



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมัน

Expression Study of Genes During Somatic Embryogenesis of Oil Palm

(*Elaeis guineensis* Jacq.)

นามผู้วิจัย นางสาวอมอร รุ่งแจ้งสุวรรณ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ชัชวาล จันทราสุริยรัตน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์อัญชณี คูเบอร์่า, ป.ร.ค.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, Dr.Agr.Sci.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมัน

Expression Study of Genes During Somatic Embryogenesis of Oil Palm

(*Elaeis guineensis* Jacq.)

โดย

นางสาวเอมอร รุ่งแจ้งสุวรรณ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอมอร รุ่งแจ้งสุวรรณ 2554: การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมัน ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ชัชวาล จันทราสุริยรัตน์, Ph.D. 83 หน้า

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณของปาล์มน้ำมันใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการพัฒนาต้นอ่อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของปาล์มน้ำมัน เพื่อนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในการย่นระยะเวลากระบวนการพัฒนาต้นอ่อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของปาล์มน้ำมัน โดยได้ศึกษาการแสดงออกของยีน 4 ยีน คือยีน *SERK* (*somatic embryogenesis receptor like kinase*) ยีน *LEC1* (*Leafy cotyledon 1-like*) ยีน *WUSCHEL* และยีน *BBM* (*BABY BOOM*) ในระยะต่างๆ ของการพัฒนาเป็นต้นอ่อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ ระยะรูปกลม (*globular*) ระยะทอร์ปิโด (*torpedo*) ระยะใบเลี้ยง (*cotyledon*) ระยะต้นอ่อน (*plantlet*) และแคลลัส (*callus*) รวมทั้งในดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย พบว่ายีน *SERK* มีระดับการแสดงออกเท่ากันในทุกเนื้อเยื่อ ยีน *WUSCHEL* ไม่พบการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อที่ทดสอบ ส่วนยีน *LEC1* กับยีน *BBM* มีการแสดงออกมากในระยะพัฒนาจาก *callus* เป็นต้นอ่อน ทั้งระยะ *globular*, *torpedo*, *cotyledon* และ *plantlet* จากผลการทดลองคาดว่ายีนทั้งสองนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งข้อมูลนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อศึกษาย่นระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันได้

Emon Rungjangsuwan 2011: Expression Study of Genes During Somatic Embryogenesis of Oil Palm, (*Elaeis guineensis* Jacq.) Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Mr. Chatchawan Jantasuriyarat, Ph.D. 83 pages.

Micropropagation of oil palm usually takes a long period of time. This research project aims to investigate genes involved in somatic embryogenesis of oil palm during tissue culture process in order to shortening the length of this process. We start with expression study of four genes of interest including *SERK* (somatic embryogenesis receptor like kinase), *LEC1* gene (*Leafy cotyledon 1-like*), *WUSCHEL* and *BBM* (*BABY BOOM*) in oil palm tissue during embryogenesis; callus, globular, torpedo, cotyledon and plantlet and male and female flowers. Results show that *SERK* constitutively expressed in all tissue types and *WUSCHEL* did not express in any tissue types examined. *LEC1* and *BBM* genes expressed at high level during somatic embryogenesis including globular, torpedo, cotyledon and plantlet stages. Our results suggested that *LEC1* and *BBM* genes are involved in the regulation of the somatic embryogenesis in oil palm during tissue culture. The information from this research will be useful for the study the mechanism of the somatic embryogenesis of oil palm during tissue culture and to shortening this process in the future.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร. ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบพระคุณ ดร. อัญชณี คุเบอรา กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำหรับสถานที่ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ Mrs. Mya Thurza สำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ พี่ชาติรี แสนสุข และ เพื่อน พี่ น้อง ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับคุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรักและกำลังใจ ให้การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

एमОР รุ่งแจ้งสุวรรณ

เมษายน 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	26
ผลและวิจารณ์	39
สรุปและข้อเสนอแนะ	50
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	51
ภาคผนวก	56
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	83

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาต้นอ่อน	22
2	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์จำเพาะสำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาต้นอ่อน	22
3	แสดงผลการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากวิธี cDNA AFLP กับนิวคลีโอไทด์จากพืชชนิดอื่น	47
ตารางผนวกที่		
1	แสดงผลข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่ได้จาก cDNA AFLP	77
2	แสดงลำดับเบสของ AFLP ไพร์เมอร์	82

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	รูปแบบการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช	12
2	การพัฒนาเป็นอวัยวะ (Organogenesis)	13
3	พัฒนาเป็นเอ็มบริโอ (Embryogenesis)	13
4	พัฒนาเป็นแคลลัส (Callus formation)	13
5	ขั้นตอนกระบวนการพัฒนาค้นอ่อนของปาล์มน้ำมัน	15
6	ระดับการแสดงออกของยีน <i>Actin</i> , <i>SERK</i> , <i>LEC1</i> และ <i>BBM</i> ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปาล์มน้ำมัน	40
7	ความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาค้นอ่อนในปาล์มน้ำมันกับพืชอื่นๆ	41
8	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอระยะพัฒนาค้นอ่อนของปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ระยะรวมทั้งดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและใบ โดยใช้เทคนิค AFLP แยกชิ้นดีเอ็นเอด้วย 4.5% denature polyacrylamide gel ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย silver stain	43
9	แสดงบริเวณแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คัดเลือกในระยะพัฒนาค้นอ่อนของปาล์ม น้ำมันทั้ง 5 ระยะรวมทั้งดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและใบ โดยใช้เทคนิค AFLP	46

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า	
1	ระยะต่างๆ ของปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ	57
2	อาร์เอ็นเอเข้มข้น 100 ng/ml (1) แคลลัส (callus) (2) ระยะรูปกลม (Globular) (3) ระยะทอร์ปิโด (Torpedo) (4) ระยะใบเลี้ยง (Cotyledon) (5) ระยะต้นอ่อน (Plantlet) (6) ดอกตัวผู้(7) ดอกตัวเมีย และ (8) ใบ	57
3	การวิเคราะห์ multiple alignment ของยีน <i>SERK</i> จากพืชชนิดต่างๆ	58
4	การวิเคราะห์ multiple alignment ของยีน <i>LEC1</i> จากพืชชนิดต่างๆ	62
5	การวิเคราะห์ multiple alignment ของยีน <i>WUSCHEL</i> จากพืชชนิดต่างๆ	64
6	การวิเคราะห์ multiple alignment ของยีน <i>BBM</i> จากพืชชนิดต่างๆ	65
7	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>SERK</i> ทั้ง 10 โคลนี	68
8	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>Lec1</i> ทั้ง 10 โคลนี	70
9	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>BBM</i> ทั้ง 10 โคลนี	72
10	ภาพเปรียบเทียบระหว่าง non embryogenic (ฝั่งซ้าย) และ embryogenic (ฝั่งขวา)	76
11	แสดงบริเวณแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณ ด้วยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ ขึ้น Selective DNA amplification ในระยะพัฒนาต้นอ่อนของปาล์ม น้ำมันทั้ง 5 ระยะรวมทั้งดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและใบ โดยใช้เทคนิค AFLP	76

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมัน

Expression Study of Genes During Somatic Embryogenesis of Oil Palm

(*Elaeis guineensis* Jacq.)

คำนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจของคนไทย ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย และเป็นที่ยอมรับกันมากของชาวสวนในปัจจุบัน เนื่องจากมีความสำคัญทางอุตสาหกรรมน้ำมันเป็นอย่างมาก สามารถนำมาใช้ในการผลิตน้ำมันชีวภาพ หรือ ไบโอดีเซล ความต้องการของตลาดมีแนวโน้มสูงทั้งภายในและภายนอกประเทศ เพื่อทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมที่จะต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาสูง จึงทำให้ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย สามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรอย่างมาก น้ำมันที่ได้จากปาล์มนอกจากจะมีคุณภาพดีแล้ว ยังถือได้ว่าปาล์มน้ำมันเป็นพืชชนิดเดียวที่สามารถให้ผลผลิตน้ำมันต่อไร่สูงเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น เป็นพืชที่ให้ผลผลิตยาวนาน ต้นทุนการดูแลรักษาในระยะหลังมีน้อยและไม่ยุ่งยาก

สำหรับประเทศไทย ปัจจุบัน ผลผลิตน้ำมันปาล์มจัดอยู่ลำดับที่ 5 ของโลก แต่ผลผลิตน้ำมันปาล์มที่ได้ส่วนใหญ่ใช้เพียงพอเพื่อการบริโภคและอุปโภคภายในประเทศเท่านั้น ปาล์มน้ำมันจึงจัดเป็นพืชน้ำมันของไทยชนิดเดียวที่ไม่ต้องเสียดุลการค้านำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งตรงกันข้ามกับพืชน้ำมันชนิดอื่น เช่น ถั่วเหลือง ละหุ่ง ทานตะวัน และงา (ฉกรรจ์, 2551) การปลูกปาล์มน้ำมันที่ผ่านมาของไทยนั้นจะต้องนำเข้าพันธุ์ปาล์มสายพันธุ์ปลูกจากต่างประเทศ ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์คูรา และ พิสิเฟอร์รา แต่เกษตรกรมักประสบปัญหาความไม่ตรงตามพันธุ์จากการเพาะเมล็ด และกว่าที่เกษตรกรจะทราบก็ใช้เวลานานหลายปี เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นบริษัทผลิตปาล์มน้ำมันในประเทศไทย พยายามพัฒนาเทคนิคการผสมพันธุ์เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ที่ตรงตามความต้องการขึ้นมาจำหน่ายแต่ก็ไม่ได้รับความสนใจ จนประเทศอังกฤษและฝรั่งเศสประสบผลสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มทำให้คาดว่าสามารถใช้วิธีนี้ ในการแก้ปัญหาการขาดแคลนพันธุ์ที่ใช้ปลูกได้

การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปล้ำมน้ำมันดำเนินต่อมาจนสามารถย่นระยะเวลาการชักนำแคลลัส (callus) มีการขยายพันธุ์โดยการใช้โซมาติกเอ็มบริโอซึ่งให้ปริมาณของต้นกล้าที่ได้มากกว่าช่วงของการพัฒนาแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ ระยะเวลาแรก ระยะรูปกลม ระยะรูปหัวใจ ระยะทอริปีโด ระยะสร้างใบเลี้ยง และพัฒนาเป็นต้นอ่อนซึ่งพบว่าแต่ละระยะใช้เวลาของการพัฒนาเป็นเวลานาน กล่าวคือจากใบอ่อนไปเป็นแคลลัสใช้เวลาประมาณ 2-4 เดือน จากแคลลัสเป็นเอ็มบริโอจินิกแคลลัสนานประมาณ 7-8 เดือน จากเอ็มบริโอจินิกแคลลัสไปเป็นยอด (shoot) นานประมาณ 3 เดือน และจะใช้เวลาอีกประมาณ 2 เดือนจึงเจริญเป็นต้นสมบูรณ์และยังไม่มีข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่จะยืนยันได้ว่ามียีนใดบ้างที่แสดงออกในขั้นนี้ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะวิจัยเวลาของการพัฒนาโดยการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาต้นอ่อนในปล้ำมน้ำมัน เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาเพื่อย่นระยะเวลาการพัฒนาต้นอ่อนของปล้ำมน้ำมันในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้มีระยะเวลาสั้นลงได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาต้นอ่อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ *Elaeis guineensis* Jacq. ในประเทศไทย และเพื่อเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับยีนเพื่อที่จะนำข้อมูลของยีนที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการย่นระยะเวลาของกระบวนการพัฒนาต้นอ่อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของปาล์มน้ำมัน



การตรวจเอกสาร

ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (Oil palm) เป็นพืชตระกูลปาล์มลักษณะลำต้นเดี่ยว ขนาดลำต้นประมาณ 12-20 นิ้ว เมื่ออายุประมาณ 1-3 ปี ลำต้นจะถูกหุ้มด้วยโคน กาบใบ แต่เมื่ออายุมากขึ้น โคนกาบใบจะหลุดร่วงเห็นลำต้นชัดเจน ผิวของลำต้นคล้ายๆ ต้นตาล ลักษณะใบเป็นรูปก้างปลา โคนกาบใบจะมีลักษณะเป็นซี่ คล้ายหนามแต่ไม่คมมาก เมื่อไปถึงกลางใบหนามดังกล่าวจะพัฒนาเป็นใบ การออกดอกเป็นพืชที่แยกเพศ คือต้นที่เป็นเพศผู้จะให้เกสรตัวผู้อย่างเดียว ต้นที่เป็นเพศเมียจะให้เกสรตัวเมียซึ่งจะติดผล ลักษณะผลเป็นทะลายผลจะเกาะติดกันแน่นจนไม่สามารถสอดนิ้วมือเข้าไปที่ก้านผลได้ เวลาเก็บผลปาล์มจึงต้องใช้มีดงอเกี่ยวที่โคนทะลายแล้วดึงให้ขาดก่อนที่จะตัดทะลายปาล์มต้องตัดทางปาล์มก่อนเพราะผลปาล์มจะตั้งอยู่บนทางปาล์ม กระบวนการตัดทาง (ใบ) ปาล์มและตัดเอาทะลายปาล์มลง เรียกรวมๆ ว่า ทางปาล์ม ปาล์มน้ำมันจัดเป็น พืชเศรษฐกิจ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกา เป็นพืชที่สามารถนำมาแปรรูปทำเป็นน้ำมันปาล์มประกอบอาหาร เนย รวมถึงเป็นส่วนผสมในไบโอดีเซลด้วย ใบมาบดเป็นอาหารสัตว์ กะลาปาล์มเป็นวัตถุดิบเชื้อเพลิง ทะลายปาล์มใช้เพาะเห็ด และกระทั่งการปลูกลงดินไปแล้วก็ช่วยในการดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ปาล์มน้ำมันให้น้ำมัน 2 ชนิด คือ น้ำมันปาล์มจากเปลือกผลปาล์มและน้ำมันปาล์มจากเมล็ดปาล์ม น้ำมันปาล์มมีองค์ประกอบทางเคมีเกี่ยวข้องกับวิตามินที่สำคัญอยู่ 2 ชนิด คือ วิตามินอีและสารแคโรทีนอยด์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างวิตามินเอ มีปริมาณสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ

น้ำมันปาล์มมีกรดไขมันอิ่มตัว (lauric acid, myristic acid, stearic acid and palmitic acid) รวมกันประมาณ 52% และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัว (oleic acid, linoleic acid and linolenic) รวมกันประมาณ 48% น้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์มที่สกัดได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เป็นน้ำมันดิบยังไม่สามารถบริโภคได้ ต้องนำไปทำการกลั่นให้เป็นน้ำมันบริสุทธิ์ ด้วยกระบวนการแยกยางเหนียว ลดกรด ฟอกสี และดูดกลั่น ได้เป็นน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และมีผลพลอยได้ คือ กรดไขมันซึ่งผลผลิตทั้งหมดนี้เรานำไปใช้ เพื่อการอุปโภคบริโภคได้อย่างมากมาย

ประเทศไทยมีการปลูกปาล์มทั้งทางภาคใต้และภาคตะวันออก พันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก เป็นปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์เทเนอร์่า โดยเฉพาะที่สามจังหวัดชายแดนภาคใต้ ช่วงปี 2547 - 2550 มีการส่งเสริมการปลูกปาล์มน้ำมันในพื้นที่นาร้าง โดยกรมพัฒนาที่ดิน มีการขุด

ร่องให้ฟรี ให้พันธุ์และปุ๋ย โดยให้เหตุผลในการส่งเสริมการปลูกเนื่องจากปาล์มเป็นพืชที่ให้น้ำมัน ใช้ได้ทั้งการบริโภคและใช้เป็นไบโอดีเซลได้

ปาล์มน้ำมันสามารถให้ผลผลิตน้ำมันปาล์มต่อไร่สูงถึง กว่า 500 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งนับว่าสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นทั้งสิ้นจึงน่าจะเป็นพืชที่เหมาะสมที่จะเป็นพืชน้ำมันหลักของประเทศ อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันการผลิตน้ำมันปาล์มของประเทศยังเพียงพอแค่สำหรับการบริโภคในประเทศเท่านั้น และยังมีปัญหาเรื่องราคาน้ำมันปาล์มที่สูงกว่าของประเทศมาเลเซีย ทั้งนี้เพราะผลผลิตหลายปาล์มต่อไร่ยังต่ำอยู่ เนื่องจากประเทศไทยขาดพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่เหมาะสม และขาดการจัดการสวนปาล์มที่ดี ประกอบกับยังไม่สามารถขยายพื้นที่ปลูกปาล์มไปยังพื้นที่ที่เหมาะสมได้ (ฉกรรจ์, 2551)

พฤกษศาสตร์ของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชในสกุล *Elaeis* ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Elaeis guineensis* ซึ่งอาจเรียกว่า African oil palm เนื่องจากพบว่ามีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในแอฟริกากลางและแอฟริกาตะวันตก ปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุด เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่นิยมปลูกกันเป็นการค้าในปัจจุบัน สปีชีส์ที่สองคือ *Elaeis oleifera* (American oil palm) เดิมเรียก *E. melanococca* หรือ Corozo มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางภาคเหนือของกลุ่มน้ำอเมซอน ในอเมริกาใต้ยวติดต่อไปถึงอเมริกากลางและคอซตาริกา ไม่นิยมปลูกเป็นการค้า เนื่องจากมีการเจริญเติบโตช้า ผลขนาดเล็ก และให้ปริมาณน้ำมันต่ำกว่าปาล์มน้ำมันชนิดแรก อย่างไรก็ตามได้มีการอาศัยลักษณะดีบางประการจากกลุ่มนี้ เพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (ธีระ และคณะ, 2546) ซึ่งพบว่าสามารถผสมข้ามกับสปีชีส์ *E. guineensis* ได้และให้เมล็ดที่ไม่เป็นหมัน และสุดท้าย *Elaeis odora* เดิมทีเดิยวจัดอยู่ในตระกูล *Barcella odora* เนื่องจากมีรายงานพบว่าปาล์มชนิดนี้ขึ้นอยู่บริเวณเดียวกับ *oleifera* ในแถบกลุ่มน้ำอเมซอน ลักษณะของปาล์มชนิดนี้ต่างจากสองสปีชีส์แรกคือ ในช่อดอกเดียวกันมีทั้งดอกตัวผู้และตัวเมีย โดยดอกตัวเมียจะอยู่ตรงส่วนฐานของ spikelet แต่อย่างไรก็ตามลักษณะช่อดอกดังกล่าวนี้ก็สามารถพบในสปีชีส์ *E. guineensis* และ *E. oleifera* โดยเฉพาะในปาล์มที่มีอายุน้อย จึงถือว่าลักษณะดังกล่าวนี้ไม่มีความแตกต่างพอที่จะแยกไปเป็นสกุลอื่น ความสำคัญของปาล์มน้ำมันชนิดนี้ยังไม่มีรายงาน (ธีระ และคณะ, 2546)

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้าม ใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ *Arecaceae* และเป็นพืชยืนต้นที่สามารถให้ผลผลิตหลายสปีชีส์ตลอดปี เริ่มจากเมื่อปาล์มมีอายุได้สองปีครึ่งหลังจากการปลูกและ

สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตทะลายนศได้ต่อเนื่องนานกว่า 20 ปี (ฉกรรจ์, 2551) ถ้าคุณลักษณะทั่วไปแล้ว ปาล์มน้ำมันจะมีลักษณะคล้ายกับพืชตระกูลปาล์มอื่นๆ เช่น มะพร้าว สละ อย่างไรก็ตามปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีถิ่นฐานวิทยาที่มีความเฉพาะหลายอย่างที่ควรรู้จักและทำความเข้าใจ ดังนี้

ราก

ปาล์มน้ำมันมีระบบรากฝอย รากอ่อนจะงอกออกจากเมล็ดเป็นอันดับแรก เมื่อต้นกล้าอายุได้ประมาณ 2-4 เดือน รากอ่อนจะหยุดเจริญเติบโตและหายไป ระบบรากจริงจะงอกจากส่วนฐานลำต้น ปาล์มน้ำมันที่เจริญเต็มที่จะประกอบด้วยรากแรกที่หยั่งลึกลงผิวดินช่วยยึดลำต้น และมีรากสอง สาม สี่ ที่แตกแขนงออกมาตามลำต้น ทอดไปตามแนวนอน จะเป็นระบบรากประสานกัน อย่างหนาแน่นอยู่บริเวณผิวดินระดับลึก 30-50 เซนติเมตร

ลำต้น

ปาล์มน้ำมันมีลำต้นตั้งตรง มียอดเดี่ยวรูปกรวย เส้นผ่านศูนย์กลางยาว 10-12 เซนติเมตร สูง 2.5-4 เซนติเมตร ประกอบด้วยใบอ่อนและเนื้อเยื่อเจริญ ในระยะ 3 ปีแรกจะเจริญเติบโตทางด้านกว้าง หลังจากนั้นลำต้นจะยืดยาว ปล้องฐานโคนใบ และข้อจะปรากฏให้เห็น ทางใบจะติดอยู่กับลำต้นอย่างน้อย 12 ปี แล้วเริ่มหลุดจากใบล่างขึ้นไป ทางใบมีการจัดเรียงตัวเวียนตามแกนลำต้น รอบละ 8 ทางใบ ลำต้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางยาว 20-75 เซนติเมตร โดยทั่วไปลำต้นสูงเพิ่มขึ้น 35-60 เซนติเมตรต่อปี แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและพันธุกรรม

ใบ

ใบของปาล์มน้ำมันเป็นใบประกอบรูปขนนก (pinnate) แต่ละใบแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแกนกลางที่มีใบย่อยอยู่ 2 ข้าง แต่ละทางใบมีใบย่อย 100-160 คู่ แต่ละใบย่อยยาว 100-120 เซนติเมตร

ดอก

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้าม มีดอกเพศเมียและดอกเพศผู้แยกช่อดอกภายในต้นเดียวกัน (monoecious) ที่ตำแหน่งของทางใบมีตาดอก 1 ตา อาจพัฒนาเป็นช่อดอกเพศผู้หรือเพศเมีย บางครั้งจะพบว่ามีช่อดอกกระเทย (hermaphrodite) การบานของดอกปาล์มน้ำมันจะไม่พร้อมกัน การพัฒนาจากระยะตาดอกจนถึงดอกบานพร้อมที่จะรับการผสมใช้เวลาประมาณ 33-34 เดือน การเปลี่ยนเพศของตาดอก (sex differentiation) จะเกิดขึ้นในช่วง 20 เดือนก่อนดอกบาน ซึ่งส่วนใหญ่จะพัฒนาเป็นดอกเพศเมีย การผสมเกสรมีลมและแมลงเป็นพาหะ โดยเฉพาะด้วงปาล์มน้ำมัน *Elaeodius kamerunicus* หลังจากการผสมเกสร 5-6 เดือน ช่อดอกตัวเมียจะพัฒนาไปเป็นทะลายที่สุกแก่เต็มที่ที่สามารถเก็บเกี่ยวได้

ดอกตัวเมีย

มีกาบหุ้ม (bract) เจริญเป็นหนามยาว 1 อัน กาบรอง (bractide) 2 แผ่น และกลีบดอก (perianth) 2 ชั้นๆ ละ 3 กลีบ เมื่อดอกบานแฉกนี้จะโค้งเปิดออก วันแรกกลีบดอกเป็นสีขาว ตรงกลางมีต่อมผลิตของเหลว เหนียว วันต่อมาเปลี่ยนเป็นสีชมพู วันที่ 2-3 ของการบานของดอกจะเป็นระยะที่เหมาะสมที่สุดของการผสม วันที่ 3 เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน วันที่ 4 เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากการผสมเกสรแล้วยอดเกสรตัวเมียจะเปลี่ยนเป็นสีดำและแข็ง ช่อดอกตัวเมียมีช่อดอกย่อยประมาณ 110 ช่อ และมีดอกตัวเมียประมาณ 4000 ดอก

ดอกตัวผู้

ที่เจริญเต็มที่ก่อนจะบานมีขนาดกว้าง 1.5-2 มิลลิเมตร ยาว 3-4 มิลลิเมตร ถูกห่อหุ้มด้วยกาบหุ้มรูปสามเหลี่ยม 1 แผ่น มีกลีบดอก 2 ชั้นๆ ละ 3 กลีบ มีเกสรตัวผู้ 6 อัน รวมกันอยู่เป็นท่อตรงกลางดอก อับเกสรตัวผู้มี 2 พู ละอองเกสรจะหลุดออกจากช่อดอกทั้งหมดภายในเวลา 3 วัน ถ้าอากาศชื้นจะใช้เวลามากขึ้น ละอองเกสรจะมีชีวิตอยู่ได้ 7 วัน แต่หลังจากวันที่ 4 ความมีชีวิตจะต่ำลง เมื่อดอกเจริญเต็มที่ช่อดอกย่อยตัวผู้มีขนาดยาว 10-20 เซนติเมตร หนา 0.8-1.5 เซนติเมตร มีลักษณะคล้ายนิ้วมือ ต้นปาล์มน้ำมันที่โตเต็มที่ช่อดอกตัวผู้ 1 ดอกให้ละอองเกสรมีน้ำหนัก 30-50 กรัม

ทะลาย

ประกอบด้วย ก้านทะลาย ช่อทะลายย่อย และผล ในแต่ละทะลายมีปริมาณผล 45-70 % ทะลายปาล์มน้ำมันเมื่อสุกแก่เต็มที่มีน้ำหนักประมาณ 1-60 กิโลกรัม แปรไปตามอายุของปาล์ม น้ำมัน และปัจจัยสิ่งแวดล้อม การปลูกเป็นการค้าต้องการทะลายที่มีน้ำหนัก 10-25 กิโลกรัม จำนวนทะลายต่อต้นก็มีความแตกต่างกันโดยมีสหสัมพันธ์ทางลบกับน้ำหนักทะลาย

ผล

ผลปาล์มน้ำมันไม่มีก้านผล (sessile drup) รูปร่างมีหลายแบบตั้งแต่รูปรียาวแหลมจนถึงรูปไข่หรือรูปยาวรี มีความยาวผลอยู่ระหว่าง 2-5 เซนติเมตร น้ำหนักผลมีตั้งแต่ 3 กรัม จนถึง 30 กรัม ประกอบด้วยผิวเปลือกนอก (exocarp) ชั้นเปลือกนอก (mesocarp) เป็นเนื้อเยื่อเส้นใย สีส้มแดงเมื่อสุก และมีน้ำมันอยู่ในชั้นนี้ปาล์มน้ำมันที่ปลูกเป็นการค้าโดยทั่วไป พบว่าสีผลที่ผิวเปลือกนอก 3 ลักษณะ คือ เมื่อผลดิบเป็นสีเขียวจะเปลี่ยนเป็นสีส้มเมื่อสุก เรียกลักษณะนี้ว่า virescens แบบที่สอง ผลดิบมีสีดำ ปลายผลมีสีงาช้างจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อสุก เรียกว่า nigrescens แบบที่สาม มีสีผิวเปลือกเมื่อสุกเป็นสีเหลืองซีด เรียกว่า albescens

ผลปาล์มน้ำมันโดยทั่วไปจะสุกเมื่ออายุ 20 สัปดาห์หลังจากเริ่มติดผล กระบวนการพัฒนาของผลปาล์มจากดอกบานจนถึงสุก แบ่งออกเป็นการพัฒนาของชั้นเปลือก (mesocarp) การพัฒนาของชั้นเนื้อใน (kernel) และกะลา (shell) และการพัฒนาของสีเปลือกผล

การพัฒนาของชั้นเปลือกนอก ในระยะดอกบานหรือหลังจากการผสมเกสร รังไข่ ผ่องรังไข่ และเซลล์รอบๆ จะพัฒนาไปเป็นโครงสร้างทางด้านความยาวของผล การพัฒนาของชั้นเปลือกนอกนี้จะเริ่มพัฒนาตั้งแต่เริ่มติดผล โดยช่วงที่มีการพัฒนาเด่นที่สุดอยู่ในช่วงเริ่มติดผลจนถึงสัปดาห์ที่ 3 หลังจากสัปดาห์ที่ 3 ไปแล้ว การพัฒนาชั้นเปลือกก็ยังคงมีอยู่ในขณะที่เซลล์ต่างๆ ในรังไข่จะเริ่มแบ่งตัวและเริ่มแบ่งหน้าที่กันอย่างชัดเจนโดยมีการพัฒนาของเนื้อในและกะลา ชั้นเปลือกจะเพิ่มขนาดขึ้นเรื่อยๆ และหลังจากสัปดาห์ที่ 15 เส้นใยจะเริ่มเห็นชัดเจน โดยเส้นใยจะเรียงตัวตามแนวอนของผล

การพัฒนาของเนื้อใน จะควบคู่ไปกับการพัฒนาของกะลา โดยจะเริ่มต้นเมื่อผลปาล์มมีอายุ 3 สัปดาห์ เนื้อเยื่อของกะลาจะพัฒนาจากสีขาวจนเป็นสีน้ำตาลเข้ม หลังจากสัปดาห์ที่ 13-14 การพัฒนาของเนื้อในและกะลาจะหยุดการเพิ่มขนาด แต่ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงภายในเนื้อในยังคงมีอยู่ โดยเฉพาะการสะสมน้ำมัน

การเปลี่ยนสีของผล ในสัปดาห์ที่ 1-7 จะมีการเพิ่มขึ้นของคลอโรฟิลล์ในชั้นเปลือกและจะเพิ่มจนถึงสัปดาห์ที่ 14-15 หลังจากนั้นค่อยๆ สลายไป การเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเจนในระยะนี้ คือ การเปลี่ยนสีของชั้นเปลือกนอก (exocarp) ซึ่งเกิดจากสะสมของคาร์โรทีนและการลดลงของคลอโรฟิลล์ ทำให้สีของเปลือกเปลี่ยนเป็นสีส้มในสัปดาห์ที่ 16-17 คาร์โรทีน ทำหน้าที่ป้องกัน oxidation ของน้ำมัน

การสังเคราะห์และการสะสมน้ำมันเกิดขึ้นทั้งในเซลล์ของชั้นเปลือกและชั้นเนื้อใน การสังเคราะห์น้ำมันในชั้นเนื้อในจะสิ้นสุดในสัปดาห์ที่ 13-14 หลังจากนั้นการสังเคราะห์น้ำมันจะมีในชั้นเปลือกเท่านั้น โดยจะเริ่มตั้งแต่สัปดาห์ที่ 15 จนผลปาล์มสุก น้ำมันที่สังเคราะห์ขึ้นในชั้นเปลือกจะสะสมอยู่ในถุงน้ำมันภายในเซลล์ โดยจะเริ่มสะสมไว้ที่ฐานของผลก่อนจึงจะกระจายไปทั่วผล ถุงน้ำมันจะครอบคลุมพื้นที่ส่วนใหญ่ของเซลล์

เมล็ด

มีลักษณะแข็ง ประกอบด้วยกะลา และเนื้อใน ซึ่งเจริญมาจากไข่ 1-3 ใบ ขนาดของเมล็ดขึ้นกับความหนาของกะลาและขนาดของเนื้อใน บนกะลาจะมีช่องสำหรับงอก 3 ช่อง ในกะลาจะประกอบด้วยอาหารต้นอ่อน หรือเนื้อในสีขาวอมเทาซึ่งมีน้ำมันสะสมอยู่ และมีเยื่อสีน้ำตาลหุ้มอยู่ โดยมีเส้นใยรองรับระหว่างเยื่อหุ้มกับกะลาอีกชั้นหนึ่ง ภายในเนื้อในตรงกันข้ามกับช่องสำหรับงอกมีต้นอ่อนฝังตัวอยู่ มีลักษณะตรงยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร

ประวัติการปลูกปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันมีพื้นเพดั้งเดิมอยู่ในแอฟริกาแถบประเทศชายฝั่งตะวันตกและตอนกลาง เป็นพืชน้ำมันที่รู้จักกันมานาน ซึ่งได้มีการปลูกเป็นสวนใหญ่ๆ เป็นธุรกิจที่สำคัญประเภทหนึ่ง ประเทศในยุโรปรู้จักปาล์มน้ำมันเป็นครั้งแรกประมาณปี พ.ศ. 2010 โดยนักสำรวจโปรตุเกส และ

รู้จักกันเพียงแต่ว่าชาวแอฟริกาใช้น้ำมันจากพืชชนิดนี้ปรุงอาหารและใช้เป็นเครื่องสำอางเท่านั้น หลังจากนั้นอีกประมาณสี่ศตวรรษจึงได้มีการส่งน้ำมันที่สกัดได้จากเนื้อและจากเมล็ดปาล์มเข้าไปยังประเทศบราซิลเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับชาวแอฟริกันที่ทำงานอยู่ตามไร่อ้อย ชาวโปรตุเกสอีกเช่นกันที่ได้นำปาล์มน้ำมันเข้ามาปลูกในทวีปเอเชีย เริ่มต้นจากปาล์มคูราเพียง 4 ต้น ที่ปลูกในสวนพฤกษชาติโบกอร์ (Bogor botanical garden) เมื่อปี พ.ศ. 2391 หลังจากนั้นได้มีการคัดเลือกพันธุ์และนำไปปลูกที่เมืองเดลี และมีการนำเข้าไปปลูกในประเทศมาเลเซียในเวลาต่อมา รู้จักกันในพันธุ์เดลีคูรา ซึ่งมีการปลูกกันอย่างกว้างขวางในยุคต้นๆ ของการปลูกปาล์มน้ำมันเชิงการค้า ในประเทศอินโดนีเซียและมาเลเซีย โดยสายพันธุ์ปลูกต่างๆ ได้รับการพัฒนามาจากการผสมระหว่าง คูราและคูรา ภายหลังจากที่มีการค้นพบว่าความหนาของกะละในผลปาล์มถูกควบคุมด้วยยีนเพียงคู่เดียว และสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมในปี พ.ศ. 2484 ก็ได้มีการพัฒนาพันธุ์ปลูกปาล์มน้ำมันจากการผสมระหว่างคูราและเทนอรา และสุดท้ายพันธุ์ปลูกที่ใช้กันได้เปลี่ยนมาเป็นพันธุ์ลูกผสมซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างคูราและฟิลิเฟอร์รา เกือบทั้งหมดเนื่องจากให้ผลผลิตน้ำมันสูงกว่าการผสมแบบอื่นๆ ในอดีต (ฉกรรจ์, 2551)

การนำเข้าประเทศไทย เมื่อประมาณ 80 ปีมาแล้ว ต้นนิยฐานว่าพระยาประคิพัทธ์ ภูบาล เป็นผู้นำพันธุ์ปาล์มน้ำมันเข้ามาจากชวา หรือมาเลเซีย แต่ปลูกกันเพียงเป็นไม้ประดับสวน ก่อนสงครามโลกครั้งที่ 2 ได้มีผู้ทำสวนปาล์มเป็นการค้าแห่งแรกของเมืองไทย ดำเนินการโดยหม่อมเจ้าอมรสมานดิษชัย กิติยากร มีเนื้อที่ปลูกปาล์มทั้งหมด 1,900 ไร่ ผลิตน้ำมันปาล์มได้ประมาณเดือนละ 6 ตัน อยู่ที่ตำบลบ้านปรก อำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา และส่งน้ำมันปาล์มเข้ามาขายในตลาดกรุงเทพฯ กิจการนี้ได้ล้มเลิกเมื่อเกิดสงครามโลกครั้งที่ 2 (ฉกรรจ์, 2551)

ความสำคัญทางเศรษฐกิจของปาล์มน้ำมัน

ปัจจุบันมีการปลูกปาล์มกันอยู่โดยทั่วไป พันธุ์ปาล์มที่นิยมปลูกเพื่อการค้าในปัจจุบัน ได้แก่ พันธุ์เทนอรา (Tenera) ซึ่งเป็นพันธุ์ผสมระหว่างพันธุ์ คูรา และ ฟิลิเฟอร์รา ปาล์มน้ำมันชอบอากาศเขตร้อนที่มีฝนตกชุก จะให้ผลผลิตหลังการปลูกประมาณ 3-4 ปี ผลผลิตจะมีสูงสุดในปีที่ 9 และให้ผลคุ้มค่าทางเศรษฐกิจไปจนถึงปีที่ 25 หลังจากนั้นแล้วจะให้ผลไม่คุ้มค่า ผลปาล์มน้ำมันประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน ส่วนที่ให้น้ำมันคือส่วนที่เป็นเนื้อของผลซึ่งจะให้น้ำมันปาล์ม (palm oil) และส่วนที่เป็น เมล็ดซึ่งมีเนื้ออยู่ข้างใน เมล็ดจะให้น้ำมันเมล็ดปาล์ม (palm kernel oil) อัตราส่วนของน้ำมันจากเนื้อนอกของผลปาล์มจะมีมากขึ้นอยู่กับพันธุ์ ดินฟ้าอากาศ การ

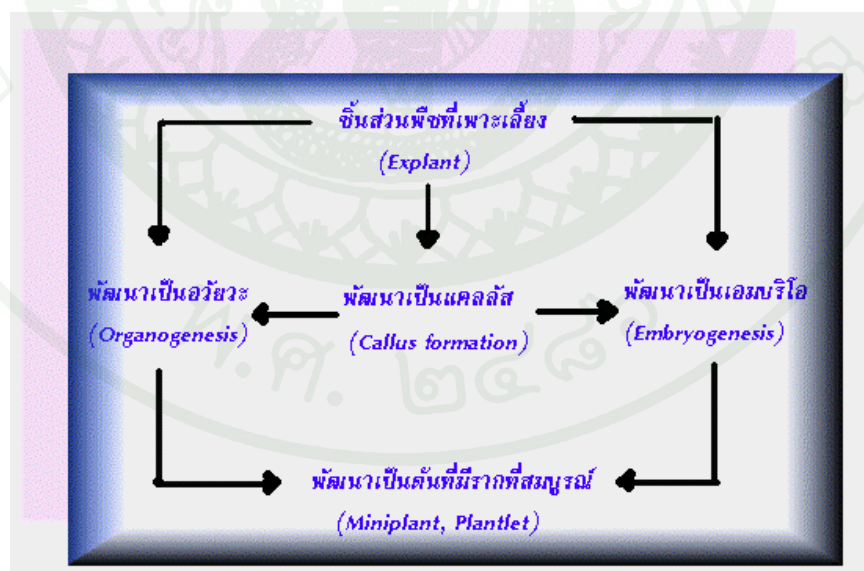
บำรุงรักษา และกรรมวิธีการสกัด แต่เฉลี่ยตามมาตรฐานสากลมีน้ำมันอยู่ร้อยละ 20 ส่วนเนื้อในของเมล็ดปาล์มมีน้ำมันอยู่ประมาณร้อยละ 45-50 ผลปาล์มน้ำมันอายุน้อยจะมีอัตราส่วนของน้ำมันต่ำ เพราะส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตยังเปลี่ยนเป็นน้ำมันไม่หมด แต่ถ้าผลแก่เกินไปจะมีกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) สูง ซึ่งน้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดปาล์มคุณภาพดี จะต้องมีการดไขมันอิสระเพียงประมาณร้อยละ 1-2 (ตามมาตรฐานโลกจะมีได้ไม่เกินร้อยละ 5) ดังนั้นเมื่อเก็บผลจากต้นแล้วจะต้องนำเข้าโรงงานสกัดน้ำมันโดยเร็วภายในเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง มิฉะนั้นจะมีการดไขมันอิสระสูง แล้วคุณภาพจะเสื่อมลง การปลูกปาล์มน้ำมันจะต้องทำควบคู่ไปกับการตั้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มคืออยู่บริเวณใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามเนื้อในของเมล็ดปาล์มน้ำมันจะเก็บไว้ได้นานโดยไม่เสื่อมคุณภาพ (ลิขิต, 2528)

การพัฒนาปลูกปาล์มน้ำมันในประเทศไทยแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรกตั้งแต่ พ.ศ. 2457 ถึง 2525 ระยะที่สองจาก พ.ศ. 2525 ถึง 2545 เป็นระยะที่มีการพัฒนาขยายพื้นที่ปลูกอย่างรวดเร็วโดยเฉลี่ยประมาณ 50,000 ถึง 100,000 ไร่ต่อปี ใน พ.ศ. 2547 มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันประมาณ 2,100,000 ไร่ โดยจังหวัดที่ปลูกมากที่สุด คือ กระบี่ สุราษฎร์ธานีและชุมพร ตามลำดับ (ฉกรรจ์, 2551)

น้ำมันปาล์มส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมทำเนยเทียม (margarin) ครีม สบู่ และใช้ในการปรุงอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นส่วนผสมของน้ำมันหล่อลื่น น้ำมันเครื่อง ส่วนผสมของยาฆ่าแมลงที่ใช้ในการผลิตกรดไขมัน ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตดินสอสี และเทียน นอกจากนี้น้ำมันปาล์มยังมีส่วนช่วยในการทำเครื่องสำอาง เพราะสามารถแทรกซึมเข้าไปในผิวได้ดีกว่าน้ำมันชนิดอื่น ส่วนน้ำมันเมล็ดปาล์มมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีคล้ายกับน้ำมันมะพร้าว คือสามารถทำให้แข็งตัวและทำให้สีหมดไปได้ง่าย อย่างไรก็ตามแม้ว่าน้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดปาล์มจะมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีแตกต่างกันแต่น้ำมันเมล็ดปาล์มก็ใช้ประโยชน์ได้เช่นเดียวกับน้ำมันปาล์ม คือ ใช้เป็นส่วนประกอบในการทำสบู่ เนยเทียม ผงซักฟอก และใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสำเร็จรูปต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมขนมปัง อุตสาหกรรมขนมหวาน และอุตสาหกรรมทำไอศกรีม เป็นต้น สำหรับน้ำมันจากพืชและสัตว์อื่นๆ ที่สามารถใช้ทดแทนน้ำมันปาล์มได้ ได้แก่ น้ำมันมะพร้าว น้ำมันหมู และน้ำมันจากไขปลา เป็นต้น

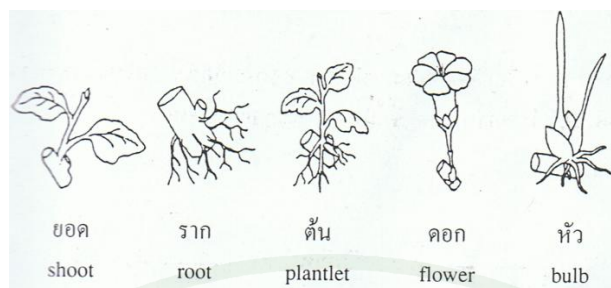
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ที่ไม่มีผนัง ที่เรียกว่า โปรโตพลาสต์ มาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์และอยู่ในสภาวะควบคุมสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ แสง และความชื้น ส่วนของพืชเหล่านี้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้หลายรูปแบบ หลักการที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ตัดเอาชิ้นส่วนของพืชที่สะอาด นำมาเลี้ยงในขวดแก้วที่บรรจุอาหารวิทยาศาสตร์ ซึ่งได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว เมื่อเซลล์จากชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาเลี้ยงได้รับแร่ธาตุ วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโต และน้ำตาล จากอาหารวิทยาศาสตร์ ที่ใช้เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จะมีการเจริญเติบโตเป็นต้นโดยตรง หรือเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์เรียกว่า แคลลัส หรือเกิดเป็นคัพภะที่เรียกว่า โชมาทิกอีมบริโอ หรือ อีมบริอยด์ และเมื่อตัดแบ่งเป็นชิ้นๆ แล้วเปลี่ยนอาหารใหม่บ่อยๆ ก็สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่มีที่สิ้นสุด ผลสุดท้ายก็จะได้ลักษณะเหมือนกันทุกประการเป็นจำนวนมากเหมาะที่จะนำไปขยายพันธุ์ การเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ ในสภาพปลอดเชื่อนั้น มีหลายรูปแบบดังนี้



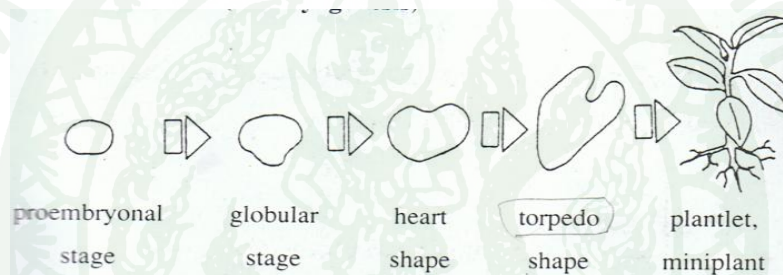
ภาพที่ 1 รูปแบบการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช

ที่มา: อรดี (2539)



ภาพที่ 2 การพัฒนาเป็นอวัยวะ (organogenesis)

ที่มา: อร์ดี (2539)



ภาพที่ 3 พัฒนาเป็นเอ็มบริโอ (embryogenesis)

ที่มา: อร์ดี (2539)



ภาพที่ 4 พัฒนาเป็นแคลลัส (callus formation)

ที่มา: อร์ดี (2539)

ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ในสภาพปลอดเชื้อนี้ จะมีการพัฒนาไปในรูปแบบไหนก็ได้ เช่น พัฒนาเป็นอวัยวะต่างๆ ได้แก่ หน่อ ราก ดอก หัว หรือพัฒนาเป็นเอ็มบริโอ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดของพืช (plant species) ส่วนของพืช (explant) ปัจจัยทางเคมี (chemical factor) และปัจจัยทางกายภาพ (physical factor) แต่ไม่ว่าจะพัฒนาไปเป็นแบบใดก่อนก็ตาม ในที่สุดก็สามารถบังคับให้เกิดเป็นต้นที่มีรากสมบูรณ์ นำออกปลูกในดินและรอดตายได้สำเร็จ (อรดี, 2539)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

สภาพที่เหมาะสมในการปลูกปาล์มน้ำมันมีดังนี้คือ

- อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 23-32 องศาเซลเซียส
- ปริมาณน้ำฝน 2,000 มิลลิเมตรต่อปี และมีการกระจายของฝนแต่ละเดือนไม่ต่ำกว่า 100 มิลลิเมตร
- ช่วงเวลาการรับแสงในแต่ละวันไม่น้อยกว่า 5 ชั่วโมง ในเวลา 1 ปี ได้รับแสงรวมไม่น้อยกว่า 1,500 ชั่วโมง
- ดินที่ปลูกมีความอุดมสมบูรณ์สูง ระบายน้ำได้ดี มีลักษณะเป็นดินร่วนจนถึงเหนียว ความเป็นกรดต่างอยู่ระหว่าง 4-6
- ระดับน้ำใต้ดินควรมากกว่า 75 เซนติเมตรและไม่น้อยกว่า 40 เซนติเมตร
- ความลาดเอียงของพื้นที่ประมาณ 12% ไม่ควรสูงกว่า 20%

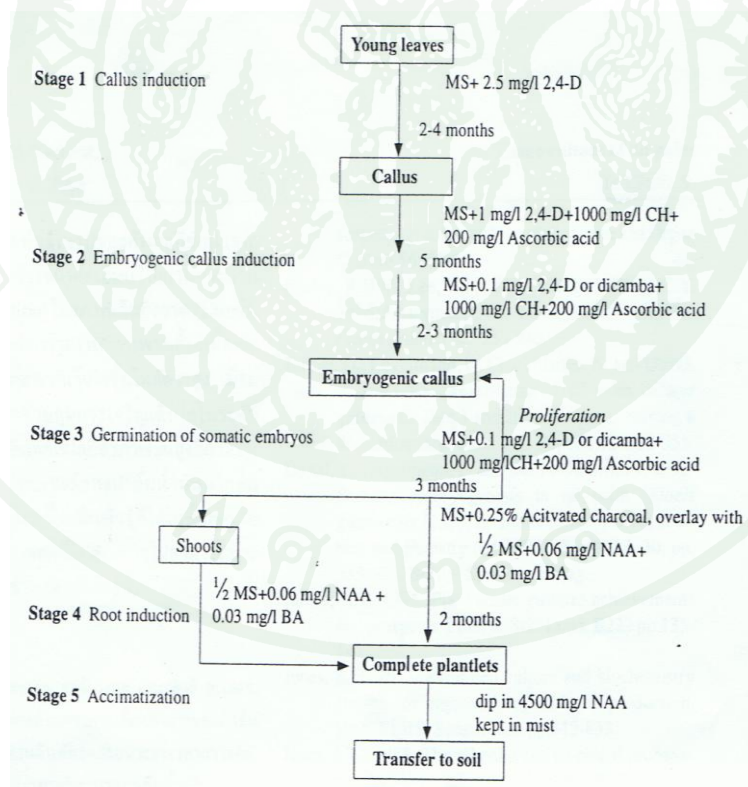
ซึ่งปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญต่อความก้าวหน้าในการปลูกปาล์มน้ำมันของประเทศไทย คือการขาดความรู้ทางวิชาการและเทคโนโลยีการปลูก ปัญหานี้รัฐบาลควรริบแก้ไขซึ่งการแก้ไขนั้นมีทั้งมาตรการระยะสั้น และมาตรการระยะยาว หนึ่งในมาตรการเหล่านี้คือการแก้ปัญหาเรื่องพันธุ์ที่ใช้ปลูก ในปัจจุบันขาดแคลนพันธุ์ปาล์มที่นำมาปลูก พันธุ์ที่ได้จากการลักลอบซื้อมาจากประเทศมาเลเซีย แหล่งที่ซื้อมานั้นไม่สามารถเชื่อถือได้และที่สำคัญคือไม่มีการรับรองพันธุ์ เมื่อนำมาปลูกแล้วใช้เวลานานกว่าจะทราบว่าเป็นพันธุ์ดีหรือไม่ เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นบริษัทผลิตปาล์มน้ำมันในประเทศไทยพยายามพัฒนาเทคนิคการผสมพันธุ์เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ขึ้นมาจำหน่ายแต่ก็ไม่ได้ได้รับความสนใจ จากผู้ปลูกปาล์มในประเทศจนทำให้ล้มเลิกไป ต่อมาในปี พ.ศ. 2528-2530 ประเทศอังกฤษและประเทศฝรั่งเศสประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันจากการใช้ชิ้นส่วนที่ไม่เกี่ยวกับเพศ เช่น ใบอ่อน ราก เป็นต้น ทำให้คาดว่าสามารถใช้วิธีนี้ในการแก้ปัญหาการ

ขาดแคลนพันธุ์ที่ใช้ปลูกได้ ซึ่งเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์ม มีประโยชน์มากต่อการขยายพันธุ์ จากต้นพันธุ์ที่เหี่ยวราที่แสดงลักษณะดีในการให้ผลผลิต และยังช่วยย่นระยะเวลาการเพาะเมล็ดอีกด้วย (สมปอง, 2539)

สมปอง (2539) อ้างถึงรายงานของ Murashige (1974) ได้เสนอขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์ไว้ 3 ขั้นตอน คือ

- ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมเนื้อเยื่อพืชให้ปราศจากเชื้อ และนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์
- ขั้นตอนที่ 2 เลี้ยงเนื้อเยื่อให้เจริญเติบโต และขยายต้นให้มีปริมาณมากบนอาหารสังเคราะห์
- ขั้นตอนที่ 3 การนำต้นที่ได้จากการเลี้ยงออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

อย่างไรก็ตามการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มก็พัฒนาขึ้นเรื่อยมาจนสามารถย่นระยะเวลาการชักนำแคลลัส และพัฒนาขั้นตอนวิธีการต่างๆ ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มประสบความสำเร็จ



ภาพที่ 5 ขั้นตอนกระบวนการพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมัน

ที่มา: สมปอง (2539)

กระบวนการเอมบริโอเจเนซิส (embryogenesis)

เอมบริโอเจเนซิสหรือโซมาติกเอมบริโอเจเนซิส (somatic embryogenesis) คือ การเกิดเอมบริโอจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อร่างกาย เป็นคำตรงกันข้ามกับ zygotic embryogenesis ที่ได้จากการปฏิสนธิของเซลล์ไข่ อาจใช้คำต่าง ๆ แทนโซมาติกเอมบริโอได้ เช่น embryoid, adventitious embryo, vegetative embryos, embryo-like structure และ กระบวนการที่เกิดอาจเรียกได้หลายชื่อ เช่น adventitious embryogenesis, asexual embryogenesis เป็นต้น ซึ่งมีการพัฒนาเป็นขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ คือ จากเอมบริโอเปลี่ยนเป็นรูปกลม รูปหัวใจ รูปตอร์ปิโด และต้นกล้า ตามลำดับ

โดยพบการเกิดเอมบริอออยด์เป็นครั้งแรกจากแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของแครอท โดยพบว่าแคลลัสของแครอทแสดงการเปลี่ยนแปลงสภาพ เมื่อย้ายจากอาหารที่มีน้ำมะพร้าวไปยังอาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะมิโน วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เมื่อย้ายครั้งที่สองไปยังอาหารที่มีออกซินความเข้มข้นต่ำจะได้ต้นเล็กๆ จำนวนมากซึ่งก็คือ เอมบริอออยด์เมื่อศึกษาเอมบริอออยด์ระหว่างการพัฒนาเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า เป็น ไบโพลาร์ออร์แกน (bipolar organ) คือ มีด้านหนึ่งเจริญเป็นรากอีกด้านเจริญเป็นต้น การพบครั้งแรกๆ นี้คิดว่าเป็นกรณียกเว้น แต่จากการทดลองในเวลาต่อมาพบว่าทำให้เกิดปรากฏการณ์เช่นนี้ได้ ดังเช่นการทดลองเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารที่มีน้ำมะพร้าว พบว่าเซลล์เดี่ยวกลายเป็น เอมบริอออยด์ได้ และรูปแบบการเจริญของเอมบริอออยด์ในหลอดทดลองเหมือนกับไซโทติกเอมบริโอ เมื่อย้ายเอมบริอออยด์เหล่านี้ไปยังอาหารจะได้ต้นสมบูรณ์ขึ้นมา ต่อมาพบว่าไม่เฉพาะแต่เพียงน้ำมะพร้าวเท่านั้น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่สังเคราะห์ขึ้นมาจากตัวก็ให้ผลเช่นกัน เช่น Halperins ทำให้เกิดเอมบริอออยด์ได้โดยไม่ต้องอาศัยน้ำมะพร้าว โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและไนโตรเจนในความเข้มข้นระดับต่างๆ แทน (อรดี, 2539)

การเกิดเอมบริอออยด์ไม่จัดว่าเป็นออร์แกโนเจเนซิส ทั้งนี้เพราะเอมบริอออยด์ที่ได้ไม่มีการต่อเชื่อมของเนื้อเยื่อลำเลียงติดกับชิ้นส่วนพืชที่เอามาเลี้ยงเลย เนื่องจากเอมบริอออยด์ มีจุดกำเนิดมาจากเซลล์ร่างกาย ไม่ได้เกิดจากการผสมเกสร ดังนั้นการเจริญของเอมบริอออยด์จะไม่มีโครงสร้างที่เรียกว่า true suspensor เมื่อนำเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเอมบริอออยด์มาส่งคู่ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า มีออร์แกเนลล์ต่างๆ มากมายในไซโทพลาสซึม มีเม็ดแป้ง นิวเคลียสขนาดใหญ่ และเห็นนิวคลีโอไลสย้อมติดสีชัดเจน จากการข้อมูลทำให้ทราบว่ามีโปรตีนและอาร์เอ็นเอในปริมาณสูง การเจริญของเอมบริอออยด์อาจถูกขัดขวางได้โดยความสมดุลของสารเคมีในอาหารทำให้เกิด

ความผิดปกติที่เรียกว่า embryonal budding และ embryogenic clump ขึ้นมา การเปลี่ยนสภาพของ เอ็มบริอยด์เกิดได้ 2 แบบ คือ

แบบแรกเป็นแบบทางตรง ในกรณีนี้เอ็มบริอยด์เกิดขึ้น โดยตรงจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ โดยไม่ผ่านขั้นตอนการเกิดแคลลัส เซลล์ที่ทำให้การเจริญเป็นเอ็มบริอยด์เกิดขึ้น เรียกว่า pre-embryonic determined cells (PEDC) ตัวอย่างได้แก่ ส้ม

แบบที่สองเป็นแบบทางอ้อม การเกิดเอ็มบริอยด์แบบนี้มาจากแคลลัส แคลลัสที่มี เอ็มบริอยด์เกิดขึ้นเรียกว่า embryogenically determined cells ซึ่งจะเกิดเอ็มบริอยด์ต่อเมื่อถูกชัก นำโดยปัจจัยต่างๆ เรียกเซลล์ที่เกิดเอ็มบริอยด์แบบนี้อีกชื่อหนึ่งว่า induced embryogenically determined cells (IEDC) พบว่า การเกิดเอ็มบริอยด์แบบนี้เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงก่อน และ หลังจากเกิดการแบ่งเซลล์แล้วก็กลับเป็นเอมบริโอเจนิคใหม่ บางครั้งออกซินและไซโทไคนินมี ผลต่อการเกิดขบวนการนี้ ตัวอย่างได้แก่ แครอท กาแฟ หน่อไม้ฝรั่ง

การพัฒนาของเอมบริโอจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

เริ่มจากการพัฒนาของเอมบริโอจากไข่ที่ได้รับการผสมหรือไซโกต โดยเริ่มจากไซโกต แบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์ ที่มีขนาดไม่เท่ากัน เซลล์ที่มีขนาดเล็ก เรียกว่า apical cell ซึ่งอยู่ทางด้านบน ส่วนเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าอยู่ทางด้านล่าง เรียกว่า basal cell ส่วนที่จะพัฒนาเป็นเอมบริโอ ก็คือ ส่วนของ apical cell ซึ่งจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นเรื่อยๆ จนมีลักษณะเป็นก้อนกลม และ เรียกระยะนี้ว่า ระยะ globular-shaped ต่อจากนั้นก็เปลี่ยนเป็นรูปหัวใจ จึงเรียกระยะนี้ว่า ระยะ heart-shaped จนสุดท้ายเมื่อเอมบริโอพัฒนาเจริญเต็มที่จะมีรูปร่างเหมือนตอร์ปิโด จึงเรียกระยะนี้ว่า torpedo-shaped ส่วนของ basal cell จะแบ่งตัวทางด้านขนาน (periclinal division) เท่านั้น จะได้เป็น เซลล์แถวยาว ที่เรียกว่า suspensor ซึ่งทำหน้าที่ช่วยยึดตัวเอมบริโอให้ฝังอยู่ใน mucellus และช่วยดูด ซึ่อาหารให้แก่เอมบริโอ เซลล์ที่อยู่ตรงรอยต่อระหว่างตัวเอมบริโอกับ suspensor เรียกว่า hypolysis cell ซึ่งทำหน้าที่เป็นจุดกำเนิดของราก (radicle) เมื่อเอมบริโอพัฒนาเจริญเต็มที่แล้ว ส่วน ของ suspensor ก็จะหมดหน้าที่และสลายตัวไป

การพัฒนาของเอมบริโอที่ได้จากเนื้อเยื่อของแคลลัส เริ่มจากเซลล์บางเซลล์ในก้อนของ แคลลัสที่มีความตื่นตัวมากกว่าเซลล์อื่นๆ สังเกตได้จากการทดสอบด้วยสีย้อม ซึ่งจะติด สีเข้มกว่า

เซลล์อื่นๆ และเมื่อตัดผ่านเซลล์ และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์เหล่านั้นมีไซโทพลาสซึมที่เข้มข้นและมีออร์แกเนลหนาแน่น เซลล์ดังกล่าวนี้จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจนได้เป็นกลุ่ม และปูดยื่นออกมา มีลักษณะคล้ายระยะ globular-shaped ต่อมาก็พัฒนาเป็นระยะ heart-shaped และ torpedo-shaped

การพัฒนาของเอมบริโอจากเซลล์ผิว (epidermis cell) เซลล์ผิวของพืชจะพบได้ที่ใบ ก้านใบ และลำต้นที่ยังอ่อนอยู่ แต่เซลล์ผิวที่นิยมนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ จะใช้จากส่วนของใบ เพราะใบมีลักษณะเป็นแผ่นบาง มีพื้นที่ผิวมาก มีเซลล์ผิวทั้งด้านบน (upper epidermis) และด้านล่าง (lower epidermis) การพัฒนาของเอมบริโอจะเริ่มจากเซลล์บางเซลล์จากเซลล์ผิว มีการคืบตัว เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เจริญ ซึ่งมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เซลล์อื่นๆ ข้างเคียงไม่มีการแบ่งตัว จนต่อมาก็จะเกิดเป็นลักษณะ globular-shaped และพัฒนาต่อไปเป็น heart-shaped จนในที่สุดก็เป็นเอมบริโอที่สมบูรณ์ รูปร่างแบบ torpedo-shaped อนึ่งจากการศึกษาการพัฒนาของเอมบริโอจิงนิซิสของแผ่นใบ พบว่า นอกจาก เซลล์ชั้นผิวแล้ว เซลล์ชั้นอื่นๆ คือ palisade cell และ spongy cell ก็สามารที่จะชักนำให้เกิดเอมบริโอจิงนิซิสได้เหมือนกัน

การพัฒนาของเอมบริโอจากการเลี้ยงเซลล์เดี่ยว (single cell culture) เซลล์เดี่ยวอาจได้มาจากการย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์ (pectinase enzyme) หรือได้จากการแยกเซลล์จากแคลลัส การเพาะเลี้ยงกระทำในอาหารเหลว จึงเรียกวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบนี้ว่าการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย การพัฒนาของเอมบริโอเริ่มจากเซลล์เดี่ยวๆ แบ่งตัวออกเป็น 2, 4 เซลล์ และทวีคูณไปเรื่อยๆ จนได้เป็นกลุ่มเซลล์ ต่อมาพัฒนาเป็นก้อนกลมๆ (globular-shaped) เจริญต่อไปเป็น heart-shaped และ torpedo-shaped ในที่สุด

ข้อแตกต่างระหว่าง organogenesis และ embryogenesis มีดังนี้คือ

1. การเชื่อมต่อระหว่างยอดและราก (shoot-root connection)

ในการเกิดออร์แกนโนเจเนซิสนั้น การเกิดยอดและรากจะเป็นอิสระต่อกัน คือ การเกิดยอดและรากอาจจะไม่ติดต่อกันก็ได้ รากอาจจะเกิดจากบริเวณหนึ่ง ส่วนยอดจะเกิดอีกบริเวณหนึ่ง แม้บนแคลลัสก้อนเดียวกัน แต่ในบางครั้งอาจจะพบว่า เนื้อเยื่อที่เกิดยอดและรากอยู่ใกล้กันอาจจะเจริญติดกันได้ หรือเนื้อเยื่อส่วนยอดด้านโคน อาจจะสามารถเกิดรากขึ้นมาจนเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ส่วนในเอมบริโอเจเนซิสส่วนยอดและรากจะต้องติดต่อกัน เนื่องจากพัฒนามาจากเซลล์ๆ เดียวกัน

2. Polarity การเกิดยอดหรือรากในแคลลัสนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกหรือสิ่งที่จะมากระตุ้นให้เกิดเป็น meristematic cell และ meristematic cell เหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากก็ได้ ดังนั้นจึงเชื่อว่า polarity ของออร์แกนโนเจนซิส เสียไป หรือ ไม่มี polarity ส่วนในเอ็มบริโอเจเนซิสนั้นจะมี polarity ซึ่งเป็นแบบ bipolar เนื่องจากการพัฒนาจากเซลล์ๆ เดียวเป็นกลุ่มเซลล์ขึ้นด้านหนึ่งของกลุ่มเซลล์เหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นยอดเจริญขึ้นไปบนอากาศ อีกด้านหนึ่งพัฒนาเป็นราก เจริญลงสู่แนวตั้ง เหมือนต้นพืชที่เจริญทั่วๆ ไป

3. การเชื่อมต่อระหว่างท่อน้ำท่ออาหาร (Vascular bundle connection) ท่อน้ำท่ออาหารของยอดและรากในขบวนการออร์แกนโนเจนซิสอาจจะต่อหรือไม่ต่อกันก็ได้ แต่โดยทั่วๆ ไป มักจะต่อกัน โดยจะต่อผ่านเนื้อเยื่อเดิม แต่ในขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส ท่อน้ำและท่ออาหารของยอดและรากจะเชื่อมต่อกัน (อรดี, 2539)

ยีนที่พบในกระบวนการ Somatic Embryogenesis ในพืชชนิดอื่น

ยีนสำคัญที่พบในกระบวนการ somatic embryogenesis ในพืชอื่นๆ ที่ได้มีการศึกษาไว้แล้ว มีกลุ่มยีนสำคัญอยู่หลายกลุ่ม พบทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocot) และพืชใบเลี้ยงคู่ (dicot) ได้แก่

กลุ่มยีนแรก คือกลุ่มยีน *SERK* (*somatic embryogenesis receptor like kinase*) ซึ่ง Schmidt และคณะ (1997) พบว่ายีน *SERK* มีการแสดงออกสูงในแคโรท แสดงออกในระยะ globular ของกระบวนการ embryogenesis ต่อมา Hecht และคณะ (2001) พบว่ายีนนี้มีการแสดงออกเฉพาะในระยะพัฒนาเป็น zygote ของเอ็มบริโอเท่านั้น ซึ่งยีนนี้พบบริเวณผนังของโปรตีน เกี่ยวข้องกับกระบวนการ phosphorylation และ dephosphorylation (Shah *et al.* 2002) มีรายงานผลการศึกษาว่ายีน *SERK* พบในมะพร้าว (Perez-Nunez *et al.* 2008) ซึ่งเป็นพืชที่มีความใกล้เคียงกับปาล์มน้ำมันมาก และยังพบในพืชอื่นหลายชนิด เช่น ข้าวโพด (Baudino *et al.* 2001), *Arabidopsis thaliana* (Hecht *et al.* 2001), ข้าว *Oryza sativa* (Hu *et al.* 2005), และ *Daucus carota* (Schmidit *et al.* 1997)

กลุ่มยีนที่สองคือ กลุ่มยีน *LEC1* (*Leafy cotyledon 1-like*) มีการแสดงออกก่อนระยะ embryogenesis และ สะสมอยู่ในเอ็มบริโอ suspensor (ส่วนที่ฝังตัวในเอ็นโดสเปิร์ม) และเอ็นโดสเปิร์ม (Laurence *et al.* 2008) โดยยีน *LEC1* เกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมการถอดรหัส (transcriptional regulator) ซึ่งมีความสามารถที่จะกำหนดกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ให้เข้าสู่ระยะการ

พัฒนาเป็นเอมบริโอ (Feher *et al.* 2003) มีรายงานการพบยีนนี้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าวโพด (*Zea mays* (Zhang *et al.* 2002)) และพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น *Arabidopsis thaliana* (Gaj *et al.* 2005), *Helianthus annuus* (Fambrini *et al.* 2006), *Theobroma cacao* (Alemanno *et al.* 2008) และ grapevine (*Vitis vinifera.*) Schellenbaum *et al.* 2008)

กลุ่มยีนที่สามคือ กลุ่มยีน *WUSCHEL* พบในบริเวณที่เซลล์แบ่งตัวเร็ว เช่น ยอดและดอกของ *Arabidopsis* (Mayer *et al.* 1998) เกี่ยวข้องกับ transcriptional activator ของดอกและเกี่ยวข้องกับ transcriptional repressor ของไซโตไคนิน (cytokinin) (Kieffer *et al.* 2006) มีรายงานการพบยีนนี้ในกาแฟ *coffea canephora* (Arroyo-Herrera *et al.* 2008)

กลุ่มยีนที่สี่คือ กลุ่มยีน *BBM (BABY BOOM)* โดยโปรตีนจากยีน *BBM* ที่ได้มีความเหมือนกับ transcription factor ของ *AP2/ERF* (Boutillier *et al.* 2002) ใน *Arabidopsis* และกะหล่ำพบว่ายีนนี้ชักนำให้เกิดโสมติคเอมบริโอ (Laurence *et al.* 2008) และยังพบใน ต้นยาสูบ *Nicotiana tabacum* (Srinivasan *et al.* 2007) นอกจากนี้ยังอาจจะมีกลุ่มยีนอีกหลายชนิดที่อาจจะมีการแสดงออกในกระบวนการพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมัน

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง พื้นฐานของ AFLP คือการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของเอนไซม์โดยต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์โดย adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้นๆ ที่มีปลายข้างหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ดังนั้นจึงสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้ได้ และจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ต่อไป ด้วยวิธีการดังกล่าว ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก็จะสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ แต่จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในคราวเดียวกันมีมากและไม่สามารถจะแยกจากกันหรือตรวจสอบโดยวิธีทั่วไป ดังนั้นการสังเคราะห์ไพรเมอร์ในการทำ AFLP จึงเพิ่มเบสคัดเลือกเข้าที่ปลาย 3' ต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อให้เลือกจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่อยู่ต่อจากบริเวณตัดจำเพาะ

สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์นั้นเท่านั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วนและสามารถกำหนดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปนั่นเอง ถ้าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษามีเบสทั้ง 4 ชนิด ในสัดส่วนเท่ากัน การเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อคัดเลือก 1 เบสจะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณเหลือเพียง 1 ใน 4 ของทั้งหมด ดังนั้นจึงสามารถควบคุมให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในจำนวนที่เหมาะสมได้ ซึ่งต้องการให้มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในช่วง 50-100 แถบ ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel แบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่งๆ เรียกว่าลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprint) ดังนั้นเทคนิค AFLP จึงเป็นวิธีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอวิธีหนึ่ง แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างบ่งบอกถึงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมาย เรียกว่าเครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) ใช้ศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตได้เช่นเดียวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอื่น (สุรินทร์, 2552)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ชนิดพืชที่ศึกษา

ตัวอย่างเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ *Elaeis guineensis* Jacq. ระยะรูปกลม ระยะรูปหัวใจ ระยะทอรับใบ ระยะสร้างใบเลี้ยง ระยะพัฒนาเป็นต้นอ่อน ใบ และดอก ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

2. ชนิดไพรเมอร์

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาต้นอ่อน

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' ไป 3')	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (3' ไป 5')	Melting temperature (°c)	ขนาด (bp)
<i>SERK</i>	GACTTCGTGGGTTTTTGCAT	CAATTGTTCCACGAACAGCA	60	331
<i>Lec1</i>	GTGGGTCAAGTGATGGGAAC	AAGGTGGTGGGACAACAAAG	60	459
<i>wuschel</i>	AGCAGCTGATGATCCTGGAG	TAGTACTGGGCGCAGGAGAG	60	214
<i>BBM</i>	AGGGTAGCAGGCAACAAAGA	CATCACCTCCCATGGTCTCT	59	777

ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาต้นอ่อน

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' ไป 3')	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (3' ไป 5')	Melting temperature (°c)	ขนาด (bp)
<i>Lec1copy1</i>	TTCAGTACGGGAGCAAGACA	AAGGTGGTGGGACAACAAAG	59	416
<i>Lec1copy2</i>	CGGTGGACAGTAAGGGAGAA	ATCATCAAGCTATTCATCCAACG	60	504
<i>Lec1copy3</i>	CGGTGGACAGTAAGGGAGAA	TCATCAAGCTATTCATCCAACG	60	503
<i>BBMcopy1</i>	AGGGTAGCAGGCAACAAAGA	CATCACCTCCCATGGTCTCT	59.9	77

3. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน

เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BH10 DT1 สำหรับเพิ่มปริมาณพลาสมิด

4. พลาสมิดสำหรับการโคลนยีน

พลาสมิด pGEM-Teasy (บริษัท Promega สหรัฐอเมริกา) ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ T7 และ SP6 ควบคุมการแสดงออกของยีน *LacZ* และต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน มีตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ multiple cloning site

5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ

- 5.1 ไนโตรเจนเหลว
- 5.2 โกร่ง
- 5.3 2% (w/v) CTAB
- 5.4 5M NaCl
- 5.5 1M Tris-HCL
- 5.6 0.5M EDTA
- 5.7 PVPP
- 5.8 DEPC water
- 5.9 2 mercaptone
- 5.10 3M NaOAc

6. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน

- 6.1 Pipette (บริษัท Eppendorf Research เยอรมนี)
- 6.2 Centrifuge 3740 (บริษัท Kubota ญี่ปุ่น)
- 6.3 GelCam Camera (บริษัท DNR Bioimaging Systems อิสราเอล)
- 6.4 GeneAmp PCR system 9600 (บริษัท Perkin-Elmer สหรัฐอเมริกา)
- 6.5 Eppendorf tube ขนาด 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร

- 6.6 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- 6.7 ชุดเครื่องมือเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส
- 6.8 ตู้ย้ายเชื้อและอุปกรณ์สำหรับการย้ายเชื้อ
- 6.9 เครื่องชั่ง (บริษัท Sartorius เยอรมนี)
- 6.10 เครื่องวัดความเป็นกรดค่า
- 6.11 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง
- 6.12 ไมโครเวฟ
- 6.13 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
- 6.14 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 6.15 ถังมือยาง
- 6.16 อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani agar
- 6.17 อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth
- 6.18 ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน
- 6.19 Verso cDNA Kit (Thermo Scientific)

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยานบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

โปรแกรม Blast จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/blast/> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนที่สนใจกับฐานข้อมูล

โปรแกรม CLC sequence viewer 6 สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มของนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษา

โปรแกรม Primer3 plus จากเว็บไซต์ <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/prime3plus.cgi>. สำหรับการออกแบบไพรเมอร์จาก ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจ

โปรแกรม Oligocalc Oligonucleotide Properties Calculator จากเว็บไซต์ <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>. สำหรับคำนวณค่าพารามิเตอร์ของไพรเมอร์

8. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ใน AFLP

- 8.1 12 U Restriction enzyme *EcoRI*
- 8.2 8 U Restriction enzyme *MseI*

- 8.3 0.3 μ M Adapter *EcoRI*
- 8.4 2 μ M Adapter *MseI*
- 8.5 4.5% polyacrylamide gel
- 8.6 silver staining solution
- 8.7 T4 ligase buffer
- 8.8 0.4 U T4 DNA ligase
- 8.9 1 mM dNTP
- 8.10 PCR buffer
- 8.11 1.5 mM $MgCl_2$
- 8.12 0.6 U Taq polymerase
- 8.13 bind silane solution
- 8.14 repel silane solution
- 8.15 ชุดกระจกสำหรับทำอิเล็กโทรโฟริซิส
- 8.16 10% acetic acid
- 8.17 developer solution

วิธีการ

1. การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาต้นอ่อนในปาล์มน้ำมัน

1.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ

บดตัวอย่างปาล์มน้ำมันระยะต่างๆ 0.2 กรัม ในไนโตรเจนเหลวใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (2%(w/v) CTAB, 2M NaCl, 100mM Tris-HCl (pH 7.4), 25 mM EDTA, 2% (w/v) PVPP, DEPC water, 2% 2-mercaptoethanol) 750 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แช่น้ำแข็ง 10 นาที เติม CI solution (24 คลอโรฟอร์ม : 1 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ โดยปริมาตร) 750 ไมโครลิตร แล้ว vortex นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 rpm อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบน 700 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม PCI (25 ฟีนอล : 24 คลอโรฟอร์ม : 1 ไอโซเอมิล โดยปริมาตร) 700 ไมโครลิตร แล้ว vortex นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 rpm อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบน 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม 3 M NaOAc 40 ไมโครลิตร และ 100% EtOH 1 มิลลิลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 rpm อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% EtOH 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที ทำให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น (DEPC treated water) คัดแปลงมาจากวิธีการของ Tao Wang's method

1.2 การเลือกไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่ได้มีการศึกษาแล้ว ในพืชอื่น จากฐานข้อมูล GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ ด้วยโปรแกรม CLC sequence viewer 6 ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ข้อมูลที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ด้วยโปรแกรม Primer 3 plus ตรวจสอบความถูกต้องของไพรเมอร์โดยโปรแกรม Oligocalc Oligonucleotide Properties Calculator

1.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน โดยนำ total RNA ที่ความเข้มข้นเท่ากันมาทำปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อสร้างสาย cDNA ด้วยไพรเมอร์ Oligo-dT โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป VERSO cDNA Kit (Thermo Scientific) และนำ cDNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ในตารางที่ 1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR thermal cycle 9600 (บริษัท Perkin-Elmer สหรัฐอเมริกา) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1	จำนวน 1 รอบ	ที่	95 องศาเซลเซียส	3	นาที
โปรแกรมที่ 2	จำนวน 30 รอบ	ที่	95 องศาเซลเซียส	30	วินาที
			60 องศาเซลเซียส	30	วินาที
			72 องศาเซลเซียส	1	นาที
สิ้นสุดที่			72 องศาเซลเซียส	7	นาที

โดยจะเก็บผลผลิตของพีซีอาร์ ที่ 22, 26 และ 30 รอบ และใช้ยีน Actin เป็น control นำผลพีซีอาร์มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 1% เจลอะกาโรส เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker (บริษัท Bio Basic Inc แคนาดา)

1.4 การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์กับพลาสมิด

นำชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการพีซีอาร์มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้บนเจลอะกาโรส สกัดดีเอ็นเอออกจากเจล โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (บริษัท QIAGEN สหรัฐอเมริกา) เติม 3 เท่า โดยปริมาตร ของบัฟเฟอร์ QG ต่อ 1 เท่า ของน้ำหนักเจล (ประมาณ 100 มิลลิกรัม ต่อ 100 ไมโครกรัม) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จนเจลละลายผสมให้เข้ากันดูดสารละลายใส่ในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที เติม บัฟเฟอร์ QG 500 ไมโครลิตร ลงใน คอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที ล้างตะกอนด้วยการเติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ ต่อ นาที นาน 1 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้ว หมุนเหวี่ยงอีกครั้งนาน 1 นาที ละลายตะกอนด้วยการเติมบัฟเฟอร์ EB 30 ไมโครลิตร ผ่านคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 ต่อ นาที นาน 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอ ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 1% เจลอะกาโรส นำดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับ pGEM-Teasy vector (บริษัท

Promega สหรัฐอเมริกา) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (2.5 ยูนิต ต่อ 100 ไมโครลิตร) ผสมกับ 1X reaction buffer (บริษัท Promega สหรัฐอเมริกา) นำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส

1.5 การเตรียมซูเปอร์คอมพีเทนต์เซลล์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BH10 DT1 วางโคโลนีเดี่ยวลงในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่า 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง นำ 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani broth 50 มิลลิลิตร นาน 3 ชั่วโมง ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5 ตกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 10% Glycerol ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็ง จนกว่าจะนำไปใช้โดยใช้ 60 ไมโครลิตร ต่อการถ่ายยีนในแต่ละตัวอย่าง

1.6 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี Electro – transformation

เติมดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ในข้อ 1.4 จำนวน 1-2 ไมโครกรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีคอมพีเทนต์เซลล์ 60 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็งนาน 5 นาที ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน cuvette ใส่ลงในเครื่อง Electro – transformation ตั้งค่ากระแสไฟฟ้าที่ 2.5 แอมป์ นาน 5 วินาที เลี้ยงในอาหาร SOC (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ และ 20 mM glucose) จำนวน 400 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 rpm นาน 1 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียรวมทั้งเซลล์แบคทีเรียมาเคลือบบนผิวหน้าอาหาร LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติม IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

1.7 การตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม

นำโคโลนีสีขาวเพิ่มปริมาณบนอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ M13_F (-20) 5'GTAAAACGACGGCCAGT3' และ M13_R

(-24) GGAAACAGCTATGACCATG 3' ตั้งโปรแกรมเครื่องพีซีอาร์ที่ที่ความแตกต่างของอุณหภูมิ
ดังนี้

โปรแกรมที่ 1	จำนวน 1 รอบ	ที่ 95 องศาเซลเซียส	3	นาที
โปรแกรมที่ 2	จำนวน 10 รอบ	ที่ 95 องศาเซลเซียส	30	วินาที
		ที่ 60 องศาเซลเซียส	30	วินาที
		ลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.5 องศาเซลเซียส		
		ที่ 72 องศาเซลเซียส	2	นาที
โปรแกรมที่ 3	จำนวน 25 รอบ	ที่ 95 องศาเซลเซียส	15	วินาที
		ที่ 55 องศาเซลเซียส	30	วินาที
		ที่ 72 องศาเซลเซียส	1	นาที
สิ้นสุด		ที่ 72 องศาเซลเซียส	7	นาที

นำผลพีซีอาร์มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสบน 1% เจลอะกาโรส เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker (บริษัท Bio Basic Inc แคนาดา) สกัดดีเอ็นเอออกจากเจล โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (บริษัท QIAGEN สหรัฐอเมริกา) เดิม 3 เท่า โดยปริมาตรของบัฟเฟอร์ QG ต่อ 1 เท่า ของน้ำหนักเจล (ประมาณ 100 มิลลิกรัม ต่อ 100 ไมโครกรัม) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จนเจลละลายผสมให้เข้ากันดูดสารละลายใส่ในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที เติม บัฟเฟอร์ QG 500 ไมโครลิตร ลงใน คอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที ล้างตะกอนด้วยการเติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้ว หมุนเหวี่ยงอีกครั้งนาน 1 นาที ละลายตะกอนด้วยการเติมบัฟเฟอร์ EB 30 ไมโครลิตร ผ่านคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอ ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสบน 1% เจลอะกาโรส ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท

1ST BASE Sequencing ประเทศ มาเลเซีย

1.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางอนุชีววิทยาบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาตัดตำแหน่งไพรเมอร์ M13 ออกโดยใช้โปรแกรม CLC sequence viewer 6 จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มของนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษา เพื่อหาจำนวนยีนนั้นๆ ในปาล์มน้ำมัน และใช้โปรแกรม Blast จากเว็บไซด์ <http://www.ncbi>.

nlm.nih.gov/cgi-bin/blast/ สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์กับนิวคลีโอไทด์จากพืชชนิดอื่น

1.9 การเลือกไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีนนั้นๆ เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลอง โดยใช้โปรแกรม Primer 3 plus ตรวจสอบความถูกต้องของไพรเมอร์โดยโปรแกรม Oligocalc Oligonucleotide Properties Calculator

1.10 ยืนยันผลการทดลองด้วยวิธี PCR

นำ cDNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ในตารางที่ 2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR thermal cycle 9600 (บริษัท Perkin-Elmer สหรัฐอเมริกา) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1	จำนวน 1 รอบ	ที่	95 องศาเซลเซียส	3	นาที
โปรแกรมที่ 2	จำนวน 30 รอบ	ที่	95 องศาเซลเซียส	30	วินาที
	60 องศาเซลเซียส		30	วินาที	
	72 องศาเซลเซียส		1	นาที	
สิ้นสุดที่			72 องศาเซลเซียส	7	นาที

โดยจะเก็บผลผลิตของพีซีอาร์ ที่ 22, 26 และ 30 รอบ และใช้ยีน Actin เป็น control นำผลพีซีอาร์มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 1% เจลอะกาโรส เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker (บริษัท Bio Basic Inc แคนาดา)

2. cDNA AFLP

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ

บดตัวอย่างปาล์มน้ำมันระยะต่างๆ 0.2 กรัม ในไนโตรเจนเหลวใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมนสารละลายบัฟเฟอร์ (2%(w/v) CTAB, 2M NaCl, 100mM Tris-HCl (pH 7.4), 25 mM EDTA, 2% (w/v) PVPP, DEPC water, 2% 2-mercaptoethanol) 750 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที เติม CI solution (24 คลอโรฟอร์ม : 1 ไอโซ

เอมิลแอลกอฮอล์ โดยปริมาตร) 750 ไมโครลิตร แล้ว vortex นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 rpm อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบน 700 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เดิม PCI (25 ฟีนอล : 24 คลอโรฟอร์ม : 1 ไอโซเอมิล โดยปริมาตร) 700 ไมโครลิตร แล้ว vortex นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 rpm อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบน 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เดิม 3 M NaOAc 40 ไมโครลิตร และ 100% EtOH 1 มิลลิลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 rpm อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% EtOH 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที ทำให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น (DEPC treated water) คัดแปลงมาจากวิธีการของ Tao Wang's method

2.2 เปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็น cDNA

โดยนำ total RNA ที่ความเข้มข้นเท่ากันมาทำปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อสร้างสาย cDNA ด้วยไพรเมอร์ Oligo-dT โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป VERSO cDNA Kit (Thermo Scientific)

2.3 ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด rare cutter และ frequent cutter คือ *EcoRI* และ *MseI* ใส่ดีเอ็นเอและสารละลายแต่ละชนิดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังนี้

สารละลายดีเอ็นเอ (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2.5	ไมโครลิตร
5X reaction buffer	5	ไมโครลิตร
<i>EcoRI</i> (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.25	ไมโครลิตร
<i>MseI</i> (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.25	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	16.75	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (1X reaction buffer ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate และ 50 mM potassium acetate)

2.4 เชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adaptor

นำดีเอ็นเอที่ตัดไว้ในข้อ 2.3 มาเติมสารต่างๆ ดังนี้

ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	25	ไมโครลิตร
<i>Eco</i> RI adaptor (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
<i>Mse</i> I adaptor (25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
5X T4 ligase buffer	10	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	11	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องอีก 2 ชั่วโมง (1X T4 ligase buffer ประกอบด้วย 1mM ATP, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate, 5 mM DTT และ 50 ng/μl BSA)

2.5 การทำ preselective amplification

นำดีเอ็นเอจากข้อ 2.4 มาทำปฏิกิริยา (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) โดยเติมสารต่างๆ ดังนี้

ดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.4	2	ไมโครลิตร
Primer E-A (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
Primer M-C (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
dNTP mix (2 mM)	2.5	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
MgCl ₂ (50 mM)	0.75	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> polymerase	0.1	ไมโครลิตร
น้ำ	15.15	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR thermal cycle 9600 (บริษัท Perkin-Elmer สหรัฐอเมริกา) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1	จำนวน 1 รอบ	ที่	95 องศาเซลเซียส	3	นาที
โปรแกรมที่ 2	จำนวน 25 รอบ	ที่	95 องศาเซลเซียส	30	วินาที
	56 องศาเซลเซียส		1	นาที	
	72 องศาเซลเซียส		1	นาที	
สิ้นสุดที่			72 องศาเซลเซียส	7	นาที

2.6 การทำ selective DNA amplification

ต้องเจือจาง pre-amplification ในข้อ 2.5 ด้วย dH₂O อัตราส่วน 1:5 ก่อนนำไปใช้

โดยเติมสารต่างๆ ดังนี้

ดีเอ็นเอที่เจือจางจากข้อ 2.5	5	ไมโครลิตร
Primer E-ANN (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
Primer M-CNN (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
dNTP mix (2 mM)	2	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2	ไมโครลิตร
MgCl ₂ (50 mM)	0.6	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.1	ไมโครลิตร
น้ำ	8.3	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR thermal cycle 9600 (บริษัท Perkin-Elmer สหรัฐอเมริกา) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1	จำนวน 1 รอบ	ที่	95 องศาเซลเซียส	5	นาที
โปรแกรมที่ 2	จำนวน 12 รอบ	ที่	95 องศาเซลเซียส	30	วินาที
			65 องศาเซลเซียส	30	วินาที

ลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส

			72 องศาเซลเซียส	1	นาที
โปรแกรมที่ 3	จำนวน 25 รอบ	ที่	95 องศาเซลเซียส	30	วินาที
	56 องศาเซลเซียส		30	วินาที	
	72 องศาเซลเซียส		1	นาที	
สิ้นสุดที่			72 องศาเซลเซียส	7	นาที

2.7 Gel electrophoresis

การเตรียม polyacrylamide gel

- เช็ด chamber ด้วย 95% EtOH 1 ครั้ง
- เช็ด chamber ด้วย repel silane ปล่อยให้แห้ง
- เช็ดแผ่นกระจกด้วย 95% EtOH 3 ครั้ง
- เช็ดแผ่นกระจกด้วย bind silane (bind silane, acetic acid, 95% EtOH) 700 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้ง เช็ดด้วย 95% EtOH อีกครั้ง
- ประกอบกระจกเข้ากับ chamber
- เตรียม acrylamide gel 50 มิลลิลิตร (4.5% acrylamide, TEMED 70 ไมโครลิตร, 10% APS 350 ไมโครลิตร)
- เทใส่ช่องว่างระหว่าง กระจกกับ chamber ให้ทั่วทั้งกระจก
- รอให้เจลแข็งตัว 1 ชั่วโมง

Gel running

- Pre-run โดยเติม 1X TBE buffer จากนั้นนำหัวออก และทำความสะอาดหลุม
- เปิดเครื่องที่กําลังไฟ 100 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที
- เมื่ออุณหภูมิถึง 49 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างดีเอ็นเอเติมสีแล้ว heat shock ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันที
- หยุดการ pre-run ทำความสะอาดหลุม แล้วใส่หัวลงไปตั้งให้ตรง ใส่ DNA marker ลงในหลุมแรก จากนั้น ใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอ ลงไปตามหลุม
- เปิดเครื่องที่กําลังไฟ 60 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสีข้อมห่างจากจุดเริ่มต้นยาว 16 เซนติเมตร หรือประมาณ 1.5 ชั่วโมง

Silver staining

- นำกระจกแยกออกจากชุด chamber
- แช่ด้วย 10% acetic acid ปริมาตร 1 ลิตรต่อ 1 กระจก เวลา 20 นาทีในที่มืด
- ล้างด้วย dH₂O 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

- ย้อมด้วย silver-staining (1 กรัมต่อลิตร ของ silver nitrate, 1.5 มิลลิลิตรต่อลิตร ของ formaldehyde) เขย่า 30 นาทีในที่มืด
- ล้างด้วย dH₂O 10 วินาที
- ย้อมด้วย Developer-solution (30 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ sodium carbonate anhydrous, 1 เกร็ด sodium thiosulfate, 1.5 มิลลิลิตรต่อลิตร ของ formaldehyde solution) จนกระทั่งมองเห็น แถบแบนปรากฏขึ้น
- หยุดการย้อมโดยการเติม 10% acetic acid เขย่าประมาณ 10 นาที
- ล้างด้วย dH₂O นาน 5 นาที จากนั้นทิ้งไว้จนแห้ง

2.8 ตัดเจล polyacrylamide และเพิ่มปริมาณเพื่อเชื่อมต่อซันดิเอ็นเอกับพลาสมิด

- กำหนดตำแหน่ง
- ใช้มีดตัดส่วนที่ต้องการ หักน้ำไว้ 5 นาที ขูดบริเวณที่ต้องการออก ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วเติมน้ำ 50 ไมโครลิตร
- ต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที เขย่าให้ทั่วระหว่างต้ม
- นำน้ำที่ได้จากการต้มเจล มาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์จากซันดิเอ็น selective DNA amplification เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR thermal cycle 9600 (บริษัท Perkin-Elmer สหรัฐอเมริกา) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1	จำนวน 1 รอบ	ที่ 95 องศาเซลเซียส	3	นาที
	โปรแกรมที่ 2	จำนวน 12 รอบ	ที่ 95 องศาเซลเซียส	30 วินาที
		ที่ 65 องศาเซลเซียส	30	วินาที
		ลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.5 องศาเซลเซียส		
		ที่ 72 องศาเซลเซียส	2	นาที
โปรแกรมที่ 3	จำนวน 25 รอบ	ที่ 95 องศาเซลเซียส	15	วินาที
		ที่ 58 องศาเซลเซียส	30	วินาที
		ที่ 72 องศาเซลเซียส	1	นาที
สิ้นสุด		ที่ 72 องศาเซลเซียส	7	นาที

นำผลที่ซัวร์มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสบน 1% เจลอะกาโรส เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker (บริษัท Bio Basic Inc แคนาดา)

2.9 การเชื่อมต่อชิ้นยีนกับพลาสมิด

นำชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการพีซีอาร์มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้บนเจลอะกาโรส สกัดดีเอ็นเอออกจากเจล โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (บริษัท QIAGEN สหรัฐอเมริกา) เดิม 3 เท่า โดยปริมาตร ของบัฟเฟอร์ QG ต่อ 1 เท่า ของน้ำหนักเจล (ประมาณ 100 มิลลิกรัม ต่อ 100 ไมโครกรัม) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จนเจลละลายผสมให้เข้ากันดูดสารละลายใส่ในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที เดิม บัฟเฟอร์ QG 500 ไมโครลิตร ลงใน คอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที ล้างตะกอนด้วยการเติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ ต่อ นาที นาน 1 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้ว หมุนเหวี่ยงอีกครั้งนาน 1 นาที ละลายตะกอนด้วยการเติมบัฟเฟอร์ EB 30 ไมโครลิตร ผ่านคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 ต่อ นาที นาน 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอ ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 1% เจลอะกาโรส นำดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับ pGEM-Teasy vector (บริษัท Promega สหรัฐอเมริกา) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (2.5 ยูนิต ต่อ 100 ไมโครลิตร) ผสมกับ 1X reaction buffer (บริษัท Promega สหรัฐอเมริกา) นำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส

2.10 การเตรียมซูเปอร์คอมพีเทนต์เซลล์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BH10 DT1 วางโคโลนีเดี่ยวลงในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่า 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง นำ 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani broth 50 มิลลิลิตร นาน 3 ชั่วโมง ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5 ตกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 10% Glycerol ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร แขน้ำแข็งจนกว่าจะนำไปใช้โดยใช้ 60 ไมโครลิตร ต่อการถ่ายยีนในแต่ละตัวอย่าง

2.11 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี Electro – transformation

เติมดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ในข้อ 1.4 จำนวน 1-2 ไมโครกรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีคอมพีเทนต์เซลล์ 60 ไมโครลิตร แขน้ำแข็งนาน 5 นาที ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน cuvette ใส่ลงในเครื่อง Electro – transformation ตั้งค่ากระแสไฟฟ้าที่ 2.5 แอมป์ นาน 5 วินาที เลี้ยง

ในอาหาร SOC (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ และ 20 mM glucose) จำนวน 400 ไมโครลิตร เชย้าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 rpm นาน 1 ชั่วโมง คูดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียรวมทั้งเซลล์แบคทีเรียมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติม IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

2.12 การตรวจสอบโคลนที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม

นำโคลนสีขาวเพิ่มปริมาณบนอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ M13_F (-20) 5'GTAAAACGACGGCCAGT3' และ M13_R (-24) GGAAACAGCTATGACCATG 3' ตั้งโปรแกรมเครื่องพีซีอาร์ที่ที่ความแตกต่างของอุณหภูมิดังนี้

โปรแกรมที่ 1	จำนวน 1 รอบ	ที่ 95 องศาเซลเซียส	3	นาที
โปรแกรมที่ 2	จำนวน 10 รอบ	ที่ 95 องศาเซลเซียส	30	วินาที
		ที่ 60 องศาเซลเซียส	30	วินาที
โปรแกรมที่ 3	จำนวน 25 รอบ	ลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.5 องศาเซลเซียส		
		ที่ 72 องศาเซลเซียส	2	นาที
		ที่ 95 องศาเซลเซียส	15	วินาที
สิ้นสุด		ที่ 55 องศาเซลเซียส	30	วินาที
		ที่ 72 องศาเซลเซียส	1	นาที
		ที่ 72 องศาเซลเซียส	7	นาที

นำผลพีซีอาร์มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 1% เจลอะกาโรส เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker (บริษัท Bio Basic Inc แคนาดา) สกัดดีเอ็นเอออกจากเจล โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (บริษัท QIAGEN สหรัฐอเมริกา) เติม 3 เท่า โดยปริมาตรของบัฟเฟอร์ QG ต่อ 1 เท่า ของน้ำหนักเจล (ประมาณ 100 มิลลิกรัม ต่อ 100 ไมโครกรัม) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จนเจลละลายผสมให้เข้ากันดูดสารละลายใส่ในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที เติม บัฟเฟอร์ QG 500 ไมโครลิตร ลงใน คอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที ล้างตะกอนด้วยการเติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ

ห้องนาน 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที เทบัพเฟอร์ทิ้ง แล้ว หมุนเหวี่ยงอีกครั้งนาน 1 นาที ละลายตะกอนด้วยการเติมบัพเฟอร์ EB 30 ไมโครลิตร ผ่านคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอ ไปตรวจสอบด้วย วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% เจลอะกาโรส ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1ST BASE Sequencing ประเทศ มาเลเซีย

2.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางอนุชีววิทยาบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาตัดตำแหน่งไพรเมอร์ M13 ออกโดยใช้โปรแกรม CLC sequence viewer 6 จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มของนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษา เพื่อหาจำนวนยีนนั้นๆ ในพาล์มน้ำมัน และใช้โปรแกรม Blast จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/blast/> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์กับนิวคลีโอไทด์จากพืชชนิดอื่น

ผลและวิจารณ์

1. การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาต้นอ่อนในปาล์มน้ำมัน

1.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

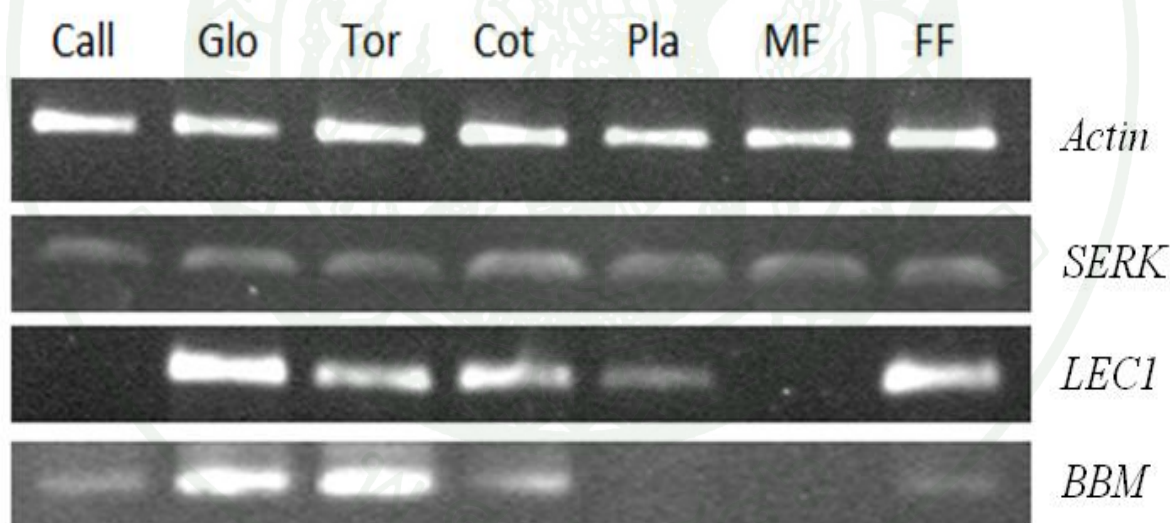
ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน โดยนำ total RNA ที่ความเข้มข้นเท่ากันมาทำปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อสร้างสาย cDNA ด้วยไพรเมอร์ Oligo-dT โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป VERSO cDNA Kit (Thermo Scientific) และนำ cDNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ในตารางที่ 1 พบว่ามีการแสดงออกของยีนต่างๆ ในเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยยีน *SERK* มีระดับการแสดงออกเท่ากันในทุกเนื้อเยื่อ ยีน *LECI* ไม่แสดงออกในระยะแคลลัสและในดอกตัวผู้ แต่แสดงออกมากในระยะ globular และค่อยๆ ลดลงในระยะ torpedo, cotyledon และน้อยที่สุดในระยะ plantlet นอกจากนี้ยังแสดงออกสูงในดอกตัวเมีย ยีน *WUSCHEL* ไม่พบการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อที่ทดสอบ และยีน *BBM* มีการแสดงออกเล็กน้อยในระยะ callus และระดับการแสดงออกสูงขึ้นในระยะ globular และระยะ torpedo จากนั้นลดลงในระยะ cotyledon แต่ไม่แสดงออกในระยะ plantlet และในดอกตัวผู้ (ภาพที่ 6)

จากผลการทดลองครั้งนี้ทำให้ทราบว่ายีน *LECI* และยีน *BBM* ในปาล์มน้ำมันน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงจากระยะ callus สู่ระยะการพัฒนาเป็นต้นอ่อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kwong และคณะ (2003) ว่ายีน *LECI* มีการแสดงออกในระยะ globular และ torpedo ของ *Arabidopsis* และรายงานของ Eng-Ti L Low และคณะ (2008) ว่ายีน *BBM* มีการแสดงออกในระยะ embryogenesis ของปาล์มน้ำมัน

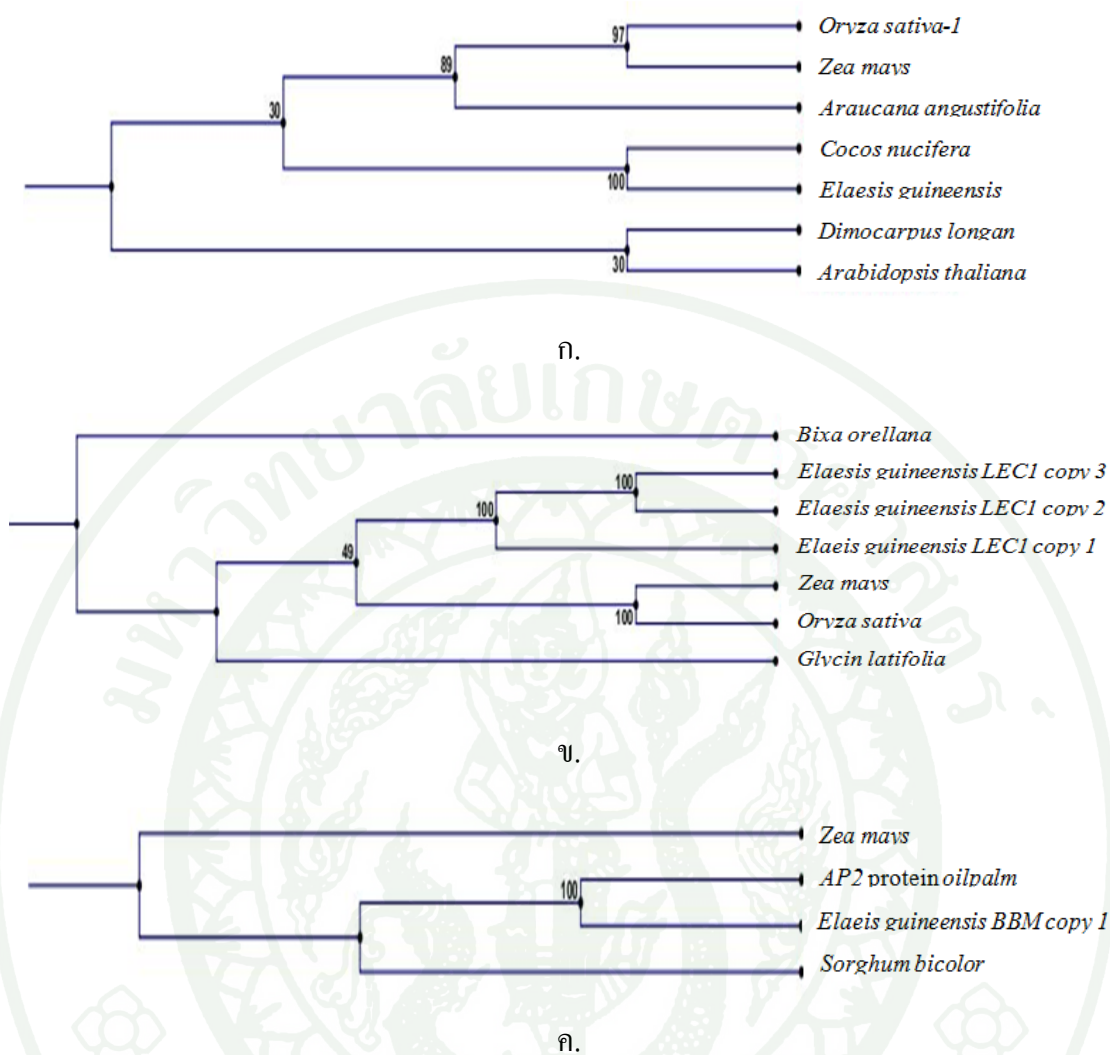
1.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางอนุชีววิทยาบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาตัดตำแหน่งไพรเมอร์ M13 ออกโดยใช้โปรแกรม CLC sequence viewer 6 จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มของนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษา แยกจำนวนซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม Clustal Alignment และใช้โปรแกรม Blast จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/blast/> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์กับนิวคลีโอไทด์จากพืชชนิดอื่น

จากข้อมูลของนิวคลีโอไทด์พบว่ายีน *SERK* มีอย่างน้อย 1 ชุด ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SERK* ในปาล์มมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SERK* ในพืชอื่น พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน *somatic embryogenesis receptor kinase* ในมะพร้าวมากที่สุดถึง 97% จากฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (ภาพที่ 7ก) ยีน *Lec1* พบว่ามีอย่างน้อย 3 ชุด จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Lec1* ในปาล์มเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Lec1* ในพืชอื่น พบว่ายีนทั้ง 3 ชุด มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวคือ ข้าว และข้าวโพด และมีความคล้ายคลึงกับยีน *leafy cotyledon1 (Lec1)* ในข้าวโพด ถึง 88% จากฐานข้อมูลของ NCBI (ภาพที่ 7ข) ยีน *BBM* มีอย่างน้อย 1 ชุด จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BBM* ในปาล์มเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BBM* ในพืชอื่น พบว่ายีน *BBM* ใกล้เคียงกับข้าวฟ่าง และพบว่ายีน *BBM* มีความคล้ายคลึงกับยีน *AP2* ในปาล์มน้ำมันมากถึง 99% จากฐานข้อมูลของ NCBI ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบโปรตีนของยีน *BBM* กับ โปรตีนของยีน *AP2* พบว่าทั้ง 2 ยีน แสดงออกเป็นโปรตีนเดียวกัน (ภาพที่ 7ค)



ภาพที่ 6 ระดับการแสดงออกของยีน *Actin*, *SERK*, *LEC1* และ *BBM* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปาล์ม น้ำมัน โดย Call : callus, Glo : globular, Tor : torpedo, Cot : cotyledon, Pla : plantlet, MF : male flower และ FF : female flower



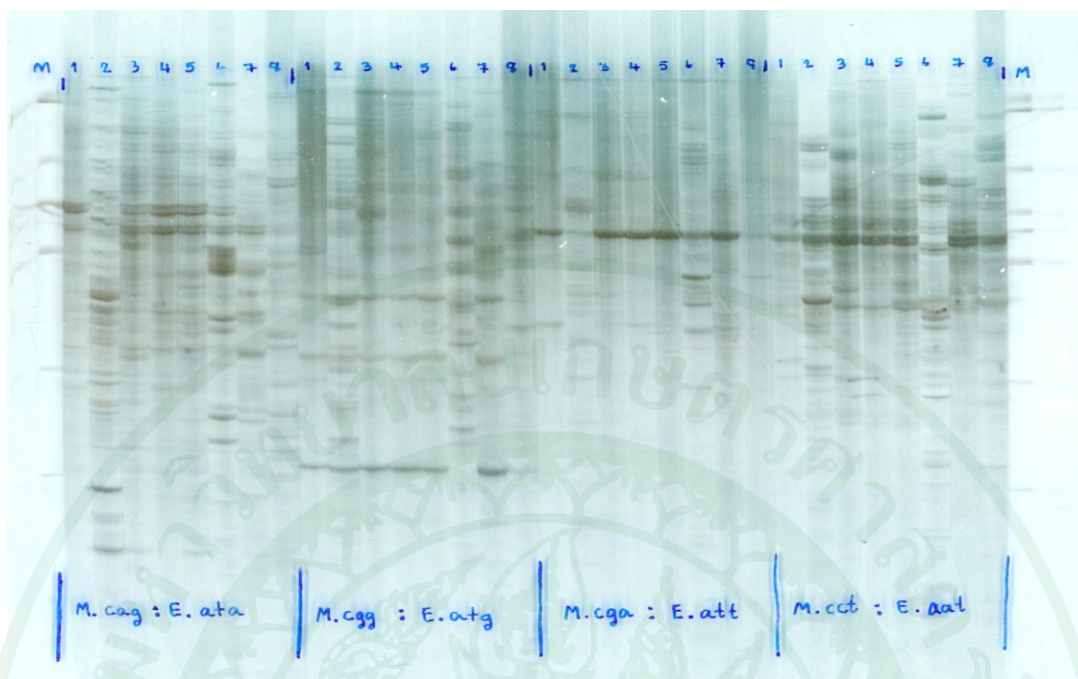
ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของต้นอ่อนในปาล์มน้ำมันกับพืชอื่นๆ

- ก) ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *SERK* ในปาล์มน้ำมันกับพืชอื่นๆ เรียงตามลำดับของ GenBank accession number ดังนี้ *Oryza sativa*, AY652735.1; *Zea mays*, NM_001111662.1; *Araucaria angustifolia*, GU134964.1; *Cocos nucifera*, AY791293.2; *Dimocarpus longan*, FJ013227.2; *Arabidopsis thaliana*, AF384970.1
- ข) ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *LEC1* ในปาล์มน้ำมันกับพืชอื่นๆ เรียงตามลำดับของ GenBank accession number ดังนี้ *Bixa orellana*, AJ489457.1; *Zea mays*, NM_001112048.1; *Oryza sativa*, AY264284.1; *Glycine latifolia*, EU088290.1
- ค) ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *BBM* ในปาล์มน้ำมันกับพืชอื่นๆ เรียงตามลำดับของ GenBank accession number ดังนี้ *Zea mays*, BT040003.1; *Elaesis guineensis* AP2 protein, AY691196.1; *Sorghum bicolor*, XM_002437349.1

2. cDNA AFLP

2.1. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน โดยใช้เทคนิค AFLP

คัดเลือกคู่ของ AFLP Primer จำนวน 16 คู่ โดยการสุ่ม นำคู่ของ primer จำนวน 16 คู่ (E-ATA + M-CAG, E-ATG + M-CGG, E-ATT + M-CGA, E-AAT + M-CCT, E-GCC + M-CGA, E-GTT + M-CGA, E-GCG + M-CAA, E-GGC + M-CAA, E-GAC + M-CAA, E-GGT + M-CAA, E-GTC + M-CAG, E-GAG + M-CAG, E-GAA + M-CGG, E-GTA + M-CGG, E-AGT + M-CCT และ E-GGG + M-CCT) มาทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอระยะพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ระยะรวมทั้งดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและใบ รวม 8 ระยะ ผลการจัดทำรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอระยะพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ระยะรวมทั้งดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและใบด้วย Primer 16 คู่ ดังกล่าว พบว่าในแต่ละคู่ของ primer มีทั้งให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจำนวน 12 คู่ และไม่ให้แถบดีเอ็นเอเลยจำนวน 4 คู่ ดังนี้ คู่ไพรเมอร์ E-GCG + M-CAA, E-GGC + M-CAA, E-GAC + M-CAA, E-GGT + M-CAA (ภาพที่ 8 ข) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอและคู่ไพรเมอร์ E-ATA + M-CAG, E-ATG + M-CGG, E-ATT + M-CGA, E-AAT + M-CCT, E-GCC + M-CGA, E-GTT + M-CGA, E-GTC + M-CAG, E-GAG + M-CAG, E-GAA + M-CGG, E-GTA + M-CGG, E-AGT + M-CCT และ E-GGG + M-CCT ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (ภาพที่ 8 ก, ข และค) อีกทั้งยังพบว่าผลการทดลองของ หทัยรัตน์และคณะ (2007) พบว่าคู่ไพรเมอร์ E-A++, M-C++ สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปาล์มน้ำมัน สุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 ได้



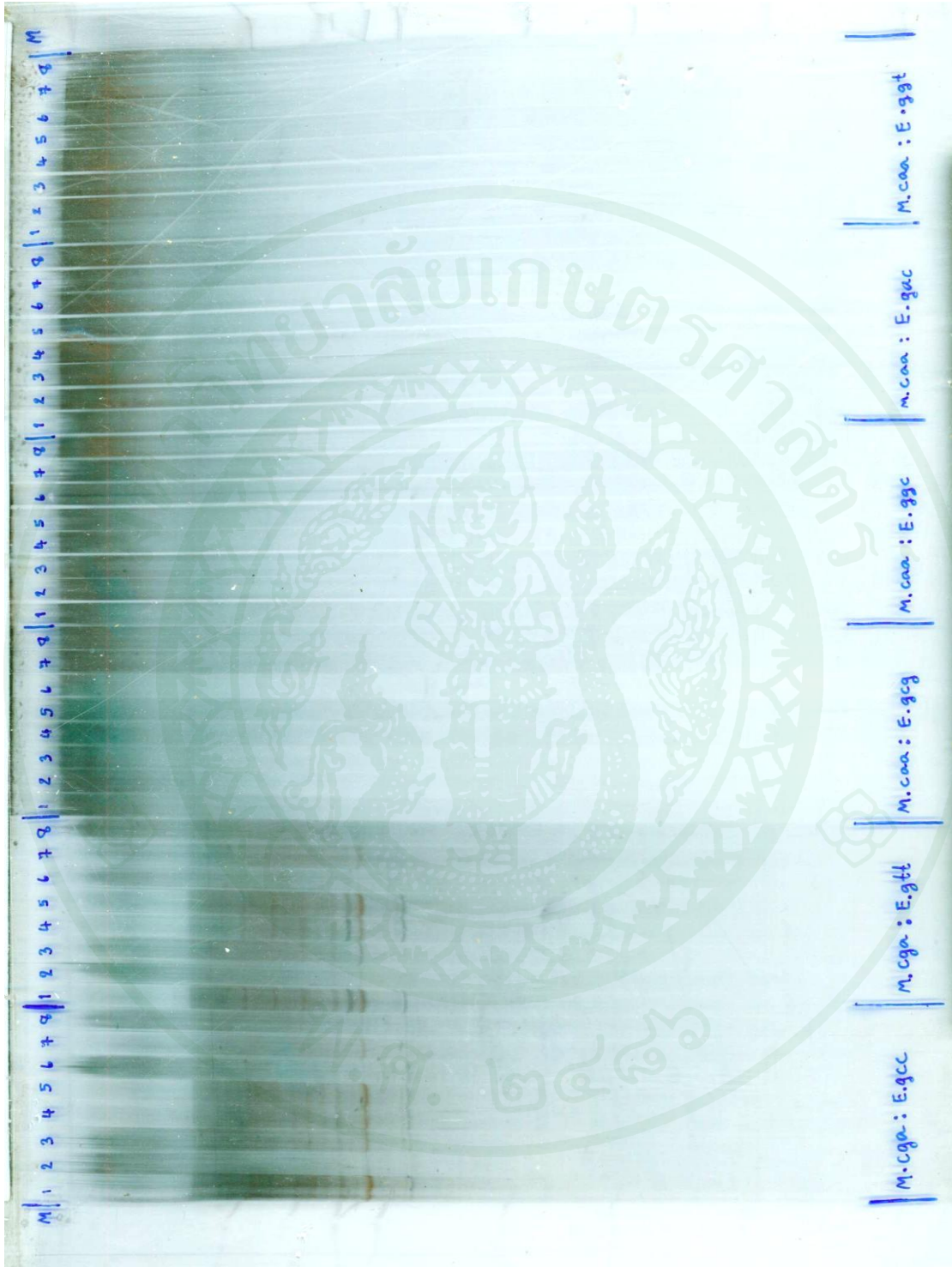
(ก)

ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอระยะพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ระยะรวมทั้งดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและใบ โดยใช้เทคนิค AFLP แยกชิ้นดีเอ็นเอด้วย 4.5% denature polyacrylamide gel ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย silver stain

ก) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอระยะพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ระยะรวมทั้งดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและใบ (ไพรเมอร์ E-ATA + M-CAG, E-ATG + M-CGG, E-ATT + M-CGA และ E-AAT + M-CCT) โดยใช้เทคนิค AFLP แยกชิ้นดีเอ็นเอด้วย 4.5% denature polyacrylamide gel ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย silver stain

ข) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอระยะพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ระยะรวมทั้งดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและใบ (ไพรเมอร์ E-GCC + M-CGA, E-GTT + M-CGA, E-GCG + M-CAA, E-GGC + M-CAA, E-GAC + M-CAA และ E-GGT + M-CAA) โดยใช้เทคนิค AFLP แยกชิ้นดีเอ็นเอด้วย 4.5% denature polyacrylamide gel ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย silver stain

ค) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอระยะพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ระยะรวมทั้งดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและใบ (ไพรเมอร์ E-GTC + M-CAG, E-GAG + M-CAG, E-GAA + M-CGG, E-GTA + M-CGG, E-AGT + M-CCT และ E-GGG + M-CCT) โดยใช้เทคนิค AFLP แยกชิ้นดีเอ็นเอด้วย 4.5% denature polyacrylamide gel ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย silver stain



(๑)

ภาพที่ 8 (ต่อ)

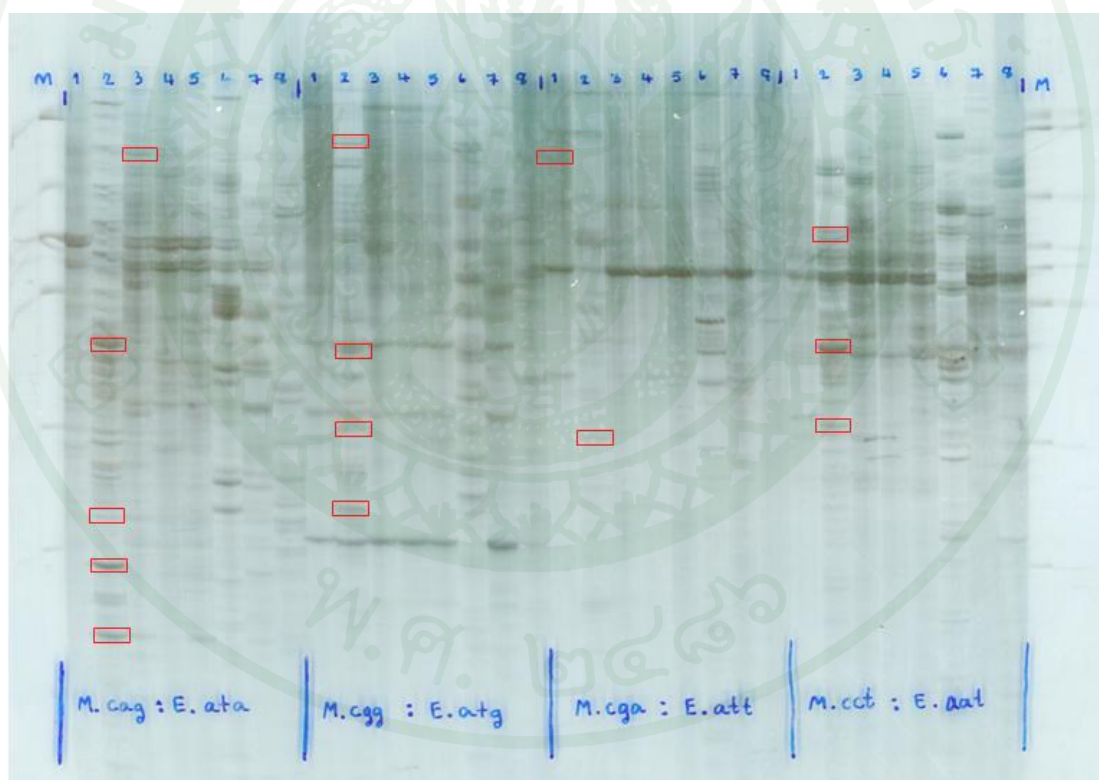


(ค.)

ภาพที่ 8 (ต่อ)

2.3 การโคลนแถบดีเอ็นเอจาก AFLP

คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจำนวน 15 แถบนำไปเพิ่มปริมาณ ด้วยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ ชั้น Selective DNA amplification เมื่อตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 1% เจลอะกาโรส ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 9 แถบจากทั้งหมด นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM-Teasy vector เพื่อเพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BH10 DT1 เลือกโคโลนีที่มีสีขาว จำนวน 10 โคโลนี ต่อแต่ละแถบดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณ และส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ E-ATA + M-CAG สามารถเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ได้ 4 แถบ ไพรเมอร์ E-ATT + M-CGA สามารถเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ได้ 1 แถบ และไพรเมอร์ E-AAT + M-CCT สามารถเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ได้ 4 แถบ (ภาพผนวกที่ 8)



ภาพที่ 9 แสดงบริเวณแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คัดเลือกในระยะพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ระยะรวมทั้งดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและใบ โดยใช้เทคนิค AFLP

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยานบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาตัดตำแหน่งไพรเมอร์ M13 ออกโดยใช้โปรแกรม CLC sequence viewer 6 จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มของนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษา แยกจำนวนซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal Alignment และ ใช้โปรแกรม Blast จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/blast/> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์กับนิวคลีโอไทด์จากพืชชนิดอื่น ได้ผลการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์กับนิวคลีโอไทด์จากพืชชนิดอื่นแสดงผลในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างนิวคลีโอไทด์จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากวิธี cDNA AFLP กับนิวคลีโอไทด์จากพืชชนิดอื่น

Number of cDNA AFLP Band	Blastn result	Accession number
E-ATA + M-CAG Band 1		
10 in 10 clones	No hit	
E-ATA + M-CAG Band 2		
5 in 10 clone	No hit	
2 in 10 clone	<i>Homo sapiens</i> chromosome 18, clone RP11-680N20, complete sequence	(AC100845.2)
1 in 10 clone	<i>Homo sapiens</i> chromosome 4 clone B203C23 map 4q25, complete sequence	(AC004049.1)
2 in 10 clone	<i>Homo sapiens</i> BAC clone RP11-339D8 from 2, complete sequence	(AC017053.8)
E-ATA + M-CAG Band 3		
5 in 10 clone	No hit	
4 in 10 clone	Human DNA sequence from clone RP5-907A6 on chromosome 1, complete	(AL589702.8)
1 in 10 clone	<i>Zea mays</i> clone 321657 hypothetical protein mRNA, complete cds	(EU968512.1)
E-ATA + M-CAG Band 4		
9 in 10 clone	<i>Amborella trichopoda</i> 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	(AY095449.1)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Number of cDNA AFLP Band	Blastn result	Accession number
1 in 10 clone	<i>Magnolia denudata</i> 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	(AF389256.1)
E-ATT + M-CGA Band 1		
8 in 10 clone	<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), RefSeqGene	(NG_012449.1)
1 in 10 clone	<i>Amborella trichopoda</i> 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	(AY095449.1)
1 in 10 clone	<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), RefSeqGene	(NG_012449.1)
E-AAT + M-CCT Band 1		
10 in 10 clone	<i>Homo sapiens</i> genomic DNA, chromosome 11q, clone:RP11-25P2, complete sequence	(AP003719.3)
E-AAT + M-CCT Band 2		
3 in 10 clone	No hit	
2 in 10 clone	<i>Amborella trichopoda</i> 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	(AY095449.1)
1 in 10 clone	<i>Homo sapiens</i> chromosome 3 clone RP11-21D1, complete sequence	(AC124153.2)
2 in 10 clone	Human DNA sequence from clone RP11-138L24 on chromosome 9, complete	(AL450312.10)
2 in 10 clone	<i>Homo sapiens</i> chromosome 15 clone RP11-96O20 map 15q21.1, complete	(AC090527.3) (AC090527)
E-AAT + M-CCT Band 3		
1 in 10 clone	No hit	
6 in 10 clone	<i>Homo sapiens</i> genomic DNA, chromosome 11q, clone:RP11-25P2, complete sequence	(AP003719.3)
3 in 10 clone	<i>Homo sapiens</i> chromosome 7 clone RP11-183I20, complete sequence	(AC083867.7)
E-AAT + M-CCT Band 4		
2 in 10 clone	No hit	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Number of cDNA AFLP Band	Blastn result	Accession number
1 in 10 clone	<i>Homo sapiens</i> dachshund homolog 2 (Drosophila) (DACH2), RefSeqGene	(NG_012817.1)
1 in 10 clone	Homo sapiens FOSMID clone ABC9-46183400C19 from chromosome 8	(gbAC207075.3)
1 in 10 clone	Human DNA sequence from clone RP1-232K4 on chromosome 6p22.3 Contains the 3'end of the JMJ gene for jumonji protein and 2 CpG islands, complete sequence	(AL021938.1)
2 in 10 clone	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 11q, clone:RP11-25P2, complete	(AP003719.3)
1 in 10 clone	Human DNA sequence from clone RP11-352K16 on chromosome 6, complete	(AL603648.3)
2 in 10 clone	Poncirus trifoliata citrus tristeza virus resistance gene locus,	(AF506028.1)

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันแยกขั้นตอนการศึกษาออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนที่หนึ่ง การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาต้นอ่อนในปาล์มน้ำมันจากพืชชนิดอื่น ซึ่งมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาต้นอ่อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาแล้ว และนำยีนเหล่านั้นมาออกแบบไพรเมอร์ จากการทดลองในปาล์มน้ำมันซึ่งนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ของแต่ละยีนมาออกแบบไพรเมอร์ ผลการทดลองพบว่ายีน *LECI* และยีน *BBM* มีการแสดงออกในระยะการพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยยีน *LECI* ไม่แสดงออกระยะ callus แต่แสดงออกมากในระยะอื่นๆ ของการพัฒนาเป็นต้นอ่อน เช่นเดียวกับกับยีน *BBM* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในระยะการพัฒนาเป็นต้นอ่อนแต่ไม่แสดงออกใน plantlet และดอกตัวผู้ ดังนั้นยีน *LECI* และยีน *BBM* น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษากลไกการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของปาล์มน้ำมันในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการย่นระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของปาล์มน้ำมันให้มีระยะเวลาสั้นลงในอนาคต และยังสามารถนำข้อมูลจากการทดลองที่ได้ไปใช้พัฒนา Bio Marker ได้ในอนาคต

ขั้นที่สอง เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนจากวิธีการ cDNA AFLP พบว่าคู่ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ให้ความแตกต่างในระดับการแสดงออกค่อนข้างมาก และแสดงความแตกต่างในระยะ callus กับระยะการพัฒนาต้นอ่อนของปาล์มน้ำมัน แต่เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยา พบว่าผลการทดลองไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ อาจเนื่องจากการปนเปื้อนในขั้นทำการทดลอง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. **ปาล์มน้ำมัน**. โรงพิมพ์ชุมนุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

ฉกรรจ์ สังข์ทอง. 2551. **ปาล์มน้ำมัน**. สำนักพิมพ์ เซาท์เทิร์นเพรสแอนด์พับลิเคชั่น, สงขลา.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรมิขม, ประกิจ ทองคำ และสมเกียรติ สี
สนอง. 2548. **เส้นทางสู่ความสำเร็จ: การผลิตปาล์มน้ำมัน**. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิต
ปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่,
สงขลา.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรมิขม, ประกิจ ทองคำ และวรรณ เลี้ยว
วาริน. 2546. **คู่มือปาล์มน้ำมันและการจัดสวน**. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตปาล์มน้ำมัน
คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่, สงขลา.

ประยงค์ สุขเดชะพันธ์. 2548. **ปาล์มน้ำมัน**. สำนักพิมพ์เกษตรสยามบุ๊คส์, กรุงเทพฯ.

ลิขิต แดดภู. 2528. **อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม**. ฝ่ายนโยบาย 2 กองเศรษฐกิจอุตสาหกรรม สำนักงาน
ปลัดกระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

สมปอง เตชะโต. 2539. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ**. ภาควิชา
พืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่,
สงขลา.

สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. เกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.

หทัยรัตน์ อุไรรงค์, อรรรัตน์ วงศ์ศรี, บุญเรือน เรื่องวิเศษ, พงษ์ศักดิ์ รวยอารี และสุภาวดี ง้อเหรียญ.
 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 โดยใช้เทคนิค AFLP. กลุ่มวิจัย
 พัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, กรุงเทพฯ.

อรดี สหวัชรินทร์. 2539. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. อักษรสยามการพิมพ์ กรุงเทพฯ

Alemanno, L., M. Devic, N. Niemenak, C. Sanier, J. Guilleminot, M. Rio, J.L. Verdeil and P.
 Montoro. 2008. Characterization of *leafy cotyledon1- like* during embryogenesis in
Theobroma cacao L. **Planta**. 227: 853–866.

Arroyo-Herrera A., A. Ku Gonzalez, R. Canche Moo, F.R. Quiroz-Figueroa, V.M. Loyola-
 Vargas, L.C. Rodriguez-Zapata, C. Burgeff D'Hondt, V.M. Suarez-Solis and E. Castano.
 2008. Expression of *WUSCHEL* in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and
 increases somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. 94: 171–180.

Baudino S., S. Hansen, R. Brettschneider, V.F.G. Hecht, T. Dresselhaus, H. Lorz, C. Dumas and
 P.M. Rogowsky. 2001. Molecular characterization of novel maize *LRR* receptor-like
 kinases, which belong to the *SERK* family. **Planta**. 213: 1–10.

Boutilier K., R. Offringa, V.K. Sharma, H. Kieft, T. Ouellet, L. Zhang, J. Hattori, C-M. Liu,
 AAM. van Lammeren, BLA. Miki, JBM. Custers and MM. van Lookeren Campagne.
 2002. Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to
 embryonic growth. **Plant Cell**. 14: 1737–1749.

Fambrini M., C. Durante, G. Cionini, C. Geri, L. Gioregitti, V. Michelotti, M. Salvini and C.
 Pugliesi. 2006. Characterization of *LEAFY COTYLEDON1-LIKE* gene in *Helianthus*
annuus and its relationship with zygotic and somatic embryogenesis. **Dev Genes Evol**.
 216: 253–264.

- Feher A., T. Pasternak and D. Dudits. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 74: 201-228.
- Gaj M.D., S. Zhang, J.J. Harada and P.G. Lemaux. 2005. *Leafy cotyledon* genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. **Planta.** 22: 977–988.
- Hecht V., J.P. Vielle-Calzada, M.V. Hartog, E.D.L. Schmidt, K. Boutilier, U. Grossniklaus and S.C. De Vries. 2001. The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiol.** 127: 803–816.
- Hu H., L. Xiong and Y. Yang. 2005. Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. **Planta.** 222: 107–117.
- Kieffer M., Y. Stern, H. Cook, E. Clerici, C. Maulbetsch and T. Laux. 2006. Analysis of the transcription factor *WUSCHEL* and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. **Plant Cell.** 18: 560-573.
- Kwong R.W., A.Q. Bui, H. Lee, L.W. Kwong, R.L. Fischer, R.B. Goldberg and J.J. Harada. 2003. Leafy Cotyledon1-Like Defines a Class of Regulators Essential for Embryo Development. **The Plant Cell.** 15: 5-18.
- Laurence A., M. Devic, N. Niemenak, C. Sanier, J. Guilleminot, M. Rio, J-L. Verdeil and P. Montoro. 2008. Characterization of *leafy cotyledon1-like* during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Planta.** 227: 853-866.
- Mayer K.F.X., R. Schoof, A. Haecker, M. Lenhard, G. Jurgens and T. Laux. 1998. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. **Cell.** 95: 805-815.

- Pe' rez-Nu' n' ez M.T., R. Souza, L. Sa' enz, J.L. Chan, J.J. Zu' n' iga-Aguilar and C. Oropeza. 2009. Detection of a *SERK-like* gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant Cell Rep.** 28: 11–19.
- Santos M.O., E. Romano, K.S.C. Yotoko, M.L.P. Tinoco, B.B.A. Dias and F.J.L. Arago. 2005. Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Sci.** 168: 723–729.
- Schellenbaum P., A. Jacques, P. Maillot, C. Bertsch, F. Mazet, S. Farine and B. Walter. 2008. Characterization of *VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3* and *VvLIL* genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Plant Cell Rep.** 27: 1799–1809.
- Schmidt E.D., F.Guzzo, M.A. Toonen and S.C. de Vries. 1997. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development.** 124: 2049-2062
- Shah K., E. Russinova, T.W. Gadella, J. Willemsse and S.C. Vries. 2002. The Arabidopsis kinase-associated protein phosphatase controls internalization of the *somatic embryogenesis receptor kinase 1*. **Genes Dev.** 16: 1707-1720.
- Somleva M.N., E.D. Schmidt and S.C. Vries. 2000. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. **Plant Cell Rep.** 19: 718–726.
- Song D., G. Li, F. Song and Z. Zheng. 2007 Molecular characterization and expression analysis of *OsBISERK1*, a gene encoding a leucine-rich repeat receptor-like kinase, during disease resistance responses in rice. **Mol Biol Rep.** 35(2): 275–283.

Srinivasan C., Z. Liu, I. Heidmann, E.D. Supena, H. Fukuoka, R. Joosen, J. Lambalk, G.

Angenent, R. Scorza, J.B. Custers and K. Boutilier. 2007. Heterologous expression of the *BABY BOOM* AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Planta**. 225: 341–351.

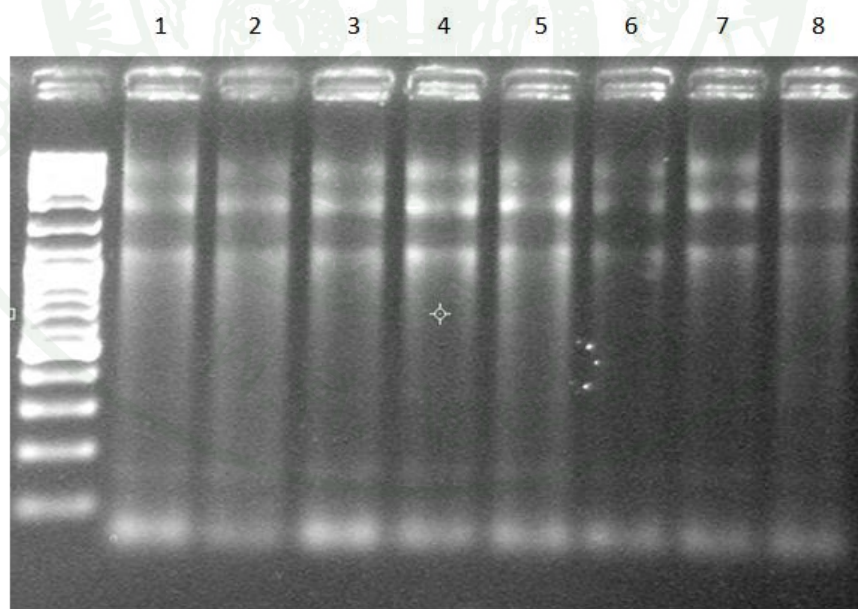
Zhang S., L. Wong, L. Meng and P.G. Lemaux. 2002. Similarity of expression patterns of *Knotted1* and *ZmLEC1* during somatic and zygotic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). **Planta**. 215: 191–194.

Zuo J., Q.W. Niu, G. Frugis and N.H. Chua. 2002. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. **Plant J**. 30: 349–359.





ภาพผนวกที่ 1 ระยะเวลาต่างๆ ของปลั่มน้ำมันที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ



ภาพผนวกที่ 2 อาร์เอ็นเอเข้มข้น 100 ng/ml (1) แคลลัส (callus) (2) ระยะรูปกลม (Globular) (3) ระยะทอร์ปิโด (Torpedo) (4) ระยะใบเลี้ยง (Cotyledon) (5) ระยะต้นอ่อน (Plantlet) (6) ดอกตัวผู้ (7) ดอกตัวเมีย และ (8) ใบ

```

1 CLUSTAL multiple sequence alignment
2
3
4 Arabidopsisthaliana AATAATTAAATTCGTCTTCCTTCTGCTCTCGGCGATAACTTGGTTTCTCTCCTCTCT
5 Cocosnucifera -----
6 Zeamays -----
7 Oryzasativa-1 -----
8
9
10 Arabidopsisthaliana CTCATCTCTCTTTGTTTCGACCCTTTTTTAGTATATTTCCAGGAAATATCTTCTTCCTCC
11 Cocosnucifera -----
12 Zeamays -----
13 Oryzasativa-1 -----CGGAGCCGGCGGGCGGCGACGAGGAGGGGAGCTGATCGGGC
14
15
16 Arabidopsisthaliana TTTCGTTTTCTCTATCTCAGTTTTCTCTTCTCAGCATTAAAGTAGTCAACGGTCAAGCA
17 Cocosnucifera -----ATGGCGG
18 Zeamays -----GTCCGC--
19 Oryzasativa-1 GGTCCCCCTTTGCCGAGG-----GGACGCCGGCGG
20
21
22 Arabidopsisthaliana TCTCGGGTTCCTTCTAATCGGAAAAGTCTAGCTTCTCAGTTCTTTTCTTTTGTCTTTTGT
23 Cocosnucifera TCCTGGAGC-----
24 Zeamays -----
25 Oryzasativa-1 CCTCGGGTTGGGTCCACTTGGCAGCGGTGAGCGGCGG-----
26
27
28 Arabidopsisthaliana GTTTCGCGGATTAATCGATTGGGTATTTTGATTTTCTCTTCAAATTAAGTCAACGGGTG
29 Cocosnucifera -----GGGAT-----GTCA
30 Zeamays -----GGGAT-----GGCG
31 Oryzasativa-1 -----CGGGGAT-----GGCG
32
33
34 Arabidopsisthaliana GATACGC---GTTGAGAGGGCTTTTCTCGTATTCTGCTTCTAATTCATCATCTTGGTA
35 Cocosnucifera TGGT-----GCCATGGTTTCT-----GTGGT-
36 Zeamays GCGTC---GCTGAGGTGGTG-----GTGGT-
37 Oryzasativa-1 GAGGCGCGGCTGCTGCGGCGG-----GCGGCT
38
39
40 Arabidopsisthaliana TTACCTTGTGTGGGTGGTAGCTTAATCGAAGGATTCGAGATCCCTTTTATCAGGGTTTT
41 Cocosnucifera -----
42 Zeamays -----CGGCGGTGG-----
43 Oryzasativa-1 GTGCTTGGCGGTGGCGGTG-----
44
45
46 Arabidopsisthaliana AACAATGATGGATTTTCTCTGATGAGGGATAGTTCTAGGGTTGTTTTAATCTCTTGAG
47 Cocosnucifera -----
48 Zeamays -----
49 Oryzasativa-1 -----
50
51
52 Arabidopsisthaliana GATAAAATGGAACGAAGATTAATGATCCCTTGCTTCTTGGGTGATTCTCGTTTGGAT
53 Cocosnucifera -----TGATTCTGGTCTTCCACCCCTGGT
54 Zeamays -----TATTTTCGGTGGTGGTGGCGGTGATC
55 Oryzasativa-1 -----TGTGGGTGGTGGCGGTGGCGGTGAGC
56
57
58 Arabidopsisthaliana TTGGTTCTCAGAGTCTCGGGCAACGCGAAGGTGATGCTCTAAGTGCCTGAAAAACAGT
59 Cocosnucifera AGGGTTCTT-----GCTAACTCGGAAGGTGATGCATTGCACAGTTTGGAGCCAAC
60 Zeamays CCGGTTGTC-----GCCAACCGGAGGGTGGTCTATACAGCTACGACAAAGC
61 Oryzasativa-1 CGGGTCGGC-----GCCAACCGGAGGGTGGTGCCTATATAGTCTGCGCAAAGT
62
63
64 Arabidopsisthaliana TTAGCCGACCTAATAAGGTGCTTCAAAGTTGGGATGCTACTCTTGTACTCCATGTACA
65 Cocosnucifera CTAATTGATCCAAGTAATGTGCTGCAGAGCTGGGATCCGACTCTGGTCAATCCATGCACA
66 Zeamays CTGAAAGATAACAACAACGCTGCAGAGTTGGGATCCAACCTCTGGTTAATCCATGTACA
67 Oryzasativa-1 CTGAAAGATGCTAACAATGTGCTGCAGAGTTGGGATCCACTCTGGTCAATCCATGCACA
68
69
70 Arabidopsisthaliana TGGTTTCATGTTACTTGCAATAGCGACAATAGTGTACACGTTGACCTTGGGAATGCA
71 Cocosnucifera TGGTTCATGTTACTTGTAATAATGACAATAGTGTGATCATTAGAGTTGATCTTGGAAATGCA
72 Zeamays TGGTTCATGTTACTTGTAACCTGATAACAGTGTGATCAGACTTGGTCTTGGAAATGCA
73 Oryzasativa-1 TGGTTCATGTTACTTGTAACCTGATAACAGTGTGATCAGACTTGGTCTTGGAAATGCA
74
75
76 Arabidopsisthaliana AATCTATCTGGACAGCTCGTAATGCAACTTGGTCACTTCCAACTTGCAGTACTTGGAG

```

ภาพผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ multiple alignment ของยีน *SERK* จากพืชชนิดต่างๆ

```

77 Cocosnucifera CAGTTATCTGGTACATTGGTCCCTCAGCTTGGTCTTCTGAAAACTTGCAATATTTGGAA
78 Zeamays CAACTATCAGGTCCATTGGTGCCACAGCTTGGGCAATTGAAAAATATGCAATATCTGGAA
79 Oryzasativa-1 CAACTGTCCAGGTGCATTTGGTCCCGAGCTTGGGCAATTGAAAAATCTGCAATATCTGGAG
80 * * * * *
81
82 Arabidopsisthaliana CTTTATAGCAATAACATTACTGGGACAATCCCAGAACAGCTTGGAAATCTGACGGAATTG
83 Cocosnucifera CTTTACAGTAACAATAAAGTGGCCACGATTCTAGTGACCTTGGAAATTTGACAAATTTG
84 Zeamays CTTTACAGTAACAATAAAGTGGGCAATACCACCTGAACTGGGGAATTTGACTAACCCTG
85 Oryzasativa-1 CTTTACAGCAACAATAAAGTGGGACAATACCTAATGAACTGGGAACTTAACTAACCCTG
86 *****
87
88 Arabidopsisthaliana GTGAGCTTGGATCTTTACTTGAACAATTTAAGCGGGCCTATTCATCAACTCTCGGCCGA
89 Cocosnucifera GTGAGCTTGGATCTGTACTTAAACAGTTTCACTGGTGGAAATTCCTGACACACTGGGAAAG
90 Zeamays GTCAGTTTGGACCTGTACTTCAACAACCTTCACTGGCGGTATTCCTGACACCTTGGGCCAA
91 Oryzasativa-1 GTCAGTTTGGATCTTTACTTGAACAACCTTCACTGGTATTTATTCGGAAACCTTGGGCCAA
92 *****
93
94 Arabidopsisthaliana CTTAAGAACTCCGTTTCTTGCCTTAAATAACAATAGCTTATCTGGAGAAATTTCCAAGG
95 Cocosnucifera CTAAACAAACTCGTCTTCTCCGGCTTAAACAACAATAGCCTGTCGGGCTCAATTCCTCAA
96 Zeamays CTATCAAAGTTGGGTTTCTCCGCTTAAATAACAACAGTCTTCTGGTCAAATTCGGAAA
97 Oryzasativa-1 CTCTACAAGCTCGTCTTCTTCTGCTTAAACAACAACAGTCTTCTGGTCAAATTTCCAAAA
98 ** * * * * *
99
100 Arabidopsisthaliana TCTTTGACTGCTGTCTGACGCTACAAGTTCTGGATCTCTCAACAATCCTCTCACCGGA
101 Cocosnucifera TCTTTAACCAATATTACTGCACTCCAAGTTTGGATTTGTCAAACAACAACCTTATCAGGA
102 Zeamays ACCTTGACCAATATCAACACTCTCCAAGTTCTGGATCTATCAACAACAATCTCTCGGGA
103 Oryzasativa-1 TCCTTGACCAATATCACTACTCTTCAAGTTCTGGATCTCTCAATAACAATCTCTCAGGA
104 * * * * *
105
106 Arabidopsisthaliana GATATTCCTGTTAATGGTTCCCTTTTCACTTTTCACTCCAATCAGTTTGGCCAAC-----
107 Cocosnucifera GAAGTTCATCAACTGATCCTTTTCGCTATTCACTCCCATCAGTTTGGCTAACAATCCT
108 Zeamays GGGGTGCCATCAAGCGTTTCTTCTCTTTACACCTATAAGTTTGGCTAACAACCCA
109 Oryzasativa-1 GAGGTTCCGCTACTGCTCCTTTTCACTCTTACCCCTATAAGTTTGGCTAATAATAAA
110 * * * * *
111
112 Arabidopsisthaliana -----ACCAAG--TGACTC----CCCTTCCTGCATCTCCACCG
113 Cocosnucifera CAATTATGTGGTCCGGGAACAACAAGGCTTGTCTGGTGTCTCCTCATTATCTCCACCA
114 Zeamays AATCTTTGGCGCCTGCTACTACAAAGCCTTGTCTGGGCTCCTCCATTTCTCCACCC
115 Oryzasativa-1 GATCTTTGGCCCGGTACTACAAAACCTGCTGAGCTCCACCTTTTCTCCACCA
116 * * * * *
117
118 Arabidopsisthaliana CCTCC---TATCTCTCTACACCGCCATCACCTGCAGGGA---GTAATAGAATTACTGGA
119 Cocosnucifera CCTCCATTTATTTCTCCAGCACCACCTCGTCTCAAGGAAGTAGTGCCTCTAGCACTGGA
120 Zeamays CCTCCATACAATCCCCAGCACAACCTTCTCAAAAG-----GCGTGTCCAGCACTGGA
121 Oryzasativa-1 CCTCCTTTCAATCCCCAACACCTACTGTGTCAAG-----GTGACTCCAAAACCTGGA
122 *****
123
124 Arabidopsisthaliana GCGATTGCGGGAGGAGTTGCTGCAGGTGCTGCACCTCTATTGTGTTCCGGCCATTGCA
125 Cocosnucifera GCAATTGCTGGTGGAGTTGCTGCAGGTGCTGCTCTGCTATTGTGTCACCTGCTATTGGA
126 Zeamays GCAGTAGCTGGAGGCGTTGCTGCAGGTGCTGCACAGCGTTGCTGATCGCAGTGCCTGCTATTGGA
127 Oryzasativa-1 GCAATTGCTGGAGGTTGCTGCAGGTGCTGCAGGTGCTGCTGTTGGCGTTCCGGCAATTGGA
128 * * * * *
129
130 Arabidopsisthaliana CTAGCTTGGTGGCGAAGGAAAAGCCGCGAGGACCCTTCTTTGATGTACCAGCTGAAGAG
131 Cocosnucifera TTTGCATGGTGGCGTCTGCTAAGCCGCAAGAACATTTCTTTGATGTGCTGCTGAAGAG
132 Zeamays TACGCATTTGGCGGAGGCGAAAACCCGAAGAGCAATCTTCGATGTCCCTGCCGAGGAG
133 Oryzasativa-1 TTTGCATGGTGGCGGCGGCTAAACCTGAAGAACCTTCTTTGATGTCCCTGCTGAGGAG
134 * * * * *
135
136 Arabidopsisthaliana GACCCAGAAGTTCATTTAGGACAACCTGAAGAGGTTTTCATTCGCTGAACTACAAGTTGCT
137 Cocosnucifera GATCCAGAAGTTCATTTGGGCCAGCTTAAAAGGTTTCTCTGCGAGAAGTCAAGTTGCT
138 Zeamays GATCCGAAGTTCACCTTGGACAGCTCAAGAGGTTCTCGCTGAGAGAGCTGCAAGTGCCT
139 Oryzasativa-1 GATCCGAAGTGCACCTTGGCCAACCTAAGAGATTCTCACTCCGGGAGCTTCAAGTTGCT
140 * * * * *
141
142 Arabidopsisthaliana TCGGATAATTTTAGCAACAAGAATATTTGGGTAGAGTGGTTTGGTAAAGTTTATAAA
143 Cocosnucifera ACGGATAATTTTAGCACAAGAATATTTGGGCAGAGTGGTTTGGCAAGTCTATAAA
144 Zeamays ACGGACAATTTTAAACAAGGAATGTCCTGGGAAGAGGCGGTTTGGAAAGTGTACAAA
145 Oryzasativa-1 ACTGATAACTTTAGCAATAAGAATATTTGGGAAGAGTGGCTTGGAAAGTGTACAAA
146 * * * * *
147
148 Arabidopsisthaliana GGACGGTTAGCTGATGGTACTTTAGTGGCCGTTAAAAGGCTAAAAGAGGAGCGCACCCAA
149 Cocosnucifera GGACGTTCTGCAGATGGTTCATTTAGTGGCAGTCAAGAGGCTAAAAGAGAGCGCACACCA
150 Zeamays GGGAGACTAACGGACGGTTCACTGGTAGCCGTGAAGAGATTGAAGGAGGAACGCACCCCC
151 Oryzasativa-1 GGTAGACTGGCAGATGGCTCGTTGGTAGCAGTAAAAGATTAAAAGAGAAAGCAACCTCCCT
152 * * * * *

```

ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)

153		
154	Arabidopsisthaliana	GGTGGCGAACTGCAGTTCCAGACAGAGGTTGAGATGATTAGTATGGCGGTTCCACGAAAC
155	Cocosnucifera	GGAGGCGAGCTCAATTTCCAGACAGAAGTTGAGATGATTAGCATGGCTGTGCATCGAAAT
156	Zeamays	GGCGGAGAGCTCCAGTTCCAAACCGAAGTTGAACTGATTAGCATGGCGGTGCACAGGAAC
157	Oryzasativa-1	GGTGGTGAAGCTCCAGTTCCAAACGAGAAGTTGAAATGATTAGCATGGCGGTGCATAGGAAC
158		** ** ** ** **
159		
160	Arabidopsisthaliana	TTGCTTCGGCTTCGTGGATTTTGCATGACTCCAACCGAAAGATTGCTTGTATCCCTAC
161	Cocosnucifera	TTGCTTCGACTTCGTGGGTTTTCATGACACCCACCGAACGATTGCTTGTATATCCCTAT
162	Zeamays	CTTCTCCGGCTCCGTGGATTCTGCATGACCCCTACAGAGCGGCTGCTAGTGTATCCATAC
163	Oryzasativa-1	CTGCTTCGGCTCCGTGGATTTTGCATGACGCCTACAGAACGGTTACTTGTCTATCCCTAC
164		* ** ** ** **
165		
166	Arabidopsisthaliana	ATGGCTAATGGAAGTGTTCCTCCTGTTTAAAGAGAAGCTCCCGAGTCCCAGCCACCCTT
167	Cocosnucifera	ATGGCTAATGGAAGTGTGGCATCATGCTTAAGAGAGCGGCCACCATCGAAACCTCCACTT
168	Zeamays	ATGGCTAACGGGAGCGTGCATCGGCCTTCGAGAACCGCGCCAAATGAGCCCCCCTC
169	Oryzasativa-1	ATGGCTAATGGGAGTGTGCATCAGGATTGCGAGAGCGGCAGCCAAATGATCCGCGCCTT
170		***** ** ** ** **
171		
172	Arabidopsisthaliana	GATTGGCCAAAGAGACAGCGTATTGCGTTGGGATCTGCAAGAGGGCTTGCCTATTACAT
173	Cocosnucifera	GATTGGACAACCTCGCGAAGGATTGCATTGGGATCTGCAAGGGGGCTGCTGATTTCAT
174	Zeamays	GAATGGGAAACGAGGCTCGGATCGCGCTGGGGTCCAGCAGAGGCTGTCTACCTGCAC
175	Oryzasativa-1	GAATGGCAAAACAAGAACTCGGATTGCGCTGGGATCTGCCAGAGGATGTCTACTTCGCAC
176		** ** ** ** *
177		
178	Arabidopsisthaliana	GATCATTGCGACCCAAAGATTATTTCATCGAGATGAAAGCTGCAAAATATTTGTTGGAT
179	Cocosnucifera	GATCATTGCGATCCAAAATATTTCATCGTATGTCAAAGCTGCAAAATATTTATTGGAT
180	Zeamays	GACCACCTGCATCCCAAGATCATCCACCGCGAGCTGAAGCGCAATATCTGCTGGAC
181	Oryzasativa-1	GACCATTGTGATCCCAAGATCATTTCATCGTATGTCAAAGCTGCAAAATATTTGTTGGAT
182		** ** ** ** **
183		
184	Arabidopsisthaliana	GAAGAGTTTGAAGCCGTGGTTGGGGATTTGGACTTGCAAAACTCATGGACTACAAGAC
185	Cocosnucifera	GAAGAGTTTGAGGCGTGTTCGAGACTTTGGCTTGGCCAAACTCATGGACTACAAGGAT
186	Zeamays	GAGGACTTCGAAGCCGTGCTGGGTGACTTCGGCTGGCCAAGCTCATGGACTACAAGGAC
187	Oryzasativa-1	GAAGATTTTGAAGCAGTGTGGGTGACTTTGGACTGGCCAAACTTATGGATTACAAGGAC
188		** ** ** ** **
189		
190	Arabidopsisthaliana	ACACATGTGACAACCGCAGTGCCTGGGACAATTGGTTCATATAGCCCCGAGTACCTTTCC
191	Cocosnucifera	ACCCATGTAACAACCTGCTGTTTCGTGGAAACAATTGGACATATTGCTCCAGAATACCTGTCT
192	Zeamays	ACCCACGTGACGACCCCGCTCCGTGGGACGATCGGCCACATCGCCCCGAGTACCTCTCC
193	Oryzasativa-1	ACTCATGTAACACAGCTGTTTCGTGGGACGATCGGACACATTGCTCCTGAGTACCTCTCT
194		** ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **
195		
196	Arabidopsisthaliana	ACTGGAATAATCATCAGAGAAAACCGATGCTTTGGGTATGGAGTTCATGCTTCTTGAGCTT
197	Cocosnucifera	ACCGAAAGTCCCTCAGAGAAGACTGATGTTTTTGGATATGGAATCATGCTTTTGAACCTT
198	Zeamays	ACGGGGAAGTCTCCGAGAAGACGGACGCTCTCGGCTACGGGATCATGCTCCTGGAACCTC
199	Oryzasativa-1	ACTGGGAAGTCTCTGAGAAGACTGATGTTTTGGCTATGGAATCATGCTTCTTGAGCTC
200		** ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **
201		
202	Arabidopsisthaliana	ATCACTGGACAAGGGCTTTTGTATCTTGCTCGCCTCGCGAATGATGATGATGATGATGTTA
203	Cocosnucifera	ATTACAGGCCAGAGGGCATTGCACCTTGCCAGGCTTGCAAAATGATGATGATGATGTTG
204	Zeamays	ATCACCGGCAGAGGGCGTTCCACTCGCTCGTCTCGCGAACGATGACGACGTCATGCTC
205	Oryzasativa-1	ATTACAGGACAAGGGCATTGATCTTGCTCGTCTTGCAACGATGATGATGATGATGTTG
206		** ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **
207		
208	Arabidopsisthaliana	CTAGACTGGGTGAAAGGGTTGTTAAAAGAGAAGAAATGGAAGCACTAGTAGATGTTGAT
209	Cocosnucifera	CTGGATTGGGTAAAAGGACTGCTGAAAGAGAAAAGCTGGACATGTTGGTGCACCCGGAT
210	Zeamays	CTTGACTGGGTGAAGGCGTCTGTAAGGAGAAGAGCTGGAGCAGCTGGTGGACCCGGAC
211	Oryzasativa-1	CTCGATTGGGTGAAAGGGCTCCTGAAAGAGAAGGTTGGAGATGCTGGTGGACCCGGAC
212		** ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **
213		
214	Arabidopsisthaliana	CTTCAGGTAATTACAAGACGAAGAAGTGGAGCAGCTAATCCAAGTGGCTTTACTCTGC
215	Cocosnucifera	CTCCAGGATGACTATGTGGAGGCTGAGGTGGAGTGCCTTATCCAAGTAACTTTGCTATGT
216	Zeamays	CTGCAGGGCCGCTACGTGGACCAGGAGGTGGAGTGCCTGATCCAGGTGGCGCTGCTGTGC
217	Oryzasativa-1	CTCCAGAGCGGCTTCGTGGACATGAGGTGGAGTCACTCATCCAGGTGGCTCTGCTCTGC
218		** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **
219		
220	Arabidopsisthaliana	ACTCAGAGTTCACCAATGGAAGACCCAAAATGTCTGAAGTTGTAAGAATGCTTGAAGGA
221	Cocosnucifera	ACCCAGGCTCCCCAATGGAGCGGCCAACGATGTCAGAGGTGGTGGAGATGCTCGAAGGT
222	Zeamays	ACGCAGGCTCCCCGATGGAGCGGCCAACGATGTCGGAGGTGGCGGGATGCTGGAGGGC
223	Oryzasativa-1	ACGCAGGCTCCCCGATGGACCGGCCAACGATGTCGGAGGTGGTGGAGATGCTGGAGGGC
224		** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **
225		
226	Arabidopsisthaliana	GATGGTTTAGCTGAGAGATGGGAAGAGTGGCAAAAGGAGGAAATGTTTCAGACAAGATTTTC
227	Cocosnucifera	GATGGCTTGCCTGAGAGATGGGAGGAATGGCAGAAGGTTGAAGTTGACGTTTAGATGTA
228	Zeamays	GACGGCTGGCGGAGCGTGGGAGCAGTGGCAGAAGGTGGAGGTGATGGCGCAGGAGGCG

ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)

```

229 Oryzasativa-1      GATGGCCTCGCGGAGCGGTGGGAGGAGTGGCAAAGGTGGAGGTGGTCCGGCAGGAGGCG
230                    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
231
232 Arabidopsisthaliana AACTACCCAACCCACCATCCAGCCGTGTCTGGCTGGATCATTGGCGATTCCACTTCCCAG
233 Cocosnucifera      GA--GATGGCTCCACCCAACGGCAACAAT-GAATGGATCAT---AGACTCTACCGACAAC
234 Zeamays             GA--GCTCGCCCCGC-----GCCACAAC-GACTGGATCGT---CGACTCCACCTACAAC
235 Oryzasativa-1      GA--GCTGGCCCCC-----GCCACAAC-GACTGGATCGT---CGACTCGACCTACAAT
236                    *          * * *          *          *          * * * * * * * * * *
237
238 Arabidopsisthaliana ATCGAAAACGAATACCCCTCGGGTCCAAGATAAGATTGAAAACCGAATGTTTTTTCTGT
239 Cocosnucifera      CTTTCATGCAGTCGAATTATCTGGCCCCAGATGA-----GAGGTAGATGATCGC-----
240 Zeamays             CTCAGGGCCGTGGAACGTCCGGCCCCGAGGTAGG-----GAGGTAGATGATCGC-----
241 Oryzasativa-1      CTCGGGGCAATGGAGCTGTCCGGCCCCGAGGTAAAAGAAAACGAAAGACAAAATCACAAGC
242                    *          *          * * * * * * * * * *
243
244 Arabidopsisthaliana AT-----TTGTTTTTCTCTGTATTTATTGAGG-----
245 Cocosnucifera      -----CGTCGGGATCCTTGTC---GTCTGTGAATATGACAG-CGGATAGGT
246 Zeamays             -----CGTCGGGATCCTTGTC---GTCTGTGAATATGACAG-CGGATAGGT
247 Oryzasativa-1      ATCCAACCTTTGCTCGAGGCTTCCTCGCCCTTGTGTGTATATGACAGACAGATCGAT
248
249
250 Arabidopsisthaliana -----
251 Cocosnucifera      -----
252 Zeamays             AGCT-----TGGTG-----
253 Oryzasativa-1      AGCTGGCAAATCTGGAGGAAAAATGGTTTACTTGTAAACCTCCCTGGTGCCTCGGTAAT
254
255
256 Arabidopsisthaliana -----GTTTTAGCTTCTGCTGCCATATTATGGTTCTTAAGTGAATACATGAGG
257 Cocosnucifera      -----
258 Zeamays             -----GTTGGTCTGTCTTTATTGATAGCT-----GCGAAACTGTAG-
259 Oryzasativa-1      TTTCAAGTAGGCTCTGCACTTGGTTGTCGTTAGAAATGCATGGCCGGCGGAATTGCAAC
260
261
262 Arabidopsisthaliana ATCAGATTGGGTTTGTAAGTGTATATGATGAAAAAGGATTGA-----
263 Cocosnucifera      -----
264 Zeamays             ATGAAATTGTG--TGCCCGTCTTCTGTAAC--CTGAGTACCTGACATCTCTGAC-----
265 Oryzasativa-1      ACATTGTTGTGGGGCTCTGCGTCTGTAATGGCTGAACAACATGATGCCTCTCTCTGCT
266
267
268 Arabidopsisthaliana -----ATGTTGTTGAA-----
269 Cocosnucifera      -----
270 Zeamays             -----ATTTTTTTTTCTG-----ATATTAGAGAG-----
271 Oryzasativa-1      GTATTGTAGCTACAACCTCTCTTTTTGACGGTGCTAAACATCCTAGGCAATCTTTTTTGG
272
273
274 Arabidopsisthaliana -----AGCTAAAAAAAAAAAA
275 Cocosnucifera      -----
276 Zeamays             -----CCGTATGACACC-----
277 Oryzasativa-1      TCTCCGGGTACACCGTGTCCGCCTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
278
279

```

ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)

```

1 CLUSTAL multiple sequence alignment
2
3
4 Zeamays      --CCACGCGTC-C---GC-CACCACACCAC---GA-GCGC-G----C---GATAACCCCT
5 Oryzasativa  ----A---T-----G-----G-----GA-G-GC-----C---G-----
6 Arabidopsisthaliana  AATTAT-T-TTATAAAGAACAAAAAAAAAAAAAGACG-GCAGAGAAACAAATGG-AACG-T
7              *      *                      *** **      *
8
9 Zeamays      --AGCT-----AGCT-TCAG--GT-AG----TAGC---GAGA--G---CCAAATGGA
10 Oryzasativa  ---GCT-----A-CC--CGG--GC--G----CGGC---G-----G---C-----GAA
11 Arabidopsisthaliana  GGAGCTCCCTTCTCTCA-CTATCAGCTACCAAATCCATCTCTGA-ATTGAACT--TGGA
12              ***      * * * *      * * * * *
13
14 Zeamays      CTCCAGCA--GC--T--TCC--TCCC--TG-CC-GC--CGG-CGCGG-AGAATGGCTCGGC
15 Oryzasativa  C---GGC---GC--T-----G-----G-CC-GC--CGA-CG-GG-A-A-----CGGT
16 Arabidopsisthaliana  C--CAGCACAGCAACAACCCCAACCCCAATGACCAGCTCAGTCGTAGTA-G---C-CGGC
17              *   ** * * * * * * * * * * * * * * * * *
18
19 Zeamays      GCGGGGCGGCGCCA-A--CAATGGCG--GCGCTG-CTCAGCAGCA--TGC-G-GCGCCGG
20 Oryzasativa  GGCG--CG----CA-G--CA--GGCG--GCG--G-C-C-GC-GC-----C-G-GC-T---
21 Arabidopsisthaliana  GCGG-TGA---CAAGAACAATGGTATCGTG--GTC-CAGCAGCAACCACCATGTGT---
22              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
23
24 Zeamays      CGA-TCGCGAGCAGGACCGCTG-ATGCCGATCGCGAACGTGATCCGCATCATGCGG--
25 Oryzasativa  --A-TACGTGAGCAGGACCGCTG-ATGCCGATCGCGAACGTGATCCGCATCATGCGC--
26 Arabidopsisthaliana  -GGCT-CGTGAGCAAGACCAA-TACATGCCAATCGCAAACGTGATAAGAATCATGCGTAA
27              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
28
29 Zeamays      --CGCGTGTGCCGGCGCACGCCAAGATCTCGGACGACGCCAAGGAGACGATCCAGGAGT
30 Oryzasativa  --CGCGTGTCTCCCGGCGCACGCCAAGATCTCGGACGACGCCAAGGAGACGATCCAGGAGT
31 Arabidopsisthaliana  AAC-C-T--TACCGTCTCAGCCAAAATCTCTGACGACGCCAAGAAACGATTCAGAAT
32              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
33
34 Zeamays      GCGTGTGCGGAGTACATCAGTTCATCAGGGGGAGGCCAACGAGCGGTGCCAGCGGGAGC
35 Oryzasativa  GCGTGTGCGGAGTACATCAGTTCATCAGGGGGAGGCCAACGAGCGGTGCCAGCGGGAGC
36 Arabidopsisthaliana  GTGTCTCGGAGTACATCAGTTCGTGACCGGTGAAGCCAACGAGCGTTCGCAACGTGAGC
37              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
38
39 Zeamays      AGCGCAAGACCATCACCGCCGAGGACGTGCTGTGGGCCATGAGCC-GCCTCGGCTTCGAC
40 Oryzasativa  AGCGCAAGACCATCACCGCCGAGGACGTGCTGTGGGCCATGAGCC-GCCTCGGCTTCGAC
41 Arabidopsisthaliana  AACGTAAGACCATAACTGCTGAAGATATCCTTTGGGCTATGAGCAAGC-TTGGGTTGAT
42              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
43
44 Zeamays      GACTACGTGCGAGCCGCTCGGCGCTACC-TCCACCGCTACCGCGAGTTCGAGGGCGACG-
45 Oryzasativa  GACTACGTGCGAGCCCTCGGCGTACC-TCCACCGCTACCGCGAGTTCGAGGGGGA-GT
46 Arabidopsisthaliana  AACTACGTGGACCCCTCACCCTGT-TCAATTAACCGGTACCGTGAATAGAGACCGA---
47              ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * *
48
49 Zeamays      CGCGCGGCGTGGGGTCG-TCCCG-G-G--G-GCCGCCCATCGCGCGGCGGCGACCACC
50 Oryzasativa  CCGCGGCGTGGG---CG-TC--G-GCGTCG-GC-GCC----GCGCG-CGGCGACACC
51 Arabidopsisthaliana  T-CGTGGT-TCTG---CACTTA-GAG-GT-GAGCCACC---GT-CGTTGA-GACAA--
52              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
53
54 Zeamays      ACC-CGCACTCCATGTGCGCAGCGGCGATG-C-TCAAGTCCCGCGGGCC-AGTCTC-CGG
55 Oryzasativa  ACCATG-G-TC-ACGTGCG---GTGG-GATG-C-TCAAGTCCCGCGGCC-AG-----GG
56 Arabidopsisthaliana  ACC-----T--ATG--G--AG-GA-AATGGTATGGGTTTCAGG-GCCCA-TCTCATGG
57              ***      * * * * * * * * * * * * * * * * *
58
59 Zeamays      AGCGCCATGTACCGCACCACCACCACC--ACGAC-ATG-CA-GATGCACGCGG-C
60 Oryzasativa  --CT-CCATGGT---G-AC-GC-----ACC--ACGAC-ATG-CA-GATGCACGCGG-C
61 Arabidopsisthaliana  C-CTACC-TCCT-CG-G--GT-----CCTTATGGTTATGGTATGTTGGAC-CAATC
62              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
63
64 Zeamays      CATG--TACGGG-GGAACGGC-CG-TGCCCCCGC--CGGCCGGGCTCCTCACCACGGCG
65 Oryzasativa  CATG--TACGGT-GG--CGGCGCGGTGCGCGCG--CG-CG-----CACC-C-----
66 Arabidopsisthaliana  CATGGTTATGGGAGG--TGGT-CGGTACTACCAAACG---G-----GTC-----G
67              **** * * * * * * * * * * * * * * * *
68
69 Zeamays      GGTTC--TCATGCCACACCCA-CAGGGTAGTAGCCACTACCTGCCTTACGCGTACGAGC
70 Oryzasativa  ---TCC--TC---CGCACC-A-C-----CAC-GC--G--TT-C-C--AC---
71 Arabidopsisthaliana  ---TCGGTCAAGATG-A---ATC-----CA--GT--G--TT---G-GTG-G-
72              **      * * * * * * * * * * *
73
74 Zeamays      CCACGTACGGCGGTGAGCAGCCATGG-CTGCATACTAT-GGAGGCGCCGCGTACGCGCC
75 Oryzasativa  -CA-----GC--T---CATGCC---G-CCGCA--CCAC-GG-----CCA-GTACGCGCC
76 Arabidopsisthaliana  -TG-----GC--T---C-T-C---GTCT-T---CCATTAA-----CG-G-A-ATGCC

```

ภาพผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ multiple alignment ของยีน *LECI* จากพืชชนิดต่างๆ

```

77          ** * * * * * * * * * *
78
79 Zeamays          CCGCAACGGCGGGAGCGGCGACGGCAGTGGCAGTGGCGG-CGGTGGCGGGAGCGCGTCCG
80 Oryzasativa      --GC-CG-T---A----CGAC---A-TG-TA---CGG-CGG---CG--AGC-----
81 Arabidopsisthaliana -GGC--T--T-----T--TGAC--CA-T--TA---TGGTCAGTA-TA--AGTG-----
82          **          *** * * * * * * * * * *
83
84 Zeamays          ACACACCCGACGGGAGCGGCGGCTTGGAGCACCCGCACCCGTTTCGCGTACAAGTAGCTAG
85 Oryzasativa      AC-----GGG-A-TGGCGGC-----GTACT---AC--G---GCG-----G--G--A-
86 Arabidopsisthaliana A-----AG--A-TGG-AAT-----TATT---C---TT--C-----A-
87          * * * * * * * * * * * * * * * *
88
89 Zeamays          TTCGTACGTC-GTTCGACTTGAGCAAGCCATCGATCTGCTGATCTGAACGTACGCTGTAT
90 Oryzasativa      T--GTACG-C-GC-C--C--G-GCA-GC---G---GC-G---G--CG-ACG--G---
91 Arabidopsisthaliana TTTTATATCTGT-T--C--A-A-A-AC---A---TGT-G-TTG---G-ATA--G---
92          * * * * * * * * * * * * * * * *
93
94 Zeamays          TGTAC---ACGCATGCACGTAGCTATCGGCGGCTAGC-TCTCCTGTTTAAAGTTGACTGT
95 Oryzasativa      -G-A---GCG---GCA-G--C--A---GCGGC-AGC-----G--GT-G---G-
96 Arabidopsisthaliana -ATATTTTAT-T-TTTATGT-CTTAT---CAAT-AACATTTC-TATATA-AT-GT--TG-
97          * * * * * * * * * * * * * * * *
98
99 Zeamays          GATTCTGTCCC----GGG-C-GGCTAGCAACTTAGTATCTTCCTTCAGTCTCTAGTTTCT
100 Oryzasativa      ----C-G--CC---GGCAC-G-CC-GCA-----G-A---CC---GTC---AA---CT
101 Arabidopsisthaliana ----CT-T-CTTTAAGGAAAAG--T-GT---T--GTA---TT-----TC---AATA-CT
102          * * * * * * * * * * * * * * * *
103
104 Zeamays          TAGCAGTCGTAGAAGTGTTCATGCTTGCCAGTGTGTTGT-TTTAGGGCCGGGTAACC
105 Oryzasativa      T-----CG-AG-----CA-----CCAGCAT-CCGT-T-----C--GGATA---C
106 Arabidopsisthaliana T--TA--TG-AGAA-----A-----CT-G-AT-TTATAT-----ATG---C
107          * * * * * * * * * * * * * * * *
108
109 Zeamays          ATCCGATGA-GATT-ATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
110 Oryzasativa      A-----A-G--T-A---G-----
111 Arabidopsisthaliana A---A--ATGATTTAACCCAA-----
112          * * * * *
113

```

ภาพผนวกที่ 4 (ต่อ)


```

1 CLUSTAL multiple sequence alignment
2
3
4 Sorghumbicolor ATG--CCGTTCG---CAGCAGCAGCAG--CAGCAG-GGC--CAG--CGA-GGTGAGCCGC
5 Zeamays ATG--CCGTTCG---CAGCAGCAACAG--CAGCAG-GGC--CAG--C-A-GGTG-GC---
6 Oryzasativa ATGGCGCGGCGGTGCAGCAGCAGCAGAGCGGCGGCGGCGGATCGACGG-GGGC---
7 *** ** *
8
9 Sorghumbicolor AGGTGGTGGCGGGTTCGACG---CGGTGGTGCCCGACGCGGAGCAGCTGATGATCCTGG
10 Zeamays -----GGCGGGTTCGACG---CGGTGGTGCCCGACGCGGAGCAGCTGATGATCCTGG
11 Oryzasativa -GGCGGCGGTGGGGTTCGACGACGCGGTGGTGCCCGACGCGGAGCAGCTGATGATGCTGG
12 *** ** *
13
14 Sorghumbicolor AGGAGATGTACCGTGGCGG-C-CTGCGCACGCCAACCGCTCGCAGATCCAGCAGATCAC
15 Zeamays AGGACATGTACCGCGGCGG-C-CTGCGCACGCCAATCGCTCGCAGATCCAGCAGATCAC
16 Oryzasativa AGGAGATGTACAGGGGAGGCTCCG-G-ACGCCGAACGCGGCGCAGATACAGCAGATCAC
17 *** ** *
18
19 Sorghumbicolor GGCGCACCTCGCCTG-C-TACGGCCGCATCGAGGGCAAGAACGCTTCTACTGGTTCCAG
20 Zeamays GGCGCACCTCGCCTG-C-TACGGCCGCATCGAGGGCAAGAACGCTTCTACTGGTTCCAG
21 Oryzasativa GGCGCACCTC-TC-GACGTACGGCCGCATCGAGGGCAAGAACGCTTCTACTGGTTCCAG
22 ***** *
23
24 Sorghumbicolor AACCACAAGGCCCGCGACCGCCAGAAGCTCCGCCGACGCTCTGCATGAGCCACCACCTC
25 Zeamays AACCACAAGGCCCGGACCGCCAGAAGATCGCGCGCAGGCTCTGCATGAGCCACCACCTC
26 Oryzasativa AACCACAAGGCCCGCGACCGCCAGAAGCTCCGCCGCGCTCTGCATGAGCCACCACCTC
27 ***** *
28
29 Sorghumbicolor CTCTCCTGCGCCAGTACTAC-GCCGCCGCGCAGGCGCAC-CACGGCCAC-GGCCACGGC
30 Zeamays CTCTCCTGCGCGCAGTACTAC-GCCGC-A-GC-GGCGCAC-CACGGCCAC-G-CC---GC
31 Oryzasativa CTCTCCTGCGCCACTACTACCACCACCAC-C--TCGC-CGC-CG-CGCGCC-CC---GT
32 ***** *
33
34 Sorghumbicolor GGC-TTCC-TCGCGCCCG-GC--C-GCCGCCGT-CGTGCGCGG-TATATGCTC-TCC
35 Zeamays --C-TTCC-TCGCGG---C-GC--C-GCCGCCG-TACGG-GCACCA--GC-TGCTC-TCC
36 Oryzasativa --CGTTCCGCGCGG---CAGCTTCTGCGCGG---C-T-GCACCCCT-CCTCCTCCTCC
37 ***** *
38
39 Sorghumbicolor -CCGTC---GACG-TCGCC-CACC--CCG-GCTG-CTGC-TGTGCTGCGC---TGCG
40 Zeamays -CCGTCC-ACGACG-TCGCC-CACC--CCG-GCTG-CTGC-TGTGCTGCGCGCTGCA
41 Oryzasativa TCC-TCCTGCGCGGTGGCCTCATCGACACGCTAATTCCTTCT-CT-CC-C---C-CA
42 ** *
43
44 Sorghumbicolor GCGTACGGTACTACT---ACC-CCACCAC-G--GC--C-GC--CGCCGCTTC-GCT-G
45 Zeamays GCGTACGGTACTACT---ACC-CCGCCAC-G--GC--C-GC--C---TTC-GCT-G
46 Oryzasativa -CGT-CGGCGACCAACCCACCTTCGCGCGCGCAGCAGCAGCA-G---CAGCTTA
47 ***** *
48
49 Sorghumbicolor CACCACCGCGCGG--ACGGCGAGCA--GGTGC-GCCG--GAAACGCCACC-C-TC---
50 Zeamays CAC--CGGCG--G-A--GC---C---GGTGC-GCCG--GCAACGCCACTC-CC---
51 Oryzasativa CACCACCGG--TACTACTACC--CTTACCAGCGCGCGCGCACCGCCAC-CGCCAGGA
52 *** *
53
54 Sorghumbicolor CGTCGCGGAC--G-A-CCAGCTCTTCCACTAT---CAGGGTGGAGGAGGGC-T--TGT-
55 Zeamays CGTCGCGGAC--C-A-CCAGCTGTCCACTAT---CAGGGTGGCGGAGGGC-T--TGT-
56 Oryzasativa CGTCGCGGCGGCGGAGCCG--CTCTTCCACTACAACAGGGAGGCGGCGG-CGTGGTGT
57 ***** *
58
59 Sorghumbicolor GCGCGCGGCTGAGGCG--C-----TCG--GCCG--GCCGAGTACTCGTCGCTGGGGAA
60 Zeamays GCGGACG--GAGGCG--C-----TCG--GCCG--GCCGAGTACTC---GCTGGGGAA
61 Oryzasativa GCGGCGGCGGAGGCGATCGGCGTTCGTCGTCGTCGTCGACTACTC---GCTGGGGAA
62 ***** *
63
64 Sorghumbicolor GCT---GGACAACCTTCGGCGTGGCGGCGCTTGACGA--CGT-CGTGCTG-AGCTCC-ACC
65 Zeamays GCT---GGACAACCTTCGGCGTGGCG--CTTGACGA--CGT-CGTGGT-AGCTCG-ACC
66 Oryzasativa GCTAGTGGACAACCTTCGGGTGGCG--CTGGAGGAGCGTTCGCGCGCAGC-CGCAGC
67 *** ** *
68
69 Sorghumbicolor T-CCA-CG--GCCGTCGACA-TGATGG---CG-CC-TCC---T-G---G-GTT-CGA-GG
70 Zeamays T-CCGGTGTGTGTCGACA-CGATGGGGCG-CC-TCCGTT-GCAGG-GTT-CGA-GG
71 Oryzasativa AGCCGGC--A-CGACGATGGCGATGA---CGGCCGTC-G--TCG---ACACTAGGCGG
72 *** *
73
74 Sorghumbicolor TGCGCCCGCG---C-GGCTGCCTTC---TGCCGCGCGCTCAAGACGCTGGACCTCTTC
75 Zeamays TGCGCCCGCGCTGCC-GGCTGCCTTCAGCTGCGGCGGCTCAAGACGCTAGACCTCTTC
76 Oryzasativa TGCGC--GCGGC-GGCAGG-TGGCTTC---TGCCGCGCGCTCAAGACGCTGGACCTCTTC
77 ***** *
78
79 Sorghumbicolor CCGGCGGGCTCAAGAAGAGCAGCAGCAGCTGGCCTGA
80 Zeamays CCGGCGGTCTCGAGGAAGAGCAGCAGCAGCTGGCCTGA
81 Oryzasativa CCGGCGGCTCAAGAAGAGCAGCATGACGTCGTCTAG
82 ***** *
83

```

ภาพผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ multiple alignment ของยีน *WUSCHEL* จากพืชชนิดต่างๆ

```

1 CLUSTAL multiple sequence alignment
2
3
4 Sorghumbicolor      ACGCACA-CAACACAGGTCTACA---ACATCTGTAGTTCATCACATTCCTTGCACGGTT
5 Zeamays             -CACACAGCAGCACAGGTCTACATCAACATCGGTAG--C-TCACATTCCTCCCACGGCT
6 AP2proteinoilpalm  -TTCA-ATCA--A-AG--CT-----T-TC--T---T-TC---TCC-T--CA-----
7                    ** * ** * ** **          ** *          **      * * **
8
9 Sorghumbicolor      GCACT-GCACCTTC-----TATCATA-GGCA-CATTCACTGCA--GGTCAACAAGGC--C
10 Zeamays             GCCTAGCGCCTTCAATTCTATCGTATAGCTTCATTC-TT-CACTGGTGAACAAGGCAGT
11 AP2proteinoilpalm  --ACT----CCT-----TAT--TA-----C---GG-GAATA---C--C
12                    ***      ***          *** **          *   **   * * *
13
14 Sorghumbicolor      -GC---AGCAGATCGATCTCCATGGACATGGACATGAGCTCAGCTTATCCCCACCCTGG
15 Zeamays             AGCTATAGCAGATCGATCTCCATGGACATGGACATGAGCTCAGCTTATCCCCACCCTGG
16 AP2proteinoilpalm  --CT--GGCA-A-CG----CCATGGACATGGACAC---TTCA-C---A----CA--GCTGG
17                    *      * * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * *
18
19 Sorghumbicolor      CTCT-CCTTCTCCCTCTCCAACAACCTACCA-CCATGGCCTTCTTGAGGCCTTCTCCAAC
20 Zeamays             CTCT-CCTTCTCCCTCTCCAACAACCTACCA-CCATGGCCTACTCGAAGCCTTCTCTAACT
21 AP2proteinoilpalm  CT-TGCCCTTCTCCCTATCTTAC--C-ACCAGCCCTA-CCTCCTCGAGGC--TCTC---T
22                    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
23
24 Sorghumbicolor      CCTCCTCGCTGCTCCAC-TCGGAGACGAGCAGGG-TA-CAGTGGAGGAGTCCCAGAAGA
25 Zeamays             CCTC---CGGTACTCTC-TTGGAGACGAGCAGGG-CG-CAGTGGAGGAGTCCCAGGAGA
26 AP2proteinoilpalm  CCTC---CGCCCTCCACAT--GGTGG-GGG-GGGGATGACGGCGGAGGAG-CGGGGAGGA
27                    **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
28
29 Sorghumbicolor      -TGGTGGAGGACTTCTCGGCGGCG-T--CGGTGGCG---CGG--GC-G----CCCCAC
30 Zeamays             -CGTGGAGGACTTCTCGGCGGCG-T--CGGTGGCG---CCG--GC-G----CCCGCG
31 AP2proteinoilpalm  TCGGCGGAGG--T----GGCGCGATGGCGGTGGTGGGCGGAAGCTGGAGGACTTC-C
32                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
33
34 Sorghumbicolor      -CGGCGGC-G-GCGACGG--CTGCA-GA---G-GATCACCAGCTTGTCTGCGGCGAG-CT
35 Zeamays             -CG-CAGCCG-GCGGCGG--CTGCA-GATCAG-GATCACCAGCTTGTGTGCGGCGAG-CT
36 AP2proteinoilpalm  TCGGCGG--GTGTGG-GGAACCG-ATGG--GGCGGT-AC--GCT-G---GCGGCGAGACC
37                    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
38
39 Sorghumbicolor      GGGCAGCAT-CACGGCCGGTCTTGGC-C-C---ACT-A--C-C---CGGC-G-C-----
40 Zeamays             GGGCAGCAT-CACAGCCAGTCTTGGC-C-C---ACT-A--C-C---CGGC-GCGCCAG
41 AP2proteinoilpalm  GGG--G-ATGCAGGG--GGATCT-ACGACTCTGAACCTGAAGCAATCG-CTG-C-----
42                    *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
43
44 Sorghumbicolor      CTGGG-AC--GACGGTGGAGA-ACC--C--CGG--C-GCGGTGAC--CG---TGGCGGCG
45 Zeamays             CTGGG-AC--GACGGTGGAGA-ACC--C--CGG--C-GCGGTGAC--CG---TGGCGGCC
46 AP2proteinoilpalm  C-GGTAACCTG-CAG-GG-GCTACCAGCGACGGAGCAGCAG-GACTCCGAGATGGCGA--
47                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
48
49 Sorghumbicolor      ATGTCG--ACGGACGT-GGC-----GGAGTCCGACCAGGCGAGGCGCCCGCGAGAC
50 Zeamays             ATGTCGTCGACGGACGT-GGCCGGGGCGGAGTCCGACCAGGCGAGGCGCCCGCGAGAC
51 AP2proteinoilpalm  AGGT-G---GCGG-CGCCGGC-----GGAGTC-AC--GG-AAGG---CCGTGAAAC
52                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
53
54 Sorghumbicolor      GTTCGGGCAGCGCACATCAATCTACCGTGGTGTACCAGGCACCGGTGGACAGGGAGATA
55 Zeamays             GTTCGGGCAGCGCACATCCATCTACCGTGGGCTCACCAGGCACCGGTGGACGGGAGATA
56 AP2proteinoilpalm  GTTCGGGCAGCGCACATCTATCTACCGCGGCGTACCAGGCATCGATGGACGGGAGATA
57                    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
58
59 Sorghumbicolor      CGAGGCGCACCTGTGGGACAACAGCTGCCCGCGGGAAGGCCAAAGCCGAAAGGTGCGCA
60 Zeamays             TGAGGCGCACCTGTGGGACAACAGCTGCCCGCGGAGGGGCCAAAGCCGAAAGGACGGCA
61 AP2proteinoilpalm  CGAGGCGCACCTGTGGGACAACAGCTGCCCGCGGAGGGGCGAGGCCGAAAGGAAGGCA
62                    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
63
64 Sorghumbicolor      AGTCTA-CTTAGGAGGCTATGATAAGGAGGAGAAGGCGGCTAGAGCTTACGACCTCGCCG
65 Zeamays             AGTCTA-CCTAGGAGGCTATGACAAGGAGGAGAAGGCGGCTAGAGCTTACGACCTCGCCG
66 AP2proteinoilpalm  AGTCTATCTT-GGTGGATACGATAAGGAGGAGAAGGCGGCGAGGGCTTACGATCTCGCAG
67                    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
68
69 Sorghumbicolor      CACTCAAGTACTGGGGTGC-T-ACAACCACGACCAACTTCCCGTGTCCAACACTACGAGAA
70 Zeamays             CGCTCAAGTACTGGGG-GCCT-ACAACCACGACCAACTTCCCGTGTCCAACACTACGAGAA
71 AP2proteinoilpalm  CGCTCAAGTATTGGGGT-C-CGACCACCACCAACTTTCCAATCTCCAACACTACGAGAA
72                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
73
74 Sorghumbicolor      GGAGCTGGAGGAGATGAAGT-CGATGACGCGGCAGGAGTTCATCGCGTCTGTGC-GCAGG
75 Zeamays             GGAGCTGGAGGAGATGAAGT-CCATGACGCGGCAGGAGTTCATCGCGTCTGTGC-GCAGG
76 AP2proteinoilpalm  GGAGCTGGAGGAGATGAAGAAC-ATGACACGACAGGAGTTTGTTCGATCGCT-CAGAAGG

```

ภาพผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ multiple alignment ของยีน *BBM* จากพืชชนิดต่างๆ

```

78
79 Sorghumbicolor    AAGAGCAGC-GGTTTCTCGC-GAGGTGCCTCCATCTACAGAGGAGTCAACAAGGCATCATC
80 Zeamays           AAGAGCAGC-GGTTTCTCAC-GAGGCGCCTCCATCTACAGAGGAGTCAACAAGGCATCATC
81 AP2proteinoilpalm AAGAGCT-CTGGTTCTC-CAGAGGCGCCTCGATCTATAGAGGGGTCAACCAGACACCATC
82 ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
83
84 Sorghumbicolor    AGCATGGCCGGTGGCAGGCAAGGATCGGCAGGGTGGCCGGAAACAAGGACCTGTA-CTTG
85 Zeamays           AGCACGGCCGGTGGCAGGCGAGGATCGGCAGGGTGGCCGGAAACAAGGACCTGTA-CTTG
86 AP2proteinoilpalm AACATGGACGGTGGCAAGCAAGAATTGGAGGGTAGCAGGCAACAAGATCTTTATCTTG
87 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
88
89 Sorghumbicolor    GGCACGTTTCAGTACTCAGGAGGAAGCAGC-GGAGGCATACGACATTGCTGCGATCAAGTT
90 Zeamays           GGCACTTTCAGTACTCAGGAAGAGGCGGC-G-AGGCGTACGACATCGCTGCGATCAAGTT
91 AP2proteinoilpalm GA-ACCTTTAGCAGCAGGAAGAGGCAGCAG-AGGCCTATGACATTGCAGCAATTAAGTT
92 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
93
94 Sorghumbicolor    CCGCGGGCTCAATGCCGTGACCAACTTCGACATGAGCCGCTACGACGTGGACAGCATC-C
95 Zeamays           CCGCGGGCTCAAGCCCGTCAACAACCTTTGACATGAGCCGCTACGACGTGGAGAGCATC-C
96 AP2proteinoilpalm TCGGGGGCTCAATGCAGTGACAAATTTGACATTAGCCGCTACGATGTCAAGAGCATAGC
97 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
98
99 Sorghumbicolor    TCAACAGCGACCTCCCGTTGG-GGG-CGGAGC-GG-CCGGACGCGC-CT----CC---A
100 Zeamays           TCAGCAGCGACCTCCCGTTCGG-GGG-CGGAGCTAG-C-GGTCGCGC-CC----CCGCCA
101 AP2proteinoilpalm -CAACAGCAACCTCCCATTTGGCGGGATG-A-C-AGGCCGG-C-C-CTCCAAGGCC---A
102 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
103
104 Sorghumbicolor    -AG----TTC-CCACTGGA--CTCA-CTG----CA-G-CCA-GGGAGC---GCTGTGCGG
105 Zeamays           -AG----TTC-CCGTTGGA--CTCG-CTG----CA-G-CCG-GGGAGC---GCTGCCGCC
106 AP2proteinoilpalm CAGAATCTTCGCCATC--ATCCTCATCTGACGCCATGACTGTGGAAGCCAAGCAGCTGT-
107 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
108
109 Sorghumbicolor    ATG-AT---CG-CCGGAG---CTGC-G-----TCAC--AGGCCA---TGCCGC-CGTCC-
110 Zeamays           ATG-ATGCTCG-CCGGGG---CTGCTGCCGCTTCGC--AGGCCACCATGCCGC-CGTCC-
111 AP2proteinoilpalm -TGGA----CGGCCGGATCCCT-C-G--GCCTCACTTGGGTT----TGCTGCGC-TCCC
112 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
113
114 Sorghumbicolor    -----G-A-GA--AGGACTACTGGTCTCTGCTCGCCCTTCA-CTACCAGCAGCAGCAGC
115 Zeamays           -----G-A-GA--AGGACTACTGGTCTCTGCTCGCCCTGCA-CTACCAGCAGCAGCAGC
116 AP2proteinoilpalm CATTAAGCAGCATCAGGACTTCTGGTCTCTGTTGCACTCCAAC-AGCAGCAGCAGCAGC
117 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
118
119 Sorghumbicolor    AGCAG---CAGCA--GT--TTCCGGCTTCTGC-TTACGAGGCT-TACGGCTCCGGCG---
120 Zeamays           AGCAGGAGCGGCA--GT--TCCCGCTTCTGC-TTACGAGGCT-TACGGCTCCGGCGCGG
121 AP2proteinoilpalm AGCAG---CAGCAAGTAAT-CAAGCTTCCAGGGTT-CG-GTCTCTTCTCCTCTGCTG---
122 ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
123
124 Sorghumbicolor    TGAAC-GTGGACTTCACGATGGGCACC-AGCAGC--CA-CAGCAGCAGCAACA-C-CGGC
125 Zeamays           TGAAC-GTGGACTTCACGATGGGCACC-AGTAGCGCAACAACAACAACA-C-CGGC
126 AP2proteinoilpalm TGA-CTATGGATTCTCTACAG-CTTCTAATGGTGTTA-TA--AGC--CAAGGGTGTGG-
127 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
128
129 Sorghumbicolor    AGTGGCGTCATGTGGGGCACCCTACGGGTGCA--A----TGGGACAGCAAGACAGCAGC
130 Zeamays           AGCGGCGTCATGTGGGGCGCCACCCTGGTGCAGTAGTGGGACAGCAAGACAGCAGC
131 AP2proteinoilpalm GG-GGAGCCTTGTGTGG-A--AC-GGTGGTGT--TG----TGGGACAGCA-G-CA--AG-
132 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
133
134 Sorghumbicolor    AGCAGCAA--GCAGGGCAACGGCTATGCCAGCAACATTCCTTATGCTGC-TGC--TGCTG
135 Zeamays           -G--GCAA--GCAGGGCAACGGCTATGCCAGCAACATTCCTTATGCTGC-TGC--T----
136 AP2proteinoilpalm -A--GCAATCACAGAACAATAG-T-TGCT-----C-TTC--TATACCGTATGCAAC-C--
137 ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
138
139 Sorghumbicolor    CTGCTATGGT-TTCTGGATCAGCTGG--CTACGAGGGCTCCACCGGAAACAATGGA-ACC
140 Zeamays           --GCTATGGT-TTCTGGATCTGCTGG--CTACGAGGGCTCCACCGGCAACAATGGA-ACC
141 AP2proteinoilpalm C--CTATTGCATT-TGGA---G--GGAATTACGAGGGCTCCA---GCTATG-TGGGGAGC
142 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
143
144 Sorghumbicolor    TGGGTTAC--CA-G-----TA---GC-A-CTAGC--ACCA-GC--A---CGGC--TCC
145 Zeamays           TGGGTTAC--TACGAC-----TACCAGC-AGC-AAC--ACCG-GC--A---CGGC--TCC
146 AP2proteinoilpalm TGGGTACACCACCCCTCTACT-ACCA-CGAACCTGCCAAGCCCAATGTGGCAGTCT
147 ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
148
149 Sorghumbicolor    C-CAGTACTACAATACTCTGTTGGGATGGA--G-TA-GG-TG--C----A----CTGAC
150 Zeamays           C-CACTACTACAATACTCTCTCGGGATGGA--G-TA-GG-TG--C----ATGCGCTGAC
151 AP2proteinoilpalm TTCAG-AC-GC--CCATCT-TT-GGAATGGAATGATATGGATGGGTGGGGA-G-G-TGAG
152 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

ภาพผนวกที่ 6 (ต่อ)

```

153
154 Sorghumbicolor      A--AG-C-TAGCTAGCT-G-A-A-ATCAGGTGATAG-GCCTAG-G-AAG---CTAG-GAC
155 Zeamays              A--AG-C-TAGCTAGCT-G-A-A-ATCAGGTGGTAG-GCCTAG-G-AAGAAGCTAG-GAC
156 AP2proteinoilpalm  AGGAGACGCA-CTTGCTGCAGAGAGAAAG-AG-AGAGTCAAAGTGAGA---TAGAGAC
157                      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
158
159 Sorghumbicolor      --TG--A--C-ATT-GAACTGATCACAATTT-TGG-C-T-----GCTACAT-ATGCCCA
160 Zeamays              --TG--A--C-ATG-GAACTGATCACAATTT-TGG-C-T-----GCTACAT-ATACC-A
161 AP2proteinoilpalm  CATGGGAGGTGATGTGAACTGACCACA-CTCACAACATAAAGAAGGGA-AGGAGAAC-A
162                      ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
163
164 Sorghumbicolor      TGTATG----G-GTATGGC-TG--G-G--G-----TG-C--A-T-CC-----TTCTGC
165 Zeamays              TGCATGCCCCATGTATGGA-TG--G-G--GGTGCCTGTG-C--G-T-CC-----TTCTGC
166 AP2proteinoilpalm  -G-A-G----G-G-A-GGACTGACGAGAAG--AC---TAACAAGATATCAAAGTTTTTGC
167                      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
168
169 Sorghumbicolor      T----AT--TCATG-AT---ATTCCTGACTTACTGT--AG----C-----A--GAG----
170 Zeamays              TTGCTAT--TCACG-AC---ACTTGCTGACTTACTGT--GG----C-----A--GAGCCGC
171 AP2proteinoilpalm  T--C-ATGGTCATGCGCCCAACTT-CT--TTTACTTTTGGTTTTTCTTTTACTGA----C
172                      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
173
174 Sorghumbicolor      A-G----CTCAT-TTACCATCAACATT-TCTAAATTCTAATT----CAAG----CTCG--
175 Zeamays              A-GAGGGCTGGT-GTACCATCAGCATT-TCTAAATTCTAATT--ATCAAG----CTCGTT
176 AP2proteinoilpalm  ATGATT-CT-ATATTGTCATCATCATC-AG--TGTAATGGAACAAGAAGCCTT-TT
177                      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
178
179 Sorghumbicolor      -----
180 Zeamays              -TCAAGCTGT-----
181 AP2proteinoilpalm  GTAAAAAAAAAAAAA
182
183

```

ภาพผนวกที่ 6 (ต่อ)

```

1 CLUSTAL multiple sequence alignment
2
3
4 1st_BASE_518332_SERK_2J_M13F_(-20) --GGAAAAATCACTATAGGGCGATTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGG
5 1st_BASE_518329_SERK_2G_M13F_(-20) -GGGAAAAAATC-CTATAGGGCAATTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGG
6 1st_BASE_518330_SERK_2H_M13F_(-20) -GGGAAAAA-TC-CTATAGGGCGATTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGG
7 1st_BASE_518331_SERK_2I_M13F_(-20) -GGGAAAAAC-TC-CTATAGGGCGATTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGG
8 1st_BASE_518326_SERK_2D_M13F_(-20) -GGGAAAA--TC-CTATAGGGCGATTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGG
9 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20) -GNNNNNNNNTC-NNATAGGGCGATTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGG
10 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20)-1 -GNNNNNNNNTC-NNATAGGGCGATTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGG
11 1st_BASE_518327_SERK_2E_M13F_(-20) -GNNATNNNNCTC-NNATAGGGCGANNGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGG
12 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20)-1 NNNNNANNNCTCANTATAGGGCNANTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGG
13 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20) NNNNNANNNCTCANTATAGGGCNANTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGG
14 1st_BASE_518328_SERK_2F_M13F_(-20) --NNNNNNNNTC-CTATAGGGCNNTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGG
15
16
17 1st_BASE_518332_SERK_2J_M13F_(-20) GGCCGCGGGAATTCGATTCAATTGTTCCACGAAACAGCAGTTGTTACATGG
18 1st_BASE_518329_SERK_2G_M13F_(-20) GGCCGCGGGAATTCGATTCAATTGTTCCACGAAACAGCAGTTGTTACATGG
19 1st_BASE_518330_SERK_2H_M13F_(-20) GGCCGCGGGAATTCGATTCAATTGTTCCACGAAACAGCAGTTGTTACATGG
20 1st_BASE_518331_SERK_2I_M13F_(-20) GGCCGCGGGAATTCGATTCAATTGTTCCACGAAACAGCAGTTGTTACATGG
21 1st_BASE_518326_SERK_2D_M13F_(-20) GGCCGCGGGAATTCGATTCAATTGTTCCACGAAACAGCAGTTGTTACATGG
22 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20) GGCCGCGGGAATTCGATTCAATTGTTCCACGAAACAGCAGTTGTTACATGG
23 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20)-1 GGCCGCGGGAATTCGATTCAATTGTTCCACGAAACAGCAGTTGTTACATGG
24 1st_BASE_518327_SERK_2E_M13F_(-20) GGCCGCGGGAATTCGATTCAATTGTTCCACGAAACAGCAGTTGTTACATGG
25 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20)-1 GGCCGCGGGAATTCGATTCAATTGTTCCACGAAACAGCAGTTGTTACATGG
26 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20) GGCCGCGGGAATTCGATTCAATTGTTCCACGAAACAGCAGTTGTTACATGG
27 1st_BASE_518328_SERK_2F_M13F_(-20) GGCCGCGGGAATTCGATTCAATTGTTCCACGAAACAGCAGTTGTTACATGG
28
29
30 1st_BASE_518332_SERK_2J_M13F_(-20) AGTCCATGAGCTTGGCCAACCCAAAGTCTCCAACAACCTGCCTCAAACCT
31 1st_BASE_518329_SERK_2G_M13F_(-20) AGTCCATGAGCTTGGCCAACCCAAAGTCTCCAACAACCTGCCTCAAACCT
32 1st_BASE_518330_SERK_2H_M13F_(-20) AGTCCATGAGCTTGGCCAACCCAAAGTCTCCAACAACCTGCCTCAAACCT
33 1st_BASE_518331_SERK_2I_M13F_(-20) AGTCCATGAGCTTGGCCAACCCAAAGTCTCCAACAACCTGCCTCAAACCT
34 1st_BASE_518326_SERK_2D_M13F_(-20) AGTCCATGAGCTTGGCCAACCCAAAGTCTCCAACAACCTGCCTCAAACCT
35 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20) AGTCCATGAGCTTGGCCAACCCAAAGTCTCCAACAACCTGCCTCAAACCT
36 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20)-1 AGTCCATGAGCTTGGCCAACCCAAAGTCTCCAACAACCTGCCTCAAACCT
37 1st_BASE_518327_SERK_2E_M13F_(-20) AGTCCATGAGCTTGGCCAACCCAAAGTCTCCAACAACCTGCCTCAAACCT
38 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20)-1 AGTCCATGAGCTTGGCCAACCCAAAGTCTCCAACAACCTGCCTCAAACCT
39 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20) AGTCCATGAGCTTGGCCAACCCAAAGTCTCCAACAACCTGCCTCAAACCT
40 1st_BASE_518328_SERK_2F_M13F_(-20) AGTCCATGAGCTTGGCCAACCCAAAGTCTCCAACAACCTGCCTCAAACCT
41
42
43 1st_BASE_518332_SERK_2J_M13F_(-20) AAATATTTGCAGCTTTGACATCAGATGAATAAATTTTGGATCACAATGA
44 1st_BASE_518329_SERK_2G_M13F_(-20) AAATATTTGCAGCTTTGACATCAGATGAATAAATTTTGGATCACAATGA
45 1st_BASE_518330_SERK_2H_M13F_(-20) AAATATTTGCAGCTTTGACATCAGATGAATAAATTTTGGATCACAATGA
46 1st_BASE_518331_SERK_2I_M13F_(-20) AAATATTTGCAGCTTTGACATCAGATGAATAAATTTTGGATCACAATGA
47 1st_BASE_518326_SERK_2D_M13F_(-20) AAATATTTGCAGCTTTGACATCAGATGAATAAATTTTGGATCACAATGA
48 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20) AAATATTTGCAGCTTTGACATCAGATGAATAAATTTTGGATCACAATGA
49 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20)-1 AAATATTTGCAGCTTTGACATCAGATGAATAAATTTTGGATCACAATGA
50 1st_BASE_518327_SERK_2E_M13F_(-20) AAATATTTGCAGCTTTGACATCAGATGAATAAATTTTGGATCACAATGA
51 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20)-1 AAATATTTGCAGCTTTGACATCAGATGAATAAATTTTGGATCACAATGA
52 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20) AAATATTTGCAGCTTTGACATCAGATGAATAAATTTTGGATCACAATGA
53 1st_BASE_518328_SERK_2F_M13F_(-20) AAATATTTGCAGCTTTGACATCAGATGAATAAATTTTGGATCACAATGA
54
55
56 1st_BASE_518332_SERK_2J_M13F_(-20) ATGACAGCCCCCTTGCAGATCCCAATGCAATCCTTCGCCGAGTTGTCCAA
57 1st_BASE_518329_SERK_2G_M13F_(-20) ATGACAGCCCCCTTGCAGATCCCAATGCAATCCTTCGCCGAGTTGTCCAA
58 1st_BASE_518330_SERK_2H_M13F_(-20) ATGACAGCCCCCTTGCAGATCCCAATGCAATCCTTCGCCGAGTTGTCCAA
59 1st_BASE_518331_SERK_2I_M13F_(-20) ATGACAGCCCCCTTGCAGATCCCAATGCAATCCTTCGCCGAGTTGTCCAA
60 1st_BASE_518326_SERK_2D_M13F_(-20) ATGACAGCCCCCTTGCAGATCCCAATGCAATCCTTCGCCGAGTTGTCCAA
61 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20) ATGACAGCCCCCTTGCAGATCCCAATGCAATCCTTCGCCGAGTTGTCCAA
62 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20)-1 ATGACAGCCCCCTTGCAGATCCCAATGCAATCCTTCGCCGAGTTGTCCAA
63 1st_BASE_518327_SERK_2E_M13F_(-20) ATGACAGCCCCCTTGCAGATCCCAATGCAATCCTTCGCCGAGTTGTCCAA
64 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20)-1 ATGACAGCCCCCTTGCAGATCCCAATGCAATCCTTCGCCGAGTTGTCCAA
65 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20) ATGACAGCCCCCTTGCAGATCCCAATGCAATCCTTCGCCGAGTTGTCCAA
66 1st_BASE_518328_SERK_2F_M13F_(-20) ATGACAGCCCCCTTGCAGATCCCAATGCAATCCTTCGCCGAGTTGTCCAA
67
68
69 1st_BASE_518332_SERK_2J_M13F_(-20) GTTCAGATGGTGGCCGCTCTCTTAAGCATGATGCAACACTTCCATTAGCC
70 1st_BASE_518329_SERK_2G_M13F_(-20) GTTCAGATGGTGGCCGCTCTCTTAAGCATGATGCAACACTTCCATTAGCC
71 1st_BASE_518330_SERK_2H_M13F_(-20) GTTCAGATGGTGGCCGCTCTCTTAAGCATGATGCAACACTTCCATTAGCC
72 1st_BASE_518331_SERK_2I_M13F_(-20) GTTCAGATGGTGGCCGCTCTCTTAAGCATGATGCAACACTTCCATTAGCC
73 1st_BASE_518326_SERK_2D_M13F_(-20) GTTCAGATGGTGGCCGCTCTCTTAAGCATGATGCAACACTTCCATTAGCC
74 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20) GTTCAGATGGTGGCCGCTCTCTTAAGCATGATGCAACACTTCCATTAGCC
75 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20)-1 GTTCAGATGGTGGCCGCTCTCTTAAGCATGATGCAACACTTCCATTAGCC
76 1st_BASE_518327_SERK_2E_M13F_(-20) GTTCAGATGGTGGCCGCTCTCTTAAGCATGATGCAACACTTCCATTAGCC

```

ภาพผนวกที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *SERK* ทั้ง 10 โคลโลนี

```

77 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20)-1 GTTCAGATGGTGGCCGCTCTCTTAAGCATGATGCAACACTTCCATTAGCC
78 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20) GTTCAGATGGTGGCCGCTCTCTTAAGCATGATGCAACACTTCCATTAGCC
79 1st_BASE_518328_SERK_2F_M13F_(-20) GTTCAGATGGTGGCCGCTCTCTTAAGCATGATGCAACACTTCCATTAGCC
80 *****
81
82 1st_BASE_518332_SERK_2J_M13F_(-20) ATACAAGCAAACGTTCCGGTAGGTGTGTCATGCAAAAACCCACGAAGTCAATC
83 1st_BASE_518329_SERK_2G_M13F_(-20) ATACAAGCAAACGTTCCGGTAGGTGTGTCATGCAAAAACCCACGAAGTCAATC
84 1st_BASE_518330_SERK_2H_M13F_(-20) ATACAAGCAAACGTTCCGGTAGGTGTGTCATGCAAAAACCCACGAAGTCAATC
85 1st_BASE_518331_SERK_2I_M13F_(-20) ATACAAGCAAACGTTCCGGTAGGTGTGTCATGCAAAAACCCACGAAGTCAATC
86 1st_BASE_518326_SERK_2D_M13F_(-20) ATACAAGCAAACGTTCCGGTAGGTGTGTCATGCAAAAACCCACGAAGTCAATC
87 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20) ATACAAGCAAACGTTCCGGTAGGTGTGTCATGCAAAAACCCACGAAGTCAATC
88 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20)-1 ATACAAGCAAACGTTCCGGTAGGTGTGTCATGCAAAAACCCACGAAGTCAATC
89 1st_BASE_518327_SERK_2E_M13F_(-20) ATACAAGCAAACGTTCCGGTAGGTGTGTCATGCAAAAACCCACGAAGTCAATC
90 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20)-1 ATACAAGCAAACGTTCCGGTAGGTGTGTCATGCAAAAACCCACGAAGTCAATC
91 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20) ATACAAGCAAACGTTCCGGTAGGTGTGTCATGCAAAAACCCACGAAGTCAATC
92 1st_BASE_518328_SERK_2F_M13F_(-20) ATACAAGCAAACGTTCCGGTAGGTGTGTCATGCAAAAACCCACGAAGTCAATC
93 *****
94
95 1st_BASE_518332_SERK_2J_M13F_(-20) TCGGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA
96 1st_BASE_518329_SERK_2G_M13F_(-20) TCGGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA
97 1st_BASE_518330_SERK_2H_M13F_(-20) TCGGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA
98 1st_BASE_518331_SERK_2I_M13F_(-20) TCGGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA
99 1st_BASE_518326_SERK_2D_M13F_(-20) TCGGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA
100 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20) TCGGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA
101 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20)-1 TCGGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA
102 1st_BASE_518327_SERK_2E_M13F_(-20) TCGGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA
103 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20)-1 TCGGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA
104 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20) TCGGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA
105 1st_BASE_518328_SERK_2F_M13F_(-20) TCGGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA
106 *****
107
108 1st_BASE_518332_SERK_2J_M13F_(-20) GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
109 1st_BASE_518329_SERK_2G_M13F_(-20) GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
110 1st_BASE_518330_SERK_2H_M13F_(-20) GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
111 1st_BASE_518331_SERK_2I_M13F_(-20) GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
112 1st_BASE_518326_SERK_2D_M13F_(-20) GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
113 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20) GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
114 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20)-1 GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
115 1st_BASE_518327_SERK_2E_M13F_(-20) GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
116 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20)-1 GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
117 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20) GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
118 1st_BASE_518328_SERK_2F_M13F_(-20) GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
119 *****
120
121 1st_BASE_518332_SERK_2J_M13F_(-20) ACAAN
122 1st_BASE_518329_SERK_2G_M13F_(-20) AC---
123 1st_BASE_518330_SERK_2H_M13F_(-20) ACAN-
124 1st_BASE_518331_SERK_2I_M13F_(-20) ACNA-
125 1st_BASE_518326_SERK_2D_M13F_(-20) -----
126 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20) AC---
127 1st_BASE_518323_SERK_2A_M13F_(-20)-1 AC---
128 1st_BASE_518327_SERK_2E_M13F_(-20) AC---
129 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20)-1 A----
130 1st_BASE_518324_SERK_2B_M13F_(-20) A----
131 1st_BASE_518328_SERK_2F_M13F_(-20) AC---
132
133

```

ภาพผนวกที่ 7 (ต่อ)

```

1 CLUSTAL multiple sequence alignment
2
3
4 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F (-20) GNNNNNNNNNCANT-ATAGGG-CGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCC
5 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F (-20) NNNNNNNANNC-CT-ATAGGG-CGANTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCC
6 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F (-20) -GGGAAACTC-CT-ATAGGG-CGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCC
7 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F (-20) -GNNNNNNNTC-NT-ATAGGG-CGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCC
8 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F (-20) --GNNNNNCTC-NN-ATAGGG-CNNTTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCC
9 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F (-20) GNNNNNNNCTC-NNATAGGG-CGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCC
10 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F (-20) -NNNNNNNNTC-CN-ATAGNGGCGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCC
11 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F (-20) -NNNNNNNCTC-NN-ATAGGG-CGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCC
12 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F (-20) NNNNNNNNNTC-NN-ATAGGG-CGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCC
13 * * * * *
14
15 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F (-20) CGGCCGCGGGAATTGCGATTGTGGGTCAAGTGATGGGAACCCGGCAGCGGCCG
16 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F (-20) CGGCCGCGGGAATTGCGATTGTGGGTCAAGTGATGGGAACCCGGCAGCGGCCG
17 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F (-20) CGGCCGCGGGAATTGCGATTGTGGGTCAAGTGATGGGAACCCGGCAGCGGCCG
18 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F (-20) CGGCCGCGGGAATTGCGATTGTGGGTCAAGTGATGGGAACCCGGCAGCGGCCG
19 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F (-20) CGGCCGCGGGAATTGCGATTGTGGGTCAAGTGATGGGAACCCGGCAGCGGCCG
20 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F (-20) CGGCCGCGGGAATTGCGATTGTGGGTCAAGTGATGGGAACCCGGCAGCGGCCG
21 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F (-20) CGGCCGCGGGAATTGCGATTGTGGGTCAAGTGATGGGAACCCGGCAGCGGCCG
22 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F (-20) CGGCCGCGGGAATTGCGATTGTGGGTCAAGTGATGGGAACCCGGCAGCGGCCG
23 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F (-20) CGGCCGCGGGAATTGCGATTGTGGGTCAAGTGATGGGAACCCGGCAGCGGCCG
24 *****
25
26 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F (-20) TGTTCG-GTACGGGAGCAA-GAC-AGG--TT----CATGCCAATCG-CTAACG
27 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F (-20) TGTTCG-GTACGGGAGCAA-GAC-AGG--TT----CATGCCAATCG-CTAACG
28 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F (-20) TGTTCG-GTACGGGAGCAA-GAC-AGG--TT----CATGCCAATCG-CTAACG
29 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F (-20) TGTTCG-GTACGGGAGCAA-GAC-AGG--TT----CATGCCAATCG-CTAACG
30 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F (-20) TGTTCG-GTACGGGAGCAA-GAC-AGG--TT----CATGCCAATCG-CTAACG
31 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F (-20) TGTTCG-GTACGGGAGCAA-GAC-AGG--TT----CATGCCAATCG-CTAACG
32 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F (-20) TGTTCG-GTACGGGAGCAA-GAC-AGG--TT----CATGCCAATCG-CTAACG
33 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F (-20) TGGACA-GTAAGGGAGAAA-GACGAGGGCTTGGGGC-TCCC--TTGTCTGA--
34 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F (-20) TGTA-ATGTAAGGGATCNGTGG--AGGGCTTGGGGC-TGCCG-T-GTCTGA--
35 ** * * * * *
36
37 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F (-20) TATCATGCGG-AAGGTGCTGCCAACCCATGCCAAGATCTCTGATGACGCCAAG
38 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F (-20) TATCATGCGG-AAGGTGCTGCCAACCCATGCCAAGATCTCTGATGACGCCAAG
39 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F (-20) TATCATGCGG-AAGGTGCTGCCAACCCATGCCAAGATCTCTGATGACGCCAAG
40 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F (-20) TATCATGCGG-AAGGTGCTGCCAACCCATGCCAAGATCTCTGATGACGCCAAG
41 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F (-20) TATCATGCGG-AAGGTGCTGCCAACCCATGCCAAGATCTCTGATGACGCCAAG
42 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F (-20) TATCATGCGG-AAGGTGCTGCCAACCCATGCCAAGATCTCTGATGACGCCAAG
43 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F (-20) TATCATGCGG-AAGGTGCTGCCAACCCATGCCAAGATCTCTGATGACGCCAAG
44 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F (-20) TATCATG-GGCAAGGTGCTGCCAACCCATGCCAAGGTCTATGATTACGCCAAG
45 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F (-20) -AGCATG-GGCAAGGTGCTGCCAACCCATGCCAAGGTCTCTGATGACGCCAAG
46 * * * * *
47
48 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F (-20) T-CC--AGGAGTGCCTGTCG-GAG-TACATCAG-CTTCATCA---CCA-GC--
49 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F (-20) T-CC--AGGAGTGCCTGTCG-GAG-TACATCAG-CTTCATCA---CCA-GC--
50 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F (-20) T-CC--AGGAGTGCCTGTCG-GAG-TACATCAG-CTTCATCA---CCA-GC--
51 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F (-20) T-CC--AGGAGTGCCTGTCG-GAG-TACATCAG-CTTCATCA---CCA-GC--
52 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F (-20) T-CC--AGGAGTGCCTGTCG-GAG-TACATCAG-CTTCATCA---CCA-GC--
53 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F (-20) T-CC--AGGAGTGCCTGTCG-GAG-TACATCAG-CTTCATCA---CCA-GC--
54 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F (-20) T-CC--AGGAGTGCCTGTCG-GAG-TACATCAG-CTTCATCA---CCA-GC--
55 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F (-20) --CTGGAGGTTNCGTGTGCGG-GCT-CATT-GTCTTCATCAAAACCAAGCTT
56 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F (-20) TGC--AGGAGTGCCTGTCG-GAG-TACATC-ATCTTCATCA---CA--CC--
57 * * * * *
58
59 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F (-20) AACGAGCGGTGCCAGCGAGAGCAGC-GCAAGACCATCACC-GCGGAGGATGTC
60 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F (-20) AACGAGCGGTGCCAGCGAGAGCAGC-GCAAGACCATCACC-GCGGAGGATGTC
61 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F (-20) AACGAGCGGTGCCAGCGAGAGCAGC-GCAAGACCATCACC-GCGGAGGATGTC
62 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F (-20) AACGAGCGGTGCCAGCGAGAGCAGC-GCAAGACCATCACC-GCGGAGGATGTC
63 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F (-20) AGCGAGCGGTGCCAGCGAGAGCAGC-GCAAGACCATCACC-GCGGAGGATGTC
64 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F (-20) AACGAGCGGTGCCAGCGAGAGCAGC-GCAAGACCATCACC-GCGGAGGATGTC
65 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F (-20) AACGAGCGGTGCCAGCGAGAGCAGC-GCAAGACCATCACC-GCGGAGGATGTC
66 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F (-20) A-TG---GGTGCCAG-GACATCTCCGCGGGAAACATC-CTTGCGGTGGATGTC
67 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F (-20) A-CGAGGGTGCAGCAAGAGCAGC-GCAAGACCATCACC-GCGGAGGATGTC
68 * * * * *
69
70 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F (-20) CCATGAGCAAGCTTGGCTT-CGACGACTAC-ATCGAGCCGCT-CAGCCTCTAC
71 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F (-20) CCATGAGCAAGCTTGGCTT-CGACGACTAC-ATCGAGCCGCT-CAGCCTCTAC
72 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F (-20) CCATGAGCAAGCTTGGCTT-CGACGACTAC-ATCGAGCCGCT-CAGCCTCTAC
73 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F (-20) CCATGAGCAAGCTTGGCTT-CGACGACTAC-ATCGAGCCGCT-CAGCCTCTAC
74 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F (-20) CCATGAGCAAGCTTGGCTT-CGACGACTAC-ATCGAGCCGCT-CAGCCTCTAC
75 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F (-20) CCATGAGCAAGCTTGGCTT-CGACGACTAC-ATCGAGCCGCT-CAGCCTCTAC
76 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F (-20) CCATGAGCAAGCTTGGCTT-CGACGACTAC-ATCGAGCCGCT-CAGCCTCTAC

```

ภาพผนวกที่ 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Lec1* ทั้ง 10 โคลน

```

77 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F_(-20) CCATGATTAACCTTGG-TTGCATGACTACGAT-GTGCCCTACA-CCTCTTC
78 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F_(-20) CCATGATCGACCTTGGCTT-CGACGACTAC-ATCGAGCCCT-CAGCCTCTAC
79 ***** * ***** ** * ***** ** * * * * * * * * * * *
80
81 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F_(-20) GCTACCGGGAGCT-CGAGGGCGACCACCG-CG-GCTCCAT-CCGTGGCGAGCC
82 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F_(-20) GCTACCGGGAGCT-CGAGGGCGACCACCG-CG-GCTCCAT-CCGTGGCGAGCC
83 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F_(-20) GCTACCGGGAGCT-CGAGGGCGACCACCG-CG-GCTCCAT-CCGTGGCGAGCC
84 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F_(-20) GCTACCGGGAGCT-CGAGGGCGACCACCG-CG-GCTCCAT-CCGTGGCGAGCC
85 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F_(-20) GCTACCGGGAGCT-CGAGGGCGACCACCG-CG-GCTCCAT-CCGTGGCGAGCC
86 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F_(-20) GCTACCGGGAGCT-CGAGGGCGACCACCG-CG-GCTCCAT-CCGTGGCGAGCC
87 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F_(-20) GCTACCGGGAGCT-CGAGGGCGACCACCG-CG-GCTCCAT-CCGTGGCGAGCC
88 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F_(-20) GCTACCTTGAGCT-CGTGGGAGATC-TCGGCGTG-TCCTT-CCGTGGCCAGCC
89 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F_(-20) GCTACCG-GGGCTTCATGGGAAACC-TCGGCGGGG--CTTGCCG-GGCCATTC
90 ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
91
92 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F_(-20) TACC-ATCAGACACCGCAGCCCC-AACCCA-TCCACCGATG-T-CGTCCCA-T
93 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F_(-20) TACC-ATCAGACACCGCAGCCCC-AGCCCA-TCCACCGATG-T-CGTCCCA-T
94 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F_(-20) TACC-ATCAGACACCGCAGCCCC-AACCCA-TCCACCGATG-T-CGTCCCA-T
95 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F_(-20) TACC-ATCAGACACCGCAGCCCC-AACCCA-TCCACCGATG-T-CGTCCCA-T
96 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F_(-20) TACC-ATCAGACACCGCAGCCCC-AACCCA-TCCACCGATG-T-CGTCCCA-T
97 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F_(-20) TACC-ATCAGACACCGCAGCCCC-AACCCA-TCCACCGATG-T-CGTCCCA-T
98 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F_(-20) TACC-ATCAGACACCGCAGCCCC-AACCCA-TCCACCGATG-T-CGTCCCA-T
99 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F_(-20) TACC-ATCAGACACCGCAGCCCC-AACCCA-TCCTCCCTTG-TTC-CCCCA-T
100 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F_(-20) TACGGATCA--CACCAGCAACCCCA-CCCAACCCTCCCTTGCT-C--CCCAAT
101 *** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
102
103 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F_(-20) GC-AGCCACCACCTCCGAGCTTTGTTG-TCCCACCACCTTAATCA-CTAGTGA
104 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F_(-20) GC-AGCCACCACCTCCGAGCTTTGTTG-TCCCACCACCTTAATCA-CTAGTGA
105 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F_(-20) GC-AGCCACCACCTCCGAGCTTTGTTG-TCCCACCACCTTAATCA-CTAGTGA
106 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F_(-20) GC-AGCCACCACCTCCGAGCTTTGTTG-TCCCACCACCTTAATCA-CTAGTGA
107 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F_(-20) GC-AGCCACCACCTCCGAGCTTTGTTG-TCCCACCACCTTAATCA-CTAGTGA
108 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F_(-20) GC-AGCCACCACCTCCGAGCTTTGTTG-TCCCACCACCTTAATCA-CTAGTGA
109 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F_(-20) GC-AGCCACCACCTCCGAGCTTTGTTG-TCCCACCACCTTAATCA-CTAGTGA
110 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F_(-20) TC-ACCCGCCACCTCCGAGCTTTGTTG-TCCCACCACCTTAATCA-CCACTNA
111 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F_(-20) -CTGCCCGCCACCTCCTNCCTTTTTTGGTCC-ACNNCTTAATCAATCACT-A
112 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
113
114 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F_(-20) CGGCCGCTGCAGGTCGACCATA-T---G-G-GAGAG-CT-CCCAACGCGTTG
115 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F_(-20) CGGCCGCTGCAGGTCGACCATA-T---G-G-GAGAG-CT-CCCAACGCGTTG
116 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F_(-20) CGGCCGCTGCAGGTCGACCATA-T---G-G-GAGAG-CT-CCCAACGCGTTG
117 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F_(-20) CGGCCGCTGCAGGTCGACCATA-T---G-G-GAGAG-CT-CCCAACGCGTTG
118 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F_(-20) CGGCCGCTGCAGGTCGACCATA-T---G-G-GAGAG-CT-CCCAACGCGTTG
119 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F_(-20) CGGCCGCTGCAGGTCGACCATA-T---G-G-GAGAG-CT-CCCAACGCGTTG
120 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F_(-20) CGGCCGCTGCAGGTCGACCATA-T---G-G-GAGAG-CT-CCCAACGCGTTG
121 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F_(-20) CGGCCGCTGCTGGTCGTCACATA-TTATGAG-GACAC-CT-CCCAACG--TTG
122 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F_(-20) CG-CGGCTCGCCGGCGGCCA-ACT---GGGAGAGANACCACCCAN---TTG
123 ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
124
125 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F_(-20) AGC-TTGAGT-ATTCTA-T-AGTG-TCACCTA---AATAGCTTGGCGTAATCA
126 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F_(-20) AGC-TTGAGT-ATTCTA-T-AGTG-TCACCTA---AATAGCTTGGCGTAATCA
127 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F_(-20) AGC-TTGAGT-ATTCTA-T-AGTG-TCACCTA---AATAGCTTGGCGTAATCA
128 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F_(-20) AGC-TTGAGT-ATTCTA-T-AGTG-TCACCTA---AATAGCTTGGCGTAATCA
129 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F_(-20) AGC-TTGAGT-ATTCTA-T-AGTG-TCACCTA---AATAGCTTGGCGTAATCA
130 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F_(-20) AGC-TTGAGT-ATTCTA-T-AGTG-TCACCTA---AATAGCTTGGCGTAATCA
131 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F_(-20) AGC-TTGAGT-ATTCTA-T-AGTG-TCACCTA---AATAGCTTGGCGTAATCA
132 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F_(-20) AGC-TTGA-TGATTCTACT-A-TG-TCGCCCTACTTAATANGTTG---TAATCA
133 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F_(-20) -GCCTTGCTTAAT-CT-TTCA-TGGCC-CCCA---AATAACTTGGCGGAATTA
134 ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
135
136 1st_BASE_518338_LEC_2F_M13F_(-20) TAGCT-G-TTTTCTGAC---
137 1st_BASE_518334_LEC_2B_M13F_(-20) TAGCT-G-TTT-CCTGAC---
138 1st_BASE_518336_LEC_2D_M13F_(-20) TAGCT-G-TTTTCTG-----
139 1st_BASE_518337_LEC_2E_M13F_(-20) TAGCT-GGTTT-CCTGAC---
140 1st_BASE_518339_LEC_2H_M13F_(-20) TAGCT-GGTTT-CCTGAC---
141 1st_BASE_518333_LEC_2A_M13F_(-20) TAGCT-G-TTT-CCTGAC---
142 1st_BASE_518335_LEC_2C_M13F_(-20) TAGCT-G-TTT-CCTGAC---
143 1st_BASE_518341_LEC_2J_M13F_(-20) TAA-TAG-TTT-CCTGATG-A
144 1st_BASE_518340_LEC_2I_M13F_(-20) TAAAT-A-NTT-NCTGANGGA
145 ** * * * * *
146

```

ภาพผนวกที่ 8 (ต่อ)


```

1 CLUSTAL multiple sequence alignment
2
3
4 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) -GG-AAAAA--TCC-TATAGG-G--C-AA-T--T--GG----GC--CCG.
5 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 -GG-AAAAAA-TCC-TATAGG-G--C-AA-T--T--GG----GC--CCG.
6 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) -GG-AAAAAAATCC-TATAGG-G--C-GA-T--T--GG----GC--CCG.
7 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 GGG-AAAAAA-TCC-TATAGG-G--C-GA-T--T--GG----GC--CCG.
8 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 GGG-AAAAAC-TCC-TATAGG-G--C-GA-T--T--GG----GC--CCG.
9 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) GGGAAAAAAC-TCCCTATAGG-G--C-GA-T--T--GG----GC--CCG.
10 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 GGGGAAAAAC-TCCCTATAGG-G-GC-GA-T--T--GG----GC--CCG.
11 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 GGG-AAAAAC-TCC-TATAGG-G--C-GA-T--T--GG----GC--CCG.
12 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 NNN-NNNNN--TCN-NATAGG-G-GC-GAAT--T--GG----GC--CCG.
13 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) NNN-NNNNN-TTT-NANNNCNTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCA.
14
15
16 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) -----CTCCC---GGCCG-CC-AT-GGCGGCCGCGGGAATTCGATTAG
17 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 -----CTCCC---GGCCG-CC-AT-GGCGGCCGCGGGAATTCGATTAG
18 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) -----CTCCC---GGCCG-CC-AT-GGCGGCCGCGGGAATTCGATTAG
19 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 -----CTCCC---GGCCG-CC-AT-GGCGGCCGCGGGAATTCGATTAG
20 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 -----CTCCC---GGCCG-CC-AT-GGCGGCCGCGGGAATTCGATTAG
21 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) -----CTCCC---GGCCG-CC-AT-GGCGGCCGCGGGAATTCGATTAG
22 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 -----CTCCC---GGCCG-CC-AT-GGCGGCCGCGGGAATTCGATTAG
23 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 -----CTCCC---GGCCG-CC-AT-GGCGGCCGCGGGAATTCGATTAG
24 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 -----CTCCC---GGCCG-CC-AT-GGCGGCCGCGGGAATTCGATTAA
25 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) GAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCCGCGCG--AATTC-ACTAG
26
27
28 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) AGC--A-GGCAACAAAGATCTTTATCTTGGAA-CCTT-TAGCACGCAGG.
29 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 AGC--A-GGCAACAAAGATCTTTATCTTGGAA-CCTT-TAGCACGCAGG.
30 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) AGC--A-GGCAACAAAGATCTTTATCTTGGAA-CCTT-TAGCACGCAGG.
31 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 AGC--A-GGCAACAAAGATCTTTATCTTGGAA-CCTT-TAGCACGCAGG.
32 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 AGC--A-GGCAACAAAGATCTTTATCTTGGAA-CCTT-TAGCACGCAGG.
33 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) AGC--A-GGCAACAAAGATCTTTATCTTGGAA-CCTT-TAGCACGCAGG.
34 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 AGC--A-GGCAACAAAGATCTTTATCTTGGAA-CCTT-TAGCACGCAGG.
35 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 AGC--A-GGCAACAAAGATCTTTATCTTGGAA-CCTT-TAGCACGCAGG.
36 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 -GCC-A-AG-GACACA-ATCTT-ATTTTGGAA-CCTT-TCGTTCAGG.
37 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) TTCCTATGGTTTC-TA--TCTT-ATTTTGGAGGCTTCTTGCTC-T-GG
38
39
40 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) GCAG-AGGC--CT----ATGA-----CATT-GCAG-CA-ATTAAGT-T
41 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 GCAG-AGGC--CT----ATGA-----CATT-GCAG-CA-ATTAAGT-T
42 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) GCAG-AGGC--CT----ATGA-----CATT-GCAG-CA-ATTAAGT-T
43 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 GCAG-AGGC--CT----ATGA-----CATT-GCAG-CA-ATTAAGT-T
44 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 GCAG-AGGC--CT----ATGA-----CATT-GCAG-CA-ATTAAGT-T
45 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) GCAG-AGGC--CT----ATGA-----CATT-GCAG-CA-ATTAAGT-T
46 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 GCAG-AGGC--CT----ATGA-----CATT-GCAG-CA-ATTAAGT-T
47 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 GCAG-AGGC--CT----ATGA-----CATT-GCAG-CA-ATTAAGT-T
48 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 GTGG-AGGCATCT----CC-----CATC-GCCG-CA-CCT--GCCT.
49 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) GT-GCAATC-TCTTCCCATCTTCGCCTCATCGT-GTCATATTA--T-T
50
51
52 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) AATGCAGCGACAATTTTCGACATTAGCC-GCTAC-GATGTCAAGAGCAT.
53 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 AATGCAGTGCACAAATTTTCGACATTAGCC-GCTAC-GATGTCAAGAGCAT.
54 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) AATGCAGTGCACAAATTTTCGACATTAGCC-GCTAC-GATGTCAAGAGCAT.
55 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 AATGCAGTGCACAAATTTTCGACATTAGCC-GCTAC-GATGTCAAGAGCAT.
56 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 AATGCAGTGCACAAATTTTCGACATTAGCC-GCTAC-GATGTCAAGAGCAT.
57 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) AATGCAGTGCACAAATTTTCGACATTAGCC-GTTAC-GATGTCAAGAGCAT.
58 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 AATGCAGTGCACAAATTTTCGACATTAGCC-GCTAC-GATGTCAAGAGCAT.
59 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 AATGCAGTGCACAAATTTTCGACATTAGCC-GCTAC-GATGTCAAGAGCAT.
60 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 TTTGTAGTGTGCGCCTTTCGACATTGGCCTAAT-CTGG-GTCAGGATGT
61 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) --TG--G-G-CGGTTTTTAA-GTTTGCC-GCT-TTGGGGTCAACAGGAT.
62
63
64 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) AACCTCCCCATTG-GCG-GG-ATGACAGGCCGGCCCTCCAAGGCCACAG.
65 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 AACCTCCCCATTG-GCG-GG-ATGACAGGCCGGCCCTCCAAGGCCACAG.
66 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) AACCTCCCCATTG-GCG-GG-ATGACAGGCCGGCCCTCCAAGGCCACAG.
67 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 AACCTCCCCATTG-GCG-GG-ATGACAGGCCGGCCCTCCAAGGCCACAG.
68 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 AACCTCCCCATTG-GCG-GG-ATGACAGGCCGGCCCTCCAAGGCCACAG.
69 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) AACCTCCCCATTG-GCG-GG-ATGACAGGCCGGCCCTCCAAGGCCACAG.
70 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 AACCTCCCCATTG-GCG-GG-ATGACAGGCCGGCCCTCCAAGGCCACAG.
71 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 AACCTCCCCATTG-GCG-GG-ATGACAGGCCGGCCCTCCAAGGCCACAG.
72 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 AACCTCCCCATTGTGTG-G--ATGACAGGCCGGCCCTCCT-GGCC-CAG.
73 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) AACCTCG--GGTG-GTGTGACATGACAGGCCGGCCCTCTG-GGCCCTC.
74
75
76 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) ATCATCCTCATCTGACGCCA-TGACTGTGGAAGCCAAGCAGCT-GTTGG.

```

ภาพผนวกที่ 9 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *BBM* ทั้ง 10 โคลน

```

77 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 ATCATCCTCATCTGACGCCA-TGACTGTGGAAGCCAAGCAGCT-GTTGG.
78 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) ATCATCCTCATCTGACGCCA-TGACTGTGGAAGCCAAGCAGCT-GTTGG.
79 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 ATCATCCTCATCTGACGCCA-TGACTGTGGAAGCCAAGCAGCT-GTTGG.
80 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 ATCATCCTCATCTGACGCCA-TGACTGTGGAAGCCAAGCAGCT-GTTGG.
81 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) ATCATCCTCATCTGACGCCA-TGACTGTGGAAGCCAAGCAGCT-GTTGG.
82 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 ATCATCCTCATCTGACGCCA-TGACTGTGGAAGCCAAGCAGCT-GTTGG.
83 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 ATCATCCTCATCTGACGCCA-TGACTGTGGAAGCCAAGCAGCT-GTTGG.
84 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 ATCATCCTCATCTGACGCCA-TGACTGTGGAAGCCAAGCANCT-GTTGG.
85 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) ATCATCCTCATCTGG-GTTGCTGACTGTGGAAGCCAAGCA-CTTGTGG.
86 ***** * *****
87
88 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) CTCTCGGCCTCACTGGGTTTGTCTGCGCTCCCCATTAAGCAGC--ATCA
89 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 CCCTCGGCCTCACTGGGTTTGTCTGCGCTCCCCATTAAGCAGC--ATCA
90 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) CCCTCGGCCTCACTGGGTTTGTCTGCGCTCCCCATTAAGCAGC--ATCA
91 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 CCCTCGGCCTCACTGGGTTTGTCTGCGCTCCCCATTAAGCAGC--ATCA
92 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 CCCTCGGCCTCACTGGGTTTGTCTGCGCTCCCCATTAAGCAGC--ATCA
93 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) CCCTCGGCCTCACTGGGTTTGTCTGCGCTCCCCATTAAGCAGC--ATCA
94 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 CCCTCGGCCTCACTGGGTTTGTCTGCGCTCCCCATTAAGCAGC--ATCA
95 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 CCCTCGGCCTCACTGGGTTTGTCTGCGCTCCCCATTAAGCAGC--ATCA
96 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 CCCTCGGCCTCACTGGGTTTGTCTGCGCTCCCCATTA-GCTCCC-ACCA
97 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) CCCTCGGTGTT-CTTGGGTTTGTCTGCGCTCCCCATT--GCTCCCATCA
98 * * * * *
99
100 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) CCTTGTTTGCACTCCAACAG-CA-GCAGCAG-C-AGCAGCAGCAGCAAA
101 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 CCTTGTTTGCACTCCAACAG-CA-GCAGCAG-C-AGCAGCAGCAGCAAA
102 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) CCTTGTTTGCACTCCAACAG-CA-GCAGCAG-C-AGCAGCAGCAGCAAA
103 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 CCTTGTTTGCACTCCAACAG-CA-GCAGCAG-C-AGCAGCAGCAGCAAA
104 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 CCTTGTTTGCACTCCAACAG-CA-GCAGCAG-C-AGCAGCAGCAGCAAA
105 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) CCTTGTTTGCACTCCAACAG-CA-GCAGCAG-C-AGCAGCAGCAGCAAA
106 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 CCTTGTTTGCACTCCAACAG-CA-GCAGCAG-C-AGCAGCAGCAGCAAA
107 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 CCTTGTTTGCACTCCAACAG-CA-GCAGCAG-C-AGCAGCAGCAGCAAA
108 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 CCTTGTTTGCTCTCCAACAG-CA-GCAA-AATC-AACAGCAACACCAAA
109 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) CCTTGTTCGCACTC-AGCTGTCAAG-A--AATCCATCATACCCCCAAA
110 ***** * * * * *
111
112 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) TCAGGGTTC-G--GTCTCTTCTCCTCTGGTGTGACTATGGATTTCTCTA
113 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 TCAGGGTTC-G--GTCTCTTCTCCTCTGGTGTGACTATGGATTTCTCTA
114 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) TCAGGGTTC-G--GTCTCTTCTCCTCTGGTGTGACTATGGATTTCTCTA
115 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 TCAGGGTTC-G--GTCTCTTCTCCTCTGGTGTGACTATGGATTTCTCTA
116 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 TCAGGGTTC-G--GTCTCTTCTCCTCTGGTGTGACTATGGATTTCTCTA
117 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) TCAGGGTTC-G--GTCTCTTCTCCTCTGGTGTGACTATGGATTTCTCTA
118 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 TCAGGGTTC-G--GTCTCTTCTCCTCTGGTGTGACTATGGATTTCTCTA
119 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 TCAGGGTTC-G--GTCTCTTCTCCTCTGGTGTGACTATGGATTTCTCTA
120 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 TCAGGGTTC-G--GTCTCTTCTCCTCTGGTGTGACTATGGATTTCTCTA
121 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) TCA---CCCTGAAGTCTCTTCTCCTCTGGTGTG-CTATGGATTTCTCTA
122 *** * * *****
123
124 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) GGTGTTATAAGCCAAGGGTGTGGGGGAGCCTTGTGTG-GAACGGTGGT
125 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 GGTGTTATAAGCCAAGGGTGTGGGGGAGCCTTGTGTG-GAACGGTGGT
126 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) GGTGTTATAAGCCAAGGGTGTGGGGGAGCCTTGTGTG-GAACGGTGGT
127 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 GGTGTTATAAGCCAAGGGTGTGGGGGAGCCTTGTGTG-GAACGGTGGT
128 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 GGTGTTATAAGCCAAGGGTGTGGGGGAGCCTTGTGTG-GAACGGTGGT
129 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) GGTGTTATAAGCCAAGGGTGTGGGGGAGCCTTGTGTG-GAACGGTGGT
130 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 GGTGTTATAAGCCAAGGGTGTGGGGGAGCCTTGTGTG-GAACGGTGGT
131 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 GGTGTTATAAGCCAAGGGTGTGGGGGAGCCTTGTGTG-GAACGGTGGT
132 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 GGTGCTATAAGCCAAGGGTGTGGGGGAGCCTTGGGTG-AAACGGTGGT
133 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) GGTGCTATGACCCAAGGGTGTGGGGGAGCCTTGTGTGAGAACAGTGGT
134 ***** * * * * *
135
136 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) GCAGCAAG-AG-CAATCACAG---AACA-ATAGTGCCTCTTCTATACCG
137 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 GCAGCAAG-AG-CAATCACAG---AACA-ATAGTGCCTCTTCTATACCG
138 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) GCAGCAAG-AG-CAATCACAG---AACA-ATAGTGCCTCTTCTATACCG
139 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 GCAGCAAG-AG-CAATCACAG---AACA-ATAGTGCCTCTTCTATACCG
140 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 GCAGCAAG-AG-CAATCACAG---AACA-ATAGTGCCTCTTCTATACCG
141 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) GCAGCAAG-AG-CAATCACAG---AACA-ATAGTGCCTCTTCTATACCG
142 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 GCAGCAAG-AG-CAATCACAG---AACA-ATAGTGCCTCTTCTATACCG
143 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 GCAGCAAG-AG-CAATCACAG---AACA-ATAGTGCCTCTTCTATACCG
144 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 GCAG-AG-GATCCATCCCAG---AACA-CTACTTGCCTCTTCTATACCG
145 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) GC-G-AGGGAG-CAATCAC-GTCCAACATCT--TTGCTCTTCTATACCG
146 * * * * *
147
148 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) TATTGCATT--TGGAGGAATTACGAG-GGCTCCAGCTATGTGGGGGAGC
149 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 TATTGCATT--TGGAGGAATTACGAG-GGCTCCAGCTATGTGGGGGAGC
150 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) TATTGCATT--TGGAGGAATTACGAG-GGCTCCAGCTATGTGGGGGAGC
151 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 TATTGCATT--TGGAGGAATTACGAG-GGCTCCAGCTATGTGGGGGAGC
152 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 TATTGCATT--TGGAGGAATTACGAG-GGCTCCAGCTATGTGGGGGAGC

```

ภาพผนวกที่ 9 (ต่อ)

```

153 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) TATTGCACT--TGGAGGGAATTACGAG-GGCTCCAGCTATGTGGGGAGC
154 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 TATTGCATT--TGGAGGGAGTTACGAG-GGCTCCAGCTATGTGGGGAGC
155 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 TATTGCATT--TGGAGGGAATTACGAG-GGCTCCAGCTATGTGGGGAGC
156 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 TATTGCATT--TATAGGGAATTACGAG-GGCTCCTGCTATGTGGGGAGG
157 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) AATTGGA-TGATG-ACGGAATTACT-GTGGCTCCNGCTATGTGGGGAGC
158 ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
159
160 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) CCAC-CCCCCTCTTACTACCACGAACCTGCCAAGC-CCAATGTGGCAGT
161 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 CCAC-CCCCCTCTTACTACCACGAACCTGCCAAGC-CCAATGTGGCAGT
162 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) CCAC-CCCCCTCTTACTACCACGAACCTGCCAAGC-CCAATGTGGCAGT
163 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 CCAC-CCCCCTCTTACTACCACGAACCTGCCAAGC-CCAATGTGGCAGT
164 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 CCAC-CCCCCTCTTACTACCACGAACCTGCCAAGC-CCAATGTGGCAGT
165 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) CCAC-CCCCCTCTTACTACCACGAACCTGCCAAGC-CCAATGTGGCAGT
166 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 CCAC-CCCCCTCTTACTACCACGAACCTGCCAAGC-CCAATGTGGCAGT
167 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 CCAC-CCCCCTCTTACTACCACGAACCTGCCAAGC-CCAATGTGGCAGT
168 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 CCAC-GCCCATCTTACTACCGCNAATCTGCTAAGCATCA-TGTGGCATT
169 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) N-ATGCCCCCTCTGACTACCCTAACCTCCCGAGC-TCANTGTGGCANT
170 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
171
172 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) CCCATCT-TTG-GAATGG-AATGATATGGATGGGTGG-GAAGGTG-AG-
173 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 CCCATCT-TTG-GAATGG-AATGATATGGATGGG-GG-GAAGGTG-AG-
174 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) CCCATCT-TTG-GAATGG-AATGATATGGATGGG-GG-GAAGGTG-AG-
175 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 CCCATCT-TTG-GAATGG-AATGATATGGATGGG-GG-GAAGGTG-AG-
176 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 CCCATCT-TTG-GAATGG-AATGATATGGATGGG-GG-GAAGGTG-AG-
177 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) CCCATCT-TTG-GAATGG-AATGATATGGATGGGTGG-GAAGGTG-AG-
178 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 CCCATCT-TTG-GAATGG-AATGATATGGATGGGTGG-GAAGGTG-AG-
179 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 CCCATCT-TTG-GAATGG-AATGATATGGATGGGTGG-GAAGGTG-AG-
180 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 TFCATCT-T-GCNAATAG-ACTGATATGCATGNTTGC-NANNNTG-AG-
181 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) CCCATCTGT-G-TAAT-GCAATGATATGTATGT-TGCTGAAG-TGGAGT
182 ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
183
184 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) -ACT-TGCTTGCGAGAGA-GAAAGAGAGAGTC-AAAAGTGAGATAG-AGA
185 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 -ACT-TGCTTGCGAGAGA-GAAAGAGAGAGTC-AAAAGTGAGATAG-AGA
186 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) -ACT-TGCTTGCGAGAGA-GAAAGAGAGAGTC-AAAAGTGAGATAG-AGA
187 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 -ACT-TGCTTGCGAGAGA-GAAAGAGAGAGTC-AAAAGTGAGATAG-AGA
188 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 -ACT-TGCTTGCGAGAGA-GAAAGAGAGAGTC-AAAAGTGAGATAG-AGA
189 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) -ACT-TGCTTGCGAGAGA-GAAAGAGAGAGTC-AAAAGTGAGATAG-AGA
190 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 -ACT-TGCTTGCGAGAGA-GAAAGAGAGAGTC-AAAAGTGAGATAG-AGA
191 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 -ACT-TGCTTGCGAGAGA-GAAAGAGAGAGTC-AAAAGTGAGATAG-AGA
192 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 TGCT--GCNTGTTGAGA-GAAAGAGAGGGTCCAAGAN--AGATATCATA
193 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) T-TTCT-CTT-CNNNNNTGCA-GANAGATTC-AAAATTAAGATCT-ANA
194 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
195
196 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) GATGAATCACTAGTGAATTC-GC-GGCC-GCCT-GCAGGTCGACCATAT
197 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 GATGAATCACTAGTGAATTC-GC-GGCC-GCCT-GCAGGTCGACCATAT
198 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) GATGAATCACTAGTGAATTC-GC-GGCC-GCCT-GCAGGTCGACCATAT
199 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 GATGAATCACTAGTGAATTC-GC-GGCC-GCCT-GCAGGTCGACCATAT
200 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 GATGAATCACTAGTGAATTC-GC-GGCC-GCCT-GCAGGTCGACCATAT
201 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) GATGAATCACTAGTGAATTC-GC-GGCC-GCCT-GCAGGTCGACCATAT
202 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 GATGAATCACTAGTGAATTC-GC-GGCC-GCCT-GCAGGTCGACCATAT
203 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 GATGAATCACTAGTGAATTC-GC-GGCC-GCCT-GCAGGTCGACCATAT
204 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 GACGAATCACTAGTGAATTC-GC-GGCCCGCCT-GCAGGTCGAACCATAN
205 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) GATNAATN-C-A---AATTCNCCCGGCC-GCCTTGNNGG-CN-----
206 ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
207
208 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) CCAACCGGTTGGATGCATAGCTTGA-GTATTCTA-TA-GTG--TC--AC
209 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 CCAACCGGTTGGATGCATAGCTTGA-GTATTCTA-TA-GTG--TC--AC
210 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) CCAACCGGTTGGATGCATAGCTTGA-GTATTCTA-TA-GTG--TC--AC
211 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 CCAACCGGTTGGATGCATAGCTTGA-GTATTCTA-TA-GTG--TC--AC
212 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 CCAACCGGTTGGATGCATAGCTTGA-GTATTCTA-TA-GTG--TC--AC
213 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) CCAACCGGTTGGATGCATAGCTTGA-GTATTCTA-TA-GTG--TC--AC
214 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 CCAACCGGTTGGATGCATAGCTTGA-GTATTCTA-TA-GTG--TC--AC
215 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 CCAACCGGTTGGATGCATAGCTTGA-GTATTCTA-TA-GTG--TC--AC
216 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 CNA-CGCGTNN-ATGNNAGCTTGAANTATNCTAANN-NNG--TC-CAN
217 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24) CCGACN--TCNGNCCA-AATTCGN-CC-CT-TA-TAANTGAGTCGAT
218 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
219
220 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20) GCTTGGC-GT-AATC-ATGG-TCATA---G-----CTGGTTTCCT---G
221 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1 GCTTGGC-GT-AATC-ATGG-TCATA---G-----CTGGTTTCCT---G
222 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20) GCTTGGC-GT-AATC-ATGG-TCATA---G-----CTGGTTTCCT---G
223 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1 GCTTGGC-GT-AATC-ATGG-TCATA---G-----CTGGTTTCCT---G
224 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1 GCTTGGC-GT-AATC-ATGG-TCATA---G-----CTGGTTTCCT---G
225 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20) GCTTGGC-GT-AATC-ATGG-TCATACTGGTTT-CC-----T---G
226 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1 GCTTGGC-GT-AATC-ATGG-TCATA---G-----CTGGTTTCCT---G
227 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1 GCTTGGC-GT-AATC-ATGG-TCATA---G-----CTGGTTTCCT---G
228 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1 GONTGGCCGT-AANNCATGGNNNNA---NAN---CTGGTTTCCT---N

```

ภาพผนวกที่ 9 (ต่อ)

```

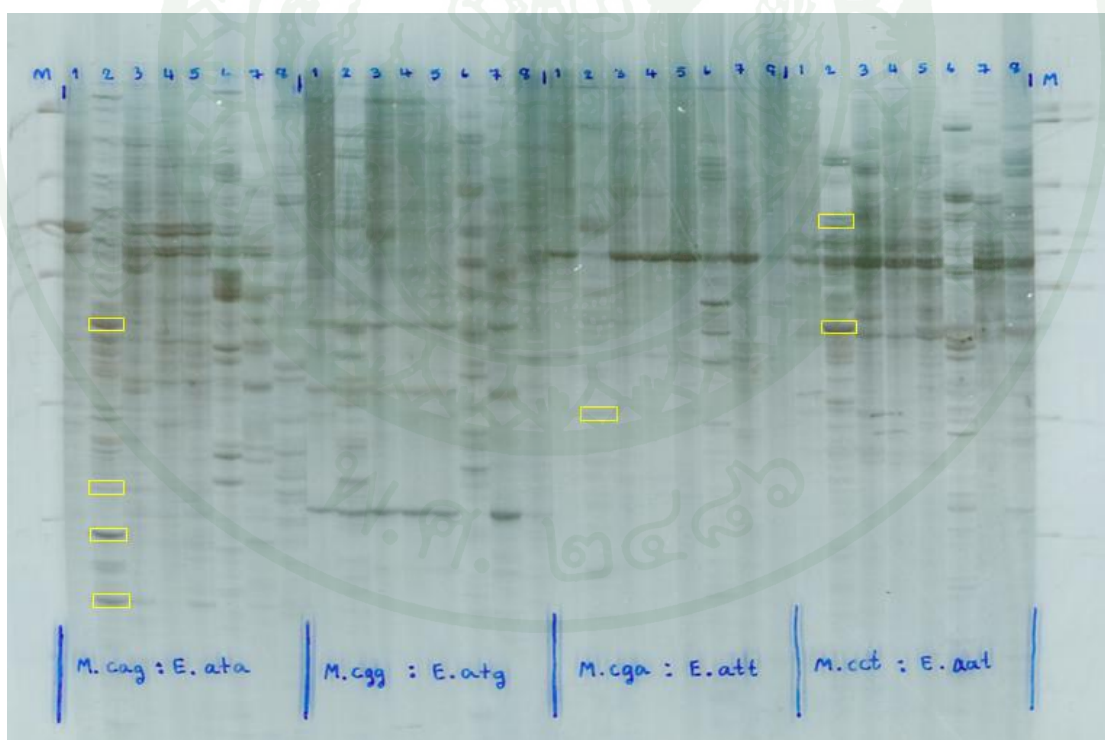
229 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24)      -CT-GGC-NNCGNT---T---TTACA---N---C-----G
230                                          *   ***           *           *
231
232 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20)        TGGGGAAGGAAAAAAAAANANN-----ANNN-----
233 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1    T-----TT-----CCT-----
234 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20).ab1    NCT-----AATT-----CNNTAAA
235 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1    T-----TT-----CCG-----
236 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1    T-----TT-----CCT-----
237 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20).ab1    N-----NNGGNGGGGAGGAAAAAGANN-----
238 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1    T-----TT-----CCT-----
239 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1    T-----TT-----CCT-----
240 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1    T-----TN-----NNN-----
241 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24)        T-----CGT-----
242
243
244 1st_BASE_518360_BBM_1J_M13F_(-20)        --N-----AN-
245 1st_BASE_518350_BBM_1E_M13F_(-20).ab1    --G-----
246 1st_BASE_518356_BBM_1H_M13F_(-20).ab1    AAGGGGGGTGGGGGGCCAGG
247 1st_BASE_518348_BBM_1D_M13F_(-20).ab1    --G-----
248 1st_BASE_518354_BBM_1G_M13F_(-20).ab1    --G-----A-
249 1st_BASE_518352_BBM_1F_M13F_(-20).ab1    --G-----N-
250 1st_BASE_518346_BBM_1C_M13F_(-20).ab1    --G-----
251 1st_BASE_518344_BBM_1B_M13F_(-20).ab1    --G-----G-
252 1st_BASE_518342_BBM_1A_M13F_(-20).ab1    --G-----AAN
253 1st_BASE_518343_BBM_1A_M13R_(-24)        --G-----A-C
254
255

```

ภาพผนวกที่ 9 (ต่อ)



ภาพผนวกที่ 10 ภาพเปรียบเทียบระหว่าง non embryogenic (ฝั่งซ้าย) และ embryogenic (ฝั่งขวา)



ภาพผนวกที่ 11 แสดงบริเวณแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณ ด้วยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ ชั้น Selective DNA amplification ในระยะพัฒนาต้นอ่อนของปาล์ม น้ำมันทั้ง 5 ระยะรวมทั้งดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและใบ โดยใช้เทคนิค AFLP

ตารางผนวกที่ 1 แสดงผลข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่ได้จาก cDNA AFLP

ชื่อ	ผลการเปรียบเทียบ (BlastN)	ค่า E-value	รหัสฐานข้อมูล NCBI
E-ATA + M-CAG : 600 bp (A2_1)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 600 bp (A2_2)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 600 bp (A2_3)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 600 bp (A2_4)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 600 bp (A2_5)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 600 bp (A2_6)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 600 bp (A2_7)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 600 bp (A2_8)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 600 bp (A2_9)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 600 bp (A2_10)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A3_1)	Homo sapiens chromosome 18, clone RP11-680N20, complete sequence	8e-76	AC100845.2
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A3_2)	Homo sapiens chromosome 4 clone B203C23 map 4q25, complete sequence	2e-114	AC004049.1
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A3_3)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A3_4)	Homo sapiens chromosome 18, clone RP11-680N20, complete sequence	3e-103	AC100845.2
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A3_5)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A3_6)	Homo sapiens BAC clone RP11-339D8 from 2, complete sequence	2e-114	AC017053.8
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A3_7)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A3_8)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A3_9)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A3_10)	Homo sapiens BAC clone RP11-339D8 from 2, complete sequence	5e-114	AC017053.8
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A4_1)	No hit	-	-

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ชื่อ	ผลการเปรียบเทียบ (BlastN)	ค่า E-value	รหัสฐานข้อมูล NCBI
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A4_2)	Human DNA sequence from clone RP5-907A6 on chromosome 1, complete	2e-98	AL589702.8
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A4_3)	Human DNA sequence from clone RP5-907A6 on chromosome 1, complete	2e-98	AL589702.8
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A4_4)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A4_5)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A_6)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A4_7)	Human DNA sequence from clone RP5-907A6 on chromosome 1, complete sequence	3e-98	AL589702.8
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A4_8)	Zea mays clone 321657 hypothetical protein mRNA, complete cds	3e-53	EU968512.1
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A4_9)	No hit	-	-
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A4_10)	Human DNA sequence from clone RP5-907A6 on chromosome 1, complete sequence	5e-100	AL589702.8
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A5_1)	Amborella trichopoda 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	5e-80	AY095449.1
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A5_2)	Magnolia denudata 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	4e-81	AF389256.1
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A5_3)	Amborella trichopoda 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	5e-80	AY095449.1
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A5_4)	Amborella trichopoda 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	5e-80	AY095449.1
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A5_5)	Amborella trichopoda 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1e-81	AY095449.1
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A5_6)	Amborella trichopoda 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1e-76	AY095449.1

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ชื่อ	ผลการเปรียบเทียบ (BlastN)	ค่า E-value	รหัสฐานข้อมูล NCBI
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A5_7)	Amborella trichopoda 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	4e-81	AY095449.1
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A5_8)	Amborella trichopoda 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1e-81	AY095449.1
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A5_9)	Amborella trichopoda 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1e-81	AY095449.1
E-ATA + M-CAG : 500 bp (A5_10)	Amborella trichopoda 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	5e-80	AY095449.1
E-ATT + M-CGA : 500 bp (A11_1)	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), RefSeqGene	2e-135	NG_012449.1
E-ATT + M-CGA : 500 bp (A11_2)	Amborella trichopoda 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	3e-83	AY095449.1
E-ATT + M-CGA : 500 bp (A11_3)	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), RefSeqGene	9e-134	NG012449.1
E-ATT + M-CGA : 500 bp (A11_4)	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), RefSeqGene	4e-132	NG_012449.1
E-ATT + M-CGA : 500 bp (A11_5)	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), RefSeqGene	2e-61	NG_012449.1
E-ATT + M-CGA : 500 bp (A11_6)	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), RefSeqGene	4e-132	NG_012449.1
E-ATT + M-CGA : 500 bp (A11_7)	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), RefSeqGene	2e-135	NG_012449.1
E-ATT + M-CGA : 500 bp (A11_8)	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), RefSeqGene	9e-134	NG_012449.1
E-ATT + M-CGA : 500 bp (A11_9)	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), RefSeqGene	2e-135	NG_012449.1
E-ATT + M-CGA : 500 bp (A11_10)	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), RefSeqGene	2e-130	NG_012449.1
E-AAT + M-CCT : 700 bp (A12.2_1)	Homo sapiens chromosome 3 clone RP11-21D1, complete sequence	0.0	AC124153.2

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ชื่อ	ผลการเปรียบเทียบ (BlastN)	ค่า E-value	รหัสฐานข้อมูล NCBI
E-AAT + M-CCT : 700 bp (A12.2_2)	No hit		
E-AAT + M-CCT : 700 bp (A12.2_3)	Amborella trichopoda 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1e-81	AY095449.1
E-AAT + M-CCT : 700 bp (A12.2_4)	No hit	-	-
E-AAT + M-CCT : 700 bp (A12.2_5)	No hit	-	-
E-AAT + M-CCT : 700 bp (A12.2_6)	Homo sapiens chromosome 15 clone RP11-96O20 map 15q21.1, complete	0.0	AC090527.3, AC090527
E-AAT + M-CCT : 700 bp (A12.2_7)	Human DNA sequence from clone RP11-138L24 on chromosome 9, complete	0.0	AL450312.10
E-AAT + M-CCT : 700 bp (A12.2_8)	Amborella trichopoda 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	2e-83	AY095449.1
E-AAT + M-CCT : 700 bp (A12.2_9)	Homo sapiens chromosome 15 clone RP11-96O20 map 15q21.1, complete	0.0	AC090527.3, AC090527
E-AAT + M-CCT : 700 bp (A12.2_10)	Human DNA sequence from clone RP11-138L24 on chromosome 9, Complete	0.0	AL450312.10
E-AAT + M-CCT : 650 bp (A13_7)	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 11q, clone:RP11-25P2, complete	5e-137	AP003719.3
E-AAT + M-CCT : 650 bp (A13_8)	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 11q, clone:RP11-25P2, complete	1e-138	AP003719.3
E-AAT + M-CCT : 650 bp (A13_9)	No hit	-	-
E-AAT + M-CCT : 650 bp (A13_10)	Homo sapiens chromosome 7 clone RP11-183I20, complete sequence	6e-167	AC083867.7
E-AAT + M-CCT : 600 bp (A14_1)	Homo sapiens dachshund homolog 2 (Drosophila) (DACH2), RefSeqGene	2e-135	NG_012817.1
E-AAT + M-CCT : 600 bp (A14_2)	Homo sapiens FOSMID clone ABC9-46183400C19 , chromosome 8	9e-139	AC207075.3

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ชื่อ	ผลการเปรียบเทียบ (BlastN)	ค่า E-value	รหัสฐานข้อมูล NCBI
E-AAT + M-CCT : 600 bp (A14_3)	Human DNA sequence from clone RP1-232K4 on chromosome 6p22.3 Contains the 3'end of the JMJ gene for jumonji protein and 2 CpG islands, complete sequence	2e-136	AL021938.1
E-AAT + M-CCT : 600 bp (A14_4)	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 11q, clone:RP11-25P2, complete	7e-135	AP003719.3
E-AAT + M-CCT : 600 bp (A14_5)	No hit	-	-
E-AAT + M-CCT : 600 bp (A14_6)	Human DNA sequence from clone RP11-352K16 on chromosome 6, Complete	3e-139	AL603648.3
E-AAT + M-CCT : 600 bp (A14_7)	Poncirus trifoliata citrus tristeza virus resistance gene locus,	3e-24	AF506028.1
E-AAT + M-CCT : 600 bp (A14_8)	Poncirus trifoliata citrus tristeza virus resistance gene locus,	3e-24	AF506028.1
E-AAT + M-CCT : 600 bp (A14_9)	No hit	-	-
E-AAT + M-CCT : 600 bp (A14_10)	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 11q, clone:RP11-25P2, complete	7e-135	AP003719.3

ตารางผนวกที่ 2 แสดงลำดับเบสของ AFLP ไพร์เมอร์

MseI				EcoRI			
AAA	AAT	AAC	AAG	AAA	AAT	AAC	AAG
ATA	ATT	ATC	ATG	ATA	ATT	ATC	ATG
ACA	ACT	ACC	ACG	ACA	ACT	ACC	ACG
AGA	AGT	AGC	AGG	AGA	AGT	AGC	AGG
TAA	TAT	TAC	TAG	TAA	TAT	TAC	TAG
TTA	TTT	TTC	TTG	TTA	TTT	TTC	TTG
TCA	TCT	TCC	TCG	TCA	TCT	TCC	TCG
TGA	TGT	TGC	TGG	TGA	TGT	TGC	TGG
CAA	CAT	CAC	CAG	CAA	CAT	CAC	CAG
CTA	CTT	CTC	CTG	CTA	CTT	CTC	CTG
CCA	CCT	CCC	CGC	CCA	CCT	CCC	CGC
CGA	CGT	CGC	CGG	CGA	CGT	CGC	CGG
GAA	GAT	GAC	GAG	GAA	GAT	GAC	GAG
GTA	GTT	GTC	GTG	GTA	GTT	GTC	GTG
GCA	GCT	GCC	GCG	GCA	GCT	GCC	GCG
GGA	GGT	GGC	GGG	GGA	GGT	GGC	GGG

หมายเหตุ ตัวอักษรสีแดง คือ ไพร์เมอร์ที่เลือกใช้

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวอมอร รุ่งแจ้งสุวรรณ
เกิดวันที่ 23 ธันวาคม 2528
สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร
ประวัติการศึกษา วท.บ. (วิทยาศาสตร์การประมง) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ตำแหน่งปัจจุบัน -
สถานที่ทำงานปัจจุบัน -
ผลงานดีเด่นและ/รางวัลทางวิชาการ -
ทุนการศึกษาที่ได้รับ -