รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม

โครงการวิจัยการตรวจสอบพันธุกรรมมะพร้าวไทยและต่างประเทศ

Genetic identification of Thai and Foreign coconuts

วิภาวี ชั้นโรจน์ ภรณี สว่างศรี อรุโณทัย ซาววา ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ วรารัตน์ ศรีประพัฒน์

มัลลิกา แก้ววิเศษ วิไลวรรณ ทวิชศรี สุภาภรณ์ สาชาติ ทิพยา ไกรทอง พรพยุง คงสุวรรณ

พิทวัฒน์ อ่อนทองหลาง ณัฐภูมิ รัตนพันธุ์ กณิศ ชัยทับ

สนับสนุนโดย

เงินรายได้จากการดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ตุลาคม 2566

สารบัญ

บทคัดย่อ	1
คำนำ	2
วิธีดำเนินการ	6
ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง	14
สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ	53
การนำไปใช้ประโยชน์	58
คำขอบคุณ	58
เอกสารอ้างอิง	59

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 58 คู่ และอุณหภูมิ annealing temperature (Ta) ที่ใช้กับตัวอย่างมะพร้าว	9
ตารางที่ 2	ความเข้มข้นและปริมาตรสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR	11
ตารางที่ 3	การตั้งโปรแกรมในปฏิกิริยา PCR	11
ตารางที่ 4	รหัสตัวอย่างและสถานที่รวบรวมมะพร้าวไทยต้นสูง	15
ตารางที่ 5	รหัสตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง แหล่งรวบรวม และข้อมูลการนำเข้า จำนวน 48 ตัวอย่าง	20
ตารางที่ 6	เครื่องหมาย SSR จำนวนแอลลีล ขนาดของแอลลีล และค่าประสิทธิภาพของไพรเมอร์ (PIC) โดยการวิเคราะห์ในมะพร้าวต้นสูง 12 ตัวอย่าง	22
ตารางที่ 7	เครื่องหมาย SSR 15 เครื่องหมาย จำนวนแอลลีล (NA) จำนวนจีโนไทป์ (GN) ค่าความหลากหลายของยีน (GD) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี้ (H) และ ค่าประสิทธิภาพของเครื่องหมาย (PIC) โดยการวิเคราะห์ในมะพร้าวต้นสูง 240 ตัวอย่าง	23
ตารางที่ 8	ประเภทและจำนวนเครื่องหมาย indel และเครื่องหมาย SNP จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค GBS ในตัวอย่างมะพร้าวสูง 240 ตัวอย่าง	25
ตารางที่ 9	แอลลีลของเครื่องหมาย SNP (Alleles) ตำแหน่งบนโครโมโซมหรือ scaffold (Chromosome/Scaffold) จีโนไทป์สำหรับการจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง (Indonesia & Vietnam) และ จีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูง (Thailand)	34
ตารางที่ 10	ลำดับตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศ (Sample No.) เครื่องหมาย SNP (SNP marker) ลำดับเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง (SNP No.) แอลลีล (Alleles) จีโนไทป์สำหรับการจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง (Indonesia & Vietnam) และ จีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูง (Thailand)	46
ตารางที่ 11	ลำดับตัวอย่างมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง (Sample No.) เครื่องหมาย SNP (SNP marker) ลำดับเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง (SNP No.) แอลลีล (Alleles) จีโนไทป์สำหรับการจำแนกมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง (Indonesia) และ จีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูง (Thailand)	49

สารบัญตาราง

ตารางที่ 12 ลำดับตัวอย่างมะพร้าวเวียดนามต้นสูง (Sample No.) เครื่องหมาย SNP (SNP marker) ลำดับเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวเวียดนามต้นสูง (SNP No.) แอลลีล (Alleles) จีโนไทป์สำหรับการจำแนกมะพร้าวเวียดนามต้นสูง (Indonesia & Vietnam) และ จีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูง (Thailand) 52

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	ผลมะพร้าวแก่ปอกเปลือกนำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน 5 ตัวอย่าง	2
ภาพที่ 2	ตัวอย่างเอมบริโอมะพร้าว	8
ภาพที่ 3	ขั้นตอนการค้นหาเครื่องหมาย SNP ในตัวอย่างมะพร้าวต้นสูงด้วยเทคนิค Genotyping-By-Sequencing (GBS)	12
ภาพที่ 4	การสำรวจและเก็บรวบรวมมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง	14
ภาพที่ 5	การสำรวจและเก็บรวบรวมมะพร้าวทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 192 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง จากประเทศเวียดนาม 26 ตัวอย่าง และประเทศอินโดนีเซีย 22 ตัวอย่าง	20
ภาพที่ 6	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยต้นสูง 192 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 48 ตัวอย่าง ประกอบด้วย เวียดนาม 26 ตัวอย่าง และอินโดนีเซีย 22 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 15 เครื่องหมาย	28
ภาพที่ 7	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยต้นสูง 192 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 48 ตัวอย่าง ประกอบด้วย เวียดนาม 26 ตัวอย่าง (สีเหลือง) และอินโดนีเซีย 22 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SNP จำนวน 3,532 เครื่องหมาย	32
ภาพที่ 8	ขั้นตอนการจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงโดยใช้เครื่องหมาย SNP	56

โครงการวิจัยการตรวจสอบพันธุกรรมมะพร้าวไทยและต่างประเทศ

Genetic identification of Thai and Foreign coconuta

วิภาวี ชั้นโรจน์[1] ภรณี สว่างศรี[1] อรุโณทัย ซาววา[1] ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์[1] วรารัตน์ ศรีประพัฒน์[1] มัลลิกา แก้ววิเศษ[1] วิไลวรรณ ทวิชศรี[2] สุภาภรณ์ สาชาติ[2] ทิพยา ไกรทอง[2] พรพยุง คงสุวรรณ[2] พิทวัฒน์ อ่อนทองหลาง[4] ณัฐภูมิ รัตนพันธุ์[3] กณิศ ชัยทับ[3]

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจจำแนกมะพร้าวต้นสูงของไทยและต่างประเทศโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ได้รวบรวมตัวอย่างมะพร้าวไทย 192 ตัวอย่าง และมะพร้าวนำเข้าจากประเทศเวียดนามและอินโดนีเซีย รวม 48 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 15 คู่ พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างมะพร้าวของไทยและต่างประเทศได้ จากนั้นทำการค้นหาเครื่องหมาย SNP โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ด้วยเทคนิค Genotyping-By-Sequencing (GBS) พบ SNP กระจายตัวทั่วจีโนม จำนวน 110,157 ตำแหน่ง คัดเลือก 3,532 ตำแหน่ง สำหรับใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะพร้าวทั้งหมด พบว่าประชากรมะพร้าวนี้ มีระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่าง 0.001 ถึง 0.070 ค่าเฉลี่ย 0.013 หรือแสดงว่าประชากรมะพร้าวที่ศึกษามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันมาก ผลการวิเคราะห์จัดกลุ่ม (cluster analysis) ด้วยวิธี neighbor-joining พบว่ามะพร้าวทั้งหมด สามารถจัดกลุ่มที่ต่างกันได้ 5 กลุ่ม และในทุกกลุ่มมีตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศร่วมอยู่ด้วย จากนั้นวิเคราะห์ principle coordinate analysis (PCoA) พบว่าไม่สามารถแยกจีโนไทป์ของมะพร้าวที่ศึกษาออกเป็นกลุ่มย่อย (subgroup) ได้ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างมะพร้าวต้นสูงของไทย เวียดนามและอินโดนีเซีย เป็นกลุ่มประชากรที่มีบรรพบุรุษ (ancestor) ร่วมกัน นอกจากนั้นได้คัดเลือก SNP ที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่าง (polymorphism) ของมะพร้าวต่างประเทศออกจากมะพร้าวไทยได้ดี จำนวน 347 ตำแหน่ง ในจำนวนนี้สามารถเลือก SNP จำนวน 17 ตำแหน่งที่มีประสิทธิภาพสูงสุด สำหรับใช้จำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงออกจากกันได้ โดยแบ่ง SNP นี้ออกเป็น 3 ชุด ประกอบด้วย ชุดเครื่องหมายหลัก 6 เครื่องหมาย ที่สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้ 62.5% ของมะพร้าวทั้งหมดออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง ได้แก่ SNP ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ A/G, G/A, G/A, C/T, C/G และ C/T ที่ตำแหน่ง VOII01062633.103, VOII01006507.39482, CM017887.8194831, VOII01000447.139559, CM017872.79752924 และ CM017876.49130428 ตามลำดับ ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 2 มี 6 เครื่องหมาย ที่สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้ 29.2% ของมะพร้าวทั้งหมด ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง ได้แก่ SNP ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ C/T, G/T, G/A, C/T, A/G และ A/C ที่ตำแหน่ง CM017875.1452347, VOII01000282.273156, CM017873.20056828, CM017879.42761423, CM017877.81328843 และVOII01000282.822647 ตามลำดับ ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 3 มี 5 เครื่องหมาย ที่สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้ 8.3% ของมะพร้าวทั้งหมด ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง ได้แก่ SNP ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ C/T, C/T, C/T, G/C และ G/A ที่ตำแหน่ง VOII01005399.23895, VOII01001019.1641, CM017882.25370686, CM017876.53111902 และ CM017875.5125425 ตามลำดับ นอกจากนั้นกรณีที่ต้องสงสัยว่าตัวอย่างมะพร้าวมีแหล่งที่มาจากประเทศอินโดนีเซีย การทดลองนี้ได้ออกแบบเครื่องหมายสำหรับตรวจพิสูจน์ รวม 7 เครื่องหมาย แบ่งเป็น ชุดเครื่องหมายหลัก จำนวน 4 เครื่องหมาย และ ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 2 จำนวน 3 เครื่องหมาย กรณีที่ต้องสงสัยว่าตัวอย่างมะพร้าวมีแหล่งที่มาจากประเทศเวียดนาม การทดลองนี้ได้ออกแบบเครื่องหมายสำหรับตรวจพิสูจน์รวม 10 เครื่องหมาย แบ่งเป็น ชุดเครื่องหมายหลัก จำนวน 5 เครื่องหมาย และ ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 2 จำนวน 5 เครื่องหมาย จากข้อมูลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนากระบวนการตรวจจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงได้ เพื่อช่วยแก้ปัญหาการลักลอบนำเข้ามะพร้าวจากต่างประเทศที่ส่งผลให้ราคามะพร้าวในประเทศตกต่ำ

รหัสโครงการ 631506

[1]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ [2]สถาบันพืชสวน [3]สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร [4]สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6

คำนำ

มะพร้าว (Coconut) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ผลมะพร้าวแก่เป็นวัตถุดิบหลักของโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อาหาร น้ำมัน เครื่องสำอาง พลังงานเชื้อเพลิง และเส้นใย ในปี พ.ศ. 2539 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมะพร้าวประมาณ 2.5 ล้านไร่ มากเป็นอันดับ 6 ของโลก โดยพื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี ชุมพรและนครศรีธรรมราช อย่างไรก็ตามพื้นที่ปลูกมะพร้าวในประเทศมีการลดลงอย่างต่อเนื่องจากปัญหาภัยแล้ง ต้นมะพร้าวอ่อนแอ และแมลงศัตรูเข้าทำลาย จากข้อมูลสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร พบว่า ในปี พ.ศ. 2556 ประเทศไทยมีพื้นที่ให้ผลผลิตมะพร้าวผลแก่ 8.49 แสนไร่ และในปี พ.ศ. 2563 ลดลงเหลือ 7.77 แสนไร่ การลดลงของพื้นที่ปลูก ส่งผลให้ผลผลิตมะพร้าวผลแก่ในประเทศไม่เพียงพอต่อการผลิตและแปรรูป โดยเฉพาะการผลิตกะทิสำเร็จรูปและแปรรูปเนื้อมะพร้าวแห้งเพื่อส่งออก จึงต้องพึ่งพาการนำเข้ามะพร้าวจากต่างประเทศที่มีราคาถูกกว่า ซึ่งกระทบต่อราคามะพร้าวในประเทศ มีการลักลอบนำเข้ามะพร้าวทำให้ราคามะพร้าวภายในประเทศตกต่ำ ช่วงปลายปีต่อเนื่องถึงต้นปีเป็นช่วงที่ผลผลิตมะพร้าวแก่ในประเทศมีจำนวนน้อย จึงอนุญาตให้นำเข้าจากต่างประเทศได้ในช่วงเดือนพฤศจิกายน – เมษายน และนำเข้าผ่านสองด่าน ได้แก่ ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพฯ และด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง โดยพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ.2507 แก้ไขเพิ่มเติม โดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ.2551 กำหนดให้การนำเข้าในรูปของผลมะพร้าวแก่ปอกเปลือก (mature dehusked coconut) เนื้อมะพร้าวสด (fresh coconut meat) และเนื้อมะพร้าวแห้ง (copra) และต้องขอใบอนุญาตนำเข้าจากกรมวิชาการเกษตร ซึ่งผลมะพร้าวแก่ปอกเปลือกที่จะนำเข้า ต้องปอกเปลือกหรือกาบมะพร้าวออกให้หมด คงเหลือเฉพาะเปลือกชั้นกลาง (mesocarp) ของผลมะพร้าวบางส่วน ไม่มีส่วนของก้านใบ หน่อ หรือยอดอ่อนติดมาด้วยและต้องรมด้วยเมธิลโบรไมด์ เพื่อทำลายการงอกตามอัตราและระยะเวลาที่กำหนด (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 ผลมะพร้าวแก่ปอกเปลือกนำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน 5 ตัวอย่าง

มะพร้าว (Coconut) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Cocos nucifera* Linn. ซึ่งมีเพียงสปีชีส์เดียวในสกุล *Cocos* จัดอยู่ในพืชวงศ์ปาล์ม Arecaceae (Palmae) และเป็นพืชดิพลอยด์ (diploid) มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=32 ขนาดจีโนม 2.40 จิกะเบส (Gb) (Wang et al., 2021) มะพร้าวมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบแปซิฟิกตะวันตกเฉียงใต้และแปซิฟิกตะวันตก (รวมถึงคาบสมุทรมาเลย์ หมู่เกาะนิวกินี และหมู่เกาะบิสมาร์ก) ต่อมาแพร่กระจายไปหลายประเทศเขตร้อนทั่วโลก (Batugal et al., 2005) ความหลากหลายของมะพร้าวเกิดจากการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ การเจริญเติบโต รูปร่างและสีผล ส่งผลให้จำแนกพันธุ์มะพร้าวได้เป็นจำนวนมาก

หลักที่ใช้ในการจำแนกพันธุ์มะพร้าวตามความสูงของต้นและการผสมพันธุ์ ทำให้จำแนกมะพร้าวออกเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ มะพร้าวต้นสูง (tall) และมะพร้าวต้นเตี้ย (dwarf) (Ekanayake et al., 2010) ซึ่งมะพร้าวต้นสูงจะเจริญเติบโตเต็มที่ในช่วงอายุ 7–10 ปี สามารถสูงได้ถึง 18 เมตร และผสมข้ามต้น เนื่องจากดอกตัวผู้ในช่อดอกจะค่อยๆ ทยอยบาน และร่วงหล่นไปหมดก่อนที่ดอกตัวเมียในช่อดอกนั้นจะเริ่มบาน จึงไม่มีโอกาสผสมตัวเอง มะพร้าวต้นสูงเป็นมะพร้าวเศรษฐกิจส่วนใหญ่ปลูกเป็นอาชีพ เพื่อใช้เนื้อจากผลแก่ไปประกอบอาหารหรืออุตสาหกรรมกะทิสำเร็จรูป และทำมะพร้าวแห้งใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมันพืช ในขณะที่มะพร้าวต้นเตี้ยใช้เวลาในการเจริญเติบโตเต็มที่ 5–6 ปี ก็สามารถให้ผลผลิตได้ และมีความสูงเต็มที่เพียง 12 เมตร โดยส่วนใหญ่จะผสมตัวเองเนื่องจากดอกเพศผู้และดอกเพศเมียในช่อดอกเดียวกันจะบานพร้อมกัน มะพร้าวต้นเตี้ยนิยมปลูกไว้เพื่อรับประทานผลอ่อน เพราะในขณะที่ผลยังไม่แก่ อายุประมาณ 4 เดือน เนื้อมีลักษณะอ่อนนุ่ม และน้ำมีรสหวาน บางพันธุ์น้ำมีคุณสมบัติพิเศษ คือ มีกลิ่นหอม

ปัญหาการลักลอบนำเข้ามะพร้าวจากต่างประเทศเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้ราคามะพร้าวตกต่ำ จากการที่ไม่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและมะพร้าวต่างประเทศได้โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา การตรวจสอบดีเอ็นเอเพื่อจำแนกมะพร้าวไทยและมะพร้าวต่างประเทศจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญ โดยใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบแหล่งที่มาของมะพร้าว ซึ่งเทคโนโลยีทางด้านดีเอ็นเอในปัจจุบันสามารถตรวจสอบถิ่นกำเนิด (Finkeldey, Leinemann, & Gailing, 2010) ทั้งยังช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์ (varietal identification) เพื่อให้การจำแนกสายพันธุ์มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น และเป็นข้อมูลสำคัญในการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืช (plant patent) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้รับความนิยมอย่างมากในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (genetic diversity) เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), STS (Sequence Tagged Sites), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), SSR (Simple Sequence Repeats) หรือ microsatellites และ SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) เป็นต้น การเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละประเภท (จุฑาพร, 2555)

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR (Simple sequence repeat) หรือ microsatellite DNA คือ ลำดับเบสที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำสั้น ๆ ความยาว 1-6 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส เรียงตัวต่อกันในทิศทางเดียวกันส่วนใหญ่จะเป็นชุดซ้ำ 2 คู่เบส (dinucleotide) แต่บางครั้งอาจพบชุดซ้ำที่เป็น 3 (trinucleotide) ถึง 4 (tetranucleotide) คู่เบส โดยลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ มักเป็นลำดับเบสจำเพาะ มีเพียงชุดเดียวในจีโนม ดังนั้นเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว ไมโครแซทเทลไลท์เป็นส่วนที่มีการกลายพันธุ์โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจานวนชุดซ้ำได้ง่าย จึงมีโอกาสได้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากัน การตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย SSR จึงพบ polymorphism ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (co-dominant) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous และ heterozygous ได้ เครื่องหมาย SSR นั้นมีประโยชน์อย่างมากในการใช้เพื่อการศึกษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การศึกษาด้านจีโนม การสร้างแผนที่จีโนม ทั้งนี้ เพราะ SSR มีอยู่เป็นจำนวนมากกระจายทั่วไปในจีโนม และมีความแปรปรวนมาก อีก

ทั้งจำนวนซ้ำของ SSR มีความแตกต่างกันในพืชหรือสัตว์ต่างสายพันธุ์ในชนิด (species) เดียวกัน จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้เป็นอย่างดีในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์, 2552)

การพัฒนาเครื่องหมาย SSR เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรมะพร้าว เช่น ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าวปลูกในประเทศจีน (Liu et al., 2011; Xiao et al., 2013) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าวต้นสูงในประเทศศรีลังกา (Perera et al., 2001) และในประเทศบราซิล (Loiola et al., 2016) จำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของมะพร้าวต้นเตี้ยในประเทศศรีลังกา (Kamaral et al., 2017) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าวต้นสูงและมะพร้าวต้นเตี้ย (Dasanayaka et al., 2009; Meerow et al., 2003) และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์มะพร้าวจากประเทศต่างๆ (Perera et al., 2003) อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยมีงานวิจัยที่จำแนกมะพร้าวต้นสูงและมะพร้าวต้นเตี้ยโดยใช้เครื่องหมาย RAPD (ทิพวัลย์ และ สุรินทร์, 2016) แต่เทคนิคดังกล่าวมักให้ผลการทดลองซ้ำที่แตกต่างไปจากเดิม เนื่องจาก ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสสุ่มสายสั้นๆ จึงไม่มีตำแหน่งจำเพาะบนจีโนม ซึ่งแตกต่างกับเครื่องหมาย SSR ที่เป็นลำดับเบสจำเพาะในจีโนม แต่ทว่ายังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าวในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมาย SSR

SNP (single nucleotide polymorphism) คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เพียงหนึ่งตำแหน่ง ปัจจุบันเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสได้ก้าวเข้าสู่เทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ (NGS; next-generation sequencing) เป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในการหาลำดับเบสทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิต (whole genome sequencing) ซึ่งพัฒนาให้สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดจีโนมได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ประกอบกับค่าใช้จ่ายในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกลงมาก ทำให้เทคโนโลยี NGS ถูกนำไปใช้ถอดรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด และสามารถตรวจหา SNP ได้จำนวนมาก การพัฒนาเครื่องหมาย SNP ด้วยเทคนิค GBS (Genotyping-by-Sequencing), ที่ใช้ประกอบกับเทคโนโลยี NGS เพื่อคัดเลือกส่วนของจีโนมที่มีสัดส่วนของยีนสูง (gene rich region) ทำให้สามารถอ่านลำดับเบสในส่วนของยีนในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีต้นทุนต่ำในการค้นหาตำแหน่ง SNP (SNP discovery) และตรวจสอบจีโนไทป์ของ SNP (SNP genotyping) อีกด้วย

จากงานวิจัยที่ผ่านมาสามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของมะพร้าวโดยใช้เทคโนโลยี NGS แบบ Illumina platform ทั้งลำดับเบสนิวเคลียสจีโนม (Xiao et al., 2017) ลำดับเบสคลอโรพลาสต์จีโนม (Huang et al., 2013) และลำดับเบสไมโตคอนเดรียจีโนม (Aljohi et al., 2016) ซึ่งข้อมูลลำดับเบสเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นลำดับเบสจีโนมอ้างอิงในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยเฉพาะเครื่องหมาย SNP ถึงแม้ว่าค่า PIC (Polymorphic Information Content) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพและความหลากหลายของแอลลีลของเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นๆ ของเครื่องหมาย SSR มีค่าสูงกว่าเครื่องหมาย SNP แต่ทว่าเครื่องหมาย SNP มีการกระจายตัวสูงมากในจีโนม (Singh et al., 2013) ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมาย SNP จึงเป็นที่นิยม ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร และการหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะที่สนใจ

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจจำแนกมะพร้าวไทยและมะพร้าวต่างประเทศโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR และ SNP โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอระหว่างมะพร้าวไทยจากจังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกมะพร้าวจำนวนมากของประเทศ ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ปัตตานี ชลบุรี นราธิวาส และสมุทรสงคราม กับมะพร้าวนำเข้าจากประเทศอินโดนีเซียและประเทศเวียดนาม เพื่อเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาการลักลอบนำเข้ามะพร้าวจากต่างประเทศต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างมะพร้าวที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ตัวอย่างมะพร้าวไทยต้นสูงจาก 8 จังหวัด ซึ่งเป็นแหล่งปลูกมะพร้าวจำนวนมาก ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ปัตตานี ชลบุรี นราธิวาส สมุทรสงคราม จำนวน 192 ตัวอย่าง

1.2 ตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศจากด่านตรวจพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 48 ตัวอย่าง ได้แก่ ประเทศเวียดนามต้นสูง 26 ตัวอย่าง และ ประเทศอินโดนีเซียต้นสูง 22 ตัวอย่าง

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอ ประกอบไปด้วย

- โกร่งและที่บด
- CTAB extraction buffer (2% CTAB, 1% PVP, 100 mM TrisHCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 0.2% 2-mercaptoethanol)
- absolute ethanol
- Isoamyl alcohol
- Chloroform
- 70% Ethanol
- 0.2M Sodium acetate
- 0.01M Ammonium acetate
- Genomic DNA Purification Kit
- TE buffer pH 8.0
- อุปกรณ์เจาะเนื้อเยื่อ (cork borer)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง
- เครื่องชั่งสาร
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectrophotometer
- เครื่อง Agarose gel electrophoresis

2.2 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
- PCR master mix (สารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย *Taq* DNA polymerase, dNTPs, MgCl2 และ บัฟเฟอร์)
- ไพรเมอร์ SSR

- ปิเปตและทิป
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง

2.3 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอ

- Agarose
- TBE buffer
- สีย้อมกรดนิวคลิอิก
- เครื่องแยก DNA Electrophoresis
- เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล Gel Documentation System
- เครื่องแยกสารพันธุกรรมอัตโนมัติ QIAxcel Advanced System

วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมะพร้าวต้นสูง

1.1 ตัวอย่างมะพร้าวไทย: เก็บและรวบรวมตัวอย่างมะพร้าวไทยที่ให้ผลผลิตเป็นผลมะพร้าวแก่สำหรับคั้นกะทิ ต้นสูงและมีอายุไม่น้อยกว่า 15 ปี จากแหล่งปลูกมะพร้าวจำนวนมาก 9 จังหวัด ในประเทศไทย ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ปัตตานี ชลบุรี นราธิวาส สมุทรสงคราม และยะลา โดยเก็บใบสดที่มีลักษณะไม่อ่อนหรือแก่เกินไป (ใบเพสลาด) เป็นใบที่สะอาด ไม่มีโรคและแมลง จำนวนอย่างน้อย 3 ใบต่อต้น

1.2 ตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศ: เก็บรวบรวมตัวอย่างผลมะพร้าวแก่ปอกเปลือกที่นำเข้าจากต่างประเทศ ได้แก่ อินโดนีเซียและเวียดนาม จากด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพฯ และด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง

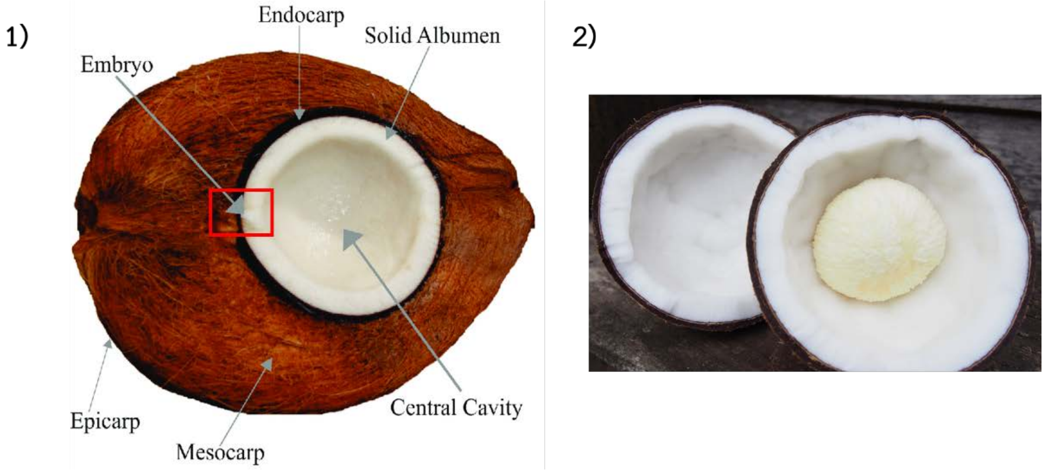
2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบมะพร้าวไทยต้นสูง

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB method) ตามวีธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Gawel and Jarret (1991) โดยนำใบสดของมะพร้าวไทยต้นสูง ประมาณ 300 กรัม ใส่ลงโกร่งบดยา เติมไนโตรเจนเหลวและบดละเอียดจนเป็นผง เติม CTAB extraction buffer ที่อุ่นที่อุณภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในโกร่งและผสมให้เข้ากัน เทลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างออกตั้งไว้ให้เย็น ตกตะกอนโปรตีนด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกชั้นของเนื้อเยื่อและส่วนใส ดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ขนาด 50 มิลลิลิตร และค่อยๆเติม 99.9% ethanol (absolute ethanol) ที่เย็นจัด ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ปิดฝาหลอด และพลิกหลอดไปมาอย่างช้าๆ เพื่อให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จนปรากฏสายดีเอ็นเอ แยกตะกอนดีเอ็นเอใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย

70% ethanol 2 รอบ และเติมสารละลาย 0.2M sodium acetate ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เทสารละลาย sodium acetate ทิ้ง และเติมสารละลาย 0.01M ammonium acetate ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วินาที เทสารละลาย ammonium acetate ทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer pH 8.0 ปริมาตรประมาณ 100-200 ไมโครลิตร เติม RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol 300 ไมโครลิตร (0.6 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ) และ 3M sodium acetate 50 ไมโครลิตร (0.1 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ) จากนั้นนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาละลายด้วย TE buffer pH 8.0 วัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตด้วยวิธี spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอหลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis และบันทึกภาพเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation System เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอในสภาพแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเอ็มบริโอมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง

ผ่าผลมะพร้าวแก่ปอกเปลือกจากต่างประเทศ แกะชิ้นส่วนเอ็มบริโอที่อยู่ภายในเนื้อมะพร้าวหรือจาวมะพร้าว (ภาพที่ 2) โดยการใช้มีดเจาะหรืออุปกรณ์เจาะเนื้อเยื่อ (cork borer) และนำอ็มบริโอมะพร้าวไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method ตามวีธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Gawel and Jarret (1991) เช่นเดียวกับข้อ 1.2



ภาพที่ 2 ตัวอย่างเอ็มบริโอมะพร้าว 1) เอ็มบริโอในเนื้อมะพร้าว 2) จาวมะพร้าว (Lédo et al, 2019)

3. การคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์จีโนไทป์มะพร้าวต้นสูง

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ SSR จำนวน 58 คู่ (Perera et al., 1999; Rivera et al., 1999; Baudouin et al., 2006; Xiao et al., 2013) ในตัวอย่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง จำนวน 12 ตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ SSR ในการจำแนกมะพร้าวต้นสูง

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 58 คู่ และอุณหภูมิ annealing temperature (Ta) ที่ใช้กับตัวอย่างมะพร้าว

No.	Primer	Repeat Motive	Forward Primer (5’-3’)	Reverse primer (5’-3’)	Product Size (bp)	Ta (°C)	Source of sequence information
1	CAC02	(CA)15(AG)7	AGCTTTTTCATTGCTGGAAT	CCCCTCCAATACATTTTTCC	225~240	52	Perera et al.,
2	CAC03	(CA)12(AG)14	GGCTCTCCAGCAGAGGCTTAC	GGGACACCAGAAAAAGCC	176~183	52	1999 & Perera
3	CAC04	(CA)19(AG)17	CCCCTATGCATCAAAACAAG	CTCAGTGTCCGTCTTTGTCC	185~207	55	et al., 2003
4	CAC06	(AG)14(CA)9	TGTACATGTTTTTTGCCCAA	CGATGTAGCTACCTTCCCC	146~164	55	
5	CAC08	(AG)10(CA)9	ATCACCCCAATACAAGGACA	AATTCTATGGTCCACCCACA	198~290	55	
6	CAC10	(AG)13(CA)9	GATGGAAGGTGGTAATGCTG	GGAACCTCTTTTGGGTCATT	156~163	55	
7	CAC11	(CA)n(TA)n	GATCTTCGGCGTTCCTCA	TCTCCTCAACAATCTGAAGC	144~147	55	
8	CAC13	(CA)9(TA)5A(TA)4(CA)6	GGGTTTTTTAGATCTTCGGC	CTCAACAATCTGAAGCATCG	151~153	55	
9	CAC23	(CA)8	TGAAAACAAAAGATAGATGTCAG	GAAGATGCTTTGATATGGAAC	170~179	55	
10	CAC38	(CA)13(CT)17	ACCCTACTTCTAACTGTTCACTC	CAGCTTGATAAATATCATCCAT	155	55	
11	CAC39	(CA)15	AATTGAGATAAGCAGATCAGT	GTCGGTCTTTATTCAGAAGG	142~166	55	
12	CAC50	(TA)6(CA)21	CTTACTCACCCCATAACAAAG	TTGTAGTTGCCCATATCTCTT	153	55	
13	CAC56	(CA)14	ATTCTTTTGGCTTAAAACATG	TGATTTTACAGTTACAAGTTTGG	138~162	50	
14	CAC65	(CA)15	GAAAAGGATGTAATAAGCTGG	TTTGTCCCCAAATATAGGTAG	150~173	52	
15	CAC68	(CA)13	AATTATTTTCTTGTTACATGCATC	AACAGCCTCTAGCAATCATAG	130~146	55	
16	CAC71	(CA)17	ATAGCTCAAGTTGTTGCTAGG	ATATTGTCATGATTGAGCCTC	172~283	55	
17	CAC72	(CA)18	TCACATTATCAAATAAGTCTCACA	GCTCTCTTTCTCATGCACA	124~132	55	
18	CAC77	(CA)15(CT)11	CAGAGGTCACAACCATATTG	CTTTAGCTATTTGTTCCAAGG	131	55	
19	CAC84	(CA)13	TTGGTTTTTGTATGGAACTCT	AAATGCTAACATCTCAACAGC	150~163	55	
20	CNZ01	(CT)15(CA)9	ATGATGATCTCTGGTTAGGCT	AAATGAGGGTTTGGAAGGATT	109~131	55	Rivera et al.,
21	CNZ02	(GA)15	CTCTTCCCATCATATACCAGC	ACTGGGGGGATCTTATCTCTG	143~161	55	1999
22	CNZ03	(GA)7	CATCTTTCATCATTTAGCTCT	AAACCAAAAGCAAGGAGAAGT	91~97	55	
23	CNZ04	(CT)29TT(CA)10	TATATGGGATGCTTTAGTGGA	CAAATCGACAGACATCCTAAA	130—166	55	
24	CNZ05	-	CTTATCCAAATCGTCACAGAG	AGGAGAAGCCAGGAAAGATTT	151-190	55	
25	CNZ06	(CT)15	ATACTCATCATCATACGACGC	CTCCCACAAAATCATGTTATT	69—97	55	
26	CNZ10	(CT)18(GT)17	CCTATTGCACCTAAGCAATTA	AATGATTTTCGAAGAGAGGTC	108—152	55	
27	CNZ29	(GT)22(GA)2CA(GA)11	TAAATGGGTAAGTGTTTGTGC	CTGTCCTATTTCCCTTTCATT	135	52	
28	CNZ40	-	CTTGATTGCTATCTCAAATGG	CTGAGACCAAATACCATGTGT	143—155	55	
29	CNZ44	(GA)15	CATCAGTTCCACTCTCATTTC	CAACAAAAGACATAGGTGGTC	151—170	55	
30	CNZ46	(CT)24	TTGGTTAGTATAGCCATGCAT	AACCATTTGTAGTATACCCCC	101—120	52	
31	CnCir01	-	TTGGTCTATTGCATGTTC	TGGCATTGAGAGGGT	150	52	Baudouin et
32	CnCirC5	-	ACCACCAAAGCCAGAGC	GCAGCCACTACCTAAAAAG	133	55	al., 2006
33	CnCirD8	-	GCTCTTGATGTGGCTGCT	AGGCGTGTTGAGATTGTGA	250	52	
34	CnCir51	-	TCTCGTGGATCTCGTC	GCTCTTCCAGTTACGTTT	200	55	
35	CnCirA9	-	AATGTTTGTGTCTTTGTGCGTGTGT	TCCTTATTTTTCTTCCCCTTCCTCA	081-140	55	
36	CnCirB12	-	GCTCTTCAGTCTTTCTCAA	CTGTATGCCAATTTTTCTA	141-190	52	
37	CnCirC12	-	ATACCACAGGCTAACAT	AACCAGAGACATTTGAA	141-191	50	
38	CnCirE2	-	TCGCTGATGAATGCTTGCT	GGGGCTGAGGGATAAACC	110-160	55	
39	WCYZ8635	(CCT)6	AACCAAACTCCTCTCCAACCTC	GATGAAGAAGCGGGTGAAGTC	210	55	Xiao et
40	WCYZ2158	(CT)6	CATCGGCCTCTTCAAACAAT	TGTCAGGTGCATAAAGGTAAGG	318-390	55	al.,2013
41	WCYZ1521	(CT)7	GTCTGTTTTCTGCTCTTCGCTT	TCCTTTTCCCATCTCTCTGAAC	150	55	
42	WCYZ8624	(CT)8	TACGTTTCCAATATCGTCGTCA	GGAAGGAATTTAGGTTTGTGGG	116-140	55	
43	WCYZ8939	(CT)9	GTTAAAAGAGGAGGTCTCGGGT	TCCCAGGAGGAACTAAAGACAC	144-210	55	
44	WCYZ8947	(CTC)7	AGCTTAGATTTCATGGCTACGG	AGATTGGATTTTGATGGGAGG	298-350	55	
45	WCYZ3554	(GA)8	CCCGGCTCTCTCTCTAAACTCT	CTCCTCCTGCTCCTTGTTGAG	264-500	55	
46	WCYZ8774	(GCA)7	ACGAAGAAAATCTCAAACAGGC	GGACTAGGCAATGGATTCAGAG	373-470	55	

No.	Primer	Repeat Motive	Forward Primer (5’-3’)	Reverse primer (5’-3’)	Product Size (bp)	Ta (°C)	Source of sequence information
47	WCYZ7691	(GGA)6	TTTCACTCCCGTCTTCATCTTT	TTGCTGCTGTTCTTCTTGTTGT	280-305	55	
48	WCYZ8794	(TA)8	ATATGCTCCATTCCTCCATCTC	ACCCTTCCCCTTATCGTACATT	202-210	55	
49	WCYZ5609	(TC)8	TATATCGGGCATCAAATGTCG	CATGAAAGACCTGCAACGAATA	260-275	55	
50	WCYZ1721	(TCA)6	ACCGTACTTACATCCTCACCCA	CACTCTTCCCTTTGCTCTTCAC	190-630	55	
51	CN11A10	(CT)30	GTTGGAGATTTAATTTTCTTG	CCCAATAATATTTTATAACAG	81~119	52	
52	CN11E10	(GT)22(GA)14	AGAGAGAGTAAATGGGTAAGT	CCCTTTCATTTTTCCTTATTC	99~151	52	
53	CN11E6	(CT)21	TACTTAGGCAACGTTCCATTC	TAACCAGAAAGCAAAAAGATT	85~128	55	
54	CN1C6	(CT)1`TT(GT)5	AGTATGTGAGTAGGATTATGG	TTCCTTGGACCCTTATCTCTT	175~184	55	
55	CN1G4	(CT)15	GTCGTCCTATACTCATCATCA	GATGCGTATGAGATGTGAGAG	112~132	55	
56	CN1H2	(GA)18	TTGATAGGAGAGCTTCATAAC	ATCTTCTTTAATGCTCGGAGT	230~321	55	
57	CN2A4	(CT)15TT(CT)3	CAGGATGGTTCAAGCCCTTAA	GGTGGAAGAGGGAGAGATTGA	87~111	55	
58	CN2A5	(CT)12TT(CT)3	AAGGTGAAATCTATGAACACA	GGCAGTAACACATTACACATG	88~121	55	

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอมะพร้าวต้นสูง โดยใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA), 0.25 µM Forward primer, 0.25 µM Reverse primer, sterile distilled H_2O และดีเอ็นเอต้นแบบ 20 นาโนกรัม (ตารางที่ 2) ผสมส่วนประกอบต่างๆ ให้เข้ากันในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตรแล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องพีซีอาร์ซึ่งโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ Initial denaturation ที่ 95 °C (5 นาที) 1 รอบ denaturation ที่ 94 °C (1 นาที) annealing ของแต่ละไพรเมอร์ (1.30 นาที) และ extension ที่ 72 °C (2 นาที) เป็นจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72 °C (10 นาที) 1 รอบ (ตารางที่ 3) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจผลการปรากฎของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซิสบน 2% ในอะกาโรสเจลที่ผสมสีย้อมกรดนิวคลีอิกเรืองแสง SafeView™ Classic โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐาน (1kb DNA ladder marker) เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล Gel Documentation System จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยละเอียดด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมอัตโนมัติ QIAxcel Advanced System บันทึกข้อมูลขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ปรากฏในแต่ละแอลลีล และผลจีโนไทป์ที่ได้

นำข้อมูลจีโนไทป์ในแต่ละไพรเมอร์ของตัวอย่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง จำนวน 12 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ค่า Polymorphism Information Content (PIC) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพที่แสดงความหลากหลายของแอลลีลของเครื่องหมายดีเอ็นเอ จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ SSR ที่ให้ค่า PIC สูงสุด จำนวน 15 ไพรเมอร์ ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในตัวอย่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงทั้งหมด ตรวจสอบความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยละเอียด บันทึกผลจีโนไทป์ที่ได้ และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมาย SSR ด้วยโปรแกรม PowerMarker (Liu and Muse, 2005) ที่ประกอบด้วยจำนวนจีโนไทป์ (NG), จำนวนแอลลีล (NA), ค่ายีนไดเวอร์ซิตี้ (GD), ค่าเฮทเทอร์โรไซโกซิตี้ (H) และค่า PIC

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นและปริมาตรสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

สารละลาย	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
2X PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)	10	1X
5 µM Forward Primer	1	0.25 µM
5 µM Reverse Primer	1	0.25 µM
DNA template (4 ng/ul)	5	20 ng
Sterile distilled H_2O	3	Add to 20 µl
Total	**20**	**-**

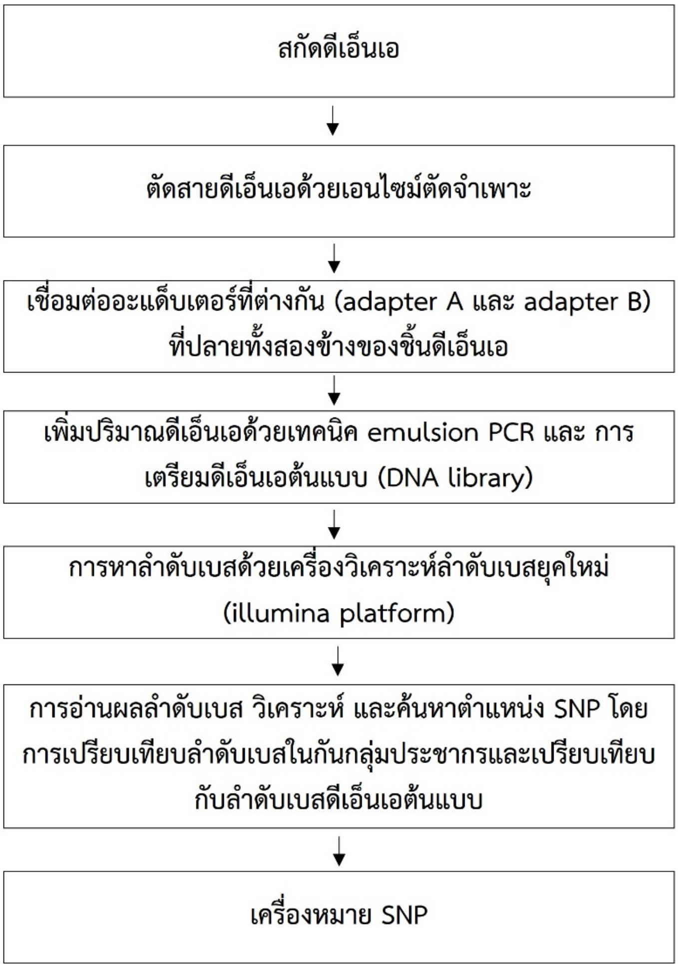
ตารางที่ 3 การตั้งโปรแกรมในปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	การเกิดปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1	Initial denaturation	95 °C	5 นาที	1
2	Denaturation	94 °C	1 นาที	
	Annealing	55–60 °C	1.30 นาที	35
	Extension	72 °C	2 นาที	
3	Final extension	72 °C	10 นาที	1
4	Hold	4 °C	∞	-

4. การค้นหาเครื่องหมาย SNP

ค้นหาเครื่องหมาย SNP ในตัวอย่างมะพร้าวต้นสูงด้วยเทคนิค Genotyping-By-Sequencing (GBS) โดยการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library) นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) 2 ชนิด *Mse*I และ *Hae*III_*Map*I คัดเลือกขนาดสายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว (ประมาณ 200-300 เบส) ต่อปลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 2 ด้าน ด้วย adapter 2 ชนิด ซึ่งถูกออกแบบให้เข้าคู่กับส่วนปลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Emulsion PCR (emPCR) เพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวให้เป็นดีเอ็นเอสายคู่ และหาลำดับเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ (illumina platform) (ภาพที่ 3)

วิเคราะห์ข้อมูลรูปแบบความแปรผันของลำดับเบสเพื่อค้นหาตำแหน่ง SNP โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสของมะพร้าว Hainan Tall coconut (จากธนาคารยีน) เป็นลำดับเบสอ้างอิงด้วยโปรแกรม GATK version 3.5 จากนั้นคัดกรองเครื่องหมาย SNP จากค่า coverage depth ≥20 ค่า missing data ที่ระดับน้อยกว่า 10% ค่า และค่า minor allele frequency (MAF) ที่ระดับ 0.01 ของแต่ละเครื่องหมาย SNP



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการค้นหาเครื่องหมาย SNP ในตัวอย่างมะพร้าวต้นสูงด้วยเทคนิค Genotyping-By-Sequencing (GBS)

5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง

นำข้อมูลจีโนไทป์ของเครื่องหมาย SSR และเครื่องหมาย SNP มาคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) (Nei, 1973) เพื่อประเมินหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างมะพร้าวต้นสูง โดยการสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) ด้วยวิธี neighbor- joining (NJ) ด้วยโปรแกรม PowerMarker (Liu and Muse, 2005) และวิเคราะหแผนภาพการกระจายตัวและสัมประสิมธิ์สหสัมพันธ์ principle coordinate analysis (PCoA) ด้วยโปรแกรม GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012)

6. การวิเคราะห์หาเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง

วิเคราะห์หาเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยต้นสูงออกจากมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้ ดังนี้

- ค้นหาจีโนไทป์ของเครื่องหมาย SNP ที่ให้แตกต่างในมะพร้าวไทยต้นสูงและมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง และคัดเลือกเครื่องหมาย SNP ที่จำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง
- ค้นหาจีโนไทป์ของเครื่องหมาย SNP ที่ให้แตกต่างในมะพร้าวไทยต้นสูงและมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง และคัดเลือกเครื่องหมาย SNP ที่จำแนกมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง

- ค้นหาจีโนไทป์ของเครื่องหมาย SNP ที่ให้แตกต่างในมะพร้าวไทยต้นสูงและมะพร้าวเวียดนามต้นสูง และคัดเลือกเครื่องหมาย SNP ที่จำแนกมะพร้าวเวียดนามต้นสูงออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกผลของเครื่องหมาย SSR จากแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวมีหน่วยเป็นคู่เบสแตกต่างกัน ในรูปแบบจีโนไทป์ที่มี 2 แอลลีล (codominant marker)
- บันทึกผลของเครื่องหมาย SNP จากเบสที่เปลี่ยนแปลงในตำแหน่งนั้นๆ ในรูปแบบจีโนไทป์ที่มี 2 แอลลีล (codominant marker)

สถานที่ดำเนินงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาดำเนินการของโครงการ เริ่มต้น กรกฎาคม 2563 สิ้นสุด มิถุนายน 2565

ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง

เก็บรวบรวมตัวอย่างมะพร้าวไทยและมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงทั้งหมด 240 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

1.1 ตัวอย่างมะพร้าวไทยต้นสูง

ตัวอย่างมะพร้าวไทยที่ให้ผลผลิตเป็นผลมะพร้าวแก่สำหรับคั้นกะทิ ต้นสูงและมีอายุไม่น้อยกว่า 15 ปี ใน 9 จังหวัด ซึ่งเป็นจังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกมะพร้าวจำนวนมากในประเทศไทย จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่ สมุทรสงคราม จำนวน 5 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 34 ตัวอย่าง ชุมพร จำนวน 25 ตัวอย่าง ชลบุรี จำนวน 19 ตัวอย่าง นครศรีธรรมราช จำนวน 40 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี จำนวน 13 ตัวอย่าง ปัตตานี จำนวน 20 ตัวอย่าง ยะลา จำนวน 16 ตัวอย่าง และ นราธิวาส จำนวน 20 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4, ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4 การสำรวจและเก็บรวบรวมมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง

ตารางที่ 4 รหัสตัวอย่างและสถานที่รวบรวมมะพร้าวไทยต้นสูง

No.	รหัส	จังหวัด	ที่อยู่แปลง
1	1CB	ชลบุรี	170/17 หมู่3 ต.ตะเคียนเตี้ย อ.บางละมุง
2	2CB	ชลบุรี	32 หมู่3 ต.ตะเคียนเตี้ย อ.บางละมุง
3	3CB	ชลบุรี	40/1 หมู่2 ต.ตะเคียนเตี้ย อ.บางละมุง
4	4CB	ชลบุรี	40/1 หมู่2 ต.ตะเคียนเตี้ย อ.บางละมุง
5	5CB	ชลบุรี	5 หมู่ 3 ต.หนองปลาไหล อ.บางละมุง
6	6CB	ชลบุรี	หมู่1 บ้านหนองน้ำเต้าลอย ต.โอ่ง อ.บางละมุง
7	7CB	ชลบุรี	หมู่1 บ้านหนองน้ำเต้าลอย ต.โอ่ง อ.บางละมุง
8	8CB	ชลบุรี	แหลมแท่น ต.แสนสุข อ.เมืองชลบุรี
9	9CB	ชลบุรี	แหลมแท่น ต.แสนสุข อ.เมืองชลบุรี
10	10CB	ชลบุรี	อ.บ้านบึง
11	11CB	ชลบุรี	6/1 หมู่10 ต.ทำบุญมี อ.เกาะจันทร์
12	12CB	ชลบุรี	154/1 หมู่2 ต.บ่อใน อ.ศรีราชา
13	13CB	ชลบุรี	430/8 หมู่9 ต.หนองขาม อ.ศรีราชา
14	14CB	ชลบุรี	ศูนย์เรียนรู้การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมะพร้าว ต.บางพระ อ.ศรีราชา
15	15CB	ชลบุรี	ศูนย์เรียนรู้การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมะพร้าว ต.บางพระ อ.ศรีราชา
16	16CB	ชลบุรี	ซอยสง่าชนม์ หมู่9 ต.สัตหีบ อ.สัตหีบ
17	17CB	ชลบุรี	ซอยเทียบแก้ว ต.สัตหีบ อ.สัตหีบ
18	18CB	ชลบุรี	ซอยเทียบแก้ว ต.สัตหีบ อ.สัตหีบ
19	19CB	ชลบุรี	172/12 หมู่11 ต.บางเสร่ อ.สัตหีบ
20	20S	สมุทรสงคราม	ต.บ้านปราโมทย์ อ.บางคนที
21	21S	สมุทรสงคราม	ต.บ้านปราโมทย์ อ.บางคนที
22	22S	สมุทรสงคราม	หมู่5 บ้านคลองวัว ต.เหมืองใหม่ อ.อัมพวา
23	23S	สมุทรสงคราม	ต.คลองเขิน อ.เมือง
24	24S	สมุทรสงคราม	ต.คลองเขิน อ.เมือง
25	25YL	ยะลา	ตรงข้าม ศวส.ยะลา ต.ธารโต อ.ธารโต จ.ยะลา
26	26YL	ยะลา	ตรงข้าม ศวส.ยะลา ต.ธารโต อ.ธารโต จ.ยะลา
27	27YL	ยะลา	ตรงข้าม ศวส.ยะลา ต.ธารโต อ.ธารโต จ.ยะลา
28	28YL	ยะลา	ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตรจังหวัดยะลา ต.ปุโรง อ.กรงปินัง จ.ยะลา
29	29YL	ยะลา	หมู่2 ต.ปุโรง อ.กรงปินัง จ.ยะลา
30	30YL	ยะลา	หมู่2 ต.ปุโรง อ.กรงปินัง จ.ยะลา
31	31Ch	ชุมพร	ต.ทะเลทรัพย์ อ.ปะทิว
32	32Ch	ชุมพร	ต.ทะเลทรัพย์ อ.ปะทิว
33	33Ch	ชุมพร	สวนพรนิพันธุ์ อ.ปะทิว
34	34Ch	ชุมพร	ต.บางสน อ.ปะทิว
35	35Ch	ชุมพร	ต.บางสน อ.ปะทิว
36	36Ch	ชุมพร	บ้านหนองปลา หมู่7 ต.ท่าหิน อ.สวี
37	37Ch	ชุมพร	บ้านหนองปลา หมู่7 ต.ท่าหิน อ.สวี
38	38Ch	ชุมพร	บ้านหนองปลา หมู่7 ต.ท่าหิน อ.สวี
39	39Ch	ชุมพร	บ้านหนองปลา หมู่7 ต.ท่าหิน อ.สวี
40	40Ch	ชุมพร	บ้านหนองปลา หมู่7 ต.ท่าหิน อ.สวี
41	41Ch	ชุมพร	อ.สวี

No.	รหัส	จังหวัด	ที่อยู่แปลง
42	42Ch	ชุมพร	อ.สวี
43	43Ch	ชุมพร	อ.สวี
44	44Ch	ชุมพร	อ.สวี
45	45Ch	ชุมพร	อ.สวี
46	46Ch	ชุมพร	อ.เมือง
47	47Ch	ชุมพร	อ.เมือง
48	48Ch	ชุมพร	อ.เมือง
49	49Ch	ชุมพร	อ.เมือง
50	50Ch	ชุมพร	อ.เมือง
51	51Ch	ชุมพร	ต.นาชะอัง อ.เมือง
52	52Ch	ชุมพร	ต.นาชะอัง อ.เมือง
53	53Ch	ชุมพร	49/1 หมู่4 ต.นาชะอัง อ.เมือง
54	54Ch	ชุมพร	49/1 หมู่4 ต.นาชะอัง อ.เมือง
55	55Ch	ชุมพร	49/1 หมู่4 ต.นาชะอัง อ.เมือง
56	56NST	นครศรีธรรมราช	7 ต.ป่าระกำ อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
57	57NST	นครศรีธรรมราช	7 ต.ป่าระกำ อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
58	58NST	นครศรีธรรมราช	7 ต.ป่าระกำ อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
59	59NST	นครศรีธรรมราช	7 ต.ป่าระกำ อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
60	60NST	นครศรีธรรมราช	หมู่7 ต.หูล่อง อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
61	61NST	นครศรีธรรมราช	หมู่7 ต.หูล่อง อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
62	62NST	นครศรีธรรมราช	หมู่7 ต.หูล่อง อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
63	63NST	นครศรีธรรมราช	หมู่7 ต.หูล่อง อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
64	64NST	นครศรีธรรมราช	หมู่7 ต.หูล่อง อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
65	65NST	นครศรีธรรมราช	ต.คลองน้อย อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
66	66NST	นครศรีธรรมราช	ต.คลองน้อย อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
67	67NST	นครศรีธรรมราช	ต.คลองน้อย อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
68	68NST	นครศรีธรรมราช	ต.คลองน้อย อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
69	69NST	นครศรีธรรมราช	หมู่1 ต.ท่าซัก อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช
70	70NST	นครศรีธรรมราช	หมู่1 ต.ท่าซัก อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช
71	71NST	นครศรีธรรมราช	ต.ท่าซัก อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช
72	72NST	นครศรีธรรมราช	ต.ท่าซัก อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช
73	73NST	นครศรีธรรมราช	ต.สระแก้ว อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช
74	74NST	นครศรีธรรมราช	ต.สระแก้ว อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช
75	75NST	นครศรีธรรมราช	ต.สระแก้ว อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช
76	76NST	นครศรีธรรมราช	ต.สระแก้ว อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช
77	77NST	นครศรีธรรมราช	ต.สระแก้ว อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช
78	78NST	นครศรีธรรมราช	หมู่5 ต.สระแก้ว อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช
79	79NST	นครศรีธรรมราช	หมู่5 ต.สระแก้ว อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช
80	80NST	นครศรีธรรมราช	ต.สระแก้ว อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช
81	81NST	นครศรีธรรมราช	ต.สระแก้ว อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช
82	82NST	นครศรีธรรมราช	ต.สิชล อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช
83	83NST	นครศรีธรรมราช	ต.สิชล อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช
84	84NST	นครศรีธรรมราช	ต.สิชล อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช

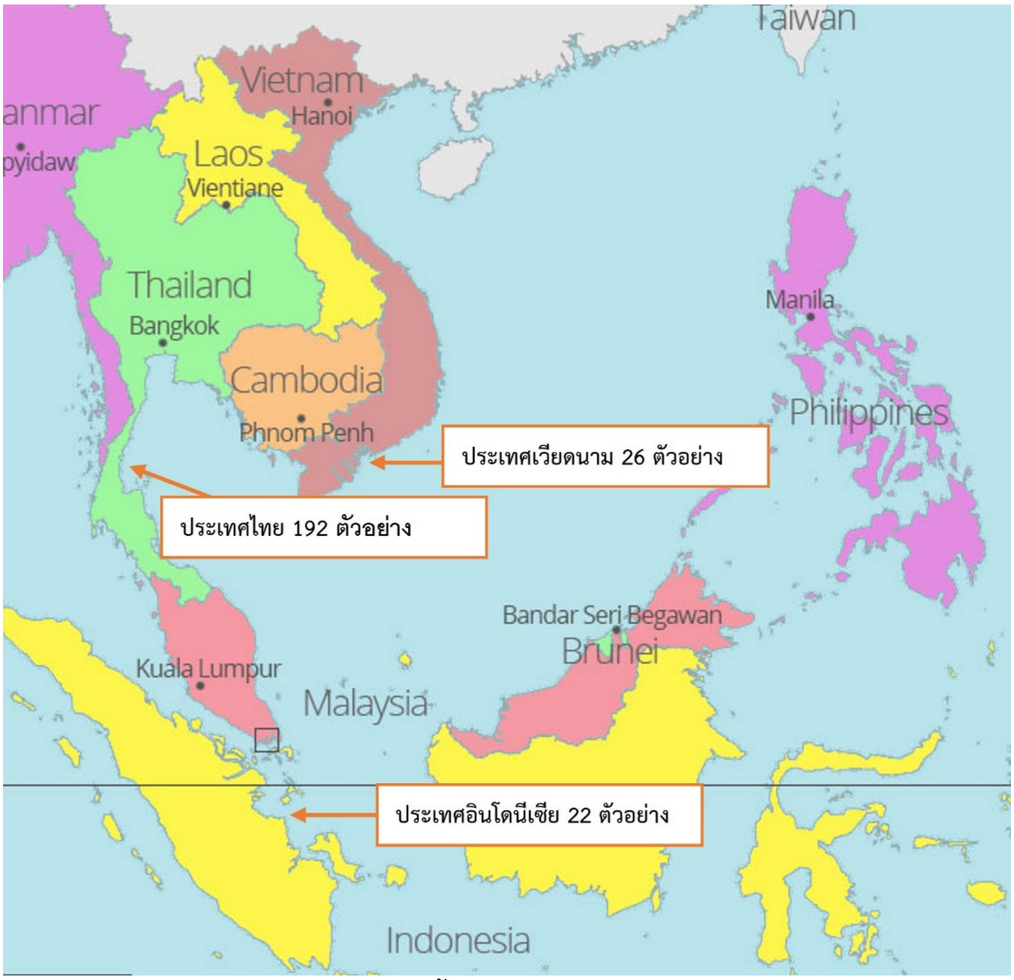
No.	รหัส	จังหวัด	ที่อยู่แปลง
85	85NST	นครศรีธรรมราช	ต.สิชล อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช
86	86NST	นครศรีธรรมราช	ต.สิชล อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช
87	87NST	นครศรีธรรมราช	ต.สิชล อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช
88	88NST	นครศรีธรรมราช	หมู่4 ต.ทุ่งใส อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช
89	89NST	นครศรีธรรมราช	หมู่4 ต.ทุ่งใส อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช
90	90NST	นครศรีธรรมราช	67 หมู่7 ต.ขนอม อ.ขนอม จ.นครศรีธรรมราช
91	91NST	นครศรีธรรมราช	67 หมู่7 ต.ขนอม อ.ขนอม จ.นครศรีธรรมราช
92	92NST	นครศรีธรรมราช	67 หมู่7 ต.ขนอม อ.ขนอม จ.นครศรีธรรมราช
93	93NST	นครศรีธรรมราช	43/4 หมู่7 ต.ขนอม อ.ขนอม จ.นครศรีธรรมราช
94	94NST	นครศรีธรรมราช	43/4 หมู่7 ต.ขนอม อ.ขนอม จ.นครศรีธรรมราช
95	95NST	นครศรีธรรมราช	43/4 หมู่7 ต.ขนอม อ.ขนอม จ.นครศรีธรรมราช
96	96SNI	สุราษฎร์ธานี	ต.ดอนสัก อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
97	97SNI	สุราษฎร์ธานี	ต.ดอนสัก อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
98	98SNI	สุราษฎร์ธานี	ต.ดอนสัก อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
99	99SNI	สุราษฎร์ธานี	ต.ดอนสัก อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
100	100SNI	สุราษฎร์ธานี	ต.ดอนสัก อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
101	101SNI	สุราษฎร์ธานี	8 หมู่6 ต.ดอนสัก อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
102	102SNI	สุราษฎร์ธานี	8 หมู่6 ต.ดอนสัก อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
103	103SNI	สุราษฎร์ธานี	1/1 หมู่3 ต.บางใบไม้ อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
104	104SNI	สุราษฎร์ธานี	1/1 หมู่3 ต.บางใบไม้ อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
105	105SNI	สุราษฎร์ธานี	หมู่3 ต.บางใบไม้ อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
106	106SNI	สุราษฎร์ธานี	หมู่3 ต.บางใบไม้ อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
107	107SNI	สุราษฎร์ธานี	65/1 หมู่3 ต.บางใบไม้ อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
108	108SNI	สุราษฎร์ธานี	65/1 หมู่3 ต.บางใบไม้ อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
109	109Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
110	110Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
111	111Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
112	112Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
113	113Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
114	114Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
115	115Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
116	116Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
117	117Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
118	118Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
119	119Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
120	120Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
121	121Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
122	122Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
123	123Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
124	124Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
125	125Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
126	126Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน
127	127Pr	ประจวบคีรีขันธ์	บ้านกรูด ต.ธงชัย อ.บางสะพาน

No.	รหัส	จังหวัด	ที่อยู่แปลง
128	128Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่1 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
129	129Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่1 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
130	130Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่1 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
131	131Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่1 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
132	132Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่1 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
133	133Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่1 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
134	134Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่2 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
135	135Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่2 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
136	136Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่2 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
137	137Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่2 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
138	138Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่2 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
139	139Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่2 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
140	140Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่2 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
141	141Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่2 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
142	142Pr	ประจวบคีรีขันธ์	แปลงที่2 ต.ทับสะแก อ.ทับสะแก
143	143PT	ปัตตานี	1 ม.1 บ้านลาลอ ต.ละหาร อ.สายบุรี จ.ปัตตานี
144	144PT	ปัตตานี	10 ม.1 บ้านลาลอ ต.ละหาร อ.สายบุรี จ.ปัตตานี
145	145PT	ปัตตานี	ต.ปะเสยะวอ อ.สายบุรี จ.ปัตตานี
146	146PT	ปัตตานี	ต.ปะเสยะวอ อ.สายบุรี จ.ปัตตานี
147	147PT	ปัตตานี	266 ม.2 ต.ปะเสยะวอ อ.สายบุรี จ.ปัตตานี
148	148PT	ปัตตานี	266 ม.2 ต.ปะเสยะวอ อ.สายบุรี จ.ปัตตานี
149	149PT	ปัตตานี	202/1 ม.5 ต.บ้านน้ำบ่อ อ.ปะนาเระ จ.ปัตตานี
150	150PT	ปัตตานี	30 ม.4 ต.ปะเสยะวอ อ.สายบุรี จ.ปัตตานี
151	151PT	ปัตตานี	30 ม.4 ต.ปะเสยะวอ อ.สายบุรี จ.ปัตตานี
152	152PT	ปัตตานี	161 ม.3 ต.ปะเสยะวอ อ.สายบุรี จ.ปัตตานี
153	153PT	ปัตตานี	57/1 ม.1 ต.ตะโล๊ะไกรทอง อ.ไม้แก่น จ.ปัตตานี
154	154PT	ปัตตานี	57/1 ม.1 ต.ตะโล๊ะไกรทอง อ.ไม้แก่น จ.ปัตตานี
155	155PT	ปัตตานี	31 ม.3 ต.ไม้แก่น อ.ไม้แก่น จ.ปัตตานี
156	156PT	ปัตตานี	21 ม.3 ต.ไม้แก่น อ.ไม้แก่น จ.ปัตตานี
157	157PT	ปัตตานี	14/5 ม.3 ต.ไม้แก่น อ.ไม้แก่น จ.ปัตตานี
158	158PT	ปัตตานี	14/5 ม.3 ต.ไม้แก่น อ.ไม้แก่น จ.ปัตตานี
159	159PT	ปัตตานี	9 ม.3 ต.ไม้แก่น อ.ไม้แก่น จ.ปัตตานี
160	160PT	ปัตตานี	9 ม.3 ต.ไม้แก่น อ.ไม้แก่น จ.ปัตตานี
161	161PT	ปัตตานี	1 ม.3 ต.ไม้แก่น อ.ไม้แก่น จ.ปัตตานี
162	162PT	ปัตตานี	1 ม.3 ต.ไม้แก่น อ.ไม้แก่น จ.ปัตตานี
163	163N	นราธิวาส	ม.4 บ้านเชิงเขา ต.ปะลุกาสาเมาะ อ.บาเจาะ จ.นราธิวาส
164	164N	นราธิวาส	ม.4 บ้านเชิงเขา ต.ปะลุกาสาเมาะ อ.บาเจาะ จ.นราธิวาส
165	165N	นราธิวาส	15/1 ม.4 บ้านเชิงเขา ต.ปะลุกาสาเมาะ อ.บาเจาะ จ.นราธิวาส
166	166N	นราธิวาส	15/1 ม.4 บ้านเชิงเขา ต.ปะลุกาสาเมาะ อ.บาเจาะ จ.นราธิวาส
167	167N	นราธิวาส	ม.4 บ้านเชิงเขา ต.ปะลุกาสาเมาะ อ.บาเจาะ จ.นราธิวาส
168	168N	นราธิวาส	ม.4 บ้านเชิงเขา ต.ปะลุกาสาเมาะ อ.บาเจาะ จ.นราธิวาส
169	169N	นราธิวาส	62 ม.4 บ้านเชิงเขา ต.ปะลุกาสาเมาะ อ.บาเจาะ จ.นราธิวาส
170	170N	นราธิวาส	51/2 ม.10 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส

No.	รหัส	จังหวัด	ที่อยู่แปลง
171	171N	นราธิวาส	51/2 ม.10 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส
172	172N	นราธิวาส	197 ม.11 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส
173	173N	นราธิวาส	197 ม.11 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส
174	174N	นราธิวาส	348 ม.11 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส
175	175N	นราธิวาส	346 ม.11 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส
176	176N	นราธิวาส	346 ม.11 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส
177	177N	นราธิวาส	189 ม.11 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส
178	178N	นราธิวาส	380/1 ม.11 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส
179	179N	นราธิวาส	ม.11 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส
180	180N	นราธิวาส	381/1 ม.11 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส
181	181N	นราธิวาส	43/1 ม.4 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส
182	182N	นราธิวาส	3/1 ม.4 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นราธิวาส
183	183YL	ยะลา	63 ม.5 ต.ตะโละอาลอ อ.รามัญ จ.ยะลา
184	184YL	ยะลา	63 ม.5 ต.ตะโละอาลอ อ.รามัญ จ.ยะลา
185	185YL	ยะลา	63/4 ม.4 ต.ตะโละอาลอ อ.รามัญ จ.ยะลา
186	186YL	ยะลา	68/1 ม.4 ต.ตะโละอาลอ อ.รามัญ จ.ยะลา
187	187YL	ยะลา	68/1 ม.4 ต.ตะโละอาลอ อ.รามัญ จ.ยะลา
188	188YL	ยะลา	ม.4 ต.ตะโละอาลอ อ.รามัญ จ.ยะลา
189	189YL	ยะลา	ม.4 ต.ตะโละอาลอ อ.รามัญ จ.ยะลา
190	190YL	ยะลา	67 ม.4 ต.ตะโละอาลอ อ.รามัญ จ.ยะลา
191	191YL	ยะลา	67 ม.4 ต.ตะโละอาลอ อ.รามัญ จ.ยะลา
192	192YL	ยะลา	63/4 ม.4 ต.ตะโละอาลอ อ.รามัญ จ.ยะลา

1.2 ตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง

เก็บรวบรวมตัวอย่างมะพร้าวแก่ปอกเปลือกที่นำเข้าจากต่างประเทศจากด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพฯ และด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร จำนวน 48 ตัวอย่าง ได้แก่ เวียดนาม 26 ตัวอย่าง และอินโดนีเซีย 22 ตัวอย่าง (ตารางที่ 5, ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การสำรวจและเก็บรวบรวมมะพร้าวทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 192 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง จากประเทศเวียดนาม 26 ตัวอย่าง และประเทศอินโดนีเซีย 22 ตัวอย่าง

ตารางที่ 5 รหัสตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง แหล่งรวบรวม และข้อมูลการนำเข้า จำนวน 48 ตัวอย่าง

No.	รหัส	ประเทศ	แหล่งที่มา	เลขรับคำร้อง	บริษัท
1	193Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39601/2563	บริษัท อำพลฟูดส์ โพรเซสซิ่ง จำกัด
2	194Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39601/2563	บริษัท อำพลฟูดส์ โพรเซสซิ่ง จำกัด
3	195Viet	เวียดนาม	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39755/2563	บริษัท ผลิตภัณฑ์อาหารเชฟช้อย จำกัด
4	196Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB40217/2563	บริษัท สุรีย์ อินเตอร์ฟู้ดส์ จำกัด
5	197Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB40217/2563	บริษัท สุรีย์ อินเตอร์ฟู้ดส์ จำกัด
6	198Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39518/2563	บริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด
7	199Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB38962/2563	บริษัท ไทย อกริ ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)
8	200Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB38671/2563	บริษัท ไทย อกริ ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)
9	201Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39822/2563	บริษัท ไทย อกริ ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)
10	202Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39829/2563	บริษัท ไทยแทน ฟู้ดส์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
11	203Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39722/2563	บริษัท ไทย อกริ ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)
12	204Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39722/2563	บริษัท ไทย อกริ ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)
13	205Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39725/2563	บริษัท ไทย อกริ ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)
14	206Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39725/2563	บริษัท ไทย อกริ ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)
15	207Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39725/2563	บริษัท ไทย อกริ ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)

No.	รหัส	ประเทศ	แหล่งที่มา	เลขรับคำร้อง	บริษัท
16	208Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39725/2563	บริษัท ไทย อกริ ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)
17	209Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB38792/2563	บริษัท ไทย อกริ ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)
18	210Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM01990/2564	บริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด
19	211Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM01990/2564	บริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด
20	212Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM01083/2564	บริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด
21	213Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM01207/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
22	214Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM05233/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
23	215Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM05233/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
24	216Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM06097/2564	บริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด
25	217Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM01990/2564	บริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด
26	218Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM05272/2564	บริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด
27	219Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM05272/2564	บริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด
28	220Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM05233/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
29	221Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM06097/2564	บริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด
30	222Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM06097/2564	บริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด
31	223Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM07846/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
32	224Viet	เวียดนาม	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39755/2563	บริษัท ผลิตภัณฑ์อาหารเชฟช้อย จำกัด
33	225Viet	เวียดนาม	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39755/2563	บริษัท ผลิตภัณฑ์อาหารเชฟช้อย จำกัด
34	226Viet	เวียดนาม	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39451/2563	บริษัท ไทย อกริ ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)
35	227Viet	เวียดนาม	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39451/2563	บริษัท ไทย อกริ ฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน)
36	228Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM11073/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
37	229Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM11073/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
38	230Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM11989/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
39	231Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM11989/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
40	232Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM11989/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
41	233Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM11914/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
42	234Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM11914/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
43	235Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM11914/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
44	236Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM07846/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
45	237Viet	เวียดนาม	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM07846/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
46	238Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM07113/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
47	239Indo	อินโดนีเซีย	ท่าเรือกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	BM07113/2564	บริษัท เอเชียติค อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด
47	240Viet	เวียดนาม	ท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร	LB39890/2563	บริษัท สุรีย์ อินเตอร์ฟู้ดส์ จำกัด

2. การวิเคราะห์จีโนไทป์มะพร้าวต้นสูงด้วยเครื่องหมาย SSR

2.1 การคัดเลือกเครื่องหมาย SSR

จากการรวบรวมตัวอย่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงทั้งหมด 240 ตัวอย่าง คัดเลือกตัวอย่างมะพร้าวต้นสูง 12 ตัวอย่าง จากแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน ประกอบด้วย ตัวอย่างมะพร้าวไทย 7 ตัวอย่าง ได้แก่ ชลบุรี (5CB) สมุทรสงคราม (20S) ยะลา (29Y) ชุมพร (31Ch) นครศรีธรรมราช (57NST) สุราษฎร์ธานี (106SNI) และ ประจวบคีรีขันธ์ (126Pr) และตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศ 5 ตัวอย่าง ได้แก่ เวียดนาม 3 ตัวอย่าง (210Viet, 217Viet และ 226Viet) และอินโดนีเซีย 2 ตัวอย่าง (193Indo และ 213Indo) เพื่อคัดเลือกไพร

เมอร์ SSR จำนวน 58 คู่ (ตารางที่ 1) ที่ให้ขนาดความยาวของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) และชัดเจน ผลการคัดเลือกพบ ไพร์เมอร์ SSR จำนวน 50 คู่ ที่ให้ polymorphism คิดเป็น 86.2% และมีไพร์เมอร์ SSR จำนวน 8 ไพรเมอร์ ที่ไม่มีความต่างของแถบดีเอ็นเอ (monomorphic band) จากนั้นบันทึกผลจีโนไทป์และนำไปวิเคราะห์หาเครื่องหมาย SSR ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยใช้ค่า PIC (Polymorphism Information Content) ที่แสดงความหลากหลายของแอลลีลและบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนก พบว่า ค่า PIC ของเครื่องหมาย SSR จำนวน 50 เครื่องหมาย มีค่าระหว่าง 0.08 ถึง 0.76 ค่าเฉลี่ย 0.50 ต่อเครื่องหมาย โดยเครื่องหมาย CAC50 มีค่า PIC สูงสุด และได้คัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่มีค่า PIC สูง (มีค่าระหว่าง 0.60 ถึง 0.76) จำนวน 15 เครื่องหมาย ซึ่งเป็น SSR ที่มีลำดับเบสซ้ำชนิดสองเบสทั้งหมด (di-nucleotide repeat) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 เครื่องหมาย SSR จำนวนแอลลีล ขนาดของแอลลีล และค่าประสิทธิภาพของไพรเมอร์ (PIC) โดยการวิเคราะห์ในมะพร้าวต้นสูง 12 ตัวอย่าง

No.	Marker	No. allele	Allele size	PIC
1	CAC23	3	174,180,182	0.63
2	CAC50	13	142,144,146,150,152,154,156,158,160,164,166,168,176	0.76
3	CAC77	8	132,144,146,148,150,152,154,156	0.64
4	CNZ10	13	108,130,134,136,138,142,144,146,148,150,152,160,164	0.76
5	CNZ40	8	134,136,140,142,150,154,158,166	0.69
6	CNZ46	8	96,100,104,106,108,112,114,118	0.61
7	CnCirD8	16	232,234,238,246,248,250,252,254,256,258,260,262,264,266,268,272	0.65
8	CnCir51	9	164,166,178,180,182,184,188,192,196	0.66
9	CnCirA9	6	88,90,92,94,96,102	0.63
10	CnCirB12	12	138,158,164,166,168,170,174,176,180,182,184,186,190	0.72
11	CnCirC12	9	160,162,166,170,172,174,176,180,182	0.70
12	WCYZ1721	5	220,222,224,228,232	0.60
13	CN11A10	13	73,81,85,87,89,91,101,103,105,107,109,115,117	0.65
14	CN1G4	8	110,112,122,124,126,130,132,134	0.64
15	CN1H2	16	164,178,182,184,186,188,190,192,194,196,198,200,202,204,206,208	0.75

2.2 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมาย SSR

จากการคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่มีประสิทธิภาพ จำนวน 15 เครื่องหมาย (ตารางที่ 6) เมื่อนำไปวิเคราะห์ในตัวอย่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงทั้งหมด 240 ตัวอย่าง ได้แก่ มะพร้าวไทย จำนวน 192 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศ จำนวน 48 ตัวอย่าง (เวียดนาม 26 ตัวอย่าง และ อินโดนีเซีย 22 ตัวอย่าง) ผลการทดลอง พบเครื่องหมาย CnCirD8 และเครื่องหมาย CN1H2 มีจำนวนแอลลีล (NA) สูงสุด จำนวน 16 แอลลีล เครื่องหมาย CAC23 มีจำนวนแอลลีลต่ำสุด จำนวน 3 แอลลีล เครื่องหมาย CN1H2 มีจำนวนจีโนไทป์ (GN) และค่าความหลากหลายของยีน (GD) สูงสุด สำหรับค่าเฮเทอโรไซโกซิตี้นั้น มีค่าระหว่าง 0.44 ถึง 0.70 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.58 และค่า PIC มีค่าระหว่าง 0.47 ถึง 0.90 มีค่าเฉลี่ย 0.71 ต่อเครื่องหมาย โดยเครื่องหมาย

CN1H2 มีค่า PIC สูงสุด จากค่าเฉลี่ย PIC ที่สูง (ตารางที่ 7) แสดงให้เห็นว่า เครื่องหมาย SSR ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ มีประสิทธิภาพสามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ในมะพร้าวต้นสูงได้เป็นอย่างดี ดังนั้นเครื่องหมายข่มร่วมชนิด SSR (multi-allelic, co-dominant markers) จึงเหมาะสมในการใช้จำแนกพันธุกรรมมะพร้าวต้นสูง และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Loiola et al. (2016) ที่พบค่า PIC เฉลี่ยสูง 0.71 ต่อเครื่องหมายจากการวิเคราะห์มะพร้าวต้นสูงของประเทศบราซิลด้วยเครื่องหมาย SSR และในตัวอย่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงมีค่าเฮเทอโรไซโกซิตี้สูงเนื่องจากมะพร้าวต้นสูงเกิดจากการผสมข้าม (cross-pollination) ส่งผลให้ลักษณะทางพันธุกรรมของมะพร้าวเป็นพันธุ์ทางที่สูง (heterozygosity) และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Teulat et al., 2000; Riangwong et al., 2020)

ตารางที่ 7 เครื่องหมาย SSR 15 เครื่องหมาย จำนวนแอลลีล (NA) จำนวนจีโนไทป์ (GN) ค่าความหลากหลายของยีน (GD) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี้ (H) และ ค่าประสิทธิภาพของเครื่องหมาย (PIC) โดยการวิเคราะห์ในมะพร้าวต้นสูง 240 ตัวอย่าง

No.	Marker	NA	GN	GD	H	PIC
1	CAC23	3	6	0.60	0.51	0.52
2	CAC50	13	26	0.75	0.56	0.71
3	CAC77	8	17	0.72	0.50	0.67
4	CNZ10	13	35	0.81	0.56	0.78
5	CNZ40	8	14	0.71	0.54	0.67
6	CNZ46	8	19	0.72	0.60	0.68
7	CnCirD8	16	47	0.86	0.58	0.84
8	CnCir51	9	25	0.71	0.60	0.66
9	CnCirA9	6	16	0.53	0.44	0.47
10	CnCirB12	12	42	0.83	0.66	0.81
11	CnCirC12	9	25	0.76	0.63	0.72
12	WCYZ1721	5	13	0.66	0.56	0.62
13	CN11A10	13	49	0.85	0.70	0.83
14	CN1G4	8	19	0.73	0.64	0.69
15	CN1H2	16	74	0.91	0.61	0.90
	Mean	**9.87**	**28.47**	**0.74**	**0.58**	**0.71**

NA (number of alleles) คือ จำนวนแอลลีลที่ต่างกันในแต่ละตำแหน่ง

GN (genotype number) คือ จำนวนจีโนไทป์

GD (gene diversity) คือ ค่าความหลากหลายของยีน

H (heterozygosity) คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี้

PIC (polymorphism information content) คือ ค่าประสิทธิภาพของเครื่องหมาย

3. การค้นหาเครื่องหมาย SNP ในจีโนมมะพร้าวต้นสูง

จากการถอดรหัสพันธุกรรมมะพร้าวต้นสูงโดยเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ด้วยเทคนิค GBS ในตัวอย่างมะพร้าวต้นสูง จำนวน 240 ตัวอย่าง ได้แก่ มะพร้าวไทย จำนวน 192 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศ จำนวน 48 ตัวอย่าง (เวียดนาม 26 ตัวอย่าง และ อินโดนีเซีย 22 ตัวอย่าง) ได้จำนวน reads ทั้งหมด 2,054,831,584 reads จำนวนเบสทั้งหมด 313.96 Gb ค่าเฉลี่ยจำนวน reads ในแต่ล่ะตัวอย่าง 8,561,798 reads โดยเปอร์เซ็นต์การ map เทียบกับจีโนมอ้างอิง Hainan Tall coconut (ASM812446v1) เฉลี่ยอยู่ที่ 99.51% และมีจำนวน SNPs ที่ยังไม่ได้ผ่านการคัดกรองเท่ากับ 528,197 ตำแหน่ง

การตรวจคัดกรองคุณภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยคัดเลือกเฉพาะตำแหน่งที่มี Minimum minor allele frequency (MAF) ≥ 0.01 และ missing data ≤ 10% พบเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด 114,749 เครื่องหมาย ประกอบด้วย เครื่องหมาย insertion/deletion (indel) จำนวน 4,592 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย SNP คุณภาพดี จำนวน 110,157 เครื่องหมาย โดยมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 16 คู่ และบน 7,850 scaffolds ของมะพร้าวต้นสูง และพบความถี่ของการเกิด SNP ทุกๆ 16,982 เบส ซึ่งพบเครื่องหมาย SNP ในบริเวณส่วนระหว่างยีน (Intergenic region) ที่ไม่มีการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน จำนวน 106,371 เครื่องหมาย คิดเป็น 96.56% ของเครื่องหมาย SNP ทั้งหมด และพบเครื่องหมาย SNP ในบริเวณบริเวณส่วนของยีน (genic region) ที่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน จำนวน 3,786 เครื่องหมาย คิดเป็น 3.56% ของเครื่องหมาย SNP ทั้งหมด ที่ประกอบด้วย เครื่องหมาย SNP บริเวณ intron จำนวน 3,157 เครื่องหมาย บริเวณ exon จำนวน 341 เครื่องหมาย บริเวณ 5'untranslated region (5'UTR) จำนวน 147 เครื่องหมาย และ บริเวณ 3'untranslated region (3''UTR) จำนวน 141 เครื่องหมาย แสดงให้เห็นถึงสัดส่วนของเครื่องหมาย indel และเครื่องหมาย SNP มีตำแหน่งบน Intergenic region มากกว่า genic region ซึ่งเป็นบริเวณยีนที่มีความอนุรักษ์ (conserve) สูง (Tatarinova et al., 2016) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Muñoz-Pérez et al. (2022) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในมะพร้าวแถบชายฝั่งแอตแลนติกและแปซิฟิกของประเทศโคลัมเบียด้วยเทคนิค GBS และในพืชอื่นๆ เช่น มะเขือเทศ (Esposito et al., 2020) ปาล์มน้ำมัน (Pootakham et al., 2015) ข้าว (Roy and Lachagari, 2017) จากเครื่องหมาย SNP ทั้งหมด ส่วนใหญ่พบประเภทของเครื่องหมาย SNP แบบการเปลี่ยนแปลงระหว่างเบสภายในกลุ่มพิวรีน (A/G) และภายในกลุ่มไพริมิดีน (C/T) เดียวกัน (transitions) 41.52% และ 41.89% ตามลำดับ และแบบการเปลี่ยนแปลงระหว่างเบสกลุ่มพิวรีนและกลุ่มไพริมิดีน (transversion) ได้แก่ A/C, A/T, C/G และ G/T คิดเป็น 4.53%, 4.63%, 3.04% และ 4.38% ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ประเภทและจำนวนเครื่องหมาย indel และเครื่องหมาย SNP จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค GBS ในตัวอย่างมะพร้าวสูง 240 ตัวอย่าง

Type	Number	Percentage (%)
Total number of polymorphisms	114,749	100.00
Indels	4,592	4.00
SNPs	110,157	96.00
Intergenic	106,371	96.56
Genic	3,786	3.44
Intron	3,157	2.87
Exon	341	0.31
5'UTR	147	0.13
3'UTR	141	0.13
Transition	91,887	83.42
A/G	45,742	41.53
C/T	46,145	41.89
Transversion	18,270	16.58
A/C	4,992	4.53
A/T	5,104	4.63
C/G	3,348	3.04
G/T	4,826	4.38

Indels คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อาศัยข้อมูลการเกิดการกลายแบบ Insertion/deletion

SNPs คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกิดจากความแตกต่างของชนิดนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว

Intergenic คือ บริเวณตำแหน่งระหว่างยีน

Genic คือ บริเวณตำแหน่งภายในยีน

Transition คือ การแทนที่ด้วยเบสในกลุ่มเดียวกัน ได้แก่ ในกลุ่มพิวรีน adenine (A) เข้าแทนที่ guanine (G) หรือกลับกัน และในกลุ่มไพริมิดีน cytocine (C) เข้าแทนที่ thymine (T) หรือกลับกัน

Transversion คือ การแทนที่เบสกลุ่มพิวรีนด้วยเบสกลุ่มไพริมิดีน หรือแทนที่เบสกลุ่มไพริมดีนด้วยเบสกลุ่มพิวรีน

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงโดยใช้เครื่องหมาย SSR และเครื่องหมาย SNP

4.1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงโดยใช้เครื่องหมาย SSR

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยต้นสูง 192 ตัวอย่าง ประกอบด้วย สมุทรสงคราม (S) 5 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 34 ตัวอย่าง ชุมพร (Ch) 25 ตัวอย่าง ชลบุรี (CB) 19 ตัวอย่าง นครศรีธรรมราช (NST) 40 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 13 ตัวอย่าง ปัตตานี (PT) 20 ตัวอย่าง ยะลา (YL) 16 ตัวอย่าง และนราธิวาส (N) 20 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 48 ตัวอย่าง ประกอบด้วย เวียดนาม (Viet) 26 ตัวอย่าง และอินโดนีเซีย (Indo) 22 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 15 เครื่องหมาย พบว่า ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างตัวอย่างมะพร้าวต้นสูงทั้งหมด มีค่าระหว่าง 0.117 ถึง 0.933 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.227 สำหรับตัวอย่างมะพร้าวที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด ได้แก่ ตัวอย่าง 134Pr (ประจวบคีรีขันธ์) และ ตัวอย่าง 135Pr (ประจวบคีรีขันธ์) และตัวอย่างมะพร้าวที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ได้แก่ ตัวอย่าง 15CB (ชลบุรี) และ ตัวอย่าง 106SNI (สุราษฎร์ธานี), ตัวอย่าง 20S (สมุทรสงคราม) และ ตัวอย่าง 76NST (นครศรีธรรมราช), ตัวอย่าง 41Ch (ชุมพร) และ ตัวอย่าง 76NST (นครศรีธรรมราช) เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) ด้วยวิธี neighbor- joining (NJ) ในมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง (ภาพที่ 6.1) พบความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มย่อย (subgroup) ตามลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ดังนี้

พันธุกรรมกลุ่มที่ 1 (I) เป็นกลุ่มที่มีจำนวนประชากรมากที่สุด จำนวน 74 ตัวอย่าง คิดเป็น 30.8% ของประชากรทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 50 ตัวอย่าง (20.8%) ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 13 ตัวอย่าง ชุมพร (Ch) 11 ตัวอย่าง นครศรีธรรมราช (NST) 9 ตัวอย่าง ชลบุรี (CB) 5 ตัวอย่าง ยะลา (YL) 4 ตัวอย่าง ปัตตานี (PT) 3 ตัวอย่าง สมุทรสงคราม (S) 2 ตัวอย่าง นราธิวาส (N) 2 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 1 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 24 ตัวอย่าง (10.0%) ได้แก่ เวียดนาม (Viet) 14 ตัวอย่าง และอินโดนีเซีย (Indo) 10 ตัวอย่าง

พันธุกรรมกลุ่มที่ 2 (Ⅱ) เป็นกลุ่มประชากรที่มีจำนวนรองลงมา จำนวน 72 ตัวอย่าง คิดเป็น 30.0% ของประชากรทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 62 ตัวอย่าง (25.8%) ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 15 ตัวอย่าง นครศรีธรรมราช (NST) 9 ตัวอย่าง ยะลา (YL) 9 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 7 ตัวอย่าง ชุมพร (Ch) 6 ตัวอย่าง นราธิวาส (N) 6 ตัวอย่าง ปัตตานี (PT) 6 ตัวอย่าง ชลบุรี (CB) 4 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 10 ตัวอย่าง (4.2%) ได้แก่ เวียดนาม (Viet) 6 ตัวอย่าง และอินโดนีเซีย (Indo) 4 ตัวอย่าง

พันธุกรรมกลุ่มที่ 3 (Ⅲ) เป็นกลุ่มประชากรที่มีจำนวน 43 ตัวอย่าง คิดเป็น 17.9% ของประชากรทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 37 ตัวอย่าง (15.4%) ได้แก่ นครศรีธรรมราช (NST) 10 ตัวอย่าง ชุมพร (Ch) 5 ตัวอย่าง ชลบุรี (CB) 5 ตัวอย่าง ปัตตานี (PT) 5 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 4 ตัวอย่าง นราธิวาส (N) 4 ตัวอย่าง สมุทรสงคราม (S) 2 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 1 ตัวอย่าง ยะลา (YL) 1 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 6 ตัวอย่าง (2.5%) ได้แก่ เวียดนาม (Viet) 4 ตัวอย่าง และอินโดนีเซีย (Indo) 2 ตัวอย่าง

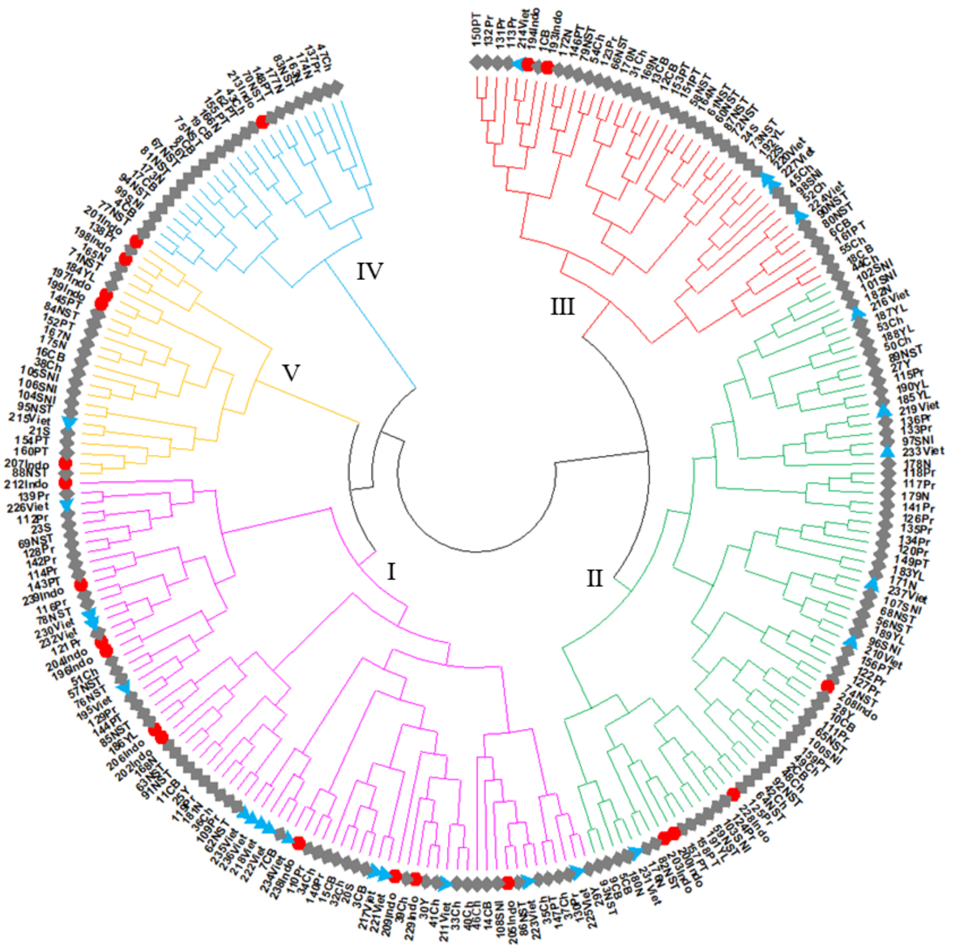
พันธุกรรมกลุ่มที่ 4 (**Ⅳ**) เป็นกลุ่มประชากรที่มีจำนวน 25 ตัวอย่าง คิดเป็น 10.4% ของประชากรทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 24 ตัวอย่าง (10.0%) ได้แก่ นครศรีธรรมราช (NST) 7 ตัวอย่าง นราธิวาส (N) 5 ตัวอย่าง ชลบุรี (CB) 4 ตัวอย่าง ปัตตานี (PT) 3 ตัวอย่าง ชุมพร (Ch) 2 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 1 ตัวอย่าง ยะลา (YL) 1 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 1 ตัวอย่าง และมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง (213Indo) 1 ตัวอย่าง (0.4%)

พันธุกรรมกลุ่มที่ 5 (**Ⅴ**) เป็นกลุ่มประชากรที่มีจำนวน 25 ตัวอย่าง คิดเป็น 10.4% ของประชากรทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 19 ตัวอย่าง (7.9%) ได้แก่ นครศรีธรรมราช (NST) 4 ตัวอย่าง ปัตตานี (PT) 4 ตัวอย่าง นราธิวาส (N) 3 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 3 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 1 ตัวอย่าง ยะลา (YL) 1 ตัวอย่าง ชลบุรี (CB) 1 ตัวอย่าง ชุมพร (Ch) 1 ตัวอย่าง สมุทรสงคราม (S) 1 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 6 ตัวอย่าง (2.5%) ได้แก่ เวียดนาม (Viet) 5 ตัวอย่าง และอินโดนีเซีย (Indo) 1 ตัวอย่าง

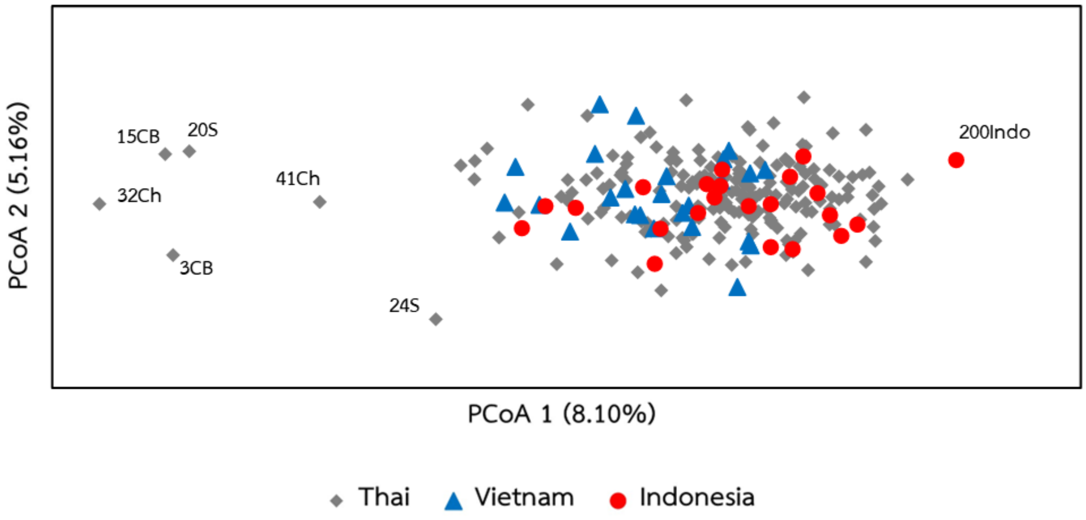
ผลการจัดกลุ่ม (cluster analysis) ด้วยวิธี neighbor- joining (NJ) ในมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 15 เครื่องหมาย แสดงให้เห็นว่า พันธุกรรมกลุ่มที่ 1 (**I**) มีจีโนไทป์ของมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงมากที่สุด คิดเป็น 10.0% ของประชากรทั้งหมด พันธุกรรมกลุ่มที่ 4 (**Ⅳ**) มีจีโนไทป์มะพร้าวต่างประเทศต้นสูงน้อยที่สุด คิดเป็น 0.4% ของประชากรทั้งหมด พันธุกรรมกลุ่มที่ 2 (**Ⅱ**) มีจีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูงมากที่สุด คิดเป็น 25.8% ของประชากรทั้งหมด และพันธุกรรมกลุ่มที่ 5 (**Ⅴ**) มีจีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูงน้อยที่สุด คิดเป็น 7.9% ของประชากรทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์การจัดกลุ่มแบบ principal coordinate analysis (PCoA) ในกลุ่มประชากรมะพร้าวไทยต้นสูง 192 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 48 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 15 เครื่องหมาย พบว่า องค์ประกอบที่ 1 (PCoA 1) สามารถอธิบายความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงได้ 8.10% และองค์ประกอบที่ 2 (PCoA 2) อธิบายได้ 5.16% โดยสององค์ประกอบนี้สามารถอธิบายความแปรปรวนทางพันธุกรรมรวมของกลุ่มประชากรได้ 13.26% แสดงให้เห็นว่า มะพร้าวไทยและมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงมีการปะปนกันของกลุ่มประชากรที่มีจีโนไทป์คล้ายกัน ไม่สามารถจัดแยกกลุ่มย่อย (subgroup) ได้อย่างชัดเจน ยกเว้นมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง 1 ตัวอย่าง (200Indo) และมะพร้าวไทยต้นสูง 6 ตัวอย่าง (3CB, 15CB, 20S, 24S, 32Ch และ 41Ch) ที่มีการกระจายตัวแยกออกมา (ภาพที่ 6.2) โดยสอดคล้องการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.227และการจัดกลุ่มแบบเดนโดรแกรมด้วยวิธี neighbor- joining (NJ) (ภาพที่ 6.1) ที่แสดงถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยกับมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง (อินโดนีเซียและเวียดนาม) หรืออาจกล่าวได้ว่า มะพร้าวต้นสูงไทย อินโดนีเซีย และเวียดนาม มีบรรพบุรุษ (ancestor) ร่วมกัน โดยมีการกระจายพันธุ์ไปยังแหล่งปลูกต่างๆ ภายหลัง

1)



2)



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยต้นสูง 192 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 48 ตัวอย่าง ประกอบด้วย เวียดนาม 26 ตัวอย่าง และอินโดนีเซีย 22 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 15 เครื่องหมาย 1) เดนโดรแกรมด้วยวิธี neighbor- joining 2) แผนภาพการกระจายตัวและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ principle coordinate analysis (PCoA)

4.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงโดยใช้เครื่องหมาย SNP

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทย 192 ตัวอย่าง ประกอบด้วย สมุทรสงคราม (S) 5 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 34 ตัวอย่าง ชุมพร (Ch) 25 ตัวอย่าง ชลบุรี (CB) 19 ตัวอย่าง นครศรีธรรมราช (NST) 40 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 13 ตัวอย่าง ปัตตานี (PT) 20 ตัวอย่าง ยะลา (YL) 16 ตัวอย่าง และนราธิวาส (N) 20 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศ 48 ตัวอย่าง ประกอบด้วย เวียดนาม (Viet) 26 ตัวอย่าง และอินโดนีเซีย (Indo) 22 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SNP ที่ผ่านการคัดกรอง missing data ที่ระดับน้อยกว่า 20% ค่า minor allele frequency (MAF) ที่ระดับ 0.01 และค่า coverage depth ≥3 จำนวน 3,532 เครื่องหมาย พบว่า ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างตัวอย่างมะพร้าวต้นสูงทั้งหมด มีค่าระหว่าง 0.001 ถึง 0.070 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.013 สำหรับตัวอย่างมะพร้าวที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด ได้แก่ ตัวอย่าง 32Ch (ชุมพร) และ ตัวอย่าง 15CB (ชลบุรี), ตัวอย่าง 32Ch (ชุมพร) และ ตัวอย่าง 3CB (ชลบุรี) ตัวอย่างมะพร้าวที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ได้แก่ ตัวอย่าง 40Ch (ชุมพร) และตัวอย่าง 200Indo (อินโดนีเซีย) เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) ด้วยวิธี neighbor- joining (NJ) ในมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง (ภาพที่ 7.1) พบความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มย่อย (subgroup) ตามลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ดังนี้

พันธุกรรมกลุ่มที่ 1 (I) เป็นกลุ่มที่มีจำนวนประชากรมากที่สุด จำนวน 60 ตัวอย่าง คิดเป็น 25.0% ของประชากรทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 52 ตัวอย่าง (21.7%) ได้แก่ นครศรีธรรมราช (NST) 15 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 11 ตัวอย่าง ปัตตานี (PT) 6 ตัวอย่าง ชลบุรี (CB) 5 ตัวอย่าง ยะลา (YL) 5 ตัวอย่าง นราธิวาส (N) 3 ตัวอย่าง ชุมพร (Ch) 3 ตัวอย่าง สมุทรสงคราม (S) 2 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 2 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 8 ตัวอย่าง (3.3%) ได้แก่ เวียดนาม (Viet) 6 ตัวอย่าง และอินโดนีเซีย (Indo) 2 ตัวอย่าง

พันธุกรรมกลุ่มที่ 2 (II) เป็นกลุ่มประชากรที่มีจำนวนรองลงมา จำนวน 57 ตัวอย่าง คิดเป็น 23.7% ของประชากรทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 37 ตัวอย่าง (15.4%) ได้แก่ ชุมพร (Ch) 8 ตัวอย่าง นครศรีธรรมราช (NST) 7 ตัวอย่าง นราธิวาส (N) 6 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 6 ตัวอย่าง ชลบุรี (CB) 3 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 3 ตัวอย่าง ปัตตานี (PT) 2 ตัวอย่าง ยะลา (YL) 2 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 20 ตัวอย่าง (8.3%) ได้แก่ อินโดนีเซีย (Indo) 15 ตัวอย่าง และเวียดนาม (Viet) 5 ตัวอย่าง

พันธุกรรมกลุ่มที่ 3 (III) เป็นกลุ่มประชากรที่มีจำนวน 50 ตัวอย่าง คิดเป็น 20.8% ของประชากรทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 45 ตัวอย่าง (18.7%) ได้แก่ นครศรีธรรมราช (NST) 11 ตัวอย่าง นราธิวาส (N) 8 ตัวอย่าง ชุมพร (Ch) 5 ตัวอย่างประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 5 ตัวอย่าง ชลบุรี (CB) 4 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 4 ตัวอย่าง ปัตตานี (PT) 4 ตัวอย่าง สมุทรสงคราม (S) 3 ตัวอย่าง ยะลา (YL) 1 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 5 ตัวอย่าง (2.1%) ได้แก่ อินโดนีเซีย (Indo) 3 ตัวอย่าง และเวียดนาม (Viet) 2 ตัวอย่าง

พันธุกรรมกลุ่มที่ 4 (IV) เป็นกลุ่มประชากรที่มีจำนวน 44 ตัวอย่าง คิดเป็น 18.3% ของประชากรทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 29 ตัวอย่าง (12.1%) ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 7 ตัวอย่าง ชลบุรี (CB) 7 ตัวอย่าง ชุมพร (Ch) 5 ตัวอย่าง นครศรีธรรมราช (NST) 4 ตัวอย่าง ปัตตานี (PT) 2 ตัวอย่าง ยะลา (YL)

2 ตัวอย่าง นราธิวาส (N) 1 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 1 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 15 ตัวอย่าง (6.2%) ได้แก่ เวียดนาม (Viet) 12 ตัวอย่าง และอินโดนีเซีย (Indo) 3 ตัวอย่าง

พันธุกรรมกลุ่มที่ 5 (**V**) เป็นกลุ่มประชากรที่มีตัวอย่างน้อยที่สุด จำนวน 29 ตัวอย่าง คิดเป็น 12.1% ของประชากรทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 28 ตัวอย่าง (11.7%) ได้แก่ ปัตตานี (PT) 6 ตัวอย่าง ยะลา (YL) 6 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 5 ตัวอย่าง ชุมพร (Ch) 4 ตัวอย่าง นครศรีธรรมราช (NST) 3 ตัวอย่าง นราธิวาส (N) 2 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 2 ตัวอย่าง และมะพร้าวเวียดนามต้นสูง (237Viet) 1 ตัวอย่าง (0.4%)

ผลการจัดกลุ่ม (cluster analysis) ด้วยวิธี neighbor- joining (NJ) ในมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง โดยใช้เครื่องหมาย SNP จำนวน 3,532 เครื่องหมาย แสดงให้เห็นว่า พันธุกรรมกลุ่มที่ 2 (**II**) มีจีโนไทป์ของมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงมากที่สุด คิดเป็น 8.3% ของประชากรทั้งหมด พันธุกรรมกลุ่มที่ 5 (**V**) มีจีโนไทป์มะพร้าวต่างประเทศต้นสูงน้อยที่สุด คิดเป็น 0.4% ของประชากรทั้งหมด พันธุกรรมกลุ่มที่ 1 (**I**) มีจีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูงมากที่สุด คิดเป็น 25.8% ของประชากรทั้งหมด และพันธุกรรมกลุ่มที่ 5 (**V**) มีจีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูงน้อยที่สุด คิดเป็น 11.7% ของประชากรทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์การจัดกลุ่มแบบ principal coordinate analysis (PCoA) ในกลุ่มประชากรมะพร้าวไทยต้นสูง 192 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 48 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SNP จำนวน 3,532 เครื่องหมาย พบว่า องค์ประกอบที่ 1 (PCoA 1) สามารถอธิบายความแปรปรวนของกลุ่มประชากรมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงได้ 8.36% และองค์ประกอบที่ 2 (PCoA 2) อธิบายได้ 1.73% โดยสององค์ประกอบนี้สามารถอธิบายความแปรปรวนทางพันธุกรรมรวมของกลุ่มประชากรนี้ได้ 10.09% แสดงให้เห็นว่า มะพร้าวไทยและมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงมีการปะปนกันของกลุ่มประชากรที่มีจีโนไทป์คล้ายกัน ไม่สามารถจัดแยกกลุ่มย่อย (subgroup) ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 7.2) โดยสอดคล้องกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.013 และการจัดกลุ่มแบบเดนโดรแกรมด้วยวิธี neighbor- joining (NJ) ที่แสดงถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยกับมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง (อินโดนีเซียและเวียดนาม) อีกทั้งยังสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศโดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 15 เครื่องหมาย (ภาพที่ 6) ที่มีการกระจายตัวระหว่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงเป็นไปในแนวทางเดียวกัน

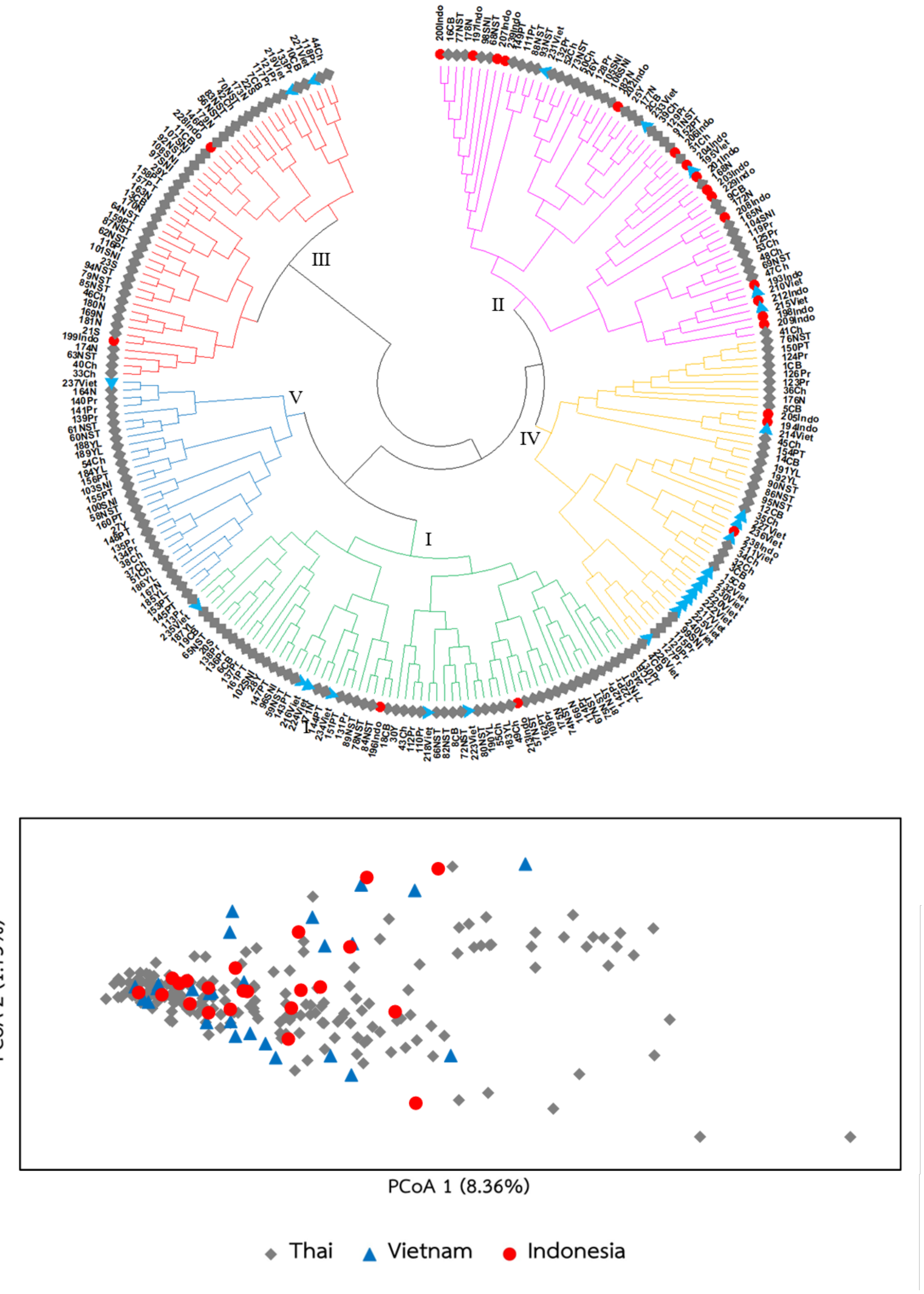
ผลการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ในมะพร้าวต้นสูงทั้งหมด โดยใช้เครื่องหมาย SNP จำนวน 3,532 เครื่องหมาย มีค่าระหว่าง 0.001 ถึง 0.070 ซึ่งมีค่าที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่าผลการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมในมะพร้าวต้นสูงทั้งหมด โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 15 เครื่องหมาย ที่มีค่าระหว่าง 0.117 ถึง 0.933 เนื่องจากเครื่องหมาย SNP มีตำแหน่งการกระจายตัวทั่วจีโนมและมีจำนวนมากกว่าเครื่องหมาย SSR จึงมีความละเอียดในการจำแนกตัวอย่างมะพร้าวต้นสูง

ผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวต้นสูงของไทย อินโดนีเซีย และเวียดนาม ทั้งในเครื่องหมาย SSR และเครื่องหมาย SNP แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างมะพร้าวแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นกลุ่มประชากรเดียวกันหรือมีบรรพบุรุษ (ancestor) ร่วมกัน โดยเกิดจากการแพร่กระจายพันธุ์ของมะพร้าวไปยัง

แหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทั้งทางทะเลและจากมนุษย์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xiao et al., (2013) ที่พบความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวในประเทศจีนและมะพร้าวจากประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงโดยใช้เครื่องหมาย SSR ดังนั้นการจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงจึงจำเป็นต้องใช้ชุดเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ประกอบไปด้วยจำนวนเครื่องหมายที่มากพอที่จะสามารถจำแนกตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงออกจากมะพร้าวไทยต้นสูงได้ โดยเครื่องหมาย SNP เป็นเครื่องหมายที่เหมาะสมในการตรวจสอบและจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศ เนื่องจากเครื่องหมาย SNP มีจำนวนมากและกระจายตัวทั่วจีโนมของมะพร้าว อีกทั้งยังมีความถูกต้องและแม่นยำสูง

1)

2)



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยต้นสูง 192 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 48 ตัวอย่าง ประกอบด้วย เวียดนาม 26 ตัวอย่าง และอินโดนีเซีย 22 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SNP จำนวน 3,532 เครื่องหมาย 1) เดนโดรแกรมด้วยวิธี neighbor- joining 2) แผนภาพการกระจายตัวและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ principle coordinate analysis (PCoA)

5. การคัดเลือกเครื่องหมาย SNP ที่ให้ความแตกต่าง (polymorphism) ในมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง

การใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 15 เครื่องหมาย หรือเพียง 15 ตำแหน่ง (loci) บนโครโมโซม ซึ่งไม่ครอบคลุมทั้งจีโนม ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้เครื่องหมาย SNP ที่ผ่านการคัดกรองคุณภาพและมีการกระจายตัวทั่วจีโนม จำนวน 110,157 เครื่องหมาย นำมาผ่านการคัดเลือกจีโนไทป์ในตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง จำนวน 48 ตัวอย่าง (อินโดนีเซีย 22 ตัวอย่าง และเวียดนาม 26 ตัวอย่าง) ที่มีความแตกต่างและไม่ตรงกับจีโนไทป์ของตัวอย่างมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง โดยคัดเครื่องหมาย SNP ที่จำแนกตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้มากกว่าหรือเท่ากับ 3 ตัวอย่างขึ้นไป ซึ่งประกอบด้วย เครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง (อินโดนีเซียและเวียดนาม) ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง เครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง และเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวเวียดนามต้นสูงออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง

โดยการตั้งชื่อเครื่องหมาย SNP (Marker notation) จะตั้งชื่อด้วยโครโมโซมหรือ scaffold ของมะพร้าวต้นสูง (Hainan Tall coconut) ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) ตามด้วยตำแหน่งที่อยู่บนโครโมโซมหรือ scaffold นั้นๆ เช่น เครื่องหมาย CM017872.55150185 หมายถึง เครื่องหมาย SNP นี้ อยู่บนโครโมโซม CM017872 ที่ตำแหน่ง 55150185 หรือเครื่องหมาย VOII01000447.139559 หมายถึง เครื่องหมาย SNP นี้ อยู่บน scaffold VOII01000447 ที่ตำแหน่ง 139559

จากผลการค้นหาเครื่องหมาย SNP ทั้งหมดของจีโนมมะพร้าวที่ศึกษาครั้งนี้ จำนวน 110,157 เครื่องหมาย พบเครื่องหมาย SNP จำนวน 347 เครื่องหมาย ที่สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง จำนวน 48 ตัวอย่าง (อินโดนีเซียและเวียดนาม) ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง โดยมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 15 คู่ และบน 130 scaffolds ของจีโนมมะพร้าวต้นสูง ประกอบด้วย เครื่องหมาย SNP จำนวน 1 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย VOII01000447.139559) สามารถจำแนกตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้สูงสุด จำนวน 7 ตัวอย่าง รองลงมาเครื่องหมาย SNP จำนวน 9 เครื่องหมาย สามารถจำแนกตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้ 6 ตัวอย่าง เครื่องหมาย SNP จำนวน 57 เครื่องหมาย สามารถจำแนกตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้ 5 ตัวอย่าง เครื่องหมาย SNP จำนวน 99 เครื่องหมาย สามารถจำแนกตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้ 4 ตัวอย่าง และเครื่องหมาย SNP จำนวน 181 เครื่องหมาย สามารถจำแนกตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้ 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 แอลลีลของเครื่องหมาย SNP (Alleles) ตำแหน่งบนโครโมโซมหรือ scaffold (Chromosome/Scaffold) จีโนไทป์สำหรับการจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง (Indonesia & Vietnam) และ จีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูง (Thailand)

No.	Alleles	Chromosome/Scaffold	Position	Genotype of coconut	
				Indonesia & Vietnam	Thailand
1	C/T	CM017872.1	55150185	C/T	C/C,T/T
2	A/C	CM017872.1	66083059	A/C	A/A,C/C
3	C/T	CM017872.1	70622030	C/T	C/C
4	G/A	CM017872.1	70765902	A/A,G/A	G/G
5	G/A	CM017872.1	73055516	G/A	G/G
6	G/A	CM017872.1	75279499	G/A	G/G
7	C/G	CM017872.1	79752924	C/G	C/C
8	C/T	CM017872.1	81709826	C/T	C/C
9	G/T	CM017872.1	83845500	G/T	G/G
10	T/C	CM017872.1	90029412	T/C	T/T
11	A/G	CM017872.1	90029446	A/G	A/A
12	T/C	CM017872.1	90029643	T/C	T/T
13	G/A	CM017872.1	92404284	G/A,A/A	G/G
14	A/G	CM017872.1	92404296	A/G,G/G	A/A
15	C/T	CM017872.1	92404297	C/T,T/T	C/C
16	T/C	CM017872.1	92404312	T/C,C/C	T/T
17	G/A	CM017872.1	92404326	G/A,A/A	G/G
18	C/T	CM017872.1	92404358	C/T,T/T	C/C
19	C/T	CM017872.1	94597401	C/T,T/T	C/C
20	A/G	CM017872.1	94597442	A/G,G/G	A/A
21	G/A	CM017873.1	1148710	G/A	G/G
22	G/A	CM017873.1	20056828	G/A	G/G,A/A
23	G/C	CM017873.1	32577620	G/C	G/G,C/C
24	T/C	CM017873.1	77327674	T/C	T/T
25	C/T	CM017874.1	13436039	C/T	C/C
26	T/C	CM017874.1	27933322	T/C	T/T
27	C/T	CM017874.1	27933424	C/T	C/C
28	G/A	CM017874.1	31651429	G/A	G/G
29	C/G	CM017874.1	37412429	C/G	C/C
30	T/C	CM017874.1	37412489	T/C	T/T
31	C/A	CM017874.1	40124418	C/A,A/A	C/C
32	C/T	CM017874.1	40124573	C/T,T/T	C/C
33	A/G	CM017874.1	48485814	A/G,G/G	A/A
34	A/G	CM017874.1	48485901	A/G,G/G	A/A
35	G/C	CM017874.1	8276208	G/C	G/G
36	A/G	CM017874.1	8276280	A/G	A/A
37	C/T	CM017875.1	1452347	C/T,T/T	C/C

No.	Alleles	Chromosome/Scaffold	Position	Genotype of coconut	
				Indonesia & Vietnam	Thailand
38	C/T	CM017875.1	19104761	C/T	C/C
39	C/T	CM017875.1	3358495	C/T,T/T	C/C
40	G/A	CM017875.1	3366866	G/A	G/G
41	C/T	CM017875.1	456534	T/T	C/C,C/T
42	G/A	CM017875.1	46834367	G/A	G/G
43	G/A	CM017875.1	51254257	G/A	G/G
44	G/A	CM017875.1	5525073	G/A	G/G
45	G/T	CM017875.1	7891331	G/T	G/G
46	T/G	CM017875.1	7927479	T/G	T/T
47	A/G	CM017876.1	37625078	A/G	A/A
48	A/G	CM017876.1	37656057	A/G	A/A
49	C/T	CM017876.1	37782654	C/T	C/C
50	C/T	CM017876.1	44584423	C/T,T/T	C/C
51	C/T	CM017876.1	44584438	C/T,T/T	C/C
52	A/G	CM017876.1	44584453	A/G,G/G	A/A
53	G/A	CM017876.1	44584486	G/A,A/A	G/G
54	C/T	CM017876.1	48958553	C/T,T/T	C/C
55	C/T	CM017876.1	49072061	T/T	C/C,C/T
56	G/A	CM017876.1	49072116	A/A	G/G,G/A
57	C/T	CM017876.1	49130428	C/T,T/T	C/C
58	C/T	CM017876.1	49130513	C/T,T/T	C/C
59	G/A	CM017876.1	49130514	G/A,A/A	G/G
60	G/A	CM017876.1	49130529	G/A,A/A	G/G
61	C/T	CM017876.1	49456714	T/T	C/C
62	G/C	CM017876.1	53111902	G/C	G/G,C/C
63	T/G	CM017876.1	55134948	G/G	T/T,T/G
64	C/T	CM017876.1	8695889	C/T	C/C,T/T
65	C/T	CM017877.1	55787627	C/T	C/C
66	C/T	CM017877.1	55787644	C/T	C/C
67	C/T	CM017877.1	55969696	C/T,T/T	C/C
68	G/A	CM017877.1	78013438	G/A	G/G
69	A/G	CM017877.1	81328843	A/G	A/A
70	C/T	CM017878.1	10578635	C/T	C/C,T/T
71	A/G	CM017878.1	10578681	A/G	A/A,G/G
72	C/T	CM017878.1	47206300	C/T,T/T	C/C
73	G/A	CM017878.1	61114069	A/A	G/G,G/A
74	G/A	CM017878.1	61116524	A/A	G/G,G/A
75	G/T	CM017878.1	61116652	T/T	G/G,G/T
76	C/T	CM017879.1	42712991	C/T	C/C
77	C/T	CM017879.1	42761423	T/T	C/C,C/T
78	G/A	CM017880.1	10104294	G/A	G/G
79	G/A	CM017880.1	11370264	G/A	G/G,A/A

No.	Alleles	Chromosome/Scaffold	Position	Genotype of coconut	
				Indonesia & Vietnam	Thailand
80	C/T	CM017880.1	11491701	C/T	C/C,T/T
81	C/G	CM017880.1	12293543	C/G	C/C
82	G/A	CM017880.1	14079993	G/A,A/A	G/G
83	C/T	CM017880.1	19677550	C/T	C/C,T/T
84	G/A	CM017880.1	20199429	G/A	G/G
85	A/T	CM017880.1	20998800	A/T	A/A
86	A/G	CM017880.1	20998915	A/G	A/A
87	T/C	CM017880.1	21461152	T/C,C/C	T/T
88	A/G	CM017880.1	21482107	A/G	A/A,G/G
89	T/C	CM017880.1	21482150	T/C	T/T,C/C
90	C/T	CM017880.1	21482235	C/T	C/C,T/T
91	C/T	CM017880.1	21978933	C/T	C/C
92	C/T	CM017880.1	22975646	C/T	C/C
93	G/A	CM017880.1	23013340	G/A	G/G
94	G/A	CM017880.1	23451183	G/A	G/G
95	C/T	CM017880.1	23451193	C/T	C/C
96	G/A	CM017880.1	23886019	G/A	G/G
97	A/C	CM017880.1	26448825	A/C	A/A,C/C
98	G/A	CM017880.1	26511914	G/A	G/G
99	C/T	CM017880.1	27455527	C/T	C/C
100	G/A	CM017880.1	27455585	G/A	G/G
101	T/C	CM017880.1	27455635	T/C	T/T
102	C/T	CM017880.1	27455696	C/T	C/C
103	T/C	CM017880.1	27455727	T/C	T/T
104	G/A	CM017880.1	30191230	A/A	G/G,G/A
105	A/G	CM017880.1	39435312	A/G	A/A
106	T/C	CM017880.1	7344896	C/C,T/C	T/T
107	C/T	CM017880.1	8546850	C/T	C/C,T/T
108	G/A	CM017881.1	26833108	G/A,A/A	G/G
109	C/T	CM017882.1	25370686	C/T	C/C,T/T
110	G/A	CM017882.1	27356723	G/A	G/G
111	C/T	CM017882.1	27356755	C/T	C/C
112	T/C	CM017882.1	27356871	T/C	T/T
113	T/C	CM017882.1	27356900	T/C	T/T
114	A/G	CM017882.1	27356903	A/G	A/A
115	G/A	CM017882.1	27356933	G/A	G/G
116	G/A	CM017882.1	29972366	G/A	G/G
117	A/G	CM017883.1	20458290	A/G	A/A
118	G/A	CM017883.1	20458372	G/A	G/G
119	A/G	CM017883.1	23938823	A/G	A/A
120	T/C	CM017883.1	23938886	T/C	T/T
121	G/A	CM017883.1	24437150	G/A,A/A	G/G

No.	Alleles	Chromosome/Scaffold	Position	Genotype of coconut	
				Indonesia & Vietnam	Thailand
122	G/A	CM017883.1	250499	A/A	G/G,G/A
123	C/T	CM017883.1	250589	T/T	C/C,C/T
124	T/C	CM017885.1	13932255	C/C	T/T,T/C
125	G/A	CM017885.1	21700595	G/A	G/G
126	G/A	CM017886.1	7934115	G/A	G/G,A/A
127	G/A	CM017887.1	13698927	G/A,A/A	G/G
128	G/A	CM017887.1	23199963	G/A	G/G,A/A
129	G/C	CM017887.1	34017306	C/C	G/G,G/C
130	T/C	CM017887.1	34017336	C/C	T/T,T/C
131	C/T	CM017887.1	34017346	T/T	C/C,C/T
132	G/A	CM017887.1	8194646	G/A	G/G
133	G/A	CM017887.1	8194652	G/A	G/G
134	C/T	CM017887.1	8194668	C/T	C/C
135	C/T	CM017887.1	8194683	C/T	C/C
136	C/T	CM017887.1	8194775	C/T	C/C
137	T/C	CM017887.1	8194788	T/C	T/T
138	C/T	CM017887.1	8194794	C/T	C/C
139	G/A	CM017887.1	8194807	G/A	G/G
140	G/A	CM017887.1	8194810	G/A	G/G
141	G/A	CM017887.1	8194831	G/A	G/G
142	C/T	VOII01000040.1	583007	C/T	C/C
143	A/G	VOII01000122.1	1076746	A/G	A/A
144	C/T	VOII01000122.1	1526121	C/T	C/C
145	G/A	VOII01000122.1	1526217	G/A	G/G
146	G/A	VOII01000122.1	1526220	G/A	G/G
147	T/C	VOII01000122.1	1526242	T/C	T/T
148	G/A	VOII01000122.1	1526263	G/A	G/G
149	G/A	VOII01000122.1	1526292	G/A	G/G
150	G/A	VOII01000122.1	1964031	G/A	G/G
151	C/T	VOII01000122.1	688145	C/T	C/C,T/T
152	A/G	VOII01000122.1	688232	A/G	A/A,G/G
153	C/T	VOII01000122.1	831158	C/T	C/C,T/T
154	G/T	VOII01000166.1	1315722	G/T	G/G
155	A/G	VOII01000166.1	279895	G/G	A/A,A/G
156	T/C	VOII01000166.1	280035	C/C	T/T,T/C
157	G/A	VOII01000172.1	1382490	G/A	G/G
158	G/A	VOII01000172.1	329347	G/A	G/G,A/A
159	C/T	VOII01000172.1	329397	C/T,T/T	C/C
160	C/T	VOII01000183.1	160134	C/T	C/C
161	G/A	VOII01000183.1	707844	G/A	G/G
162	G/A	VOII01000251.1	1867	G/A	G/G
163	C/T	VOII01000253.1	74788	T/T	C/C,C/T

No.	Alleles	Chromosome/Scaffold	Position	Genotype of coconut	
				Indonesia & Vietnam	Thailand
164	T/C	VOII01000282.1	145620	C/C	T/T,T/C
165	G/T	VOII01000282.1	273156	G/T	G/G
166	G/A	VOII01000282.1	543790	A/A	G/G,G/A
167	A/C	VOII01000282.1	822647	A/C	A/A
168	G/A	VOII01000315.1	7643	G/A	G/G,A/A
169	G/A	VOII01000378.1	59525	G/A	G/G,A/A
170	C/T	VOII01000447.1	139559	A/T	C/C,T/T
171	G/A	VOII01000447.1	139604	G/A	G/G,A/A
172	C/T	VOII01000461.1	209913	C/T,T/T	C/C
173	A/C	VOII01000501.1	585941	A/C	A/A
174	C/T	VOII01000512.1	487793	C/T,T/T	C/C
175	G/A	VOII01000512.1	535253	G/A	G/G
176	C/T	VOII01000578.1	1051994	T/T	C/C
177	C/T	VOII01000653.1	119216	C/T	C/C
178	T/C	VOII01000653.1	140608	T/C	T/T
179	C/T	VOII01000653.1	214860	C/T	C/C
180	C/T	VOII01000653.1	214901	C/T	C/C
181	G/A	VOII01000653.1	411775	G/A	G/G
182	G/A	VOII01000653.1	411776	G/A	G/G
183	G/C	VOII01000653.1	411789	G/C	G/G
184	C/T	VOII01000675.1	1714793	C/T	C/C,T/T
185	G/A	VOII01000683.1	291752	A/A	G/G,G/A
186	C/T	VOII01000683.1	56105	T/T	C/C,C/T
187	C/A	VOII01000738.1	245718	C/A	C/C
188	C/T	VOII01000738.1	513	C/T	C/C,T/T
189	C/T	VOII01000786.1	96980	T/T	C/C,C/T
190	A/G	VOII01000794.1	188238	A/G,G/G	A/A
191	C/T	VOII01000904.1	466677	C/T,T/T	C/C
192	G/A	VOII01000912.1	216182	G/A,A/A	G/G
193	C/T	VOII01000991.1	203000	C/T	C/C
194	T/C	VOII01000991.1	52651	T/C	T/T
195	T/C	VOII01000991.1	52704	T/C	T/T
196	G/A	VOII01000991.1	52711	G/A	G/G
197	A/G	VOII01000991.1	52723	A/G	A/A
198	A/G	VOII01000991.1	52740	A/G	A/A
199	G/A	VOII01000991.1	52759	A/G	G/G
200	C/T	VOII01000991.1	52764	C/T	C/C
201	C/T	VOII01001019.1	1641	C/T,T/T	C/C
202	C/T	VOII01001098.1	67445	C/T	C/C,T/T
203	G/A	VOII01001112.1	388065	G/A,A/A	G/G
204	C/T	VOII01001129.1	5512	C/T	C/C,T/T
205	T/C	VOII01001143.1	54819	T/C	T/T,C/C

No.	Alleles	Chromosome/Scaffold	Position	Genotype of coconut	
				Indonesia & Vietnam	Thailand
206	T/G	VOII01001143.1	54932	T/G	T/T,G/G
207	C/T	VOII01001143.1	55000	C/T	C/C,T/T
208	A/G	VOII01001143.1	55016	A/G	A/A
209	C/T	VOII01001225.1	195792	C/T	C/C,T/T
210	A/G	VOII01001228.1	545010	A/G	A/A,G/G
211	C/T	VOII01001251.1	620763	C/T	C/C,T/T
212	C/T	VOII01001526.1	333759	C/T	C/C,T/T
213	G/A	VOII01001559.1	272063	G/A	G/G
214	G/T	VOII01001571.1	1204	G/T	G/G
215	G/A	VOII01001638.1	98655	A/A	G/G,G/A
216	C/T	VOII01001694.1	366301	C/T	C/C
217	C/T	VOII01001846.1	574345	C/T	C/C
218	C/T	VOII01001917.1	167779	C/T	C/C,T/T
219	C/T	VOII01001988.1	294700	C/T,T/T	C/C
220	A/T	VOII01002051.1	286577	A/T	A/A,T/T
221	T/C	VOII01002058.1	620480	C/C	T/T,T/C
222	C/T	VOII01002058.1	658817	T/T	C/C,C/T
223	C/T	VOII01002079.1	362315	T/T	C/C,C/T
224	G/A	VOII01002123.1	18175	G/A,A/A	G/G
225	T/C	VOII01002246.1	177703	T/C	T/T
226	A/G	VOII01002405.1	403132	A/G	A/A
227	C/T	VOII01002558.1	48036	C/T,T/T	C/C
228	G/A	VOII01002597.1	87133	G/A	G/G
229	C/T	VOII01002597.1	88180	C/T	C/C,T/T
230	C/T	VOII01002719.1	1130523	C/T	C/C
231	G/A	VOII01002719.1	149118	G/A	G/G
232	A/G	VOII01002719.1	300600	A/G	A/A
233	G/A	VOII01002730.1	89361	G/A	G/G
234	C/T	VOII01002776.1	6076	C/T	C/C,T/T
235	T/C	VOII01002956.1	19522	T/C	T/T,C/C
236	G/A	VOII01003019.1	102247	G/A	G/G
237	T/A	VOII01003043.1	138849	T/A	T/T,A/A
238	A/G	VOII01003089.1	50933	A/G	A/A
239	C/T	VOII01003104.1	300014	T/T	C/C./C/T
240	G/A	VOII01003104.1	300137	A/A	G/G,G/A
241	T/C	VOII01003104.1	4694	T/C	T/T,C/C
242	G/A	VOII01003104.1	4816	G/A	G/G,A/A
243	C/T	VOII01003150.1	251284	T/T	C/C,C/T
244	T/C	VOII01003150.1	41618	C/C	T/T,C/T
245	T/C	VOII01003150.1	41822	C/C	T/T,C/T
246	T/A	VOII01003173.1	114775	T/A,A/A	T/T
247	C/T	VOII01003184.1	42743	C/T	C/C,T/T

No.	Alleles	Chromosome/Scaffold	Position	Genotype of coconut	
				Indonesia & Vietnam	Thailand
248	C/T	VOII01003222.1	168571	C/T,T/T	C/C
249	T/G	VOII01003317.1	147198	G/G	T/T,T/G
250	A/G	VOII01003317.1	147211	G/G	A/A,A/G
251	C/T	VOII01003328.1	52569	C/T	C/C
252	A/T	VOII01003344.1	138237	A/T	A/A,T/T
253	C/T	VOII01003593.1	12292	C/T	C/C
254	T/A	VOII01003593.1	7600	T/A	T/T
255	T/C	VOII01003815.1	303202	T/C	T/T,C/C
256	G/A	VOII01003877.1	27316	G/A	G/G
257	G/A	VOII01003923.1	314511	G/A,A/A	G/G
258	C/T	VOII01004146.1	72303	T/T	C/C,C/T
259	C/T	VOII01004181.1	84272	C/T	C/C
260	C/T	VOII01004181.1	89706	C/T	C/C
261	C/G	VOII01004400.1	280336	G/G	C/C,C/G
262	C/T	VOII01004429.1	110586	C/T	C/C,T/T
263	G/A	VOII01004429.1	45204	G/A	G/G
264	C/T	VOII01004475.1	89539	C/T,T/T	C/C
265	C/T	VOII01004679.1	25006	C/T	C/C
266	T/C	VOII01004842.1	26135	T/C,C/C	T/T
267	C/T	VOII01004842.1	26366	C/T,T/T	C/C
268	G/A	VOII01004968.1	10472	G/A	G/G,A/A
269	C/T	VOII01005204.1	93468	C/T	C/C
270	C/T	VOII01005399.1	23895	C/T,T/T	C/C
271	C/T	VOII01005572.1	151352	T/T	C/C,C/T
272	G/T	VOII01005645.1	15228	G/T,T/T	G/G
273	C/T	VOII01005804.1	39073	T/T	C/C,C/T
274	T/C	VOII01005838.1	120177	T/C	T/T
275	C/T	VOII01005838.1	120197	C/T	C/C
276	C/T	VOII01005838.1	77910	C/T	C/C
277	T/G	VOII01005996.1	40471	T/G	T/T
278	G/A	VOII01006115.1	4503	G/A	G/G,A/A
279	C/T	VOII01006337.1	32068	C/T,T/T	C/C
280	C/T	VOII01006507.1	39287	C/T,T/T	C/C
281	G/A	VOII01006507.1	39323	G/A,A/A	G/G
282	A/G	VOII01006507.1	39342	A/G,G/G	A/A
283	T/C	VOII01006507.1	39422	T/C,C/C	T/T
284	G/A	VOII01006507.1	39482	G/A,A/A	G/G
285	G/A	VOII01006507.1	77333	G/A	G/G,A/A
286	A/G	VOII01006507.1	77340	A/G	A/A,G/G
287	T/C	VOII01006507.1	77491	T/C	T/T,C/C
288	C/T	VOII01006595.1	24358	C/T	C/C
289	A/G	VOII01006595.1	66407	A/G	A/A

No.	Alleles	Chromosome/Scaffold	Position	Genotype of coconut	
				Indonesia & Vietnam	Thailand
290	G/A	VOII01006717.1	83689	G/A	G/G
291	G/A	VOII01006733.1	3476	G/A	G/G
292	A/G	VOII01007305.1	126957	A/G	A/A,G/G
293	C/T	VOII01007434.1	169871	C/T	C/C
294	G/A	VOII01007434.1	60211	G/A,A/A	G/G
295	C/T	VOII01007625.1	131573	C/T	C/C,T/T
296	C/T	VOII01007650.1	4929	T/T	C/C,C/T
297	G/C	VOII01007694.1	121623	G/C	G/G
298	C/A	VOII01007694.1	121843	C/A	C/C
299	G/A	VOII01007719.1	9782	G/A	G/G
300	C/T	VOII01008338.1	3791	C/T,T/T	C/C
301	G/A	VOII01008345.1	10424	A/A	G/G,G/A
302	G/A	VOII01008345.1	10540	A/A	G/G,G/A
303	T/A	VOII01008345.1	10564	A/A	T/T,T/A
304	G/A	VOII01008375.1	110714	A/A	G/G,G/A
305	C/T	VOII01008427.1	39892	C/T	C/C
306	C/T	VOII01008546.1	173955	C/T,T/T	C/C
307	A/T	VOII01008692.1	124568	A/T,T/T	A/A
308	C/T	VOII01008692.1	124643	C/T,T/T	C/C
309	T/C	VOII01008692.1	2881	T/C	T/T
310	A/G	VOII01008692.1	40973	A/G	A/A,G/G
311	G/A	VOII01008853.1	47132	G/A	G/G
312	T/G	VOII01008913.1	5155	G/G	T/T,T/G
313	A/T	VOII01009360.1	7831	A/T,T/T	A/A
314	C/T	VOII01009483.1	20443	C/T	C/C,T/T
315	T/A	VOII01009655.1	79840	T/A	T/T
316	C/T	VOII01009830.1	993	C/T	C/C
317	C/T	VOII01010324.1	6874	C/T	C/C,T/T
318	G/A	VOII01011622.1	117102	G/A	G/G,A/A
319	A/G	VOII01011785.1	84886	A/G,G/G	A/A
320	T/G	VOII01011785.1	84904	T/G	T/T
321	C/T	VOII01011848.1	84032	C/T	C/C
322	C/A	VOII01012165.1	16940	C/A	C/C,A/A
323	C/T	VOII01012436.1	3131	C/T,T/T	C/C
324	G/A	VOII01013142.1	5419	G/A	G/G
325	G/A	VOII01016309.1	3375	G/A	G/G,A/A
326	C/T	VOII01016309.1	3409	C/T	C/C,T/T
327	G/A	VOII01016309.1	3481	G/A	G/G,A/A
328	A/G	VOII01016309.1	3496	A/G	A/A,G/G
329	C/A	VOII01017141.1	1015	A/A	C/C,C/A
330	C/T	VOII01018794.1	18401	T/T	C/C,C/T
331	G/A	VOII01018833.1	86048	G/A	G/G

No.	Alleles	Chromosome/Scaffold	Position	Genotype of coconut	
				Indonesia & Vietnam	Thailand
332	A/G	VOII01020267.1	9539	A/G	A/A
333	G/A	VOII01028421.1	409	G/A	G/G
334	C/T	VOII01030505.1	36069	C/T	C/C
335	A/C	VOII01033763.1	483	A/C	A/A
336	A/G	VOII01038007.1	435	A/G	A/A
337	G/A	VOII01042395.1	2021	A/A	G/G,G/A
338	G/A	VOII01044421.1	6394	A/A	G/G,G/A
339	C/T	VOII01047284.1	368	C/T,T/T	C/C
340	A/G	VOII01047284.1	441	A/G,G/G	A/A
341	A/G	VOII01047284.1	551	A/G,G/G	A/A
342	C/T	VOII01051996.1	710	T/T	C/C,C/T
343	C/T	VOII01058191.1	851	C/T	C/C
344	A/G	VOII01062633.1	103	A/G	A/A
345	A/G	VOII01062633.1	192	A/G	A/A
346	C/T	VOII01079476.1	199	C/T	C/C,T/T
347	C/T	VOII01081255.1	700	C/T	C/C

Alleles คือ แอลลีลของเครื่องหมาย SNP
Chromosome/Scaffold คือ โครโมโซมหรือ scaffold
Position คือ ตำแหน่งที่อยู่บนโครโมโซมหรือ scaffold
Genotype of coconut คือ จีโนไทป์ของมะพร้าวต้นสูง
Indonesia & Vietnam คือ จีโนไทป์สำหรับการจำแนกมะพร้าวอินโดนีเซียและเวียดนามต้นสูง
Thailand คือ จีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูง

6. การคัดเลือกเครื่องหมาย SNP ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง

จากผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่มีความใกล้ชิดระหว่างตัวอย่างมะพร้าวต้นสูงไทย อินโดนีเซีย และเวียดนาม ดังนั้นในการจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง ต้องใช้เครื่องหมาย SNP จำนวนหนึ่งที่รวมกันเป็นชุดเครื่องหมาย SNP เพื่อจำแนกตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง (อินโดนีเซียและเวียดนาม) ทั้งหมด ออกจากตัวอย่างมะพร้าวไทยต้นสูง โดยมีชุดเครื่องหมายหลัก (core set) ที่ประกอบด้วย เครื่องหมาย SNP หลักที่มีจีโนไทป์ที่สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้จำนวนมาก และชุดเครื่องหมายย่อย (sub set) ที่สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้รองลงมา ดังนี้

6.1 ชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงเพื่อการตรวจสอบ

การจำแนกและตรวจสอบมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงทั้งหมด 48 ตัวอย่าง (อินโดนีเซีย 22 ตัวอย่าง และเวียดนาม 26 ตัวอย่าง) ออกจากตัวอย่างมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง โดยเครื่องหมาย SNP รวม 17 เครื่องหมาย โดยสามารถแบ่งเป็นชุดเครื่องหมาย SNP จำนวน 3 ชุด ประกอบด้วย

ชุดเครื่องหมายหลัก (ตารางที่ 10) มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 6 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 1 – 6) สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง จำนวน 30 ตัวอย่าง (อินโดนีเซีย 14 ตัวอย่าง และ

เวียดนาม 16 ตัวอย่าง) คิดเป็น 62.5% ของมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงทั้งหมด ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่

เครื่องหมาย VOII01062633.103 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 1 (SNP No.) มีแอลลีล A/G มะพร้าวต่างประเทศต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous A/G จำนวน 6 ตัวอย่าง ประกอบด้วย มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง 1 ตัวอย่าง (194Indo) และมะพร้าวเวียดนามต้นสูง 5 ตัวอย่าง (214Viet, 217Viet, 218Viet, 234Viet และ 235Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous A/A ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย VOII01006507.39482 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 2 (SNP No.) มีแอลลีล G/A มะพร้าวต่างประเทศต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous G/A และ homozygous AA จำนวน 6 ตัวอย่าง ประกอบด้วย มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง 1 ตัวอย่าง (196Indo) และมะพร้าวเวียดนามต้นสูง 5 ตัวอย่าง (195Viet, 211Viet, 225Viet, 234Viet และ 240Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous G/G ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017887.8194831 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 3 (SNP No.) มีแอลลีล G/A มะพร้าวอินโดนีซัยต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous G/A จำนวน 5 ตัวอย่าง (197Indo, 207Indo, 208Indo, 228Indo และ 229Indo) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous G/G ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย VOII01000447.139559 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 4 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวต่างประเทศต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/T ประกอบด้วย มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง 6 ตัวอย่าง (198Indo, 201Indo, 204Indo, 209Indo, 212Indo และ 229Indo) และมะพร้าวเวียดนามต้นสูง 1 ตัวอย่าง (215Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C และ T/T ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017872.79752924 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 5 (SNP No.) มีแอลลีล C/G มะพร้าวต่างประเทศต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/G จำนวน 6 ตัวอย่าง ประกอบด้วย มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง 3 ตัวอย่าง (198Indo, 202Indo และ 212Indo) และมะพร้าวเวียดนามต้นสูง 3 ตัวอย่าง (216Viet, 227Viet และ 233Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

และ เครื่องหมาย CM017876.49130428 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 6 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวต่างประเทศต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/T และ homozygous T/T จำนวน 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วย มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง 1 ตัวอย่าง (239Indo) และมะพร้าวเวียดนามต้นสูง 4 ตัวอย่าง (220Viet, 224Viet, 225Viet และ 231Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 2 (ตารางที่ 10) มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 6 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 7 – 12) สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 14 ตัวอย่าง คิดเป็น 29.2% ของมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง 6 ตัวอย่าง (199Indo, 200Indo, 203Indo 205Indo, 206Indo และ 213Indo) และมะพร้าวเวียดนามต้นสูง 8 ตัวอย่าง (219Viet, 221Viet, 222Viet, 223Viet, 226Viet, 230Viet, 236Viet และ 237Viet) ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่

เครื่องหมาย CM017875.1452347 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 7 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/T และ homozygous T/T จำนวน 3 ตัวอย่าง (199Indo, 203Indo และ 206Indo) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย VOII01000282.273156 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 8 (SNP No.) มีแอลลีล G/T มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous G/T จำนวน 2 ตัวอย่าง (200Indo และ 205Indo) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous G/G ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017873.20056828 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 9 (SNP No.) มีแอลลีล G/A มะพร้าวต่างประเทศต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous G/A จำนวน 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วย มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง 1 ตัวอย่าง (213Indo) และมะพร้าวเวียดนามต้นสูง 2 ตัวอย่าง (223Viet และ 237Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous G/G และ homozygous A/A ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017879.42761423 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 10 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ homozygous T/T จำนวน 3 ตัวอย่าง (219Viet, 226Viet และ 236Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C และ heterozygous C/T ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017877.81328843 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 11 (SNP No.) มีแอลลีล A/G มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous A/G จำนวน 2 ตัวอย่าง (221Viet และ 222Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous A/A ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

และ เครื่องหมาย VOII01000282.822647 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 12 (SNP No.) มีแอลลีล A/C มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous A/C จำนวน 2 ตัวอย่าง (230Viet และ 237Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous A/A ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 3 (ตารางที่ 10) มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 5 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 13 – 17) สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้ 4 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.3% ของมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงทั้งหมด ประกอบด้วย มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง 2 ตัวอย่าง (193Indo 238Indo) และมะพร้าวเวียดนามต้นสูง 2 ตัวอย่าง (210Viet 232Viet) ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่

เครื่องหมาย VOII01005399.23895 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 13 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/T และ homozygous T/T จำนวน 1 ตัวอย่าง (193Indo) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย VOII01001019.1641 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 14 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/T และ homozygous T/T จำนวน 1 ตัวอย่าง (238Indo) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017882.25370686 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 15 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/T จำนวน 1 ตัวอย่าง (210Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C และ homozygous T/T ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017876.53111902 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 16 (SNP No.) มีแอลลีล G/C มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous G/C และ homozygous C/C จำนวน 1 ตัวอย่าง (232Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous G/G ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

และ เครื่องหมาย CM017875.5125425 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 17 (SNP No.) มีแอลลีล G/A มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous G/A มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous G/G ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

ตารางที่ 10 ลำดับตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศ (Sample No.) เครื่องหมาย SNP (SNP marker) ลำดับเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง (SNP No.) แอลลีล (Alleles) จีโนไทป์สำหรับการจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง (Indonesia & Vietnam) และ จีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูง (Thailand)

Sample No.	SNP marker	VOII0106 2633.103	VOII01006 507.39482	CM017887 .8194831	VOII010004 47.139559	CM017872. 79752924	CM017876. 49130428	CM017875 .1452347	VOII010002 82.273156	CM017873. 20056828	CM017879. 42761423	CM017877. 81328843	VOII010002 82.822647	VOII01005 399.23895	VOII01001 019.1641	CM017882. 25370686	CM017876. 53111902	CM017875. 51254257
	SNP No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Alleles	A/G	G/A	G/A	C/T	C/G	C/T	C/T	G/T	G/A	C/T	A/G	A/C	C/T	C/T	C/T	G/C	G/A
	Indonesia & Vietnam	A/G	G/A,A/A	G/A	C/T	CG	C/T,T/T	C/T,T/T	G/T	G/A	T/T	A/G	A/C	C/T,T/T	C/T,T/T	C/T	G/C,C/C	G/A
	Thailand	A/A	G/G	G/G	C/C,T/T	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G,A/A	C/C,C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C,T/T	G/G	G/G
1	194Indo	A/G 1	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	T/T 1	C/C	G/C 1	G/G
2	196Indo	A/A	G/A 2	G/G	C/C	C/C	C/C	C/T 2	G/G	NN	C/C	A/A	A/A	C/T 2	C/C	C/C	G/G	G/G
3	197Indo	A/A	G/G	G/A 3	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
4	198Indo	A/A	G/G	G/G	C/T 4	CG 4	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/T 4	C/C	C/C	G/G	G/G
5	201Indo	A/A	G/G	G/G	C/T 5	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/A 5
6	202Indo	A/A	G/G	G/G	C/C	CG 6	C/C	C/C	G/T 6	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/T 6	C/C	G/G	G/G
7	204Indo	NN	G/G	G/G	C/T 7	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	NN	C/C	C/C	C/C	G/G	NN
8	207Indo	A/A	G/G	G/A 8	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	T/T 8	C/C	G/C 8	G/A 8
9	208Indo	A/A	G/G	G/A 9	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	NN	A/A	C/C	NN	C/T 9	G/G	G/G
10	209Indo	A/A	G/G	G/G	C/T 10	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	NN	C/C	C/C	G/G	G/G
11	212Indo	A/A	G/G	G/G	C/T 11	CG 11	C/C	NN	G/G	G/G	NN	A/A	A/A	C/C	NN	C/C	NN	G/G
12	228Indo	A/A	G/G	G/A 12	C/C	C/C	C/C	C/C	NN	NN	C/C	A/A	A/A	NN	NN	NN	G/G	G/G
13	229Indo	A/A	G/G	G/A 13	C/T 13	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	NN	C/C	NN	G/G	G/G
14	239Indo	A/A	NN	G/G	C/C	C/C	C/T 14	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	NN	C/C	C/C	C/C	G/G	G/A 14
15	195Viet	A/A	G/A 15	G/G	C/C	C/C	NN	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/C 15	G/G
16	211Viet	A/A	A/A 16	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
17	214Viet	A/G 17	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/C 17	G/G
18	215Viet	A/A	G/G	G/G	C/T 18	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/T 18	NN	G/G
19	216Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	CG 19	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
20	217Viet	A/G 20	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/T 20	G/G	G/G
21	218Viet	A/G 21	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/A 21
22	220Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/T 22	C/C	G/G	G/A 22	C/C	A/G 22	A/C 22	C/C	C/C	C/T 22	NN	NN
23	224Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	T/T 23	C/C	G/G	A/A	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	NN
24	225Viet	A/A	G/A 24	G/G	NN	C/C	C/T 24	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
25	227Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	CG 25	C/C	C/C	G/T 25	G/G	C/C	A/A	A/C 25	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
26	231Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/T 26	C/C	G/G	G/G	C/T	NN	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
27	233Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	CG 27	NN	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G

Sample No.	SNP marker	VOII0106 2633.103	VOII01006 507.39482	CM017887 .8194831	VOII010004 47.139559	CM017872. 79752924	CM017876. 49130428	CM017875 .1452347	VOII010002 82.273156	CM017873. 20056828	CM017879. 42761423	CM017877. 81328843	VOII010002 82.822647	VOII01005 399.23895	VOII01001 019.1641	CM017882. 25370686	CM017876. 53111902	CM017875. 51254257
	SNP No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Alleles	A/G	G/A	G/A	C/T	C/G	C/T	C/T	G/T	G/A	C/T	A/G	A/C	C/T	C/T	C/T	G/C	G/A
	Indonesia & Vietnam	A/G	G/A,A/A	G/A	C/T	CG	C/T,T/T	C/T,T/T	G/T	G/A	T/T	A/G	A/C	C/T,T/T	C/T,T/T	C/T	G/C,C/C	G/A
	Thailand	A/A	G/G	G/G	C/C,T/T	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G,A/A	C/C,C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C,T/T	G/G	G/G
28	234Viet	A/G 28	G/A 28	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	NN	A/C 28	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
29	235Viet	A/G 29	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
30	240Viet	A/A	G/A 30	G/G	C/C	C/C	C/C	NN	NN	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
31	199Indo	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/T 31	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
32	200Indo	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/T 32	G/G	C/C	A/A	NN	C/C	C/C	C/C	NN	G/G
33	203Indo	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/T 33	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
34	205Indo	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/T 34	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
35	206Indo	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	T/T 35	G/G	G/G	C/C	A/A	NN	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
36	213Indo	A/A	G/G	G/G	C/C	NN	C/C	C/C	G/G	G/A 36	C/C	A/A	A/A	T/T 36	C/C	C/C	G/G	NN
37	219Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	T/T 37	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/A 37
38	221Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/G 38	NN	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
39	222Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	NN	C/C	G/G	G/G	C/C	A/G 39	A/A	C/C	NN	C/C	G/G	G/G
40	223Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/A 40	C/C	A/A	NN	NN	NN	C/C	G/G	G/G
41	226Viet	A/A	NN	G/G	C/C	NN	NN	C/C	G/G	G/G	T/T 41	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
42	230Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	A/A	C/C	A/A	A/C 42	NN	C/C	C/C	G/G	G/G
43	236Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	T/T 43	NN	A/A	C/C	C/C	NN	G/G	NN
44	237Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/A 44	C/C	NN	A/C 44	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G
45	193Indo	A/A	G/G	G/G	C/C	NN	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/T 45	C/C	C/C	G/G	NN
46	238Indo	A/A	NN	G/G	NN	C/C	C/C	NN	G/G	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C	C/T 46	C/C	G/G	G/G
47	210Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	NN	A/A	C/C	C/C	C/T 47	G/G	G/G
48	232Viet	A/A	G/G	G/G	C/C	NN	C/C	C/C	NN	A/A	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C 48	G/G

แถบสีเหลือง คือ จีโนไทป์ของเครื่องหมาย SNP และลำดับตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงที่สามารถจำแนกออกจากมะพร้าวไทยต้นสูงได้

NN คือ missing data

6.2 ชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและอินโดนีเซียต้นสูงเพื่อการตรวจสอบ

การจำแนกและตรวจสอบมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงทั้งหมด 22 ตัวอย่าง ออกจากตัวอย่างมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง โดยเครื่องหมาย SNP รวม 7 เครื่องหมาย สามารถแบ่งเป็นชุดเครื่องหมาย SNP จำนวน 2 ชุด ประกอบด้วย

ชุดเครื่องหมายหลัก (ตารางที่ 11) มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 4 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 1 – 4) สามารถจำแนกมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง จำนวน 17 ตัวอย่าง คิดเป็น 77.3% ของมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงทั้งหมด ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่

เครื่องหมาย VOII01001019.1641 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 1 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/T และ homozygous T/T จำนวน 4 ตัวอย่าง (194Indo, 202Indo, 207Indo และ 238Indo) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017875.1452347 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 2 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/T และ homozygous T/T จำนวน 4 ตัวอย่าง (196Indo, 199Indo, 203Indo และ 206Indo) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017887.8194831 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 3 (SNP No.) มีแอลลีล G/A มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous G/A จำนวน 5 ตัวอย่าง (197Indo, 207Indo, 208Indo, 228Indo และ 229Indo) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous G/G ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

และ เครื่องหมาย VOII01000447.139559 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 4 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/T จำนวน 6 ตัวอย่าง (198Indo, 201Indo, 204Indo, 209Indo, 212Indo และ 229Indo) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C และ homozygous T/T ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 2 (ตารางที่ 11) มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 3 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 5 – 7) ได้แก่ สามารถจำแนกมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง 5 ตัวอย่าง (193Indo 200Indo 205Indo 213Indo 239Indo) คิดเป็น 22.7% ของมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงทั้งหมดออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย VOII01005399.23895 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 5 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/T และ homozygous T/T จำนวน 2 ตัวอย่าง (193Indo และ 213Indo) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย VOII01000282.273156 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 6 (SNP No.) มีแอลลีล G/T มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous G/T จำนวน 2 ตัวอย่าง (200Indo และ 205Indo) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous G/G ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

และ เครื่องหมาย CM017875.51254257 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 7 (SNP No.) มีแอลลีล G/A มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous G/A จำนวน 1 ตัวอย่าง (239Indo) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous G/G ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

ตารางที่ 11 ลำดับตัวอย่างมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง (Sample No.) เครื่องหมาย SNP (SNP marker) ลำดับเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง (SNP No.) แอลลีล (Alleles) จีโนไทป์สำหรับการจำแนกมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง (Indonesia) และ จีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูง (Thailand)

Sample No.	SNP marker	CUVOII01001019.1641	CUCM017875.1452347	CUCM017887.8194831	CUVOII01000447.139559	CUVOII01005399.23895	CUVOII01000282.273156	CUCM017875.51254257
	SNP No.	1	2	3	4	5	6	7
	Alleles	C/T	C/T	G/A	C/T	C/T	G/T	G/A
	Indonesia	C/T,T/T	C/T,T/T	G/A	C/T	C/T,T/T	G/T	G/A
	Thai	C/C	C/C	G/G	C/C,T/T	C/C	G/G	G/G
1	194Indo	T/T 1	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G
2	196Indo	C/C	C/T 2	G/G	C/C	C/T 2	G/G	G/G
3	197Indo	C/C	C/C	G/A 3	C/C	C/C	G/G	G/G
4	198Indo	C/C	C/C	G/G	C/T 4	C/T 4	G/G	G/G
5	199Indo	C/C	C/T 5	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G
6	201Indo	C/C	C/C	G/G	C/T 6	C/C	G/G	G/A 6
7	202Indo	C/T 7	C/C	G/G	C/C	C/C	G/T 7	G/G
8	203Indo	C/C	C/T 8	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G
9	204Indo	C/C	C/C	G/G	C/T 9	C/C	G/G	NN
10	206Indo	C/C	T/T 10	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G
11	207Indo	T/T 11	C/C	G/A 11	C/C	C/C	G/G	G/A 11
12	208Indo	NN	C/C	G/A 12	C/C	C/C	G/G	G/G
13	209Indo	C/C	C/C	G/G	C/T 13	NN	G/G	G/G
14	212Indo	NN	NN	G/G	C/T 14	C/C	G/G	G/G
15	228Indo	NN	C/C	G/A 15	C/C	NN	NN	G/G
16	229Indo	C/C	C/C	G/A 16	C/T 16	NN	G/G	G/G
17	238Indo	C/T 17	NN	G/G	NN	C/C	G/G	G/G
18	193Indo	C/C	C/C	G/G	C/C	C/T 18	G/G	NN
19	200Indo	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	G/T 19	G/G
20	205Indo	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	G/T 20	G/G
21	213Indo	C/C	C/C	G/G	C/C	T/T 21	G/G	NN
22	239Indo	C/C	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A 22

แถบสีเหลือง คือ จีโนไทป์ของเครื่องหมาย SNP และลำดับตัวอย่างมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงที่สามารถจำแนกที่มีออกจากมะพร้าวไทยต้นสูงได้

NN คือ missing data

6.3 ชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและเวียดนามต้นสูงเพื่อการตรวจสอบ

การจำแนกและตรวจสอบมะพร้าวเวียดนามต้นสูงทั้งหมด 26 ตัวอย่าง ออกจากตัวอย่างมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง โดยเครื่องหมาย SNP รวม 10 เครื่องหมาย สามารถแบ่งเป็นชุดเครื่องหมาย SNP จำนวน 2 ชุด ประกอบด้วย

ชุดเครื่องหมายหลัก (ตารางที่ 12) มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 5 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 1 – 5) สามารถจำแนกมะพร้าวเวียดนามต้นสูง จำนวน 18 ตัวอย่าง คิดเป็น 69.2% ของมะพร้าวเวียดนามต้นสูงทั้งหมด ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่

เครื่องหมาย VOII01006507.39482 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 1 (SNP No.) มีแอลลีล G/A มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous G/A และ homozygous A/A จำนวน 5 ตัวอย่าง (195Viet, 211Viet, 225Viet, 234Viet และ 240Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous G/G ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017882.25370686 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 2 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/T จำนวน 4 ตัวอย่าง (210Viet, 215Vie,t 217Viet และ 220Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C และ T/T ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย VOII01062633.103 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 3 (SNP No.) มีแอลลีล A/G มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous A/G จำนวน 5 ตัวอย่าง (214Viet, 217Viet, 218Viet, 234Viet และ 235Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous A/A ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017872.79752924 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 4 (SNP No.) มีแอลลีล C/G มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/G จำนวน 3 ตัวอย่าง (216Viet, 227Viet และ 233Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

และ เครื่องหมาย CM017879.42761423 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 5 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ homozygous T/T จำนวน 3 ตัวอย่าง (219Viet, 226Viet และ 236Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C และ heterozygous C/T ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 2 (ตารางที่ 12) มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 5 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 6 – 10) สามารถจำแนกมะพร้าวเวียดนามต้นสูง 8 ตัวอย่าง (221Viet 222Viet 223Viet 224Viet 230Viet 231Viet 232Viet 237Viet) คิดเป็น 30.8% ของมะพร้าวเวียดนามต้นสูงทั้งหมด ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่

เครื่องหมาย CM017877.81328843 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 6 (SNP No.) มีแอลลีล A/G มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous A/G จำนวน 2 ตัวอย่าง (221Viet และ 222Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous A/A ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017873.20056828 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 7 (SNP No.) มีแอลลีล G/A มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous G/A จำนวน 2 ตัวอย่าง (223Viet และ 237Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous G/G และ homozygous A/A ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย CM017876.49130428 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 8 (SNP No.) มีแอลลีล C/T มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/T และ homozygous T/T จำนวน 2 ตัวอย่าง (224Viet และ 231Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous C/C ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย VOII01000282.822647 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 9 (SNP No.) มีแอลลีล A/C มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous A/C จำนวน 2 ตัวอย่าง (230Viet และ 237Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous A/A ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

และ เครื่องหมาย CM017876.53111902 เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 10 (SNP No.) มีแอลลีล G/C มะพร้าวเวียดนามต้นสูงมีจีโนไทป์แบบ heterozygous G/C และ homozygous C/C จำนวน 1 ตัวอย่าง (232Viet) มะพร้าวไทยต้นสูงที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous G/G ทั้งหมด จำนวน 192 ตัวอย่าง

ตารางที่ 12 ลำดับตัวอย่างมะพร้าวเวียดนามต้นสูง (Sample No.) เครื่องหมาย SNP (SNP marker) ลำดับเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวเวียดนามต้นสูง (SNP No.) แอลลีล (Alleles) จีโนไทป์สำหรับการจำแนกมะพร้าวเวียดนามต้นสูง (Indonesia & Vietnam) และ จีโนไทป์ของมะพร้าวไทยต้นสูง (Thailand)

Sample No.	SNP marker	VOII01006 507.39482	CM017882 .25370686	VOII0106 2633.103	CM017872 .79752924	CM017879 .42761423	CM017877 .81328843	CM017873 .20056828	CM017876 .49130428	VOII010002 82.822647	CM017876 .53111902
	SNP No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Alleles	G/A	C/T	A/G	C/G	C/T	A/G	G/A	C/T	A/C	G/C
	Vietnam	GA,AA	CT	AG	CG	TT	AG	GA	CT,TT	AC	GC,CC
	Thailand	GG	CC,TT	AA	CC	CC,CT	AA	GG,AA	CC	AA	GG
1	195Viet	GA 1	CC	AA	CC	CC	AA	GG	NN	AA	GC 1
2	210Viet	GG	CT 2	AA	CC	CC	NN	GG	CC	AA	GG
3	211Viet	AA 3	CC	AA	CC	CC	AA	GG	CC	AA	GG
4	214Viet	GG	CC	AG 4	CC	CC	AA	GG	CC	AA	GC 4
5	215Viet	GG	CT 5	AA	CC	CC	AA	GG	CC	AA	NN
6	216Viet	GG	CC	AA	CG 6	CC	AA	GG	CC	AA	GG
7	217Viet	GG	CT 7	AG 7	CC	CC	AA	GG	CC	AA	GG
8	218Viet	GG	CC	AG 8	CC	CC	AA	GG	CC	AA	GG
9	219Viet	GG	CC	AA	CC	TT 9	AA	GG	CC	AA	GG
10	220Viet	GG	CT 10	AA	CC	CC	AG 10	GA 10	CT 10	AC 10	NN
11	225Viet	GA 11	CC	AA	CC	CC	AA	GG	CT 11	AA	GG
12	226Viet	NN	CC	AA	NN	TT 12	AA	GG	NN	AA	GG
13	227Viet	GG	CC	AA	CG 13	CC	AA	GG	CC	AC 13	GG
14	233Viet	GG	CC	AA	CG 14	CC	AA	GG	NN	AA	GG
15	234Viet	GA 15	CC	AG 15	CC	CC	NN	GG	CC	AC 15	GG
16	235Viet	GG	CC	AG 16	CC	CC	AA	GG	CC	AA	GG
17	236Viet	GG	NN	AA	CC	TT 17	NN	GG	CC	AA	GG
18	240Viet	GA 18	CC	AA	CC	CC	AA	GG	CC	AA	GG
19	221Viet	GG	CC	AA	CC	CC	AG 19	GG	CC	NN	GG
20	222Viet	GG	CC	AA	CC	CC	AG 20	GG	NN	AA	GG
21	223Viet	GG	CC	AA	CC	CC	AA	GA 21	CC	NN	GG
22	224Viet	GG	CC	AA	CC	CC	AA	AA	TT 22	AA	GG
23	230Viet	GG	CC	AA	CC	CC	AA	AA	CC	AC 23	GG
24	231Viet	GG	CC	AA	CC	CT	NN	GG	CT 24	AA	GG
25	232Viet	GG	CC	AA	NN	CC	AA	AA	CC	AA	CC 25
26	237Viet	GG	CC	AA	CC	CC	NN	GA 26	CC	AC 26	GG

แถบสีเหลือง คือ จีโนไทป์ของเครื่องหมาย SNP และลำดับตัวอย่างมะพร้าวเวียดนามต้นสูงที่สามารถจำแนกที่มีออกจากมะพร้าวไทยต้นสูงได้

NN คือ missing data

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สรุปผลการทดลอง

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าวไทยและต่างประเทศ จำนวน 240 ตัวอย่าง ประกอบด้วย มะพร้าวไทยต้นสูง 192 ตัวอย่าง ได้แก่ สมุทรสงคราม (S) 5 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ (Pr) 34 ตัวอย่าง ชุมพร (Ch) 25 ตัวอย่าง ชลบุรี (CB) 19 ตัวอย่าง นครศรีธรรมราช (NST) 40 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี (SNI) 13 ตัวอย่าง ปัตตานี (PT) 20 ตัวอย่าง ยะลา (YL) 16 ตัวอย่าง และนราธิวาส (N) 20 ตัวอย่าง และมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 48 ตัวอย่าง ได้แก่ มะพร้าวเวียดนามต้นสูง (Viet) 26 ตัวอย่าง และมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง (Indo) 22 ตัวอย่าง พบว่า ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรมะพร้าวทั้งหมด โดยใช้เครื่องหมาย SNP จำนวน 3,532 เครื่องหมาย มีระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่าง 0.001 ถึง 0.070 ค่าเฉลี่ย 0.013 แสดงถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่สูงระหว่างประชากรมะพร้าวไทยและต่างประเทศ ผลการจัดกลุ่ม (cluster analysis) ด้วยวิธี neighbor- joining (NJ) และผลการวิเคราะห์ principle coordinate analysis (PCoA) พบว่า มะพร้าวไทยและมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงมีการปะปนกันของกลุ่มประชากรที่มีจีโนไทป์คล้ายกัน ไม่สามารถจัดแยกกลุ่มย่อย (subgroup) ได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงโดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 15 เครื่องหมาย ที่มีการกระจายตัวแบบผสมระหว่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมะพร้าวต้นสูงของไทย อินโดนีเซีย และเวียดนาม ทั้งในเครื่องหมาย SNP และเครื่องหมาย SSR แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างมะพร้าวแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นกลุ่มประชากรเดียวกันหรือมีบรรพบุรุษ (ancestor) ร่วมกัน โดยเกิดจากการแพร่กระจายพันธุ์ของมะพร้าวไปยังแหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทั้งทางทะเลและจากมนุษย์ โดยเครื่องหมาย SNP เป็นเครื่องหมายที่เหมาะสมในการตรวจสอบและจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศ เนื่องจากเครื่องหมาย SNP มีจำนวนมากและกระจายตัวทั่วจีโนมของมะพร้าว อีกทั้งยังมีความถูกต้องและแม่นยำสูง

2. การค้นหาเครื่องหมาย SNP ที่ให้ความแตกต่าง (polymorphism) ในมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง โดยการคัดเลือกจีโนไทป์ของเครื่องหมาย SNP ที่กระจายตัวทั่วจีโนม จำนวน 110,157 เครื่องหมาย ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ด้วยเทคนิค Genotyping-By-Sequencing (GBS) พบเครื่องหมาย SNP จำนวน 347 เครื่องหมาย โดยมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 15 คู่ และบน 130 scaffolds ของจีโนมมะพร้าว ที่สามารถจำแนกตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงออกจากมะพร้าวไทยต้นสูงได้มากกว่าหรือเท่ากับ 3 ตัวอย่างขึ้นไป

3. จากผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่มีความใกล้ชิดระหว่างมะพร้าวต้นสูงไทย อินโดนีเซีย และเวียดนาม ดังนั้นการจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง (อินโดนีเซียและเวียดนาม) ออกจากตัวอย่างมะพร้าวไทยต้นสูง ต้องใช้เครื่องหมาย SNP จำนวนหนึ่งที่รวมกันเป็นชุดเครื่องหมาย SNP โดยมีชุดเครื่องหมายหลัก (core set) ที่ประกอบด้วย เครื่องหมาย SNP หลักที่มีจีโนไทป์ที่สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้จำนวนมากและชุดเครื่องหมายย่อย (sub set) ที่สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้รองลงมา (ภาพที่ 8)

3.1 ชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงเพื่อการตรวจสอบ โดยจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงทั้งหมด 48 ตัวอย่าง (อินโดนีเซียง 22 ตัวอย่าง และเวียดนาม 26 ตัวอย่าง) ออกจากตัวอย่างมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย SNP รวม 17 เครื่องหมาย สามารถแบ่งเป็นชุดเครื่องหมาย SNP จำนวน 3 ชุด ประกอบด้วย

ชุดเครื่องหมายหลัก มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 6 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 1 – 6) สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง จำนวน 30 ตัวอย่าง (อินโดนีเซีย 14 ตัวอย่าง และเวียดนาม 16 ตัวอย่าง) คิดเป็น 62.5% ของมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงทั้งหมด ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่ เครื่องหมาย VOII01062633.103 (SNP A/G), เครื่องหมาย VOII01006507.39482 (SNP G/A), เครื่องหมาย CM017887.8194831 (SNP G/A), เครื่องหมาย VOII01000447.139559 (SNP C/T), เครื่องหมาย CM017872.79752924 (SNP C/G), และ เครื่องหมาย CM017876.49130428 (SNP C/T) ตามลำดับ

ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 2 มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 6 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 7 – 12) สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง 14 ตัวอย่าง (อินโดนีเซีย 6 ตัวอย่าง และเวียดนาม 8 ตัวอย่าง) คิดเป็น 29.2% ของมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงทั้งหมด ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่ เครื่องหมาย CM017875.1452347 (SNP C/T), เครื่องหมาย VOII01000282.273156 (SNP G/T), เครื่องหมาย CM017873.20056828 (SNP G/A), เครื่องหมาย CM017879.42761423 (SNP C/T), เครื่องหมาย CM017877.81328843 (SNP A/G) และ เครื่องหมาย VOII01000282.822647 (SNP A/C) ตามลำดับ

ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 3 มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 5 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 13 – 17) สามารถจำแนกมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงได้ 4 ตัวอย่าง (อินโดนีเซีย 2 ตัวอย่าง และเวียดนาม 2 ตัวอย่าง) คิดเป็น 8.3% ของมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงทั้งหมด ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่ เครื่องหมาย VOII01005399.23895 (SNP C/T), เครื่องหมาย VOII01001019.1641 (SNP C/T), เครื่องหมาย CM017882.25370686 (SNP C/T), เครื่องหมาย CM017876.53111902 (SNP G/C) และ เครื่องหมาย CM017875.5125425 (SNP G/A) ตามลำดับ

3.2 ชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและอินโดนีเซียต้นสูงเพื่อการตรวจสอบ โดยจำแนกมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง 22 ตัวอย่าง ออกจากตัวอย่างมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย SNP รวม 7 เครื่องหมาย สามารถแบ่งเป็นชุดเครื่องหมาย SNP จำนวน 2 ชุด ประกอบด้วย

ชุดเครื่องหมายหลัก มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 4 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 1 – 4) สามารถจำแนกมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง จำนวน 17 ตัวอย่าง คิดเป็น 77.3% ของมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงทั้งหมด ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่ เครื่องหมาย VOII01001019.1641 (SNP C/T), เครื่องหมาย CM017875.1452347 (SNP C/T), เครื่องหมาย CM017887.8194831 (SNP G/A) และ เครื่องหมาย VOII01000447.139559 (SNP C/T) ตามลำดับ

ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 2 มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 3 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 5 – 7) สามารถจำแนกมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 22.7% ของมะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูงทั้งหมด ออก

จากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่ เครื่องหมาย VOII01005399.23895 (SNP C/T), เครื่องหมาย VOII01000282.273156 (SNP G/T) และ เครื่องหมาย CM017875.51254257 (SNP G/A) ตามลำดับ

3.3 **ชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและเวียดนามต้นสูง** โดยจำแนกมะพร้าวเวียดนามทั้งหมด 26 ตัวอย่าง ออกจากตัวอย่างมะพร้าวไทยจำนวน 192 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย SNP รวม 10 เครื่องหมาย สามารถแบ่งเป็นชุดเครื่องหมาย SNP จำนวน 2 ชุด ประกอบด้วย

ชุดเครื่องหมายหลัก (core set) มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 5 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 1 – 5) สามารถจำแนกมะพร้าวเวียดนามต้นสูง จำนวน 18 ตัวอย่าง คิดเป็น 69.2% ของมะพร้าวเวียดนามต้นสูงทั้งหมด ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่ เครื่องหมาย VOII01006507.39482 (SNP G/A), เครื่องหมาย CM017882.25370686 (SNP C/T), เครื่องหมาย VOII01062633.103 (SNP A/G), เครื่องหมาย CM017872.79752924 (SNP C/G) และ เครื่องหมาย CM017879.42761423 (SNP C/T) ตามลำดับ

ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 2 มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 5 เครื่องหมาย (เครื่องหมาย SNP ลำดับที่ 6 – 10) สามารถจำแนกมะพร้าวเวียดนามต้นสูง 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 30.8% ของมะพร้าวเวียดนามต้นสูงทั้งหมด ออกจากมะพร้าวไทยต้นสูง จำนวน 192 ตัวอย่าง ได้แก่ เครื่องหมาย CM017877.81328843 (SNP A/G),เครื่องหมาย CM017873.20056828 (SNP G/A), เครื่องหมาย CM017876.49130428 (SNP C/T), เครื่องหมาย VOII01000282.822647 (SNP A/C) และ เครื่องหมาย CM017876.53111902 (SNP G/C) ตามลำดับ

การจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงโดยใช้เครื่องหมาย SNP

เครื่องหมาย SNP จำนวน 110,157 เครื่องหมาย ที่ผ่านการคัดกรองคุณภาพและมีการกระจายตัวทั่วจีโนม

↓

เครื่องหมาย SNP จำนวน 347 เครื่องหมาย
ที่ให้ความแตกต่างระหว่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงกับมะพร้าวไทยต้นสูง ≥ 3 ตัวอย่างขึ้นไป

กรณีที่ไม่รู้แหล่งที่มาของตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง

↓

ชุดเครื่องหมายหลัก
มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 6 เครื่องหมาย

1. **เครื่องหมาย VOII01062633.103** (SNP A/G) มะพร้าวต่างประเทศต้นสูง = AG, มะพร้าวไทยต้นสูง = AA
2. **เครื่องหมาย VOII01006507.3948** (SNP G/A) มะพร้าวต่างประเทศต้นสูง = GA หรือ AA, มะพร้าวไทยต้นสูง = GG
3. **เครื่องหมาย CM017887.8194831** (SNP G/A) มะพร้าวต่างประเทศต้นสูง = GA, มะพร้าวไทยต้นสูง = GG
4. **เครื่องหมาย VOII01000447.139559** (SNP C/T) มะพร้าวต่างประเทศต้นสูง = CT, มะพร้าวไทยต้นสูง = CC หรือ TT
5. **เครื่องหมาย CM017872.79752924** (SNP C/G) มะพร้าวต่างประเทศต้นสูง = CG, มะพร้าวไทยต้นสูง = CC
6. **เครื่องหมาย CM017876.49130428** (SNP C/T) มะพร้าวต่างประเทศต้นสูง = CT หรือ TT, มะพร้าวไทยต้นสูง = CC

↓

ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 2
เครื่องหมาย SNP จำนวน 6 เครื่องหมาย
เครื่องหมาย CM017875.1452347 (SNP C/T), เครื่องหมาย VOII01000282.273156 (SNP G/T), เครื่องหมาย CM017873.20056828 (SNP G/A), เครื่องหมาย CM017879.42761423 (SNP C/T), เครื่องหมาย CM017877.81328843 (SNP A/G) และ เครื่องหมาย VOII01000282.822647 (SNP A/C)

↓

ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 3
เครื่องหมาย SNP จำนวน 5 เครื่องหมาย
เครื่องหมาย VOII01005399.23895 (SNP C/T), เครื่องหมาย VOII01001019.1641 (SNP C/T), เครื่องหมาย CM017882.25370686 (SNP C/T), เครื่องหมาย CM017876.53111902 (SNP G/C) และ เครื่องหมาย CM017875.5125425 (SNP G/A)

กรณีที่ต้องสงสัยแหล่งที่มาของมะพร้าวต่างประเทศต้นสูง

↓

คาดว่าแหล่งที่มา: ประเทศอินโดนีเซีย

↓

ชุดเครื่องหมายหลัก
มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 4 เครื่องหมาย

1. **เครื่องหมาย VOII01001019.1641** (SNP C/T)
   มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง = CT หรือ TT, มะพร้าวไทยต้นสูง = CC
2. **เครื่องหมาย CM017875.1452347** (SNP C/T)
   มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง = CT หรือ TT, มะพร้าวไทยต้นสูง = CC
3. **เครื่องหมาย CM017887.8194831** (SNP G/A)
   มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง = GA, มะพร้าวไทยต้นสูง = GG
4. **เครื่องหมาย VOII01000447.139559** (SNP C/T)
   มะพร้าวอินโดนีเซียต้นสูง = CT, มะพร้าวไทยต้นสูง = CC หรือ TT

↓

ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 2
เครื่องหมาย SNP จำนวน 3 เครื่องหมาย
เครื่องหมาย VOII01005399.23895 (SNP C/T), เครื่องหมาย VOII01000282.273156 (SNP G/T) และ เครื่องหมาย CM017875.51254257 (SNP G/A)

คาดว่าแหล่งที่มา: ประเทศเวียดนาม

↓

ชุดเครื่องหมายหลัก
มีเครื่องหมาย SNP จำนวน 5 เครื่องหมาย

1. **เครื่องหมาย VOII01006507.39482** (SNP G/A)
   มะพร้าวเวียดนามต้นสูง = GA หรือ AA, มะพร้าวไทยต้นสูง = GG
2. **เครื่องหมาย CM017882.25370686** (SNP C/T)
   มะพร้าวเวียดนามต้นสูง = CT, มะพร้าวไทยต้นสูง = CC หรือ TT
3. **เครื่องหมาย VOII01062633.103** (SNP A/G)
   มะพร้าวเวียดนามต้นสูง = AG, มะพร้าวไทยต้นสูง = AA
4. **เครื่องหมาย CM017872.79752924** (SNP C/G)
   มะพร้าวเวียดนามต้นสูง = CG, มะพร้าวไทยต้นสูง = CC
5. **เครื่องหมาย CM017879.42761423** (SNP C/T)
   มะพร้าวเวียดนามต้นสูง = TT, มะพร้าวไทยต้นสูง = CC หรือ CT

↓

ชุดเครื่องหมายย่อยที่ 2
เครื่องหมาย SNP จำนวน 5 เครื่องหมาย
เครื่องหมาย CM017877.81328843 (SNP A/G),เครื่องหมาย CM017873.20056828 (SNP G/A), เครื่องหมาย CM017876.49130428 (SNP C/T), เครื่องหมาย VOII01000282.822647 (SNP A/C) และ เครื่องหมาย CM017876.53111902 (SNP G/C)

ภาพที่ 8 ขั้นตอนการจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูงโดยใช้เครื่องหมาย SNP

คำแนะนำและข้อเสนอแนะ

1. จากความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าวมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง (อินโดนีเซียและเวียดนาม) ที่แสดงถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ในการจำแนกตัวอย่างมะพร้าวต่างประเทศต้นสูงออกจากมะพร้าวไทยต้นสูงเพื่อการตรวจสอบนั้น จึงจำเป็นต้องใช้ชุดเครื่องหมาย SNP ที่ประกอบด้วยเครื่องหมาย SNP หลายๆ ตำแหน่ง ร่วมกัน (combination) ดังนั้นชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง ชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและอินโดนีเซียต้นสูง และ ชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและเวียดนามต้นสูง ควรได้รับการทวนสอบ (validation) เพื่อเป็นการประเมินความแม่นยำของเครื่องหมาย SNP ที่ใช้ในการจำแนก รวมถึงเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง เพื่อลดระยะเวลาและลดต้นทุน ซึ่งมีเทคนิคในการตรวจสอบเครื่องหมาย SNP เช่น การใช้เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมแบบเวลาจริง (Real-Time PCR) ด้วยเทคนิค TaqMan hybridization probes เป็นการใช้โพรบที่จำเพาะกับแอลลีลของเครื่องหมาย SNP และเทคนิค KASP Genotyping ด้วยการออกแบบของไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อ SNPs หรือ MassARRAY ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับในการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยวิธี Multiplex PCR ร่วมกับ MALDI-TOF รวมถึงการวิเคราะห์เครื่องหมาย SNP แบบ haplotype หรือ เครื่องหมาย SNP ในหลายๆ ตำแหน่งร่วมกัน โดยเครื่องหมาย SNP นี้มีแนวโน้มที่จะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันทั้งหมดเป็นชุดและไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งหากนำข้อมูลตำแหน่ง SNP มาวิเคราะห์ haplotype เพิ่มเติม จะเป็นการใช้ข้อมูลให้เกิดประโยชน์มากที่สุดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกและตรวจสอบมะพร้าวต้นสูง

2. การนำเข้ามะพร้าวจากต่างประเทศผ่านด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพฯ และด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร กำหนดให้การนำเข้าในรูปของผลมะพร้าวแก่ปอกเปลือก (mature dehusked coconut) ในงานวิจัยนี้ได้สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเอ็มบริโอมะพร้าวต่างประเทศโดยจะต้องมีการผ่าผลมะพร้าวแก่ปอกเปลือกจากต่างประเทศ และแกะชิ้นส่วนเอ็มบริโอที่อยู่ภายในเนื้อมะพร้าวหรือจาวมะพร้าว จึงทำให้สูญเสียตัวอย่างผลมะพร้าวแก่ปอกเปลือกจากต่างประเทศ เพื่อเป็นการลดปัญหานี้ จึงควรมีการพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอในส่วนกาบหรือชั้น mesocarp ของมะพร้าวนำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อกำจัดสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compound) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำปฏิกิริยา PCR และลดระยะเวลาในการตรวจจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง

3. จากการไม่สามารถจำแนกสัณฐานวิทยาของผลมะพร้าวแก่ปอกเปลือกของไทยและต่างประเทศได้ ดังนั้น ชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง (อินโดนีเซียและเวียดนาม) ชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและอินโดนีเซียต้นสูง และชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและเวียดนามต้นสูง เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยตรวจสอบตัวอย่างมะพร้าวที่มีข้อสงสัยว่าเป็นมะพร้าวจากต่างประเทศ ทั้งกรณีที่รู้แหล่งที่มา (อินโดนีเซียและเวียดนาม) และไม่รู้แหล่งที่มา จากด่านตรวจพืช กรมวิชาการเกษตร

การนำไปใช้ประโยชน์

ในการศึกษาครั้งนี้ ข้อมูลตำแหน่งและจีโนไทป์ของเครื่องหมาย SNP ที่ได้จากการถอดรหัสพันธุกรรมมะพร้าวต้นสูง โดยเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ด้วยเทคนิค Genotyping-By-Sequencing (GBS) จะเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของมะพร้าวที่สำคัญ ซึ่งนักวิจัยสามารถนำไปพัฒนาหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรที่สนใจ เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะบนยีนที่ควบคุมลักษณะต่างๆ หรือ เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการตรวจจำแนกพันธุ์มะพร้าว ซึ่งเป็นการพัฒนาต่อยอดและช่วยในด้านการปรับปรุงพันธุ์ การตรวจจำแนกพันธุ์ หรือประเด็นปัญหาต่างๆ ได้ต่อไป

นอกจากนี้ การใช้ชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง (อินโดนีเซียและเวียดนาม) เพื่อตรวจพิสูจน์ในกรณีที่ไม่ทราบแหล่งที่มาของมะพร้าวที่ต้องสงสัย การใช้ชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและอินโดนีเซียต้นสูง เพื่อตรวจพิสูจน์กรณีที่ต้องสงสัยว่าตัวอย่างมะพร้าวมีแหล่งที่มาจากประเทศอินโดนีเซีย และชุดเครื่องหมาย SNP ที่สามารถจำแนกมะพร้าวไทยและเวียดนามต้นสูง เพื่อตรวจพิสูจน์กรณีที่ต้องสงสัยว่าตัวอย่างมะพร้าวมีแหล่งที่มาจากประเทศเวียดนาม นับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตอบสนองนโยบายของทางภาครัฐเพื่อช่วยแก้ปัญหาการลักลอบนำเข้าของมะพร้าวแก่ปอกเปลือกที่ส่งผลให้ราคามะพร้าวภายในประเทศตกต่ำ แต่อย่างไรก็ตามหากนำเทคโนโลยีที่ได้นี้ไปใช้จะต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการตรวจจำแนกมะพร้าวไทยและต่างประเทศต้นสูง รวมถึงการพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมะพร้าวนำเข้า เพื่อให้มีความรวดเร็ว ลดระยะเวลา ลดค่าใช้จ่าย เพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำในการตรวจพิสูจน์ต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้ดำเนินงานขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร ที่สนับสนุนให้มีการดำเนินงานโครงการวิจัยการตรวจสอบพันธุกรรมมะพร้าวไทยและต่างประเทศ โดยใช้งบประมาณของเงินรายได้จากการดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร ขอขอบคุณนายดนัย นาคประเสริฐ หัวหน้าโครงการฯ ตั้งแต่ กรกฎาคม 2563 ถึง กันยายน 2564 ปัจจุบัน ข้าราชการบำนาญ สำหรับคำแนะนำและประสานงานต่างๆ ในการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิจัยพืชสวน นางวิไลวรรณ ทวิชศรี นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ นางสุภาภรณ์ สาชาติ นักวิชาการเกษตรชำนาญการ นางสาวทิพยา ไกรทอง ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร และ นางสาวพรพยุง คงสุวรรณ นักวิชาการเกษตรชำนาญการ สำหรับการเก็บตัวอย่างมะพร้าวไทยและต่างประเทศ ขอขอบคุณด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพฯ และด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง กรมวิชาการเกษตร สำหรับการเก็บตัวอย่างมะพร้าวนำเข้าจากอินโดนีเซียและเวียดนาม และขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารการดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร ที่ปรึกษาโครงการฯ นางปิยนุช นาคะ ที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตรด้านพืชสวนอุตสาหกรรม นางพุฒนา รุ่งระวี ที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตรด้านวิชาการสถิติและการประเมินผลงานวิจัย และนางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ ที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตรด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาต่างๆ ในการดำเนินงานโครงการฯ นี้ กระทั่งโครงการฯ สามารถดำเนินงานสำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

จุฑาพร แสงประจักษ์ (2555). การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสาหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. KHON KAEN AGR. J., 40, 299-308.

ทิพวัลย์ บุญแก้ว และ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2016). การระบุพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะพร้าวจากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี. Thai Journal of Science and Technology, 5(2), 150-159.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2552). เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์ (Vol. 64). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Aljohi, H. A., Liu, W., Lin, Q., Zhao, Y., Zeng, J., Alamer, A., Alanazi, I. O., Alawad, A. O., Al-Sadi, A. M., Hu, S., and Yu, J. (2016). Complete Sequence and Analysis of Coconut Palm (*Cocos nucifera*) Mitochondrial Genome. PLoS One, 11(10), e0163990.

Batugal, P., Rao, V. R., and Oliver, J. (2005). Coconut Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Serdang, Selangor DE, Malaysia.

Baudouin, L., Lebrun, P., Louis, K., Ritter, E., Berger, A., and Billotte, N. (2006). QTL analysis of fruit components in the progeny of a Rennell Island Tall coconut (*Cocos nucifera* L.) individual. TAG. Theoretical and applied genetics, 112, 258-68.

Dasanayaka, P. N., Everard, J. M. D. T., Karunanayaka, E. H., and Nandadasa, H. G. (2009). Analysis of coconut (*Cocos nucifera* L.) diversity using microsatellite markers with emphasis on management and utilisation of genetic resources. J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka, 37(2), 99-109.

Ekanayake, G., Perera, C., Dasanayaka, N., and Everard, J. (2010). Varietal Classification of New Coconut (Cocos nucifera L.) Forms Identified from Southern Sri Lanka. COCOS, 19, 41-50.

Esposito, S., Cardi, T., Campanelli, G., Sestili, S., Díez, M. J., Soler, S., Prohens, J., & Tripodi, P. (2020). ddRAD sequencing-based genotyping for population structure analysis in cultivated tomato provides new insights into the genomic diversity of Mediterranean 'da serbo' type long shelf-life germplasm. Horticulture research, 7, 134.

Finkeldey, R., Leinemann, L., and Gailing, O. (2010) Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. Appl. Microbiol. Biotechnol, 85(5), 1251-1258.

Gawel, N. J., and Jarret, R. L. (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. Plant Mol. Biol. Rep., 9(3), 262-266.

Huang, Y. Y., Matzke, A. J., and Matzke, M. (2013). Complete sequence and comparative analysis of the chloroplast genome of coconut palm (*Cocos nucifera*). PLoS One, 8(8), e74736.

Kamaral, L. C. J., Perera, S. A. C. N., Perera, K. L. N. S., and Dassanayaka, P. N. (2017). Characterisation of Sri Lanka Yellow Dwarf Coconut (*Cocos nucifera* L.) by DNA fingerprinting with SSR markers. J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka, 45(4), 405 - 412.

Lédo A.d.S., Passos E.E.M., Fontes H.R., Ferreira J.M.S., Talamini V., and Vendrame W.A. (2019). Advances in Coconut palm propagation. Revista Brasileira de Fruticultura. 41(2), e-159.

Liu, K. and Muse, S.V. (2005). PowerMarker: Integrated Analysis Environment for Genetic Marker Data. Bioinformatics, 21, 2128-2129.

Liu, X., Tang, H., Li, D., and Hou, L. (2011). Genetic Diversity of Coconut Cultivars in China by Microsatellite (SSR) Markers. Molecular Plant Breeding, 2(12), 83-91.

Loiola, C. M., Azevedo, A. O., Diniz, L. E., Aragao, W. M., Azevedo, C. D., Santos, P. H., Ramos, H. C., Pereira, M. G., and Ramos, S. R. (2016). Genetic Relationships among Tall Coconut Palm (*Cocos nucifera* L.) Accessions of the International Coconut Genebank for Latin America and the Caribbean (ICG-LAC), Evaluated Using Microsatellite Markers (SSRs). PLoS One, 11(3), e0151309.

Meerow, A. W., Wisser, R. J., Brown, S. J., Kuhn, D. N., Schnell, R. J., and Broschat, T. K. (2003). Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. Theoretical and Applied Genetics, 106(4), 715–726.

Muñoz-Pérez, J. M., Cañas, G. P., López, L., & Arias, T. (2022). Genome-wide diversity analysis to infer population structure and linkage disequilibrium among Colombian coconut germplasm. Scientific reports, 12(1), 2958.

Nei, M. (1973). The theory and estimation of genetic distance. In: Morton, N.E., Ed., Genetic Structure of Populations. University Press of Hawaii, Honolulu, 45- 54.

Peakall, R. and Smouse, P.E. (2012). GenAlEx 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research-An Update. Bioinformatics Application Note, 28, 2537-2539.

Perera, L., Russell, J. R., Provan, J., and Powell, W. (1999). Identification and characterisation of microsatellite loci in coconut (*Cocos nucifera*) and the analysis of coconut populations in Sri Lanka. Molecular Ecology, 8, 344-346.

Perera, L., Russell, J. R., Provan, J., and Powell, W. (2001). Levels and distribution of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L., var. Typica form typica) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers. Euphytica, 122, 381–389.

Perera, L., Russell, J. R., Provan, J., and Powell, W. (2003). Studying genetic relationships among coconut varieties/populations using microsatellite markers. Euphytica, 132(1), 121–128.

Pootakham, W., Ruang-Areerate, P., Jomchai, N., Sonthirod, C., Sangsrakru, D., Yoocha, T., Theerawattanasuk, K., Nirapathpongporn, K., Romruensukharom, P., Tragoonrung, S., and Tangphatsornruang, S. (2015) Construction of a high-density integrated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) using genotyping-by-sequencing (GBS). Frontiers in Plant Science, 6,367.

Riangwong, K., Wanchana, S., Aesomnuk, W., Saensuk, C., Nubankoh, P., Ruanjaichon, V., . . . Arikit, S. (2020). Mining and validation of novel genotyping-by-sequencing (GBS)-based simple sequence repeats (SSRs) and their application for the estimation of the genetic diversity and population structure of coconuts (*Cocos nucifera* L.) in Thailand. Hortic Res, 7, 156.

Rivera, R., Edwards, K., Barker, J., Arnold, G., Ayad, G., Hodgkin, T., and Karp, A. (1999). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. *Genome, 42*(4), 668-675.

Roy, S., and Lachagari, R. (2017). Assessment of SNP and InDel Variations Among Rice Lines of Tulaipanji x Ranjit. Rice Science, 24, 336-348.

Singh, N., Choudhury, D. R., Singh, A. K., Kumar, S., Srinivasan, K., Tyagi, R. K., Singh, N. K., and Singh, R. (2013). Comparison of SSR and SNP markers in estimation of genetic diversity and population structure of Indian rice varieties. PLoS One, 8(12), e84136.

Tatarinova, T., Chekalin, E., Nikolsky, Y., Bruskin, S., Chebotarov, D., McNally, K., and Alexandrov, N. (2016). Nucleotide diversity analysis highlights functionally important genomic regions. Scientific Reports, 6.

Teulat, B., Aldam, C., Trehin, R., Lebrun, P., Barker, J. H. A.., Arnold, G. M., Karp, A., Baudouin, L., and Rognon, F. (2000). An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. Theor Appl Genet 100, 764–771.

Wang, S., Xiao, Y., Zhou, Z. W., Yuan, J., Guo, H., Yang, Z., Yang, J., Sun, P., Sun, L., Deng, Y., Xie, W. Z., Song, J. M., Qamar, M. T. U., Xia, W., Liu, R., Gong, S., Wang, Y., Wang, F., Liu, X., Fernie, A. R., ... Luo, J. (2021). High-quality reference genome sequences of

two coconut cultivars provide insights into evolution of monocot chromosomes and differentiation of fiber content and plant height. Genome biology, 22(1), 304.

Xiao, Y., Luo, Y., Yang, Y., Fan, H., Xia, W., Mason, A., Zhao, S., Sager, R., and Qiao, F. (2013). Development of microsatellite markers in Cocos nucifera and their application in evaluating the level of genetic diversity of Cocos nucifera. Plant Omics, 6(3), 193-200.

Xiao, Y., Xu, P., Fan, H., Baudouin, L., Xia, W., Bocs, S., Xu, J., Li, Q., Guo, A., Zhou, L., Li, J., Wu, Y., Ma, Z., Armero, A., Issali, A. E., Liu, N., Peng, M., and Yang, Y. (2017). The genome draft of coconut (*Cocos nucifera*). Gigascience, 6(11), 1-11.