



การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR ของยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดน้ำท่วมขังในปาล์มน้ำมัน

Development of EST-SSR Markers Involved in Waterlogging Stress in Oil Palm

มานิตา มุขดาร์^{1,2} และ พจมาลย์ สุรนินพงษ์^{1,2*}
Mukda, M.^{1,2} and Suraninpong, P.^{1,2*}

¹ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมอาหาร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จ. นครศรีธรรมราช 80161

¹ School of Agricultural Technology and Food Industry, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80161

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI), Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding author: potjamas@hotmail.com

Received 09 June 2021; Revised 27 April 2022; Accepted 18 May 2022

บทคัดย่อ

ด้วยปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) ที่ปลูกในภาคใต้ของประเทศไทย มักประสบปัญหาน้ำท่วมขังในฤดูฝน ส่งผลให้ผลผลิตของปาล์มน้ำมันลดลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะน้ำท่วมขัง เพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้ทนต่อสภาวะน้ำท่วมขัง โดยทำการค้นหาลำดับ Expressed Sequence Tag - Simple Sequence Repeat (EST-SSR) จากข้อมูลการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน (DEGs) ของทรานสคริปโตมปาล์มน้ำมันที่ทนต่อสภาวะน้ำท่วมขังจาก DEGs จำนวน 3,289 ยีน พบ EST-SSR จำนวน 229 ตำแหน่ง สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 214 คู่ และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้วิธีพีซีอาร์ ได้ 125 คู่ เมื่อนำไพรเมอร์ที่ได้ไปทดสอบในปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ สุราษฎร์ธานี 2 ด้วยวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis พบว่า ไพรเมอร์ จำนวน 99 และ 26 คู่ไพรเมอร์ ให้ผลเป็นมอนอมอร์ฟิกและพอลิมอร์ฟิก ตามลำดับ คู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลพอลิมอร์ฟิกเมื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน โดยใช้ Chi-square test พบไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ ที่เกี่ยวข้องกับยีน 6 ยีน แสดงความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมัน 2 สายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.37 ผลที่ได้จากการศึกษานี้ยืนยันว่า สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้ไปใช้ในการคัดเลือกปาล์มน้ำมันให้ทนต่อสภาวะน้ำท่วมขังได้

คำสำคัญ: EST-SSR, เครื่องหมายโมเลกุล, ปาล์มน้ำมัน, การทนต่อสภาวะน้ำท่วมขัง, ยีน

Abstract

Because oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) grown in the southern part of Thailand frequently experiences waterlogging during the rainy season, yield loss is a concern. This research was then developed molecular markers of genes associated with waterlogging for the selection of oil palm tolerance to waterlogging stress. The Expressed Sequence Tag - Simple Sequence Repeat (EST-SSR) sequence was searched from transcriptome of different gene expression data (DEGs) of oil palm tolerance to waterlogging stress. Of 3,289 DEGs, 229 EST-SSRs were found. 214 primer pairs could be designed and 125 primer pairs could be amplified via PCR technique. All of the obtained primers when tested with oil palm variety Surat Thani 1 and Surat Thani 2 by using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, 99 and 26 primer pairs revealed monomorphic and polymorphic, respectively. The polymorphic primers were using for analysis the differences between oil palm variety with Chi-square test. Six primer pairs associated with 6 genes exposed significant difference between the two oil palm varieties ($p < 0.05$) with the mean PIC of 0.37. Therefore, the obtained result from this study was confirmed the useful of molecular markers in the selection of oil palm to waterlogging stress.

Keywords: EST-SSR, molecular marker, oil palm, waterlogging tolerant, genes

บทนำ

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคใต้ที่มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมากที่สุด ในช่วงฤดูฝนพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทั้งทางฝั่งตะวันออกและฝั่งตะวันตกบางพื้นที่ประสบปัญหาน้ำท่วมขัง ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตปาล์มน้ำมันลดลง การเกิดน้ำท่วมขังสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ น้ำท่วม (flooding) และน้ำขัง (waterlogging) สภาวะน้ำท่วมมีลักษณะที่ระดับน้ำที่ไหลบ่าตามผิวดินและมีการซึมลงสู่ใต้ดิน สังเกตได้จากระดับน้ำสูงกว่าผิวดิน ส่วนสภาวะน้ำขังเป็นส่วนของดินในบริเวณที่มีการเจริญเติบโตของรากมีลักษณะอึดตัวไปด้วยน้ำตลอดเวลา ไม่สามารถระบายน้ำออกไปได้ ซึ่งอาจเกิดขึ้นมาจากระดับน้ำใต้ดินที่สูงขึ้น (รวี, 2540) เมื่อปาล์มน้ำมันอยู่ในสภาวะน้ำท่วมขังจะมีการตอบสนองทางสรีรวิทยา เช่น การชักนำการเปิดปากใบ ศักย์ของน้ำในใบลดลง ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบลดลง และอัตราการสังเคราะห์แสงในใบลดลง ส่งผลให้การเจริญเติบโตทางด้านลำต้น เช่น ความสูงต้น จำนวนทางใบ พื้นที่หน้าตัดทางใบ พื้นที่ใบต่อต้นน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้น และรากต่ำกว่าต้นปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้รับสภาวะน้ำท่วมขัง (มนต์สรวง และคณะ, 2553) ซึ่งกระบวนการตอบสนองทางสรีรวิทยานี้ถูกควบคุมด้วยยีนที่เกี่ยวข้อง

การคัดเลือกพันธุ์พืชในปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้กันอย่างกว้างขวาง เครื่องหมายโมเลกุล Simple Sequence Repeat (SSR) หรือเครื่องหมาย microsatellite เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ เนื่องจากมีความหลากหลายสูง มีลักษณะเป็น co-dominant มีอัลลีลจำนวนมากและมีการกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1-6 คู่เบส แต่ไม่เกิน 10 คู่เบส สามารถกำหนดจำนวนซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลี-เมอเรส (Peng and Lapitan, 2005) และเป็นเครื่องหมายระดับโมเลกุลที่มีความสามารถในการระบุจีโนมโทปภายในสปีชีส์ (Sochor *et al.*, 2019)

Expressed Sequence Tag (EST) เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจากห้องสมุดของ cDNA ที่ใช้เพื่อแสดงข้อมูลในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิต (Peng and Lapitan, 2005) Expressed Sequence Tag - Simple Sequence Repeat (EST-SSR) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนามาจากลำดับเบสของยีนที่มีการแสดงออก โดยการนำข้อมูลเหล่านี้มาออกแบบไพรเมอร์ในตำแหน่งเฉพาะของยีนนั้น ๆ จึงมีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์จีโนมโทป เนื่องจากสามารถแสดงจีโนมโทปแบบข่มร่วม (co-dominant) มี polymorphism สูง และสามารถถ่ายถอดระหว่างสปีชีส์ได้ง่าย (Kantety *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2018) ในปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR มาใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างแพร่หลาย เช่น Yan และ Gao (2020) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Camellia reticulata* เพื่อพัฒนาเครื่องหมาย SSR สำหรับใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างประชากร และประวัติการวิวัฒนาการ Hou และคณะ (2017) วิเคราะห์ตำแหน่ง SSR ของข้าวฟ่างทางกระรอก เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม Liuming และคณะ (2021) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของต้นโบทัน (*Paeonia Sect. Moutan*) เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างประชากร เนื่องจากงานวิจัยของต้นโบทันมีฐานข้อมูลจีโนมอย่างจำกัด Fang และคณะ (2014) พัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR แบบพอลิเมอร์ฟิงของสน (*Pinus sylvestris* var. *Mongolica*) ขึ้นมาใหม่ เพื่อนำไปใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม การปรับปรุงพันธุ์ในระดับโมเลกุลและการอนุรักษ์สายพันธุ์สน เป็นต้น จากรายงานความสำเร็จในการใช้ EST-SSR เพื่อเป็นเครื่องหมายโมเลกุลดังที่ได้กล่าวในข้างต้น การศึกษานี้จึงได้พัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR ขึ้นเพื่อนำไปใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันที่ทนและไม่ทนต่อสภาวะน้ำท่วมขัง

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุอุปกรณ์

นำตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ สุราษฎร์ธานี 2 อย่างละ 40 ตัวอย่าง จากบริษัท ซีพีโอ อะโกรเทค จำกัด (296 หมู่ 2 ถนนเพชรเกษม ตำบลสลูย์ อำเภอท่าแซะ จังหวัดชุมพร 86140) มาทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Doyle และ Doyle (Suraninpong *et al.*, 2015) ตรวจคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) และวัดค่าการดูดกลืนแสง (Nano Drop Spectro-photometer)

2. การค้นหาตำแหน่ง EST-SSR

ทำการคัดเลือกยีนที่แสดงออกแตกต่างกัน (Differentially Expressed Genes, DEGs) ของสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ทนและไม่ทนต่อในสภาวะน้ำท่วมขัง ซึ่งได้แก่ สายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ สุราษฎร์ธานี 2 ตามลำดับ จากฐานข้อมูล transcriptome ในโครงการ การค้นหายีนและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะน้ำท่วมขังในปาล์ม-น้ำมัน (ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานการวิจัยการเกษตร องค์การมหาชน, สวก) พบยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน จำนวน 3,289 ยีน (Nuanlaong, 2018; Nuanlaong *et al.*, 2020) นำยีนจำนวนดังกล่าวมาหาตำแหน่ง EST-SSR โดยใช้โปรแกรม Websat (<http://wsmartins.net/websat/>) กำหนดจำนวนเบสซ้ำและการซ้ำของแต่ละชุดเบส ดังนี้ ซ้ำสองเบส (dinucleotide repeats) จำนวน 10 ซ้ำ ซ้ำสามเบส (trinucleotide repeats) จำนวน 6 ซ้ำ ซ้ำสี่เบส (tetranucleotide repeats) จำนวน 5 ซ้ำ ซ้ำห้าเบส (pentanucleotide repeats) จำนวน 4 ซ้ำ และ ซ้ำหกเบส (hexanucleotide repeats) จำนวน 3 ซ้ำ ตามลำดับ

3. การออกแบบไพรเมอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีตำแหน่ง EST-SSR ไปออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) และ Oligocalculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) โดยกำหนดหลักเกณฑ์ในการออกแบบ คือ ขนาดของไพรเมอร์อยู่ในช่วง 18-22 เบสแพร์ ขนาดของผลผลิตที่ซึ่อร์อยู่ในช่วง 200-300 เบสแพร์ อุณหภูมิ annealing ซึ่งเป็นช่วงที่ไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับสายดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะเจาะจงอยู่ในช่วง 50-60

องศาเซลเซียส เฟอร์เซ็นต์คู่เบส CG อยู่ในช่วง 50-60 เฟอร์เซ็นต์ และมี 2 ทิศทาง คือ Forward (F) และ Reverse (R)

4. ปฏิกริยาพีซีอาร์

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ สุราษฎร์ธานี 2 มาทำปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์ที่ออกแบบ ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอ Mastermix (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) ไพรเมอร์ forward และ reverse และน้ำ nucleus free water (NFW) เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง annealing โดยในขั้นตอน pre-denature ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ขั้นตอน denature ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ 50-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน final extension ใช้ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำผลที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกา โรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

5. การวิเคราะห์พอลิมอร์ฟิก

นำไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณปริมาณดีเอ็นเอจากการศึกษาในข้อ 4 มาแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis จากนั้นทำการจำแนกจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นเจล แต่ละแถบคือ 1 อัลลีล สำหรับคู่ไพรเมอร์ที่แสดงลักษณะแบบพอลิมอร์ฟิก นำค่าที่นับได้มาวิเคราะห์หาค่า Polymorphism information content (PIC) โดยใช้สูตรของ Anderson และคณะ (1993) ดังนี้

$$PIC = 1 - \sum p_{ij}^2$$

จากนั้นนำค่า PIC ของแต่ละคู่ไพรเมอร์มาคำนวณหาความแตกต่างในการจำแนกสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้ง 2 สายพันธุ์โดยการ วิเคราะห์ค่า Chi-square ด้วยโปรแกรม Social Science Statistics (https://www.socscistatistics.com/tests/?fbc-Lid=I-wAR39xZN_iEsakfV3XHZHFAKICxSAQijl4hVywpAgVC-WUserMjfwP9kVKE0k)

6. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยเทคนิค Blastx

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนที่แถบแสดงความแตกต่างมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ด้วยเทคนิค Blastx (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) เพื่อหา ยีนที่เกี่ยวข้องกับเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR

ผลการทดลอง

1. การค้นหาตำแหน่ง EST-SSR

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DEGs เมื่อนำมาเข้าโปรแกรม websat เพื่อหาตำแหน่ง EST-SSR พบตำแหน่ง EST-SSR จำนวน 229 ตำแหน่ง (ร้อยละ 6.26) และพบจำนวนซ้ำของแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 3 ถึง 17 เบส เบสซ้ำส่วนใหญ่เป็นเบสซ้ำสามเบส เบสซ้ำหก เบส เบสซ้ำห้าเบส และเบสซ้ำสี่เบส คิดเป็นร้อยละ 67.69 (155 ตำแหน่ง) 31.00 (71 ตำแหน่ง) 0.87 (2 ตำแหน่ง) และ 0.44 (1 ตำแหน่ง) ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

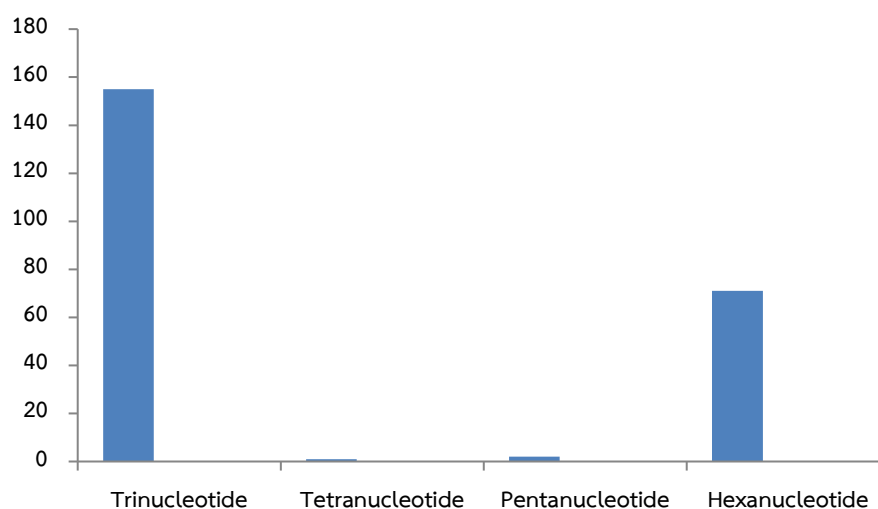


Figure 1 The EST-SSR position's number was found in trinucleotide tetranucleotide pentanucleotide and hexanucleotide

2. การออกแบบไพรเมอร์และการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มี EST-SSR เมื่อนำไปออกแบบไพรเมอร์ สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 214 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็นร้อยละ 93.45 ส่วนตำแหน่ง EST-SSR ที่ไม่สามารถออกแบบได้มีจำนวน 15 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 6.55 จากตำแหน่ง EST-SSR ทั้งหมด ส่วนการหาสภาวะ PCR ที่เหมาะสม ด้วยเทคนิค gradient PCR ได้คู่ไพรเมอร์ที่มีอุณหภูมิในช่วง annealing ที่เหมาะสมจำนวน 125 คู่ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 214 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็นร้อยละ 58.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถแบ่งตามอุณหภูมิได้เป็น อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส จำนวน 1 คู่ไพรเมอร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จำนวน 80 คู่ไพรเมอร์ อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ และอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จำนวน 38 คู่ไพรเมอร์

3. การวิเคราะห์พอลิมอร์ฟิก

การตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอบน denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ของไพรเมอร์ทั้งหมด 125 คู่ไพรเมอร์ พบคู่ไพรเมอร์ที่แสดงออกแบบมอโนเมอร์ฟิก จำนวน 99 คู่ไพรเมอร์ (ร้อยละ 79.2) และคู่ไพรเมอร์ที่แสดงออกแบบพอลิมอร์ฟิก จำนวน 26 คู่ไพรเมอร์ (ร้อยละ 20.8) ซึ่งเมื่อนำข้อมูลความถี่อัลลีลและความถี่ของจีโนไทป์ของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ สุราษฎร์ธานี 2 ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ที่แสดงลักษณะแบบพอลิมอร์ฟิก มาวิเคราะห์หาความแตกต่าง โดยใช้ Chi-square พบว่า ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ แสดงความแตกต่างของอัลลีลและจีโนไทป์ระหว่างปาล์มน้ำมัน 2 สายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2) ได้แก่ ไพรเมอร์ P-6 00012/80-2, P-7 00198/156, P-8 00120/24, P-101 00045/406, P-106 00022/618 และ P-154 00069/367 โดยมีค่า PIC อยู่ในช่วง 0.18 ถึง 0.17 และมีค่าเฉลี่ย PIC เท่ากับ 0.37 (ตารางที่ 3)

4. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยเทคนิค Blastx

ลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ที่แสดงความแตกต่างของอัลลีลและจีโนไทป์ระหว่างปาล์มน้ำมัน 2 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล NCBI ด้วยเทคนิค Blastx พบว่า เป็นลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน 6 ยีนที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งเมื่อทำการค้นหาความเหมือนกันของ translated nucleotide sequences (predicted amino acid sequence) กับ protein sequence ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI ผลปรากฏว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ สุราษฎร์ธานี 2 เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม la-related protein Larp4B, zinc finger protein ZAT2-like, ethylene-responsive transcription factor ABR1, SWI/ SNF complex subunit SWI3C isoform X1, CTL-like protein DDB_G0274487 และ serine carboxypeptidase-like

Table 1 Chi-Square analysis of allele frequency between oil palm variety Surat Thani 1 and Surat Thani 2 after separated on 5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

Primer	Strain	Frequency of Alleles			Chi-square
		A	B	C	
P-6 00012/80-2	Surat Thani 1	4	76	-	0.004124
	Surat Thani 2	16	64	-	
P-7 00198/156	Surat Thani 1	24	48	8	0.030054
	Surat Thani 2	32	32	16	
P-8 00120/24	Surat Thani 1	4	76	-	0.035015
	Surat Thani 2	12	68	-	
P-101 00045/406	Surat Thani 1	44	36	-	0.008002
	Surat Thani 2	60	20	-	
P-106 00022/618	Surat Thani 1	24	12	-	< 0.00001
	Surat Thani 2	52	28	-	
P-154 00069/367	Surat Thani 1	68	12	-	0.003487
	Surat Thani 2	52	28	-	

Table 2 Characteristics of polymorphic EST-SSRs gene determined via Chi-Square analysis

Primer name	EST-SSR motif	Primer sequence 5'→3'	Alleles number	Putative function	PIC
P-6 00012/80-2	(GAG)7	F: TGGTAACTCATGAGGAGGAC R: CTACCAATCCCCTGCTATC	2	la-related protein Larp4B	0.21
P-7 00198/156	(AGA)9	F: CGGACGACTCTGTAGTCAAT R: TGAGTTGGTGGTCTAGCTTC	3	zinc finger protein ZAT2-like	0.59
P-8 00120/24	(CTC)6	F: TGTGGAGTACTCAAGGCTCT R: ATAACCTCTCTGCTGCTCTG	2	ethylene-responsive transcription factor ABR1	0.18
P-101 00045/406	(GAC)6	F: CGATGCAGTAATCCCAAG R: AAGTCAGAGATGCGTTGG	2	SWI/SNF complex subunit SWI3C isoform X1	0.44
P-106 00022/618	(CCG)7	F: TGTCACCCCATCCAAGT R: GGAGGTAGCCAGAATTTGAG	2	CTL-like protein DDB G0274487	0.44
P-154 00069/367	(TCC)7	F: GgTTCTCGAAGCTTCACTC R: CCTAGCTGCTCTATCGGTAT	2	serine carboxypeptidase-like	0.36

วิจารณ์

การค้นหาเครื่องหมาย EST-SSR ของปาล์มน้ำมันที่ทนต่อสภาพน้ำท่วมซึ่งสามารถหาเครื่องหมาย EST-SSR ได้ทั้งหมด 229 ตำแหน่ง จากทั้งหมด 3,289 ยีน คิดเป็นร้อยละ 6.96 ซึ่งต่ำกว่า การศึกษาของ Cheng และคณะ (2015) ที่พบเครื่องหมาย EST-SSR จำนวน 8,137 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 7.49 จากการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 108,692 ลำดับ ใน *Taxodium 'zhongshansa'* Sharma และคณะ (2020) พบตำแหน่ง EST-SSR จำนวน 249 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 9.95 จากการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน *Camellia reticulata* จำนวน 2,503 ลำดับ Hou และคณะ (2017) พบตำแหน่ง SSR จำนวน 4,724 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 6.1 จากการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 25,341 ลำดับ ในข้าวฟ่างหางกระรอก (*Panicum miliaceum*) ในขณะที่ Liuming และคณะ (2021) พบตำแหน่ง EST-SSR จำนวน 8,443 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 5.21 จากการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 162,095 ลำดับ ในต้นโบตั๋น (*Paeonia Sect. Moutan*) ซึ่งการพบตำแหน่งเครื่องหมาย SSR ในจำนวนน้อยนี้อาจเกิดขึ้นจากการกำหนดจำนวนเบสซ้ำในการค้นหาเครื่องหมาย SSR (Yan *et al.*, 2008; Kantety *et al.*, 2002) โดยการศึกษาครั้งนี้ได้กำหนดเบสซ้ำของ SSR เป็น ซ้ำสองเบส ซ้ำสามเบส ซ้ำสี่เบส ซ้ำห้าเบส และซ้ำหกเบส จำนวน 10, 6, 5, 4 และ 3 ตำแหน่ง ตามลำดับ ทำให้สามารถหาเครื่องหมาย EST-SSR ได้ ร้อยละ 6.96 ในขณะที่ Sharma และคณะ (2020) ได้กำหนดหลักเกณฑ์ของจำนวนเบสซ้ำของ SSR เป็น ซ้ำสองเบส ซ้ำสามเบส ซ้ำสี่เบส ซ้ำห้าเบส และซ้ำหกเบส จำนวน 6, 5, 5, 5 และ 5 ตำแหน่ง ตามลำดับ จึงสามารถหาเครื่องหมาย EST-SSR ได้ ร้อยละ 9.95 Cheng และคณะ (2015) ได้กำหนดหลักเกณฑ์ของจำนวนเบสซ้ำของ SSR เป็น ซ้ำหนึ่งเบส ซ้ำสองเบส ซ้ำสามเบส ซ้ำสี่เบส ซ้ำห้าเบส และซ้ำหกเบส จำนวน 10, 6, 5, 5, 5 และ 5 ตำแหน่ง ตามลำดับ จึงสามารถหาเครื่องหมาย EST-SSR ได้ ร้อยละ 8.17 และ Hou และคณะ (2017) ได้กำหนดหลักเกณฑ์ของจำนวนเบสซ้ำของ SSR เป็น ซ้ำสองเบส ซ้ำสามเบส ซ้ำสี่เบส ซ้ำห้าเบส และซ้ำหกเบส จำนวน 8, 5, 5, 5 และ 5 ตำแหน่ง ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า ตำแหน่งเบสที่พบส่วนใหญ่เป็นเบสซ้ำสามเบส สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบเบสซ้ำสามเบสบนตำแหน่ง SSR มากที่สุดในลำดับ EST เช่น ข้าวสาลี (Nahas *et al.*, 2020) สาเหตุที่พบตำแหน่งเบสซ้ำสามเบสมากกว่าจำนวนเบสซ้ำอื่น ๆ นั้น เนื่องมาจากไม่มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนซ้ำ SSR ในส่วนที่เป็น coding นำไปสู่การไม่เปลี่ยนแปลงการเข้ารหัสของยีน (Bazzo *et al.*, 2018)

สำหรับอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ จำนวน 125 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ ร้อยละ 58.4 สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ที่อุณหภูมิ annealing 56 60 63 และ 65 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง annealing คือ อุณหภูมิที่ไพรเมอร์สายเดี่ยวเข้าจะจับกับสายเดี่ยวของดีเอ็นเอเป้าหมาย อุณหภูมิที่ใช้โดยทั่วไปมักจะต่ำกว่าอุณหภูมิแยกตัว (melting temperature) ของไพรเมอร์ 3-5 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 3-4 องศาเซลเซียส (Sambrook and Russell, 2001; Doi *et al.*, 2019) ซึ่งในการศึกษานี้เลือกใช้อุณหภูมิ annealing ในช่วง 60-65 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 52-58 องศาเซลเซียส (Borah, 2011) ทั้งนี้เนื่องมาจากไพรเมอร์ที่ออกแบบในการศึกษานี้มีเปอร์เซ็นต์ของเบส CG ค่อนข้างสูง พันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสมีความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ต้องใช้อุณหภูมิหลอมที่สูงขึ้นไปด้วย (Strien *et al.*, 2013; Doi *et al.*, 2019) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบ จำนวนไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีหลายแถบดีเอ็นเอค่อนข้างมาก รวมทั้งพบไพรเมอร์ที่ไม่สามารถหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมได้ ซึ่ง นิรากร และคณะ (2556) ชี้ให้เห็นว่า เกิดจากไพรเมอร์ที่ออกแบบไม่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอตำแหน่งเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณอุณหภูมิของไพรเมอร์ forward และ reverse ที่ทำเกินไป มีผลให้ดีเอ็นเอไม่จับกับไพรเมอร์ จึงไม่สามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ได้

ส่วนการจำแนกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และสุราษฎร์ธานี 2 ด้วยวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis พบว่า ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ คิดเป็นร้อยละ 23.10 แสดงความแตกต่างระหว่างปาล์ม-น้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งเป็นร้อยละที่มีจำนวนน้อยกว่างานวิจัยของ Yan และ Gao (2020) ที่พบไพรเมอร์จำนวน 11 คู่ ที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางกลับกันสูงกว่าการศึกษาของ Chai และคณะ (2020) ที่พบว่า เมื่อนำไพรเมอร์ 63 คู่ที่ได้จากการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR ของ *Opisthospappus* มีทั้งหมด 11 คู่ คิดเป็นร้อยละ 17.46 ที่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างประชากรของ *O. longilobus* และ *O. taihangensis*

ส่วนการพบค่า PIC อยู่ในช่วง 0.18 ถึง 0.59 โดยมีค่าเฉลี่ย PIC ที่ 0.37 พบว่า ต่ำกว่าค่า PIC ของ *Taxodium 'zhongshansa'* ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 0.466 (Cheng *et al.*, 2015) และต่ำกว่าค่า PIC ที่พบในอ้อย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.62 (Parthiban *et al.*, 2018) แต่สูงกว่าค่า PIC ของ *Rhododendron arboreum* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.195 (Sharma *et al.*, 2020) ทั้งนี้หากข้อมูลเฉลี่ย PIC สูงต้องมี PIC > 0.50 ปานกลางคือ 0.25 < PIC < 0.50 และความเล็กน้อยคือ PIC < 0.25 (Yu *et al.*, 2012, Cheng *et al.*, 2015) ดังนั้นผลการจำแนกความแตกต่างของไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ ระหว่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และสุราษฎร์ธานี 2 จึงจัดอยู่ในช่วงปานกลาง

นอกจากนี้พบว่า ไพรเมอร์ 6 คู่มาจากยีน 6 ยีน ซึ่งเมื่อวิเคราะห์หาโปรตีนของยีนทั้ง 6 แล้ว พบว่า เป็นโปรตีนที่ทราบหน้าที่แล้ว ดังนี้

โปรตีน la-related protein Larp4B หรือยีน LARP4B มีผลกระตุ้นต่อการก่อตัวของ lamellipodia (Egiz *et al.*, 2019)

โปรตีน zinc finger protein ZAT2-like หรือยีน ZAT2 ซึ่งยีน zinc finger protein ZAT2 ตอบสนองต่อการทำงานของ monooxygenase และออกซิน (Toubiana *et al.*, 2020) หากการแสดงออกของ monooxygenase มากเกินไปในยาสูบจะช่วยให้ทนต่อความเครียดเพิ่มขึ้น (Duan *et al.*, 2017)

โปรตีน ethylene-responsive transcription factor ABR1 หรือยีน ABR1 เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อกรดแอบไซซิก และการตอบสนองที่เกี่ยวข้องกับการสร้างน้ำตาล (Choudhury, 2019)

โปรตีน SWI/SNF complex subunit SWI3C isoform X1 หรือ ยีน LOC107905227 เกี่ยวข้องกับการสร้างแบบจำลอง และการปรับเปลี่ยนของโครมาติน (Romeu *et al.*, 2014)

โปรตีน CTL-like protein DDB_G0274487 หรือยีน DDB_G0274487 เกี่ยวข้องกับ transcription factor RAV1 (Han *et al.*, 2020) ซึ่ง RAV1 เป็น transcription factor ที่เกิดขึ้นในช่วงแรกของการชราภาพของใบ ซึ่งการชราภาพของใบเป็นกระบวนการพัฒนาที่ควบคุมโดยพันธุกรรมและนำไปสู่การตายของเซลล์ (Woo *et al.*, 2010)

โปรตีน serine carboxypeptidase-like เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อความเครียด การเจริญเติบโต การพัฒนาและการป้องกันเชื้อโรค (Jiang *et al.*, 2018)

จากข้อมูลยีนที่พบในการศึกษานี้ พบว่า ยีนส่วนใหญ่มีการแสดงออกของแถบดีเอ็นเอแบบพอลิมอร์ฟิก ซึ่งไม่เคยมีรายงานความเกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาวะน้ำท่วมขังมาก่อน จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเครื่องหมายโมเลกุลของยีนทั้ง 6 ที่ได้จากการศึกษานี้ไปตรวจสอบกับปาล์มน้ำมันจำนวนมากที่อยู่ในสภาวะน้ำท่วมขังเพื่อยืนยันเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้ต่อไป

สรุป

ด้วยการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต้องใช้ระยะเวลาที่ยาวนานและใช้พื้นที่ปลูกเพื่อคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ต้องการจำนวนมาก ดังนั้นการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เพื่อช่วยคัดเลือกต้นปาล์มน้ำมันให้มีลักษณะตามที่ต้องการจะช่วยย่นระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้ งานวิจัยนี้ได้เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR จำนวน 6 เครื่องหมาย จาก DEGs ของยีนที่แสดงออกแตกต่างกัน จำนวน 3,289 ยีน หรือคิดเป็นร้อยละ 0.18 แม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาได้จะมีร้อยละค่อนข้างต่ำ แต่ผลการวิเคราะห์ความถี่อัลลีลและความถี่ของจีโนไทป์ของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ สุราษฎร์ธานี 2 ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ที่แสดงลักษณะแบบพอลิมอร์ฟิก โดยใช้ Chi-square แสดงค่าความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมัน 2 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีค่าเฉลี่ย PIC ที่ 0.37 ซึ่งจัดอยู่ในระดับปานกลาง รวมทั้งยีนที่ได้จากทั้ง 6 คู่ไพรเมอร์เป็นยีนใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานในกลไกการตอบสนองต่อสภาวะน้ำท่วมขังมาก่อน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นมาไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกต้นปาล์มน้ำมันในโครงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อให้มีลักษณะที่ทนต่อสภาพเครียดน้ำท่วมขังต่อไปได้ โดยจะต้องทำการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 6 คู่ไพรเมอร์กับต้นปาล์มน้ำมันจำนวนมากขึ้นเพื่อให้ผลการศึกษาที่มีความแม่นยำมากขึ้น ในขณะเดียวกันทำการศึกษากการแสดงออกของยีนทั้ง 6 ในสภาวะน้ำท่วมขังควบคู่ไปด้วยเพื่อให้ได้ข้อมูลกลไกการตอบสนองต่อสภาวะน้ำท่วมขังในปาล์มน้ำมันที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

เอกสารอ้างอิง

- Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.D. and Sorrells, M.E. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36(1): 181-186.
- Bazzo, B.R., de Carvalho, L.M., Carazzolle, M.F., Pereira, G.A.G. and Colombo, B.R. 2018. Development of novel EST-SSR markers in the macaúba palm (*Acrocomia aculeata*) using transcriptome sequencing and cross-species transferability in *Arecaceae* species. *MBC Plant Biology* 18: 276.
- Borah, P. 2011. Primer designing for PCR. *Optometry and Vision Science* 11(3): 134-136.
- Chai, M., Ye, H., Wang, Z., Zhou, Y., Wu, J., Gao, Y., Han, W., Zang, E., Zhang, H., Ru, W., Sun, G. and Wang, Y. 2020. Genetic divergence and relationship among *Opisthopappus* species identified by development of EST-SSR markers. *Frontiers in Genetics* 11: 177.
- Cheng, Y., Yang, Y., Wang, Z., Qi, B., Yin, Y. and Li, H. 2015. Development and characterization of EST-SSR markers in *Taxodium 'zhongshansa'*. *Plant Molecular Biology Reporter* 33: 1804-1814.

- Choudhury, S. 2019. In silico analysis of ERF family in Arabidopsis, Oryza and Solanum crop plants. *Journal of Genetics, Genomics and Plant Breeding* 3(3): 34-44.
- Doi, H., Fukaya, K., Oka, S.I., Sato, K., Kondoh, M. and Miya, M. 2019. Evaluation of detection probabilities at the water-filtering and initial PCR steps in environmental DNA metabarcoding using a multispecies site occupancy model. *Scientific Reports* 9: 3581.
- Egiz, M., Usui, T., Ishibashi, M., Zhang, X., Shigeta, S., Toyoshima, M., Kitatani, K. and Yaegashi, N. 2019. La-Related Protein 4 as a suppressor for motility of ovarian cancer cells. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 247: 59-67.
- Fang, P., Niu, S., Yuan H., Li, Z., Zhang, Y., Yuan, L. and Li, W. 2014. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (*Pinaceae*). *Applications in Plant Sciences* 2(1): 1300057.
- Han, A. R., Kim, S.A., Kim, G.H., and Choi, C. 2020. Identification of favorable SNP alleles related to fruit traits in diverse apple germplasm. *Research Square*. doi:10.21203/rs.2.19413/v2.
- Hou, S., Sun, Z. Li, Y., Wang, Y., Ling, H., Xing, G., Han, Y. and Li, H. 2017. Transcriptomic analysis, genic SSR development, and genetic diversity of proso millet (*Panicum miliaceum*; Poaceae). *Applications in Plant Sciences* 5(7): 1600137.
- Jiang, P., Zhang, K., Ding, Z., He, Q., Li, W., Zhu, S., Cheng, W., Zhang, K. and Li, K. 2018. Characterization of a strong and constitutive promoter from the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene AtSCPL30 as a potential tool for crop transgenic breeding. *BMC Biotechnology* 18: 59.
- Kantety, R.V., Rota, M.L., Matthews, D.E. and Sorrells, M.E. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology* 48: 501-510.
- Liuming, L., Yunyao, Y., Hewen, Z., Pingsheng, L., Zenghui, H., Jing, W. and Kezhong, Z. 2021. Development of EST-SSR markers and association analysis of floral scent in tree peony. *Scientia Horticulturae* 289: 110409.
- Nahas, L.D., Alsamman, A.M., Hamwieh, A., Al-Husein, N. and Lababidi, G. 2020. Characterization of EST-SSR markers in bread wheat EST related to drought tolerance and functional analysis of SSR-containing unigenes. *Highlights in BioScience* ISSN: 2682-4043. doi:10.36462/H.BioSci.20203.
- Nuanlaong, S., 2018. Gene identification and gene expression of lysigenous aerenchyma formation in oil palm roots under waterlogging condition. Ph.D. Thesis, Walailak University, Thailand.
- Nuanlaong, S., Wuthisuthimethavee, S., Mekanawakul, M. and Suraninpong, P. 2020. Transcriptome analysis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) roots under waterlogging stress. *Plant Omics Journal* 13(1): 46-56.
- Parthiban, S., Govindaraj, P. and Senthilkumar, S. 2018. Comparison of relative efficiency of genomic SSR and EST-SSR markers in estimating genetic diversity in sugarcane. *3 Biotech* 8: 144. doi: 10.1007/s13205-018-1172-8
- Peng, J.H. and Lapitan, Nora L.V. 2005. Characterization of EST-derived microsatellites in the wheat genome and development of eSSR markers. *Functional and Integrative Genomics* 5: 80-96.
- Romeu, J.F., Monforte, A.J., Sánchez, G., Granell, A., Garcia-Brunton, J., Badenes, M.L., and Rios, G. 2014. Quantitative trait loci affecting reproductive phenology in peach. *Plant Biology* 14: 52.
- Rueangkhanab, M., Maenmeun, S., Sangsing, K. and Chiarawipa, R. 2010. Physiological and growth responses of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedling to waterlogging. *Thai Agricultural Research Journal* 28: 43-57.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Rapid isolation of yeast DNA. *In* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (eds. Green, M.R. and Sambrook, J.), pp. 631–632. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seewinta, N., Bhusudsawang, G. and Ukoskit, K. 2013. Preliminary study of SSR markers developed by next generation sequencing in *Jatropha curcas* L. *Journal of Science and Technology* 21: 409-417.
- Setthaphakdi, R. 2540. Fruit trees in flooding conditions and solutions solving. *Journal of progressive Agriculture* 12: 4-11.
- Sharma, H., Kumar, P., Singh, A., Aggarwal, K., Roy, J., Sharma, V. and Rawat, S. 2020. Development of polymorphic EST-SSR markers and their applicability in genetic diversity evaluation in *Rhododendron arboretum*. *Molecular Biology Reports* 47: 2447-2457.
- Sochor, M., Jemelková, M. and Doležalová, I. 2019. Phenotyping and SSR markers as a tool for identification of duplicates in lettuce germplasm. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 55(3): 110-119
- Strien, J., Sanft, J. and Mall, G. 2013. Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences. *Molecular Biotechnology* 54: 1048-1054.
- Suraninpong, P., Nuanlaong, S. and Wuthisuthimethavee, S. 2015. A new classification of Thailand's Nepenthes species by genetic analysis of AFLP Markers. *Acta Horticulturae* 1100: 77-82.
- Woo, H.R., Kim J.H., Kim, J., Kim, J., Lee, U., Song, I.J., Kim, J.H., Lee, H.Y., Nam, H.G. and Lim, P.O. 2010. The RAV1 transcription factor positively regulates leaf senescence in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 61(14): 3947-3957.
- Yan, J., Huen, D., Morely, T., Johnson, G., Gubb, D., Roote, J. and Adler, P. N. 2008. The multiple-wing-hairs gene encodes a novel GBD-FH3 domain-containing protein that functions both prior to and after wing hair initiation. *Genetics* 180(1): 219-228.
- Yan, T and Gao, L.Z. 2020. Development and characterization of EST-SSR markers for *Camellia reticulata*. *Applications in Plant Sciences* 8(5): e11348.
- Yu, J.Z., Fang, D.D., Kohel, R.J., Ulloa, M., Hinze, L.L., Percy, R.G., Zhang, Jinfa, C.P., Scheffler, B.E. and Jones, D.C. 2012. Development of a core set of SSR markers for the characterization of *Gossypium* germplasm. *Euphytica* 187: 203-213.
- Zhang, Z., Xie, W., Zhang, J., Zhao, X., Zhao, Y. and Wang, Y. 2018. Phenotype- and SSR-based estimates of genetic variation between and within two important *Elymus* Species in Western and Northern China. *Genes* 9: 147.