

การสร้างแผนที่พันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

The Construction of Genetic Linkage Maps of Oil Palm

(*Elaeis guineensis* Jacq.)

วิภาวี ชันโรจน์ กัลยรัตน์ ภูสุดแสง ขวัญใจ พิพัฒน์เจริญวงศ์ กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง

สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการสร้างแผนที่พันธุกรรมในปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) จากประชากรลูกผสม F_1 จำนวน 220 ต้น ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ Tenera สองพันธุ์ คือ clone B และ clone D วิเคราะห์แผนที่พันธุกรรมแบบ double pseudo-test cross โดยใช้เครื่องหมาย G-SSRs, EST-SSRs และ AFLP สร้างแผนที่ชนิดรวม (Integrated map) เชื่อมระหว่างแผนที่ clone B และ clone D โดยใช้เครื่องหมายที่มีจีโนไทป์แบบ intercross (เครื่องหมายโมเลกุลที่มีการกระจายตัวทั้งในพ่อและแม่) แผนที่พันธุกรรมที่ได้ประกอบไปด้วย G-SSRs จำนวน 116 เครื่องหมาย, EST-SSRs จำนวน 22 เครื่องหมาย และ AFLPs จำนวน 22 เครื่องหมาย จากจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด 160 เครื่องหมาย สร้างกลุ่มลิงค์เกจได้ 26 กลุ่ม รวมความยาวกลุ่มลิงค์เกจทั้งหมดได้ 1,285 cM ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายเฉลี่ย 8.1 cM ในแผนที่พันธุกรรมนี้มีเครื่องหมาย G-SSR มีตำแหน่งลิงค์กับลักษณะความหนาของกะลา ในระยะทาง 6.4 cM แผนที่พันธุกรรมที่สร้างได้นี้นำไปพัฒนาให้เป็นแผนที่พันธุกรรมที่มีความอึดตัว และสามารถใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับ QTLs ของลักษณะที่สนใจ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากกับการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

คำสำคัญ: แผนที่พันธุกรรม ปาล์มน้ำมัน SSR ลักษณะความหนาของกะลา

Abstract

Genetic linkage maps of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) were constructed based on 220 F_1 progenies derived from a cross between two Tenera palms, clone B and clone D. The double pseudo-test cross mapping strategy was applied using G-SSRs, EST-SSRs and AFLPs markers. The intercross markers (the markers

segregating in both parents) were used as bridges to align the two parent-specific genetic maps to produce an integrated map comprising 116 G-SSRs, 22 EST-SSRs and 22 AFLP markers. The 160 genetic markers were distributed on 26 linkage groups and covered 1,285 cM with an average spacing between two markers of 8.1 cM. A G-SSR marker was mapped at 6.4 cM from the *Sh* locus controlling shell-thickness phenotype. The map developed in this study provides an initial step in producing a saturated linkage map of the *Elaeis guineensis* and can be used for identification of QTLs associated with agronomic important traits in oil palm.

Keyword: genetic linkage map, oil palm, SSR, *Sh* locus

1. บทนำ

ปาล์มน้ำมันสปีชีส์ *Elaeis guineensis* Jacquin เป็นพืชยืนต้นใบเลี้ยงเดี่ยว มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 32 โครโมโซม โฮโมโลกัส โครโมโซมจำนวน 16 แท่ง ($2n=32$) เปลือกผลชั้นกลาง (mesocarp) และเมล็ด (kernel) ของปาล์มน้ำมันให้ผลผลิตน้ำมันสูงจึงเป็นพืชน้ำมันที่สำคัญชนิดหนึ่ง ลักษณะความหนาของกะลาสามารถแยกได้เป็น 3 แบบ คือ พันธุ์ Dura มีจีโนไทป์โฮโมไซกัสของแอลลีล Sh^+ ($Sh^+ Sh^+$) ผลปาล์มจะมีกะลาหนา, พันธุ์ Pisifera ควบคุมโดยจีโนไทป์โฮโมไซกัสแอลลีล Sh^- ($Sh^- Sh^-$) ผลปาล์มจะไม่มีกะลา และพันธุ์ Tenera ควบคุมโดยจีโนไทป์เฮเทอโรไซกัส ($Sh^+ Sh^-$) ผลปาล์มจะมีกะลาบาง เป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ Dura และพันธุ์ Pisifera แนวทางการศึกษาจีโนมปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาปาล์มพันธุ์ใหม่หรือเพื่อการถ่ายทอดลักษณะที่ดีที่ต้องการสู่พันธุ์ปาล์มที่ปลูกเป็นการค้า จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องศึกษาและเข้าใจจีโนมของปาล์มน้ำมัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล ข้อมูลแผนที่พันธุกรรมที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการประยุกต์ใช้ต่อการสืบหาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะ

(quantitative trait locus) และใช้เครื่องหมายดังกล่าวในโครงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

เครื่องหมาย SSR (simple sequence repeat; SSR หรือไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) คือ ลำดับเบสซ้ำที่มีจำนวนเบสในหนึ่งหน่วยซ้ำไม่มากนักตั้งแต่ 1-6 เบส เช่น $(A)_n$, $(CA)_n$, $(TAT)_n$, $(GATA)_n$ เป็นต้น เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำมีจำนวนตั้งแต่ไม่กี่ซ้ำจนถึงจำนวนหลายสิบซ้ำ ไมโครแซทเทลไลท์ที่พบกระจายทั่วไปในจีโนมสิ่งมีชีวิตยูคาริโอท อัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างจีโนไทป์มีค่อนข้างสูง เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำเพาะตำแหน่ง (locus-specific marker) เป็นวิธีการวิเคราะห์จีโนไทป์ที่มีประสิทธิภาพ และแสดงจีโนไทป์แบบข่มร่วม (co-dominant) แต่มีข้อจำกัดในขั้นตอนการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ค่อนข้างยุ่งยากสิ้นเปลืองเวลา และเสียค่าใช้จ่ายสูง [1] สำหรับสิ่งมีชีวิตบางสปีชีส์ที่มีข้อมูลลำดับเบสเป็นจำนวนมากในฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ โดยเฉพาะลำดับเบสของยีนที่เกิดการแสดงออกหรือลำดับเบสดีเอ็นเอจากจีโนม การพัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR (expressed sequence tag-simple sequence repeat) สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเหล่านั้น

จากฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ คุณสมบัติที่สำคัญของเครื่องหมาย EST-SSR คือ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลต่อยีนที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลอีกชนิดหนึ่งที่นิยมคือ AFLP (amplified fragment length polymorphism) [2] เป็นการการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลแบบหลายตำแหน่ง (multi-locus markers) ในคราวเดียวกัน โดยอาศัยหลักการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด (มีตำแหน่งจดจำ 4 และ 6 bp) และเชื่อม adapter ที่เป็นดีเอ็นเอสายสั้นเข้ากับปลายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสอง และใช้ primers ที่สามารถจับกับ adapter โดยครอบคลุมถึงชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1, 2 หรือ 3 สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ซึ่งได้แถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมเป็นจำนวนมากและอ่านจีโนไทป์แบบข่มสมบูรณ (dominant) สามารถใช้เพิ่มความหนาแน่นของแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล

ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาพันธุศาสตร์พื้นฐานของปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล 3 ชนิด คือ 1) เครื่องหมาย G-SSR (genomic-SSR) 2) เครื่องหมาย EST-SSR (Expressed sequence tag-SSR) และ 3) เครื่องหมาย AFLP เพื่อสร้างแผนที่พันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน ข้อมูลแผนที่พันธุกรรมที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการประยุกต์ใช้ต่อการสืบหาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจของปาล์มน้ำมัน เช่น ความหนาของกะลา

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 ประชากรลูกผสม

ในงานวิจัยนี้ใช้ประชากรลูกผสม F_1 จำนวน 220 ต้น อายุ 4 ปี ที่เกิดจากการผสมระหว่าง clone B (แม่พันธุ์) และ clone D (พ่อพันธุ์) เป็นปาล์มน้ำมันชนิด Tenera ทั้งสองพันธุ์ ตัวอย่างปาล์มน้ำมันทั้งหมดนี้ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก บริษัท โกลเด็นท์ เทอเนร่า จำกัด นำตัวอย่างไปปาล์มน้ำมัน มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) [3]

2.2 เครื่องหมายโมเลกุล G-SSR

นำดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันมาวิเคราะห์เครื่องหมาย G-SSR (ใช้รหัสเครื่องหมาย GSSR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากงานวิจัย Billotte และคณะ [4] ซึ่งมีจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมด 256 คู่ และไพรเมอร์ที่ได้จากสถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (ใช้รหัสเครื่องหมาย GSSRb) จำนวน 215 คู่

2.3 เครื่องหมาย EST-SSR

นำดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันมาวิเคราะห์เครื่องหมาย EST-SSR (ใช้รหัสเครื่องหมาย ESSR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากงานวิจัยของ Pipatchartlearnwong [5] ซึ่งใช้ฐานข้อมูล PalmGenes (<http://palmoilis.mpob.gov.my/palmgenes.html>) และข้อมูลจากการหาลำดับเบส EST โดย จากสถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ทำการออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด 326 คู่ไพรเมอร์

องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 20 μ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 10 นาโนกรัม (ng), 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร (μ l), $MgCl_2$ 25 มิลลิโมลาร์ (mM), dNTPs 2.0 มิลลิโมลาร์ (mM), ไพรเมอร์แต่ละไพรเมอร์ 0.25 ไมโครโมลาร์ (μ M) และเอนไซม์ Tag DNA polymerase 1 ยูนิต อุณหภูมิใน

การทำพีซีอาร์ ประกอบด้วย อุณหภูมิ denature ที่ 95 °C นาน 1 นาที และ 94 °C นาน 3 นาที ตามด้วยรอบ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 35 รอบ ที่ 94 °C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ตามความเหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่ นาน 1 นาที 30 วินาที อุณหภูมิ extension °C นาน 30 วินาที และ final elongation 72 °C นาน 5 นาที ตรวจสอบโพลีเมอร์พีซีเอ็มใน polyacrylamide gel electrophoresis 6% และ ย้อม ด้วยซิลเวอร์ไนเตรทจากนั้นอ่านผลและวิเคราะห์ การกระจายตัวในประชากรลูกผสมปลาแม่น้ำมัน

2.4 เครื่องหมายโมเลกุล AFLP

นำดีเอ็นเอปลาแม่น้ำมันมาวิเคราะห์ เครื่องหมาย AFLP ตามวิธีการของ Vos และคณะ [2] ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *MseI* เชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter ทำปฏิกิริยา PCR 2 รอบ คือ preselective PCR ใช้ไพรเมอร์ *EcoRI* + 1 (E-A) คู่กับ ไพรเมอร์ *MseI* + 1 (M-C) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ 30 รอบที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 56 °C เป็นเวลา 60 วินาที และ 72 °C เป็น เวลา 60 วินาที และ selective PCR ใช้ไพรเมอร์ *EcoRI* + 3 (E-ANN) คู่กับ ไพรเมอร์ *MseI* + 3 (M-CNN) จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ ทำปฏิกิริยา touch down PCR ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 65 °C เป็น เวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 60 วินาที จำนวน 12 รอบ แต่ละรอบจะลดอุณหภูมิ annealing จาก 65 °C ลงรอบละ 0.7 °C หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 56 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 60 วินาที จำนวน 23 รอบ ตรวจสอบโพลีเมอร์พีซีเอ็มใน polyacrylamide gel electrophoresis 6% และย้อม DNA ด้วย Silver nitrate จากนั้นอ่านผลและวิเคราะห์การกระจายตัวใน ประชากรลูกผสมปลาแม่น้ำมัน

2.5 ลักษณะความหนาทะเลา (Sh)

เก็บข้อมูลฟีโนไทป์ของลักษณะความหนา ของทะเลาจากประชากรลูกผสม F_1 ที่เกิดจากการผสม ข้ามระหว่างพันธุ์ Tenera สองพันธุ์ คือ clone B X clone D จำนวน 220 ต้น การกระจายตัวของลักษณะ ความหนาทะเลา คือ หนา (Dura) : ปานกลาง (Tenera) : ไม่มีทะเลา (Pecifera) ทดสอบอัตราส่วน 1:2:1 โดยใช้สถิติ Chi-square ที่ความเชื่อมั่น $P=0.05$

2.6 การวิเคราะห์จีโนไทป์

เครื่องหมาย GSSRs, ESSRs และ AFLPs ในประชากรลูกผสมปลาแม่น้ำมันทั้งหมด รวมทั้ง ลักษณะความหนาทะเลา ถูกนำมาวิเคราะห์การ การกระจายตัวเพื่อดูความสอดคล้องกับการกระจายตัว ของเมนเดล จีโนไทป์ $ab \times aa$ หรือ $ao \times oo$ มี อัตราส่วน 1:1, จีโนไทป์ $aa \times ab$ หรือ $oo \times ao$ มี อัตราส่วน 1:1, จีโนไทป์ $ao \times ao$ มีอัตราส่วน 3:1, จี โนไทป์ $ab \times ab$ มีอัตราส่วน 1:2:1 และจีโนไทป์ $ab \times cd$ หรือ $ab \times ac$ มีอัตราส่วน 1:1:1:1 ทดสอบค่าสถิติ โดย Chi-square ที่ความเชื่อมั่น $P=0.05$

2.7 การตั้งชื่อเครื่องหมายโมเลกุล

ตั้งชื่อเครื่องหมายโมเลกุลโดยใช้จำนวน แอลลิล ในแต่ละเครื่องหมาย ตามด้วย B, D หรือ X โดยที่ B คือมีอัตราส่วน 1:1 มีจีโนไทป์แบบ 1 แอล ลิล $ao \times oo$ หรือมีจีโนไทป์แบบ 2 แอลลิล $ab \times aa$, D คือมีอัตราส่วน 1:1 มีจีโนไทป์แบบ 1 แอลลิล $oo \times ao$ หรือมีจีโนไทป์แบบ 2 แอลลิล $aa \times ab$ และ X คือมี อัตราส่วนแบบ 3:1 มีจีโนไทป์แบบ 1 แอลลิล $ao \times ao$ 3:1, อัตราส่วน 1:2:1 มีจีโนไทป์แบบ 2 แอลลิล $ab \times ab$ หรืออัตราส่วนแบบ 1:1:1:1 มีจีโนไทป์แบบ 3 แอลลิล $ab \times ac$ และมีจีโนไทป์แบบ 4 แอลลิล $ab \times cd$ ตามด้วยชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลและรหัส ของคู่ไพรเมอร์ ตัวอย่างเช่น 3XGSSR3886 เป็น

เครื่องหมาย G-SSR ที่มี 3 แอลลิล จีโนไทป์แบบ ab x ac และรหัสไพรเมอร์ 3886

2.8 การวิเคราะห์ linkage และการสร้างแผนที่พันธุกรรม

สร้างแผนที่พันธุกรรมใช้การวิเคราะห์แบบ double pseudo-test cross [6] ขั้นแรกคือการสร้างแผนที่พันธุกรรมใน Clone B และ Clone D ด้วยโปรแกรม JoinMap Version 3.0 [7] โดยกำหนดค่า LOD score ต่ำสุดที่ 4.0 ตรวจสอบความถูกต้องการจัดลำดับเครื่องหมายโมเลกุล ระหว่างแผนที่ของ clone B และ clone D จากนั้นสร้างแผนที่รวม (Integrated map) เชื่อมโยงระหว่างแผนที่ clone B และ clone D โดยใช้เครื่องหมายที่มีจีโนไทป์แบบ intercross (ชนิด X) กำหนดค่า LOD score ต่ำสุดที่ 4.0, recombination fraction (r) ที่ 0.35, ระยะทางระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลใช้ mapping function แบบ Kosambi function, การจัดลำดับเครื่องหมาย กำหนดค่า jump น้อยกว่า 2 และ ripple มากกว่า 3 เปรียบเทียบความถูกต้องการจัดลำดับเครื่องหมายโมเลกุลระหว่างแผนที่รวม และแผนที่พ่อแม่วิเคราะห์ขนาดประมาณจีโนมด้วยวิธีการของ Hulbert และคณะ [8] $G = N(N-1) X/K$ โดยที่ N คือ จำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่สร้างแผนที่พันธุกรรม, X คือ ระยะเฉลี่ยระหว่างสองเครื่องหมายโมเลกุล และ K คือ จำนวนของ two point linkage

3.ผลการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ เครื่องหมาย GSSR จำนวน 256 คู่ไพรเมอร์, เครื่องหมาย GSSRb จำนวน 215 คู่ไพรเมอร์,

เครื่องหมาย EST-SSR จำนวน 326 คู่ไพรเมอร์ และ เครื่องหมาย AFLP จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ ได้ เครื่องหมายที่มีโพลิมอร์ฟิซึมระหว่าง clone B, clone D และประชากรลูกจำนวน 10 ต้น จำนวน 217 เครื่องหมาย ประกอบด้วย GSSRs จำนวน 143 เครื่องหมาย, GSSRbs จำนวน 18 เครื่องหมาย, ESSRs จำนวน 29 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย AFLPs 27 เครื่องหมาย นำเครื่องหมายทั้งหมด 217 เครื่องหมาย วิเคราะห์การกระจายตัวในประชากรลูกที่เหลือ 220 ต้น ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงผลการกระจายตัวสอดคล้องกับการกระจายตัวของเมนเดล (Chi-square, $P < 0.05$) ทั้งหมด 191 เครื่องหมาย ประกอบด้วย GSSRs จำนวน 124 เครื่องหมาย, GSSRbs จำนวน 17 เครื่องหมาย, ESSRs จำนวน 23 เครื่องหมาย และ AFLPs จำนวน 27 เครื่องหมาย (ตารางที่ 1) มี เครื่องหมายโมเลกุลที่กระจายตัวตาม clone B ที่มี อัตราส่วน 1:1 จีโนไทป์แบบ ao x oo จำนวน 7 เครื่องหมาย คิดเป็น 3.7%, จีโนไทป์แบบ ab x aa จำนวน 34 เครื่องหมาย คิดเป็น 17.8%, และจีโนไทป์แบบ ab x cc จำนวน 3 เครื่องหมาย คิดเป็น 1.6% เครื่องหมายโมเลกุลที่กระจายตัวตาม clone D ที่มี อัตราส่วน 1:1 จีโนไทป์แบบ oo x ao จำนวน 14 เครื่องหมาย คิดเป็น 7.3%, จีโนไทป์แบบ aa x ab จำนวน 26 เครื่องหมาย คิดเป็น 13.6% และจีโนไทป์แบบ cc x ab จำนวน 3 เครื่องหมาย คิดเป็น 1.6% เครื่องหมายโมเลกุลที่พ่อแม่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ทั้งคู่ มีอัตราส่วน 3:1 จีโนไทป์แบบ ao x ao จำนวน 30 เครื่องหมาย คิดเป็น 15.7%, อัตราส่วน 1:1:1:1 จีโนไทป์แบบ ab x ac จำนวน 39 เครื่องหมาย คิดเป็น 20.4%, จีโนไทป์แบบ ab x cd จำนวน 9 เครื่องหมาย คิดเป็น 4.7% และอัตราส่วน 1:2:1 จีโนไทป์แบบ ab x ab จำนวน 26 เครื่องหมาย

คิดเป็น 13.6% รวมถึงลักษณะความหนาทะเลา มีอัตราส่วน 1:2:1 ในการกระจายตัว คือ หนา (Dura) : ปานกลาง (Tenera) : ไม่มีทะเลา (Pisifera) จำนวน 41:127:52 เครื่องหมาย SSRs ส่วนใหญ่ที่วิเคราะห์ได้ ปรากฏตำแหน่งเดียวในจีโนม ยกเว้น 7 คู่ไพร์เมอร์ GSSR0268, GSSR0446, GSSR2409, GSSRb078,

GSSRb040, GSSRb159 และ ESSR0607 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่เกิด ปรากฏสองตำแหน่งในจีโนม (duplicated loci) มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 26 เครื่องหมาย แสดงผลการกระจายตัวไม่สอดคล้องกับการกระจายตัวของเมนเดล (distorted markers)

ตารางที่ 1 แสดงการวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากรลูกผสม F_1 จำนวน 220 ต้น ของเครื่องหมาย G-SSR ที่พัฒนาจากการวิจัยของ Billotte และคณะ [5] เครื่องหมาย G-SSR ที่ได้จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เครื่องหมาย EST-SSR และเครื่องหมาย AFLP

Code	Segregating marker alleles	Segregation ratio	Parent genotypes B x D	Number of segregating marker loci in the cross			
				G-SSR	EST-SSR	AFLP	Total
1B	1 allele	1:1	ao x oo	1	1	5	7
1D		1:1	oo x ao	2	2	10	14
1X		3:1	ao x ao	15	3	12	30
2B	2 alleles	1:1	ab x aa	29	5	-	34
2D		1:1	aa x ab	22	4	-	26
2X		1:2:1	ab x ab	21	5	-	26
3B	3 alleles	1:1	ab x cc	3	-	-	3
3D		1:1	cc x ab	3	-	-	3
3X		1:1:1:1	ab x ac	36	3	-	39
4X	4 alleles	1:1:1:1	ab x cd	9	-	-	9
total				141	23	27	191

3.2 การวิเคราะห์ลิ้งค์เกจและการสร้างแผนที่พันธุกรรม

สร้างแผนที่พันธุกรรมของ clone B และ clone D โดยใช้เครื่องหมาย G-SSRs, EST-SSRs และ AFLPs แผนที่พันธุกรรมของ clone B ประกอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 118 เครื่องหมาย จำแนกเป็นเครื่องหมาย G-SSRs, EST-SSRs, AFLPs จำนวน 94, 16 และ 8 เครื่องหมายตามลำดับ ได้ลิ้งค์เกจจำนวน 20 กลุ่ม รวมความยาวแผนที่ทั้งหมด 1,086 cM กลุ่มลิ้งค์เกจมีความยาวเฉลี่ย 54.3 cM ลิ้งค์เกจมีขนาด

ตั้งแต่ 5.9 ถึง 116.6 cM ประมาณขนาดของจีโนมด้วยวิธีด้วยวิธีของ Hulbert และคณะ [8] เท่ากับ 1,294 cM มีเครื่องหมายโมเลกุล 22 เครื่องหมาย คิดเป็น 12.2% ที่แสดงผลการกระจายตัวไม่สอดคล้องกับการกระจายตัวของเมนเดล (distorted markers) (ตารางที่ 2) พบเครื่องหมาย 2BGSSRb192 มีตำแหน่งใกล้เคียงที่ควบคุมลิ้งค์เกจความหนาทะเลา 6.4 cM

แผนที่พันธุกรรมของ clone D มีเครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 128 เครื่องหมาย จำแนกเป็นเครื่องหมาย G-SSRs, EST-SSRs และ AFLPs

จำนวน 97, 15 และ 16 เครื่องหมายตามลำดับ ได้ลิงค์
 เกจ 20 กลุ่ม รวมความยาวแผนที่ทั้งหมด 1,105 cM
 กลุ่มลิงค์เกจมีความยาวเฉลี่ย 44.2 cM ลิงค์เกจมีขนาด
 ตั้งแต่ 5.9 ถึง 133.3 cM ประมาณขนาดของจีโนม
 ด้วยวิธีด้วยวิธีของ Hulbert และคณะ [8] 1,360 cM มี
 เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 21 เครื่องหมาย คิดเป็น
 12.1% ที่แสดงผลการกระจายตัวไม่สอดคล้องกับการ
 กระจายตัวของเมนเดล (distorted markers; ตารางที่ 2)
 การเรียงลำดับเครื่องหมายโมเลกุลในแผนที่ clone B
 และ clone D มีบางลิงค์เกจที่เรียงเครื่องหมายโมเลกุล
 สลับตำแหน่งกันโดยส่วนใหญ่เครื่องหมายโมเลกุลที่
 มีการกระจายตัวแบบ 3:1 มีจีโนไทป์ ao x ao จะ
 ครอบคลุมการจัดลำดับของเครื่องหมายโมเลกุล เช่น
 กลุ่มลิงค์เกจที่ 9 ของ clone B ต้องตัดเครื่องหมาย
 1XEagtMcta53 ออก การเรียงลำดับเครื่องหมาย
 โมเลกุลจึงสอดคล้องกับกลุ่มลิงค์เกจที่ 13 ของ clone
 B

การสร้างแผนที่รวม ใช้เครื่องหมายที่มีจีโน
 ไทป์แบบ Intercross (1X, 2X, 3X และ 4X) ใน clone
 B และ clone D เป็นเครื่องหมายเชื่อมโยงระหว่าง
 แผนที่ clone B และ clone D จากเครื่องหมายโมเลกุล
 ทั้งหมด 191 เครื่องหมาย (G-SSRs 141 เครื่องหมาย,
 EST-SSRs 23 เครื่องหมาย และ AFLPs 27
 เครื่องหมาย) สร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลชนิด
 แผนที่รวม ได้ลิงค์เกจจำนวน 26 กลุ่ม (รูปที่ 1) พบ
 เครื่องหมายที่วิเคราะห์กลุ่มลิงค์เกจได้มีจำนวน 158
 เครื่องหมาย ประกอบด้วย G-SSRs 116 เครื่องหมาย,
 EST-SSRs 22 เครื่องหมาย และ AFLPs 20
 เครื่องหมาย รวมความยาวแผนที่ได้ 1,285 cM
 ค่าเฉลี่ยของระยะห่างระหว่างสองเครื่องหมาย
 โมเลกุลเท่ากับ 8.1 cM ความยาวลิงค์เกจตั้งแต่ 5.9 cM
 ถึง 113.4 cM ประมาณขนาดของจีโนมด้วยวิธีด้วยวิธี

ของ Hulbert และคณะ [8] ได้ 1,527 cM มี
 เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 26 เครื่องหมาย คิดเป็น
 11.9% ที่แสดงผลการกระจายตัวไม่สอดคล้องกับการ
 กระจายตัวของเมนเดล (distorted markers; ตารางที่ 2)
 และเครื่องหมาย 2BGSSRb192 (กลุ่มลิงค์เกจที่ 3) มี
 ตำแหน่งใกล้เคียงกับลักษณะความหนาเกาะลามากที่สุด ใน
 ระยะทาง 6.4 cM (รูปที่ 1)

ตารางที่ 2 แสดงผลการสร้างแผนที่พันธุกรรมของ
 clone B, clone D และ Integrated

	Code	Clone B	Clone D	Integrated
		map	map	map
Initial number of segregating loci		181	174	218
Number of mapped loci				
G-SSR:				
Parent specific loci of type:	1B	1	-	1
	1D	-	1	2
	2B	25	-	25
	2D	-	21	14
	3B	3	-	3
	3D	-	-	1
Bridge loci of type:	1X	7	10	9
	2X	21	21	21
	3X	31	33	33
	4X	6	7	7
EST-SSR:				
Parent specific loci of type:	1B	1	-	1
	1D	-	2	2
	2B	4	-	4
	2D	-	5	4
	3B	-	-	-
	3D	-	2	-
Bridge loci of type:	1X	3	2	3
	2X	5	5	5
	3X	3	3	3
AFLP:				
Parent specific loci of type:	1B	2	-	2
	1D	-	7	8
Bridge loci of type:	1X	6	9	10
Total:		118	128	158
Linkage analysis LOD threshold		4.0	4.0	4.0

	Code	Clone B	Clone D	Integrated
		map	map	map
Number of linkage groups		20	25	26
Unlinked markers		30	19	33
Unmapped markers (distorted)		22	21	26
Map length (cM)		1,086	1,105	1,285
Estimated genome size ^a (cM)		1,294	1,360	1,527
Linkage group average length (cM)		54.3	44.2	49.4
Marker density		9.1	8.6	8.1

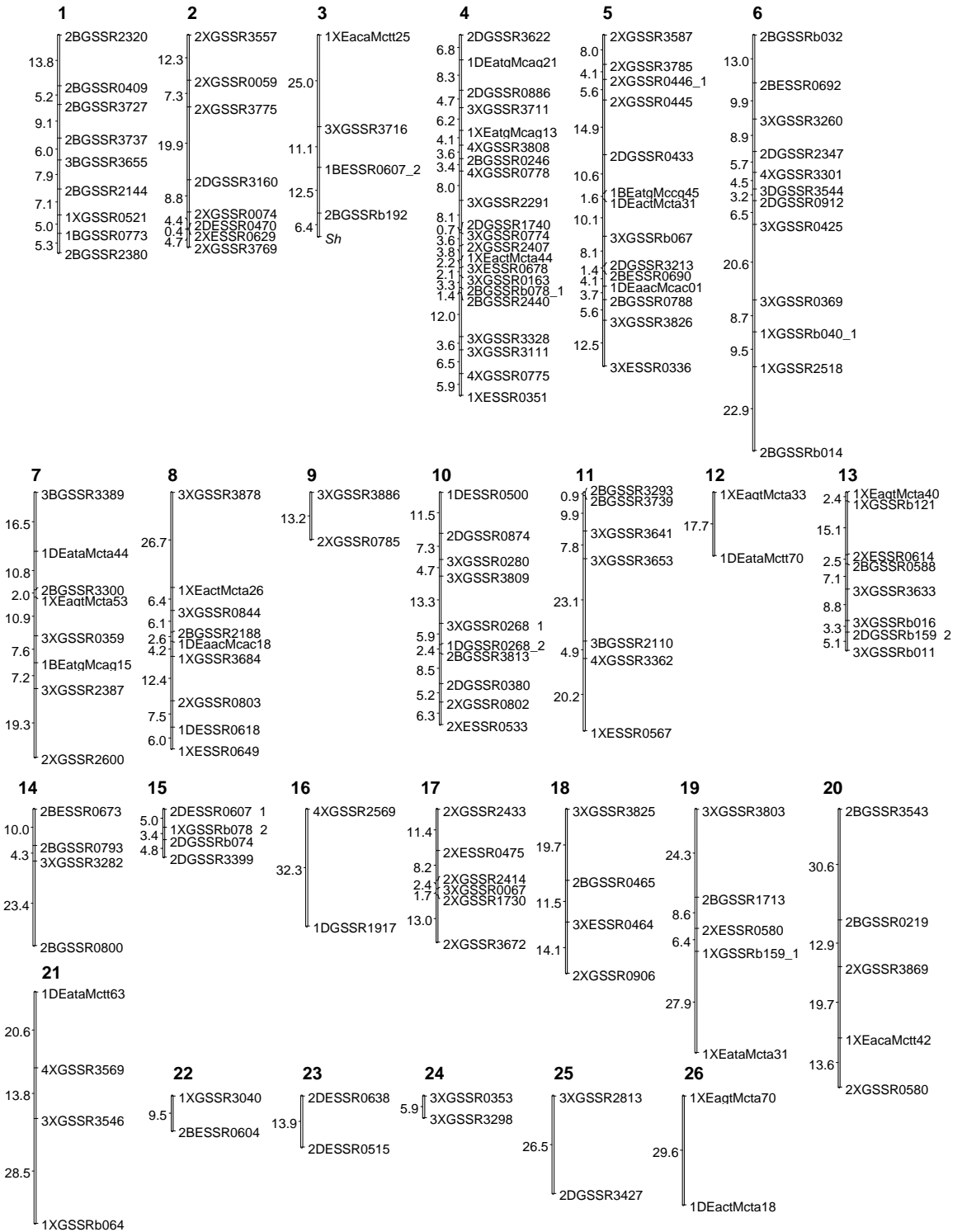
^aAccording to Hulbert และคณะ [8]

4. การวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการสร้างแผนที่พันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq) ที่มีมาก่อนหน้านี้ ได้แก่ การสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล RAPD ของปาล์มน้ำมัน [9] ใช้ประชากรลูกผสม F_1 ระหว่าง Tenera และ Pisifera และได้เครื่องหมาย RAPD ที่ลิงก์กับลักษณะกลาของผลปาล์ม 2 เครื่องหมาย ซึ่งมีตำแหน่งขนานทั้งสองข้างของลักษณะความหนาของกลา ในระยะห่าง 17.5 และ 23.9 cM ตามลำดับ งานวิจัยของ Rance และคณะ [10] สร้างแผนที่ RFLP ในการวิเคราะห์หา QTLs ของลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ประชากรลูกผสม F_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของปาล์มพันธุ์ A137/30 เครื่องหมาย RFLP ที่ใช้ในการสร้างแผนที่นี้มีทั้งชนิดข่มร่วม (codominant) มีการกระจายตัวแบบ 1:2:1 และชนิดข่มสมบูรณ์ (dominant) มีการกระจายตัวแบบ 3:1 และแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลของปาล์มน้ำมันที่ถือว่าละเอียดเป็นแผนที่เครื่องหมาย SSR และ AFLP ที่สร้างจากการผสมระหว่างพันธุ์ Tenera (LM2T) กับพันธุ์ Dura (DA10D) (Billotte และคณะ [4])

จากการเปรียบเทียบอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมโดยการใช้อัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมโดยการใช้เครื่องหมาย SSR จากไพรเมอร์ชุดเดียวกันที่พัฒนาจากงานวิจัยของ Billotte และคณะ [4] พบว่าอัตราโพลิมอร์ฟิซึมในงานวิจัยของ Billotte และคณะ [4] มีประมาณ 65.6% ขณะที่งานวิจัยนี้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมประมาณ 48.4% แสดงให้เห็นว่างานวิจัยนี้มีจำนวนเครื่องหมาย G-SSR ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมน้อยกว่าทั้งนี้สาเหตุหนึ่งอาจเนื่องจาก clone B และ clone D ซึ่งเป็นชนิด Tenera ทั้งคู่ มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมมากกันมากกว่าชนิด Tenera กับ Dura ที่ใช้ในการงานวิจัยของ Billotte และคณะ [4] เหตุผลที่โครงการวิจัยนี้ได้เลือกใช้ประชากรลูกผสมนี้ เนื่องจากในการสร้างประชากรลูกผสมของปาล์มน้ำมัน เพื่อการศึกษา QTL ต้องใช้ระยะเวลาการสร้างนาน 4-5 ปี ถึงสามารถเก็บข้อมูลได้ ขณะที่ประชากรลูกผสมนี้เป็นประชากรที่สร้างขึ้นมาก่อนแล้ว ลูกผสมมีอายุ 4 ปี ซึ่งเป็นช่วงอายุที่เหมาะสมกับการเริ่มโครงการวิจัยการวิเคราะห์ QTL ประกอบกับประชากรลูกผสมนี้มีพ่อแม่ที่มีลักษณะแตกต่างกันในอัตราส่วนดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักในการหาเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับ QTL ของลักษณะนี้

แผนที่ปาล์มน้ำมันที่สร้างได้ในงานวิจัยนี้ประกอบด้วยลิงค์เกจจำนวน 26 กลุ่ม รวมความยาวแผนที่ได้ 1,285 cM ความหนาแน่นเฉลี่ย 8.1 cM เทียบกับแผนที่ปาล์มน้ำมันของ Billotte และคณะ [4] ที่ได้ลิงค์เกจ 16 กลุ่มเท่ากับโฮโมโลกัสโครโมโซมปาล์มน้ำมัน ($2n=32$) และรวมความยาวแผนที่ได้ 1,743 cM ความหนาแน่นเฉลี่ย 1.8 cM แสดงว่าแผนที่ปาล์มน้ำมันที่สร้างได้ในงานวิจัยนี้ยังมีความหนาแน่นไม่อึดตัว เนื่องจากจำนวนกลุ่มลิงค์เกจที่วิเคราะห์ได้ไม่เท่ากับโฮโมโลกัสโครโมโซมปาล์ม



รูปที่ 1 แผนที่พันธุกรรมรวมของปาล์มที่สร้างจากประชากรลูกผสม F1 จำนวน 220 สายพันธุ์ที่เกิดจากการผสมระหว่าง clone B และ clone D โดยใช้เครื่องหมายจำนวน 158 เครื่องหมาย (G-SSRs 116 เครื่องหมาย, EST-SSRs

22 เครื่องหมาย และ AFLPs 20 เครื่องหมาย) วิเคราะห์ลิงเกจโดยกำหนดค่า LOD score ต่ำสุดที่ 4.0 recombination fraction (r) ที่ 0.35 ระยะทางระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลใช้ mapping function แบบ Kosambi function

น้ำมัน (16) ถ้าทำการทดลองต่อโดยการเพิ่ม ช่องว่างระหว่างเครื่องหมายจำนวนคู่ไพรเมอร์ SSR เพื่อใช้ในการสร้างแผนที่ และเพิ่มจำนวนคู่ไพรเมอร์ AFLP เพื่อใช้ในการเติมจะช่วยลดระยะห่างระหว่างสองเครื่องหมายโมเลกุลและเชื่อมกลุ่มลิงค์เกจเข้าด้วยกันให้มีจำนวนกลุ่มลิงค์เกจเท่ากับจำนวน โฮโมโลกัสโครโมโซม

ในการทดลองนี้พบเครื่องหมาย G-SSR คือ 2BGSSRb192 (กลุ่มลิงค์เกจที่ 3) มีตำแหน่งใกล้เคียงกับลักษณะความหนากระดาษ ในระยะทาง 6.4 cM เป็นระยะทางที่ค่อนข้างห่างและมีเพียงเครื่องหมายเดียว ถ้าต้องการหาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งใกล้เคียงมากขึ้นและเป็นเครื่องหมายขนานข้างลักษณะความหนากระดาษ ระหว่างเครื่องหมาย 2BGSSRb192 สามารถใช้วิธี BSA (Bulked Segregant Analysis) ของเครื่องหมาย AFLP ก็จะสามารถหาดำแหน่งเครื่องหมายที่ระยะทางใกล้เคียงมากขึ้นและขนานข้างลักษณะความหนากระดาษซึ่งจะนำไปใช้ในการคัดเลือกลักษณะกระดาษของปาล์มน้ำมันได้

จากแผนที่รวม (Integrated map) กลุ่มลิงค์เกจที่ 4, 10 และ 13 มีการเรียงตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลสลับกันเมื่อเทียบกับตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลในแผนที่ clone B และ clone D อาจเนื่องมาจากเกิด mutation บนโครโมโซมในลักษณะแบบ inversion หรืออาจเกิดจากการคำนวณลิงค์เกจที่ไม่แม่นยำและเมื่อนำเครื่องหมาย G-SSR ในแต่ละกลุ่มลิงค์เกจของแผนที่รวม (Integrated map) เทียบกับแผนที่ของ Billotte และคณะ [4] เครื่องหมาย G-SSR มีการเรียงลำดับเครื่องหมายโมเลกุลใน

ตำแหน่งเดียวกันและอยู่ในกลุ่มลิงค์เกจเดียวกัน เช่น กลุ่มลิงค์เกจที่ 6 (รูปที่1) กับ กลุ่มลิงค์เกจที่ 3 (LG3) ของ Billotte และคณะ [4] แต่มีบางกลุ่มลิงค์เกจที่มีการเรียงลำดับของเครื่องหมายโมเลกุลแตกต่างกัน เช่น กลุ่มลิงค์เกจที่ 10 (รูปที่1) กับ กลุ่มลิงค์เกจที่ 1 (LG1) ของ Billotte และคณะ [4] แผนที่พันธุกรรมของปาล์มน้ำมันที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปเทียบกับแผนที่พันธุกรรมของปาล์มน้ำมันที่ใช้ประชากรลูกผสมอื่นได้ (comparative mapping) และสามารถใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะ QTLs ที่สนใจ

5.กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Powell, W., Machray, G.C., and Provan, J., Polymorphism Revealed by Simple Sequence Repeat, Trends Olant Sci., Vol.1, pp. 215-221, 1996.
- [2] Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting., Nucleic Acids Res., Vol. 23, pp. 4407-4414, 1995.

- [3] Gawel NL. and Jaret RL., A Modified CTAB DNA Extraction Procedure of Musa and Lpomeoa., Plant Mol. Bio. Rpt., Vol. 9, pp. 262-266, 1991.
- [4] Billotte N., Marseillac N., Risterucci A-M., Adon B., Brottier P., Baurens F-C., Singh R., Herra A., Asmady H., Billot C., Amblard P., Durand-Gasselin T., Courtois B., Asmono D., Cheah S.C., Rohde W., Ritter E., Charrier A., Microsatellite-based High Density Linkage Map in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theor. Appl. Genet., Vol. 110, pp. 754–765, 2005.
- [5] Pipatchartlearnwong K., Tragoonrung S., Tangphatsarnruang S., Ukoskit K., Development and Characterization of EST-SSR Markers in Oil Palm (*Elaeis guineensis*). ABIC: Agricultural Biotechnology for Better Living and a Clean Environment., p. 212, 2009.
- [6] Grattapaglia D., Sederoff R., Genetic Linkage Maps of Eucalyptus grandis and Eucalyptus urophylla Using a Pseudo-Testcross Mapping Strategy and RAPD Markers., Genetics Vol. 137, pp. 1121–1137, 1994.
- [7] Stam, P., Johan, W. van Ooijen., JoinMap™ Version 3.0 : Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps., CIP-DTA KONINKLIJKE, DEN HAAG: Piet Stam and Johan W. Van Ooijen., 1995.
- [8] Hulbert SH., Ilott TW., Legg EJ., Lincoln SE., Lander ES., Michelmore.RW., Genetic Analysis of the Fungus *Bremia Lactucae* Using Restriction Fragment Length Polymorphisms., Genetics Vol. 148, pp.479–494, 1988.
- [9] Moretzsohn M.C., Nunes C.D.M., Ferreira M.E., Grattapaglia D., RAPD Linkage Mapping of the Shell Thickness Locus in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theor. Appl. Genet., Vol. 100, pp. 63–70, 2000.
- [10] Rance K.A., Mayes S., Price Z., Jack P.L., Corley R.H.V., Quantitative Trait Loci for Yield Components in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theor. Appl. Genet., Vol. 103, pp. 1302–1310, 2001.