สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์และเทคนิคอาร์เอพีดี

IDENTIFICATION OF OIL PALM (*Elaeis guineensis* Jacq.) USING ISOZYME AND RAPD TECHNIQUE

คณะผู้ดำเนินงานวิจัย

รศ.ดร. อารมย์ ศรีพิจิตต์

อ. อรอุมา รุ่งน้อย

ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
SB
299
.R3
อ6H85
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 50804
วัน, เดือน, ปี 21 พ.ค. 2547
b11346450
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดีต้องขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ได้สนับสนุนเงินทุนในการวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการวิจัยในครั้งนี้

รศ.ดร. อารมย์ ศรีพิจิตต์
อ.อรอุมา รุ่งน้อย
ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Accordingly the problem of oil palm seedling (*Elaeis guineenis* Jacq.) that planted in Thailand was not real Tenera cultivars and yield of them was too low. The method for testing the cultivars of oil palm seedling are very important. The method to solve this problem is using isozyme technique and random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique.

The suitable isozyme technique consisted of isozyme extraction from the young leaf of oil palm by using buffer that contained of isozyme extraction from the young leaf of oil palm by using buffer that contained 0.1Mm pH 7.5, 0.5% β -mercaptoethanol, 10% glycerol, 5% tween20 and 2% pvp and then centrifuge at 14,000 rpm for 20 minutes. Then separate isozyme by electrophoresis using polyacrylamide at 12 percent were used for malate dehydrogenase and esterase.Banding pattern from two enzyme systems can be classified only each cultivars but can't be classified for F_1 between Dura 064 No.33 and Pisifera 116 No. 339.

The suitable RAPD technique consisted of genomic DNA extraction from the young leaf by using SDS buffer (Dellaporta *et al.*, 1983).From 32 samples of oil palm, RAPD generated by 14 out of 100 different 10-mer oligonucleotide primer gave 81 discriminate banding. The average size of the amplified DNA fragements ranged from 0.35-1.7 kb. The polymorphism of those DNA profile evaluated by NTSYS-pc 2.02j was analyzed. The phylogenetic tree devided oil palm into 4 groups including group1 : Dura 064 No.33,F_1 (Dura 064 No.33 x Pisifera 116 No.339) 14 samples and unkown cultivars (similarity coefficient (SC = 0.76-0.97) ; group2: Pisifera 425 and Pisifera 427 (SC=0.76); group3: Dura 588 and Dura 671 (SC=0.67); and group4: Pisifera 116 No.339, Dura 589 and 7 unknown cultivars (SC=different). The RAPD technique was proved as a useful technique for identification of oil palm cultivars.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญภาพ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	9
ผลการทดลอง	21
วิจารณ์ผลการทดลอง	55
สรุปผลการทดลอง	62
บรรณานุกรม	64
ภาคผนวก	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	รูปแบบ malate dehydrogenase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมัน	21
2	รูปแบบ esterase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมัน	22
3	รูปแบบ peroxidase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมัน	22
4	รูปแบบ glucose-6-phosphate dehydrogenase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมัน	23
5	รูปแบบ malate dehydrogenase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมัน	23
6	รูปแบบ esterase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมัน	24
7	รูปแบบ malate dehydrogenase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมันซึ่งสกัดด้วยบัฟเฟอร์ 5 ชนิด	25
8	รูปแบบ malate dehydrogenase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมันซึ่งทำการแยกเอนไซม์บนเจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (ก) และ 8.5 เปอร์เซ็นต์ (ข)	26
9	ผลการตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากบัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบต่างกัน	27
10	ผลการตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบต่างกัน 4 ระดับ	28
11	ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	29
12	ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ dNTPs ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	30
13	ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	31
14	ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่ระดับต่างๆ	31
15	ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบของปาล์มน้ำมันที่ระดับต่างๆ	32
16.	ผลการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	33
17.	ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของอะกาโรสเจลที่ระดับต่างๆ ในการตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์	33
18	ผลการเปรียบเทียบความต่างศักย์ไฟฟ้าซึ่งใช้ในขั้นตอนการทำอิเล็คโตรโฟรีซีส	34
19	ผลการเปรียบเทียบระยะเวลาในการย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์	35
20	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPA11	38
21	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPA17	39
22	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC07	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC08	41
24	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC15	42
25	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPD01	43
26	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPD03	44
27	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPD12	45
28	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE01	46
29	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE16	47
30	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE17	48
31	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE19	49
32	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPF07	50
33	ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPF08	51
34	phylogenetic tree ที่ได้จากการใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.02j ของปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง	53
35	phylogenetic tree ที่ได้จากการใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.02j ของปาล์มน้ำมัน 16 ตัวอย่าง	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชนิดและองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์จากใบอ่อนปาล์มน้ำมัน	17
2	แสดงชนิดและองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	18
3	แสดงชนิดไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 100 ชนิดของบริษัท Operon Technology	19
4	แสดงชนิดของไพรเมอร์และลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละชนิดที่ทำการคัดเลือกเพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี	36
5	แสดงลำดับเบส จำนวน และขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ 14 ชนิดกับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทางภาคใต้ ปลูกมากในจังหวัดกระบี่, สุราษฎร์ธานี, ชุมพร, สตูล และตรัง ตามลำดับ พื้นที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันใน 5 จังหวัดนี้คิดเป็นร้อยละ 95.5 ของพื้นที่การเพาะปลูกปาล์มน้ำมันทั้งหมดของประเทศ ในปี พ.ศ. 2540 มีอยู่ประมาณ 1,097,000 ไร่ ผลผลิตทะลายปาล์มสดเท่ากับ 2,681,000 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 2,445 กิโลกรัมต่อไร่ สร้างรายได้ให้กับเกษตรกร 5,817.8 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2541) ปัจจุบันความต้องการปาล์มน้ำมันเพื่อนำมาใช้ในด้านอุตสาหกรรมเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี และผลผลิตที่ได้ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศทำให้ต้องนำเข้าน้ำมันปาล์มดิบจากต่างประเทศในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก เนื่องจากผลผลิตเฉลี่ยของปาล์มน้ำมันต่อพื้นที่ของไทยยังคงต่ำเมื่อเทียบกับผลผลิตปาล์มน้ำมันของมาเลเซียและอินโดนีเซียซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าหลายเท่า ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนดังกล่าวจึงต้องมีการขยายพื้นที่ปลูกและพัฒนาศักยภาพในการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น

ปัจจุบันพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่นิยมปลูกเพื่อเป็นการค้าในประเทศไทย คือพันธุ์เทเนรา (Tenera) ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ดูรา (Dura) ที่ใช้เป็นต้นแม่ในการผสมข้ามกับต้นพ่อคือพันธุ์พิสิเฟอรา (Pisifera) ให้พันธุ์ลูกผสมเทเนราชั่วที่ 1 ซึ่งรวบรวมลักษณะที่ดีเด่นของพ่อและแม่ไว้ เช่น มีทะลายมาก, ลักษณะผลขนาดใหญ่, เมล็ดมีกะลาบาง, ชั้น Mesocarp หนา และให้น้ำมันสูงถึง 22 - 24 เปอร์เซ็นต์ จากลักษณะที่ดีของพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนราทำให้มีความต้องการใช้ต้นกล้าเพื่อนำมาปลูกสูง แต่เกษตรกรมักประสบปัญหาเกี่ยวกับเมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้าที่ซื้อมาไม่ตรงตามพันธุ์ที่ต้องการ ซึ่งเกิดจากเมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้าเหล่านั้นไม่ใช่พันธุ์ลูกผสมเทเนรา หรือเกิดจากการนำเมล็ดที่เกิดจากลูกผสมเทเนราชั่วที่ 1 หรือลูกผสมชั่วอื่น ๆ มาปลูก ทำให้ได้ผลผลิตต่ำและไม่เป็นที่ต้องการของโรงงานรับซื้อ ปัญหาดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้ามการเก็บเมล็ดที่เกิดจากต้นลูกผสมชั่วแรกมาปลูกจะทำให้มีการกระจายของลักษณะที่ไม่ดีต่าง ๆ ปรากฏออกมา

จากปัญหาดังกล่าวทำให้เกษตรกรประสบปัญหาเกี่ยวกับการขาดแคลนต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่จะนำมาใช้ปลูกเพื่อขยายพื้นที่การผลิต เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว จึงได้มีการทดลองนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้ตรวจสอบพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้ตรงกับความต้องการของเกษตรกรซึ่งจะทำให้เกษตรกรสามารถผลิตปาล์มน้ำมันที่มีคุณภาพและให้ผลผลิตสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวิธีการจำแนกพ่อแม่พันธุ์และลูกผสมปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ (isozyme) และอาร์เอพีดี (RAPD)

ตรวจเอกสาร

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้นที่จัดอยู่ในตระกูลปาล์ม (Family Palmae) พันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้ามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Elaeis guineensis* Jacq. มีชื่อสามัญคือ African oil palm มีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (ทรงยศ ตันพิพัฒน์. 2529) ดังต่อไปนี้

1. ราก รากเกิดขึ้นตรงฐานโคนของลำต้นเป็นระบบรากแขนง (adventitious root system) ในต้นปาล์มน้ำมันที่เจริญเติบโตเต็มที่จะมีรากแขนงทั้งหมด 4 พวก คือ รากชุดแรก (primary roots) เกิดตรงโคนลำต้นมีขนาดใหญ่ที่สุด (เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 – 10 มิลลิเมตร) ส่วนใหญ่เจริญตามแนวนอนอาจจะยาวออกไปไกล 15 – 20 เมตร อีกส่วนหนึ่งจะเจริญไปตามแนวลึก รากชุดที่สอง (secondary roots) เป็นรากที่แตกแขนงจากรากชุดแรกรากพวกนี้มีการเจริญเติบโตสองลักษณะเช่นเดียวกับพวกแรก ส่วนรากชุดที่สาม (tertiary roots) และสี่ (quaternary roots) จะเป็นรากที่แตกแขนงมาจากรากชุดที่สองมีหน้าที่ดูดธาตุอาหารมาเลี้ยงลำต้น

2. ลำต้น ลำต้นมีลักษณะเป็นต้นเดี่ยวตั้งตรงรูปทรงกระบอก มีเนื้อเยื่อเจริญเฉพาะตรงปลายยอด ซึ่งในระยะ 2 - 3 ปีแรกจะช่วยในการเจริญเติบโตทางด้านกว้าง หลังจากนั้นแล้วจึงจะมีการเจริญทางด้านความสูงเรื่อยไปประมาณ 25 - 50 เซนติเมตร ต่อปี ลำต้นถูกปกคลุมด้วยตอใบเรียงตัวกันเป็นเกลียวโดยรอบไม่มีกิ่งก้านสาขา

3. ใบ เป็นใบประกอบเรียกว่า even pinnately compound leaves ประกอบด้วยก้านทาง (rachis) และใบย่อย (leaflet) ความยาวของทางปาล์มน้ำมันอาจยาวถึง 7.5 เมตร ที่โคนก้านทางจะมีหนามแหลมคมเรียกว่า spine ซึ่งเกิดจากการหลุดร่วงของใบย่อยเหลือแต่เส้นกลางใบ (mid rib) หักติดอยู่กับทั้งสองข้างของโคนทางเป็นระยะหนึ่งส่วนสี่ของความยาวทาง ทางปาล์มน้ำมันจะอยู่ติดกับลำต้นนานถึง 20 ปี ใบย่อยมีลักษณะเรียวยาว สีเขียวเข้ม เส้นใบขนานกัน เส้นกลางใบอยู่กลางแผ่นใบ ใบย่อยมี cuticle หนา เมื่อปาล์มน้ำมันมีอายุมากขึ้นทางใบแต่ละทางจะมีใบย่อยประมาณ 250-300 ใบ การเกิดของใบหรือทางปาล์มน้ำมันจะเกิดจากตายอดปาล์มน้ำมันที่มีอายุ 5-6 ปี อัตราการเกิดทางปาล์มน้ำมันประมาณ 30-40 ทางต่อปี การเรียงตัวของใบมี 2 แบบคืออาจเรียงตัวแบบเวียนซ้าย (left hand phyllotaxy) หรือเรียงตัวแบบเวียนขวา (right hand phyllotaxy)

4. ดอก ปาล์มน้ำมันเป็นพืชพวก monoecious คือมีช่อดอกตัวผู้ (male inflorescence) และช่อดอกตัวเมีย (female inflorescence) แยกกันอยู่คนละช่อบนต้นเดียวกัน การเกิดช่อดอกของปาล์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมันจะเริ่มขึ้นเมื่อปาล์มน้ำมันอายุ 2-3 ปีหลังจากปลูก ช่อดอกจะเกิดจากตาดอกซึ่งอยู่ตรงซอกโคนก้านใบทุกใบใช้เวลาพัฒนาจนถึงดอกบานประมาณ 33 - 34 เดือน ช่อดอกที่เกิดขึ้นมาใหม่จะถูกหุ้มด้วยกาบหุ้มช่อดอกซึ่งจะเปิดออก 6 - 8 สัปดาห์ก่อนดอกบาน ช่อดอกชนิดต่าง ๆ นั้นมีลักษณะ ดังนี้

4.1 ช่อดอกเพศผู้ ประกอบด้วยช่อดอกย่อย (spikelet) ที่มีลักษณะเรียวยาวคล้ายนิ้วมือ แต่ละอันยาวประมาณ 12 - 20 เซนติเมตร เรียงอยู่บนแกนกลางช่อดอก แต่ละช่อดอกย่อยจะมีดอกตัวผู้เล็ก ๆ เกิดโดยรอบประมาณ 600 - 2,000 ดอก เวลาดอกบานจะเห็นเป็นสีเหลืองอ่อน กลิ่นหอม จะบานออกจากโคนมายังปลายช่อใช้เวลา 2 - 3 วัน ช่อดอกทั้งช่อจะให้เกสรตัวผู้ประมาณ 25 - 50 กรัม

4.2 ช่อดอกเพศเมียเป็นแบบ spike หรือ spadix ยาวประมาณ 24 - 45 เซนติเมตร ประกอบด้วยช่อดอกย่อยซึ่งมีใบประดับที่ยาวปลายแหลม (spinous bract) เรียงเป็นเกลียวบนแกนช่อดอกใหญ่ ช่อดอกย่อยที่อยู่ตรงกลางแกนจะมีดอกตัวเมียประมาณ 12 - 30 ดอก และจะมีน้อยลงทางโคนและปลายแกนของช่อ ทั้งช่อดอกจะมีดอกตัวเมียทั้งสิ้นหลายพันดอก เมื่อดอกพร้อมที่จะผสมจะเห็นยอดเกสรตัวเมีย (stigma) ซึ่งมี 3 แฉก มีสีขาวหรือเหลืองอ่อน แถบแดงเคลือบด้วยเมือกเหนียว ๆ เมื่อพ้นระยะนี้แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีแดงและม่วง

4.3 ช่อดอกผสมหรือกะเทย ช่อดอกประเภทนี้คือช่อดอกที่มีช่อดอกย่อยทั้งเพศผู้และเพศเมียอยู่ในช่อดอกเดียวกัน เกิดขึ้นในบางโอกาสเท่านั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่ปาล์มน้ำมันเริ่มผลิตช่อดอกใหม่ๆ (อายุประมาณ 3-4 ปี) โดยทั่วไปช่อดอกย่อยเพศเมียจะอยู่บริเวณส่วนกลางและช่อดอกย่อยเพศผู้จะอยู่ทางส่วนโคนและปลายของช่อดอกใหญ่ ช่อดอกประเภทนี้เป็นลักษณะที่ไม่พึงประสงค์เพราะจะให้ผลผลิตต่ำ

5. ผล ผลปาล์มน้ำมันจะสุกแก่สามารถเก็บเกี่ยวได้หลังจากดอกตัวเมียได้รับการผสมจากเกสรตัวผู้แล้วประมาณ 5-6 เดือน การสุกแก่ของผลปาล์มในฤดูฝนจะสุกแก่เร็วกว่าผลที่เจริญเติบโตในฤดูแล้ง ปาล์มที่มีอายุเต็มที่แล้วสามารถจะให้ผลประมาณ 1,600 ผลต่อทะลาย ผลปาล์มน้ำมันเป็นแบบ drupe ประกอบด้วยเปลือกชั้นนอก (exocarp) เปลือกชั้นกลางหรือกาบ (mesocarp) ซึ่งเป็นส่วนที่มีน้ำมันทั้งสองส่วนเรียกรวมกันว่า pericarp และชั้นในสุดเป็นกะลา (endocarp) ถัดจากส่วนนี้ไปก็เป็นส่วนของเมล็ดซึ่งประกอบด้วย เนื้อในเมล็ด (kernel หรือ endosperm) ซึ่งมีน้ำมันอยู่เช่นกัน และส่วนของคัพภะ (embryo) ผลและเมล็ดของปาล์มน้ำมันเป็นส่วนที่มีความสำคัญที่สุดเพราะเป็นส่วนที่ให้น้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (ทรงยศ ตันพิพัฒน์. 2529)

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันนิยมใช้ลักษณะต่างๆของผลเป็นเกณฑ์ในการจำแนกเช่น ลักษณะของกะลา (shell) กลีบหุ้มผล สีของผลก่อนสุกและปริมาณน้ำมันในชั้น mesocarp พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจควรมีลักษณะดังนี้คือ

1. มีอายุยาวนานและให้ผลผลิตสูง

2. มีชั้นของเปลือก (mesocarp) และเนื้อในเมล็ด (kernel) ซึ่งเป็นส่วนที่มีน้ำมันอยู่ควรมีความหนาและกะลาควรจะบาง

3. sex ratio สูงคือมีอัตราส่วนเปอร์เซ็นต์ช่อดอกตัวเมียต่อช่อดอกที่เกิดขึ้นทั้งหมดในแต่ละต้นในรอบปีสูง

4. มีอัตราการผลิตทางใบในรอบปีสูง เพราะการผลิตทางใบ 1 ทางจะมีการผลิตช่อดอก 1 ช่อ ดังนั้นเมื่ออัตราการผลิตทางใบสูงจะทำให้การผลิตช่อดอกสูงตามไปด้วย

5. ขนาดของลำต้นใหญ่และเตี้ย (dumpy) ลักษณะเช่นนี้ทำให้สะดวกในการดูแลรักษาและการเก็บเกี่ยวผลผลิต

พันธุ์ปาล์มน้ำมันในปัจจุบันสามารถจำแนกได้ 4 พันธุ์ (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2523)

1. มาโครกายา(Macrocaya) ปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้มีกะลาหนาประมาณ 6-8 มิลลิเมตรหรือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผลทั้งหมด ชั้นของ mesocarp บางจึงทำให้ปริมาณน้ำมันในผลต่ำ ปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้ไม่เหมาะที่จะปลูกเป็นการค้า

2. ดูรา (Dura) ปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้มีชั้นของ mesocarp หนาปานกลางหรือประมาณ 35-55 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผลทั้งหมดและมีน้ำมันประมาณ 17-18 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผลทั้งหมด กะลาหนาปานกลางประมาณ 25-55 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผลทั้งหมด เนื้อในเมล็ดมีขนาดใหญ่ประมาณ 7-20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผลทั้งหมด ปัจจุบันนิยมใช้เป็นต้นแม่ในการปรับปรุงพันธุ์ปลูกเป็นการค้า

3. พิสิเฟอรา (Pisifera) ปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้มีกะลาบางมากชั้น mesocarp หนากว่าพันธุ์ดูรา เนื้อในเมล็ดน้อยแต่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง นอกจากนี้ยังมี sex ratio สูงกว่าพันธุ์ดูราแต่ปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้มักจะผลิตช่อดอกตัวเมียที่เป็นหมัน และก่อนที่ผลจะสุกมักจะเน่าก่อนเสมอ ส่วนต้นที่เป็นหมันส่วนใหญ่มักจะเจริญเติบโตทางลำต้นจึงไม่เหมาะที่จะนำมาปลูกเป็นการค้า นักปรับปรุงพันธุ์นิยมใช้ปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้เป็นพ่อพันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการค้า

4. เทเนรา (Tenera) ปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างปาล์มน้ำมันพันธุ์พิสิเฟอรากับพันธุ์ดูรา ลักษณะที่ดีของปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้ได้แก่มีกะลาบางประมาณ 0.5-4 มิลลิเมตรหรือประมาณ 1-32 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผลทั้งหมด ชั้น mesocarp มีความหนาตั้งแต่ปานกลางจนถึงหนามากประมาณ 60-90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักทั้งหมดและมีน้ำมันประมาณ 22-24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผลทั้งหมด นอกจากนี้ยังมี sex ratio และจำนวนทะลายมากกว่าพันธุ์ดูราจากคุณสมบัติที่ดีของพันธุ์นี้จึงนิยมปลูกเป็นการค้า

หลักการตรวจสอบพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

ไอโซไซม์ (isozyme) หรือไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) หมายถึง เอนไซม์ที่มีรูปร่างโมเลกุลหลายแบบ แต่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันในสิ่งมีชีวิตเดียวกัน ซึ่งไอโซไซม์มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ, ระยะการเจริญเติบโต และชนิดของสิ่งมีชีวิต (Markert and Moller, 1959) การศึกษาไอโซไซม์เพื่อการจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคอิเล็คโตรโฟรีซีส (electrophoresis technique) อาศัยหลักการที่สำคัญ คือ ไอโซไซม์เป็นสายโพลีเปปไทด์ (polypeptides) ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโน (amino acid) เรียงกันอยู่ ลำดับของกรดอะมิโนนี้จะแปลมาจากรหัสพันธุกรรม(gene)บนสายนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) ไอโซไซม์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนแตกต่างกันจะมีประจุสุทธิ, ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลแตกต่างกันเมื่อนำไอโซไซม์มาแยกบนตัวกลางที่เหมาะสมด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟรีซีส ซึ่งเป็นการแยกอนุภาคซึ่งมีประจุในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของเอนไซม์จะเคลื่อนที่ในอัตราที่ต่างกันและหลังจากทำการย้อมสีด้วยปฏิกิริยาจำเพาะสำหรับไอโซไซม์แต่ละชนิดก็จะเห็นแถบสีของเอนไซม์รูปแบบต่างๆ แถบสีที่ปรากฏนี้เรียกว่า รูปแบบของไอโซไซม์ (isozyme pattern) ซึ่งไอโซไซม์ที่มีประจุสุทธิมากกว่าจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าไอโซไซม์ที่มีประจุสุทธิน้อยกว่า (Doehlert and Duke, 1983) อนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก อัตราการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับความเข้มในสนามไฟฟ้า และจำนวนประจุไฟฟ้ารวมของอนุภาค การเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันนั้นจึงเป็นผลโดยตรงจากลักษณะพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Crawford, 1983) ดังนั้นการใช้ไอโซไซม์เพื่อเป็นเครื่องหมายทางเคมี (chemical marker) สำหรับการจำแนกพันธุ์พืชจึงเป็นสิ่งจำเป็น การใช้เทคนิคอิเล็คโตรโฟรีซีสนี้ใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชได้หลายชนิดโดยในพืชที่มีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงหรือใกล้เคียงกันมากก็สามารถใช้รูปแบบไอโซไซม์มาช่วยในการพิจารณาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ให้ชัดเจนขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับงานด้านปรับปรุงพันธุ์พืชได้โดยใช้เป็นเครื่องหมายที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่และลูก ซึ่งช่วยให้การคัดเลือกพันธุ์พืชได้ผลถูกต้องแน่นอนส่งผลให้แผนงานการปรับปรุงพันธุ์มีประสิทธิภาพมากขึ้น มีการศึกษาในพืชหลายชนิด ได้แก่ การจำแนกลูกผสมของ ท้อ (*Prunus* L. *Batsch*) สามารถใช้รูปแบบของเอนไซม์ malate dehydrogenase ได้ (Arulsekar *et al.*, 1986a) นอกจากนี้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชอีกหลายชนิดยังสามารถใช้รูปแบบของไอโซไซม์ที่สกัดจากใบช่วยในการศึกษาต้นเพศผู้และเพศเมียแยกจากกันได้ซึ่งปกติต้องใช้เวลาหลายปีจึงจะทราบว่าพืชชนิดนั้นๆ เป็นต้นเพศผู้หรือเพศเมียจึงช่วยให้การวางแผนงานปรับปรุงพันธุ์เกิดประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ได้มีการศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ในพืชเพื่อจำแนกพันธุ์พืชอีกหลายชนิด ได้แก่ ท้อ(Mowrey *et al.*, 1990),ลิ้นจี่ (ชัยวัฒน์ ยัพวัฒนพันธ์ และเกศิณี ระมิงค์วงศ์, 2542), มะม่วง (ปุณฑริกา หะรินสุต, 2534), ไผ่ (อัญชลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถ, 2536), หมากสง (ชวนพิศ อรุณรังสิกุล และคณะ, 2538) และปาล์มน้ำมัน (วิไลวรรณ โชติเกียรติ และอมรรัตน์ พงศ์ดารา, 2538)

หลักการตรวจสอบพันธุ์พืชโดยเทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA;RAPD)

ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคต่าง ๆ ในการหาความสัมพันธ์ และการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยความแตกต่างในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ ได้แก่ restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Soller and Beckman, 1983) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) (Nyborn *et al.*, 1990) และ RAPD (William *et al.*, 1990 ; Welsh and McClelland, 1990) เทคนิคเหล่านี้ทำให้เห็นความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งช่วยในการบ่งชี้และจัดจำแนกพันธุ์ได้ ชิ้นดีเอ็นเอถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนหรือเครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular marker) ของลักษณะใดลักษณะหนึ่ง โดยใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการตรวจและใช้ประโยชน์จากการเกิดความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (polymorphism) ในการจำแนกพันธุ์พืชชนิดนั้น ๆ

เทคนิคอาร์เอพีดีหรือที่เรียกสั้น ๆ ว่า Rapid ซึ่งใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชเป็นวิธีการที่นิยมมากในปัจจุบันเนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็ว สามารถทำการตรวจสอบพืชได้หลายชนิดโดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่เจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitary primer) จึงสามารถนำมาใช้กับพืชได้ทุกชนิด โดยไม่ต้องใช้โพรบ (probe) ที่เฉพาะเจาะจงกับพืชแต่ละชนิดและสามารถตรวจสอบได้ทั้งจีโนม (genome) ของพืชซึ่งมีระดับของ polymorphism สูงทำให้สามารถประเมินการกระจายตัวทางพันธุกรรมของพืชที่นำมาศึกษาได้ (พรพันธุ์ ภู่พร้อมพันธุ์, 2537)

William *et al.*, (1990) ได้คิดค้นเทคนิคอาร์เอพีดีขึ้น โดยอาศัยหลักการที่ว่าสารพันธุกรรม (DNA) ของพืชจะมีการเรียงตัวของลำดับเบสแตกต่างกันในพืชแต่ละพันธุ์ ได้แก่ adenine (A) thymine (T) guanine (G) และcytosine (C) ซึ่งเบสแต่ละตัวจะเป็นคู่สมกัน โดย A จับคู่กับ T และ C จับคู่กับ G เมื่อนำ DNA ของพืชที่จะทำการตรวจสอบมาเพิ่มปริมาณในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction แล้วนำมาทดสอบโดยวิธีทางอิเล็คโตรโฟรีซีส ตรวจสอบการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบ DNA ในตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างซึ่งเรียกว่าเป็น polymorphism กัน หมายถึงพันธุกรรมของตัวอย่างทั้งสองมีความแตกต่างกัน ใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชหลายชนิด ได้แก่ พืชตระกูลกะหล่ำ ข้าว และถั่วเหลือง ฯลฯ (Yu *et al.*, 1993)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR)

Saiki *et al.*, (1985) ได้เสนอผลงานการค้นพบเทคนิคพีซีอาร์ เทคนิคนี้ได้นำความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ 1.) การทำให้ดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่แยกตัวออกเป็นสายเดี่ยว (DNA template denature) 2.) การเข้าคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นต้นแบบ (primer annealing) 3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อออกไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากส่วนของไพรเมอร์ (primer extension) โดยทั้ง 3 ขั้นตอนจะใช้อุณหภูมิแตกต่างกันดังนี้คือ ขั้นตอน DNA template denature ใช้อุณหภูมิประมาณ 90 – 95 องศาเซลเซียส ขั้นตอน primer annealing ใช้อุณหภูมิ 40 – 60 องศาเซลเซียส ขั้นตอน primer extension ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเมื่อทำซ้ำจำนวนหลายรอบจะทำให้มีการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอจากเดิมได้อย่างทวีคูณแบบ exponential โดยมีผลผลิตที่เป็นจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ คำนวณได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) ถ้าปฏิกิริยาพีซีอาร์มีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์ การทำซ้ำจำนวน 30 รอบจะได้ผลผลิตเป็นจำนวนชิ้นดีเอ็นเอเป็นล้านชิ้น นับตั้งแต่ได้มีการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ก็ได้มีการประยุกต์ใช้ในเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยนำไปดัดแปลงให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์หนึ่งในวิธีต่าง ๆ ที่ประยุกต์ใช้และอยู่ในความนิยมคือการทำเครื่องหมายระดับโมเลกุลโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ข้อดีของวิธีนี้ก็คือทำได้ง่าย รวดเร็วต้องการดีเอ็นเอปริมาณน้อย และไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี เทคนิคอาร์เอพีดีมีประโยชน์ในแง่ประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์พืช, การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร, การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ และใช้ศึกษาตัวอย่างที่มีจำนวนมากซึ่งสามารถทำได้ในเวลารวดเร็ว

เทคนิคอาร์เอพีดี

เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิคพีซีอาร์ ทำได้โดยการสุ่มใช้ไพรเมอร์ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ เพียงหนึ่งไพรเมอร์ โดยทั่วไปไพรเมอร์สายสั้นจะเกาะกับดีเอ็นเอบนโครโมโซมได้หลายตำแหน่ง และใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างสุ่มจากดีเอ็นเอแม่แบบที่ซับซ้อน โดยไพรเมอร์ที่เกาะกับดีเอ็นเอในทิศทางตรงกันข้าม และห่างกันในระยะหนึ่งทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนได้จำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์จะขึ้นกับความยาวของไพรเมอร์ ขนาดของจีโนม และตำแหน่งการเกาะของไพรเมอร์บนจีโนม ไพรเมอร์ที่ใช้ในพืชส่วนใหญ่มีความยาว 8 – 10 นิวคลีโอไทด์ สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่แตกต่างกัน 2 – 10 ขนาด ไพรเมอร์ที่ใช้ต้องมีลำดับเบสแบบสุ่มมีปริมาณ G+C 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นอย่างน้อย และมี inverted repeat ภายในน้อย (บุรชัย สนธยานนท์, 2536) การใช้ไพรเมอร์ 1 ไพรเมอร์ในการทำให้เกิดลายพิมพ์จากจีโนมที่ซับซ้อนโดยไพรเมอร์ที่ใช้นั้นไม่จำเป็นต้องทราบลำดับมาก่อน วิธีนี้เรียกว่า arbitary primer PCR (AP-PCR) (Welsh and McClelland, 1990) ผลผลิตที่เกิดขึ้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟรีซีสแล้วทำการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตซึ่งจะเห็นความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอเป็นรูปแบบได้แตกต่างกันซึ่งเรียกว่าการเกิด polymorphism การเกิด polymorphism เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะหรือจากการเปลี่ยนแปลงซึ่งจะไปเปลี่ยนแปลงขนาด หรือป้องกันการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย เช่นการเกิด insertion, deletion และ invertion ชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ที่ได้สามารถตรวจพบได้ค่อนข้างน้อย และผลผลิตที่เกิดขึ้นแต่ละอันจะแสดงออกถึง 1 อัลลีล (allele) ต่อ โลคัส (locus) ในการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ผลผลิตที่เพิ่มจำนวนได้จะถูกถ่ายทอดในรูปของ dominant marker (Waugh and Powell, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคอาร์เอพีดีนี้ถูกนำมาใช้ได้อย่างกว้างขวางในการตรวจหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากแหล่งรวบรวมพันธุ์พืช ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้ใช้คาดคะเนความแปรปรวนของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชชนิดเดียวกัน และสามารถใช้ตรวจสอบจีโนมพืชได้ (Thormann *et al.*, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. วัสดุพืชที่ใช้ในการตรวจสอบพันธุ์

ปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง ซึ่งได้แก่พันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33, พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339, ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, พันธุ์ดูรา 588, พันธุ์ดูรา 589, พันธุ์ดูรา 671, พันธุ์พิสิเฟอรา 425, พันธุ์พิสิเฟอรา 427, พันธุ์ลูกผสม เทเนราเบอร์ 62 (F62) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่จำนวน 10 ต้น

2. วัสดุสารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกพันธุ์โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

2.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ประกอบด้วย

1. tris(hydroxymethyl)aminomethane [$C_4 H_{11} NO_3$]
2. polyvinylpyrrolidone (pvp) [$C_6H_9NO]_n$
3. β - mercaptoethanol [C_2H_6OS]
4. polyoxyethylene-20-sorbitan monolaurate (tween20)
5. glycerol [$C_3H_8O_3$]
6. triton x-100 [$C_{34}H_{62}O_{11}$]
7. sucrose [$C_{12}H_{22}O_{11}$]
8. ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลประกอบด้วย

1. acrylamide [C_3H_5NO]
2. N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (temed) [$C_6H_{16}N_2$]
3. N,N'-methylene bisacrylamide [$C_7H_{10}NO_3$]
4. tris(hydroxymethyl)aminomethane [$C_4H_{11}O_2N_2$]
5. ammonium persulfate [$(NH_4)_2S_2O_8$]

2.1.3 สารเคมีที่ใช้เป็นอิเลคโทรดบัฟเฟอร์

1. tris(hydroxymethyl)aminomethane [$C_4H_{11}NO_3$]
2. glycine [$C_2H_5NO_2$]
3. disodium ethylenediamine tetraacetic acid [$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 2H_2O$]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 สารเคมีที่ใช้เป็นสีย้อมเจล

1. sodium phosphate monobasic [$Na_2H_2PO_4H_2O$]
2. potassium phosphate monobasic anhydrous [KH_2PO_4]
3. fast blue RR salt [$2C_{15}H_{14}ClN_3O_3ZnCl_2$]
4. α - naphthyl acetate [$C_{12}H_{10}O_2$]
5. β - naphthyl acetate [$C_{12}H_{10}O_2$]
6. ethanol [C_2H_5OH]
7. sodium acetate trihydrate [$CH_3COONa\ 3H_2O$]
8. α - naphthyl acid phosphate [$C_{10}H_8O_4PNa$]
9. β - naphthyl acid phosphate [$C_{10}H_8O_4PNa$]
10. magnesium chloride hexahydrate [$MgCl_2H_2O$]
11. acetone
12. 3 - amino - 9 – ethylcarbazole [$C_{14}H_{14}N_2$]
13. β - napthol [$C_{10}H_8O$]
14. hydrogenperoxide [H_2O_2]
15. DL malic acid [$C_4H_6O_5$]
16. β - nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) [$C_{21}H_{27}O_{14}N_7P_2\ 3H_2O$]
17. nitro blue tetrazolium chloride (NBT) [$C_{40}H_{30}N_{10}O_6C_{12}$]
18. N- methylphenazonium methosulfate (PMS) [$C_{14}H_{14}N_2O_4S$]
19. thiazoyl blue tetrazolium bromide (MTT) [$C_{18}H_{16}W_5SBr$]
20. disodium ethylenediamine tetraacetic acid [$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2\ 2H_2O$]
21. sodium hydroxide [NaOH]
22. DL lactic acid [$C_3H_6O_3$]
23. glucose – phosphate disodium salt [$C_6H_{11}O_9PNa_2$]
24. β - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)
    [$C_{21}H_{26}O_{17}N_7P_3Na_2\ 3H_2O$]
25. L- glutamic acid [$C_5H_9NO_4$]
26. D- sorbital [$C_6H_{14}O_6$]
27. hypoxanthine (6-hydroxypurine) [$C_5H_4N_4O$]
28. sodium chloride [NaCl]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม marker dye solution ประกอบด้วย

1. bromophenol blue [$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$]
2. xylene cyanol FF [$C_{25}H_{27}N_2O_7S_2Na$]
3. glycerol [$C_3H_8O_3$]

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกพันธุ์โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1. tris(hydroxymethyl)aminomethane [$C_4H_{11}NO_3$]
2. disodium ethylenediamine tetraacetic acid [$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2\,2H_2O$]
3. cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) [$C_{19}H_{42}NBr$]
4. sodium chloride [NaCl]
5. sodium dodecyl sulphate (SDS) [$C_{12}H_{25}NaO_4S$]
6. isoamyl alcohol [$C_5H_{11}OH$]
7. polyvinylpyrrolidone [$(C_6H_9NO)_n$]
8. ethanol (C_2H_5OH)
9. potassium acetate [$C_2H_3O_2K$]
10. isopropyl alcohol [C_3H_8O]
11. phenol [C_6H_5OH]
12. chloroform [$CHCl_3$]
13. sodium acetate [CH_3COONa]
14. Rnase solution
15. β - mercaptoethanol [C_2H_6OS]
16. ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

1. agarose
2. sodium hydroxide [NaOH]
3. disodium ethylenediamine tetraacetic acid [$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2\,2H_2O$]
4. ethidium bromide [$C_{21}H_{20}BrN_3$]
5. 100 base pair DNA ladder marker
6. boric acid [H_3BO_3]
7. bromophenol blue [$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$]
8. sucrose [$C_{12}H_{22}O_{11}$]
9. xylene cyanol FF [$C_{25}H_{27}N_2O_7S_2Na$]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

1. PCR buffer (10 X buffer) DyNAzyme ของบริษัท Finnzyme
2. สารละลาย $MgCl_2$ ของบริษัท Finnzyme
3. *Taq* DNA polymerase DyNAzyme ของบริษัท Finnzyme
4. arbitary primer ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ ของบริษัท Operon Technology
5. dNTPs เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 ของบริษัท SibNzyme
6. ดีเอ็นเอแม่แบบของปาล์มน้ำมัน เข้มข้น 100 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร
7. น้ำกลั่น
8. 100 base pair DNA ladder maker

3. วัสดุอื่นๆ

3.1 โกร่งสำหรับบดตัวอย่าง

3.2 กระติกน้ำแข็ง

3.3 เครื่องแก้วต่างๆประกอบด้วย flask, beaker, pipette, cylinder, pasteur pipette

3.4 ด้ามมีดและใบมีด

3.5 ปากคีบ

3.6 ช้อนตักสาร

3.7 eppendorf tube

3.8 pipett tip

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการการจำแนกพันธุ์โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

1.1 เครื่องอิเล็คโตรโฟรีซีสแนวตั้งแบบ Dual Gel Caster ของ Hoefer รุ่น Mighty Small SE 245

1.2 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ของ Pharmacia รุ่น EPS 301

1.3 ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง

1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

1.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

1.6 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

1.7 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

1.8 ตู้อบ (oven)

1.9 เครื่อง vortex (vortex mixer)

1.10 micro pipette

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.11 เครื่องดูดอากาศ (vacuum pump)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการจำแนกพันธุ์โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

2.1 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

2.3 ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง

2.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

2.5 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

2.6 เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ

2.7 เครื่องอิเล็คโตรโฟรีซีสแบบแนวนอน Easycast Model #B2

2.8 เตาไมโครเวฟ (microwave oven)

2.9 เครื่องถ่ายเจล UV รุ่น viber lourmat TCX-2.0M และ Sony Video graphic printer Up-895 MD100

2.10 micro pipette

3. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ผลจากเทคนิคอาร์เอพีดี

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc รุ่น 2.02j

วิธีการ

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

1. การสกัดเอนไซม์

นำตัวอย่างใบอ่อนปาล์มน้ำมันสกัดด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ (tris buffer) ความเข้มข้นและความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมร่วมด้วยกับสาร β-mercaptoethanol, pvp, glycerol, tween20, triton x-100 และ sucrose ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมตามแต่ละชนิดของบัฟเฟอร์ โดยใช้ตัวอย่างพืช 0.3 กรัมน้ำหนักสด ต่อสารละลายสกัดปริมาตร 0.9-1.2 มิลลิลิตร ทำการบดตัวอย่างพืชในโกร่งที่แช่แข็งร่วมกับไนโตรเจนเหลว บดตัวอย่างจนละเอียดมีลักษณะคล้ายผงแป้ง เติมบัฟเฟอร์แล้วนำไปเทใส่หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตรนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 –14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมเจลและการแยกโมเลกุลของเอนไซม์

เตรียมเจลโดยใช้เครื่องอิเล็คโตรโฟรีซีสชนิด slab gel เตรียมเจลแบบไม่ต่อเนื่อง (disc:discontinouse) ใช้ตัวกลางเป็นโพลีอะคริลาไมด์เจลซึ่งประกอบด้วยด้วยเจลส่วนบน (stacking gel) และเจลส่วนล่าง (running gel) ความเข้มข้น 8.5 และ 12 เปอร์เซ็นต์ เตรียมเจลตามสูตรดัดแปลงของ ชวนพิศ อรุณรังสิกุล และ คณะ (2538) (รายละเอียดในภาคผนวก) ทำการแยกเอนไซม์โดยใช้ 10X buffer pH8.3 เป็นอิเล็คโทรดบัฟเฟอร์โดยใช้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายใต้อุณหภูมิ 7-10 องศาเซลเซียส จนกระทั่งการเดินทางของ bromophenol blue ห่างจากขอบเจลด้านล่าง 1 เซนติเมตร จึงปิดเครื่องอิเล็คโตรโฟรีซีสนำแผ่นเจลออกจากกระจกแล้วทำการย้อมสีเอนไซม์

3. การย้อมสีเอนไซม์

นำแผ่นเจลที่ได้มาทำมาตรวจสอบกับสารเคมีที่มี substrate และ coenzyme ที่จำเพาะกับ enzyme แต่ละชนิดเพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาและตกตะกอนเป็นแถบ (band) ที่เรียกว่า zymogram ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของพันธุกรรมได้ในที่นี้ทำการศึกษากับ isozyme 12 ระบบได้แก่ esterase, acid phosphatase, peroxidase, malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase glucose-6- phosphate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, superoxide dimutase indophenol oxidase, sorbital dehydrogenase, xanthine dehydrogenase และ alkaline phosphatase เมื่อเจลติดสีชัดเจนแล้วทำการตรึง (fix) เอนไซม์และล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์และกรดอะซีติก 7 เปอร์เซ็นต์

4. การแปลผลรูปแบบไอโซไซม์

ศึกษารูปแบบเอนไซม์ของปาล์มน้ำมันนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์หรือจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

1. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบอ่อนปาล์มน้ำมันที่ยังไม่คลี่ออกเป็นทางใบมาสกัดด้วยบัฟเฟอร์แต่ละชนิดโดยวิธีสกัดจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของบัฟเฟอร์ (รายละเอียดในภาคผนวก)

2. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอทำโดยวิธีการอิเล็คโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย TBE buffer และย้อมแผ่นเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตแล้วเทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (รายละเอียดในภาคผนวก) ปรับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอตามความต้องการ

3. การเตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์

เตรียมส่วนผสมต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นดังนี้คือ 10X PCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 2 ยูนิตต่อไมโครลิตร, 50μM primer, 200μM dNTPs, ดีเอ็นเอแม่แบบของปาล์มน้ำมัน 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรและน้ำกลั่น ในการทดลองเบื้องต้นต้องตรวจหาไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอก่อนโดยใส่สารต่างๆในปฏิกิริยาที่ระดับหนึ่งเมื่อเลือกได้ไพรเมอร์ที่ต้องการแล้วจึงทดลองเปลี่ยนแปลงสภาพต่างๆ (รายละเอียดดังภาคผนวก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle โดยตั้งโปรแกรมต่างๆที่อุณหภูมิและเวลาดังนี้คือ

4.1 ขั้นตอน predenaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

4.2 ขั้นตอน denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที

4.3 ขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที

4.4 ขั้นตอน primer extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที

4.5 ขั้นตอน terminate ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้เกิด primer extension สมบูรณ์

5. การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล แล้วย้อมแผ่นเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

6. การวิเคราะห์ผลจากเทคนิคอาร์เอพีดี

วิเคราะห์การเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc รุ่น 2.02j

วิธีการดำเนินการ

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

1. การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์

นำใบอ่อนของปาล์มน้ำมันที่ยังไม่คลี่มาสกัดเอนไซม์ดังวิธีการในข้อ 1 นำไปแยกโมเลกุลของเอนไซม์ดังวิธีการในข้อ 2 จากนั้นนำไปย้อมสีเอนไซม์ดังวิธีการในข้อ 3 แล้วทำการแปลผลรูปแบบไอโซไซม์

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบไอโซไซม์

2.1 การศึกษาบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์โดยใช้บัฟเฟอร์ดังตารางที่ 1 แล้วนำสารสกัดที่ได้มาแยกเอนไซม์แล้วย้อมสีเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุด เปรียบเทียบความชัดเจนของรูปแบบเอนไซม์จากบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดแต่ละชนิด

2.2 การศึกษาระยะเวลาการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์

นำใบอ่อนของปาล์มน้ำมันมาสกัดเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 1 ในขั้นตอนนี้ทำการปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000, 13,000 และ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลานาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารสกัดเอนไซม์ที่ได้ไปแยกโมเลกุลของเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 2 และทำการย้อมสีเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 3 แปลผลเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาการปั่นตกตะกอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การศึกษาความเข้มข้นของเจล

ทำการสกัดเอนไซม์จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันโดยใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 2.1 มาแยกเอนไซม์บนตัวกลางเจลที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 ระดับคือ 8.5 และ 12 เปอร์เซ็นต์แล้วย้อมเจลด้วยสีย้อมเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุด เปรียบเทียบความชัดเจนของรูปแบบเอนไซม์จากความเข้มข้นของเจลที่ใช้ในการแยกเอนไซม์ทั้ง 2 ระดับ

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

1. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกสกัดดีเอ็นเอ

1.1 การศึกษาบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดดีเอ็นเอโดยใช้บัฟเฟอร์ดังตารางที่ 2

1.2 การศึกษาความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง

ทำการปรับเปลี่ยนจำนวนรอบที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงสกัดดีเอ็นเอเป็น 4 ระดับได้แก่ 6,000, 8,000, 10,000, และ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์

2.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้แก่

2.1.1 เปรียบเทียบความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 1.5, 2.5, 3.0 และ 4.0 มิลลิโมลาร์

2.2.2 เปรียบเทียบความเข้มข้นของ dNTPs ที่ระดับความเข้มข้น 100, 150, 200 และ 250 มิลลิโมลาร์

2.2.3 เปรียบเทียบความเข้มข้นของ primer ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 0.3, 0.4 และ 1.0 มิลลิโมลาร์

2.2.4 เปรียบเทียบความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.0

2.2.5 เปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40, และ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

2.2 การศึกษาการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

การศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ปรับเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 3 ระดับคือ 36, 40 และ 45 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ชนิดและองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์จากใบอ่อนปาล์มน้ำมัน

ชนิดของบัฟเฟอร์	องค์ประกอบ
1	tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 β-mercaptoethanol เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ glycerol เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ tween 20 เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์
2	tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 β-mercaptoethanol เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ glycerol เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ tween 20 เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ pvp เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์
3	tris-HCl เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 8.0 β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ pvp เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ triton x-100 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ sucrose เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์
4	tris-HCl เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 8.0 β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ pvp เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ sucrose เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์
5	tris-HCl เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 8.0 β-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ pvp เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ triton x-100 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ sucrose เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

50804

3. การศึกษาตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.1 การศึกษาเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของอะกาโรสเจลที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ระดับความเข้มข้น 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์

3.2 การศึกษาเปรียบเทียบระดับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในขั้นตอนการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 70, 80, 90 และ 100 โวลต์

3.3 การศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ที่ระยะเวลา 10, 20, 30 และ 40 นาที

ตารางที่ 2 ชนิดและองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

ชนิดของบัฟเฟอร์	องค์ประกอบ
1	tris-HCL เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ pH8.0 NaCl เข้มข้น 2.8 โมลาร์ EDTA เข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 CTAB เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์
2	tris-HCl เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 NaCl เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ EDTA เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 β-mercaptoethanol เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์
3	tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.6 NaCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ EDTA เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 β-mercaptoethanol เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ SDS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาคัดเลือกชนิดไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน

โดยคัดเลือกจากไพรเมอร์จำนวน 100 ชนิด (ตารางที่ 3) ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์คัดเลือกชนิดที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์และทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาของไพรเมอร์แต่ละชนิดที่ให้ polymorphism ที่เหมาะสมสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้

ตารางที่ 3 แสดงชนิดไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 100 ชนิดของบริษัท Operon Technology

ชุดไพรเมอร์	หมายเลขลำดับของไพรเมอร์
OPA	1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14,15,16, 17, 18,19 และ 20
OPC	1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14,15,16, 17, 18,19 และ 20
OPD	1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14,15,16, 17, 18,19 และ 20
OPE	1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14,15,16, 17, 18,19 และ 20
OPF	1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14,15,16, 17, 18,19 และ 20

5. การตรวจสอบผลจากเทคนิคอาร์เอพีดี

หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ 5 ไมโครลิตรมาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีสบนแผ่นอะกาโรสเจลโดยใช้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้าที่เหมาะสม ตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกผลไพรเมอร์ชนิดที่ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มากหรือก่อให้เกิดความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอซึ่งเหมาะสมที่จะใช้กับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันด้วยไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้ว นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้วมาใช้สังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์เป็นต้นแบบด้วยวิธีพีซีอาร์โดยมีส่วนผสมและวิธีการเช่นเดียวกับที่อธิบายในข้อ 3 เทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย 100 base pair ladder marker ตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยการย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์และถ่ายภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพรุ่น Vilber

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lourmat TCX-20.M และ SONY Video graphic printer Up-895 MD ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกผล เขียน polymorphism วิเคราะห์ ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยอ่านจากแถบ polymorphism แล้วบันทึกข้อมูลโดยจะกำหนดเลขสัญลักษณ์ "1" กับการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ "0" กับการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น วิเคราะห์ข้อมูลการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc รุ่น 2.02j ในขั้นตอนการทำ similarity ใช้โปรแกรม SIMQUAL คำนวณโดยวิธีการของ Jaccard (1908) แสดงเป็นค่าสมการได้ดังนี้

coefficient : a /(n-d)

แล้วทำ cluster analysis เพื่อสร้าง phylogenic tree ในขั้นตอนนี้ใช้ SAHN เพื่อแปลผลข้อมูลที่เป็นตัวเลขโดยใช้ โปรแกรม UPGMA (Unweighted pair-group method arithmetic average) แล้วทำการหาค่าจาก tree โดยใช้ FIND

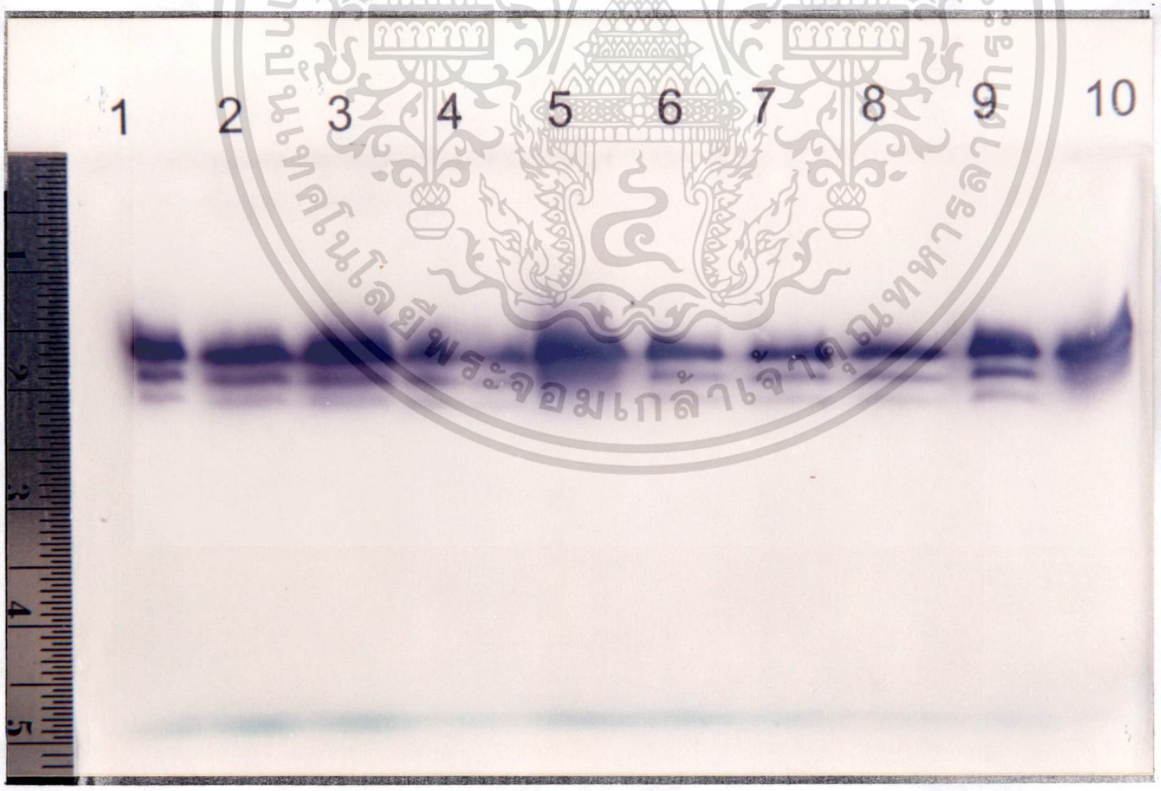
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

1. การศึกษาระบบไอโซไซม์ของปาล์มน้ำมัน

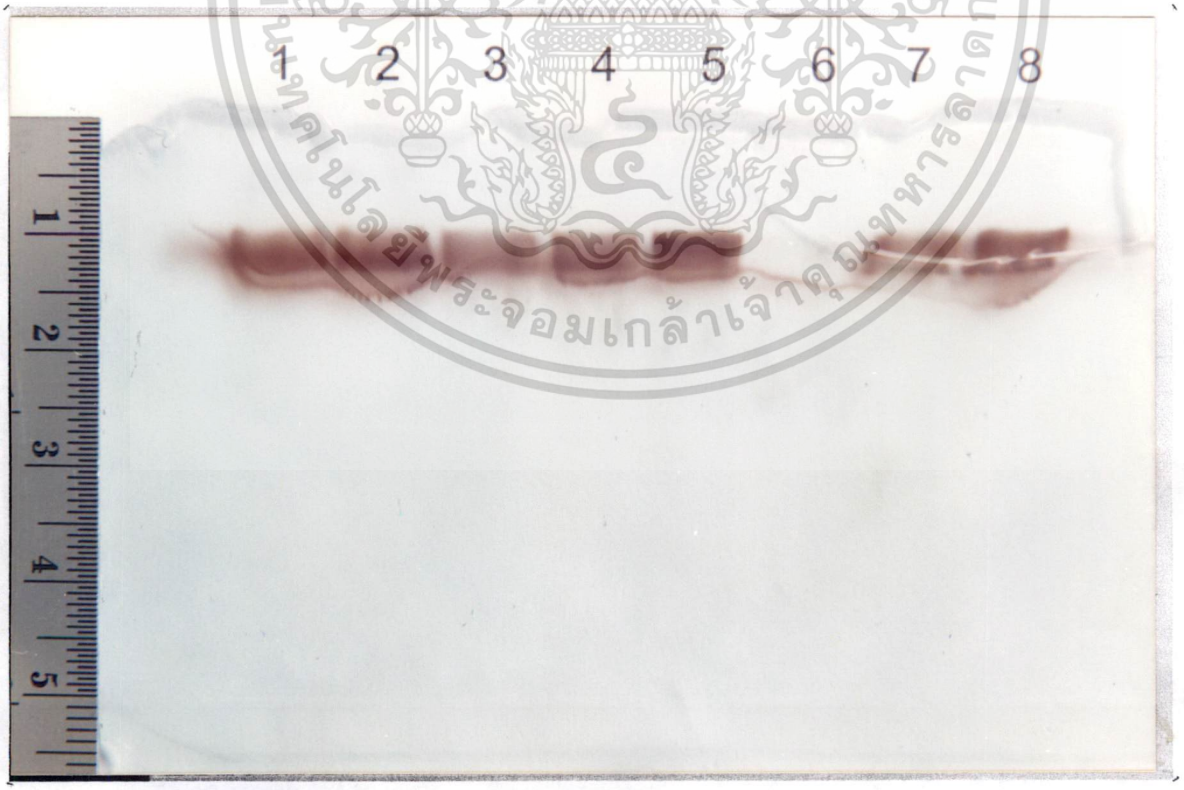
จากการศึกษาเอนไซม์ทั้ง 12 ระบบสามารถตรวจพบปฏิกิริยา (activity) ของเอนไซม์ได้ 4 ระบบคือ malate dehydrogenase, esterase, peroxidase, และ glucose –6-phosphate dehydrogenase ซึ่งมีเพียง malate dehydrogenase และ esterase ที่ย้อมติดสีชัดเจนที่สุด (ภาพที่ 1 และ 2) ส่วน peroxidase และ glucose –6-phosphate dehydrogenase ย้อมติดสีแต่ไม่ชัดเจน (ภาพที่ 3 และ 4) และจากการย้อม malate dehydrogenase พบว่าต้นแม่ดูรา 064 เบอร์ 33 (1) มีแถบสีเกิดขึ้น 3 แถบ ต้นพ่อพิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2) มีแถบสีเกิดขึ้น 2 แถบ ส่วนลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ที่ได้จากพ่อแม่ดังกล่าวจำนวน 6 ตัวอย่าง (3-8) นั้นมีแถบสีเกิดขึ้นเพียง 1 แถบ (ภาพที่ 5) แถบสีที่เกิดขึ้นจากการย้อม esterase พบว่าต้นแม่ดูรา 064 เบอร์ 33 (8) มีแถบสีเกิดขึ้น 6 แถบ ต้นพ่อพิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (1) มีแถบสีเกิดขึ้น 5 แถบ ส่วนลูกผสมเทเนอราชั่วที่1ที่ได้จากพ่อแม่ดังกล่าวจำนวน 6 ตัวอย่าง (2-7) นั้นมีแถบสีเกิดขึ้น 4 แถบ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 1 รูปแบบ malate dehydrogenase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2 รูปแบบ esterase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 3 รูปแบบ peroxidase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมัน

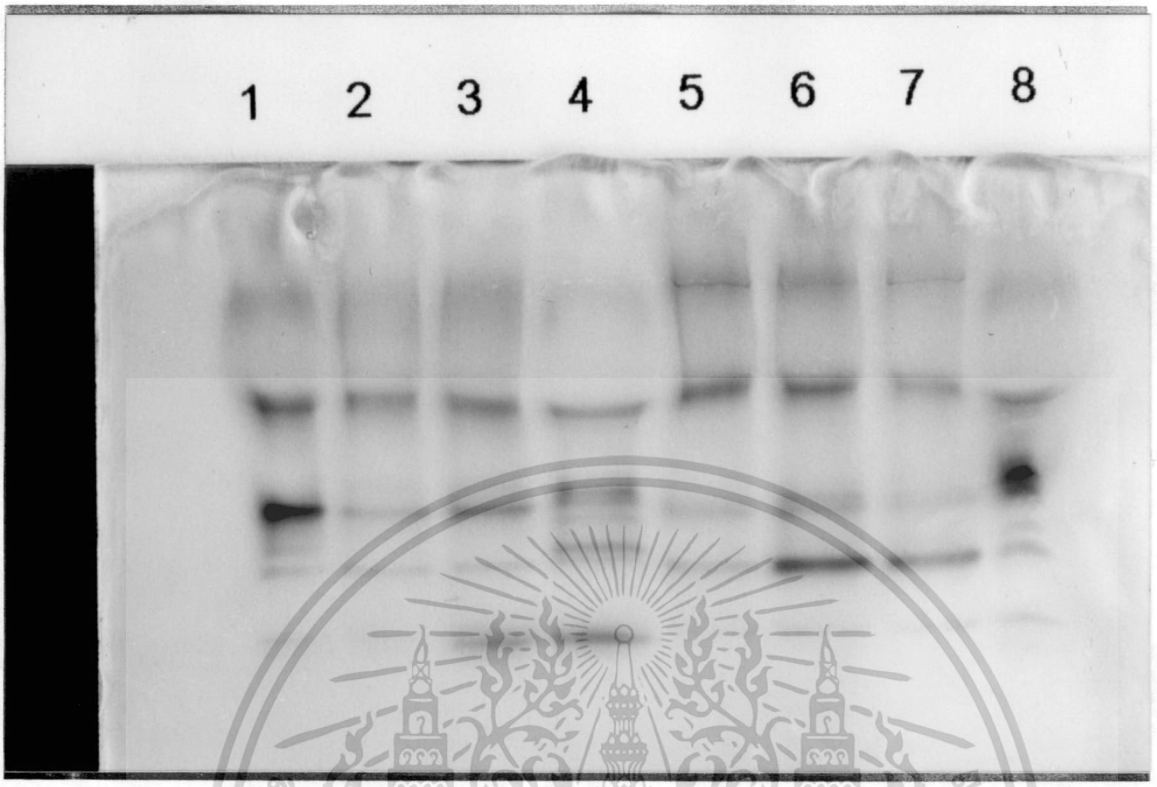
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4 รูปแบบ glucose-6-phosphate dehydrogenase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมัน

ภาพที่ 5 รูปแบบ malate dehydrogenase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมัน

1 = ดูรา 064 เบอร์ 33 2 = พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 3-8 = ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 รูปแบบ esterase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมัน

1 = พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 2-7 = ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 จากพันธุ์แม่ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พ่อพิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 8 = ดูรา 064 เบอร์ 33

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบไอโซไซม์

2.1 การศึกษาบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์

การนำใบอ่อนปาล์มน้ำมันมาทำการสกัดด้วยสารสกัดเอนไซม์บัฟเฟอร์ 5 ชนิด (ตารางที่ 1) แล้วทำการปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แล้วนำมาแยกเอนไซม์บนเจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์แล้วย้อมด้วย malate dehydrogenase เปรียบเทียบความชัดเจนของรูปแบบเอนไซม์จากการใช้บัฟเฟอร์ที่ต่างกัน จากการทดลองพบว่าบัฟเฟอร์ชนิดที่ 2 ให้แถบชัดเจนที่สุด (ภาพที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 7 รูปแบบ malate dehydrogenase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมันซึ่งสกัดด้วยบัฟเฟอร์ 5 ชนิด
1 และ 2 = บัฟเฟอร์ชนิดที่ 1 3 และ 4 = บัฟเฟอร์ชนิดที่ 2 5 และ 6 = บัฟเฟอร์ชนิดที่ 3
7 และ 8 = บัฟเฟอร์ชนิดที่ 4 9 และ 10 = บัฟเฟอร์ชนิดที่ 5

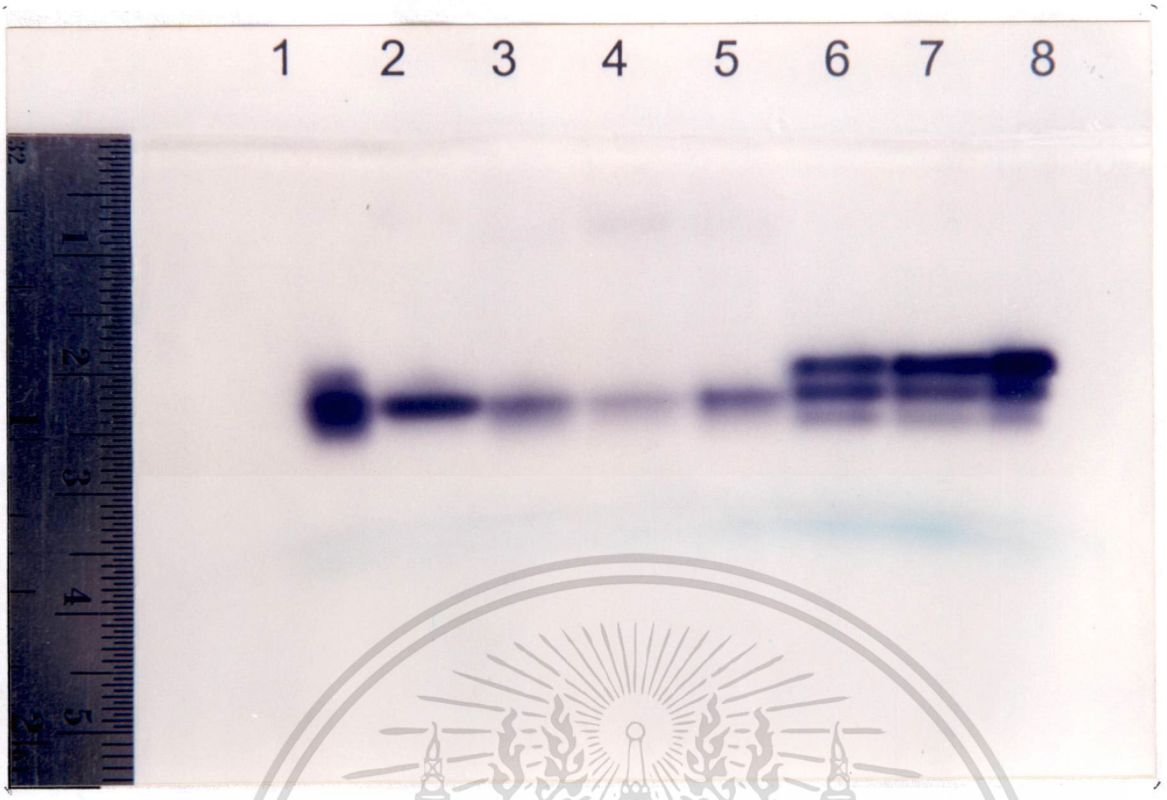
2.2 การศึกษาความเร็วและระยะเวลาในการปั่นตกตะกอน

จากการทดลองพบว่าการใช้ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 20 นาทีให้สารสกัดเอนไซม์ที่ใสและให้แถบแบนคมชัดที่สุด

2.3 การศึกษาความเข้มข้นของเจล

จากการแยกไอโซไซม์บนตัวกลางเจลที่มีความเข้มข้นต่างกัน 2 ความเข้มข้นคือ 8.5 และ 12 เปอร์เซ็นต์แล้วย้อมด้วย malate dehydrogenase เปรียบเทียบความชัดเจนของรูปแบบเอนไซม์จากการใช้เจลความเข้มข้นต่างกัน พบว่าเจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์(ภาพที่ 8 ก)ให้แถบชัดเจนกว่าเจลเข้มข้น 8.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 8 ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 ก รูปแบบ malate dehydrogenase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมันซึ่งทำการแยกเอนไซม์บนเจล เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 8 ข รูปแบบ malate dehydrogenase ของใบอ่อนปาล์มน้ำมันซึ่งทำการแยกเอนไซม์บนเจล เข้มข้น 8.5 เปอร์เซ็นต์

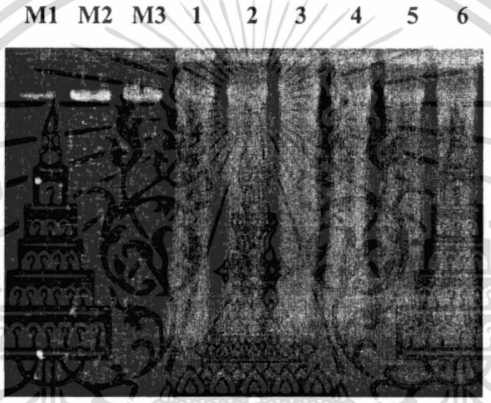
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

1. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกสกัดดีเอ็นเอ

1.1 การศึกษาบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

จากการเปรียบเทียบชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ 3 ชนิดได้แก่ บัฟเฟอร์ที่มี CTAB เป็นองค์ประกอบ, บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ Salt และบัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS พบว่าบัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS ตามวิธีการดัดแปลงของ Dellaporta *et al.*, (1983) ให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ สะอาด บริสุทธิ์ และดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นมากพอ โดยมีความเข้มข้นประมาณ 300 - 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรซึ่งเหมาะสำหรับเก็บไว้ใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดีต่อไป (ภาพที่ 9)

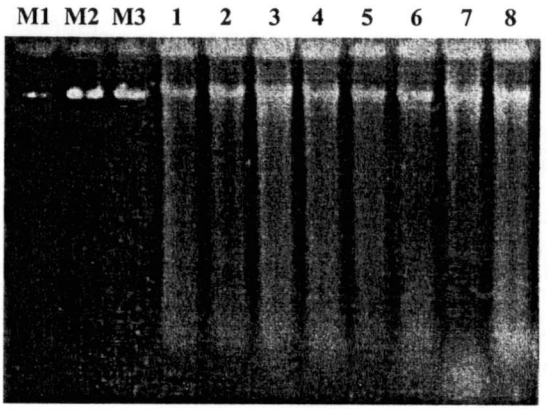


ภาพที่ 9 แสดงการตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากบัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบต่างกัน
M1, M2 และ M3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 10, 100 และ200 นาโนกรัม ตามลำดับ
1 และ 2 คือ ดีเอ็นเอ ที่สกัดโดยใช้ บัฟเฟอร์ ที่มี CTAB เป็นองค์ประกอบ
3 และ 4 คือ ดีเอ็นเอ ที่สกัดโดยใช้ บัฟเฟอร์ ที่มี Salt เป็นองค์ประกอบ
5 และ 6 คือ ดีเอ็นเอ ที่สกัดโดยใช้ บัฟเฟอร์ ที่มี SDS เป็นองค์ประกอบ

1.2 การศึกษาความเร็วในการหมุนเหวี่ยง

การเปรียบเทียบความเร็วในการหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกสารสกัดดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 4 ระดับได้แก่ 6,000 รอบต่อนาที, 8,000 รอบต่อนาที, 10,000 รอบต่อนาที และ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที สามารถแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากสารละลายบัฟเฟอร์ได้ปริมาณของดีเอ็นเอมากที่สุด และดีเอ็นที่ได้มีคุณภาพดีไม่ขาดเสียหาย (ภาพที่ 10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 10 แสดงผลการตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบต่างกัน 4 ระดับ

M1, M2 และ M3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 10, 100 และ 200 นาโนกรัม ตามลำดับ

1 และ 2 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาที

3 และ 4 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที

5 และ 6 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที

7 และ 8 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์

2.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้แก่

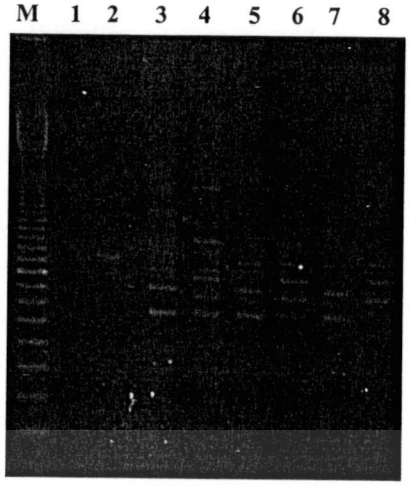
2.1.1 เปรียบเทียบความเข้มข้นของ $MgCl_2$

จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เปรียบเทียบความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 4 ระดับได้แก่ 1.5 มิลลิโมลาร์, 2.5 มิลลิโมลาร์, 3.0 มิลลิโมลาร์ และ 4.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ 2.5 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 11)

2.1.2 เปรียบเทียบความเข้มข้นของ dNTPs

จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ dNTPs 4 ระดับได้แก่ 100 ไมโครโมลาร์, 150 ไมโครโมลาร์, 200 ไมโครโมลาร์ และ 250 ไมโครโมลาร์ พบว่าความเข้มข้นของ dNTPs ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ 200 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น ต่างๆ
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker
1 และ 2 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ในพันธุ์ดูรา และพิสิเฟอรา
3 และ 4 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ในพันธุ์ดูรา และพิสิเฟอรา
5 และ 6 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ ในพันธุ์ดูรา และพิสิเฟอรา
7 และ 8 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ ในพันธุ์ดูรา และพิสิเฟอรา

2.1.3 เปรียบเทียบความเข้มข้นของ primer

จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ primer 4 ระดับได้แก่ 0.2 ไมโครโมลาร์ 0.3 ไมโครโมลาร์, 0.4 ไมโครโมลาร์ และ 1.0 ไมโครโมลาร์ พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ 0.2 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 13)

2.1.4 เปรียบเทียบความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase

จากการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase 4 ระดับได้แก่0.2 ยูนิต, 0.4 ยูนิต, 0.8 ยูนิต และ 1.0 ยูนิต พบว่าความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ 0.4 ยูนิต (ภาพที่ 14)

2.1.5 เปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบ

จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 4 ระดับได้แก่ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 15)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การศึกษาการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

จากการเปรียบเทียบอุณหภูมิสำหรับใช้ในขั้นตอน annealing 3 ระดับได้แก่ 36 องศาเซลเซียส, 40 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด (ภาพที่ 16)

3. การศึกษาตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.1 การศึกษาความเข้มข้นของอะกาโรสเจล

จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นอะกาโรสเจล 4 ระดับได้แก่ 0.8 เปอร์เซ็นต์, 1.0 เปอร์เซ็นต์, 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของเจลที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์เนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน (ภาพที่ 17)

ภาพที่ 12 แสดงผลการเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของ dNTPs ที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker

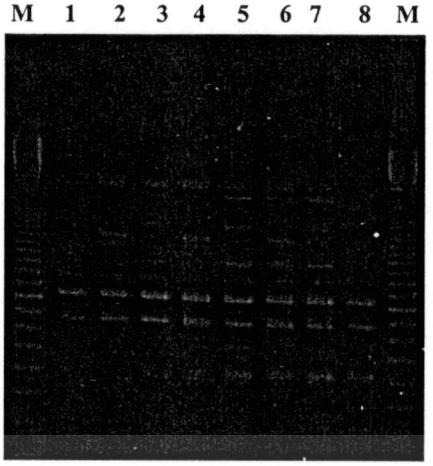
1 และ 2 ใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูรา และพิสิเฟอรา

3 และ 4 ใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูรา และพิสิเฟอรา

5 และ 6 ใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูรา และพิสิเฟอรา

7 และ 8 ใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูรา และพิสิเฟอรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 13 แสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของไพรเมอร์ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker

1 และ 2 ใช้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

3 และ 4 ใช้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

5 และ 6 ใช้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

7 และ 8 ใช้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

ภาพที่ 14 แสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่ระดับ ต่าง ๆ

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker

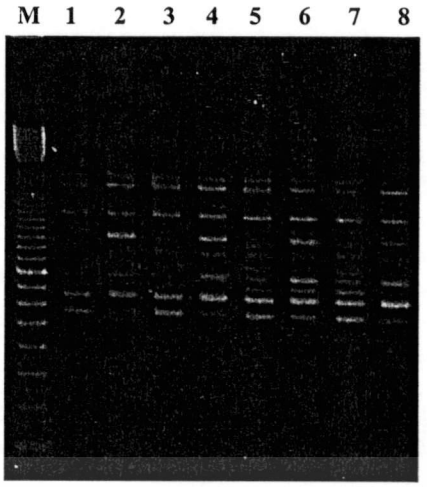
1 และ 2 ใช้ *Taq* DNA polymerase ที่มีความเข้มข้น 0.2 ยูนิต ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

3 และ 4 ใช้ *Taq* DNA polymerase ที่มีความเข้มข้น 0.4 ยูนิต ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

5 และ 6 ใช้ *Taq* DNA polymerase ที่มีความเข้มข้น 0.8 ยูนิต ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

7 และ 8 ใช้ *Taq* DNA polymerase ที่มีความเข้มข้น 1.0 ยูนิต ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 15 แสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบของปาล์มน้ำมันที่ระดับต่าง ๆ
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker
1 และ 2 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา
3 และ 4 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัม ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา
5 และ 6 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความเข้มข้น 30 นาโนกรัม ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา
7 และ 8 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความเข้มข้น 40 นาโนกรัม ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

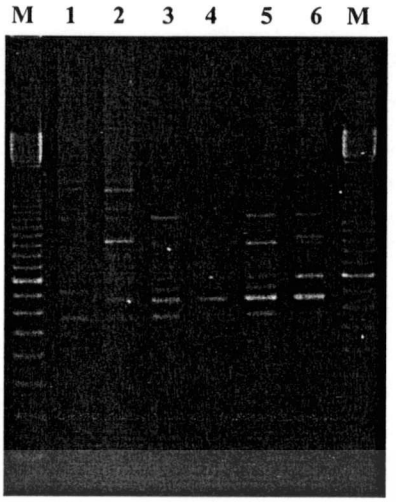
3.2 การศึกษาระดับความต่างศักย์ไฟฟ้าในขั้นตอนการทำอิเล็คโตรโฟรีซีส

จากการเปรียบเทียบความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสเพื่อตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยเปรียบเทียบความต่างศักย์ไฟฟ้า 4 ระดับได้แก่ 70, 80, 90 และ 100 โวลต์ พบว่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมคือ 80 โวลต์ เนื่องจากให้ความชัดเจนและระยะห่างระหว่างแถบของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการตรวจสอบความแตกต่าง (ภาพที่ 18)

3.3 การศึกษาระยะเวลาในการย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

จากการเปรียบเทียบระยะเวลาในการย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนที่สุด 4 ช่วงเวลา ได้แก่ 10 นาที 20 นาที, 30 นาที และ 40 พบว่าความเข้มข้นของเอธิเดียมโบรไมด์ที่เหมาะสมคือ 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรเป็นเวลา 30 นาที เนื่องจากทำให้มองเห็นแถบสว่างของดีเอ็นเอได้ชัดเจนที่สุด (ภาพที่ 19)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



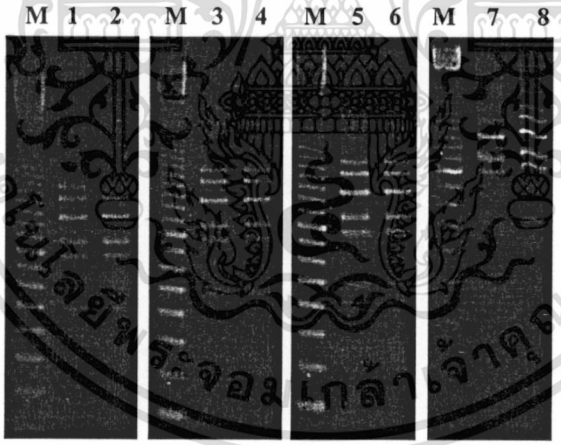
ภาพที่ 16 แสดงผลการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker

1 และ 2 ใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

3 และ 4 ใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 40 องศาเซลเซียส ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

5 และ 6 ใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 45 องศาเซลเซียส ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา



ภาพที่ 17 แสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของอะกาโรสเจลที่ระดับต่าง ๆ ในการตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker

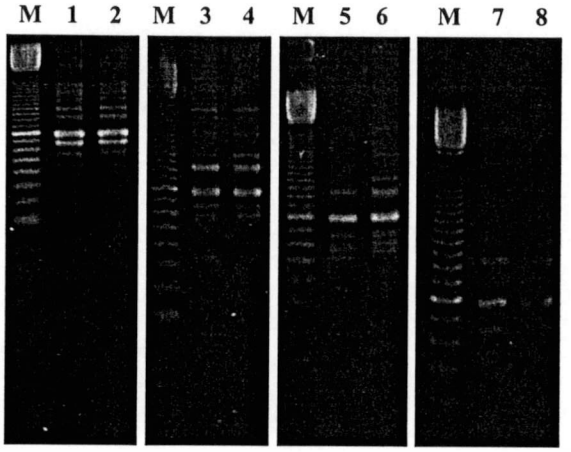
1 และ 2 ใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

3 และ 4 ใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

5 และ 6 ใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

7 และ 8 ใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



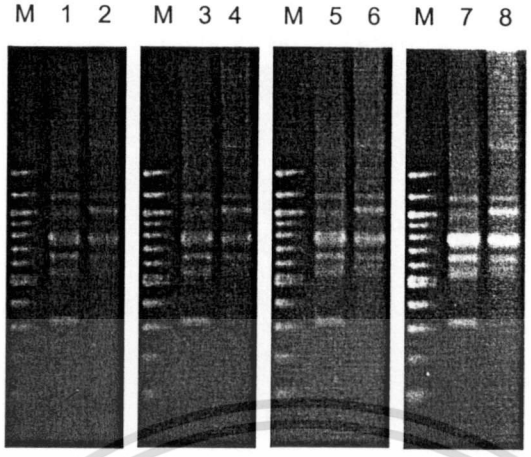
ภาพที่ 18 แสดงผลการเปรียบเทียบความต่างศักย์ไฟฟ้าซึ่งใช้ในขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair ladder marker
1 และ 2 ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 70 โวลต์ ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา
3 และ 4 ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา
5 และ 6 ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา
7 และ 8 ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

4. การศึกษาคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

จากการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้งหมดโดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33, พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339, ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, พันธุ์ดูรา 588 , พันธุ์ดูรา1589 , พันธุ์ดูรา 671, พันธุ์พิสิเฟอรา 425, พันธุ์พิสิเฟอรา 427, ลูกผสมเทเนราเบอร์ 62 (F62) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ต้นพบว่ามีไพรเมอร์ 14 ชนิด (ตารางที่ 4) ที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนของแถบแบน (major band) และแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบจาง (minor band) โดยเมื่อพิจารณาเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากไพรเมอร์แต่ละชนิดจะให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กันในปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ เมื่อแยกขนาดดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรสเจลด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีสเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่าสามารถเห็นความแตกต่างจนเกิดรูปแบบเฉพาะพันธุ์ และระหว่างพันธุ์ซึ่งเรียกว่าเกิด polymorphism โดยที่แถบดีเอ็นเอจะมีจำนวนระหว่าง 3 - 9 แถบ เฉลี่ย 6 แถบต่อ 1 ไพรเมอร์ ขนาดดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 0.35 – 1.7 กิโลเบส จำนวนทั้งหมด 81 แถบ (ตารางที่ 5) จำนวนแถบและขนาดดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของไพรเมอร์ และดีเอ็นเอแม่แบบของปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันในบางแถบเมื่อเปรียบเทียบกันภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่มจากการทดลองนี้แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะมีความจำเพาะในแต่ละพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ดูรา, พันธุ์พิสิเฟอรา และพันธุ์ลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทเนรา จะมีแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบร่วมระหว่างต้นพ่อพันธุ์พิสิเฟอรา และต้นแม่พันธุ์ดูราเสมอ (ภาพที่ 20 – 33)



ภาพที่ 19 แสดงผลการเปรียบเทียบระยะเวลาในการย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker

1 และ 2 ใช้ระยะเวลาในการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ 10 นาทีในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

3 และ 4 ใช้ระยะเวลาในการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ 20 นาทีในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

5 และ 6 ใช้ระยะเวลาในการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ 30 นาทีในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

7 และ 8 ใช้ระยะเวลาในการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ 40 นาทีในพันธุ์ดูราและพิสิเฟอรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงชนิดของไพรเมอร์และลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละชนิดที่ทำการคัดเลือกเพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

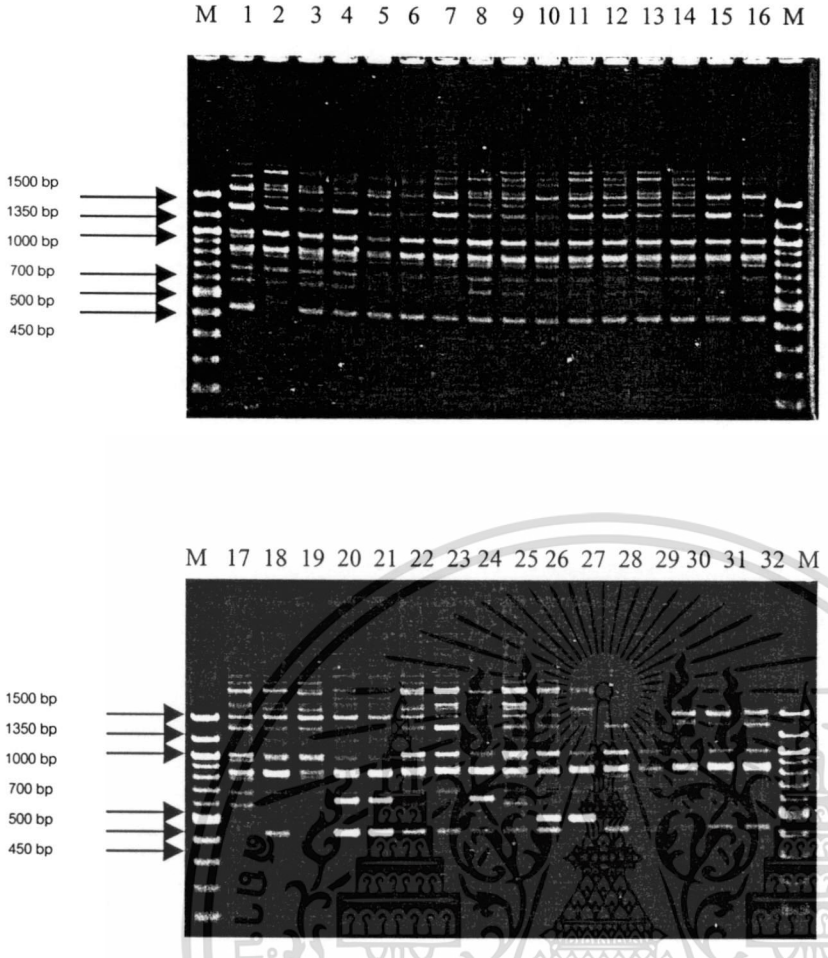
ชนิดของไพรเมอร์	ลำดับเบส
1.OPA11	5'CAATCGCCGT3'
2.OPA17	5'GACCGCTTGT3'
3.OPC07	5'GTCCCGACGA3'
4.OPC08	5'TGGACCGGTG3'
5.OPC15	5'GGCGGATCAG3'
6. OPD01	5'ACCGCGAAGG3'
7. OPD03	5'GTGGCCGTCA3'
8. OPD12	5'CACCGTATCC3'
9. OPE01	5'CCCAAGGTCC3'
10. OPE16	5'GGTTACTGTG3'
11. OPE17	5'CTACTGCCGT3'
12. OPE19	5'ACGGCGTATG3'
13.OPF07	5'CCGATATCCC3'
14.OPF08	5'GGGATATCGG3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบสจำนวนและขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ 14 ชนิดกับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง

ลำดับ	ชนิดไพรเมอร์	จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (base pair)
1	OPA11	7	450 - 1500
2	OPA17	5	680 - 1500
3	OPC07	6	550 - 1700
4	OPC08	3	750 - 1200
5	OPC15	5	600 - 1800
6	OPD01	5	600 - 1400
7	OPD03	9	380 - 1250
8	OPD12	6	600 - 1450
9	OPE01	7	500 - 1100
10	OPE16	5	650 - 1350
11	OPE17	6	550 - 1500
12	OPE19	6	400 - 1400
13	OPF07	5	350 - 1000
14	OPF08	6	450 - 1200
รวม		81	อยู่ในช่วง 350 - 1700

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

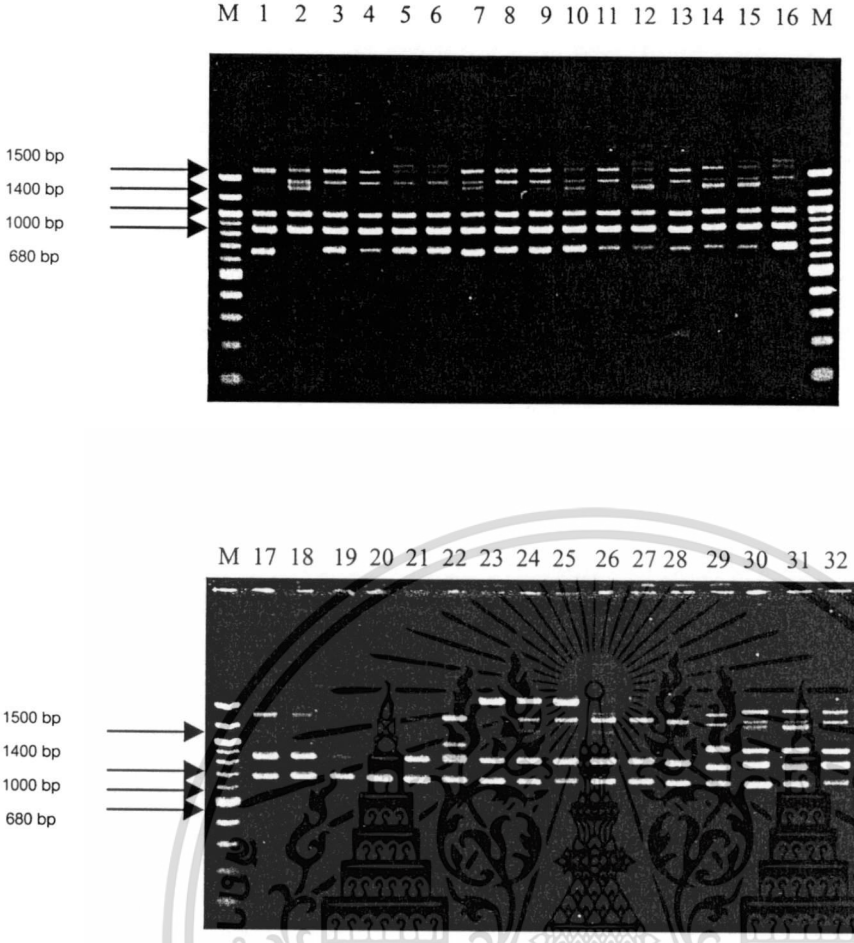


ภาพที่ 20 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPA11 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

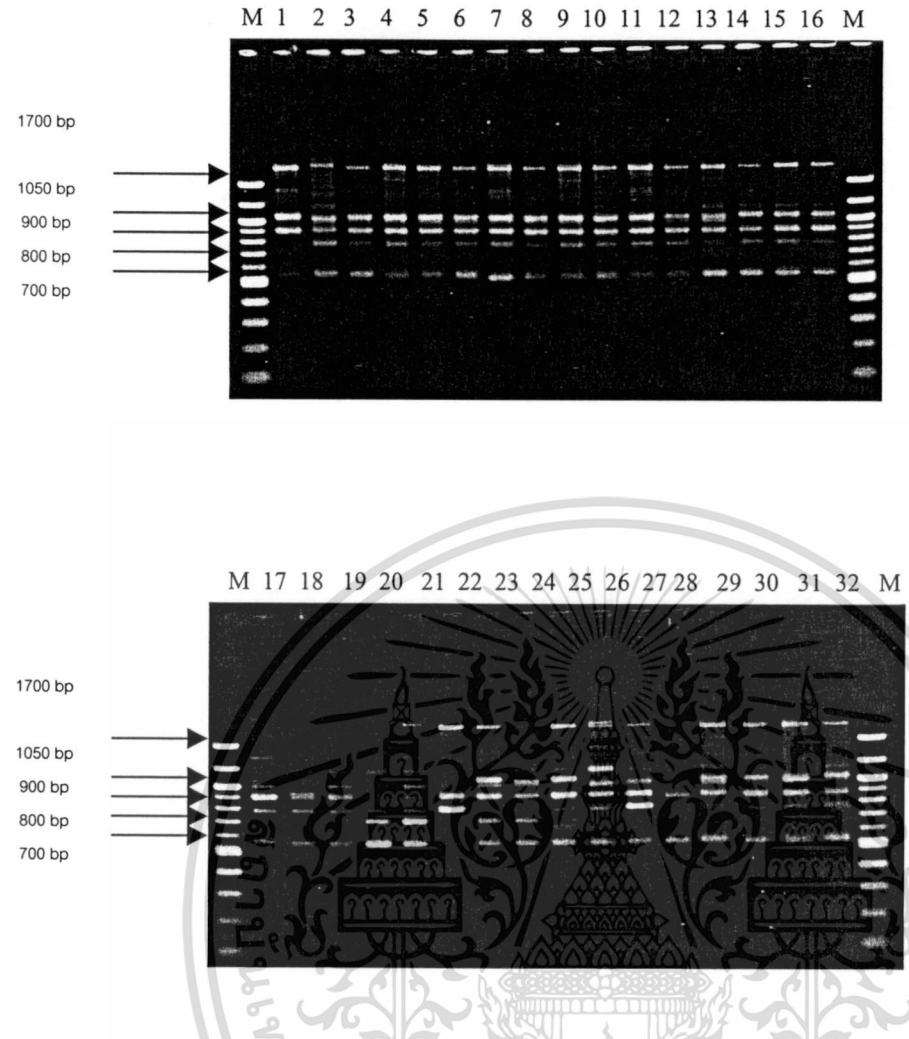


ภาพที่ 21 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPA17 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

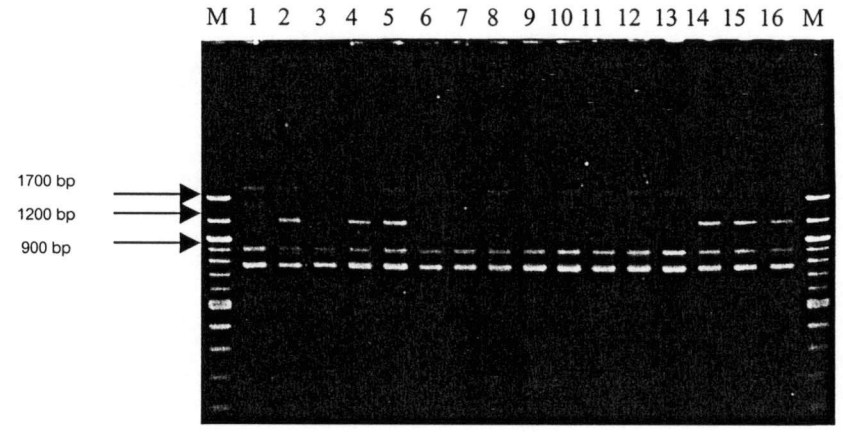


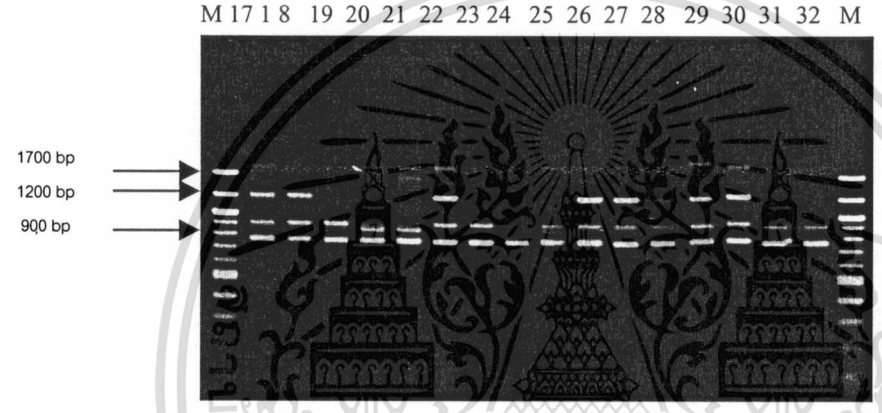
ภาพที่ 22 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC07 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



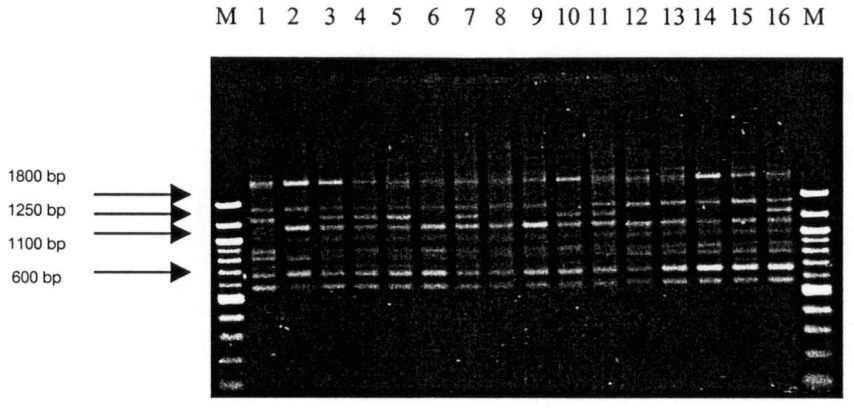


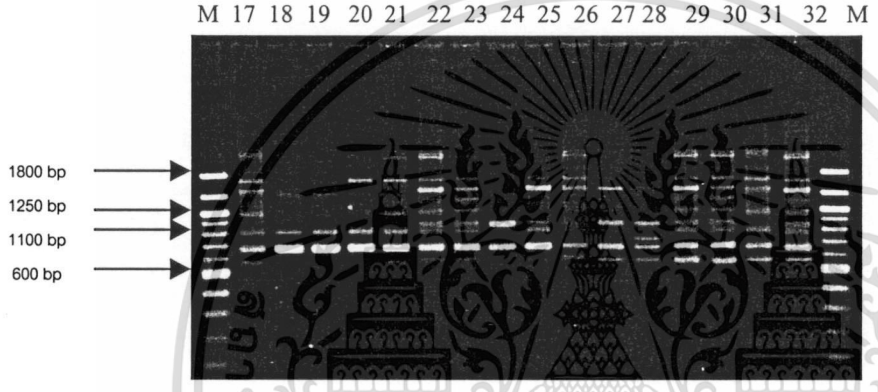
ภาพที่ 23 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC08 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), ดูรา 589(18), ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



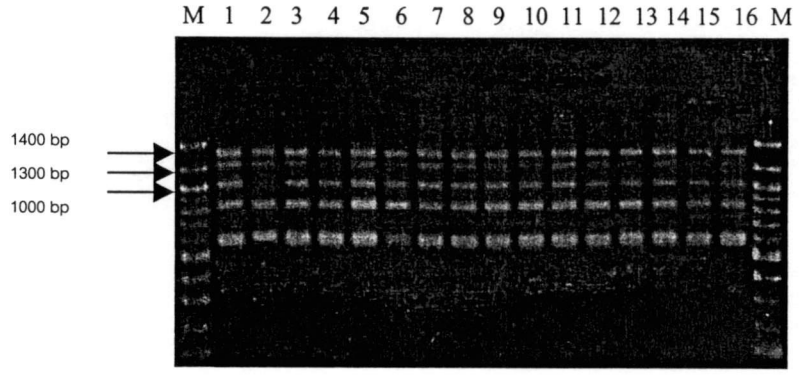


ภาพที่ 24 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC15 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

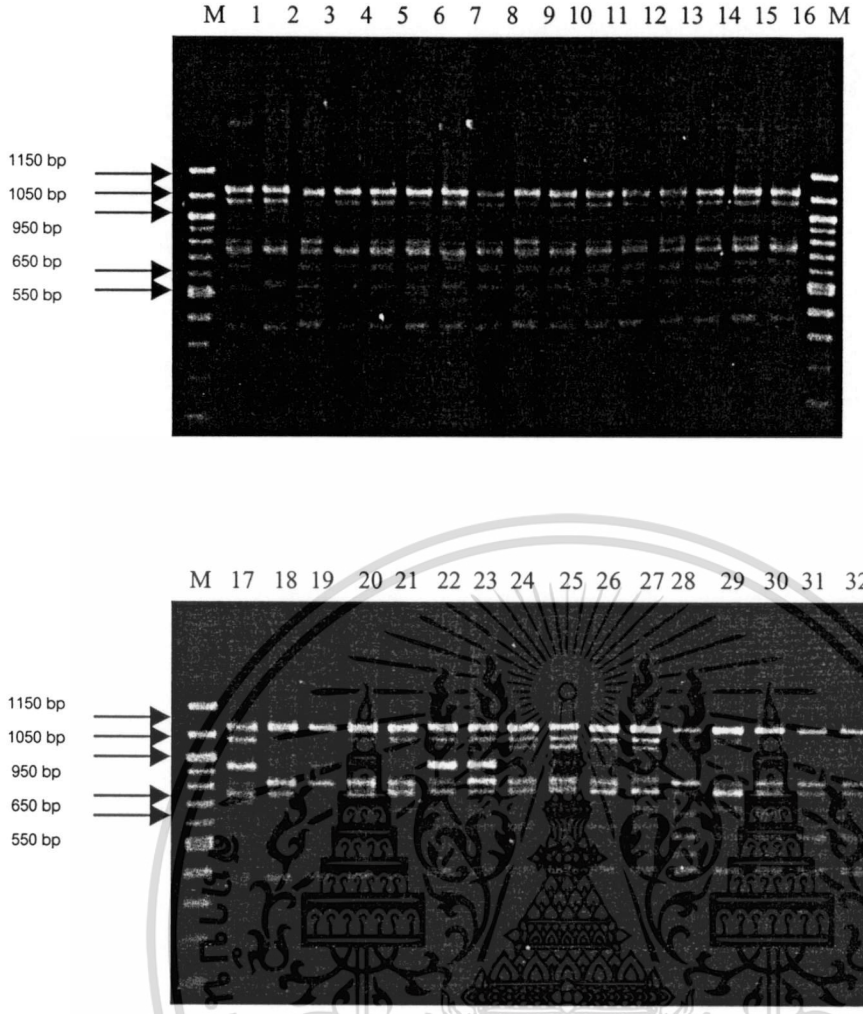


ภาพที่ 25 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPD01 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

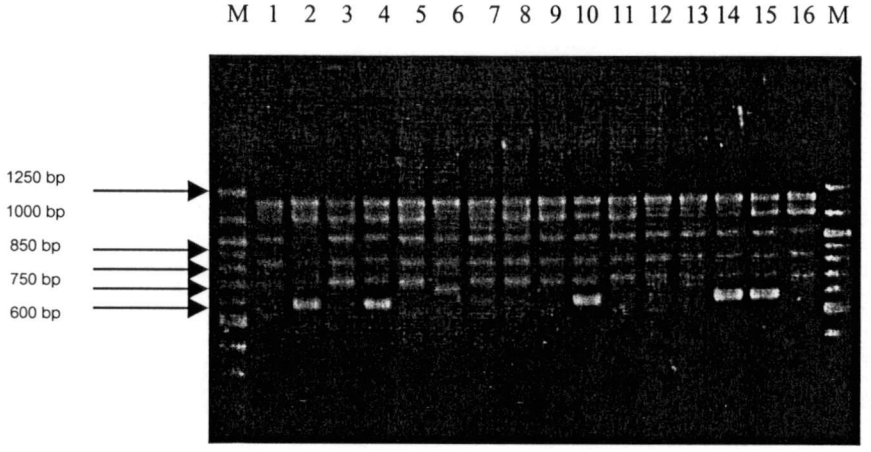


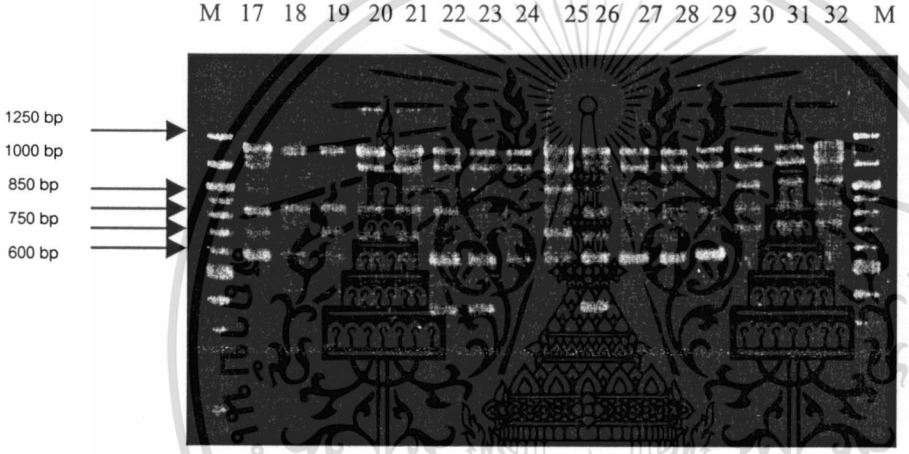
ภาพที่ 26 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPD03 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



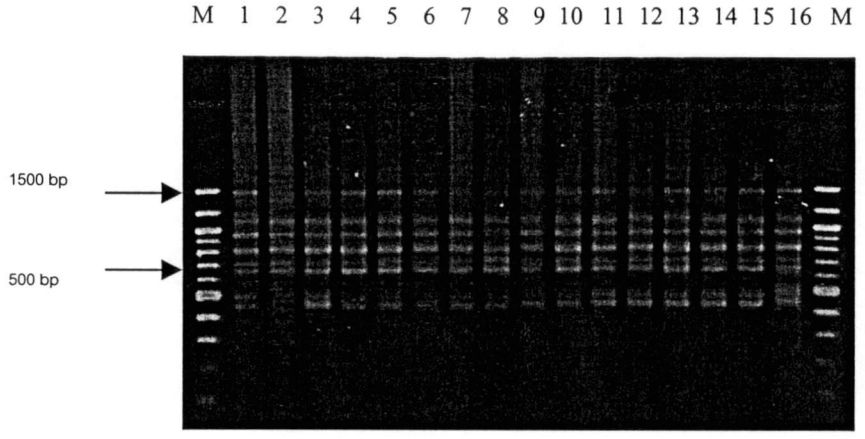


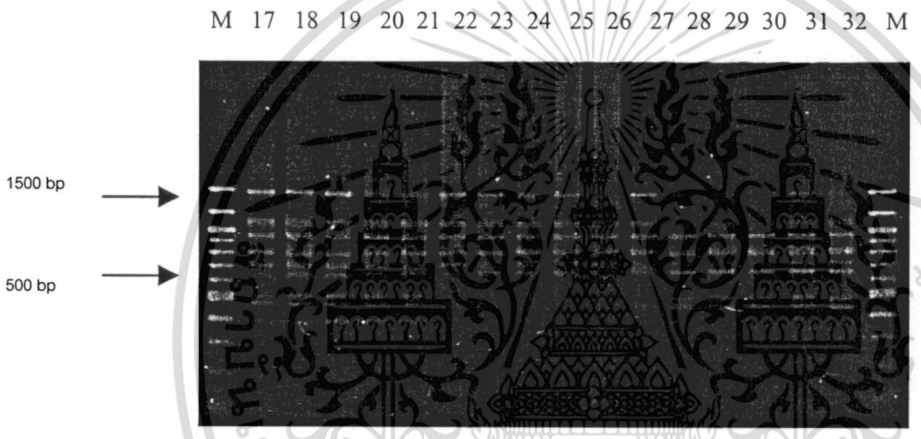
ภาพที่ 27 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPD12 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับ พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



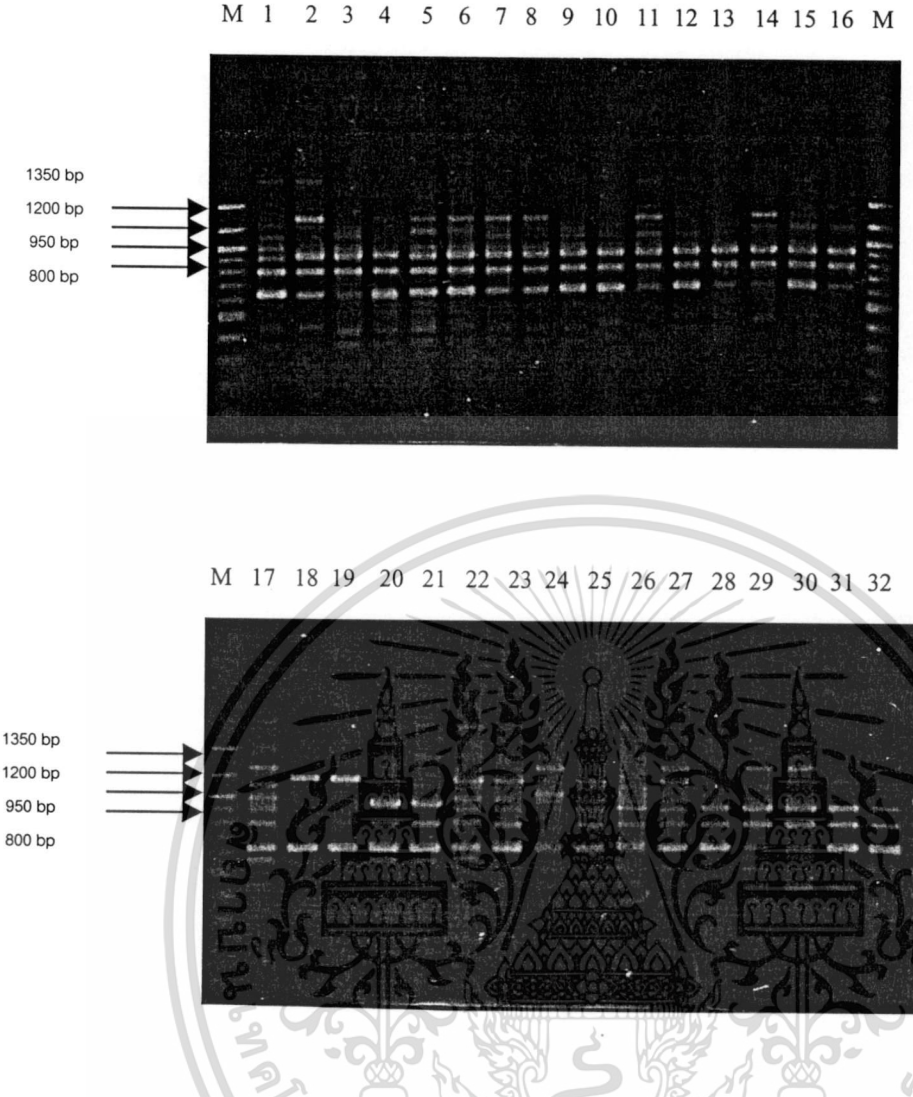


ภาพที่ 28 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE01 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับ พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

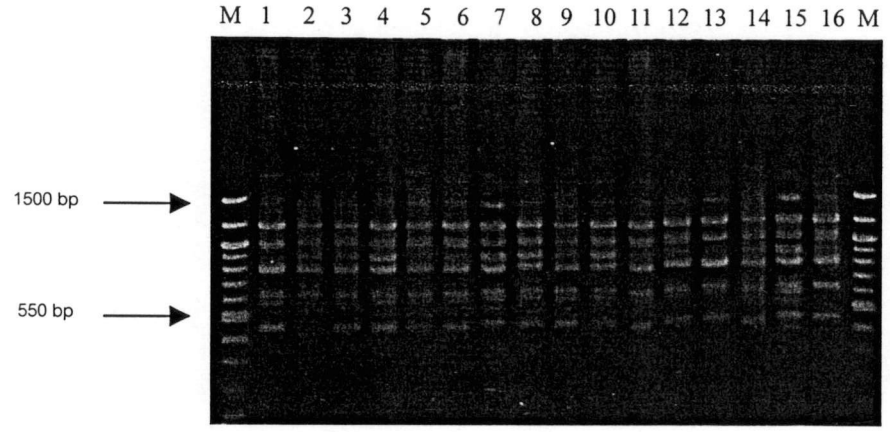


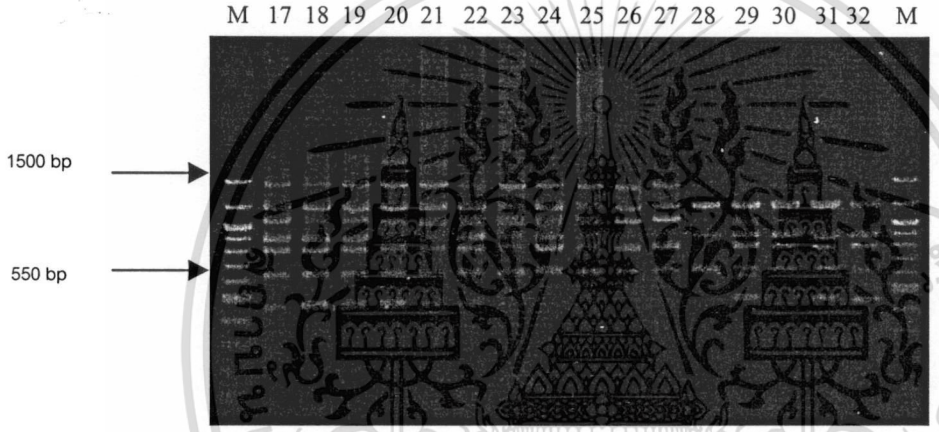
ภาพที่ 29 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE16 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



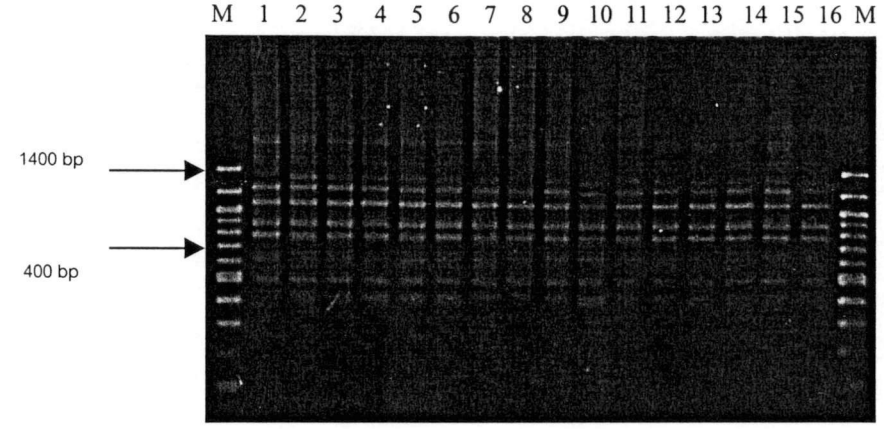


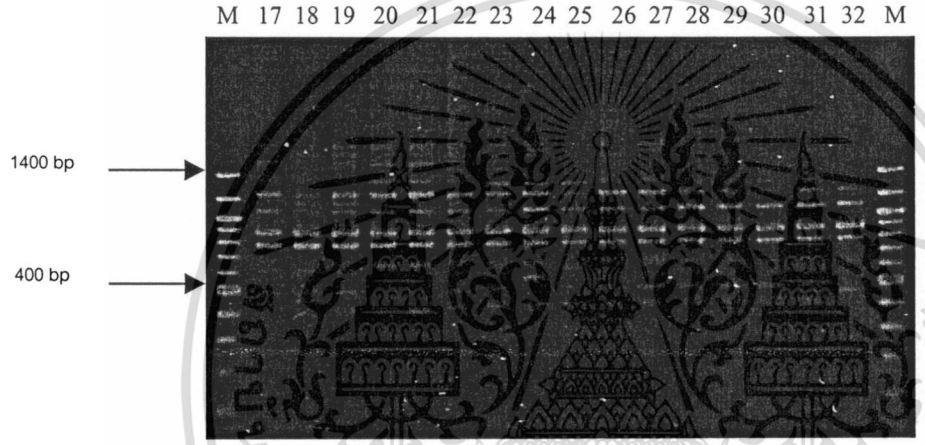
ภาพที่ 30 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE17 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



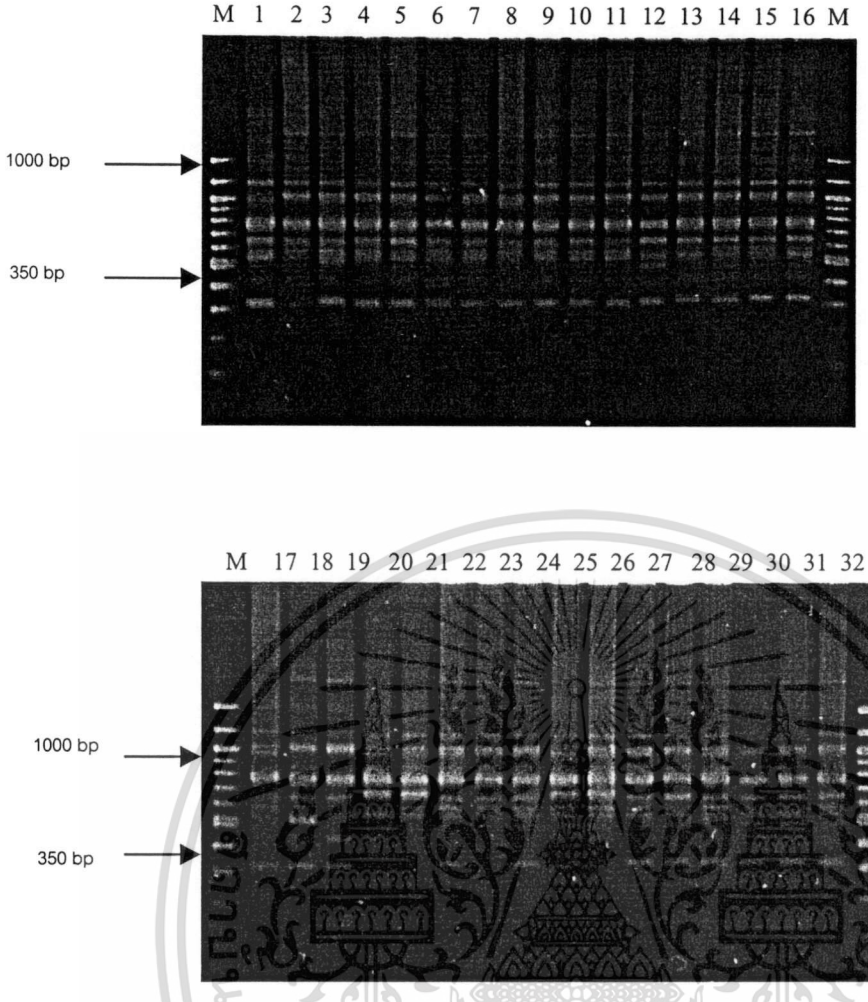


ภาพที่ 31 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE19 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

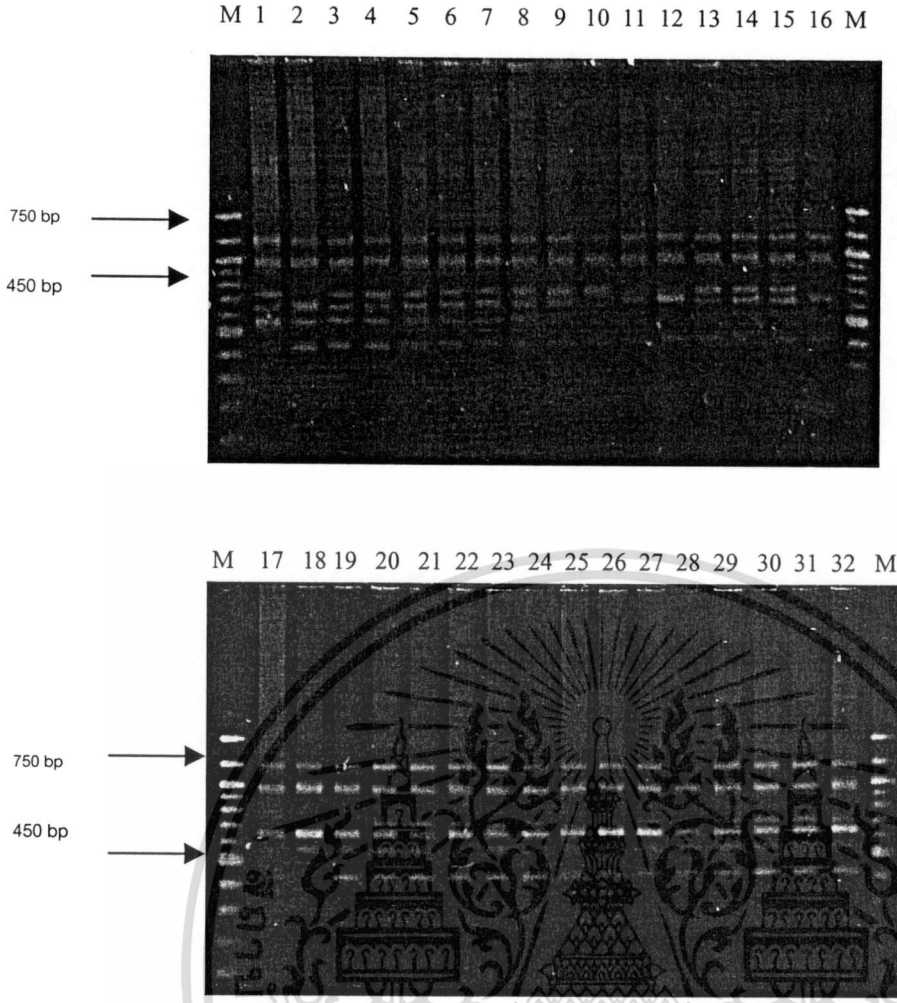


ภาพที่ 32 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPF07 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 33 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPF 08 ในปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 (1), พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 (2), ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง (3–16), พันธุ์ดูรา 588 (17), พันธุ์ดูรา 589(18), พันธุ์ดูรา 671 (19), พันธุ์พิสิเฟอรา 425 (20), พันธุ์พิสิเฟอรา 427 (21), พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) (22) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง (23 - 32)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

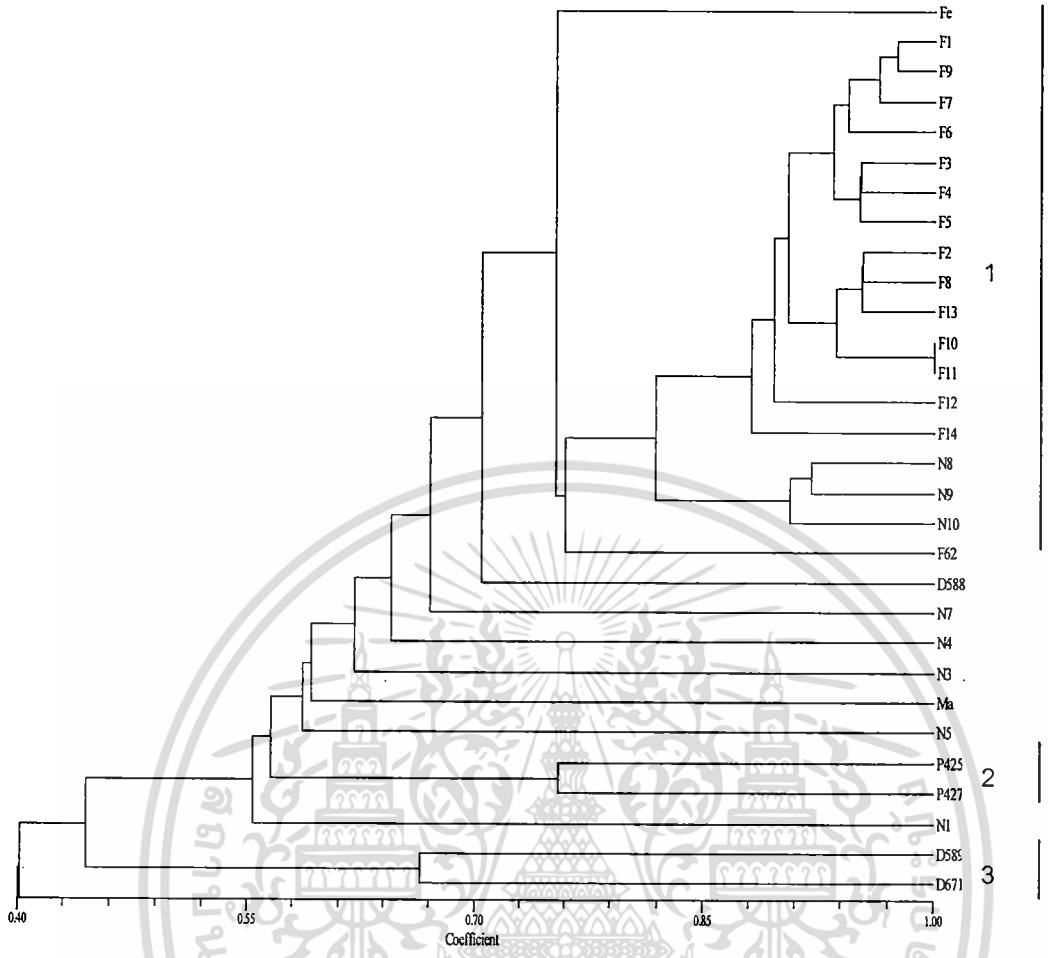
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การตรวจสอบผลจากเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน สามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.02 j โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนด้วยวิธีการของ Jaccard (1908) แล้วใช้โปรแกรม UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) จัดกลุ่มตัวอย่างและแสดงผลในรูปของ phylogenetic tree จากแถบดีเอ็นเอทั้ง 81 แถบ มีค่าดัชนีความเหมือน ดังตารางที่ 5 และ phylogenetic tree (ภาพที่ 34) จากผลดังกล่าวสามารถแบ่งกลุ่มปาล์มน้ำมันได้ 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย พันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33, พันธุ์ลูกผสม F_1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับ พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, พันธุ์ลูกผสม F62 และ พันธุ์ลูกผสมไม่ทราบพ่อแม่ อีก 3 ตัวอย่าง ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.74 – 0.97 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 2 ตัวอย่าง คือ พันธุ์พิสิเฟอรา 425 และพันธุ์พิสิเฟอรา 427 ซึ่งมีดัชนีความเหมือนในกลุ่ม 0.74 กลุ่มที่ 3 คือ พันธุ์ดูรา 589 และพันธุ์ดูรา 671 มีดัชนีความเหมือนในกลุ่มเป็น 0.69 และในกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 พันธุ์ดูรา 588 และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่อีก 7 ตัวอย่างซึ่งมีดัชนีความเหมือนแตกต่างกันจึงไม่สามารถจัดเข้ากับกลุ่มใด ๆ ได้

ในการนำพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 และลูกผสม F_1 เทเนรา ระหว่าง พันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 ทั้ง 14 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์เปรียบเทียบภายในกลุ่ม พบว่า phylogenetic tree ลูกผสม F_1 เทเนรา มีดัชนีความเหมือนใกล้เคียงกับพันธุ์ดูรา คือ อยู่ในช่วง 0.78 – 0.98 แต่มีความแตกต่างกับพันธุ์พ่อพิสิเฟอรา ภายในกลุ่มลูกผสม F_1 เทเนรา มีดัชนีความเหมือนใกล้เคียงกันมาก คืออยู่ในช่วง 0.89 – 0.98 (ภาพที่ 35) ซึ่งดัชนีดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ลูกผสม F_1 เทเนรา ในขั้นตอนการตรวจสอบพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อให้ได้ลูกผสมที่ถูกต้องในการนำมาใช้เพาะปลูก

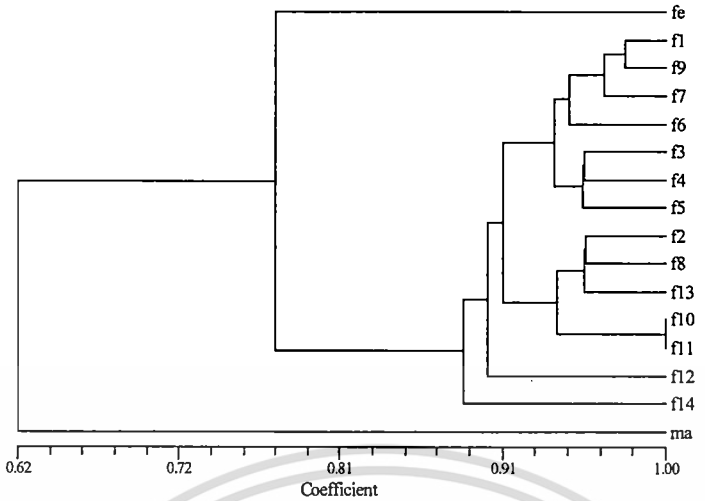
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 34 แสดง phylogenetic tree ที่ได้จากการใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.02 j ของปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง ที่เกิดจากแถบดีเอ็นเอที่มี polymorphism กัน

Fe (พันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33), Ma (พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339), F1 – F14 (ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับ พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 14 ตัวอย่าง), D588 (พันธุ์ดูรา 588), D589 (พันธุ์ดูรา 589), D671 (พันธุ์ดูรา 671), P425 (พันธุ์พิสิเฟอรา 425), P427 (พันธุ์พิสิเฟอรา 427), F62 (พันธุ์ลูกผสมเทเนราเบอร์62) และ N1 – N10 (พันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 35 แสดง phylogenetic tree ที่ได้จากการใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.02 j ของ ของปาล์มน้ำมัน 16 ตัวอย่าง ที่เกิดจากแถบดีเอ็นเอที่มี polymorphism กัน fe (พันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33), Ma (พันธุ์พิซิเฟอรา 116 เบอร์ 339), f1 – f14 (ลูกผสม F_1 ระหว่าง พันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พิซิเฟอรา 116 เบอร์ 339 14 ตัวอย่าง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

1. การศึกษาระบบไอโซไซม์ของปาล์มน้ำมัน

จากการศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ของปาล์มน้ำมันพบว่า malate dehydrogenase และ esterase มีปฏิกิริยาสามารถย้อมเจลติดสีได้ชัดเจนส่วนเอนไซม์ที่ย้อมเจลติดสีไม่ชัดเจนและเอนไซม์ที่ย้อมเจลไม่ติดสีอาจมีสาเหตุมาจากความไม่เหมาะสมของอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ต่อระบบของเอนไซม์นั้นๆ ซึ่งจะผลทำให้การเกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์จึงย้อมเจลไม่ติดสี (Shields *et al.*, 1983) นอกจากนั้นการย้อมเจลไม่ติดสีอาจเกิดจากวิธีการเตรียมสีย้อมและขั้นตอนในการย้อมเจลที่ไม่เหมาะสม

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบไอโซไซม์

2.1 การศึกษาบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์

จากการทดลองเปรียบเทียบเพื่อหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดเอนไซม์พบว่าบัฟเฟอร์ชนิดที่ 1, 2 และ 3 ให้แถบแบนที่คมชัดที่สุด บัฟเฟอร์ชนิดที่ 5 ให้แถบแบนที่ชัดเจนน้อยที่สุด บัฟเฟอร์ชนิดที่ 4ไม่ปรากฏแถบแบนและจากบัฟเฟอร์ทั้งหมดที่ให้แถบแบนคมชัดพบว่าบัฟเฟอร์ชนิดที่ 2 ซึ่งดัดแปลงจากวิไลวรรณ โชติเกียรติ และ อมรรัตน์ พงศ์ดารา (2538) ประกอบด้วย tris –HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5, β-mercaptoethanol เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์, glycerol เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ pvp เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ให้แถบแบนที่คมชัดที่สุดและสารสกัดที่ได้มีลักษณะใสไม่เหนียวหนืดสะดวกในการใช้ปฏิบัติงาน

2.2 การศึกษาระยะเวลาการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์

จากการทดลองการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลานาน 20 นาที จะให้ผลการสกัดที่ดีที่สุดโดยเมื่อนำไปแยกบนเจลแล้วให้แถบเอนไซม์ที่คมชัดมากที่สุดซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rahman and Nito (1994b) ซึ่งใช้ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีระยะเวลานาน 20 นาที ในการทดลองกับคัมควอทแต่แตกต่างกับพืชอื่นๆ เช่นทุเรียนซึ่งใช้ความเร็วในการหมุนเหวี่ยง 20,000 รอบต่อนาทีนาน 20 นาที (สุภาพ สุนทรนนท์ และ คณะ, 2540) สละซึ่งใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีนาน 20 นาที (ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และ คณะ, 2538) เป็นต้น

2.3 การศึกษาความเข้มข้นของเจล

ในการทดลองนี้ใช้เจลอะคริลาไมด์เข้มข้น 8.5 และ 12 เปอร์เซ็นต์สอดคล้องกับในรายงานของ Shields *et al.*, (1983) ซึ่งใช้ความเข้มข้นของเจลในช่วง 6-12 เปอร์เซ็นต์ จากการใช้เจลเข้มข้น 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ในการแยกไอโซไซม์ของปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33, พิสิเฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 3 ตัวอย่างและลูกผสมเทเนอราเบอร์ 62 (F62) จำนวน 3 ตัวอย่างจะให้จำนวนแถบของเอนไซม์ malate dehydrogenase ที่เหมือนกันแต่การใช้เจล 12 เปอร์เซ็นต์ให้แถบคมชัดกว่าแต่แถบชิดกันมาก ดังนั้นจึงควรใช้เวลาในการแยกเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ 20 นาทีหลังจาก marker พ้นจากขอบล่างของเจล

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

1. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

1.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้บัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน

เทคนิคทางชีวโมเลกุลจำเป็นต้องอาศัยดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ สะอาด และบริสุทธิ์ การใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมีผลทำให้การปรากฏของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันได้ (Aichitte *et al.*, 1993) เนื่องจากความสามารถในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์จะแปรเปลี่ยนไปถ้ามีองค์ประกอบอื่นปนเปื้อนมากับดีเอ็นเอ ทำให้การแปรผลในเทคนิคอาร์เอพีดีผิดพลาดได้ (Weeden *et al.*, 1992) จากผลการทดลองพบว่า บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS ตามวิธีการดัดแปลงของ Dellaporta (1983) ให้ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวุ้นใสมีความเข้มข้นประมาณ 300 - 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งสามารถเก็บเป็น stock สำหรับใช้ในขั้นตอนการทำเทคนิคอาร์เอพีดีต่อไป บัฟเฟอร์ชนิดดังกล่าวจึงเหมาะที่จะใช้สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนปาล์มน้ำมัน โดยดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้น สอดคล้องกับผลการทดลองสกัดดีเอ็นเอในใบของ โกโก้ (Wilde *et al.*, 1992), หญ้าสโตโล (Kazan *et al.*, 1992), หอมกระเทียม (Susan *et al.*, 1993), อ้อย (Freqene *et al.*, 1994), ปาล์มน้ำมัน (Shah *et al.*, 1994) และ กะหล่ำ (Nozaki *et al.*, 2000)

1.2 ผลการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างกัน

ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยงมีผลต่อความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งมีผลต่อความสำเร็จของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยในการสกัดดีเอ็นเอมักจะมีการปนเปื้อนของ polyphenolic compound โพลีแซคคาไรด์ และ/หรือ โปรตีนซึ่งเป็นอุปสรรคที่สำคัญที่ทำให้ประสิทธิภาพของงาน molecular analysis ลดลง (Murray and Thompson, 1980) ฉะนั้นการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเหมาะสมย่อมเป็นสิ่งจำเป็น จากผลการทดลองพบว่าการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที สามารถแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากสารละลายบัฟเฟอร์ได้ปริมาณของดีเอ็นเอมากที่สุด และดีเอ็นที่ได้มีคุณภาพดีไม่ขาดเสียหายสอดคล้องกับการศึกษาในใบของ มะเขือเทศ (Chague *et al.*, 1996), หญ้าสโตโล (Kazan *et al.*, 1992), มะละกอ (Stiles *et al.*, 1993), ข้าวบาร์เล่ย์ Tinker *et al.*, 1993), ยูคาลิปตัส (Keil and Griffin., 1994) และพืชในตระกูล malus (Ur- Rahman *et al.*, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สภาวะที่เหมาะสมของการใช้เทคนิค

2.1 ผลจากการปรับความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยา

2.1.1 ผลจากการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$

ผลของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ถ้ามีความเข้มข้นของปฏิกิริยามากเกินไปจะทำให้มีการเพิ่มขยายผลิตผลที่ไม่จำเพาะทำให้เกิดการสะสมมากแต่ถ้ามีความเข้มข้นน้อยเกินไปจะลดปริมาณผลผลิตที่ต้องการทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของ $MgCl_2$ มีผลต่อการเกิด primer annealing ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันคือ 2.5 มิลลิโมลาร์สอดคล้องกับการจำแนกพันธุ์ของแอปเปิ้ล (Koller *et al.*,1993), ยาสูบ (Bai *et al.*, 1995), ถั่วลันเตา (Hoey *et al.*,1996) และข้าวโพด (Lanza *et al.*, 1997)

2.1.2 ผลการปรับความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ผลิตโดยแต่ละบริษัทอาจมีความแตกต่างกันในเรื่องของสภาวะที่เหมาะสม (assay condition) ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบความเข้มข้นที่พอเหมาะในการใช้เอ็นไซม์และตรวจสอบผลโดยใช้วิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีสในปฏิกิริยาพีซีอาร์ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอ็นไซม์สูงเกินไปจะมีผลให้เกิดการสะสมของผลิตผลที่เป็น nonspecific back ground เกิดขึ้นมากแต่หากใช้ในปริมาณต่ำเกินไปจะทำให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาต่ำทำให้แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไม่ชัดเจน (Saiki and Gelfand, 1989) ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันคือ 0.4 ยูนิตสอดคล้องกับการศึกษาในมะม่วง (Schnll *et al.*, 1995) และกะหล่ำ (Kresavich *et al.*, 1992)

2.1.3 ผลการปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์

ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.1-0.5 ไมโครโมลาร์ถ้าให้ความเข้มข้นสูงเกินไปจะส่งผลให้เกิดการจับคู่ผิดพลาดและมีการสะสมของผลผลิตที่ไม่จำเพาะมากขึ้น (วัชรี อัตตทิพยหลคุณ, 2536) ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันคือ 0.2 ไมโครโมลาร์สอดคล้องกับการศึกษาในหญ้าสโตโล (Kazan *et al.*, 1992), ถั่วลันเตา (Hoey *et al.*, 1996), ข้าวสาลี (Castagna *et al.*, 1997) และข้าวโพด (Lanza *et al.*, 1997)

2.1.4 ผลการปรับความเข้มข้นของ dNTPs

dNTPs ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) โดยปกติความเข้มข้นของแต่ละชนิดจะอยู่ระหว่าง 50-200 ไมโครโมลาร์โดยต้องปรับให้เป็นเป็นกลางที่ pH 7.0 และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ควรจะเตรียมเป็น primary stock solution ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์แล้วเจือจางเป็น working sample

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจาก dNTPs สามารถจับกับแมกนิเซียมอิออนดังนั้นปริมาณ dNTPs ในปฏิกิริยาจึงเป็นตัวกำหนด free Mg^{2+} ในปฏิกิริยามาตรฐานควรมีความเข้มข้นสุดท้ายของ dNTPs ทั้ง 4 ชนิดรวม 0.8 มิลลิโมลาร์ทำให้มีความเข้มข้นของ free Mg^{2+} เหลือ 0.7 จาก 1.5 มิลลิโมลาร์ที่ไม่ได้จับกับ dNTPs ฉะนั้นถ้าเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ dNTPs ควรจะต้องเปลี่ยนความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออนให้พอเหมาะเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างจำเพาะถูกต้องได้ปริมาณผลผลิตสูงและลดความผิดพลาดในการเรียงลำดับเบสคู่สม ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ dNTPs ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ 200 ไมโครโมลาร์สอดคล้องกับการศึกษาในหญ้าสโตโล (*Kazan et al.*, 1992), มันฝรั่ง (Karihaloo *et al.*, 1995) และ ท้อ (Lu *et al.*, 1996)

2.1.5 ผลการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบ

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบมีความจำเป็นต่อผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในปฏิกิริยาโดยทั่วไปดีเอ็นเอที่ใช้จะมีความเข้มข้นระหว่าง 5-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในกรณีที่ดีเอ็นเอมีความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดพลาดทำให้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาไม่ชัดเจนพอเนื่องจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ในสภาพที่ดีเอ็นเอมีความเข้มข้นสูงเกินไป (Saiki, 1989) ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรสอดคล้องกับการทดลองในข้าวสาลี (Devos and Gale, 1992), ข้าวบาร์เลย์ (Tinker *et al.*, 1993) และข้าว (Huang *et al.*, 1997)

2.2 ผลจากการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

อุณหภูมิและระยะเวลาที่ต้องการสำหรับ primer annealing ขึ้นกับลำดับเบส เนื่องจาก เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 20 – 85 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ให้ผลดีที่สุด อยู่ในช่วง 55 – 72 องศาเซลเซียส การเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าวช่วยลดการจับคู่ผิดพลาด และลดการเกิด misextension ของนิวคลีไทด์ที่ไม่ถูกต้องที่ 3' – end ของไพรเมอร์ ฉะนั้นอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ค่อนข้างสูงจะช่วยเพิ่มความจำเพาะ (Saiki, 1989) ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมันควรใช้อุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากการตรวจสอบผลโดยการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสพบว่าอุณหภูมิดังกล่าวให้แถบของดีเอ็นเอชัดเจนและเห็นความแตกต่างของ polymorphism สอดคล้องกับการทดลองในข้าวสาลี (Castagna *et al.*, 1997), pigeon pea (Ratnaparkhe *et al.*, 1995), ท้อ (peach) (Lu *et al.*, 1996), มันฝรั่ง Demeke *et al.*, (1996) และ มะม่วง (Valenzuela *et al.*, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบผลปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.1 ผลจากการปรับความเข้มข้นของเจลในขั้นตอนการตรวจสอบผล

ความเข้มข้นของเจลมีผลต่อความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เนื่องจากความสัมพันธ์ของขนาดดีเอ็นเอ และความเข้มข้นเจลจะเป็นไปตามสมการ $\log\mu = \log\mu_0 - K_r\tau$ โดย μ คือ ระยะการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ τ คือ ความเข้มข้นของเจลโดยทั่วไปความเข้มข้นเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ จะเหมาะกับขนาดดีเอ็นเอ 1 – 20 กิโลเบส 1.0 เปอร์เซ็นต์ เหมาะกับ 0.5 – 7 กิโลเบส 1.5 เปอร์เซ็นต์เหมาะกับ 0.2 – 3 กิโลเบส และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ เหมาะกับ 0.1 – 2 กิโลเบส (Sambrook, 1989) จากผลการทดลองพบว่าการใช้เจลที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นความเข้มเข้นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ เนื่องจากให้แถบดีเอ็นชัดเจน สามารถตรวจสอบผลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ง่ายที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาในข้าวสาลี (Devos and Gale, 1992), มะละกอ (Stiles *et al.*, 1993), ข้าวโอ๊ต (Heun *et al.*, 1994), มันฝรั่ง (Karihaloo *et al.*, 1995) และข้าว (Huang *et al.*, 1997)

3.2 ผลจากการปรับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในขั้นตอนการทำอิเล็คโตรโฟรีซีส

ในการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสด้วยระดับความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำจะช่วยลดความเสียหายของแถบดีเอ็นเอแต่อย่างไรก็ตามในการใช้กระแสไฟฟ้าต้องคำนึงถึงขนาดและน้ำหนักของแถบดีเอ็นเอด้วยโดยประสิทธิภาพของการแยกแถบดีเอ็นเอของอะกาโรสเจลจะลดลงในขณะที่กระแสไฟฟ้าเพิ่มสูงขึ้น (Sambrook, 1989) จากการทดลองใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าในการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสเพื่อตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอใบอ่อนปาล์มน้ำมันที่ระดับต่าง ๆ พบว่าความต่างศักย์ที่เหมาะสม คือ 80 โวลต์ เนื่องจากให้ความชัดเจนและระยะห่างระหว่างแถบของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการตรวจสอบความแตกต่าง สอดคล้องกับการศึกษาในข้าว Japonica (Mackill, 1995)

3.3 ผลการปรับความเข้มข้นของเอธิเดียมโบรไมด์ในการย้อมตรวจสอบผล

การเกิดแถบสว่างของแถบดีเอ็นเอหลังจากย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เกิดขึ้นเนื่องจากโมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์เข้าไปแทรกในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอและเมื่อนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอพบว่าความเข้มข้นของเอธิเดียมโบรไมด์ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรย้อมเป็นเวลานาน 30 นาทีจะให้แถบสว่างดีเอ็นเอที่ชัดเจนที่สุดสอดคล้องกับการศึกษาใน แตงกวา (Kennard *et al.*, 1994), องุ่น (Debener *et al.*, 1996), ถั่ว (Schneider *et al.*, 1997) และ ข้าวสาลี (Dweikat *et al.*, 1997)

4. ผลการคัดเลือกชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดี

เมื่อแยกขนาดดีเอ็นเอบนแผ่นเจลอะกาโรสด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีส จากการพิจารณาแถบดีเอ็นเอทีเกิดขึ้นทั้งหมดจากไพรเมอร์แต่ละชนิดให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กันในปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าสามารถเห็นความแตก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างจนเกิดรูปแบบเฉพาะในแต่ละพันธุ์ และระหว่างพันธุ์ซึ่งเรียกว่าเกิด polymophism โดยที่แถบดีเอ็นเอจะมีจำนวนระหว่าง 3 - 9 แถบ เฉลี่ย 6 แถบต่อ 1 ไพรเมอร์ ขนาดดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 0.35 – 1.7 กิโลเบส จำนวนทั้งหมด 81 แถบ จำนวนแถบและขนาดดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของไพรเมอร์ และดีเอ็นเอแม่แบบของปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันในบางแถบเมื่อเปรียบเทียบกันภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่มจะสามารถใช้เป็นตัวแทนหรือเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เฉพาะเจาะจงต่อการจัดกลุ่มของปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการทดลองนี้ และใช้ระบุพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้

จากการทดลองพบว่าเทคนิคอาร์เอพีดีทำให้เกิดความหลากหลายของรูปแบบแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ปาล์มน้ำมันซึ่งรูปแบบที่แตกต่างกันอาจเกิดจากสาเหตุดังนี้คือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบสใดเบสหนึ่งซึ่งไพรเมอร์จะเข้าไปจับ หรือเกิดจากมีการเพิ่มหรือขาดหายไปของลำดับชิ้นดีเอ็นเอตรงบริเวณระหว่างตำแหน่งที่ไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ arbitary primer ในการทำอาร์เอพีดีสามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมได้ (William *et al.*, 1990) ตัวอย่างเช่น Valenzuela *et al.*, (1997) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อดูความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในมะม่วงจำนวน 15 พันธุ์ เพื่อหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการระบุพันธุ์มะม่วง เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและทำได้รวดเร็ว Thompson *et al.*, 1998 ได้รายงานการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์ถั่วเหลืองโดยใช้ arbitary primer พบว่าแถบดีเอ็นเอบางแถบจะจำเพาะต่อพืชในแต่ละพันธุ์และสามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการจำแนกพันธุ์ได้สอดคล้องกับการใช้เทคนิคนี้ในปาล์มน้ำมัน

5. ผลจากการวิเคราะห์ผลเทคนิคอาร์เอพีดี

จากผลการทดลองสามารถจัดกลุ่มปาล์มน้ำมันได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33, ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับ พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62), และ ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ อีก 3 ตัวอย่าง ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.74 – 0.97; กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 2 ตัวอย่าง คือ พันธุ์พิสิเฟอรา 425, และพันธุ์ พิสิเฟอรา 427 ซึ่งมีดัชนีความเหมือนในกลุ่ม 0.74; กลุ่มที่ 3 คือ พันธุ์ดูรา 589, และ พันธุ์ดูรา 671 มีดัชนีความเหมือนในกลุ่มเป็น 0.69; และในกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339, พันธ์ดูรา 588 และลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่อีก 7 ตัวอย่าง ซึ่งมีดัชนีความเหมือนแตกต่างกันจึงไม่สามารถจัดเข้ากลับกลุ่มใด ๆ ได้ ภายในกลุ่มที่ 1 นอกจากจะประกอบด้วย ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ทั้ง 14 ตัวอย่าง รวมทั้งพันธุ์แม่ดูราแล้ว ยังประกอบด้วย ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) และลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่อีก 3 ตัวอย่าง (N8, N9, และ N10) ซึ่งการจัดกลุ่มดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ทั้ง 3 มีลักษณะพันธุกรรมใกล้เคียงกับลูกผสมเทเนราชั่วที่1 โดยมีดัชนีความเหมือนในช่วง 0.82 – 0.97 จึงมีแนวโน้มว่าการนำลูกผสมทั้ง 3 ตัวอย่างไปใช้ในการเพาะปลูก ก็น่าจะได้ผลผลิตที่มีความใกล้เคียงกับลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ซึ่งจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองดังกล่าวจำเป็นจะต้องมีการศึกต่อไปเพื่อดูความใกล้เคียงของลักษณะทางสัณฐานวิทยารวมทั้งผลผลิตโดยการนำลูกผสมทั้ง 3 ตัวอย่างไปเพาะปลูกเปรียบเทียบกับลูกผสมเทเนราชั่วที่1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

จากการวิเคราะห์ไอโซไซม์เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันพบว่าสามารถตรวจพบ activity ของเอนไซม์เพียง 2 ชนิดที่ให้ผลชัดเจนที่สุดคือ malate dehydrogenase และ esterase ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองระบบสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้แต่ไม่สามารถใช้ในการจำแนกลูกผสมออกจากพ่อแม่พันธุ์ได้อาจเนื่องมาจากการใช้เนื้อเยื่อในระยะการการเจริญเติบโตที่ต่างกันทั้งนี้เพราะการแสดงออกของเอนไซม์จะถูกควบคุมโดยระยะการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโต

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

การเตรียมดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมันใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการดัดแปลงของ Dellaporta *et al.*, (1983) โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS สกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมันและใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ในการหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนแยกสารสกัดดีเอ็นเอได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นประมาณ 300 – 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณและคุณภาพดีเพียงพอที่จะนำไปใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดี

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาในเทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นได้สมบูรณ์ใช้องค์ประกอบของสารในแต่ละปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร โดยประกอบด้วย น้ำกลั่น 3.8 ไมโครลิตร 10 × PCR buffer 1 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ 1 ไมโครลิตร, dNTPs เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร, primer เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 2 ยูนิตต่อไมโครลิตร 0.2 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 2 ไมโครลิตร ส่วนขั้นตอนการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอใช้อุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 45 cycles และ อุณหภูมิ terminate ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอนการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสเพื่อตรวจสอบผลโดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ เวลา 30 นาที จะให้ดีเอ็นเอที่ชัดเจนที่สุด

จากการใช้ไพรเมอร์ขนาด 10-mer oligonucleotide ที่มีลำดับเบสแบบสุ่มจำนวน 100 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 14 ชนิดจาก 5 ชุด (OPA OPC OPD OPE และ OPF ของบริษัท Operon Technology สหรัฐอเมริกา) ได้แก่ OPA11 OPA17 OPC07 OPC08 OPC15 OPD01 OPD03 OPD12 OPE01 OPE16 OPE17 OPE19 OPF07 และ OPF08 ทำให้เกิดการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มี polymorphism กันจำนวนทั้งหมด 81 แถบ โดยขนาดของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 0.35 – 1.7 กิโลเบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่าเทคนิคอาร์เอพีดีใช้ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้เป็นอย่างดี โดยจากการนำแถบดีเอ็นเอที่มี polymorphism ของปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33, พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339, ลูกผสมเทเนราชั่วที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับ พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, พันธุ์ดูรา 588 , พันธุ์ดูรา589 , พันธุ์ดูรา 671, พันธุ์พิสิเฟอรา 425 , พันธุ์พิสิเฟอรา 427 , ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62) และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรม และลำดับความสัมพันธ์ได้ในรูปของ phylogenetic tree โดยสามารถจัดแบ่งปาล์มน้ำมันได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย พันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33, ลูกผสมเทเนราชัวที่1 ระหว่างพันธุ์ดูรา 064 เบอร์ 33 กับ พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, ลูกผสมเทเนราเบอร์62 (F62), และ ลูกผสมไม่ทราบพ่อแม่ อีก 3 ตัวอย่าง ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.74 – 0.97; กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 2 ตัวอย่าง คือ พันธุ์พิสิเฟอรา 425 และพันธุ์พิสิเฟอรา 427 ซึ่งมีดัชนีความเหมือนในกลุ่ม 0.74; กลุ่มที่ 3 คือ พันธุ์ดูรา 589 และ พันธุ์ดูรา 671 มีดัชนีความเหมือนในกลุ่มเป็น 0.69; และในกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์พิสิเฟอรา 116 เบอร์ 339, พันธุ์ดูรา 588 และลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่อีก 7 ตัวอย่าง ซึ่งมีดัชนีความเหมือนแตกต่างกันจึงไม่สามารถจัดเข้ากลับกลุ่มใด ๆ ได้ เทคนิคอาร์เอพีดีจึงจัดเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถจะนำมาใช้จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่สะดวก ให้ผลรวดเร็ว เพื่อให้เกษตรกรสามารถเลือกใช้ปาล์มน้ำมันในการเพาะปลูกได้ถูกต้องตรงตามพันธุ์ที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ชวนพิศ อรุณรังสิกุล และคณะ. 2538. แบบของไอโซไซม์ในพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ไทย:หมาก สง. หน้า 1-15. ใน รายงานผลการวิจัยประจำปี 2538. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กำแพงแสน,นครปฐม.

ชินวัฒน์ ยัพวัฒพันธ์ และเกศิณี ระมิงค์วงศ์. 2542. การจำแนกพันธุ์ลิ้นจี่โดยวิธีสัณฐานวิทยาอิเล็กโทรโฟรีซีสและเซลล์พันธุศาสตร์. วารสารเกษตร. 15 : 98-108.

ทรงชัย ตันพิพัฒน์. 2529. ปาล์มน้ำมัน. หน้า 436-513. ใน พืชน้ำมัน. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

บุรชัย สนธยานนท์. 2536. การวิเคราะห์ DNA โดยดูจาก RFLP และ RAPD. หน้า 18.28-18.42. ใน คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ;เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และวิศวกรรม เล่มที่2. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยมหิดลศาลายา, นครปฐม.

ปุณฑริกา หะรินสุต. 2534. ไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสในมะม่วงต่างสายพันธุ์. เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องชีวเคมีทางการเกษตร. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2523. ปาล์มน้ำมัน. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

พรพันธุ์ ภู่พร้อมพันธุ์. 2537. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม. หน้า 24-28. ใน การฝึกอบรมทางวิชาการเรื่องการควบคุมและการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์พืช. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กำแพงแสน, นครปฐม.

วัชรี อัตตทิพยหลคุณ และ มนตรี อัตตทิพยหลคุณ. 2536. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology. โรงพิมพ์เรือนแก้ว, กรุงเทพฯ.

วิไลวรรณ โชติเกียรติ และอมรรัตน์ พงศ์ดารา. 2533. การศึกษาโปรตีนและไอโซไซม์ในสารสกัดใบปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนรา. วารสารสงขลานครินทร์. 12 : 21-28.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และคณะ. 2538. การจำแนกเพศต้นกล้าสละโดยใช้การวิเคราะไอโซไซม์. หน้า 1-15. ใน รายงานการวิจัยศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี, จันทบุรี.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2541. สถิติการเกษตรประเทศไทย ปีการเพาะปลูก 2540/41. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สุภาพ สุนทรนนท์ และคณะ. 2540. เทคนิคการใช้ไอโซไซม์ในการจำแนกพันธุ์และ clone ทุเรียน. วิทยาสารสถาบันวิจัยพืชสวน. 16 : 35-43.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัญชลี สามารถ. 2536. การจำแนกพันธุ์ไผ่โดยใช้รูปแบบไอโซไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Aitchitt, M. *et al.* 1993. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Plant Mol.Biol.Rep. 11:317-319.

Arulsekar, S. *et al.* 1986a. Genetic of malate dehydrogenase isozymes in the peach. The journal of Heredity. 77 : 49-51.

Bai, D. *et al.* 1995. Identification of two RAPD maker tightly linked with the *Nicotiana debneyi* gene for resistance to black root rot of tobacco. Theor.Appl.Genet. 91 : 1184-1189.

Castagna, R. *et al.* 1997. Genetic variability of wild diploid wheat *Triticum urartu* revealed by RFLP and RAPD markers. Theor.Appl.Genet. 94 : 424-430.

Chague, V. *et al.* 1996. Identification and mapping on Chromosome 9 of RAPD markers linked to Sw-5 in tomatoes by bulked segregant analysis. Theor.Appl.Genet. 95 : 1045-1051.

Crawford, D.J. 1983. Phylogenetic and systematic interferences from electrophoretic studies. Pages 418-461. In S.D. Tankley and T.J. Orton, eds. Isozymes in Plant Genetic and Breeding, Part A. Elsevier Science Publishers, Amsterdam .

Debener, T. *et al.* 1996. RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species. Mol.Bred. 2 : 321-327.

Dellaporta, S.L. *et al.* 1983. A plant DNA mini preparation : version 2. Plant.Mol.Biol.Rep. 1 : 19-21.

Demeke, T. *et al.* 1996. Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. Plant Cell Rep. 15 : 662-667.

Devos, K.M. and Gale, M.D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. Theor.Appl.Genet. 84 : 567-572.

Doehlert, D.C. and Duke, S.H. 1993. Specific determination of α-amylase activity in crude plant extracts containing α-amylase. Journal of Plant Physiology. 71 : 229-284.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leave tissues. Phytochem.Bull. 19 : 11-15.

Dweikat, S. *et al.* 1997. Identification of RAPD marker for Hessian fly resistance gene in wheat. Theor.Appl.Genet. 94 : 419-423.

Freqene, M.A. *et al.* 1994. Vaiability of chloroplast DNA and nuclear ribosomal dNA in cassava (*Manihot escalenta* Crantz) and it wild relatives. Theor.Appl.Genet. 89 : 719-727.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Heun, M. *et al.* 1994. A comparision of RAPD and isozyme analysis for determining genetic relationship among *Avena sterillis* L. accessions. Theor.Appl.Genet. 87 : 689-696.

Hoey, B.K. *et al.* 1996. A phylogenetic analysis of pisum based on morphological characters and allozyme and RAPD markers. Theor.Appl.Genet. 92 : 92-100.

Huang, N. *et al.* 1997. RFLP mapping of isozymes RAPD and QTLs for grain shape,brown planthoppers ressistance in a double haploid rice population. Mol.Bred. 3 : 105-113.

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

Karihaloo, J.L. *et al.* 1995. Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant *Solanum melongena* L.(Solanaceae). Theor.Appl.Genet. 90 : 767-770.

Kazan, K. *et al.* 1992. Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. Theor.Appl.Genet. 85 : 882-888.

Keil, M. and Griffin, A.R. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker in discrimination and verification of genotypes in Eucalyptus. Theor.Appl.Genet. 85 : 882-888.

Kennard, W.C. *et al.* 1994. Linkages among RFLP, RAPD, Isozyme, diseases resistanced morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. Theor.Appl.Genet. 89 : 42-48.

Koller, B. *et al.* 1992. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor.Appl.Genet. 85 : 901-904.

Kresavich, S. *et al.* 1992. Characterisation of genetic identities and relation ships of *Brassica olevacea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. Theor. Appl. Genet. 85 : 190-196.

Lanza, L.L.B. *et al.* 1997. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. Theor.Appl.Genet. 94 : 1023-1030.

Lu, Z.X. *et al.* 1996. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. Hort.Sci. 31 : 127-129.

Mackill,D.J. 1995. Classifying Japonica rice cultivars with RAPD markers. Crop Sci. 35 : 889-894.

Markert, C.L. and Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes : tissue,ontogenetic and species specific. Proc.Nat.Acad.Sci. 45 : 753-763.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mowrey, B.D. *et al.* 1983. Isozyme survey of various species of Pruns in the subgenus *Amygdalus.* Horticulturae. 44 : 251-560.

Murray, H.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucl.Acid.Res. 8 : 4321-4325.

Nozaki, T. *et al.* 2000. Construction of synteny groups of *Brassica alboglabra* by RAPD markers and detection of chromosome aberration and distorted transmission under the genetic background of *B. compestris.* Theor.Appl.Genet. 101 : 538-546.

Nyborn, H. *et al.* 1990. Genetic variation detected by use of the M13 DNA fingerprint probe in Malus Promus and Rubus (Rosaceae). Theor.Appl.Genet. 85 : 985-993.

Pasteur, N. and Pasteur, G. 1988.Standard solution for electrophoresis and staining. Pages 83-150. In Ellis Horwood Limited, ed. Practical isozyme genetics. John wiley and Son Ltd.,England.

Rahman, M.M. and Nito, N. 1994b. Phylogenetic relationships in the kumquat (*Fortunella*) as revealed by isozyme analysis. Scientia Horticulturae. 57 : 17-28.

Ratnaparkhe, M.B. *et al.* 1995. Genetic fingerprinting of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) and its wild relatives using RAPD marker. Theor.Appl.Genet. 91 : 893-898.

Saiki, R.K. *et al.* 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. Science. 230 : 1350-1354.

Saiki, R.K. and Gelfand, D.H. 1989. Introducing AmpliTaq DNA Polymerase. Amplification. 1 : 4-6.

Sambrook, J. *et al.* 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.

Scandalious, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of isozyme in plants. Biochemical Genetics. 3 : 37-79.

Schnell, R.J. *et al.* 1995. Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD marker. Theor. Appl.Genet. 90 : 269-274.

Schnieider, K.A. *et al.* 1997. Marker assisted selection to improve drought resistant in common bean. Crop Sci. 37 : 51-56.

Shah, F.H. *et al.* 1994. The utility of RAPD markers for determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). Theor.Appl.Genet. 89 : 713-718.

Shields, C.R. *et al.* 1983. A culture of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. Pages 418-450. In S.D.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tankley and T.J. Orton, eds. Isozymes in Plant Genetic and Breeding, Part A. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Soller, M. and Beckman, J.S. 1983. Genetic polymorphism in varietal identify and genetic improvement. Theor.Appl.Genet. 67 : 25-33.

Stile, J.I. *et al.* 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. Theor.Appl.Genet. 85 : 697-701.

Susan, E.W. *et al.* 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. Theor.Appl.Genet. 86 : 497-504.

Thom, M. and Meretzki, A. 1970. Peroxidase and esterase isozyme in Hawaiian sugarcane. Hawaiian planter'Record. 58 : 81-84.

Thompson, J.A. *et al.* 1998. Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. Crop Sci. 38 : 1348-1355.

Thormann, C.E. *et al.* 1994. Comparision of RFLP and RAPD marker to estimation genetic relationships within and among Crucifurous species. Theor.Appl.Genet. 88 : 973-980.

Tinker, N.A. *et al.* 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. Theor.Appl.Genet. 85 : 976-984

Ur-Rahman, H. *et al.* 1997. The use of RAPD for verifying the apomatic status of seedling of Malus species. Theor.Appl.Genet. 95 : 1080-1083.

Valenzuela, J.A.L. *et al.* 1997. Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivas using RAPD markers. Hort.Sci. 32 : 1105-1108.

Waugh, R. and Powell, W. 1992. Using RAPD marker for crop improvement. TIBTECH.10 : 189-191.

Weeden, N.F. *et al.* 1992. Inheritance reliability of RAPD markers. Pages 12-17. In Proc. Of the symp. Application of RAPD Technology to Plant Breeding. Minneapolis, New york.

Welsh, J. and mcClelland, M. 1990. Fingerprint genome using PCR with arbitary primers. Nucl.Acids Res. 18 : 721-7218.

Wilde, J. *et al.* 1992. Genetic fingerprinting of Theobroma clone using amplified polymorphic DNA markers. Theor.Appl.Genet. 86 : 871-877.

William, J.G.K. *et al.* 1990. DNA polymorphism amplified by arbitary primers useful as genetic markers. Nucleic acids Res. 18 : 6531-6535.

Yang, X. and Quiros, C. 1993. Identifying and classification of celery cultivar with RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 86 : 205-212.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yu, K.F. *et al.* 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Pages 287-301. In Glick, B.R. and Thompson, J.E, eds. Methods in plant molecular biology and biotechnology. CRC, New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

1. การเตรียมเจล เตรียมเจลตามสูตรดัดแปลงของชวนพิศ อรุณรังสิกุลและคณะ (2538) ซึ่งประกอบด้วยสารละลายดังนี้คือ

1.1 สารละลาย A ได้แก่ tris –HCl buffer pH 8.9 ซึ่งประกอบด้วย

1. 1N HCl	48 มิลลิลิตร
2. tris	36.6 กรัม
3. temed	0.23 มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรกรองและเก็บในที่มืด

1.2 สารละลาย B ได้แก่ tris –HCl buffer pH 6.7 ซึ่งประกอบด้วย

1. 1N HCl	48 มิลลิลิตร
2. tris	5.98 มิลลิลิตร
3. temed	0.46 มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรกรองและเก็บในที่มืด

1.3 สารละลาย C ได้แก่สารลาย acrylamide ซึ่งประกอบด้วย

1. acrylamide	28 มิลลิลิตร
2. N,N' methylene bisacrylamide	0.74 มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรกรองและเก็บในที่มืด

1.4 สารละลาย D ได้แก่สารละลาย ammonium persulfate ประกอบด้วย ammonium persulfate 0.1 กรัม ละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง

การเตรียมเจลที่ระดับความเข้มข้น 8.5 และ 12 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีปริมาณของสารละลายที่ใช้ในการเตรียม running gel และ stacking gel แสดงในตารางผนวกที่ 1 (ชวนพิศ อรุณรังสิกุลและคณะ. 2538)

2. การเตรียมอิเล็คโทรดบัฟเฟอร์ (10X tris buffer pH 8.3) ประกอบด้วย

1. tris	6.0 มิลลิลิตร
2. glycine	28.8 มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรหลังปรับ pH เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

3. Marker dye solution ประกอบด้วย

1. 0.25% bromophenol blue

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. 0.25% xylene cyanol FF

3. 30% glycerol in H_2O

ตารางผนวกที่ 1 แสดงปริมาณของสารละลายที่ใช้ในการเตรียมเจลตามสูตรดัดแปลงของ ชวนพิศ อรุณรังสิกุลและคณะ (2538)

%PAGE	running gel					stacking gel				
	A (ml)	B (ml)	H_2O (ml)	E (µl)	temed (µl)	C (ml)	D (ml)	H_2O (ml)	E (µl)	temed (µl)
8.5	11.87	4.55	8.57	75	0.5	0.72	1.25	4.20	27.72	0.5
12	2.75	9.05	10.21	150	0.5	0.54	0.73	2.74	18	0.5

4. การเตรียมสีย้อมเอนไซม์

4.1 สีย้อมเอนไซม์ Esterase (E.C.3.1.1.2) ดัดแปลงจากของ Thom and Maretzki (1970) ประกอบด้วย

1. 0.1M phosphate buffer pH 6.0 100 มิลลิลิตร
2. fast blue RR salt 150 มิลลิลิตร
3. 1% α naphthyl acetate + 1%β naphthyl acetate in absolute ethanol 3 มิลลิลิตร

การเตรียมสีย้อมนำสารในข้อ 1 และ 2 ผสมกันก่อนย้อมประมาณ 30 นาทีเมื่อจะทำการย้อมเจลจึงเติมสารในข้อ 3 ลงไป

การเตรียม 0.1M phosphate buffer pH 6.0 เตรียม 250 มิลลิลิตรประกอบด้วย

sodium phosphate monobasic 3.45 กรัม

potassium phosphate monobasic 3.40 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรหลังปรับ pH เท่ากับ 250 มิลลิลิตร

4.2 สีย้อมเอนไซม์ Acid phosphatase (E.C.3.1.3.2) (Scandalios 1969) ประกอบด้วย

1. 0.5M acetate buffer pH 4.8 100 มิลลิลิตร
2. fast blue RR salt 150 มิลลิลิตร
3. 1% α naphthyl acid phosphate + 1%β naphthyl acid phosphate in 50% acetone 3 มิลลิลิตร
4. 1M $MgCl_2$ $6H_2O$ 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสีย้อมนำสารในข้อ 1 และ 2 ผสมให้เข้ากันก่อนย้อมประมาณ 30 นาที เมื่อจะทำการย้อมเจลจึงเติมสารในข้อ 3 และ 4 ลงไป

การเตรียม 0.5M acetate buffer pH 4.8 เตรียม 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วย sodium acetate trihydrate 17.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรหลังปรับ pH เท่ากับ 250 มิลลิลิตร

4.3 สีย้อมเอนไซม์ Peroxidase (E.C.1.11.1.7) Thom and Maretzki (1970) ประกอบด้วย

stock A

1. 3 –amino-9-ethylcarbazol	420 มิลลิกรัม
2. β - napthol	290 มิลลิกรัม
3. acetone	200 มิลลิลิตร

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันเก็บในที่มืดอุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส

stock B (0.0125 M tris-acetate buffer pH 4.0) เตรียม 2,500 มิลลิลิตรประกอบด้วย

1. tris	3.78 กรัม
2. acetic acid	4.05 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรหลังปรับ pH เท่ากับ 2,500 มิลลิลิตร

stock C

1. 30% H_2O_2	10 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง

ใช้จะใช้อัตราส่วนระหว่าง stock A: stock B: stock C=20:80:1 โดยปริมาตร และปฏิกิริยาจะสิ้นสุดในช่วง 20-30 นาที

4.4 สีย้อม Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) Pasteur and Pasteur (1988) ประกอบด้วย

1. tris –A buffer	35 มิลลิลิตร
2. 2M MALIC acid pH 7.0	5 มิลลิลิตร
3. 0.5M $MgCl_2$	0.3 มิลลิลิตร
4. 1%NAD in H_2O	2 มิลลิลิตร

ก่อนใช้เติม :

5. 1%NBT in H_2O	1 มิลลิลิตร
6. 1%PMS in H_2O	0.5 มิลลิลิตร
7. 1%MTT in H_2O	1 มิลลิลิตร

บ่มเจลในที่มืดจนเกิดแถบสีน้ำเงินใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที

การเตรียม tris –A buffer (0.2M tris-HCl pH 8.0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EDTA	0.2 กรัม
tris	12.1 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรหลังปรับ pH 500 มิลลิลิตร

การเตรียม 2M Malic acid pH 7.0 เตรียม 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

malic acid	134.1 กรัม
NaOH in flakes	80 กรัม

ข้อควรระวังในการเตรียมคือควรเตรียมในบีกเกอร์ที่วางบนจานที่ใส่น้ำแข็งเติมน้ำกลั่น 350 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์เพื่อละลาย malic acid คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วค่อย ๆ เติม NaOH จนหมดเมื่อสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร หลังจากปรับ pH โดยใช้ NaOH in flakes

4.5 สีย้อม Lactate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.27) Pasteur and Pasteur (1988) ประกอบด้วย

1. tris A buffer	35 มิลลิลิตร
2. 0.5M DL-Lactic acid	6 มิลลิลิตร
3. 1%NAD in H_2O	1 มิลลิลิตร

ก่อนใช้เติม :

5. 1%NBT in H_2O	0.3 มิลลิลิตร
6. 1%PMS in H_2O	0.5 มิลลิลิตร

บ่มเจลในที่มืดจนกระทั่งเกิดแถบสีน้ำเงิน

4.6 สีย้อม Glucose-6-phosphate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.77) Pasteur and Pasteur (1988) ประกอบด้วย

1. tris A buffer	5 มิลลิลิตร
2. glucose-6-phosphate	10 มิลลิกรัม
3. 1%NADP in H_2O	0.2 กรัม
4. 0.5M $MgCl_2$	2 กรัม

ก่อนย้อมเติม :

1. 1%NBT in H_2O	0.1 มิลลิลิตร
2. 1%MTT in H_2O	0.1 มิลลิลิตร
3. 1%PMS in H_2O	0.3 มิลลิลิตร

บ่มเจลในที่มืดจนเกิดแถบสีน้ำเงินใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

4.7 สีย้อม Glutamate dehydrogenase (E.C. 1.4.1.2) Pasteur and Pasteur (1988) ประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. phosphate I buffer	16 มิลลิลิตร
2. H_2O	11 มิลลิลิตร
3. L-glutamic acid	1.3 กรัม
4. 1%NAD in H_2O	3 มิลลิลิตร
ก่อนใช้เติม :	
5. 1%NBT in H_2O	1 มิลลิลิตร
6. 1% PMS in H_2O	0.25 มิลลิลิตร

บ่มเจลในที่มืดจนเกิดแถบสีน้ำเงินซึ่งใช้เวลาหลายชั่วโมง

การเตรียม phosphate I buffer (0.2M phosphate pH 9.2)

Na_2HPO_4	28.2 กรัม
H_2O	1,000 มิลลิลิตร

4.8 สีย้อม Alcohol dehydrogenase (E.C. 1.1.1.1) Pasteur and Pasteur (1988) ประกอบด้วย

1. tris A buffer	40 มิลลิลิตร
2. 0.5M $MgCl_2$	0.2 มิลลิลิตร
3. 95% ethanol	3 มิลลิลิตร
4. 1%NAD in H_2O	2 มิลลิลิตร
ก่อนใช้เติม :	
5. 1%NBT in H_2O	1 มิลลิลิตร
6. 1%MTT in H_2O	0.3 มิลลิลิตร
7. 1%PMS in H_2O	0.5 มิลลิลิตร

บ่มเจลในที่มืดจนเกิดแถบสีน้ำเงินซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที

4.9 สีย้อม Superoxide dimutase indophenol oxidase (E.C.1.15.1.1) Pasteur and Pasteur (1988) ประกอบด้วย

1. tris A buffer	40 มิลลิลิตร
2. 0.5M $MgCl_2$	0.2 มิลลิลิตร
3. 1%NAD in H_2O	1 มิลลิลิตร
ก่อนใช้เติม :	
5. 1%NBT in H_2O	1 มิลลิลิตร
6. 1%PMS in H_2O	0.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มเจลภายใต้แสงจากหลอดนีออนจนเกิดแถบสีน้ำเงินซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1–2 ชั่วโมงจะปรากฏแถบสว่างและบนพื้นเจลจะเกิดสีน้ำเงิน

4.10 สีย้อม Sorbital dehydrogenase (E.C.1.1.1.14) Pasteur and Pasteur (1988) ประกอบด้วย

1. tris A buffer	40 มิลลิลิตร
2. D-sorbital	250 มิลลิกรัม
3. 0.5MM$MgCl_2$	0.2 มิลลิลิตร
4. 1%NAD in H_2O	2 มิลลิลิตร

ก่อนใช้เติม :

5. 1%NBT in H_2O	1 มิลลิลิตร
6. 1%MTT in H_2O	0.3 มิลลิลิตร
7. 1%PMS in H_2O	0.5 มิลลิลิตร

บ่มเจลในที่มืดจนเกิดแถบสีน้ำเงินซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาทีขึ้นไป

4.11 สีย้อม Xanthine dehydrogenase (E.C.1.2.1.37) Pasteur and Pasteur (1988) ประกอบด้วย

1. tris A buffer	40 มิลลิลิตร
2. hypoxanthine	100 มิลลิกรัม

นำไปผสมกันแล้วต้มจนเดือดให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันปล่อยให้เย็นแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ก่อนใช้เติม :

3. 1%NAD in H_2O	1 มิลลิลิตร
4. 1%NBT in H_2O	1 มิลลิลิตร
5. 1% PMS in H_2O	0.5 มิลลิลิตร

บ่มเจลในที่มืดอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเกิดแถบสีน้ำเงิน

4.12 สีย้อม Alkaline phosphate (E.C.3.1.3.1) Pasteur and Pasteur (1988) ประกอบด้วย

1. α - naphthyl acid phosphate	50 มิลลิกรัม
2. fast blue RR salt	50 มิลลิกรัม

ก่อนใช้เติม :

4. tris D buffer	40 มิลลิลิตร
5. 0.5M $MgCl_2$	0.6 มิลลิลิตร
6. 0.25M $MnCl_2$	1.2 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มเจลในที่มืดจนเกิดแถบสีน้ำตาลซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาทีขึ้นไป

การเตรียม Tris D buffer (0.05M tris-NaCl pH8.7)

1. tris	6.05 กรัม
2. 1N HCl	3.3 มิลลิลิตร
3. NaCl	6.7 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรหลังจากปรับ pH เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

1. การเตรียมสารเคมีและขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

1.1 การเตรียมสารเคมี

1.1.1 1M tris-HCl pH 8.0 เตรียม 1 ลิตร ประกอบด้วย tris 121.1 กรัมละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรหลังปรับ pH เท่ากับ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1.1.2 0.1M tris-HCl pH 7.6 เตรียม 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย tris 6.005 กรัมละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรหลังปรับ pH เท่ากับ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1.1.3 0.5M EDTA pH8.0 เตรียม 1 ลิตรประกอบด้วย

1. EDTA	186.1 กรัม
2. NaOHในรูปของเกล็ด	20 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรหลังปรับ pH เท่ากับ 1 ลิตรซึ่ง EDTA จะเริ่มละลายเมื่อ pH เท่ากับ 8

1.1.4 5M NaCl เตรียม 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย NaCl 146.1 กรัมละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1.1.5 สารละลาย SDS เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ pH 7.2 เตรียม 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย SDS 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจากนั้นให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส เพื่อให้สารละลายได้ดีขึ้นปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตรหลังจากปรับ pH (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อเนื่องจากสารระเหยที่ได้จาก SDS มีอันตราย)

1.1.6 5M potssium acetate เตรียม 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วย potassium acetate 122.5 กรัมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1.1.7 3M sodium acetate pH 5.2 เตรียม 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วย sodium acetate 102.06 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตรหลังจากปรับ pH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1.1.8 5XTE buffer ประกอบด้วย 50 mM tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH8.0 เตรียม 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

1. 1M tris-HCl pH 8.0	25 มิลลิลิตร
2. 0.5M EDTA pH 8.0	10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1.1.9 1XTE buffer เตรียม 1,000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 5XTE buffer 200 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1.1.10 phenol:chloroform:isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 เตรียม 1,000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย phenol 500 มิลลิลิตร, chloroform 480 มิลลิลิตรและ isoamyl alcohol 20 มิลลิลิตร ผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีชา

1.1.11 chloroform:isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 เตรียม 500 มิลลิลิตรประกอบด้วย chloroform 480 มิลลิลิตรและ isoamyl alcohol 20 มิลลิลิตร ผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีชา

1.1.12 absolute ethanol เตรียม 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.1.13 75 % ethanol เตรียม 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย absolute ethanol 375 มิลลิลิตร ผสมรวมกันกับน้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.1.14 isopropyl alcohol เตรียม 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.1.15 salt buffer ประกอบด้วย 100 mM tris-HCl pH8.0, 50 mM EDTA pH8.0, 500 mM NaCl และ 10 mM β– mercaptoethanol เตรียม 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

1. 1M tris –HCl pH 8.0	100 มิลลิลิตร
2. 0.5M EDTA pH 8.0	100 มิลลิลิตร
3. 2.5M NaCl	200 มิลลิลิตร
4. 1M β– mercaptoethanol	10 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.1.16 SDS buffer ประกอบด้วย 50 mM tris-HCl pH7.6, 50 mM EDTA pH8.0, 10 mM NaCl, 10 mM β– mercaptoethanol และ 0.5 % SDS เตรียม 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

1. 0.1M tris –HCl pH 7.6	250 มิลลิลิตร
2. 0.5M EDTA pH 8.0	50 มิลลิลิตร
3. 2.5M NaCl	2 มิลลิลิตร
4. 1M β – mercaptoethanol	5 มิลลิลิตร
5. 20% SDS	12.5 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.1.17 CTAB buffer ประกอบด้วย 200 mM tris-HCl pH 8.0, 40 mM EDTA pH8.0, 2.8 M NaCl, 10 mM β– mercaptoethanol และ 4 % CTAB เตรียม 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

1. 1M tris –HCl pH 8.0	100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. 0.5M EDTA pH 8.0	40 มิลลิลิตร
3. 5M NaCl	280 มิลลิลิตร
4. 1M β– mercaptoethanol	5 มิลลิลิตร
5. CTAB	20 กรัม

ผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

1.2.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Salt buffer ตามวิธีการดัดแปลงจาก Yang and Quiros. (1993)

1. นำใบอ่อนปาล์มน้ำมัน 0.5 กรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วถ่ายใส่หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีบัฟเฟอร์ 1.2 มิลลิลิตร

2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

3. นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

4. ดูดสารละลายใสส่วนบน (supernatant) 700 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) 600 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

5. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา นาน 2 นาที

6. ดูดสารละลายใสส่วนบน 600 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่แล้วสกัดซ้ำด้วย chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 600 ไมโครลิตรผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ดูดสารละลาย 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่เติม 3 M NaOAc pH 5.2 50 ไมโครลิตร, 100% ethanol 1 มิลลิลิตรนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

8. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

9. ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol ทำซ้ำ 3 ครั้ง

1.2.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ SDS buffer ตามวิธีการดัดแปลงจาก Dellaporta (1993)

1. นำใบอ่อนปาล์มน้ำมัน 0.5 กรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วถ่ายใส่หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ผสมโดยให้เข้ากันเป็นครั้งคราว

3. เติม 5 M KOAc 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันเบาๆ (gentle mix) แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในขั้นนี้โปรตีนและโพลีแซคคาไรด์จะตกตะกอนรวมกับ KOAc เหลือกรดนิวคลีอิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่ในสารละลาย

4. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที

5. ดูดสารละลายใสส่วนบน 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม isopropyl alcohol ที่เย็นจัด (-20 องศาเซลเซียส) 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันจะพบว่าเกิดส่วนที่เป็นวุ้นใสลอยอยู่คือส่วนของดีเอ็นเอดีเอ็นเอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

6. เทสารละลายทิ้งให้เหลือเฉพาะส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นวุ้นใสแล้วเติม 75%ethanol ที่เย็นจัด (-20 องศาเซลเซียส) เขย่าเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาทีดูดสารละลายใสส่วนบนทิ้งให้เหลือเฉพาะส่วนของตะกอน ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 3 ครั้ง

7. ละลายตะกอนของดีเอ็นเอโดยใช้ 0.1XTE buffer 1 มิลลิลิตร นำดีเอ็นเอไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.2.3 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ CTAB buffer ตามวิธีการของ Doyles and Doyles(1987)

1. นำใบอ่อนปาล์มน้ำมัน 0.5 กรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วเติมบัฟเฟอร์ 7 มิลลิลิตรลงไปในโกร่งผสมให้เข้ากันตักใส่หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3. เติม isoamyl alcohol ปริมาตรเท่าตัวแล้วผสมให้เข้ากันเบา ๆ (gentle mix)

4. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

5. ดูดสารละลายใสส่วนบนซึ่งเป็นส่วนของ isoamyl alcohol ที่ผสมอยู่กับดีเอ็นเอใส่ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

6. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

7. เทสารละลายทิ้งให้เหลือเฉพาะส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นวุ้นใสแล้วเติม 75% ethanol ที่เย็นจัด (-20 องศาเซลเซียส) เขย่าเบา ๆแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาทีดูดสารละลายใสส่วนบนทิ้งให้เหลือเฉพาะส่วนของตะกอน ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 3 ครั้ง

8. นำดีเอ็นเอไปผึ่งไว้ใน laminar flow เพื่อให้ alcohol ระเหยให้หมดจากดีเอ็นเอ

9. ละลายตะกอนของดีเอ็นเอโดยใช้ 0.1XTE buffer 1 มิลลิลิตร นำดีเอ็นเอไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารเคมีและขั้นตอนการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ

2.1 การเตรียมสารเคมี

2.1.1 1M boric acid เตรียม 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย boric acid 30.92 กรัมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 1XTBE buffer ประกอบด้วย 89 mM tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA pH 8.0 และ 89 mM boric acid เตรียม 1 ลิตร ประกอบด้วย

1. 1M tris-HCl pH 8.0	89 มิลลิลิตร
2. 2 0.5M EDTA pH 8.0	4 มิลลิลิตร
3. 1M boric acid	89 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร

2.1.3 10mg/ml ethidium bromide เตรียม 100 มิลลิลิตรประกอบด้วย ethidium bromide 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนจนสารละลายเข้ากันดีใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมงเก็บไว้ในขวดสีชา

2.1.4 6X loading dye solution ประกอบด้วย 0.25% bromophenol blue และ 40% sucrose เตรียม 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

1. bromophenol blue	0.025 กรัม
2. sucrose	4 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.5 10X dye (type 2 dry matter) ประกอบด้วย 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol และ 25% ficoll (type 400) เตรียม 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

1. bromophenol blue	0.125 กรัม
2. xylene cyanol	0.125 กรัม
3. ficoll (type 400)	12.5 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.6 0.8 % agarose gel เตรียม 50 มิลลิลิตรประกอบด้วย

1. agarose	0.4 กรัม
2. 1XTBE buffer	50 มิลลิลิตร

ละลาย agarose ด้วย TBE buffer นำไปต้มจนเดือดคนให้สารละลายเข้ากันดีทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส นำมาเทลงบนถาดสำหรับเตรียมเจลเสียบหวี (comb) เพื่อให้เกิดช่อง (well)

2.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบการเรืองแสงของดีเอ็นเอหลังจากย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ การเรืองแสงเกิดจากโมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์เข้าแทรกอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ แล้วเมื่อนำไปส่องแสงอัลตราไวโอเล็ตจะเกิดการเรืองแสง ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ

2.1.1 ผสมสารละลายดีเอ็นเอเข้ากับ loading dye ในอัตราส่วน 2:1 หยอดลงใน well ของแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นคือ 10, 100 และ 200 นาโนกรัม โดยมี 1X TBE buffer เป็นอิเล็คโทรดบัฟเฟอร์เดินกระแสไฟฟ้าคงที่ 80 โวลต์ ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวกจนกระทั่งแนวการเดินทางของ loading dye เคลื่อนที่ห่างจากขอบเจลด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตรจึงปิดเครื่องอิเล็คโตรโฟรีซีส

2.2.2 นำแผ่นเจลย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร นาน 10-30 นาทีแล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 10 นาที

2.2.3 นำแผ่นเจลส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตถ่ายภาพเพื่อนำมาเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3. การเตรียมสารเคมีและขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.1 การเตรียมสารเคมี

3.1.1 เตรียมสารผสม (master mix) ตามความเข้มข้นและปริมาณดังนี้คือ

1. 10X PCR buffer	1 ไมโครลิตร
2. 2.5 mM $MgCl_2$	1 ไมโครลิตร
3. 0.2 unit /µl *Taq* DNA polymerase	0.2 ไมโครลิตร
4. 0.2µM primer	1 ไมโครลิตร
5. 200µM dNTPs	1 ไมโครลิตร
6. น้ำกลั่น	3.8 ไมโครลิตร

3.1.2 เตรียมสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.2 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.2.1 ดูดสารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรปริมาตร 2 ไมโครลิตรใส่ในหลอดพีซีอาร์

3.2.2 เตรียม master mix ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆดังแสดงไว้ดังข้อ 3.1.1 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer

3.2.3 เติม master mix ปริมาตร 8 ไมโครลิตรลงในหลอดพีซีอาร์ซึ่งมีดีเอ็นเอในข้อ 3.2.1

3.2.4 หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เสร็จแล้วนำ PCR product ที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาตรวจสอบ polymorphism ด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส ขั้นตอนการตรวจสอบมีดังนี้คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ผสมสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับ loading dye ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรมาผสมรวมกับ loading dye 5 ไมโครลิตรหยอดลงใน well ของแผ่นอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์โดยใช้ 100 base pair ladder marker ใช้ 1X TBE buffer เป็นอิเล็คโทรดบัฟเฟอร์เดินกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวกจนกระทั่งแนวการเดินทางของ loading dye เคลื่อนที่ห่างจากขอบเจลด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตรจึงปิดเครื่องอิเล็คโตรโฟรีซีส

2. นำแผ่นเจลย้อมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรแล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที

3. นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตถ่ายภาพเพื่อนำไปศึกษาและสรุปผลการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ 2

ตารางผนวกที่ 2.1 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA11 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPA11 1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1
OPA11 1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1
OPA11 1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
OPA11 800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA11 700	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA11 500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
OPA11 450	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.2 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA17 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPA17 1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
OPA17 1400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA17 1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
OPA17 850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA17 680	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.3 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPC07 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPC07 1700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
OPC07 1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
OPC07 900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC07 800	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
OPC07 700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA07 550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2.4 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPC08 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPC08 1200	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
OPC08 900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC08 750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.5 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPC15 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPC15 1800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
OPC15 1250	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
OPC15 1100	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
OPC15 650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC15 600	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.6 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPD01 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็น

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPD01 1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
OPD01 1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0
OPD01 1000	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
OPD01 850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD01 600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.7 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF08 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPF08 1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF08 1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF08 750	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
OPF08 650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF08 550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF08 450	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2.8 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPD03 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPD03 1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD03 1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
OPD03 1050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
OPD03 950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD03 800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD03 750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD03 650	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
OPD03 550	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
OPD03 380	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.9 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPD12 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็น

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPD12 1450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD12 1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD12 1000	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
OPD12 850	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD12 750	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
OPD12 600	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0

ตารางผนวกที่ 2.10 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPE01 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPE01 1500	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
OPE01 1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE01 950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE01 800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE01 700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE01 650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE01 500	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2.11 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPE16 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ “1” กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ “0” กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPE16 1350	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
OPE16 1200	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
OPE16 950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPE16 800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE16 650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.12 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPE17 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ “1” กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ “0” กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPE17 1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
OPE17 1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE17 1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE17 900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE17 650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE17 550	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1

ตารางผนวกที่ 2.13 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPE19 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ “1” กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ “0” กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPE19 1400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPE19 1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE19 1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE19 850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE19 800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE19 400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2.14 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF07 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPF07 1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
OPF07 750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF07 650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF07 550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF07 350	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้