การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอ

สุวิมล กลศึก ประสาน สืบสุข อรรัตน์ วงศ์ศรี และยิ่งนิยม ริยาพันธ์

บทคัดย่อ

การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอ ช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันมีความถูกต้องแม่นยำและประสบความสำเร็จเร็วขึ้น การทดลองครั้งนี้จึงวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของยีนควบคุมความหนากะลาและยีนเกี่ยวข้องกับความสูงต้นในเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 4 ตำแหน่ง บนยีนควบคุมความหนากะลา ได้แก่ SNP_{DA}, SNP_{ENGC} , SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAV} โดยการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะ ดำเนินการในเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะสัณฐานจำนวน 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราจำนวน 9 ต้น ที่ได้จากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Calarbar กับต้นพ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS จากการตรวจสอบชนิดของนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ตำแหน่ง พบว่าปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรากลุ่มนี้มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} โดยมีนิวคลีโอไทด์เป็น A/T ส่วนนิวคลีโอไทด์อีก 3 ตำแหน่ง ไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยมีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{DA} เป็น C/C ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น C/C และตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น C/C กลุ่มที่ 2 ปาล์มน้ำมันดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา จำนวน 32 ต้น ได้มาจากการผสมผสมตัวเองของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา (ปาล์มน้ำมันต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Yangambi ผสมกับต้นพ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS) จากการตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAV} พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} โดยปาล์มน้ำมันดูรา มีนิวคลีโอไทด์ เป็น A/A ปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา มีนิวคลีโอไทด์ เป็น T/T และปาล์มน้ำมันเทเนอรา มีนิวคลีโอไทด์เป็น T/A หรับการศึกษาพันธุกรรมของยีนเกี่ยวข้องกับความสูงต้น (gibberellin 20 oxidase) ดำเนินการในปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามชนิด (*guineensis* x *oleifera*) โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าว และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส อย่างไรก็ตามการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับความสูงต้นยังไม่เสร็จสิ้น จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาต่อเพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะความสูงต้นในปาล์มน้ำมันต่อไป

บทนำ

การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้ได้พันธุ์ดี มีคุณภาพ สอดคล้องกับความต้องการของอุตสาหกรรม เป็นหัวใจหลักของการพัฒนาอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ คือ เชื้อพันธุกรรม กรมวิชาการเกษตร โดยศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี เก็บรวบรวมเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีความหลากหลาย มีที่มาจากแหล่งเชื้อพันธุ์ที่สำคัญ และได้นำเชื้อพันธุ์เหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี ในเบื้องต้นมีการเก็บข้อมูลประวัติพันธุ์ และลักษณะสำคัญทางฟีโนไทป์เอาไว้อย่าง

กรมวิชาการเกษตร

เป็นระบบ อย่างไรก็ตามลักษณะภายนอกเหล่านี้มีสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องในการแสดงออก การแยกความแตกต่างในบางลักษณะที่มีความใกล้เคียงกันจึงทำได้ยาก โดยเฉพาะการแยกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรากับเทเนอราด้วยลักษณะผล ซึ่งในบางครั้งปาล์มน้ำมันเทเนอรามีการแสดงออกคล้ายกับปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา นอกจากนี้การใช้ลักษณะสัณฐานเป็นมาตรฐานการคัดเลือกเพียงอย่างเดียว ยังให้ประสิทธิภาพและความแม่นยำในการคัดเลือกไม่มากพอ ดังนั้นกรมวิชาการเกษตร โดยหทัยรัตน์ และคณะ (2557) จึงได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms) ในส่วนของยีนควบคุมความหนากะลา ซึ่งอาศัยการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่งบนยีนดังกล่าว มาใช้ในการแยกความแตกต่างของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ภายในกลุ่มพันธุ์เดียวกันของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งการศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอ เป็นการสร้างเอกลักษณ์บ่งชี้พันธุกรรม ตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ ช่วยให้การคัดเลือกถูกต้องแม่นยำ ลดพื้นที่ในการปลูกคัดเลือก ประหยัดเวลาและงบประมาณในการดูแลรักษา ส่งเสริมให้การปรับปรุงพันธุ์และการผลิตพันธุ์ลูกผสมมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีอายุยืน แต่ด้วยความสูงที่มากขึ้นตามอายุต้นจนไม่เอื้อต่อการเกี่ยวทะลายปาล์มน้ำมันจึงมีอายุการเก็บเกี่ยวอยู่ที่ 20-25 ปี เท่านั้น ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้มีผลผลิตทะลายสดสูงและต้นเตี้ย จึงช่วยยืดระยะเวลาการเก็บเกี่ยวผลผลิตออกไปได้ อย่างไรก็ตามปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้น มีทรงพุ่มกว้าง ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการมาตรฐานและคัดเลือกด้วยการแสดงออกของลักษณะภายนอก จึงต้องใช้เวลาและพื้นที่จำนวนมากในการปลูกทดสอบ ในขณะที่พื้นที่ปลูกทดสอบมีจำนวนจำกัด ดังนั้นจึงต้องคัดเลือกลักษณะที่ต้องการด้วยลักษณะสัณฐานร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งปัจจุบันมีรายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับความสูงต้นในบางพืช (Ikeda *et al.*,2001; Itoh *et al.*, 2002) การศึกษาลำดับพันธุกรรมของยีนเหล่านี้เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่งบนยีนควบคุมความหนากะลา และศึกษาลำดับพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสูงต้นในเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันบางกลุ่มของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุพืช

ปาล์มน้ำมัน *Elaeis guineensis*, *E. oleifera* และลูกผสมข้ามชนิด *guineensis* x *oleifera* ณ แปลงรวบรวมเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอเอ็นเอ
- สารเคมีสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซีส
- สารเคมีสำหรับใช้ทำ PCR ทั่วไป และ Real-time PCR
- สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากเจล

กรมวิชาการเกษตร

อุปกรณ์

- อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอเอ็นเอ
- อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส
- อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและทำ PCR ทั่วไป และ Real-time PCR
- อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล

วิธีการ

1. การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมกะลา (MADS-box) ในเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

1.1 การเก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน

เก็บตัวอย่างใบต้นปาล์มน้ำมันปาล์มน้ำมันชนิด *E guineensis* ประเภทดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา จากประชากรเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ณ แปลงรวบรวมเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน โดยใช้วิธีการทดัดแปลงมาจาก Doyle และ Doyle (1990) ดังนี้ เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 2xCTAB (2% (w/v) Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide, 1.4 M NaCl, 50mM Na2 EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)) โดยเติม β-mercaptoethanal เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ลงในบัฟเฟอร์ก่อนการสกัดดีเอ็นเอ นำตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันน้ำหนักสดประมาณ 200 มิลลิกรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ บดด้วยโกร่งให้ละเอียดพร้อมกับไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ CTAB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องเขย่า นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยกลับหลอดไปมาทุก 15 นาที เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Chloroform : Isoamyl alcohol = 24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในหลอดโดยวิธีกลับหลอดไปมาประมาณ 200 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 500-700 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมโอโซโพรพานอลปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที วางทิ้งไว้ให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (Tris-HCl 1 M (pH 8.0), Na_2EDTA 0.25 M) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไปใช้งานต่อไป

1.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

ทำการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer คำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กลับมาเป็นปริมาณดีเอ็นเอ และทำการบันทึกภาพตัวอย่างจีโนมิกดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ศรีวิชัยการเกษตร

ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE (Tris Base, Glacial acetic acid, Na EDTA 0.5 M (pH 8.0) เป็นเวลา 30 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบและบันทึกภาพภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

1.4 การทำ Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction: PCR)

เจือจางจีโนมิกดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณแล้วด้วย TE buffer ให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงนิคลีโอไทด์ (SNP) ที่ตำแหน่งต่าง ๆ 4 ตำแหน่ง ดังนี้

ชุดที่ 1ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อ SNP ที่ตำแหน่ง SNP_{DA}

ไพรเมอร์เส้นที่ 1 Forward primer: 5’- AGCCGGCAGGTCACTTTC -3’

ไพรเมอร์เส้นที่ 2 Reverse primer: 5’- GGAGAAGACAATAAGGGCAACCT -3’

โพรบเส้นที่ 1 Hybridization probe (C): VIC-5’- CATTTCGGCGTTTGCA -Q-(MQB)-3’

โพรบเส้นที่ 2 Hybridization probe (A): FAM-5’- CATTTCGGCCTTTGCA -Q-(MQB)-3’

ชุดที่ 2 ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อ SNP ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC}

ไพรเมอร์เส้นที่ 1 Forward primer: 5’- GCCGGCAGGTCACTTTCT -3’

ไพรเมอร์เส้นที่ 2 Reverse primer: 5’- GGAGAAGACAATAAGGGCAACCT -3’

โพรบเส้นที่ 1 Hybridization probe (A): VIC-5’- AAATGGACTGCTGAAGAA-Q-(MQB)-3’

โพรบเส้นที่ 2 Hybridization probe (T): FAM-5’- TGGACTGCCGAAGAA-Q-(MQB)-3’

ชุดที่ 3 ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อ SNP ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa}

ไพรเมอร์เส้นที่ 1 Forward primer: 5’- GCCGGCAGGTCACTTTCT -3’

ไพรเมอร์เส้นที่ 2 Reverse primer: 5’- GGAGAAGACAATAAGGGCAACCT -3’

โพรบเส้นที่ 1 Hybridization probe (C): VIC-5’- CAACTCATAAGCTTTCTTC -Q-(MQB)-3’

โพรบเส้นที่ 2 Hybridization probe (A): FAM-5’- CTCATAAGCATTCTTC -Q-(MQB)-3’

ชุดที่ 4 ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อ SNP ที่ตำแหน่ง SNP_{LaAV}

ไพรเมอร์เส้นที่ 1 Forward primer: 5’- GCCGGCAGGTCACTTTCT -3’

ไพรเมอร์เส้นที่ 2 Reverse primer: 5’- CCGGCTGGAGAAGACAATAAGG -3’

โพรบเส้นที่ 1 Hybridization probe (C): VIC-5’- CTTTGTGATGCTGAGGTT -Q-(MQB)-3’

โพรบเส้นที่ 2 Hybridization probe (A): FAM-5’- CTTTGTGATGATGAGGTT -Q-(MQB)-3’

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2xTaq Man® Genotyping master mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 20x Assay primer and probe ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 8 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิปฏิกิริยา 2 ระดับ คือ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที จำนวน 50 รอบ โปรแกรมจะบันทึกและคำนวณปริมาณสีฟลูออเรสเซนต์ที่ได้ในแต่ละรอบ

กรมวิชาการเกษตร

ของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ชนิดของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งสนิปส์

2. การศึกษาพันธุกรรมของยีนควบคุมความสูงในปาล์มน้ำมัน

2.1 การเก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน

เก็บตัวอย่างใบต้นปาล์มน้ำมันปาล์มน้ำมันชนิด *E. oleifera* และลูกผสมข้ามชนิด *guineensis* x *oleifera* จากแปลงรวบรวมเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

วิธีการเช่นเดียวกับ ข้อ 1.2

2.3 การออกแบบไพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

สืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความสูงของพืช ออกแบบไพรเมอร์ที่สอดคล้องกับลำดับเบสของยีนดังกล่าว โดยประเมิน GC content, annealing temperature, primer dimer และ hairpin formation ด้วย Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) ทดสอบและคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการทำพีซีอาร์ โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบปาล์มนำมันเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เจือจางจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย TE buffer ให้มีความเข้มข้น 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 100 นาโนกรัม ไพรเมอร์เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์เข้มข้น 1 เท่า ดีออกซีนิวคลีโอไทด์เข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิโมลาร์ เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เข้มข้น 1 ยูนิต โดยตั้งอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ

ระดับที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ระดับที่ 2 ตั้งอุณหภูมิและเวลาตามคุรสมบัติของไพรเมอร์ที่ออกแบบ

ระดับที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อีก 1 รอบ

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมกะลา (MADS-box) ในเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์บนยีน MADS-box ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างกะลา ในเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีของหทัยรัตน์ และคณ (2557) พบว่า การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ (SNPs) แยกความแตกต่างของปาล์มน้ำมันดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอราภายในกลุ่มเดียวกันออกจากกันได้ มี 4 ตำแหน่ง ได้แก่ SNP_{DA}, SNP_{ENGC} , SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAV} ซึ่งในการศึกษาครั้งนั้นเป็นการใช้ตัวอย่างประชากรปาล์มน้ำมันที่มีประวัติพันธุ์มาจากการผสมตัวเองภายในกลุ่มเดียวกัน ในการทดลองครั้งนี้จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งสำคัญบนยีน MADS-box ดังกล่าวในประชากรปาล์มน้ำมันที่ได้มาจากการผสมข้ามกลุ่ม ซึ่ง

ยังไม่ได้รับการศึกษา และเป็นกลุ่มที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันตามโครงการปรับปรุงพันธุ์รอบที่ 3 ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ได้แก่ ปาล์มน้ำมันที่ได้จากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันกลุ่ม Calarbar กับ AVROS และปาล์มน้ำมันที่ได้จากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันกลุ่ม Yangambi กับ AVROS

1.1 ปาล์มน้ำมันที่ได้จากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ Calarbar กับสายพันธุ์ AVROS

ประชากรของปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้ได้มาจากการผสมระหว่างต้นแม่เทเนอรา IRH629:316T กลุ่ม Calarbar ผสมกับต้นพ่อพิสิเฟอรา HC129:1056P สายพันธุ์ AVROS ดังนั้นต้นปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรารุ่นลูกจึงได้รับยีนควบคุมกะลาประกอบด้วย ยีนด้อยอัลลีลที่ 1 มาจากต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Calarbar และยีนด้อยอัลลีลที่ 2 มาจากต้นพ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS การตรวจสอบความแปรปรวนของของนิวคลีโอไทด์บนยีน MADS-box ในเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้ ดำเนินการในปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรารุ่นลูก ซึ่งมีพันธุกรรมของยีนควบคุมกะลาเป็นยีนด้อยทั้งสองอัลลีล

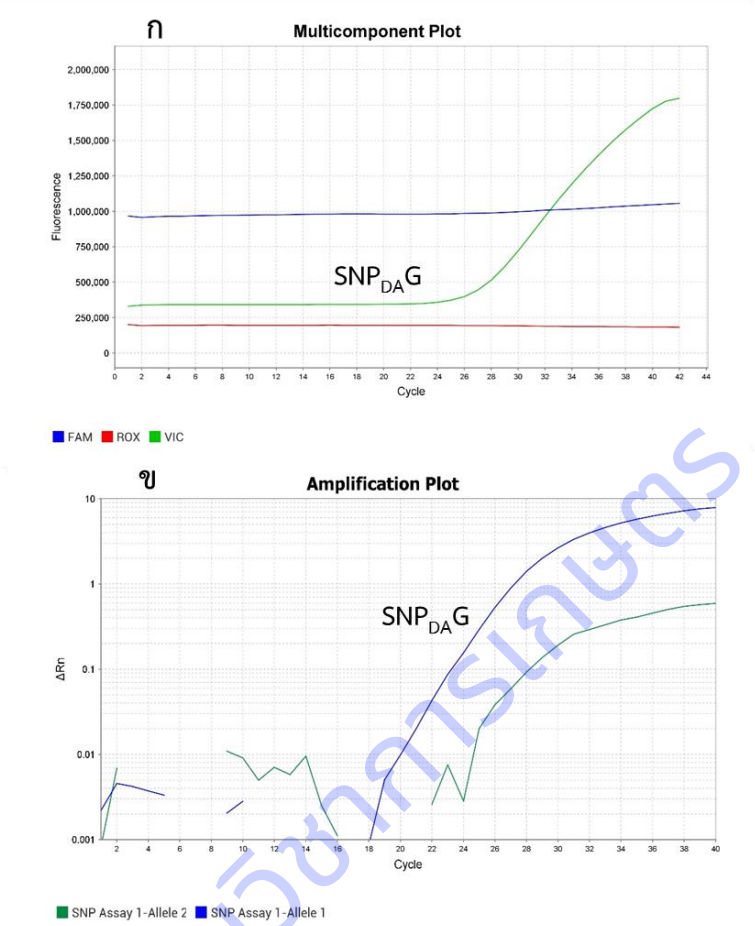
จากงานวิจัยของหทัยรัตน์ และคณะ (2557) รายงานไว้ว่า ปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ Calarbar ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีอไทด์บนยีน MADS-box ที่ตำแหน่ง SNP_{DA}, SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAV} แต่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} โดยอัลลีลยีนเด่นมีนิวคลีโอไทด์เป็น T และอัลลีลยีนด้อยมีนิวคลีโอไทด์เป็น C การเปลี่ยนแปลงนิวคลีอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวนี้สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแยกความแตกต่างของปาล์มน้ำมันดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอราภายในสายพันธุ์ Calabar ได้ ส่วนปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ AVROS ไม่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{DA}, SNP_{ENGC} และ SNP_{TaYa} แต่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีน MADS-box ที่ตำแหน่ง SNP_{LaAV} โดยยีนเด่นมีนิวคลีโอไทด์เป็น C และยีนด้อยมีนิวคลีโอไทด์เป็น A และใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแยกความแตกต่างของปาล์มน้ำมันดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอราภายในปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ AVROS (ตารางภาคผนวกที่ 1) ดังนั้นตามประวัติพันธุ์ปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรารุ่นลูกควรมีนิวคลีโอไทด์ของสนิปส์ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น C/T ซึ่งนิวคลีโอไทด์ C ได้มาจากอัลลีลยีนด้อยของต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Calabar และนิวคลีโอไทด์ T ได้มาจากอัลลีลยีนด้อยของต้นพ่อพิสิเฟอรากลุ่ม AVROS และมีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น C/A ซึ่งนิวคลีโอไทด์ C ได้มาจากอัลลีลยีนด้อยของต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Calabar และนิวคลีโอไทด์ A ได้มาจากอัลลีลยีนด้อยของต้นพ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS

ดำเนินการเก็บตัวอย่างใบจากต้นที่ได้รับการตรวจสัณฐานแล้วว่าเป็นต้นพิสิเฟอรา คือ ดอกตัวเมียเป็นหมัน มีการติดผลน้อยมาก ผลลีบ และไม่มีการสร้างกะลา จำนวน 9 ต้น มาสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้ CTAB buffer จากนั้นจึงทำ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ตำแหน่งดังกล่าว ให้ผลดังนี้

1.1.1 การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{DA}

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 เพื่อตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{DA} ของยีน MADS-box พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราทั้ง 9 ต้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{DA} โดยกราฟ

Amplification plot และ Multicomponent plot ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มปริมาณได้แสดงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{DA} เป็น G (รูปที่ 1)



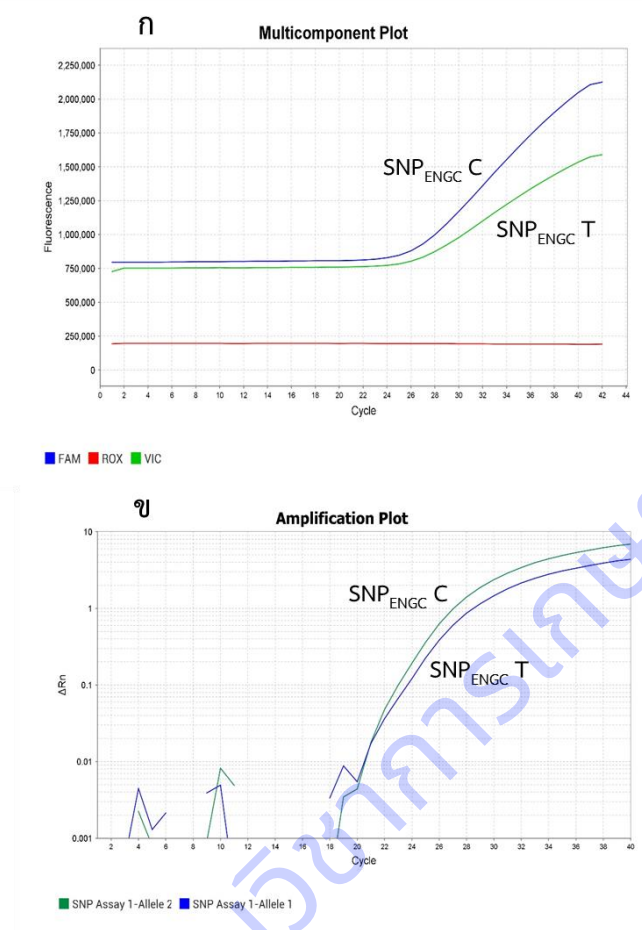
รูปที่ 1 ตัวอย่างกราฟ Multicomponent plot และ Amplification plot ที่ได้จากการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน MADS-box และโพรบที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{DA} ในปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราที่ได้จากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันกลุ่ม Calarbar กับ AVROS ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

1.1.2 การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC}

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{ENGC} ผลการทดลองพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ โดยกราฟ Amplification plot และ Multicomponent plot ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายมี 2 แบบ ได้แก่ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น C และชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น T (รูปที่ 2) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากรายงานของหทัยรัตน์และคณะ (2557) (ตารางภาคผนวกที่ 1) และจากประวัติพันธุ์ พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น

กรมวิชาการเกษตร

C คือ อัลลีลยีนด้อยจากต้นแม่เทเนอรากลุ่ม Calabar ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น T คือ อัลลีลยีนด้อยจากต้นพ่อพิสิเฟอรากลุ่ม AVROS



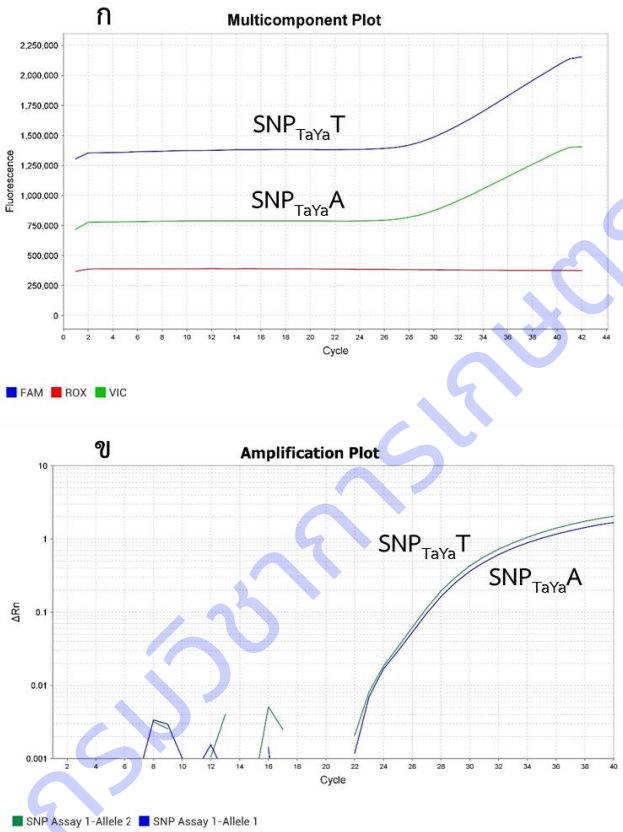
รูปที่ 2 ตัวอย่างกราฟ Multicomponent plot และ Amplification plot ที่ได้จากการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน MADS-box และโพรบที่จำเพาะต่อสนิปส์ตำแหน่ง SNP_{ENGC} ในปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราที่ได้จากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันกลุ่ม Calarbar กับ AVROS ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

1.1.3 การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa}

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 3 ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{TaYa} ผลการทดลองพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ โดยกราฟ Amplification plot และ Multicomponent plot ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายมี 2 แบบ ได้แก่ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{TaY} เป็น A และชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{TaY} เป็น T (รูปที่ 3) เมื่อพิจารณาจากประวัติพันธุ์ พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น A คือ อัลลีลยีนด้อยจากต้นแม่เทเนอรากลุ่ม Calabar ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น T คือ อัลลีลยีนด้อยจากต้นพ่อพิสิเฟอรากลุ่ม AVROS ผล

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองครั้งนี้แตกต่างจากรายงานของหทัยรัตน์และคณะ (2557) ที่รายงานว่าปาล์มน้ำมันกลุ่ม AVROS ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีไม่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวนี้ (ตารางภาคผนวกที่ 1) แต่ตรงกับผลการทดลองของประสาน สืบสุข (ติดต่อส่วนตัว) ที่พบว่า ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการอ่านลำดับดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) บางส่วนบนยีน MADS-box ในปาล์มน้ำมันกลุ่ม AVROS มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} โดยอัลลีลยีนเด่นมีนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น A และอัลลีลยีนด้อยมีนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น T



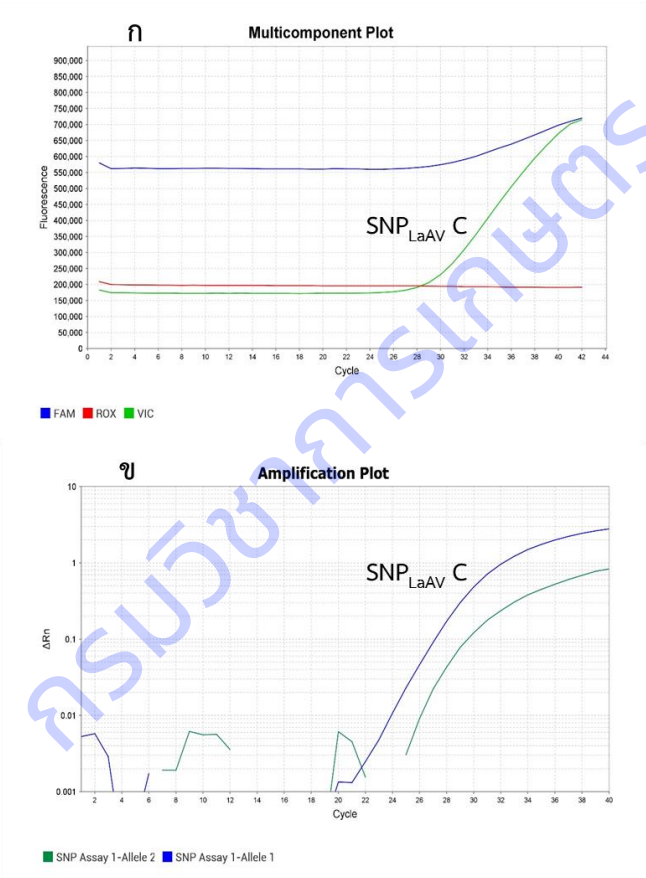
รูปที่ 3 ตัวอย่างกราฟ Multicomponent plot และ Amplification plot ที่ได้จากการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน MADS-box และโพรบที่จำเพาะต่อสนิปส์ตำแหน่ง SNP_{TaYa} ในปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราที่ได้จากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันกลุ่ม Calarbar กับ AVROS ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

1.1.4 การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{LaAV}

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 4 ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{LaAV} พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และได้กราฟ Amplification plot และ Multicomponent plot ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น C (รูปที่ 4) นั่นคือ ปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราทั้ง 9 ต้น ได้รับอัลลีลของยีนด้อยจากต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Calabar มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น C และอัลลีลของยีนด้อยจากต้นพ่อพิสิเฟอรา

กรมวิชาการเกษตร

สายพันธุ์ AVROS มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น C เช่นกัน และจากผลการทดลองครั้งนี้ทำให้ทราบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{LaAV} บนยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ AVROS ซึ่งตรงกับรายงานของ Singh และคณะ (2013) และประสาน สืบสุข (ติดต่อส่วนตัว) ที่พบว่า ปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ AVROS ไม่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{LaAV} โดยอัลลีลของยีนด้อยและยีนเด่นมีนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น C อย่างไรก็ตามผลการทดลองครั้งนี้ไม่ตรงกับรายงานของหทัยรัตน์และคณะ (2557) ที่รายงานว่า ยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ AVROS มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{LaAV} โดยยีนเด่น (Sh) มีนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น C และยีนด้อยมีนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น A (ตารางภาคผนวกที่ 1)



รูปที่ 4 ตัวอย่างกราฟ Multicomponent plot และ Amplification plot ที่ได้จากการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน MADS-box และโพรบที่จำเพาะต่อสนิปส์ตำแหน่ง SNP_{LaAV} ในปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราที่ได้จากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ Calarbar กับสายพันธุ์ AVROS ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

จากประวัติพันธุ์และผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ตำแหน่ง บนยีน MADS-box ในปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราที่ได้จากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ Calarbar กับ AVROS ทั้ง 9 ต้น พบว่า

กรมวิชาการเกษตร

มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{ENGC} และ SNP_{TaYa} ไม่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งและ SNP_{DA} และ SNP_{LaAV} โดยอัลลีลยีนด้อยที่มาจากต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Calabar มีนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{DA} เป็น C นิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น C นิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น A และนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น C และอัลลีลยีนด้อยที่มาจากต้นพ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS มีนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{DA} เป็น C นิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น T นิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น T และนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น C

1.2 เชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันที่ได้จากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ Yangambi กับสายพันธุ์ AVROS

จากการตรวจสอบประวัติพันธุ์ พบว่าประชากรของปาล์มน้ำมัน Yangambi-AVROS ได้มาจากการผสมระหว่างต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Yangambi C9023: 73T ผสมกับต้นพ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS HC129:1056P ได้ปาล์มน้ำมันรุ่นลูกพิสิเฟอราและเทเนอรา จากนั้นจึงคัดเลือกต้นเทเนอรามาผสมตัวเอง ได้ปาล์มน้ำมันรุ่นลูกดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา

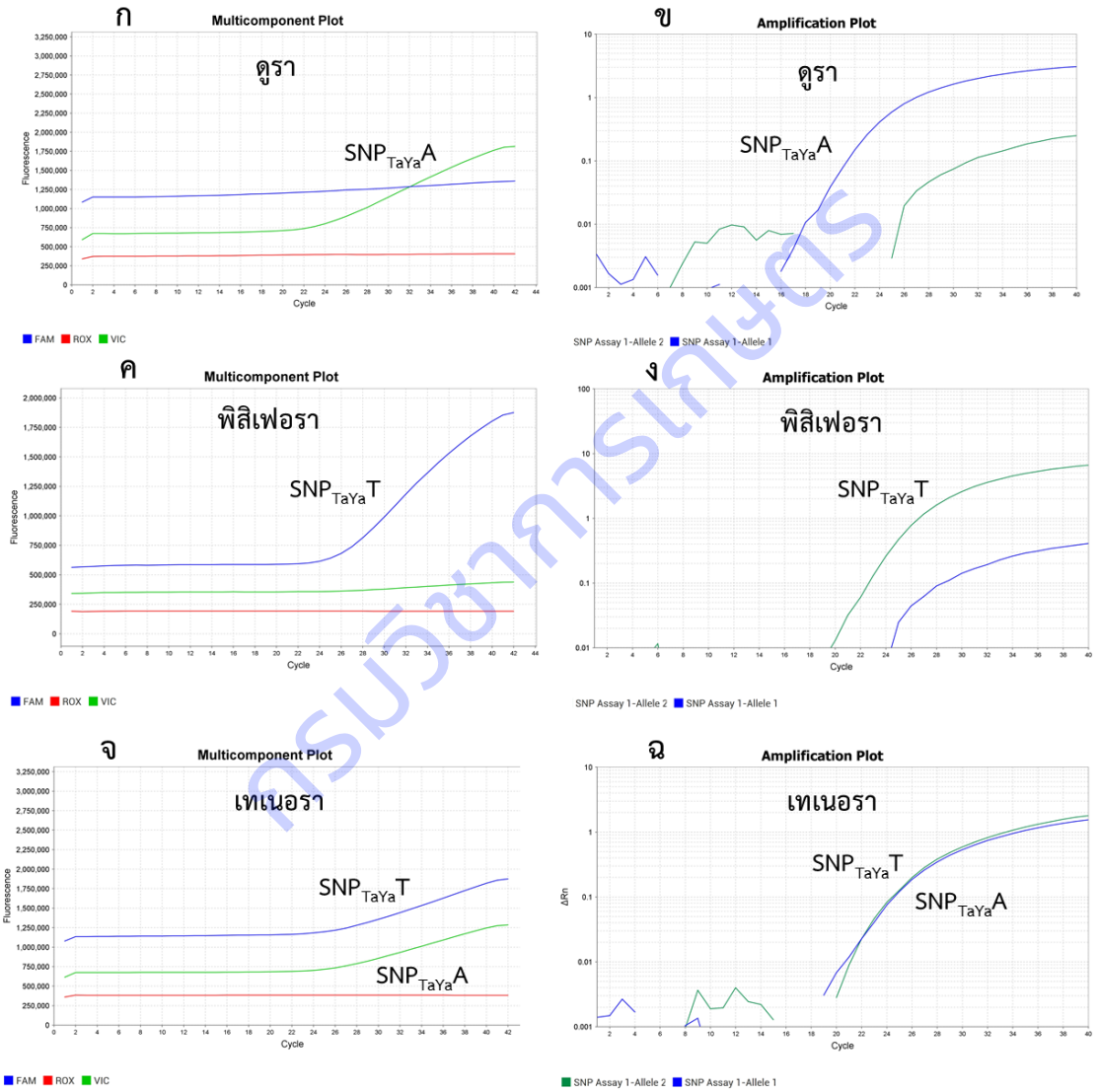
งานวิจัยของหทัยรัตน์ และคณะ (2557) รายงานไว้ว่า ปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ Yangambi ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ บนยีน MADS-box ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} โดยยีนเด่นมีนิวคลีโอไทด์เป็น A และยีนด้อยมีนิวคลีโอไทด์เป็น T (ตารางภาคผนวกที่ 1) จึงสามารถใช้การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวนี้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแยกความแตกต่างของปาล์มน้ำมันดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอราภายในสายพันธุ์ Yangambi ได้ ส่วนนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{ENGC} และ SNP_{LaAV} ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมีนิวคลีโอไทด์เป็น T และ C ตามลำดับ ทั้งยีนด้อยและยีนเด่น สำหรับปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ AVROS นั้น จากผลการทดลองในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} เช่นเดียวกัน แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} และ SNP_{LaAV} โดยนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งทั้งสอง SNP_{ENGC} และ SNP_{LaAV} มีนิวคลีโอไทด์เป็น T และ C ตามลำดับ ทั้งยีนด้อยและยีนเด่น งานวิจัยครั้งจึงเก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ Yangambi กับสายพันธุ์ AVROS จากต้นที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะสัณฐานแล้วจำนวน 32 ต้น ได้แก่ ดูรา 10 ต้น พิสิเฟอรา 12 ต้น และเทเนอรา 10 ต้น มาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีน MADS-box ด้วยการทำ Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAV} ซึ่งให้ผลการทดลองดังนี้

1.2.1 การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa}

จากการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีน MADS-box ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} ของปาล์มน้ำมันดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการทำ Real-time PCR ใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 3 พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และกราฟ Amplification plot และ Multicomponent plot แสดงชนิดของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ตรวจสอบดังนี้ ปาล์มน้ำมันดูราซึ่งได้รับยีนเด่นทั้งสองอัลลีลมาจากต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Yangambi แสดงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa}

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เป็น A (รูปที่ 5) ปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราซึ่งได้รับอัลลีลยีนด้อยมาจากต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Yangambi และต้นพ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS แสดงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น T และปาล์มน้ำมันเทเนอราซึ่งได้รับอัลลีลยีนเด่นมาจากต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Yangambi และอัลลีลยีนด้อยมาจากต้นพ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS แสดงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} 2 แบบ คือ นิวคลีโอไทด์ A จากยีนเด่นของต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Yangambi และนิวคลีโอไทด์ T จากยีนด้อยของต้นพ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS ผลการทดลองนี้ยืนยันได้อีกครั้งว่า ปาล์มน้ำมันในสายพันธุ์ AVROS มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa}



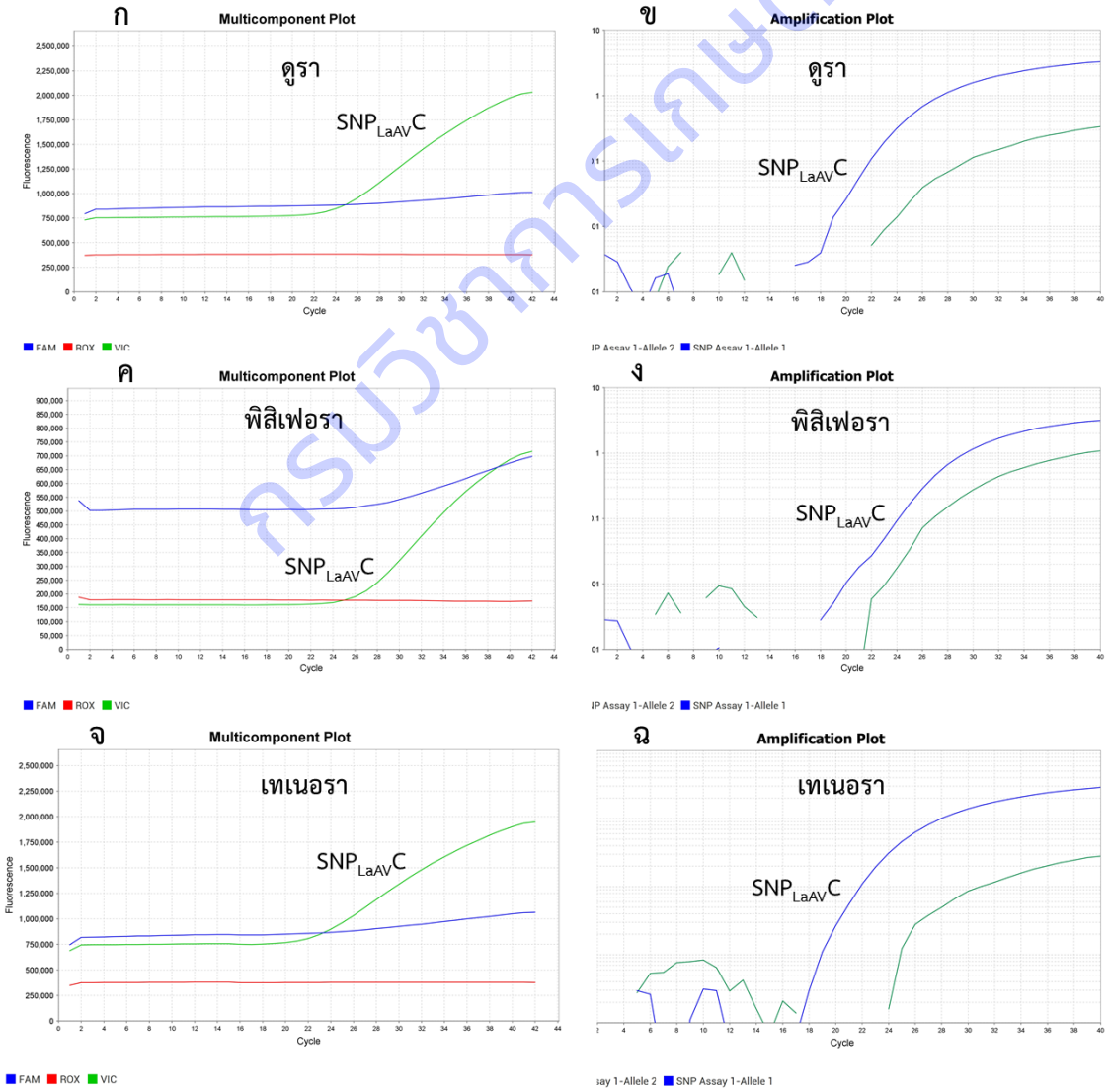
รูปที่ 5 ตัวอย่างกราฟ Multicomponent plot และ Amplification plot ที่ได้จากการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน MADS-box และโพรบที่จำเพาะต่อสนิปส์ตำแหน่ง SNP_{TaYa} ในปาล์มน้ำมันดูรา (ก-ข) พิสิเฟอรา (ค-ง) และเทเนอรา (จ-ฉ) ซึ่งได้จากการผสมตัวเองของลูกผสมเทเนอรา (ปาล์มน้ำมันต้นแม่

กรมวิชาการเกษตร

เทเนอราสายพันธุ์ Yangambi กับปาล์มน้ำมันต้พ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS) ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

1.2.2 การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{LaAV}

จากการตรวจสอบชนิดของนิวคลีโอไทด์บนยีน MADS-box ที่ตำแหน่ง SNP_{LaAV} ในปาล์มน้ำมันดูรา 10 ต้น พิสิเฟอรา 12 ต้น และเทเนอรา 10 ต้น ที่ได้มาจากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันกลุ่ม Yangambi กับ AVROS ดำเนินการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 4 ผลการตรวจสอบพบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าว โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และกราฟ Amplification plot และ Multicomponent plot ของปาล์มน้ำมันดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา แสดงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวเป็น C (รูปที่ 6) ผลการทดลองนี้ยืนยันได้อีกครั้งว่า ปาล์มน้ำมันในสายพันธุ์ AVROS ไม่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{LaAV}



กรมวิชาการเกษตร

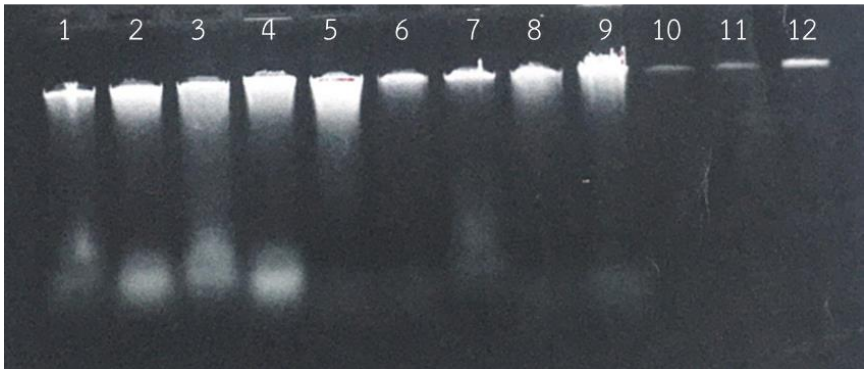
รูปที่ 6 ตัวอย่างกราฟ Multicomponent plot และ Amplification plot ที่ได้จากการทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน MADS-box และโพรบที่จำเพาะต่อสนิปส์ตำแหน่ง SNP_{LaAV} ในปาล์มน้ำมันดูรา (ก-ข) พิสิเฟอรา (ค-ง) และเทเนอรา (จ-ฉ) ซึ่งได้จากการผสมตัวเองของลูกผสมเทเนอรา (ปาล์มน้ำมันต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Yangambi กับปาล์มน้ำมันต้พ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS) ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

จากประวัติพันธุ์และผลการตรวจสอบนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งสนิปส์ทั้ง 2 ตำแหน่ง บนยีน MADS-box ในปาล์มน้ำมันดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ของปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้ทั้ง 32 ต้น พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{TaYa} ในปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ Yangambi และสายพันธุ์ AVROS ไม่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{LaAV} ในปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ Yangambi และสายพันธุ์ AVROS โดยอัลลีลยีนเด่นที่มาจากต้นแม่ดูราสายพันธุ์ Yangambi มีนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น A นิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น C และอัลลีลยีนด้อยที่มาจากต้นพ่อพิสิเฟอรากลุ่ม AVROS มีนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น T นิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น C มีผลให้นิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAV} ในรุ่นถัดมาเป็นไป

2. การเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความสูงในปาล์มน้ำมัน

2.1 การเก็บตัวอย่างและสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันชนิด *E. oleifera* และลูกผสมข้ามชนิด *guineensis* x *oleifera* จำนวน 30 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอด้วย 2 วิธีการ คือ วิธีการใช้ CTAB buffer และวิธีการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ พบว่าการสกัดดีเอ็นด้วยการใช้ CTAB buffer ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ ในขณะเดียวกันก็มีสารปนเปื้อนในปริมาณมากกว่าเช่นกัน ดังรูปที่ 7



กรมวิชาการเกษตร

รูปที่ 7 ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการใช้ CTAB buffer (Lane 1-9) และการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (Lane 10-12)

2.2 การออกแบบไพรเมอร์และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

ได้ดำเนินการค้นหาข้อมูลยีนที่ข้องกับความสูงในปาล์มน้ำมันจากข้อมูลสาธารณะในเว็บไซต์ของ NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่า ข้อมูล “>XM_010912744.1| PREDICTED: Elaeis guineensis gibberellin 20 oxidase 2-like (LOC105037036),mRNA” เป็นข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความสูงในปาล์มน้ำมัน ประกอบด้วย 3 exon จึงออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ ดังนี้

ไพรเมอร์คู่ที่ 1 Forward primer 5’-CAA ATG GAA CCA ACT CCC ACC TCC-3’

Reverse primer 5’-TCG CCG ATG TTG ATG ACA AGA GC-3’

ไพรเมอร์คู่ที่ 2 Forward primer 5’-GCC CTA TCA AAT GGC CGG TAC AAG-3’

Reverse primer 5’-GCA GGG CAT CAC ATG ACT GAG CCT T-3’

ไพรเมอร์คู่ที่ 1 อยู่ในส่วนของ exon 1 และ 2 ไพรเมอร์คู่ที่ 2 อยู่ในส่วนของ exon 3 ตรวจสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์ โดยการคัดเลือกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากลูกผสมข้ามชนิด *guineensis* x *oleifera* จำนวน 3 ตัวอย่าง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง ด้วยการใช้คู่ไพรเมอร์ดังกล่าว มีสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบพีซีอาร์ดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 100 นาโนกรัม ไพรเมอร์เข้มข้น 0.2 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์เข้มข้น 1 เท่า ดีออกซีนิวคลีโอไทด์เข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิโมลาร์ เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เข้มข้น 1 ยูนิต เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้นในขั้นตอนการทำพีซีอาร์จึงทำการเปรียบเทียบอุณหภูมิขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย 3 ระดับ คือ 48, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ดังนี้

อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

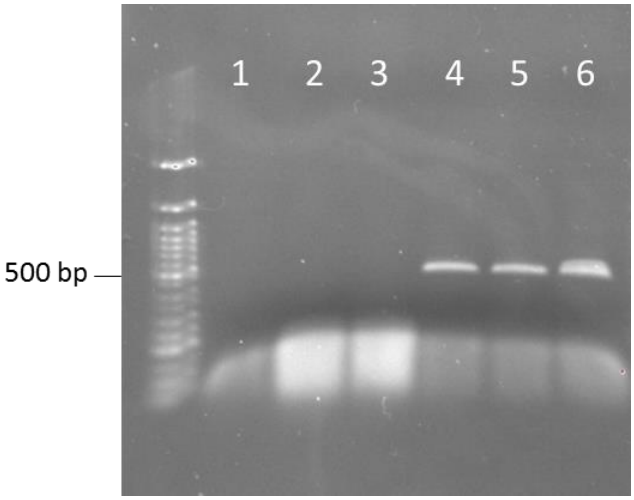
อุณหภูมิ 48, 55 หรือ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อีก 1 รอบ

ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์คู่ที่ 1 ไม่สามารถเพิ่มปริมารดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ไม่มีผลผลิตพีวีอาร์ในขณะที่ไพรเมอร์คู่ที่ 2 สามารถเพิ่มผลผลิตปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายคือ 55 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 500 คู่เบส ส่วนพีซีอาร์ที่ดำเนินการด้วยองค์ประกอบสารเคมีและสภาวะเดียวกันนี้แต่ใช้อุณหภูมิขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 48 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที พบว่าเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมให้ไพรเมอร์เข้าจับกับลำดับเบสคู่สมของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ จึงไม่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ ดังรูปที่ 7

ศูนย์วิทยทรัพยากร

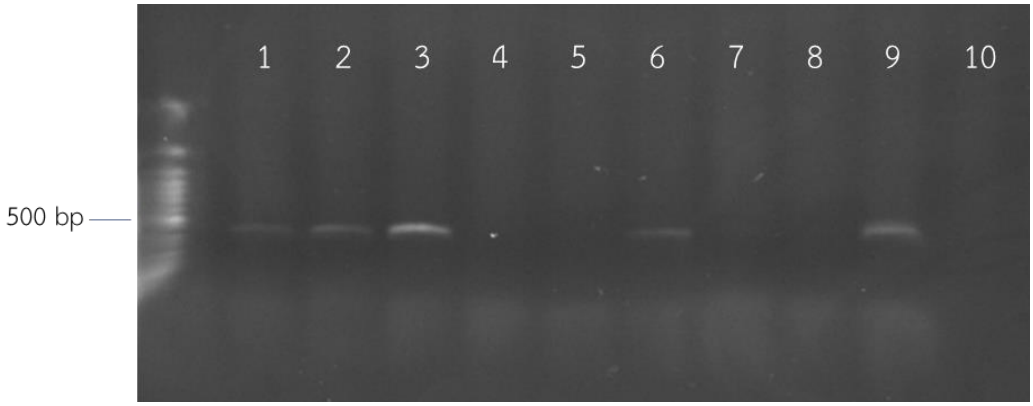


รูปที่ 7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน *E. Oleifera* เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ด้วยคู่ไพรเมอร์ F 5'-CAAATGGAACCAACTCCCACCTCC-3' และ GA20ox2 R 5'-TCCGCGATGTTGATGACAAGAGC-3' ร่วมกับใช้อุณหภูมิขั้นในตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (lane 1-3) และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (lane 4-6)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง

เมื่อได้องค์ประกอบของสารเคมีและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์แล้ว จึงดำเนินการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองโดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันชนิด *E. oleifera* จำนวน 10 ตัวอย่าง และตัวอย่างดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามชนิด *guineensis* x *oleifera* จำนวน 10 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันชนิด *E. oleifera* จำนวน 10 ตัวอย่าง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้จึงไม่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ ส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามชนิด *guineensis* x *oleifera* จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ โดยให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 500 คู่เบส รูปที่ 9



รูปที่ 9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของลูกผสมข้ามชนิด *guineensis* x *oleifera* เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (lane 1-10) ด้วยไพรเมอร์ F 5'-CAAATGGAACCAACTCCCACCTCC-3' และ R 5'-TCCGCGATGTTGATGACAAGAGC-3'

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลอง

ปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราที่ได้จากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Calarbar กับต้นพ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS มีนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} โดยมีนิวคลีโอไทด์เป็น A/T ส่วนนิวคลีโอไทด์อีก 3 ตำแหน่ง ไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{DA} เป็น C/C ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น C/C และตำแหน่ง SNP_{LaAV} เป็น C/C ส่วนปาล์มน้ำมันดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอราที่ได้จากการผสมตัวเองของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา (ปาล์มน้ำมันต้นแม่เทเนอราสายพันธุ์ Yangambi ผสมกับต้นพ่อพิสิเฟอราสายพันธุ์ AVROS) มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} เช่นกัน โดยปาล์มน้ำมันดูรา มีนิวคลีโอไทด์ เป็น A/A ปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา มีนิวคลีโอไทด์ เป็น T/T และปาล์มน้ำมันเทเนอรา มีนิวคลีโอไทด์เป็น T/A สำหรับการศึกษาพันธุกรรมของยีนเกี่ยวข้องกับความสูงต้นในปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามชนิด (*guineensis* x *oleifera*) โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส อย่างไรก็ตามการทำวิจัยเรื่องนี้ยังไม่เสร็จสิ้น จึงมีความจำเป็นที่ต้องดำเนินการวิจัยต่อ เนื่องจากเมื่อทำวิจัยจนได้ข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับความสูงต้นแล้ว สามารถนำข้อมูลที่ได้นี้มาพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะความสูงต้นในปาล์มน้ำมันได้ และนำเครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีความสูงช้า ทำให้การคัดเลือกพันธุ์ทำได้รวดเร็ว มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตสูง แต่มีความสูงช้า ต้นเตี้ยลง จะช่วยยืดอายุการเก็บเกี่ยวและชะลอระยะเวลาการโค่นล้มเพื่อปลูกใหม่ให้ยาวนานออกไป ถือเป็นการเพิ่มรายได้และลดต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกร

เอกสารอ้างอิง

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ อรรัตน์ วงศ์ศรี และ นัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ. 2557. เครื่องหมายโมเลกุลในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา. ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Ikeda A., Ueguchi-Tanaka M., Sonoda Y., Kitano H., Koshioka M., Futsuhara Y., Matsuoka M., Yamaguchi J. 2001. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. Plant Cell 13: 999-1010.

Itoh H., Tatsumi T., Sakamoto T., Otomo K., Toyomasu T., Kitano H., Ashikari M., Ichihara S., Matsuoka M. 2004A rice semi-dwarf gene, Tan-Ginbozu (D35), encodes the gibberellin biosynthesis enzyme, ent-kaurene oxidase. Plant Mol Biol. 54: 533-47.

Singh, R., Low, E-T.L., Ooi, L.C-L., Ong-Abdullah, M., Chin, Nagappan, T.N., Nookiah, J. R., Amiruddin, M.D., Rosli, R., Manaf, M.A.A., Chan, K-L., Halim, M.A., Lakey, N. Azizi., Smith, N.S.W., Budiman, M.A., Hogan, M., Bacher, B., Brunt, A.V., Wang, C., Ordway, J.M., Sambanthamurthi, R. and Martienssen, R.A. 2013. The oil palm *Shell* gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. Nature 15: 340-344.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ตำแหน่งสนิปส์ (SNPs) ที่ได้จากข้อมูลการอ่านลำดับพันธุกรรมของยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมัน 10 กลุ่มพันธุ์ จำนวน 129 ตัวอย่าง

Type	Fruit Type	No. of samples	SNP_{Tan}	SNP_{DA}	SNP_{ENGC}	SNP_{TaYa}	SNP_{LaAV}	reference
Deli Dura	Dura	6	C	C	T	A	C	
Dami	Dura	3	G	C	T	A	C	
	Pisifera	3	G	G	T	A	C	หทัยรัตน์และคณะ 2557
	Tenera	3	G	**C/G**	T	A	C	
Ekona	Dura	3	G	C	T	A	C	
	Pisifera	3	G	C	C	A	C	หทัยรัตน์และคณะ 2557
	Tenera	4	G	C	**T/C**	A	C	
Ghana	Dura	4	G	C	T	A	C	
	Pisifera	4	G	C	C	A	C	หทัยรัตน์และคณะ 2557
	Tenera	3	G	C	**T/C**	A	C	
La Me	Dura	13	G	C	T	A	C	
	Pisifera	13	G	C	T	A	A	หทัยรัตน์และคณะ 2557
	Tenera	11	G	C	T	A	**C/A**	
Nigeria	Dura	3	G	C	T	A	C	
	Pisifera	3	G	C	C	A	C	Singh *et al.* 2013
	Tenera	3	G	C	**T/C**	A	C	
Tansania	Dura	4	C	C	T	A	C	1.Singh *et al.* 2013
	Pisifera	4	G	C	T	T	C	
	Tenera	4	**C/G**[2]	C	T	**A/T**[1]	C	2. หทัยรัตน์และคณะ 2557
Yangambi	Dura	3	G	C	T	A	C	
	Pisifera	3	G	C	T	T	C	หทัยรัตน์และคณะ 2557
	Tenera	2	G	C	T	**A/T**	C	
AVROS	Dura	4	G	C	T	A	C	
	Pisifera	4	G	C	T	A	A	หทัยรัตน์และคณะ 2557
	Tenera	4	G	C	T	A	**C/A**	
Calabar	Dura	5	G	C	T	A	C	
	Pisifera	5	G	C	C	A	C	หทัยรัตน์และคณะ 2557
	Tenera	5	G	C	**T/C**	A	C	

หมายเหตุ : ที่มา หทัยรัตน์ และคณะ (2557)

กรมวิชาการเกษตร