รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีปาล์มน้ำมันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต
2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีปาล์มน้ำมันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต

   กิจกรรม : การวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะสีผลแบบ Virescens ในปาล์มน้ำมัน

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Molecular Markers for Study Fruit Colour of Oil Palm Virescens
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นางสาวอุษา ชูรักษ์ ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันกระบี่

   ผู้ร่วมงาน : นางสาวเพ็ญศิริ จำรัสฉาย ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี
5. **บทคัดย่อ** :

การศึกษาและพัฒนาเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล (DNA markers) ในการศึกษาลักษณะสีผลของปาล์มน้ำมันระดับดีเอ็นเอ โดยการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะสีผลแบบ virescens *(Vir)* ซึ่งลักษณะผลปาล์มดิบสีเขียวและสุกสีส้มได้ พบในกลุ่มของพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะผลแบบ virescens ในกลุ่ม Calabar และ Tanzania การศึกษานี้ใช้ใบปาล์มน้ำมันในแปลงทดลองจากศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี กลุ่ม Calabar ใช้ประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 กลุ่ม Tanzania ใช้ประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 7 จากการสืบค้นข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมลักษณะสีผลแบบ virescens ในปาล์มน้ำมันจากงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่ พบว่า *Elaeis guineensis virescens* R2R3-MYB gene เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมสีผลในปาล์มน้ำมัน การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะผลแบบ virescens ในปาล์มน้ำมันนั้น โดยการทำพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ด้วยไพรเมอร์ F1 5’ TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA 3’ และ R1 5’ AAAGCGTGCTTCCTTCATGT3’ ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที จำนวน 30 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศา

กรมวิชาการเกษตร

เซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อีก 1 รอบ เบื้องต้นพบว่าสามารถแยกกลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 และ 7 ลูกเขียวได้ โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 650 -700 bp ส่วนพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 ลูกดำ มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700-800 bp ใกล้เคียงกับกลุ่มปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎ์ธานี 1 ลูกดำ

คำสำคัญ : เครื่องหมายโมเลกุล ลักษณะผลแบบผลปาล์มดิบสีเขียวและสุกสีส้ม แถบดีเอ็นเอ

ABSTRACT

Study and development of molecular markers (DNA markers) in the study of fruit color characteristics of DNA palm oil. Molecular markers were studied in relation to virescens (Vir) color traits of green and ripe orange palm fruit. Found in virescens strains in the Calabar and Tanzania cohorts. This study was performed using oil palm leaves in the experimental plots from Surat Thani Palm Oil Research Center, Calabar group used Surat Thani palm 1. Tanzania uses a population of oil palm breeders, Surat Thani palm 7. Investigations of genes involved in virescens color control genes in oil palm were published in published research that *Elaeis guineensis* virescens R2R3-MYB gene was involved in the color control gene in oil palm. In vitro target DNA enrichment, the optimum conditions for performing PCR to increase the expected target DNA load were associated with controlling the virescens effect in palm oil. By making a total of 20 μl PCR with primer F1 5 'TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA 3' and R1 5 'AAAGCGTGCTTCCTTCATGT3'. The initial temperature was 95 ° C for 5 minutes, the primer and target DNA pairing procedure temperature was 64 ° C for 30 seconds, the DNA synthesis step temperature was 72 ° C for 1 second for 30 cycles. Followed by the temperature of 72 degrees Celsius for another 5 minutes. Preliminary it was found that the population of Surat Thani oil palm breeders 1 and 7 were green with DNA bands of approximately 650 -700 bp. One black ball has a DNA band of approximately 700-800 bp, similar to that of the Surat Thani hybrid oil palm 1.

Key words: DNA markers, Virescens, PCR, DNA bands

6. คำนำ :

ลักษณะสีผล แบบ Virescens ซึ่งผลดิบสีเขียวและสุกสีส้มในปาล์มน้ำมันนั้นเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่า เมื่อปาล์มน้ำมันอยู่ในระยะสุกแก่เต็มที่พร้อมเก็บเกี่ยวสีผลแสดงสีต่างจากผลดิบชัดเจน และได้เปอร์เซ็นต์น้ำมันอยู่ในระดับที่ตรงตามศักยภาพของพันธุ์ ลดปัญหาการเก็บเกี่ยวผลปาล์มดิบสู่โรงสกัดน้ำมันปาล์มดิบ ซึ่งเป็นปัญหาอยู่ในขณะนี้ ดังนั้นการหาวิธีการซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าสามารถปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้ได้ลักษณะสีผล แบบ Virescens ซึ่งผลดิบสีเขียวและสุกสีส้มได้นั้นค่อนข้างน่าสนใจ แต่การปรับปรุงพันธุ์แบบ conventional เพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการต้องนั้นใช้เวลานาน

กรมวิชาการเกษตร

การใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล (DNA markers) ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันนั้นสามารถลดระยะเวลาได้ และมีประสิทธิผลมากกว่า แบบ conventional ซึ่งเป็นแบบวิธีมาตรฐานเดิมซึ่งใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 10 ปีต่อชั่วรุ่น และ DNA markers ยังเหมาะในการหาแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงกับการหาลักษณะที่ต้องการ เช่น ความหนาของกะลา ผลแบบ mantle และลักษณะสีผล แบบ Virescens ซึ่งผลดิบสีเขียวและสุกสีส้ม ก็เป็นลักษณะหนึ่งที่เหมาะกับการใช้วิธีนี้เช่นกัน เพื่อให้ทราบลักษณะที่เป็น dominant homozygotes ในต้นประชากรพ่อ และยืนยันในระดับยีน พบว่ากลุ่มของพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะผลแบบ Virescens มี Nigeria, Calabar, Ghana และ Tanzania นอกจากนี้ทำให้ได้ลักษณะที่ต้องการเร็วกว่า มีประสิทธิผลมากกว่า อีกทั้งยังเป็นการยืนยันในระดับดีเอ็นเอของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันและนำไปขยายผลได้ตรงตามความต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์อีกด้วย โดยมีวัตุประสงค์ เพื่อศึกษาและพัฒนาเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล (DNA markers) ในการศึกษาลักษณะสีผลของปาล์มน้ำมันระดับดีเอ็นเอ

ปาล์มน้ำมันมีลักษณะสีผล 3 แบบ คือ Nigrescens *(Nig)* ซึ่งผลดิบสีม่วงดำ และผลสุกสีม่วงแดงหรือแดงส้ม Albescens มีสีผิวเปลือกเมื่อสุกเป็นสีเหลืองซีด โดยทั่วไปพบน้อยมาก และ Virescens *(Vir)* ซึ่งลักษณะผลปาล์มดิบสีเขียว และเมื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะผลสุกสีผิวเปลือกเปลี่ยนเป็นสีส้ม โดย *Vir* เป็นลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนเด่น (dominant homozygotes) และ *Nig* เป็นลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนด้อย (recessive heterozygotes) (Ying *et al*, 2007; Sambanthamurthi *et al*, 2009) การเปลี่ยนแปลงสีของผลชนิด Virescens ง่ายต่อการสังเกตด้วยสายตามากกว่าชนิด Nigrescens ดังนั้นเมื่อมีการผสมข้ามกับกลุ่มพิสิเฟอราที่มีผลลักษณะชนิด Virescens ซึ่งอาจจะเป็นแบบ heterozygous ทำให้ลูกผสมที่ได้มีผลทั้งลักษณะชนิด Nigrescens และ Virescens ดังนั้นเพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะผลชนิด Virescens fruit 100% ของการผลิตลูกผสม จำเป็นต้องมีกลุ่มพ่อพันธุ์พิสิเฟอราที่มีลักษณะผลชนิด Virescens fruit แบบ homozygous และการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อค้นหาแถบดีเอ็นที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนทั้งสองจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอและทำให้ทราบว่าประชากรปาล์มน้ำมันต้นไหนเป็น dominant homozygotes หรือ recessive heterozygotes เพื่อจะได้นำลักษณะดังกล่าวมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้ได้ลักษณะที่ต้องการ และประหยัดเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

Oil palm FFB ripeness categories

Total number of empty fruitlets socket	Mesocarp color		
	Yellow	Yellowish orange	Orange
0	Unripe	Unripe	Ripe

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

0-10	Unripe	under ripe	Ripe
>10	Unripe	Ripe	Ripe

ที่มา Hazir and Shariff (2011)

The fruit of the virescens oil palm changes from yellowgreen when unripe to bright orange when ripe, signaling the optimal time for harvesting and oil yield. Credit:*Nature Communications*

Fruit color of the nigrescens oil palm changes very littleas it ripens, especially from the perspective of harvesters on the ground, making it difficult to determine when abunch is ripe. Credit: MPOB (Malaysian Palm Oil Board)

ที่มา MPOB (2014)

เทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งในหลายๆ เทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งมีความเหมาะสมในการใช้จำแนกและตรวจสอบสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งพื้นฐานของเทคนิค AFLP คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) และประสิทธิภาพของ PCR เข้าด้วยกัน แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำ PCR โดยใช้ primer คู่หนึ่งๆ ภายหลังจากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก เรียกว่า ลายพิมพ์ AFLP (AFLP fingerprint) AFLP เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ ทั้งนี้เพราะสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย ทำได้ค่อนข้างเร็ว ในช่วงเวลาไม่นานและได้แถบดีเอ็นที่มีความจำเพาะเจาะจง (Ying *et al*, 2007) ดังนั้นเทคนิค AFLP จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการสำรวจจีโนมพืชหรือสัตว์ที่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อน เป็นวิธีการหนึ่งที่รวดเร็วในการค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอหรือ DNA markers ที่อยู่ชิดกับลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ ช่วยให้การสร้าง saturated linkage map ประสบผลในระยะเวลาสั้น ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสของการได้ markers ที่ linked กับลักษณะสำคัญและยังสามารถวิเคราะห์ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตใช้วิเคราะห์พันธุ์และเพศได้อีกด้วย (หทัยรัตน์ และคณะ, 2547) Ying *et. al*. (2007) รายงานว่าการใช้เทคนิค AFLP ในปาล์มน้ำมันเพื่อค้นหา markers พบว่าแถบดีเอ็นเอ 142 bp, 356 bp

กรมวิชาการเกษตร

และ 254 bp มีความจำเพาะเจาะจงกับลักษณะผลแบบ *Virescens* โดยใช้ไพรเมอร์ *Eco*R I และ *Mse* I ดังนี้ E-ACT/M-CTA (254 bp) E-ACT/M-C A T (356 bp) E-ACT/M-C A T (142 bp)

การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกันยีนที่ทราบลำดับเบสแล้วในบางลักษณะที่สนใจจะช่วยย่นระยะเวลาในการศึกษาวิจัยได้ จากการสืบค้นข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมลักษณะสีผลแบบ virescens ในปาล์มน้ำมันจากงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่ พบว่ายีน R2R3-MYB ควบคุมลักษณะสีผลแบบ virescens ในปาล์มน้ำมัน (Singh *et al*, 2014)

เชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันที่มีรวบรวมไว้สำหรับงานวิจัยปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันนั้นมีทั้งปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ ได้แก่ Deli Dura และ African Dura (Kazemba) และปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์ ได้แก่ AVROS La Me EKONA Nigeria Calabar Ghana Yangambi DAMI และ Tanzania กลุ่มพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะสีผลแบบ Virescens มี Nigeria Calabar Ghana และ Tanzania ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันรอบที่ 1 และ 2 มีลูกผสมปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผลสีเขียวที่ผ่านการรับรองพันธุ์มี 3 พันธุ์ คือ สุราษฎร์ธานี 1 5 และ 7 ส่วนองค์กรด้านปรับปรุงพันธุ์ของบริษัท ASD มีความพยายามสร้างสายพันธุ์ Virescens แท้ ของกลุ่มไนจีเรีย โดยการเลือกต้นเทเนอราจากกลุ่มประชากรที่ผสมระหว่างดูรากับเทเนอราที่มีผลสีเขียว จากนั้นทำการผสมตัวเองเพื่อกระจายตัวได้ต้นชนิดพิสิเฟอรา ซึ่งอาจจะมีลักษณะผลสีเขียว (homozygous หรือ heterozygous) และนำไปทดสอบสร้างคู่ผสมลักษณะผลสีเขียว การทดสอบลักษณะสีผลสีเขียวแท้สามารถทดสอบได้ทั้งแบบดั้งเดิมและและพันธุวิศวกรรม (Seng *et al*., 2007)

ลักษณะสีของผลปาล์มน้ำมันมี 3 กลุ่ม คือ Virescens fruit ลักษณะของผลปาล์มดิบมีสีเขียวเข้ม เปลี่ยนสีเป็นสีส้มเมื่อผลสุก Nigrescens fruit ผลปาล์มดิบมีสีม่วงเข้มจนถึงดำ เมื่อสุกเป็นสีแดงส้ม และ Albescens fruit มีสีผิวเปลือกเมื่อสุกเป็นสีเหลืองซีด โดยทั่วไปพบน้อยมาก แต่พบในปาล์มน้ำมันพันธุ์คอมแพคท์โครน (Compact clones) พันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกสีเขียวมีข้อดีคือสามารถแยกผลสุกได้ชัดเจนเป็นประโยชน์ในการรับซื้อทะลายปาล์ม สีผิวเปลือกนอกของผลปาล์มควบคุมด้วยยีนหลัก 1 ตัว ลักษณะผลสีส้มเป็นลักษณะเด่น ปัจจุบันมีรายงานค้นพบยีนที่ควบคุมลักษณะสีผลของปาล์มน้ำมัน ได้แก่ VIRESCENS (VIR) gene ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกเครื่องหมายโมเลกุล Simple sequence repeat (SSR) จำนวน 197 เครื่องหมาย เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ จำนวน 4,451 สนิปส์ และ RFLP marker ได้แก่ MET16 และKT3 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งติดกับตำแหน่ง QTL หรือยีน VIRESCENS (VIR) gene การตรวจสอบ Vir allele และการนำลักษณะดังกล่าวไปสู่พันธุ์ที่ต้องการทำได้ง่าย

ปาล์มน้ำมันที่ปลูกเป็นพันธุ์การค้าโดยทั่วไปจะเป็นลักษณะชนิด Nigrescens เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ซึ่งที่ใช้แม่พันธุ์กลุ่ม เดลิ ดูรา จะให้ผลผลิตสีทะลายแบบ Nigrescens ดังนั้นเมื่อมีการผสมข้ามกับกลุ่มพิสิเฟอราที่มีผลลักษณะชนิด Virescens ซึ่งอาจจะเป็นแบบ Heterozygous และเนื่องจากลักษณะการพัฒนาสีผลถูก

กรมวิชาการเกษตร

ควบคุมยีน 1 คู่ และแบบ Virescens เป็นลักษณะเด่น หรือ Nigrescens เป็นลักษณะด้อย ทำให้ลูกผสมที่ได้มีผลทั้งลักษณะชนิด Nigrescens และ Virescens ดังนั้นเพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะผลชนิด Virescens 100% ของการผลิตลูกผสม จำเป็นต้องมีกลุ่มพ่อพันธุ์พิสิเฟอราที่มีลักษณะสีผลชนิด Virescens แบบ Homozygous

การเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดผลผลิตทะลายสดเป็นสิ่งสำคัญ การเก็บเกี่ยวทะลายปาล์มในระยะสุกแก่สามารถลดปริมาณทะลายปาล์มดิบเข้าโรงงาน ช่วยเพิ่มอัตราการสกัดน้ำมันต่อทะลายของประเทศได้ ปริมาณน้ำมันต่อทะลายในทะลายดิบมีน้อยเนื่องจากการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่ผลิตน้ำมันไม่สมบูรณ์ ปริมาณเอนไซน์ไลเปสสูงในช่วงอาทิตย์สุดท้ายของการพัฒนาของทะลาย (Mohd *et al*., 2002) และจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมเช่น มีน้ำ และอุณหภูมิที่เหมาะสม ขณะเดียวกันส่งผลให้ค่ากรดไขมันอิสระในน้ำมันที่สกัดเพิ่มขึ้น ดังนั้นเพื่อให้ได้น้ำมันปาล์มที่มีคุณภาพและมีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงสุด จะต้องเก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงที่เหมาะสม ซึ่งดัชนีที่ใช้ที่เกษตรกรใช้ส่วนใหญ่ใช้คือสีเปลือกผล สีของทะลายปาล์มที่สุกจะมีการพัฒนาสีเป็นสีดำแดง แดง และส้ม นั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ซึ่งองค์ประกอบทะลายและผลผลิตไม่มีความแตกต่างกันในลักษณะของสีผลที่แตกต่างกันในพันธุ์เดียวกัน (Mohd *et al*., 2000) การศึกษาของ Mohd และ Abdul (2011) พบว่า ปาล์มน้ำมันลูกผสม PS1 เมื่อวัดสีผลปาล์มน้ำมันแบบ Virescens มีความแตกต่างของ % RGB กลุ่ม Red-green 29.46 Red-blue 57.17 Green-blue 39.28 สำหรับแบบ Nigrescens มีความแตกต่างของ % RGB กลุ่ม Red-green 18.33 Red-blue 38.78 Green-blue 25.04 การเปลี่ยนแปลงสีผลของทะลายปาล์มน้ำมัน สีผลแบบ Virescens มีลักษณะการเปลี่ยนของสีเด่นชัดทำให้ง่ายต่อการสังเกตเมื่อถึงรอบการเก็บเกี่ยวปาล์มน้ำมัน จึงเป็นดัชนีการเก็บเกี่ยวที่ดีและยังช่วยในการพัฒนาการคัดผลผลิตของโรงงานได้ดีขึ้นอีกด้วย (Seng *et al*., 2007) ดังนั้นการพัฒนาลูกผสมแบบ Virescens แท้ จะช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของการเก็บเกี่ยวอีกทางหนึ่ง และยังช่วยเพิ่มปริมาณและคุณภาพน้ำมันของโรงงานสกัดน้ำมัน

กรมวิชาการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. ปาล์มน้ำมันจากเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในประชากรพ่อ ที่มีผลดิบสีเขียวและผลสุกสีส้ม *(Virescens)* กลุ่ม Calabar และ Tanzania และประชากรลูกซึ่งได้จากการทดสอบเบื้องต้น แบบ conventional ในแปลงทดลองจากศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

2. สารเคมี

- สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ
- สารเคมีสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR)
- สารเคมีสำหรับทำอิเลคโตรโฟรีซีสและย้อมเจล

3. วัสดุอุปกรณ์

- เครื่อง PCR
- UV transluminator
- เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีส
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- ตู้ไมโครเวฟ
- ไมโครปิเปต
- หลอดเอฟเพนดอร์ฟและถาดวางหลอด

- วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมลักษณะผลแบบ Virescens และลำดับเบสที่สัมพันธ์กับแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงกัน

2. สกัดดีเอ็นเอใบปาล์มน้ำมัน จากเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในประชากรพ่อและประชากรลูก ที่มีผลดิบสีเขียวและผลสุกสีส้ม *(Virescens)* กลุ่ม Calabar และ Tanzania

3. ออกแบบและคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงกับลักษณะผลแบบ Virescens จากเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในประชากรพ่อและประชากรลูก

4. ทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง วิเคราะห์ผลและลายพิมพ์ดีเอ็นของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผลแบบ Virescens

5. หาลำดับเบสทั้งหมดของลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับยีนควบคุมลักษณะผลแบบ Virescens

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การสกัดดีเอ็นเอ เก็บรวบรวมใบของปาล์มน้ำมันของแต่ละพันธุ์ดังกล่าวจากศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี สกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมันโดยวิธีของ หทัยรัตน์ และคณะ (2547), Agrawal และคณะ (1992) ซึ่งมีการดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้คือ นำใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน 0.1 กรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด เติม Extraction buffer [50 mM Tris HCl pH 8.0, 1% (W/V) N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide (CTAB), 50mM Na_2EDTA และ 0.7 M NaCl] จำนวน 700 ml และเติม 2-mercaptoethanol จำนวน 3 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที เขย่าหลอดทุกๆ 10 นาที จากนั้นเติม Chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 700 µl ผสมสารละลายในหลอดให้เข้ากันโดยวิธีกลับหลอดไปมาประมาณ 5-10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน 600 µl ใส่หลอด microtube ใหม่ จากนั้นเติม 3 M Sodium acetate 60 µl และ Isopropanol 360 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปแช่ไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทน้ำ

กรมวิชาการเกษตร

ใสทิ้ง เติม Washing solution 500 µl เพื่อล้างตะกอนดีเอ็เอ 2 ครั้ง ได้ตะกอนที่ก้นหลอดคือดีเอ็นเอ จากนั้นล้างตะกอน ดีเอ็นเอ ด้วย 70% แอลกอฮอล์ 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE (1 mM Na_2EDTA, 10 mM Tris-HCl pH8.0) จำนวน 50 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 30 นาที เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C นำดีเอ็นเอที่ได้วัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (spectrophotometer) (หรือเครื่องวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ LabChip GX)

2. ทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง โดยออกแบบและคัดเลือกไพรเมอร์ จากลำดับเบสที่ได้จากการสืบค้น จนกว่าจะให้แถบดีเอ็เอที่ได้ มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีผลแบบ Virescens ให้มากที่สุด โดยทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง

2.1 นำผลผลิตพีซีอาร์ ไปแยกขนาดของดีเอ็นเอตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยการทำการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนตัวกลางอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1- 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1xTBE (Tris base, Boric acid, EDTA 0.5 M pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบผลด้วย Gel documentation เพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

2.2 วิเคราะห์และประมวลผลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกลุ่มประชากรทั้งหมดที่คัดเลือก

การบันทึกข้อมูล ทำการบันทึกข้อมูลดังต่อไปนี้

- ที่มาของกลุ่มปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผลแบบ Virescens
- ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้
- ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแถบดีเอ็นเอที่ได้
- ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผลแบบ Virescens
- ลำดับเบสของลักษณะที่สนใจของปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผลแบบ Virescens

- เวลาและสถานที่ - เริ่มต้น ปี 2559 สิ้นสุด ปี 2563 และสถานที่ทำการทดลองคือ ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันกระบี่

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ข้อมูลลำดับเบสของยีนควบคุมลักษณะสีผลแบบ virescens

1. จากการสืบค้นข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมลักษณะสีผลแบบ virescens ในปาล์มน้ำมันจากงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่ พบว่า *Elaeis guineensis virescens* R2R3-MYB gene เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมสีผลในปาล์มน้ำมัน โดยข้อมูลลำดับเบสของยีนจากฐานข้อมูล NCBI และสังเคราะห์ไพรเมอร์จำนวน 1 คู่

กรมวิชาการเกษตร

2. จากการสกัดดีเอ็นจากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันประชาการต้นพ่อพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 และ 7 ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วย Spectrometer ที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร พบว่า ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพอยู่ในช่วง 1.63-1.89 ตาราง 1

ตาราง 1 ข้อมูลจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบปาล์มน้ำมันประชากรต้นพ่อพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 และ 7

ตัวอย่างประชากร		ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/ul)	คุณภาพดีเอ็นเอ A_{260}/A_{280}
ST1 28	(I)	894.1	1.88
ST1 28	(II)	831.7	1.80
ST1 787	(I)	4,705.6	1.86
ST1 787	(II)	283.3	1.83
ST1 139	(I)	2,564.5	1.82
ST1 139	(II)	636.8	1.89
ST7 438	(I)	303.9	1.63
ST7 438	(II)	1,013.4	1.85

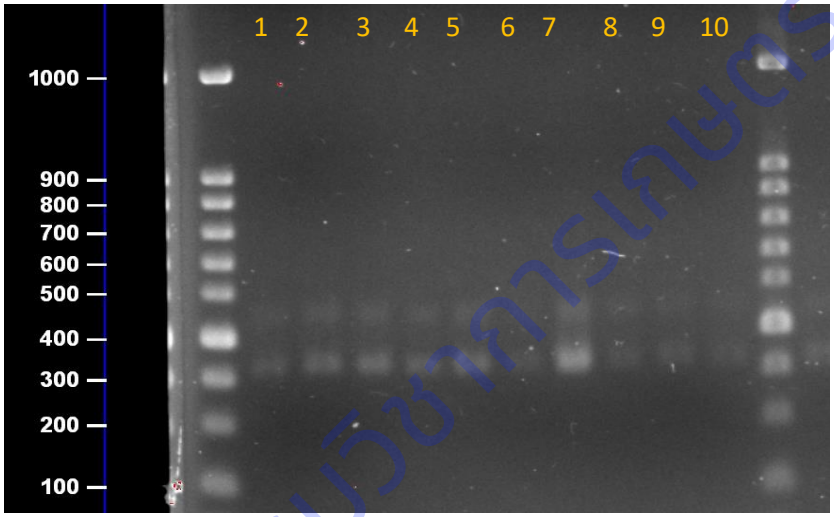
3. ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสของ KJ789862.1 : Elaeis guineensis virescens R2R3-MYB gene (ตารางผนวก 1) ข้อมูลองค์ประกอบสารเคมี อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

ทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ด้วยการใช้ไพรเมอร์ F1 5’GTATTAGTAACAAGAGCAACTC 3’ และ R1 5’TGGATATATAATGAACGATCTTC 3’ มีองค์ประกอบดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 50 ng/µl ไพรเมอร์เข้มข้น 100 pmol/µl บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า ดีออกซีนิวคลีโอไทด์เข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิโมลาร์ เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เข้มข้น 0.2 ยูนิต เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยทำพีซีอาร์ดังนี้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อีก 1 รอบ

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยการทำการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนตัวกลางอะกาโรสเจล

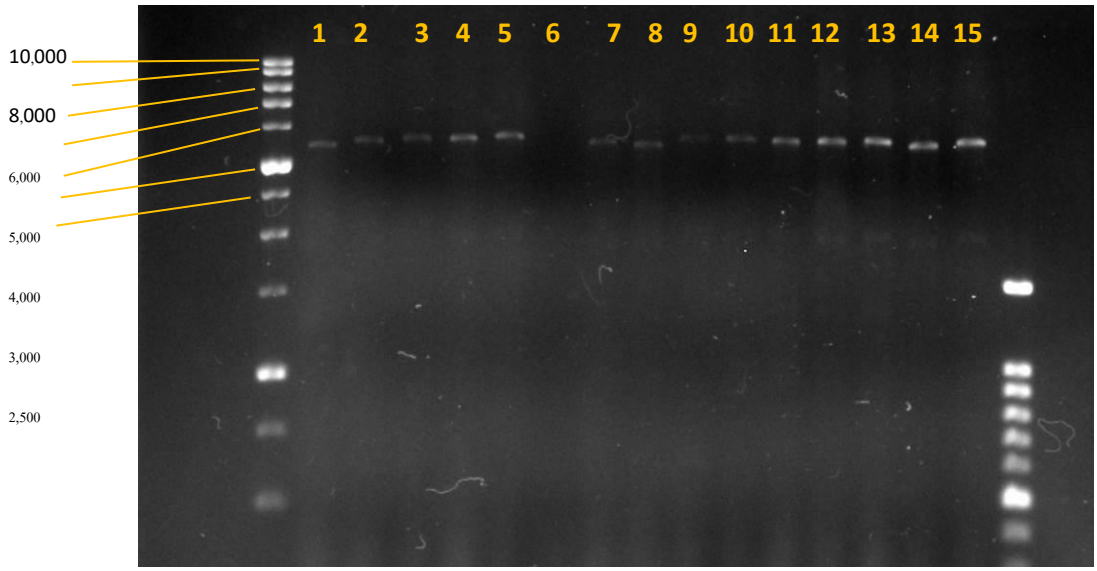
กรมวิชาการเกษตร

จากภาพที่ 1 พบว่าควรจะมีการปรับเพิ่มหรือลดสภาวะต่างๆ ในการทำพีซีอาร์ครั้งต่อไป เช่น เพิ่มอุณหภูมิขั้นตอนในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย ลดปริมาณไพรเมอร์ลงเนื่องจากมีส่วนที่ใช้ไม่หมดในการทำปฏิกิริยา ลดจำนวนรอบลง หรือเพิ่มอุณหภูมิขั้นตอนในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอ เป็นต้น การเพิ่มอุณหภูมิขั้นตอนในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำจำนวน 25 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อีก 1 รอบ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะผลแบบ Virescens ในปาล์มน้ำมันได้ (ภาพที่2) โดยการทำพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

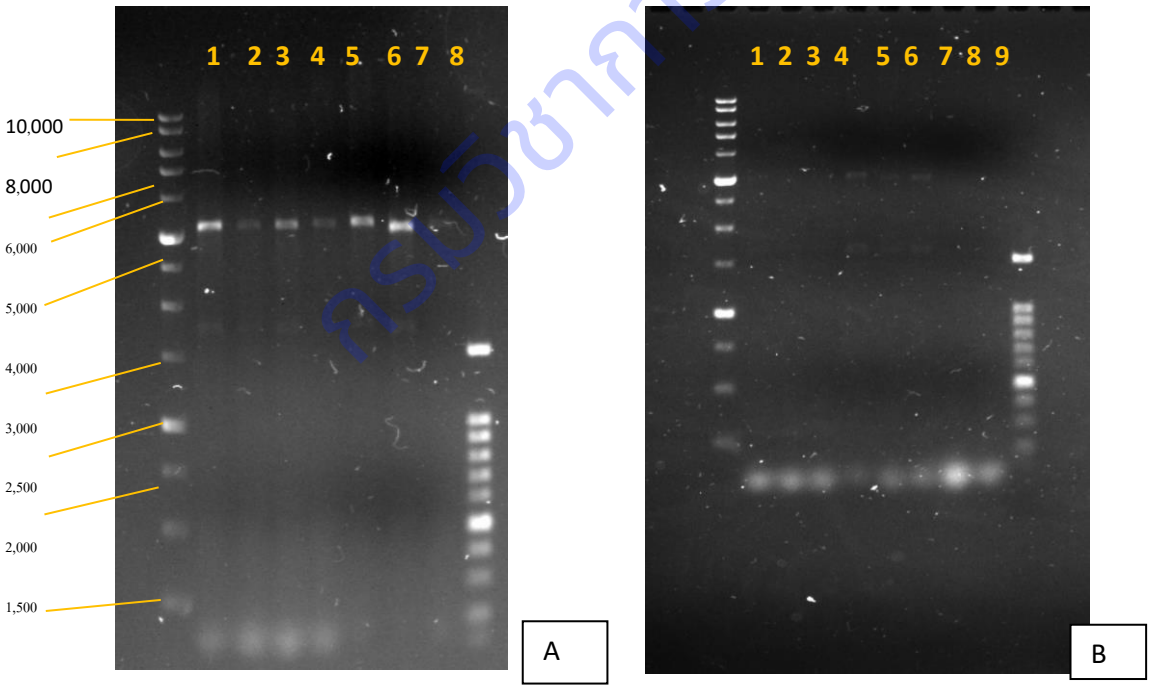


ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ด้วยไพรเมอร์ F1 5’GTATTAGTAACAAGAGCAACTC 3’ และ R1 5’TGGATATATAATGAACGATCTTC 3’ ร่วมกับใช้อุณหภูมิขั้นตอนในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (lane 1-10)

ศรีวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ด้วยไพรเมอร์ F1 5'GCGTACGTGGAACCACAA3' และ R1 5' CTCCATTCTGGTGAGAAAGCGT3' ร่วมกับใช้อุณหภูมิขั้นตอนในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (lane 1-15) 1Kb DNA ladder



ภาพที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ด้วยไพรเมอร์ F1 5'GCGTACGTGGAACCACAA3' และ R1 5' CTCCATTCTGGTGAGAAAGCGT3' ร่วมกับใช้อุณหภูมิขั้นตอน

กรมวิชาการเกษตร

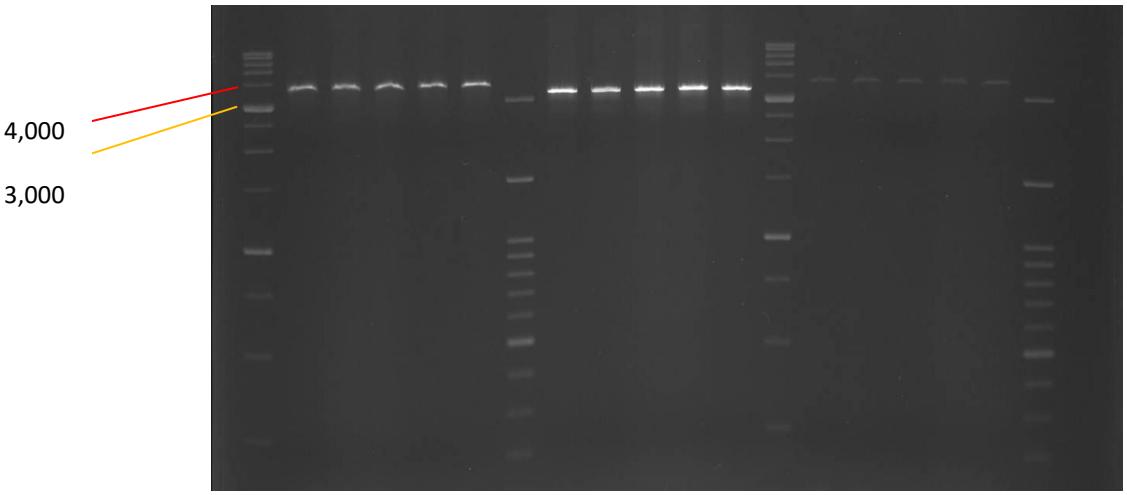
ในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 62 องศาเซลเซียส (lane 1-8) (รูป A) และ 60 องศาเซลเซียส (lane 1-9) (รูป B) เป็นเวลา 30 วินาที 1Kb DNA ladder

ดังนั้นสภาวะที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะผลแบบ Virescens ในปาล์มน้ำมันได้ โดยการทำพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ด้วยไพรเมอร์ F1 5'GCGTACGTGGAACCACAA3' และ R1 5' CTCCATTCTGGTGAGAAAGCGT3' เข้มข้น 100 pmol/µl ไมโครลิตร ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 50 ng/µl บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า ดีออกซีนิวคลีโอไทด์เข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิโมลาร์ เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เข้มข้น 0.2 ยูนิต อุณหภูมิในการทำพีซีอาร์ 3 ระดับ คืออุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 62 เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 25 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อีก 1 รอบ

ทดลองปรับอุณหภูมิในการทำพีซีอาร์ 3 ระดับ คืออุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 64 เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที จำนวน 30 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อีก 1 รอบ

พบว่าจากภาพที่ 4 lane ที่ 2-6 เป็นกลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 ลูกเขียว lane ที่ 8-12 เป็นกลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 7 ลูกเขียว lane ที่ 14-18 เป็นกลุ่มประชากรพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎ์ธานี 7 พบว่าขนาดดีเอ็นเอ อยู่ในช่วง 3-4 Kb แต่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรได้ชัดเจน การทดสอบไพรเมอร์ตัวอื่นๆที่สัมพันธ์กับลักษณะการควบคุมลักษณะผลแบบ Virescens นั้นจะช่วยนั้นจะช่วยแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรได้

กรมวิชาการเกษตร



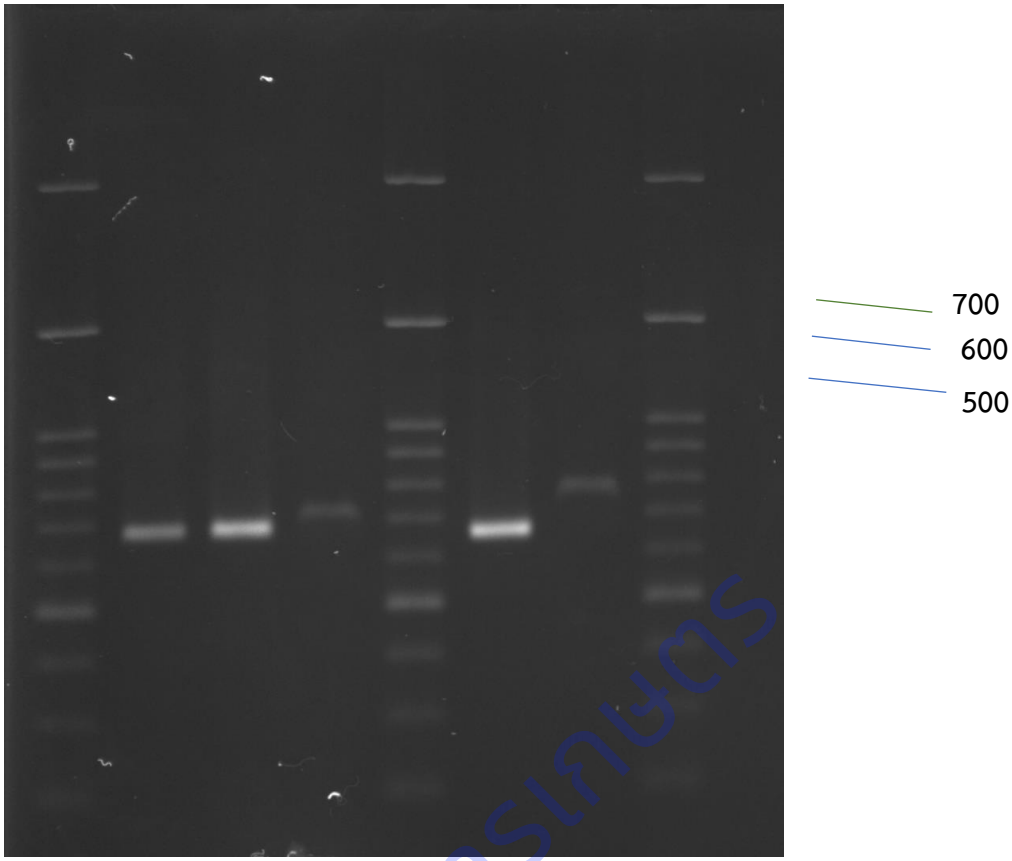
ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ด้วยไพรเมอร์ F1 5'GCGTACGTGGAACCACAA3' และ R1 5' CTCCATTCTGGTGAGAAAGCGT3' ร่วมกับใช้อุณหภูมิขั้นตอนในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 64 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
100bp DNA ladder (lane 7,19) 1Kb DNA ladder (lane 1, 13)
ST1 (lane 2-6) ST7 (lane 8-12) T (lane 14-18)

จากการหาข้อมูลลำดับเบสของยีน *VIR* ที่เกิดมิวเตชั่นพบว่าประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันกลุ่มแทนซาเนียมีการกลายพันธุ์โดยมีการเปลี่ยนลำดับเบส G เป็น T (Singh et al, 2013, Singh et al, 2014) นั่นคือจากข้อมูลนี้ในการทำ PCR เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับยีน *VIR* อาจต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะร่วมด้วย เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่มีผลปาล์มแบบ virescens และ nigrescens

ทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ F1 5'TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA3' และ R1 5' AAAGCGTGCTTCCTTCATGT3' พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมัน จากรูปที่ 5 lane ที่ 1 และ 2 เป็นกลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 ลูกเขียว ขนาดดีเอ็นเอ 700 bp lane ที่ 4 เป็นกลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 7 ขนาดดีเอ็นเอ 700 bp ลูกเขียว และ lane ที่ 3 กลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 ลูกดำ lane ที่ 5 เป็นกลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 7 ลูกดำ ขนาดดีเอ็นเอ 700-800 bp (ภาพที่ 5)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

L 1 2 L 4 L

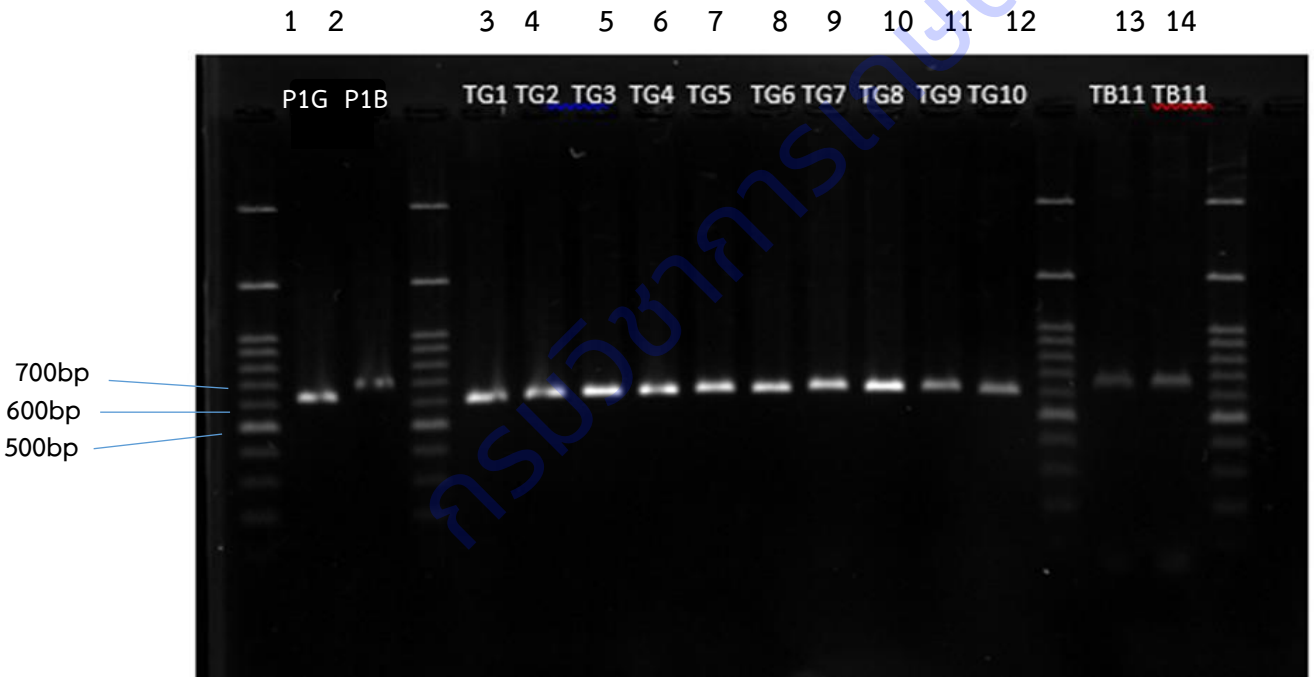


ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ด้วยไพรเมอร์ F1 5’TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA3’ และ R1 5’ AAAGCGTGCTTCCTTCATGT3’ 100 bp DNA ladder (L)

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 6 lane ที่ 1 และ 2 เป็นกลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 ลูกเขียว และดำ ตามลำดับ lane ที่ 3-12 กลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎ์ธานี 1 ลูกเขียว lane ที่ 13-14 เป็นกลุ่มกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎ์ธานี 1 ลูกดำ

จากรูปพบว่ากลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 ลูกเขียว (P1G) มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 650 bp พ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 ลูกดำ (P1B) มีมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 bp และเมื่อดูแถบดีเอ็นเอในประชากรปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎ์ธานี 1 ลูกเขียว (TG1-10) พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 650 bp เท่ากับกลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 ลูกเขียว (P1G) และปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎ์ธานี 1 ลูกดำ (TB11) พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 bp ใกล้เคียงกับกลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 ลูกดำ (P1B) นั่นเอง อย่างไรก็ตามควรใช้จำนวนประชากรหลายตัวอย่างเพื่อดูแนวโน้มต่อไป



ภาพที่ 6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ด้วยไพรเมอร์ F1 5’TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA3’ และ
R1 5’ AAAGCGTGCTTCCTTCATGT3’ 100 bp DNA ladder (L)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

กลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 และ 7 ลูกเขียว มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 650 - 700 bp พ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 ลูกดำ มีมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700-800 bp ใกล้เคียงกับกลุ่มปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎ์ธานี 1 ลูกดำ ดังนั้น การตรวจสอบตัวอย่างประชากรลูกที่มีทะลายปาล์มสีเขียวและผลปาล์มสีดำแล้วเปรียบเทียบกับตำแหน่งมีความจำเพาะเจาะจงในข้างต้น ดังนั้นในปีงบประมาณ 2564 ซึ่งยังดำเนินงานวิจัยต่อนั้น ควรตรวจสอบตัวอย่างประชากรลูกผสมที่มีทะลายปาล์มสีเขียวและผลปาล์มสีดำแล้วนั่นเอง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับงานปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อได้ลักษณะที่ต้องการ และประหยัดเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันในกลุ่ม Virescens ทราบว่าเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันต้นใหนมีแนวโน้มที่สัมพันธ์กับลักษณะผลแบบ Virescens แท้ เพื่อผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ตรงลักษณะที่ต้องการ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) :

12. เอกสารอ้างอิง :

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ อรรัตน์ วงศ์ศรี บุญเรือน เรืองวิเศษ พยุงศักดิ์ รวยอารี และ สุภาวดี ง้อเหรียญ. 2547. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1, 2 และ 3 โดยใช้เทคนิค AFLP

Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from Chberospondias asillaris leaves. BioLect. Biodiv. Lett. 2 : 19-24.

Hazir, M., H., M. and Shariff, A., R., M. 2011. Oil Palm Physical and Optical Characteristics from Two Different Planting Materials. Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology 3(9): 953-962.

Mikkonen, T. , Koort, J.M.K., Bjo¨rkroth , K.J. and Sukura, A. 2005. Testing of amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique as a tool for molecular epidemiology of Trichinella native. Veterinary Parasitology 132 : 19-22.

Malaysian Palm Oil Board (MPOB). 2014. Newly identified gene provides reliable visual cue for oil palm fruit ripeness. Phys Org. 30 June : 1-3.

Rajinder Singh, Eng-Ti Leslie Low, Leslie Cheng-Li Ooi, Meilina Ong-Abdullah, Rajanaidu Nookiah, Ngoot-Chin Ting, Marhalil Marjuni, Pek-Lan Chan, Maizura Ithnin, Mohd Arif Abdul Manaf, Jayanthi Nagappan, Kuang-Lim Chan, Rozana Rosli, Mohd Amin Halim, Norazah Azizi, Muhammad A. Budiman, Nathan Lakey, Blaire Bacher, Andrew Van Brunt, Chunyan Wang, Michael Hogan, Dong He, Jill D. MacDonald, Steven W. Smith, Jared M. Ordway

กรมวิชาการเกษตร

and Robert A. The oil palm *VIRESCENS* gene controls fruit colour and encodes a R2R3-MYB. Nature Communications. 1-8.

Seng T. Y., Q. Z. Faridah., C. L. HO., I. Maizura and Vengeta R. 2007. Flanking AFLP Markers for the Virescens Trait in Oil Palm. Journal of Oil Palm Research. Volume 19, December 2007, Pages: 381–392 pp.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP : A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23 : 4407-4414.

Ying, S. T., Zaman, F. Q., Ling, H. C., Ithnin, M. and Rao, V. 2007. Flanking AFLP markers for the Virescens trait in oil palm. Journal of Oil Palm Research. 19: 381:392.

13. ภาคผนวก

1. ข้อมูลลำดับเบสของยีนควบคุมลักษณะสีผลแบบ virescens การตรวจสอบข้อมูลลำดับเบสของ ยีน R2R3-MYB จากฐานข้อมูล NCBI

KJ789862.1 : Elaeis guineensis virescens R2R3-MYB gene, complete cds

```
   1 atgggtaatt tgcgtgccga agtccaacgt ccagctggtg ttcgcaaagg agcatggagt
  61 gaagaggagg acaggcttct gagaaagtgc gttgagaaat atggcgaagg gaactggcgc
 121 catgttcccc aaagggcagg taagcgattc cttgcttacc gacatttgtg gcaaagcaaa
 181 tcgcaaaacc ttttctatcc tgaactgaac acacaaatga tcaaaattgc tcttcaattc
 241 aacaagtatc caagcgcaag cgtatgaagg agctgttgtc ttttcatccc agcacagcct
 301 aactcctgat taccttgtct cacatcttta cagaataaag ctgaagtctg ttactcatgg
 361 gtattagtaa caagagcaac tctatgaaac cctgaatact ttccctcttc tgtactctga
 421 actgggtgtg aagttggtaa cttctcaccc ttttttattt cttattattc ctactaaact
 481 tctgtactct ttcttatatt taatgcaatg actcttgagt taggtcttcc ctaactcatt
 541 tgcatcaaaa aaaaaaaagt ggagtctttt gtcattcttg agctcattgt gcttttgtgg
 601 atttgaaggc ctcagaaggt gccgaaagag ctgccgacta cggtggttga actatctcag
 661 ccctaggatc aacagggaga aattttcgga ggaagaaaca gatcttatca tcaggcttca
 721 taagctcttg ggcaacaggt aacaacaaac tatgaagatc gttcattata tatccatttg
 781 tttatagaga cctttatatt tgttttgtct tgagagatgc caatagtttt gcttctctta
 841 attcatattc cttacctgta aagtgaaaaa aaaaaaaaaa ttctgtgaga tcattcatta
 901 tgtatgtgtt tgtttttata cagctggtag ctctggtggt tggcacccct ctcctaagga
 961 actgttttat gggcatagaa agctcaaatc ctagtattgg taaattacca tcatattact
1021 ttaaccgaaa ataatactta aaaaattatt gcataatttt catatgacaa gttaagaaac
1081 aatattaaag ttaaacggca attacaatac aaaatgcttc atgccgctga tcaacaaaag
1141 gttcattatg tttatgtggc aaaagaggat taatttgatt gaaggtgtac gctagctaac
```

กรมวิชาการเกษตร

1201 gtagtaacat gttggactga gaaaatttag taacatgttg gactgagaaa atttttgcac
1261 cactaattac caaattctag ctttcttctt atgttgggac aattaatcac taaaaaaagg
1321 ataagatggt gcaaatccca tgaggaacct tgatgaagta caaaatagag catatttcat
1381 catgtactga gcacaactat cttcagaatt taagctcgtg ctatgtgtct tgtttgcttc
1441 atagactgtc acactcgaac cctctagata ggttgacgca tgacacggcc acacactcca
1501 taagaaattc ctagagaatg tgacatagtc aggaatcttc ttgtactttg aatgtcccag
1561 tataggttcc aaacaagtag actgataaat attgcatcta gatttagatt taagcgcaag
1621 atctttcttt tgctgaatga ttttactgta ttccttttgc agtagcatgt acatcaactc
1681 ttaaaaatgg aatctatgca cttaaaccta tacccaagac gttgtgcttt aggcctaaag
1741 aaaatacacg ataatatcaa cacattttca gtcttttcgt acaatcgtat atttgatttg
1801 ttgggtttca ttcttgagat cattccactt cctccgaatg caattggcgt acgcaaccgc
1861 gggcctctag ctctatttgc tattttcatg catcatgctt ctcttgaatc tcttgtcctc
1921 caagggaccc tctctattaa atcatcacag ttgaacacaa acaattcaac taatgagatc
1981 tgaattcgat aaatcaggtg gtcattaatt gcaggtaggc ttccaggcag gacagcaaat
2041 gacatcaaga actactggaa cactcacctg ggcaagaaag tagaagttga aaacaagaag
2101 gcggagccca gtgctgatgc caaagtaatt aagccacggc catggaaagt accgttgcaa
2161 tggttttggt cagaagatca gcaatcatgt ggaagccagc agccgcaaga agagtttggc
2221 ataccagagc taccgacaat ctcagagaac gatgaagcgt ggctgaatag tataatgaat
2281 ggagatagag agaacagtgc agtgccagac gttggaaacg ggagcacaat gaacctgcag
2341 aatgaatttg gaatcggagg cttggaggaa aatagagatg gggcagtgtt tctggaagga
2401 gttctaggat gggatgactt gctttgggcc actatatag
//

ตารางผนวก 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *Elaeis guineensis* virescens R2R3-MYB gene

Primer	Sequence (5' -> 3')	Length	Start	Stop	Tm (^{0}C)
Forward primer	GTATTAGTAACAAGAGCAACTC	22	361	382	60
Reverse primer	TGGATATATAATGAACGATCTTC	23	754	776	60

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร