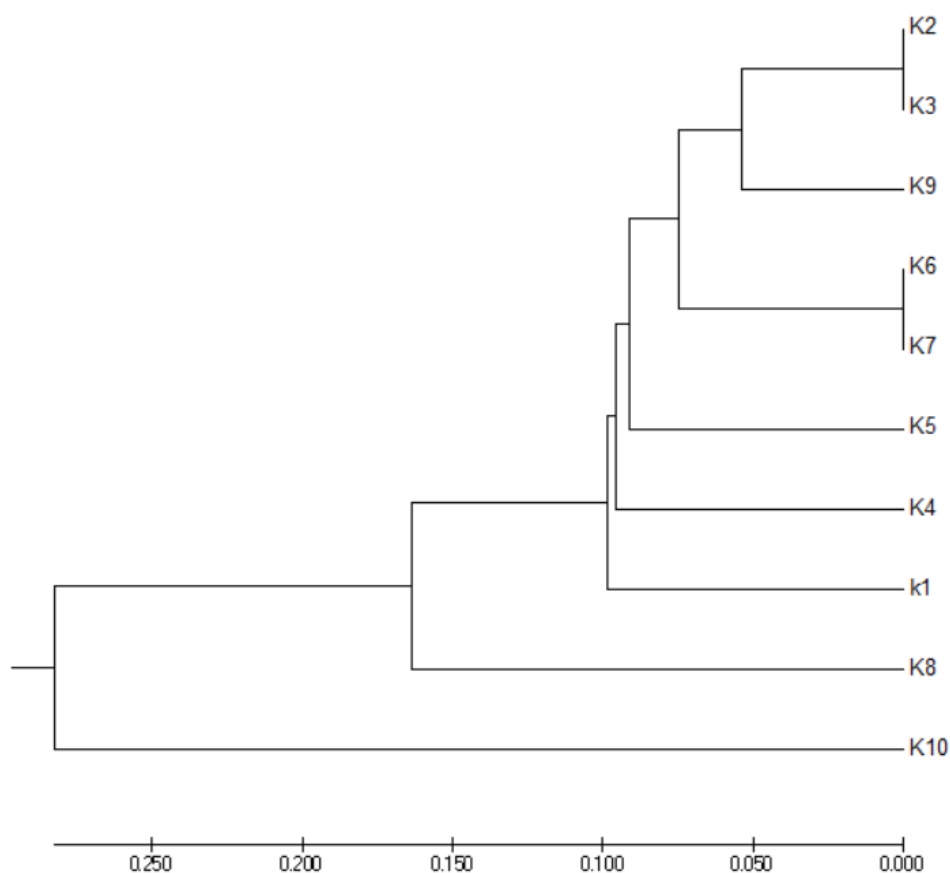
ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสไพรเมอร์ 10 คู่

	Primer sequences	Tm (C)	Size (bp)	Motif
1	F: CGCCCTCTGCTAAGTGCTAT R: TGAAAGAAAACCTTATGTGTCCA	58.4	180	tct(6)
2	F: GACGGCAGCTCCCTTCTT R: TGTGTCGATTGGTCCTCTTG	58.4	238	gcc(7)
3	F: ATTTGCAGTTGCAGGGTTCT R: GCAGCAGCAACAGATTCAAA	58.4	202	tgt(5)
4	F: ACTCCAAAACCAAACCACCA R: CATAAAATCCGGATGCTGCT	58.4	199	cac(5)
5	F: GGCTGGCTTCCTAATTTTT R: CCTGCCCTGTCCATTCTTTA	58.4	236	tctt(5)
6	F: TCCCTCTCACGCTCTCTGTT R: CTGGTGTGCCAACCTAAACC	58.4	202	cct(5)
7	F: CCGGCTCAAGATCCAAAG R: ACTAGCGAGCCACTGAGAGC	58.4	213	cag(6)
8	F: TAGAAGATGGCTTCCGACGA R: TTCCTCTCCTCCTCCTCCTC	58.4	233	atg(5)
9	F: ACCTGTTTGCATGGAACCTT R: TTCAACCGCCAAAGTCTTC	58.4	202	ctc(5)
10	F: TTCGGTTTGATTGCCGTTAT R: ATCTGTCTCCCCGGTAACT	58.4	205	a(14)

ผลและอภิปรายผล

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างใบปาล์มอ่อนในพื้นที่อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานีด้วยชุดสกัด จากนั้นนำ Genomic DNA ทั้งหมด 10 ตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับชุดไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ หลังจากนั้นทำการตรวจสอบด้วย Gel Electrophoresis แล้วนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MEGA ของสายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน และใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ UPGMA จะแสดงระยะห่างของสายพันธุ์กรรม จากผลการวิเคราะห์ที่แสดงในรูปภาพที่ 1 พบว่าประชากรปาล์มน้ำมันของตัวอย่างในสวนพื้นที่ อ.โคกโพธิ์พบว่าจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันมีการแสดงความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์กรรมที่คล้ายคลึงกัน ตัวอย่าง K₂ และ K₃ กับตัวอย่าง K₆ และ K₇ มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมาก ต่อมาวิเคราะห์ผลการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันด้วยโปรแกรม Arlequin เพื่อแสดงความแปรปรวนของพันธุกรรมในระดับประชากรของตัวอย่างปาล์มน้ำมันในพื้นที่ อ.โคกโพธิ์ จากการวิเคราะห์พบว่า ค่า Nucleotide diversity มี

ค่าเท่ากับ 0.3555 ± 0.2437 และ ค่า Haplotype diversity มีค่าเท่ากับ 0.9556 ± 0.0594 (ตารางที่ 2) จากการวิเคราะห์พบว่า ค่าทั้งสองค่านี้จัดอยู่ในระดับสูงทั้งสอง อาจจะบ่งชี้ได้ว่าลักษณะทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันจากตัวอย่างในพื้นที่ อ.โคกโพธิ์ จ.ปัตตานี มีความเสถียรภาพสูง และมีความแปรผันทางพันธุกรรมค่อนข้างคงที่ แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันมีความคล้ายคลึงกัน อาจจะเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าประชากรจากสวนตัวอย่างใน อ.โคกโพธิ์ จ.ปัตตานี อาจจะมาจากต้นพ่อแม่พันธุ์ที่มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมซึ่งจะส่งผลให้ผลผลิตนั้นเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งตรงกันข้ามกับผลการศึกษาจากสวนตัวอย่างของสวนปาล์มในพื้นที่ อ.หนองจิก จ.ปัตตานี ที่มีความแตกต่างกันของลักษณะทางพันธุกรรม (รอกีเยาะ เจ๊ะหลง และคณะ) ทั้งที่ใช้ชุดไพรเมอร์ชุดเดียวกัน อาจจะบ่งชี้ว่าไพรเมอร์ชุดนี้น่าจะเพียงพอที่นำมาวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมได้



ภาพที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างประชากรปาล์มน้ำมัน อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี

ตารางที่ 2 แสดงความแปรผันของพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมัน อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี ด้วยโปรแกรม Arlequin

Sample	Khokpho
Nucleotide diversity	0.3555 ± 0.2437
Haplotype diversity	0.9556 ± 0.0594

อย่างไรก็ตามมีการประยุกต์ใช้ของเทคนิคทางด้าน Microsatellite หรือ SSR ในการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในระดับสายพันธุ์จนถึงประชากร ในกลุ่มสายพันธุ์พืชที่มีคุณสมบัติในการผลิตน้ำมันเหมือนพืชตระกูลปาล์มน้ำมัน (Siripin and Jindasing, 2012) ได้นำเครื่องหมาย SSR มาทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสด ในปีเดียวกันมีรายงานการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์มะพร้าวด้วยเทคนิค ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) (นภาพร แก้วดวงดี และอนุชิตา แซ่ตั้ง, 2012) ปีค.ศ. 2014 มีการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนา และการประยุกต์ใช้เครื่องหมาย SSR บ่งบอกลักษณะจำเพาะทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันที่สามารถเจริญในพื้นที่ภูมิอากาศหนาวเย็นจากผลการศึกษาพบว่าเทคนิค เครื่องหมาย SSR นั้นสามารถบ่งบอกลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างของปาล์มน้ำมันที่สามารถเจริญในพื้นที่ภูมิอากาศหนาวเย็นเมื่อเปรียบเทียบกับปาล์มน้ำมันที่เจริญในเขตร้อนชื้น (Xiao et al., 2014) ต่อมาได้มีการศึกษาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ภายในสายพันธุ์ของพืชตระกูลปาล์มด้วยเทคนิคเครื่องหมาย SSR ซึ่งสามารถบ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์ *E.guineensis* และสายพันธุ์ *Phoenix dactylifera* (Xiao et al., 2016) มีรายงานการวิจัยที่ใช้เครื่องหมาย SSR ในการวิเคราะห์การจัดจำแนกทางพันธุกรรม และลักษณะโครงสร้างพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) เปรียบเทียบระหว่างพื้นที่ในประเทศจีน และมาเลเซีย (Zhou et al., 2015) จากงานที่กล่าวมาจะแสดงให้เห็นได้ว่าการใช้เครื่องหมาย Microsatellite สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและความแตกต่างภายในกลุ่มประชากรของปาล์มน้ำมันได้ แต่ควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมจากจำนวนพื้นที่เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายแสดงความแตกต่างของสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันในประเทศไทยได้

สรุป

การใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน โดยการทดสอบด้วยโปรแกรม 10 คู่ พบว่าการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยโปรแกรม MEGA ด้วยวิธี UPGMA และสร้างแผนภูมิ dendrogramในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมัน พบว่า จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Arlequin ค่า Nucleotide diversity และ Haplotype diversity จัดอยู่ในระดับสูงอาจจะบ่งชี้ได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างประชากรปาล์มน้ำมัน อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี มีความเสถียรภาพสูง และความแปรผันทางพันธุกรรมค่อนข้างคงที่

เอกสารอ้างอิง

- นภาพร แก้วดวงดี และอนุชิตา แซ่ตั้ง. (2555). ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์มะพร้าว. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์*, 12(1), 108-120.
- รอกีเยาะห์ เจ๊ะหลง ปรียา แก้วอ่อน และจาร์ นิคม. (2561). ศึกษาการประยุกต์ใช้เทคนิคเครื่องหมาย DNA ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันปลูกในพื้นที่อำเภอหนองจิก จังหวัดปัตตานี. *การประชุมวิชาการระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเครือข่ายภาคใต้ ครั้งที่ 3 ประจำปี 2561*.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- Siripin, S. & Jindasing, M. (2012). Genetics Diversity in Vegetable Soybean Cultivars by SSR Markers. *Agricultural Sci. J.*, 43(2)(Suppl.), 525-528.



- Tranbarger, T. J., Kluabmongkol, W., Sangrakru, D., Morcillo, F., Tregear, J. W., Tragoonrung, S. & Billotte, N. (2012). SSR markers in transcripts of genes linked to post-transcriptional and transcriptional regulatory functions during vegetative and reproductive development of *Elaeis guineensis*. *BMC Plant Biology*, 12, 1-11.
- Xiao, Y., Lixia, Z., Xia, W., Mason, A. S., Yang, Y., Ma, Z. & Peng, M. (2014). Exploiting transcriptome data for the development and characterization of gene-based SSR markers related to cold tolerance in oil palm (*Elaeis guineensis*). *BMC Plant Biology*. 14, 1-13.
- Xiao, Y., Xia, W., Ma, J., Mason, A. S., Fan, H., Shi, P., Lei, X., Ma, Z. & Peng, M. (2016). Genome-Wide Identification and Transferability of Microsatellite Markers between Palmae Species. *Front. Plant Sci.*, 7, 1-10.
- Zhou, L. X., Xiao, Y., Xia, W. & Yang, Y. D. (2015). Analysis of genetic diversity and population structure of oil palm (*Elaeis guineensis*) from China and Malaysia based on species-specific simple sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 16247-16254.