รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพปาล์มน้ำมัน

Research and development on biotechnology of oil palm

กรมวิชาการเกษตร

นางสาวสุวิมล กลศึก

Miss Suvimon Konlasuk

2564

รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพปาล์มน้ำมัน

Research and development on biotechnology of oil palm

กรมวิชาการเกษตร

นางสาวสุวิมล กลศึก

Miss Suvimon Konlasuk

2564

กรมวิชาการเกษตร

คำปรารภ

โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพปาล์มน้ำมัน ดำเนินการภายใต้แผนงานย่อย วิจัยปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันผลผลิตน้ำมันสูงเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมแปรรูปเพิ่มมูลค่า แผนงานวิจัยย่อยภายใต้แผนงานวิจัยการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมปาล์มน้ำมันเพื่อการผลิตอย่างยั่งยืน โดยโครงการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพปาล์มน้ำมันประกอบด้วย 3 การทดลอง ได้แก่ การทดลอง 1.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมที่มีศักยภาพการให้ผลผลิตสูง เพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมให้ได้ปริมาณมากด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการผสมข้ามร่วมกับในอนาคต การทดลอง 1.2 การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอ ดำเนินการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งสำคัญบนยีนควบคุมความหนากะลาในเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และการทดลอง 1.3 การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะสีผลแบบ Virescens ในปาล์มน้ำมัน เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มและปาล์มน้ำมันผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดง สนับสนุนงานปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราที่มีผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้ม 100 % ที่กำลังดำเนินการ

โครงการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพปาล์มน้ำมันนี้ ดำเนินการสอดคล้องกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (Conventional breeding) ซึ่งกำลังดำเนินการอยู่ในขณะนี้ ภายใต้โครงการวิจัยปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตน้ำมัน ทั้งนี้เพื่อนำงานวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพมาสนับสนุนงานปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้มีความถูกต้องแม่นยำ และก้าวหน้าได้รวดเร็วขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
ผู้วิจัย	2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	3
บทนำ	4
บทคัดย่อ	6
กิจกรรมที่ 1 การวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน	8
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	37
บรรณานุกรม	39
ภาคผนวก	41

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพปาล์มน้ำมัน อยู่ภายใต้แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมปาล์มน้ำมันเพื่อการผลิตอย่างยั่งยืน ได้รับเงินสนับสนุนจากสำนักงานส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (สกสว) จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้เป็นอย่างสูง ขอขอบคุณข้าราชการ พนักงานราชการ และพนังงานจ้างเหมาของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีทุกท่านที่มีส่วนร่วมดำเนินงานวิจัยครั้งนี้

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย

นางสาวสุวิมล กลศึก	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี
นางสาวเตือนจิตร เพ็ชรรุณ	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี
นางสาวอุษา ชูรักษ์	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	ศูนย์วิจัยพัฒนาการเกษตรพัทลุง
นางสาวอรรัตน์ วงศ์ศรี	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ	สถาบันพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน
นางยิ่งนิยม ริยาพันธ์	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี
นางสาวภรณี สว่างศรี	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวเพ็ญศิริ จำรัสฉาย	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี
นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

NCBI	National Center for Biotechnology Information
MS	Murashige and Skoog
SNP	single nucleotide polymorphism
PCR	Polymerase Chain Reaction

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

ปัจจุบันปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีบทบาทสำคัญเพิ่มขึ้นมากสำหรับอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์ขั้นสูงเพื่ออุปโภค บริโภค และผลิตไบโอดีเซลเป็นพลังงานทดแทน ในระบบการค้าน้ำมันพืชมีสัดส่วนปริมาณน้ำมันปาล์มสูงถึงร้อยละ 66-70 การพัฒนาอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มขับเคลื่อนภายใต้ยุทธศาสตรปฏิรูปปาลมน้ำมันและน้ำมันปาลมทั้งระบบ ป 2559–2569 กำหนดเป้าหมายให้มีการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 250,000 ไร่ต่อปี และปลูกทดแทนสวนเก่า 30,000 ไร่ต่อปี โดยเพิ่มผลผลิตเฉลี่ยจาก 3.22 เป็น 3.50 ตันต่อไร่ต่อปี รวมทั้งเพิ่มอัตราการสกัดน้ำมันจากร้อยละ 18. เป็นร้อยละ 20 ภายในปี 2569 นอกจากนี้ยุทธศาสตร์ชาติระยะ 20 ปี และแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 12 ได้กำหนดยุทธศาสตร์ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน โดยการเพิ่มผลิตภาพการผลิตบนพื้นฐานของการพัฒนาและใช้วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีการวิจัยและพัฒนาและนวัตกรรมที่ผสมผสานกับการพัฒนาทรัพยากรมนุษย์

กรมวิชาการเกษตร โดยศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ได้วิจัยปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันมาตั้งแต่ปี 2531 จนถึงปัจจุบัน ผลการวิจัยทำให้ได้ปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมที่มีลักษณะดี และผ่านการรับรองจากกรมวิชาการเกษตรเป็นพันธุ์แนะนำ 9 พันธุ์ มีศักยภาพในการให้ผลผลิตทะลายสดไม่ต่ำกว่า 3.6 ตันต่อไร่ต่อปี และเปอร์เซ็นต์น้ำมันไม่ต่ำกว่า 23% หรือเทียบเท่าอัตราการสกัดน้ำมันของโรงงาน (Oil Extraction Rate, OER) ไม่ต่ำกว่า 20% โดยมีการสร้างสวนพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์เพื่อผลิตพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี มีกำลังการผลิตปีละ 4-5 ล้านเมล็ดงอก ผลการนำพันธุ์ไปใช้ประโยชน์ ในช่วงปี 2542-2560 ได้ดำเนินการผลิตปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี จำนวน 31,222,748 เมล็ดงอก และจำหน่ายจ่ายแจกสู่เกษตรกรคิดเป็นพื้นที่ปลูกประมาณ 900,000 ไร่ หรือประมาณ 20% ของพื้นที่ปลูกทั้งหมด คิดเป็นรายได้จากการจำหน่ายพันธุ์ไม่ต่ำกว่า 632.67 ล้านบาท มีเกษตรกรมากกว่า 40,000 รายที่นำพันธุ์ปาล์มน้ำมันของกรมวิชาการเกษตรไปปลูก สามารถลดการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากต่างประเทศลงได้ไม่น้อยกว่า 900 ล้านบาท นอกจากนี้ยังสามารถลดต้นทุนของเกษตรกรรายย่อยในการซื้อต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ไม่น้อยกว่า 500 ล้านบาท อันเนื่องมาจากการจำหน่ายพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตรมีราคาไม่สูงมากนัก ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีที่กระจายไปสู่เกษตรกรทำให้ผลผลิตเพิ่มและคืนกำไรให้กับเกษตรกรได้ คิดเป็นเงินหมุนเวียนในระบบของปาล์มน้ำมันของประเทศไม่ต่ำกว่า 6,000 ล้านบาทต่อปี ยุทธศาสตร์การวิจัยกรมวิชาการเกษตรปี 2559-2564 ให้ดำเนินการจัดทำกรอบการวิจัยปรับปรุงพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตปาล์มน้ำมันอย่างครบวงจรโดยมุ่งเน้นวิจัยปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีเพื่อให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในระดับต่าง ๆ กัน

ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร มีเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ทราบประวัติพันธุ์ ซึ่งได้รับมาจากองค์กรปรับปรุงพันธุ์ของประเทศต่าง ๆ และวางแผนการปรับปรุงพันธุ์อย่างเป็นระบบ โดยเฉพาะเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันแอฟริกัน (*E. guineensis*) ที่ใช้สำหรับผลิตลูกผสมเทเนอราที่ให้ผลผลิตทะลายและเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่อทะลายสูง การนำเชื้อพันธุกรรมมาใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์โดยตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ด้วยลักษณะฟีโนไทป์ภายนอกเพียงอย่างเดียวอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องในการแสดงออก การแยกความแตกต่างในบางลักษณะที่มีความใกล้เคียงกันจึงทำได้ยาก และอาศัยเวลา โดยการปรับปรุงพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานใช้เวลาอย่างน้อย 10 ปีต่อชั่วรุ่น ในขณะที่การ

กรมวิชาการเกษตร

ตรวจสอบพันธุกรรมปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) เป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ ไม่จำเป็นต้องอาศัยสภาพแวดล้อมเพื่อการแสดงออก ช่วยลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง ทำให้มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกสูงกว่า อีกทั้งเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้ยังเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์รองรับการปรับปรุงพันธุ์ได้อีกด้วย ดังนั้นการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะผลดิบสีเขียวและผลสุกสีส้มและการศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอเพื่อแยกความแตกต่างของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา จึงถือว่ามีความสำคัญและมีผลให้เกิดความก้าวหน้าและความแม่นยำในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้ปาล์มน้ำมันที่ทำการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ข้ามสปีชีส์ (*E. guineensis* x *E. oleifera*) มีข้อจำกัดในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมให้ได้ปริมาณมาก และมีแนวโน้มให้ความแปรปรวนค่อนข้างสูง อาจจะทำให้ปาล์มน้ำมันแต่ละต้นให้ผลผลิตแตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะดำเนินการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาเทคนิค ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพปาล์มน้ำมัน ดำเนินการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมที่มีศักยภาพให้ผลผลิตสูง ศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอ และศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะสีผลแบบ Virescens ในปาล์มน้ำมัน มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนางานปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันแบบดั้งเดิมที่กำลังดำเนินการอยู่ให้ก้าวหน้ามากยิ่งขึ้น โดยใช้ความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมันพบว่า ใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดีที่สุด 59.2 และ 58.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สามารถชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม Dicamba เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร คิดเป็น 60.0 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล sorbitol 0.2 โมลาร์ คิดเป็น 60.0 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาพันธุกรรมเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 4 ตำแหน่ง บนยีนควบคุมความหนากะลา ได้แก่ SNP_{DA}, SNP_{ENGC}, SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAV} ในเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันของกรมวิชาการเกษตร 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) เชื้อพันธุ์ที่เกี่ยวเนื่องกับปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ IRH629 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} 2) เชื้อพันธุ์ที่เกี่ยวเนื่องกับปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ IRH629 และสายพันธุ์ HC129 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} และ SNP_{TaYa} และ 3) เชื้อพันธุ์ที่เกี่ยวเนื่องกับปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ C9023:73 และ HC129:1056 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} จากนั้นจึงใช้ผลการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์นี้คัดเลือกต้นพ่อพิสิเฟอราเพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเทเนอราที่เกี่ยวเนื่องกับกลุ่มเชื้อพันธุ์ดังกล่าว ส่วนการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะสีผลแบบ virescens ในปาล์มน้ำมัน เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลแยกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันที่มีผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มและปาล์มน้ำมันที่มีผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดง ดำเนินการศึกษาในเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันของกรมวิชาการเกษตร ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ F3 5’-TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA-3’ และ R3 5’- AAAGCGTGCTTCCTTCATGT-3’ .ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันสองกลุ่มนี้ โดยปาล์มน้ำมันที่มีผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มมีแถบดีเอ็นเอในขนาด 650 -700 คู่เบส ส่วนปาล์มน้ำมันที่มีผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดงมีแถบดีเอ็นเอขนาด 750-800 คู่เบส จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า นิวคลีโอไทด์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างและปาล์มน้ำมันสองกลุ่มนี้ได้มี 1 ตำแหน่ง โดยปาล์มน้ำมันผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มมีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งดังกล่าวเป็น A ส่วนปาล์มน้ำมันผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดงมีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งดังกล่าวเป็น T

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Abstract

The project of research and development on biotechnology of oil palm was conducted to study on tissue culture of oil palm hybrid producing high yield, study on genetic of oil palm germplasm in DNA level and study on molecular marker linked to the virescens fruit color in oil palm. The objective of this project was to improve oil palm variety by incorporating biotechnology with conventional breeding. The young leaves of the oil palm hybrid were cultured on Murashige and Skoog (MS) and supplemented with dicamba 2.0 and 2.5 mg/l could induce callus by 59.2% and 58.0%, respectively. Embryogenic callus was detected highest at 60.0% when It was transferred to MS supplemented with dicamba 2.0 mg/l and somatic embryo was induced highest at 60.0% when it was cultured on MS supplemented with sorbital 0.2 M. The study on genetic of oil palm germplasm belonging to Department of Agriculture in DNA level was detectionof single nucleotide polymorphisms (SNPs) at 4 locus on shell thickness-related gene including SNP_{DA}, SNP_{ENGC}, SNP_{TaYa} and SNP_{LaAV}. The three groups of oil palm germplasm consisted of 1) the germplasm related to line IRH629 which was SNP at $SNP_{ENGC,}$ 2) the germplasm related to line IRH629 and line HC129 which was SNPs at SNP_{ENGC} and $SNP_{TaYa.}$ and 3) the germplasm related to line C9023:73 and line HC129:1056 which was SNP at SNP_{TaYa}. These SNPs markers were used for pisifera selection to produce seeds of tenera hybrids related to those germplasms. The study on molecular marker linked to oil palm virescens fruit colour was to develop DNA marker for identification of virescens fruit colour and nigrescens fruit colour of oil palm germplasm belonging to Department of Agriculture. Two amplification fragments, 650-700 from oil palm virescens fruit color and 750-800 from oil palm nigrescens fruit color, obtained from primer pair F3 5’-TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA-3’ and R3 5’-AAAGCGTGCTTCCTTCATGT-3’ were used for identification of them. The nucleotide sequences of the fragment franked by those primers showed one locus of single nucleotide polymorphism which was A on fragment of oil palm virescens fruit color and was T on fragment of oil palm nigrescens fruit color.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

กิจกรรมที่ 1
การวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน
Research on biotechnology for oil palm breeding

สุวิมล กลศึก เตือนจิตร เพ็ชรรุณ อุษา ชูรักษ์ ภรณี สว่างศรี อรรัตน์ วงศ์ศรี ยิ่งนิยม ริยาพันธ์ เพ็ญศิริ จำรัสฉาย ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์

Suvimon Konlasuk, Tuenjit Pechrun, Usa Churak, Phorani Sawangrat, Onrat Wongsri, Yingniyom Riyapan, Pensiri Jumratchay and Phummarin Wanitchananan

คำสำคัญ ปาล์มน้ำมัน เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ เครื่องหมายโมเลกุล

Keywords: Oil palm, Tissue culture, Single nucleotide polymorphism, Molecular marker

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพปาล์มน้ำมัน ดำเนินการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมที่มีศักยภาพให้ผลผลิตสูง ศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอ และศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะสีผลแบบ Virescens ในปาล์มน้ำมัน มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนางานปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันแบบดั้งเดิมที่กำลังดำเนินการอยู่ให้ก้าวหน้ามากยิ่งขึ้น โดยใช้ความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมันพบว่า ใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดีที่สุด 59.2 และ 58.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สามารถชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม Dicamba เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร คิดเป็น 60.0 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล sorbitol 0.2 โมลาร์ คิดเป็น 60.0 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาพันธุกรรมเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 4 ตำแหน่ง บนยีนควบคุมความหนากะลา ได้แก่ SNP_{DA}, SNP_{ENGC}, SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAV} ในเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันของกรมวิชาการเกษตร 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) เชื้อพันธุ์ที่เกี่ยวเนื่องกับปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ IRH629 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} 2) เชื้อพันธุ์ที่เกี่ยวเนื่องกับปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ IRH629 และสายพันธุ์ HC129 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} และ SNP_{TaYa} และ 3) เชื้อพันธุ์ที่เกี่ยวเนื่องกับปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ C9023:73 และ HC129:1056 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} จากนั้นจึงใช้ผลการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์นี้คัดเลือกต้นพ่อพิสิเฟอราเพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเทเนอราที่เกี่ยวเนื่องกับกลุ่มเชื้อพันธุ์ดังกล่าว ส่วนการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะสีผลแบบ virescens ในปาล์มน้ำมัน เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลแยกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันที่มีผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มและปาล์มน้ำมันที่มีผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดง ดำเนิน

การศึกษาในเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันของกรมวิชาการเกษตร ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ F3 5'-TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA-3' และ R3 5'- AAAGCGTGCTTCCTTCATGT-3' .ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันสองกลุ่มนี้ โดยปาล์มน้ำมันที่มีผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มมีแถบดีเอ็นเอในขนาด 650 -700 คู่เบส ส่วนปาล์มน้ำมันที่มีผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดงมีแถบดีเอ็นเอขนาด 750-800 คู่เบส จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า นิวคลีโอไทด์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างและปาล์มน้ำมันสองกลุ่มนี้ได้มี 1 ตำแหน่ง โดยปาล์มน้ำมันผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มมีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งดังกล่าวเป็น A ส่วนปาล์มน้ำมันผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดงมีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งดังกล่าวเป็น T

Abstract

The project of research and development on biotechnology of oil palm was conducted to study on tissue culture of oil palm hybrid producing high yield, study on genetic of oil palm germplasm in DNA level and study on molecular marker linked to the virescens fruit color in oil palm. The objective of this project was to improve oil palm variety by incorporating biotechnology with conventional breeding. The young leaves of the oil palm hybrid were cultured on Murashige and Skoog (MS) and supplemented with dicamba 2.0 and 2.5 mg/l could induce callus by 59.2% and 58.0%, respectively. Embryogenic callus was detected highest at 60.0% when It was transferred to MS supplemented with dicamba 2.0 mg/l and somatic embryo was induced highest at 60.0% when it was cultured on MS supplemented with sorbital 0.2 M. The study on genetic of oil palm germplasm belonging to Department of Agriculture in DNA level was detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) at 4 locus on shell thickness-related gene including SNP_{DA}, SNP_{ENGC}, SNP_{TaYa} and SNP_{LaAV}. The three groups of oil palm germplasm consisted of 1) the germplasm related to line IRH629 which was SNP at $SNP_{ENGC,}$ 2) the germplasm related to line IRH629 and line HC129 which was SNPs at SNP_{ENGC} and $SNP_{TaYa.}$ and 3) the germplasm related to line C9023:73 and line HC129:1056 which was SNP at SNP_{TaYa}. These SNPs markers were used for pisifera selection to produce seeds of tenera hybrids related to those germplasms. The study on molecular marker linked to oil palm virescens fruit colour was to develop DNA marker for identification of virescens fruit colour and nigrescens fruit colour of oil palm germplasm belonging to Department of Agriculture. Two amplification fragments, 650-700 from oil palm virescens fruit color and 750-800 from oil palm nigrescens fruit color, obtained from primer pair F3 5'-TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA-3' and R3 5'-AAAGCGTGCTTCCTTCATGT-3' were used for identification of them. The nucleotide sequences of the fragment franked by those primers showed one locus of single nucleotide polymorphism

สำนักวิทยบริการฯ

which was A on fragment of oil palm virescens fruit color and was T on fragment of oil palm nigrescens fruit color.

บทนำ

ปัจจุบันปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีบทบาทสำคัญเพิ่มขึ้นมากสำหรับอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์ขั้นสูงเพื่ออุปโภค บริโภค และผลิตไบโอดีเซลเป็นพลังงานทดแทน ในระบบการค้าน้ำมันพืชมีสัดส่วนปริมาณน้ำมันปาล์มสูงถึงร้อยละ 66-70 การพัฒนาอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มขับเคลื่อนภายใต้ยุทธศาสตรปฏิรูปปาลมน้ำมันและน้ำมันปาลมทั้งระบบ ป 2559–2569 กำหนดเป้าหมายให้มีการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 250,000 ไร่ต่อปี และปลูกทดแทนสวนเก่า 30,000 ไร่ต่อปี โดยเพิ่มผลผลิตเฉลี่ยจาก 3.22 เป็น 3.50 ตันต่อไร่ต่อปี รวมทั้งเพิ่มอัตราการสกัดน้ำมันจากร้อยละ 18. เป็นร้อยละ 20 ภายในปี 2569 นอกจากนี้ยุทธศาสตร์ชาติระยะ 20 ปี และแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 12 ได้กำหนดยุทธศาสตร์ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน โดยการเพิ่มผลิตภาพการผลิตบนพื้นฐานของการพัฒนาและใช้วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีการวิจัยและพัฒนาและนวัตกรรมที่ผสมผสานกับการพัฒนาทรัพยากรมนุษย์

กรมวิชาการเกษตร โดยศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ได้วิจัยปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันมาตั้งแต่ปี 2531 จนถึงปัจจุบัน ผลการวิจัยทำให้ได้ปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมที่มีลักษณะดี และผ่านการรับรองจากกรมวิชาการเกษตรเป็นพันธุ์แนะนำ 9 พันธุ์ มีศักยภาพในการให้ผลผลิตทะลายสดไม่ต่ำกว่า 3.6 ตันต่อไร่ต่อปี และเปอร์เซ็นต์น้ำมันไม่ต่ำกว่า 23% หรือเทียบเท่าอัตราการสกัดน้ำมันของโรงงาน (Oil Extraction Rate, OER) ไม่ต่ำกว่า 20% โดยมีการสร้างสวนพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์เพื่อผลิตพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี มีกำลังการผลิตปีละ 4-5 ล้านเมล็ดงอก ผลการนำพันธุ์ไปใช้ประโยชน์ ในช่วงปี 2542-2560 ได้ดำเนินการผลิตปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี จำนวน 31,222,748 เมล็ดงอก และจำหน่ายจ่ายแจกสู่เกษตรกรคิดเป็นพื้นที่ปลูกประมาณ 900,000 ไร่ หรือประมาณ 20% ของพื้นที่ปลูกทั้งหมด คิดเป็นรายได้จากการจำหน่ายพันธุ์ไม่ต่ำกว่า 632.67 ล้านบาท มีเกษตรกรมากกว่า 40,000 รายที่นำพันธุ์ปาล์มน้ำมันของกรมวิชาการเกษตรไปปลูก สามารถลดการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากต่างประเทศลงได้ไม่น้อยกว่า 900 ล้านบาท นอกจากนี้ยังสามารถลดต้นทุนของเกษตรกรรายย่อยในการซื้อต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ไม่น้อยกว่า 500 ล้านบาท อันเนื่องมาจากการจำหน่ายพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตรมีราคาไม่สูงมากนัก ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีที่กระจายไปสู่เกษตรกรทำให้ผลผลิตเพิ่มและคืนกำไรให้กับเกษตรกรได้ คิดเป็นเงินหมุนเวียนในระบบของปาล์มน้ำมันของประเทศไม่ต่ำกว่า 6,000 ล้านบาทต่อปี ยุทธศาสตร์การวิจัยกรมวิชาการเกษตรปี 2559-2564 ให้ดำเนินการจัดทำกรอบการวิจัยปรับปรุงพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตปาล์มน้ำมันอย่างครบวงจรโดยมุ่งเน้นวิจัยปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีเพื่อให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในระดับต่าง ๆ กัน

ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร มีเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ทราบประวัติพันธุ์ ซึ่งได้รับมาจากองค์กรปรับปรุงพันธุ์ของประเทศต่าง ๆ และวางแผนการปรับปรุงพันธุ์อย่างเป็นระบบ โดยเฉพาะเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันแอฟริกัน (*E. guineensis*) ที่ใช้สำหรับผลิตลูกผสมเทเนอราที่ให้ผลผลิตทะลายและเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่อทะลายสูง การนำเชื้อพันธุกรรมมาใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์โดยตรวจสอบความ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ตรงตามพันธุ์ด้วยลักษณะฟีโนไทป์ภายนอกเพียงอย่างเดียวอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องในการแสดงออก การแยกความแตกต่างในบางลักษณะที่มีความใกล้เคียงกันจึงทำได้ยาก และอาศัยเวลา โดยการปรับปรุงพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานใช้เวลาอย่างน้อย 10 ปีต่อชั่วรุ่น ในขณะที่การตรวจสอบพันธุกรรมปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) เป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ ไม่จำเป็นต้องอาศัยสภาพแวดล้อมเพื่อการแสดงออก ช่วยลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง ทำให้มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกสูงกว่า อีกทั้งเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้ยังเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์รองรับการปรับปรุงพันธุ์ได้อีกด้วย ดังนั้นการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะผลดิบสีเขียวและผลสุกสีส้มและการศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอเพื่อแยกความแตกต่างของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา จึงถือว่ามีความสำคัญและมีผลให้เกิดความก้าวหน้าและความแม่นยำในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้ปาล์มน้ำมันที่ทำการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ข้ามสปีชีส์ (*E. guineensis* x *E. oleifera*) มีข้อจำกัดในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมให้ได้ปริมาณมาก และมีแนวโน้มให้ความแปรปรวนค่อนข้างสูง อาจจะทำให้ปาล์มน้ำมันแต่ละต้นให้ผลผลิตแตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะดำเนินการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาเทคนิค ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่

ระเบียบวิธีการวิจัย

การทดลอง 1.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมที่มีศักยภาพการให้ผลผลิตสูง

อุปกรณ์

1. ชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูง
2. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) น้ำตาลซูโครส
3. สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มออกซิน
4. สารเคมีสำหรับใช้ฆ่าเชื้อ
5. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น คีมคีบ มีดผ่าตัด จานเพาะเลี้ยง ขวดเพาะเลี้ยง
6. ตู้อบแห้ง หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ และตู้เย็น เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัด pH

วิธีการ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การชักนำแคลลัส

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วยสูตรอาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนจำนวน 24 กรรมวิธีๆ ละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1-6 สูตร MS ร่วมกับ Picloram ความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร

กรรมวิธีที่ 7-12 สูตร MS ร่วมกับ Dicamba ความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร

กรรมวิธีที่ 13-18 สูตร N6 ร่วมกับ Picloram ความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร

ลิขสิทธิ์การเกษตร

กรรมวิธีที่ 19-24 สูตร N6 ร่วมกับ Dicamba ความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร

คัดเลือกต้นปาล์มน้ำมันลูกผสมที่มีศักยภาพการให้ผลผลิตสูงแล้วนำใบอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง แล้วตัดใบอ่อนปาล์มน้ำมันให้มีขนาด 5x5 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ Gelrite 0.3 เปอร์เซ็นต์ pH 5.7 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล บันทึกชนิดและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

ขั้นตอนที่ 2 การชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วยสูตรอาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงจำนวน 9 กรรมวิธีๆ ละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สูตร MS ร่วมกับ Dicamba ความเข้มข้น 1.0 มก./ล.

กรรมวิธีที่ 2 สูตร MS ร่วมกับ Dicamba ความเข้มข้น 2.0 มก./ล.

กรรมวิธีที่ 3 สูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มก./ล.

กรรมวิธีที่ 4 สูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มก./ล.

กรรมวิธีที่ 5 สูตร N6 ร่วมกับ Dicamba ความเข้มข้น 1.0 มก./ล.

กรรมวิธีที่ 6 สูตร N6 ร่วมกับ Dicamba ความเข้มข้น 2.0 มก./ล.

กรรมวิธีที่ 7 สูตร N6 ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มก./ล.

กรรมวิธีที่ 8 สูตร N6 ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มก./ล.

กรรมวิธีที่ 9 สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

นำชิ้นส่วนแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 ในแต่ละพันธุ์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ Gelrite 0.3 เปอร์เซ็นต์ pH 5.7 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ขั้นตอนที่ 3 การชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วยสูตรอาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงจำนวน 5 กรรมวิธีๆ ละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สูตร MS ร่วมกับ น้ำตาล sorbital ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

กรรมวิธีที่ 2 สูตร MS ร่วมกับ น้ำตาล sorbital ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

กรรมวิธีที่ 3 สูตร MS ร่วมกับ น้ำตาล sorbital ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์

กรรมวิธีที่ 4 สูตร N6 ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มก./ล.

กรรมวิธีที่ 5 สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 ของปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนดร่วมกับ putrescine 0.16 ก./ล. casein amino acid 0.5 ก./ล. และผงถ่าน (activated charcoal) 2 ก./ล. Gelrite 0.3 เปอร์เซ็นต์ pH 5.7 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล บันทึกการพัฒนาของยอดจากโซมาติกเอ็มบริโอ

ระยะเวลาดำเนินงาน: ตุลาคม 2559 - ธันวาคม 2564

สถานที่ดำเนินงาน: ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

การทดลอง 1.2 การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอ

วัสดุพืช

เชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
- สารเคมีสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซีส
- สารเคมีสำหรับใช้ทำ PCR (Polymerase Chain Reaction: PCR) ทั่วไป และ Real-time PCR
- สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากเจล

อุปกรณ์

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

วิธีการ

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งสำคัญบนยีนควบคุมความหนากะลาในเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

1 การเก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน

เก็บตัวอย่างใบต้นปาล์มน้ำมันปาล์มน้ำมันชนิด *E guineensis* ประเภทดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอราจากประชากรเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ณ แปลงรวบรวมเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน โดยใช้วิธีการดัดแปลงมาจาก 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

กรมวิชาการเกษตร

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

3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

ทำการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer คำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กลับมาเป็นปริมาณดีเอ็นเอ และทำการบันทึกภาพตัวอย่างจีโนมิกดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE (Tris Base, Glacial acetic acid, Na_2EDTA 0.5 M (pH 8.0) เป็นเวลา 30 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบและบันทึกภาพภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

4 การทำ Real-time PCR

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

ชุดที่ 1ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{DA} ยีนเด่นมีนิวคลีโอไทด์เป็น C ยีนด้อยมีนิวคลีโอไทด์เป็น T

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’

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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 2xTag Man® Genotyping master mix 10 ไมโครลิตร 20x Assay primer and probe 1 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอแม่พิมพ์เข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 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

ระยะเวลาดำเนินงาน: ตุลาคม 2559 - ธันวาคม 2564

สถานที่ดำเนินงาน: ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

การทดลอง 1.3 การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะสีผลแบบ Virescens ในปาล์มน้ำมัน

วัสดุและอุปกรณ์

1. ปาล์มน้ำมันจากเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในประชากรพ่อ ที่มีผลดิบสีเขียวและผลสุกสีส้ม *(Virescens)* กลุ่ม Calabar และ Tanzania ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

2. สารเคมี

- สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ
- สารเคมีสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction: PCR)
- สารเคมีสำหรับทำอิเลคโตรโฟรีซีสและย้อมเจล

3. วัสดุอุปกรณ์สำหรับทำ PCR

- เครื่องมือ PCR
- UV transluminator
- เครื่องมืออิเลคโตรโฟรีซีส
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- ตู้ไมโครเวฟ
- ไมโครปิเปต

วิธีการ

กรมวิชาการเกษตร

1. การสืบค้นข้อมูล

สืบค้นข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมลักษณะผลแบบ Virescens จากฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI

2. เก็บตัวอย่างและสกัดดีเอ็นเอใบปาล์มน้ำมัน

เก็บรวบรวมใบของปาล์มน้ำมันของแต่ละพันธุ์ดังกล่าวจากศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี สกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมันโดยวิธีของ หทัยรัตน์ และคณะ (2557), 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 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที เขย่าหลอดทุก ๆ 10 นาที จากนั้นเติม Chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 700 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในหลอดให้เข้ากันโดยวิธีกลับหลอดไปมาประมาณ 5-10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน 600 ไมโครลิตร ใส่หลอด microtube ใหม่ จากนั้นเติม 3 M Sodium acetate 60 ไมโครลิตร และ Isopropanol 360 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปแช่ไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทน้ำใสทิ้ง เติม Washing solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็เอ 2 ครั้ง ได้ตะกอนที่ก้นหลอดคือดีเอ็นเอ จากนั้นล้างตะกอน ดีเอ็นเอ ด้วย 70% แอลกอฮอล์ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE (1 mM Na_2EDTA, 10 mM Tris-HCl pH8.0) จำนวน 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 30 นาที เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C นำดีเอ็นเอที่ได้วัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (spectrophotometer)

3. ออกแบบและคัดเลือกไพรเมอร์

ออกแบไพรเมอร์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมลักษณะสีผลแบบ Virescens จากฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างปาล์มน้ำมันที่ให้ผลดิบสีส้มและปาล์มน้ำมันที่ให้ผลดิบสีดำ

4. ทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง

โดยทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง นำผลผลิตพีซีอาร์ไปแยกขนาดของดีเอ็นเอตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยการทำการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนตัวกลางอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1-1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1xTBE (Tris base, Boric acid, Na_2EDTA 0.5 M pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบผลด้วย Gel documentation เพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

5. หาลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มปริมาณได้จากหลอดทดลอง

6. วิเคราะห์และประมวลผล

บันทึกข้อมูล

กรมวิชาการเกษตร

- ที่มาของกลุ่มปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผลสีแบบ Virescens
- ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้
- ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแถบดีเอ็นเอที่ได้
- ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
- ลำดับนิวคลีโอไทด์

ระยะเวลาดำเนินงาน: ตุลาคม 2559 - ธันวาคม 2564

สถานที่ดำเนินงาน: ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันกระบี่ ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และศูนย์วิจัยพัฒนาการเกษตรพัทลุง

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

กิจกรรมที่ 1 วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

การทดลอง 1.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมที่มีศักยภาพการให้ผลผลิตสูง

1. การชักนำแคลลัส

ดำเนินการเตรียมสูตรอาหาร MS และ N6 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Picloram และ Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร และทำการตัดยอดเพื่อนำชิ้นส่วนใบอ่อนที่อยู่เหนือส่วนตายอดประมาณ 10 นิ้วมาเพาะเลี้ยงในที่มืด เพื่อชักนำการเกิดแคลลัส พบว่า ชิ้นส่วนใบอ่อนเริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 เดือน โดยสูตรอาหารที่พบการเกิดแคลลัสเร็วที่สุด คือ สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 เดือน พบว่า ชิ้นส่วนใบอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด ในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร คิดเป็น 59.3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร คิดเป็น 58.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1.1-1) แต่ทั้ง 2 สูตรสามารถชักนำเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมีความแตกต่างทางสถิติกับอีก 22 สูตรอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยจะเกิดแคลลัสบริเวณขอบใบที่ม้วนงอ โดยลักษณะแคลลัสเกิดเป็นตุ่มขาวขุ่น มีลักษณะฉ่ำน้ำ (ภาพที่ 1.1-1) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของภุมรินทร์ และคณะ (2560) การชักนำแคลลัสจากใบอ่อนในสภาพที่มืดจะทำให้เกิดแคลลัสได้จากสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ระยะเวลา 2.5 เดือน และสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Picloram ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ระยะเวลา 6 เดือน ทำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะกลมมีสีน้ำตาลอ่อนเกิดขึ้นที่บริเวณขอบใบ และอาสลัน และคณะ (2545) ได้รายงานว่าสามารถชักนำแคลลัสเริ่มแรกได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส และพบว่าใบอ่อนที่ได้จากต้นพันธุ์ที่อายุมาก (10 และ 20 ปี) ส่งผลให้การสร้างแคลลัสเกิดขึ้นลดลงและใช้เวลาในการชักนำ

ศรีวิชัยการเกษตร

แคลลัสยาวนานกว่าต้นพันธุ์ที่มีอายุน้อย (1ปี) และรายงานว่าชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสปาล์มน้ำมัน คือ Dicamba เข้มข้น 1.0-5.0 มิลลิกรัม/ลิตร (ชักนำแคลลัสได้เฉลี่ย 9.11 เปอร์เซ็นต์)

สำหรับในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Picloram พบว่า ชิ้นส่วนใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในสูตรอาหารที่มีระดับความเข้มข้นที่ 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร คิดเป็น 33.3 16.6 และ 20.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 1.1-1) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำกว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ส่วนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ Picloram ที่มีระดับความเข้มข้น 1.5-2.5 มิลลิกรัม/ลิตร จะพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำและไม่พบการเกิดแคลลัส อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างชนิดกันการตอบสนองต่อความเข้มข้นก็ต่างกันด้วย และสูตรอาหาร N6 ส่วนใหญ่ไม่พบเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพบต่ำมาก อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงแต่ละชนิดตอบสนองต่อสูตรอาหารต่างกัน โดยมีรายงานว่าปาล์มน้ำมันสามารถพัฒนาให้แคลลัสได้ทุกชิ้นส่วนพืช โดยลักษณะทางจีโนไทด์ของชิ้นส่วนพืชมีผลต่อการสร้างแคลลัสแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ดังนั้นการพัฒนาจึงมีความแตกต่างกันไปในแต่ละชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง เช่น การเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันลูกผสมที่ได้จากต้นแม่เดลี่ ดูรา (Deli dura) ผสมกับต้นพ่อลาเม (La me) สามารถสร้างแคลลัสได้ 31 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นแม่เดลี่ ดูรา (Deli dura) ผสมกับต้นพ่อนิฟอร์ (Nifor) และต้นแม่เดลี่ ดูรา (Deli dura) ผสมกับต้นพ่อยังแกมบิ (Yangambi) แคลลัสมีการพัฒนา 7 และ 9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Rival *et al*.,1997) เตือนจิตร และคณะ (2558) สามารถชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามสปีชีส์ได้ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Picloram ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร โดยแคลลัสมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด 0.48 0.44 และ 0.42 กรัม

ตารางที่ 1.1-1 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมันในอาหารสูตร MS และ N6 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Picloram และ dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 and 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร	แคลลัส (%)	สูตรอาหาร	แคลลัส (%)
1. MS + Picloram 0.1 mg/l	33.3bc	13. N6 + Picloram 0.1 mg/l	0.0f
2. MS + Picloram 0.5 mg/l	16.9de	14. N6 + Picloram 0.5 mg/l	20.6de
3. MS + Picloram 1.0 mg/l	20.3de	15. N6 + Picloram 1.0 mg/l	4.1f
4. MS + Picloram 1.5 mg/l	0.0f	16. N6 + Picloram 1.5 mg/l	0.0f
5. MS + Picloram 2.0 mg/l	0.0f	17. N6 + Picloram 2.0 mg/l	4.1f
6. MS + Picloram 2.5 mg/l	4.1f	18. N6 + Picloram 2.5 mg/l	0.0f
7. MS + Dicamba 0.1 mg/l	0.0f	19. N6 + Dicamba 0.1 mg/l	8.9ef
8. MS + Dicamba 0.5 mg/l	24.9cd	20. N6 + Dicamba 0.5 mg/l	0.0f
9. MS + Dicamba 1.0 mg/l	58.6a	21. N6 + Dicamba 1.0 mg/l	0.0f
10. MS + Dicamba 1.5 mg/l	37.6b	22. N6 + Dicamba 1.5 mg/l	0.of

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สูตรอาหาร	แคลลัส (%)	สูตรอาหาร	แคลลัส (%)
11. MS + Dicamba 2.0 mg/l	59.3a	23. N6 + Dicamba 2.0 mg/l	0.0f
12. MS + Dicamba 2.5 mg/l	0.0f	24. N6 + Dicamba 2.5 mg/l	0.0f
C.V. (%)			113.8

หมายเหตุ: ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 1.1-1 ลักษณะการเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมันในอาหารสูตร MS และ N6 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Picloram และ dicamba

ดำเนินการย้ายชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสลงในอาหารสูตรเดิมและบันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสเพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสให้เพียงพอต่อการชักนำเอ็มบริโอจีนีซิส พบว่า ลักษณะแคลลัสมีการเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นในสูตรอาหาร MS ที่เติม Dicamba ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร แต่แคลลัสส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นสีเหลืองน้ำตาลอ่อน ฉ่ำน้ำ เกาะกันแน่น และในสูตรอาหาร MS ที่เติม Dicamba ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสบางส่วนมีการขยายขนาดกลาง มีสีเหลืองน้ำตาลฉ่ำน้ำ ลักษณะเกาะกันแน่นและในสูตรอาหาร MS ที่เติม Dicamba ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสส่วนใหญ่มีการขยายขนาดเล็กน้อย มีสีเหลืองน้ำตาลฉ่ำน้ำ ลักษณะเกาะกันแน่น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ กษิดิศ และคณะ (2556) และชยานิจ และคณะ (2552) ได้รายงานว่า ลักษณะของแคลลัสที่พบจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นก้อนแข็งสีเหลืองอ่อน เกาะตัวกันแน่น เรียกว่า compact callus และ Te-chato และคณะ (1998) และ Teixeira และคณะ (1993) รายงานว่า คัพภะอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดและใช้เวลาในการเกิดแคลลัสน้อยที่สุด 4 เดือน และให้แคลลัสที่เกาะตัวกันแน่น เนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อที่อยู่ในระยะ juvenile stage ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีอายุน้อยสามารถตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตได้ดี ส่วนในสูตรอาหาร N6 แคลลัสไม่มีการพัฒนาเพิ่มเติม (ตารางที่ 1.1-2 และภาพที่ 1.1-2)

2. การชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

จากการนำแคลลัสในข้อ 1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ N6 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสาร

กรมวิชาการเกษตร

ควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส พบว่า แคลลัสมีลักษณะการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในสูตรอาหาร MS ที่เติม Dicamba ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร คิดเป็น 60.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร คิดเป็น 25.0 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในสูตรอื่น ๆ ยังไม่พบการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (ตารางที่ 1.1-3 และภาพที่ 1.1-3) โดยมีการรายงานของภุมรินทร์ และคณะ (2558) ได้รายงานว่า การพัฒนาเป็น embyogenic callus ของปาล์มน้ำมันโดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ควรใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำการเกิดการพัฒนาของแคลลัสปาล์มน้ำมันให้เกิดเป็น embryogenic callus ที่มีลักษณะเป็น friable callus ที่สามารถพัฒนาต่อไปได้ และเตือนจิตร และคณะ (2558) ได้รายงานว่า แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของปาล์มน้ำมันลูกผสมข้ามสปีชีส์มีแนวโน้มพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร คิดเป็น 35 และ 26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน ทั้งนี้การพัฒนาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน อาจขึ้นอยู่กับชนิดหรือพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ชนิดของชิ้นส่วนที่นำมาชักนำให้เกิดแคลลัส รวมทั้งอายุของแคลลัสด้วย

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.1-2 ลักษณะการพัฒนาแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมันในอาหารสูตร MS และ N6 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Picloram และ dicamba ที่ระดับความเข้มข้น0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร

สูตรอาหาร	ลักษณะการพัฒนาของแคลลัส
1. MS + Picloram 0.1 mg/l	แคลลัสไม่ค่อยพัฒนา มีสีขาวเหลือง ฉ่ำน้ำและพัฒนาเป็นเส้น ลักษณะเกาะกันแน่น
2. MS + Picloram 0.5 mg/l	แคลลัสไม่ค่อยพัฒนา มีสีขาวเหลือง ฉ่ำน้ำและพัฒนาเป็นเส้น ลักษณะเกาะกันแน่น
3. MS + Picloram 1.0 mg/l	แคลลัสไม่พัฒนา
4. MS + Picloram 1.5 mg/l	ไม่เกิดแคลลัส
5. MS + Picloram 2.0 mg/l	ไม่เกิดแคลลัส
6. MS + Picloram 2.5 mg/l	แคลลัสไม่พัฒนา
7. MS + Dicamba 0.1 mg/l	ไม่เกิดแคลลัส
8. MS + Dicamba 0.5 mg/l	แคลลัสมีการเพิ่มปริมาณหรือขนาดเล็กน้อยแต่มีสีเหลือง น้ำตาล ฉ่ำน้ำ ลักษณะเกาะกันแน่น
9. MS + Dicamba 1.0 mg/l	แคลลัสมีการเพิ่มปริมาณเล็กน้อย มีสีขาว ฉ่ำน้ำ ลักษณะเกาะกันแน่น
10.MS + Dicamba 1.5 mg/l	แคลลัสไม่ค่อยพัฒนา มีสีขาวเหลือง ฉ่ำน้ำและพัฒนาเป็นเส้น ลักษณะเกาะกันแน่น
11.MS + Dicamba 2.0 mg/l	แคลลัสมีการเพิ่มปริมาณหรือขนาดค่อนข้างใหญ่ มีสีเหลืองน้ำตาลฉ่ำน้ำ ลักษณะเกาะกันแน่นและบางชิ้นเกิดเป็นเส้น
12.MS + Dicamba 2.5 mg/l	แคลลัสมีการเพิ่มปริมาณหรือขนาดกลาง มีสีเหลืองน้ำตาลฉ่ำน้ำ ลักษณะเกาะกันแน่น
13.N6 + Picloram 0.1 mg/l	ไม่เกิดแคลลัส
14.N6 + Picloram 0.5 mg/l	แคลลัสไม่พัฒนาเพิ่ม
15.N6 + Picloram 1.0 mg/l	แคลลัสไม่พัฒนาเพิ่ม
16.N6 + Picloram 1.5 mg/l	ไม่เกิดแคลลัส
17.N6 + Picloram 2.0 mg/l	แคลลัสไม่พัฒนาเพิ่ม
18.N6 + Picloram 2.5 mg/l	ไม่เกิดแคลลัส
19.N6 + Dicamba 0.1 mg/l	แคลลัสไม่พัฒนาเพิ่ม
20.N6 + Dicamba 0.5 mg/l	ไม่เกิดแคลลัส
21.N6 + Dicamba 1.0 mg/l	ไม่เกิดแคลลัส
22.N6 + Dicamba 1.5 mg/l	ไม่เกิดแคลลัส
23.N6 + Dicamba 2.0 mg/l	ไม่เกิดแคลลัส
24.N6 + Dicamba 2.5 mg/l	ไม่เกิดแคลลัส

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.1-2 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่เติม Dicamba เข้มข้น 2.0 2.5 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.1-3 เปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารสูตร MS และ N6 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

สูตรอาหาร	การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (%)
1. MS + Dicamba 1.0 mg/l	ไม่พบการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส
2. MS + Dicamba 2.0 mg/l	60.0
3. MS + 2,4-D 1.0 mg/l	25.0
4. MS + 2,4-D 2.0 mg/l	10.0
5. N6 + Dicamba 1.0 mg/l	ไม่พบการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส
6. N6 + Dicamba 2.0 mg/l	ไม่พบการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส
7. N6 + 2,4-D 1.0 mg/l	ไม่พบการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส
8. N6 + 2,4-D 2.0 mg/l	ไม่พบการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส
9. MS	ไม่พบการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ภาพที่ 1.1-3 ลักษณะการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่เติม Dicamba เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรมวิชาการเกษตร

3. การชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในข้อ 2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล sorbital ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 โมลาร์ อาหารสูตร N6 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีแนวโน้มพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุดในสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำตาล sorbitol 0.2 โมลาร์ คิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ โดยเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาเป็นกลุ่มก้อนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีส่วนที่ยื่นออกมาลักษณะคล้ายระยะ Globular – shaped มากที่สุด แต่ยังไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดและรากที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาหรือมีการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมกับชนิดและชิ้นส่วนของปาล์มนำมันต่อไป (ตารางที่ 1.1-4 และภาพที่ 1.1-4)

ตารางที่ 1.1-4 เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล sorbital ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 โมลาร์ อาหารสูตร N6 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

สูตรอาหาร	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (%)
1. MS + sorbital 0.1 โมลาร์	20.0
2. MS + sorbital 0.2 โมลาร์	60.0
3. MS + sorbital 0.3 โมลาร์	40.0
4. N6 + 2,4-D 0.1 mg/l	20.0
5. MS	60.0

ภาพที่ 1.1-4 ลักษณะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล sorbitol 0.2 โมลาร์

กรมวิชาการเกษตร

การทดลอง 1.2 การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอ

การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งบนยีนควบคุมความหนากะลาในเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

1. เชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีความเกี่ยวเนื่องกับปาล์มน้ำมัน Calabar สายพันธุ์ IRH629

ประวัติพันธุ์

ปาล์มน้ำมันเชื้อพันธุ์กลุ่ม Calabar ที่ได้มาจากปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ IRH629 ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ประกอบด้วย 2 กลุ่มประชากร ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประชากรปาล์มน้ำมันที่ได้มาจากปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ IRH629 ต้นเทเนอราหมายเลข 316 ผสมตัวเอง ปาล์มน้ำมันรุ่นลูกที่ได้กระจายตัวให้ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ปลูกทดสอบที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

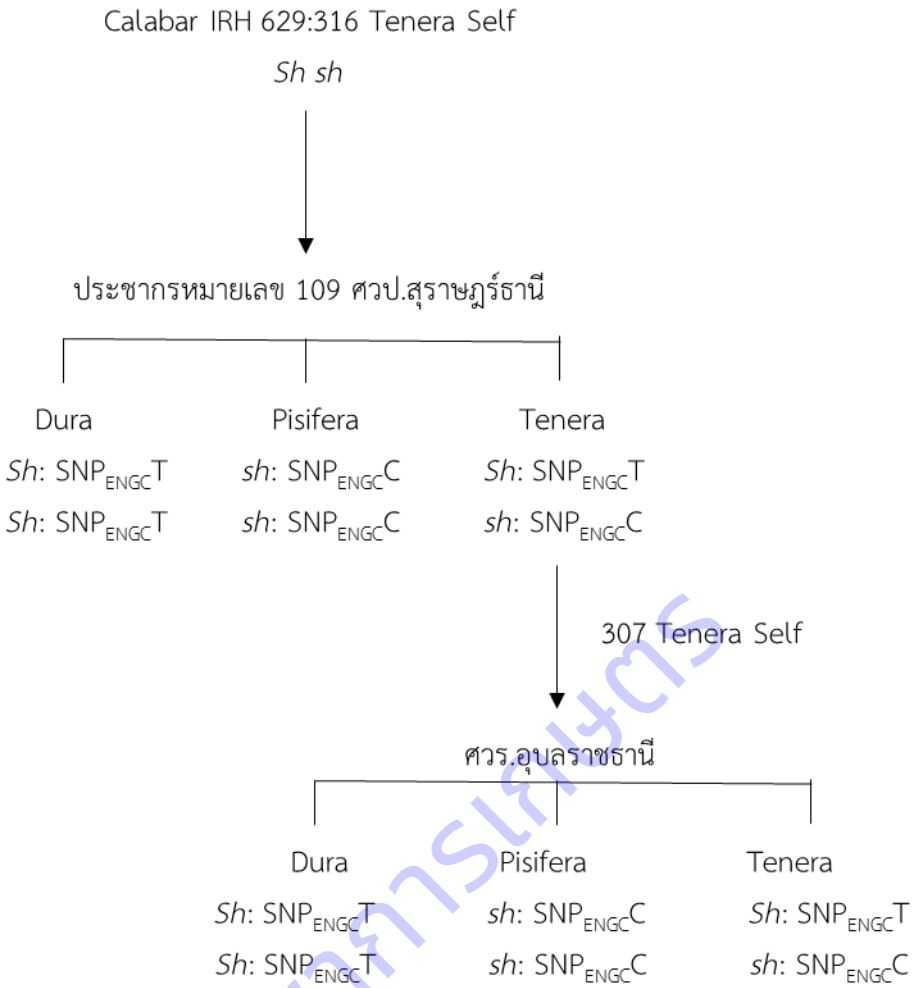
กลุ่มที่ 2 ประชากรปาล์มน้ำมันที่ได้มาจากปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ IRH629 ต้นเทเนอราหมายเลข 316 ผสมตัวเอง ให้ปาล์มน้ำมันรุ่นลูกที่กระจายตัวให้ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ซึ่งปลูกทดสอบที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และดำเนินการคัดเลือกต้นเทเนอราหมายเลข 307 มาผสมตัวเองอีกครั้ง ได้ปาล์มน้ำมันรุ่นลูกที่ได้กระจายตัวให้ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ปลูกทดสอบที่ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี

การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมความหนากะลา

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งสนิปส์ทั้ง 4 ตำแหน่ง บนยีนควบคุมความหนากะลา ได้แก่ ตำแหน่ง SNP_{DA}, SNP_{ENGC} , SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAV} (ตารางผนวก 1) (หทัยรัตน์ และคณะ 2557) ในปาล์มน้ำมันดูราและเทเนอรา เนื่องจากเป็นปาล์มน้ำมันที่แสดงลักษณะสัณฐานกะลาชัดเจน ทั้งนี้ประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มที่ 1 ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี บางส่วนถูกโค่นล้มเพื่อใช้พื้นที่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์รอบที่ 3 คงเหลือเฉพาะต้นพิสิเฟอรา ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงดำเนินการในประชากรปาล์มกลุ่มที่ 2 โดยเก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันดูรา จำนวน 5 ต้น และเทเนอรา จำนวน 5 ต้น มาสกัดดีเอ็นเอ และทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะในแต่ละตำแหน่งสนิปส์ ผลการตรวจสอบพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง SNP_{ENGC} โดยปาล์มน้ำมันดูรา (ยีนควบคุมความหนากะลา: *Sh/Sh*) มีนิวคลีโอไทด์เป็น T ทั้งสองอัลลีล (T/T) และปาล์มน้ำมันเทเนอรา (ยีนควบคุมความหนากะลา: *Sh/sh*) มีนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *Sh* เป็น T และมีนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *sh* เป็น C (T/C) จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบได้ว่าปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา (ยีนควบคุมความหนากะลา: *sh/sh*) ในประชากรกลุ่มนี้มีนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น (C/C) ส่วนนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง SNP_{DA}, SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAV} พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง ปาล์มน้ำมันดูราและเทเนอราในกลุ่มนี้มีนิวคลีโอไทด์ทั้งสองอัลลีลในแต่ละตำแหน่งเหมือนกัน กล่าวคือ ตำแหน่ง SNP_{DA} มีนิวคลีโอไทด์เป็น C/C ตำแหน่ง SNP_{TaYa} มีนิวคลีโอไทด์เป็น A/A และตำแหน่ง SNP_{LaAV} มีนิวคลีโอไทด์เป็น C/C

จากประวัติพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมความหนากะลา สามารถบันทึกประวัติพันธุ์พร้อมทั้งรายละเอียดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} ของปาล์มน้ำมันกลุ่มที่ 1 และ 2 ได้ดังนี้ภาพที่ 1.2-1

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.2-1 ประวัติพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน Calabar ที่มีความเกี่ยวเนื่องกับสายพันธุ์ IRH629 กลุ่มที่ 1 และ 2 และการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} ในแต่ละชั่วรุ่น โดย *Sh* คือ ยีนเด่นควบคุมความหนากะลา *sh* คือ ยีนด้อยควบคุมความหนากะลา

การคัดเลือกต้นพิสิเฟอราด้วยเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์

กลุ่มที่ 1 ปาล์มน้ำมันอายุ 31 ปี ปัจจุบันคงเหลือเฉพาะต้นพ่อพิสิเฟอราที่ใช้ประโยชน์เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันเทเนอราลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเก็บตัวอย่างใบจากต้นดังกล่าว จำนวน 5 ต้น มาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของต้นพ่อพิสิเฟอราที่คัดเลือกไว้ก่อนนี้ด้วยลักษณะสัณฐานกะลา ได้แก่ ต้นหมายเลข 139, 140, 141, 319 และ 408 จากการตรวจสอบพบว่า ปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ต้น มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น C/C มีจีโนไทด์เป็นพิสิเฟอราสอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน (ตารางที่ 1.2-1)

กลุ่มที่ 2 ปาล์มน้ำมันอายุประมาณ 7 ปี เป็นแปลงที่ปลูกเพื่อเพิ่มปริมาณและคัดเลือกต้นพ่อพิสิเฟอราเพื่อการเก็บละอองเกสรมาผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 ปลูกทดสอบ จำนวน 30 ต้น ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี จากการตราจสอบลักษณะสัณฐาน พบว่าเป็นปาล์มน้ำมันดูราและเทเนอราที่แสดงลักษณะรูปร่างผลการติดผล และมีกะลาชัดเจน จำนวน 26 ต้น และเป็นปาล์มน้ำมันที่แสดงลักษณะไม่ชัดเจน กล่าวคือ ติดผลน้อย

กรมวิชาการเกษตร

มาก รูปร่างผลเล็กกลีบ และฝ่อก่อนที่จะเจริญเต็มที่ จำนวน 4 ต้น ได้แก่ ต้นหมายเลข 9, 11, 28 และ 29 จึงเก็บตัวอย่างใบจากปาล์มน้ำมันต้นดังกล่าวมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เพื่อคัดเลือกต้นพ่อพิสิเฟอรา จากการตรวจสอบพบว่า ปาล์มน้ำมันทั้ง 4 ต้น มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น T/T และมีจีโนไทด์เป็นดูรา ดังนั้นจึงไม่พบปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราในแปลงนี้ (ตารางที่ 1.2-1)

ตารางที่ 1.2-1 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} ของปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรากลุ่ม Calabar ที่มีความเกี่ยวเนื่องกับสายพันธุ์ IRH629

ตัวอย่าง	หมายเลขต้น	สัณฐานกะลา	SNP_{ENGC}	จีโนไทด์
กลุ่มที่ 1				
1	139	Pisifera	C/C	Pisifera
2	140	Pisifera	C/C	Pisifera
3	141	Pisifera	C/C	Pisifera
4	319	Pisifera	C/C	Pisifera
5	408	Pisifera	C/C	Pisifera
กลุ่มที่ 2				
1	9	-	T/T	Dura
2	11	-	T/T	Dura
3	28	-	T/T	Dura
4	29	-	T/T	Dura

หมายเหตุ : - คือ ไม่มีผลให้ตรวจสอบ

2. เชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีความเกี่ยวเนื่องกับปาล์มน้ำมัน Calabar สายพันธุ์ IRH629 และปาล์มน้ำมัน AVROS สายพันธุ์ HC129

ประวัติพันธุ์

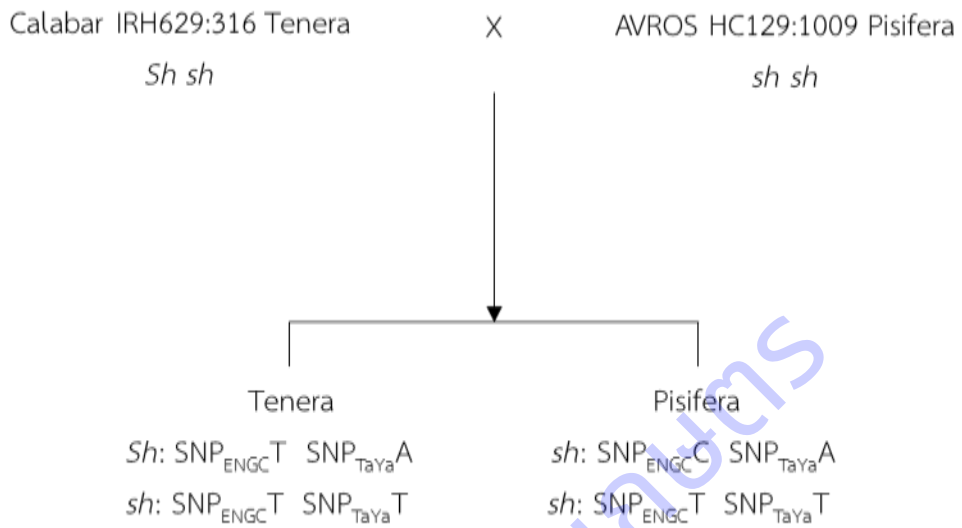
ประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้ได้มาจากปาล์มน้ำมัน Calabar สายพันธุ์ IRH629 ต้นเทเนอรา หมายเลข 316 ผสมข้ามกับปาล์มน้ำมัน AVROS สายพันธุ์ HC129 ต้นพิสิเฟอรา หมายเลข 1009 (คู่ผสมหมายเลข 122) ได้ปาล์มน้ำมันรุ่นลูกกระจายตัวให้เทเนอราและพิสิเฟอรา ปลูกทดสอบปี 2533 ณ ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมความหนากะลา

เนื่องจากปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้มีอายุ 31 ปี ต้นสูงมาก จึงเก็บตัวอย่างใบจากต้นที่ได้รับการตรวจสอบสัณฐานกะลาชัดเจนแล้วจากโครงการปรับปรุงพันธุ์รอบที่ 1 ได้แก่ ต้นพิสิเฟอราจำนวน 1 ต้น และต้นเทเนอรา จำนวน 1 ต้น จากการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมลักษณะความหนากะลาทั้ง 4 ตำแหน่ง พบว่า ต้นพิสิเฟอรา มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ SNP_{ENGC} และ SNP_{TaYa} โดยอัลลีล sh ที่ได้รับจากต้นเทเนอรา IRH629:316 มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น C และ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น A และอัลลีล sh ที่ได้รับจากต้นพิสิเฟอรา HC129:1009 มีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น T และ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น T

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จากประวัติพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมความหนากะลา สามารถบันทึกประวัติพันธุ์พร้อมทั้งรายละเอียดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} และ SNP_{TaYa} ของปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้ได้ดังนี้ภาพที่ 1.2-2



ภาพที่ 1.2-2 ประวัติพันธุ์ของปาล์มน้ำมันที่มีความเกี่ยวเนื่องกับปาล์มน้ำมัน Calabar สายพันธุ์ IRH629 และปาล์มน้ำมัน AVROS สายพันธุ์ HC129 และการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} และ SNP_{TaYa} ในชั่วรุ่นถัดมา โดย *Sh* คือ ยีนเด่นควบคุมความหนากะลา *sh* คือ ยีนด้อยควบคุมความหนากะลา

การคัดเลือกต้นพิสิเฟอราด้วยเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์

ปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้มีอายุ 31 ปี และถูกโค่นล้มต้นเพื่อใช้พื้นที่ทำวิจัยโครงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันรอบที่ 3 คงเหลือไว้เฉพาะต้นที่มีลักษะสัณฐานกะลาเป็นพิสิเฟอราและต้นรายล้อมเท่าที่จำเป็น และเนื่องจากเป็นปาล์มน้ำมันที่ต้นสูงมาก ทำให้การปฏิบัติงานเก็บละอองเกสรทำได้ลำบาก ปัจจุบันต้นที่สามารถปฏิบัติงานได้มีเพียง 9 ต้น ได้แก่ ต้นหมายเลข 27 28 44 51 364 442 467 723 และ 729 จากการเก็บตัวอย่างใบมาสกัดดีเอ็นเอและทำ Real-time ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} และ SNP_{TaYa} ของยีนควบคุมลักษณะความหนากะลา พบว่าปาล์มน้ำมันทั้ง 9 ต้น มีนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} เป็น C/T นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น A/T ดังนั้นปาล์มน้ำมันทั้ง 9 ต้นจึงมีจีโนไทด์เป็นพิสิเฟอราสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานกะลา (ตารางที่ 1.2-2)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.2-2 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} และ SNP_{TaYa} ของปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราที่มีความเกี่ยวข้องกับปาล์มน้ำมัน Calabar สายพันธุ์ IRH629 และปาล์มน้ำมัน AVROS สายพันธุ์ HC129

ตัวอย่าง	หมายเลขต้น	สัณฐานกะลา	SNP_{ENGC}	SNP_{TaYa}	จีโนไทด์
1	27	Pisifera	C/C	A/A	Pisifera
2	28	Pisifera	C/C	A/A	Pisifera
3	44	Pisifera	C/C	A/A	Pisifera
4	51	Pisifera	C/C	A/A	Pisifera
5	364	Pisifera	C/C	A/A	Pisifera
6	442	Pisifera	T/T	A/A	Pisifera
7	467	Pisifera	T/T	A/A	Pisifera
8	723	Pisifera	T/T	A/A	Pisifera
9	729	Pisifera	T/T	A/A	Pisifera

1.3 เชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีความเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ C9023:73 และ HC129:1056

ประวัติพันธุ์

เชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีความเกี่ยวเนื่องกับสายพันธุ์ C9023 และ HC129:1056 ประกอบด้วย 3 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้ได้มาจากปาล์มน้ำมันกลุ่ม Yangambi สายพันธุ์ C9023 ต้นเทเนอราหมายเลข 73 ผสมข้ามกับปาล์มน้ำมันกลุ่ม AVROS สายพันธุ์ HC129 ต้นพิสิเฟอราหมายเลข 1056 (คู่ผสม 132) ได้ปาล์มน้ำมันรุ่นลูกเป็นเทเนอราและพิสิเฟอรา จากนั้นจึงคัดเลือกต้นเทเนอราหมายเลข 1415 มาผสมตัวเอง ได้ปาล์มน้ำมันรุ่นลูกกระจายตัวเป็นดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา ปลูกทดสอบในปี 2546 ปัจจุบันอายุ 18 ปี

กลุ่มที่ 2 ประชากรปาล์มน้ำมันที่ได้มาจากปาล์มน้ำมันกลุ่ม Yangambi ต้นเทเนอราสายพันธุ์ C9023 หมายเลขต้น 73 ผสมตัวเอง (ประชากรหมายเลข 112) ได้ปาล์มน้ำมันรุ่นลูกดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ปลูกทดสอบ ณ ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และคัดเลือกปาล์มน้ำมันเทเนอราหมายเลขต้น 427 จากแปลงทดสอบดังกล่าวมาผสมตัวเองอีกครั้ง ได้ปาล์มน้ำมันรุ่นลูกดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ปลูกทดสอบ ณ ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ปี 2549 ปัจจุบันอายุ 15 ปี

กลุ่มที่ 3 ประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้ได้มาจากปาล์มน้ำมันเทเนอราสายพันธุ์ 132/1415 ผสมข้ามกับปาล์มน้ำมันเทเนอราสายพันธุ์ 112/427 ได้ประชากรรุ่นลูกเป็นดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ปลูกทดสอบ ณ ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ปี 2547 ปัจจุบันอายุ 17 ปี

การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมความหนากะลา

กลุ่มที่ 1 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในปาล์มน้ำมันกลุ่มที่ 1 ดำเนินการในประชากรรุ่นลูกของปาล์มน้ำมันเทเนอรา 132/1415 ผสมตัวเอง โดยเก็บตัวอย่างใบดูรา 10 ต้น และเทเนอรา 10 ต้น มาสกัดดีเอ็นเอและทำ Real-time PCR ด้วยไพรเมอร์และโพรบจำเพาะ ผลการทดลองพบว่าปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้มีการ

กรมวิชาการเกษตร

เปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} โดยดูรามีนิวคลีโอไทด์เป็น T/T สำหรับเทเนอรา ยีน Sh ได้รับการถ่ายทอดมาจากต้นเทเนอราสายพันธุ์ C9023 หมายเลข 73 มีนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น A ยีน sh ซึ่งได้รับการถ่ายทอดมาจากต้นพิสิเฟอราสายพันธุ์ HC129 หมายเลข 1056 มีนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น T ดังนั้นปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราซึ่งมียีน sh ทั้งสองอัลลีลได้รับการถ่ายทอดมาจากต้นพิสิเฟอราสายพันธุ์ HC129 หมายเลข 1056 มีนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น T/T แม้ประชากรในปาล์มน้ำมันกลุ่มที่ 1 มีประวัติพันธุ์มาจากการผสมข้ามกลุ่มและประชากรรุ่นลูกของสายพันธุ์ 132/1415 ได้รับการถ่ายทอดยีนควบคุมลักษณะกะลามาจากปาล์มน้ำมันต่างกลุ่ม คือ Yangambi และ AVROS แต่เนื่องจากปาล์มน้ำมันทั้ง 2 กลุ่มนี้มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งเดียวกัน คือ SNP_{TaYa} ทำให้การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในประชากรรุ่นลูกของสายพันธุ์ 132/1415 เกิดขึ้นเพียงตำแหน่งเดียว

กลุ่มที่ 2 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ตำแหน่ง บนยีนควบคุมความหนากะลา ดำเนินการในปาล์มน้ำมันกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นประชากรรุ่นลูกของปาล์มน้ำมันเทเนอรา 112/427 ผสมตัวเอง โดยเก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันดูราจำนวน 10 ต้น และเทเนอรา จำนวน 10 ต้น มาสกัดดีเอ็นเอ และทำ Real-time PCR ผลการตรวจสอบพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง SNP_{TaYa} โดยปาล์มน้ำมันดูรามีนิวคลีโอไทด์เป็น A/A และปาล์มน้ำมันเทเนอรามีนิวคลีโอไทด์เป็น A/T ดังนั้นปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราจึงมีนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น T/T

กลุ่มที่ 3 เก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันดูรา 9 ต้น และเทเนอรา 9 ต้น จากประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มที่ 3 มาทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ตำแหน่ง โดยการสกัดดีเอ็นเอและทำ Real-time PCR บนยีนควบคุมความหนากะลา ผลการทดลองพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง SNP_{TaYa} โดยปาล์มน้ำมันดูรามีนิวคลีโอไทด์เป็น A/A และปาล์มน้ำมันเทเนอรามีนิวคลีโอไทด์เป็น A/T ดังนั้นปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราจึงมีนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น T/T จากประวัติพันธุ์ การถ่ายทอดยีนควบคุมความหนากะลาของประชากรเทเนอราในปาล์มน้ำมันกลุ่มที่ 3 นี้ มีการกระจายตัว 2 แบบ คือ เทเนอราที่มียีน *sh* ถ่ายทอดมาจากปาล์มน้ำมันกลุ่ม Yangambi และเทเนอราที่มียีน *sh* ถ่ายทอดมาจากปาล์มน้ำมันกลุ่ม AVROS อย่างไรก็ตามเนื่องจากปาล์มน้ำมันกลุ่ม Yangambi และ AVROS มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมความหนากะลาที่ตำแหน่งเดียวกัน ทำให้เครื่องหมายกุลสนิปส์ตำแหน่ง SNP_{TaYa} ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเทเนอราทั้ง 2 แบบนี้ได้ แต่ยังสามารถแยกความแตกต่างของดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอราภายในกลุ่มนี้ได้

จากประวัติพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมความหนากะลา สามารถบันทึกประวัติพันธุ์พร้อมทั้งรายละเอียดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} ของปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้ได้ดังนี้ภาพที่ 1.2-3

การคัดเลือกต้นพิสิเฟอราด้วยเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์

กลุ่มที่ 1 ประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มที่ 1 มีทั้งหมด 192 ต้น จากการตรวจสอบลักษณะความหนากะลาพบดูรา 47 ต้น พิสิเฟอรา 38 ต้น เทเนอรา 97 ต้น และต้นที่ไม่ชัดเจนเนื่องจากมักฝ่อตั้งแต่ผลยังไม่โตเต็มที่หรือออกดอกตัวผู้เป็นส่วนใหญ่ 10 ต้น จากการบันทึกและสังเกตการเจริญเติบโต ความอุดมสมบูรณ์ของต้น ลักษณะผิดปกติบางลักษณะ และอาการขาดธาตุอาหาร พบว่าต้นพิสิเฟอราที่เจริญเติบโตทางลำต้นสมบูรณ์และผ่านเกณฑ์

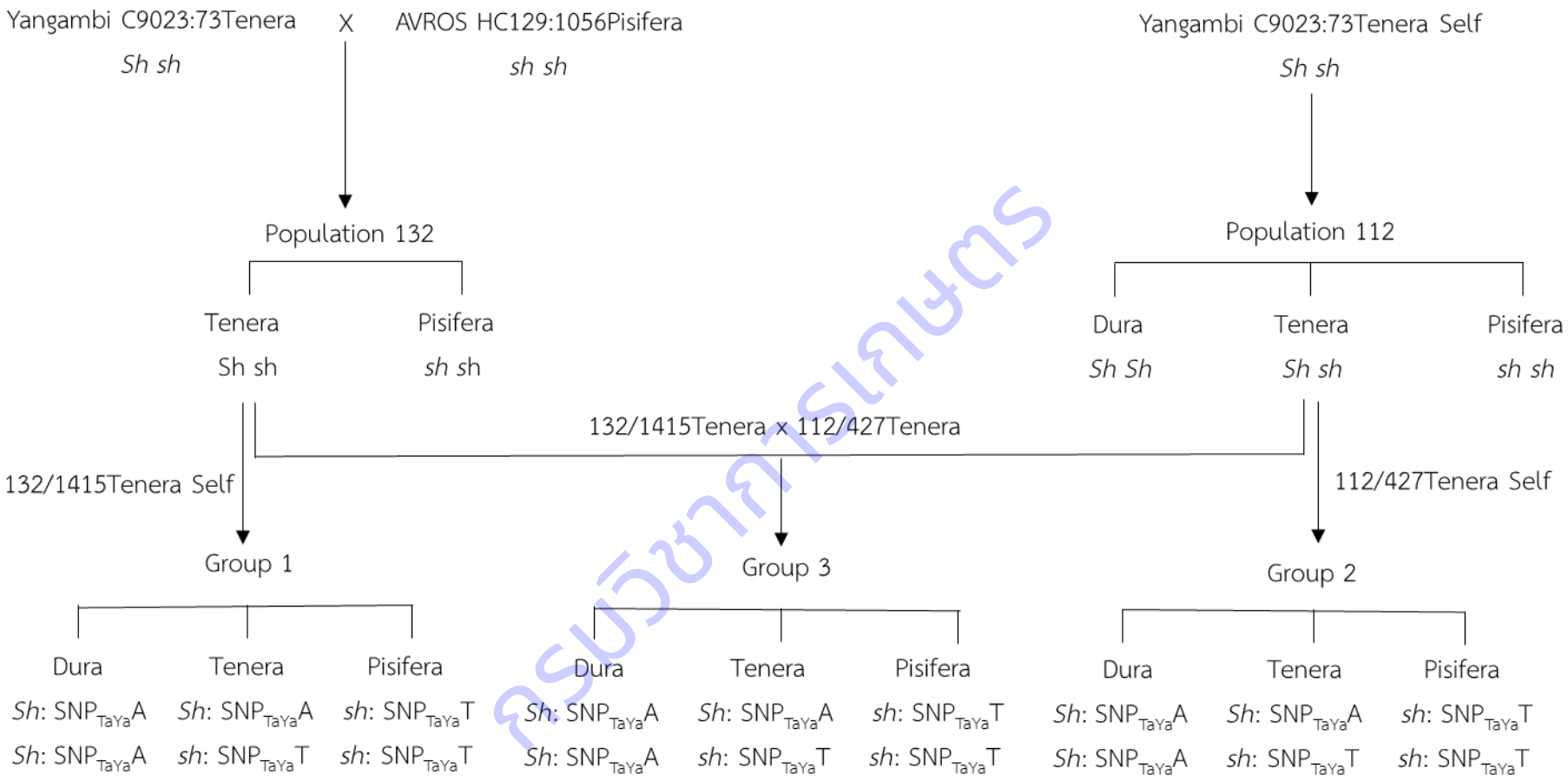
ศูนย์วิทยทรัพยากร

มาตรฐานมีทั้งหมด 17 ต้น ได้แก่ ต้นหมายเลข 573 585 587 592 593 601 621 650 668 669 677 690 699 717 735 738 และ 742 ดังนั้นจึงการเก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันต้นพิสิเฟอรา 17 ต้นดังกล่าวมาสกัดดีเอ็นเอและทำ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} จากการตรวจสอบพบว่าปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราทั้ง 17 ต้น มีจีโนไทด์เป็นพิสิเฟอรา โดยมีนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น T/T สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานกะลา (ตารางที่1.2-3)

กลุ่มที่ 2 ประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้มีทั้งหมด 100 ต้น จากการตรวจสอบลักษณะความหนากะลา พบว่ามีปาล์มน้ำมันดูรา 30 ต้น พิสิเฟอรา 18 ต้น เทเนอรา 45 ต้น และต้นที่ไม่ชัดเจนเนื่องจากมักฝ่อตั้งแต่ผลยังไม่โตเต็มที่หรือออกดอกตัวผู้เป็นส่วนใหญ่ 7 ต้น เก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา 18 ต้นมาสกัดดีเอ็นเอและทำ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{TaYa} ผลการตรวจสอบพบว่าสามารถคัดเลือกต้นพิสิเฟอราได้ 17 ต้น ที่มีจีโนไทด์เป็นพิสิเฟอราสอดคล้องกับลักษณะความหนากะลา โดยปาล์มน้ำมันทั้ง 17 ต้นมีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น T/T ได้แก่ หมายเลข 224 227 244 251 255 256 258 262 268 275 283 293 295 305 310 312 และ 313 และมีปาล์มน้ำมัน 1 ต้น ที่ตัวอย่างเอ็นเอแสดงจีโนไทด์เป็นเทเนอราไม่สอดคล้องกับลักษณะกะลา คือ หมายเลข 238

กลุ่มที่ 3 ประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้มีทั้งหมด 80 ต้น จากการตรวจสอบลักษณะความหนากะลา พบว่ามีปาล์มน้ำมันดูรา 16 ต้น พิสิเฟอรา 18 ต้น เทเนอรา 46 ต้น จากการบันทึกและสังเกตการเจริญเติบโต ความอุดมสมบูรณ์ของต้น ลักษณะผิดปกติบางลักษณะ และอาการขาดธาตุอาหาร พบว่าต้นพิสิเฟอราที่เจริญเติบโตทางลำต้นสมบูรณ์และผ่านเกณฑ์มาตรฐานมีทั้งหมด 5 ต้น ได้แก่ ต้นหมายเลข 165 202 287 541 และ 875 จากการเก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราทั้ง 5 ต้น มาสกัดดีเอ็นเอและทำ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{TaYa} พบว่า ปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราทั้ง 4 ต้น จีโนไทด์เป็นพิสิเฟอราสอดคล้องกับลักษณะความหนากะลา โดยมีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง SNP_{TaYa} เป็น T/T (ตารางที่1.2-3)

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.2-3 ประวัติพันธุ์ของปาล์มน้ำมันที่มีความเกี่ยวเนื่องกับปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ C9023:73 และ HC129:1056 และการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} ในแต่ละชั่วรุ่น โดย *Sh* คือ ยีนเด่นควบคุมความหนากะลา *sh* คือ ยีนด้อยควบคุมความหนากะลา

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.2-3 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa} ของปาล์มน้ำมันพิสิเฟอราที่มีความเกี่ยวข้องกับปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ C9023:73 และ HC129:1056

ตัวอย่าง	หมายเลขต้น	สัณฐานกะลา	SNP_{TaYa}	จีโนไทด์
กลุ่มที่ 1				
1	573	Pisifera	T/T	Pisifera
2	585	Pisifera	T/T	Pisifera
3	587	Pisifera	T/T	Tenera
4	592	Pisifera	T/T	Pisifera
5	593	Pisifera	T/T	Pisifera
6	601	Pisifera	T/T	Pisifera
7	621	Pisifera	T/T	Pisifera
8	650	Pisifera	T/T	Pisifera
9	668	Pisifera	T/T	Pisifera
10	669	Pisifera	T/T	Pisifera
11	677	Pisifera	T/T	Pisifera
12	690	Pisifera	T/T	Pisifera
13	699	Pisifera	T/T	Pisifera
14	717	Pisifera	T/T	Pisifera
15	735	Pisifera	T/T	Pisifera
16	738	Pisifera	T/T	Pisifera
17	742	Pisifera	T/T	Pisifera
กลุ่มที่ 2				
1	224	Pisifera	T/T	Pisifera
2	227	Pisifera	T/T	Pisifera
3	244	Pisifera	T/T	Tenera
4	251	Pisifera	T/T	Pisifera
5	255	Pisifera	T/T	Pisifera
6	256	Pisifera	T/T	Pisifera
7	258	Pisifera	T/T	Pisifera
8	262	Pisifera	T/T	Pisifera
9	268	Pisifera	T/T	Pisifera
10	275	Pisifera	T/T	Pisifera
11	283	Pisifera	T/T	Pisifera
12	293	Pisifera	T/T	Pisifera
13	295	Pisifera	T/T	Pisifera
14	305	Pisifera	T/T	Pisifera
15	310	Pisifera	T/T	Pisifera
16	312	Pisifera	T/T	Pisifera
17	313	Pisifera	T/T	Pisifera
กลุ่มที่ 3				
1	165	Pisifera	T/T	Pisifera
2	202	Pisifera	T/T	Pisifera
3	287	Pisifera	T/T	Pisifera

กรมวิชาการเกษตร

4	541	Pisifera	T/T	Pisifera
5	875	Pisifera	T/T	Pisifera

การทดลอง 1.3 การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะสีผลแบบ Virescens ในปาล์มน้ำมัน

การออกแบบและทดสอบไพรเมอร์

จากการสืบค้นข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมลักษณะสีผลแบบ virescens ในปาล์มน้ำมันจากงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่เป็นข้อมูลสาธารณะ NCBI พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องคือ R2R3-MYB จากข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าว ในเบื้องต้นจึงได้สังเคราะห์ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คือ

ไพรเมอร์คู่ที่ 1: F1 5’-GTATTAGTAACAAGAGCAACTC-3’

R1 5’-TGGATATATAATGAACGATCTTC-3’

ไพรเมอร์คู่ที่ 2: F2 5’-GCGTACGTGGAACCACAA-3’

R2 5’-CTCCATTCTGGTGAGAAAGCGT-3’

ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 คือ F1 5’-GTATTAGTAACAAGAGCAACTC-3’ และ R1 5’-TGGATATATAATGAACGATCTTC-3’ มีองค์ประกอบสารเคมี คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 50 ng/µl ไพรเมอร์เข้มข้น 0.5 µmol บัฟเฟอร์เข้มข้น 1 เท่า ดีออกซีนิวคลีโอไทด์เข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิโมลาร์ เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เข้มข้น 1 ยูนิต ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

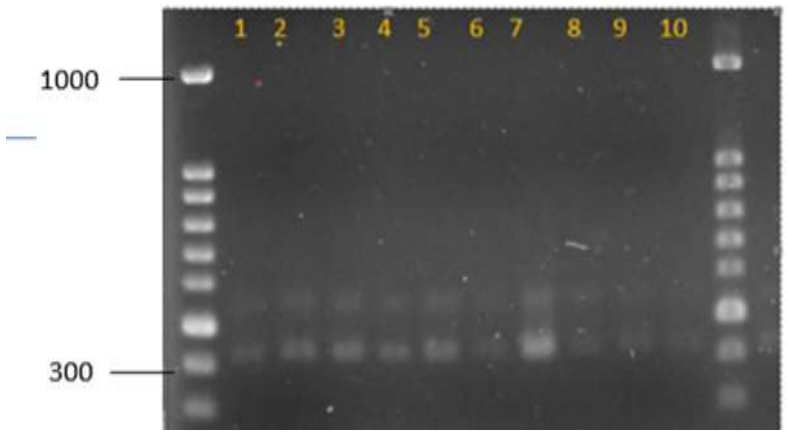
อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อีก 1 รอบ

ผลจากการทดลองพบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ยังไม่ชัดเจนและมีมากกว่าหนึ่งแถบ (ภาพที่ 1.3-1) ทั้งนี้อาจเนื่องจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ยังไม่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะ

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.3-1 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ด้วยไพรเมอร์ F1 5’-GTATTAGTAACAAGAGCAACTC 3’ และ R1 5’-TGGATATATAATGAACGATCTTC- 3’ ร่วมกับใช้อุณหภูมิขั้นตอนในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (lane 1-10)

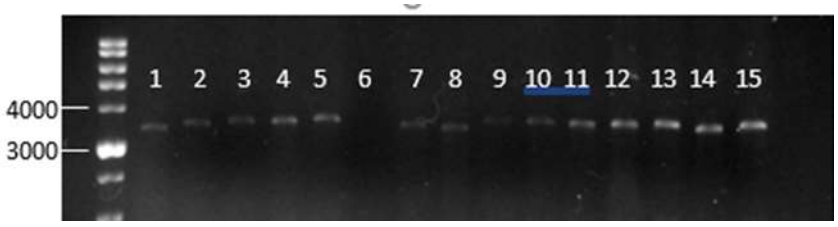
ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 คือ F2 5’- GCGTACGTGGAACCACAA -3’ และ R2 5’-CTCCATTCTGGTGAGAAAGCGT-3’ มีองค์ประกอบสารเคมี คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 50 ng/µl ไพรเมอร์เข้มข้น 0.5 µmol บัฟเฟอร์เข้มข้น 1 เท่า ดีออกซีนิวคลีโอไทด์เข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิโมลาร์ เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เข้มข้น 1 ยูนิต ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

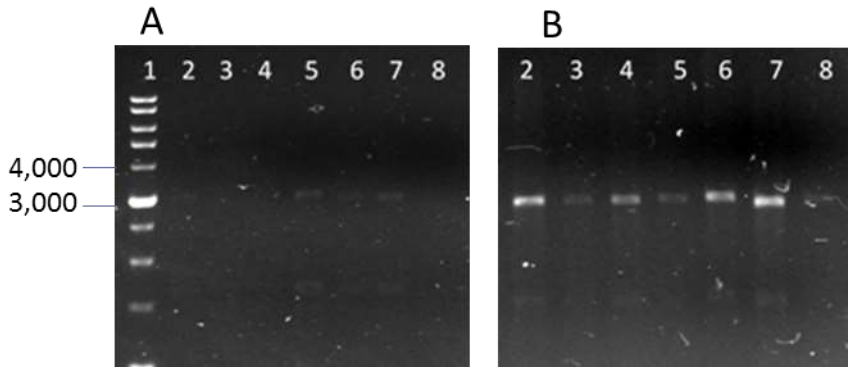
ทำซ้ำจำนวน 25 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อีก 1 รอบ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนเป้าหมายได้ (ภาพที่ 1.3-2)



ภาพที่ 1.3-2 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ F2 5'-GCGTACGTGGAACCACAA-3' และ R2 5'- CTCCATTCTGGTGAGAAAGCGT-3' โดยใช้อุณหภูมิขั้นตอนในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (lane 1-15)

ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 คือ F2 5'- GCGTACGTGGAACCACAA -3' และ R2 5'-CTCCATTCTGGTGAGAAAGCGT-3' โดยลดอุณหภูมิในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเป็น 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ผลการทดลองพบว่ายังให้แถบดีเอ้นเอไม่ชัดเจน (ภาพที่ 1.3-3A) และเมื่อเทียบกับการใช้อุณหภูมิ 62 เป็นเวลา 30 วินาที (ภาพที่ 1.3-3B) พบว่าการใช้อุณหภูมิ 62 เป็นเวลา 30 วินาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมมากกว่า

กรมวิชาการเกษตร

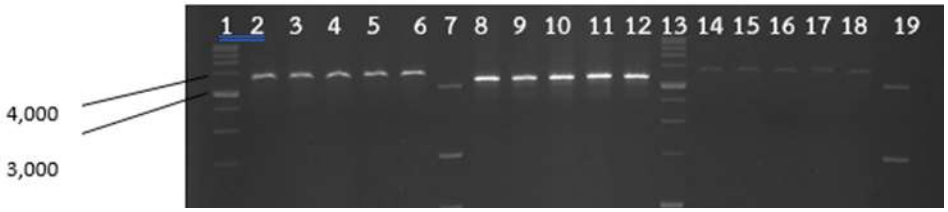


ภาพที่ 1.3-3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ F2 5'-GCGTACGTGGAACCACAA-3' และ R2 5'- CTCCATTCTGGTGAGAAAGCGT-3' โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส (lane 2-8) (รูป A) และ 62 องศาเซลเซียส (lane 2-8) (รูป B) เป็นเวลา 30 วินาที

อย่างไรก็ตามได้ทดสอบเพิ่มเติมโดยปรับเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเป็น 64 เป็นเวลา 30 วินาที โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ
อุณหภูมิ 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

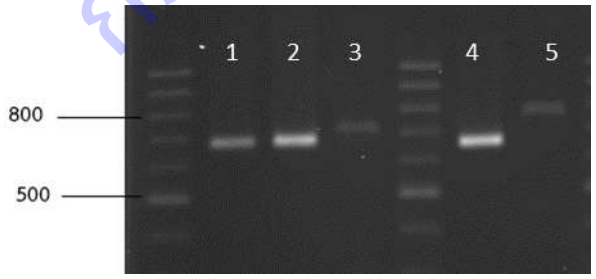
ผลการทดลองพบว่า แถบดีเอ็นที่ได้จากปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 ซึ่งมีผลดิบสีเขียวสุกสีส้ม (lane ที่ 2-6) ส่วน lane ที่ 8-12 เป็นแถบดีเอ็นที่ได้จากปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ผลดิบสีเขียวสุกสีส้ม และ lane ที่ 14-18 เป็นแถบดีเอ็นที่ได้จากปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 อยู่ในช่วง 3-4 Kb แต่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรได้ชัดเจน (ภาพที่ 1.3-4)



ภาพที่ 1.3-4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ F2 5'-GCGTACGTGGAACCACAA-3' และ R2 5'- CTCCATTCTGGTGAGAAAGCGT-3' ร่วมกับใช้อุณหภูมิขั้นตอนใน

การจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 64 องศาเซลเซียส 30 วินาที ปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 (lane 2-6) ปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 (lane 8-12) ปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 (lane 14-18)

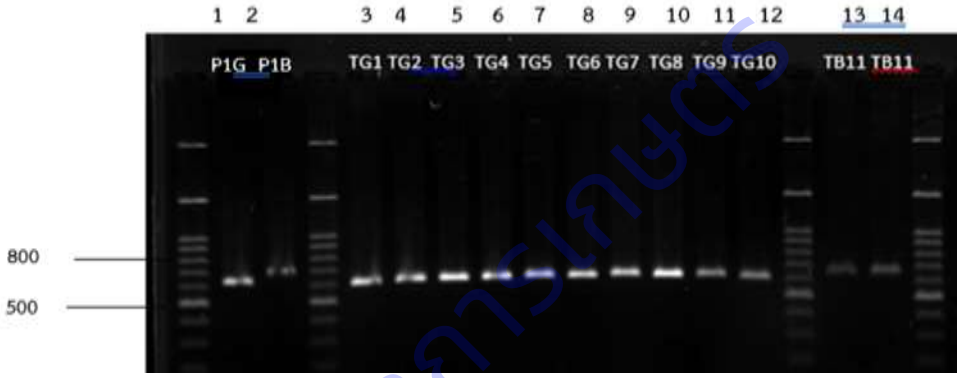
ทำการสังเคราะห์และทดสอบไพรเมอร์เพิ่มเติม คือ F3 5'-TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA-3' และ R3 5'-AAAGCGTGCTTCCTTCATGT-3' โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อีก 1 รอบ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ โดยสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันได้ (ภาพที่ 5) lane ที่ 1 และ 2 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1 ผลดิบสีเขียวสุกสีส้ม ขนาดดีเอ็นเอ 650-700 bp lane ที่ 4 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 7 ขนาดดีเอ็นเอ 650-700 bp ผลดิบสีเขียวสุกสีส้ม และ lane ที่ 3 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1 ผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดง lane ที่ 5 เป็นกลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 7 ผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดง ขนาดดีเอ็นเอ 750-800 bp (ภาพที่ 1.3-5)



ภาพที่ 1.3-5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ด้วยไพรเมอร์ F3 5'TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA3' และ R3 5' AAAGCGTGCTTCCTTCATGT3' ร่วมกับใช้อุณหภูมิขั้นตอนในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 64 องศาเซลเซียส 30 วินาที

กรมวิชาการเกษตร

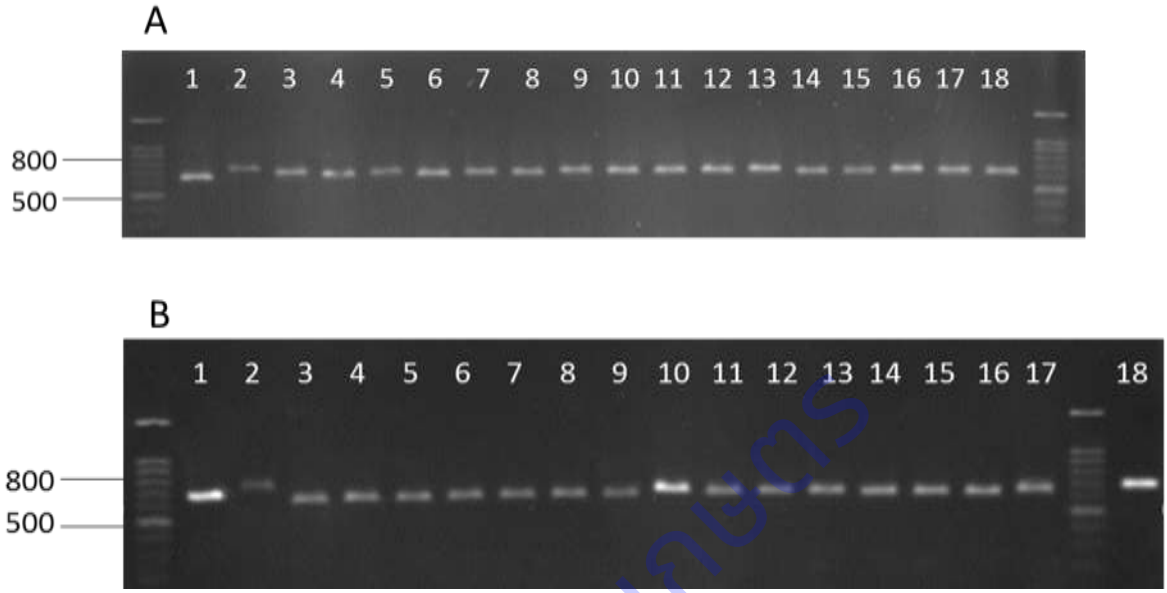
จากการทดสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์คู่ที่ 3 ในการแยกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้ม และปาล์มน้ำมันผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดง พบว่า ปาล์มน้ำมันต้นพ่อพันธุ์ของลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 ผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้ม (lane 1) มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 650-700 ปาล์มน้ำมันต้นพ่อพันธุ์ของสุราษฎร์ธานี 1 ผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดง (lane 2) มีมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750-800 bp ปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 ผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้ม (lane 3-12) มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 650-700 bp และปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 ผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดง (lane13-14) พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750-800 bp (ภาพที่ 1.3-6)



ภาพที่ 1.3-6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ด้วยไพรเมอร์ F3 5’TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA3’ และ R3 5’ AAAGCGTGCTTCCTTCATGT3’ ร่วมกับใช้อุณหภูมิขั้นตอนในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 64 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที lane ที่ 1 และ 2 เป็นกลุ่มประชากรพ่อพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1 ผลสีเขียวและดำ ตามลำดับ lane ที่ 3-12 กลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎ์ธานี 1 ลูกเขียว lane ที่ 13-14 เป็นกลุ่มกลุ่มประชากรปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎ์ธานี 1 ผลสีดำ

จากการทดสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์คู่ที่ 3 เพิ่มเติม พบว่าปาล์มน้ำมันต้นพ่อพันธุ์ของลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 ผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้ม (ภาพที่ 1.3-7A และ B lane 1) และปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 ผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มและผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดง (ภาพที่ 1.3-7A และ B lane 3 -18) ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 650 -700 bp ส่วนปาล์มน้ำมันต้นพ่อพันธุ์ของลูกผสมสุ

ราษฎร์ธานี 1ผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดงให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 -800 bp (ภาพที่ 1.3-7A และ B lane 2)



ภาพที่ 1.3-7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ F3 5'-TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA-3' และ R3 5'- AAAGCGTGCTTCCTTCATGT-3' ใช้อุณหภูมิขั้นตอนในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 64 องศาเซลเซียส 30 วินาที โดยปาล์มน้ำมันต้นพ่อพันธุ์ของลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 ผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้ม (A และ B lane 1) ปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 ผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มและผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดง (A และ B lane 3 -18) ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 650 -700 bp ส่วนปาล์มน้ำมันต้นพ่อพันธุ์ของลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1ผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดงให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 -800 bp (และ B lane 2)

การหาลำดับเบส (DNA sequencing)

เมื่อตรวจสอบลำดับเบสส่วนที่ขนาบด้วยไพรเมอร์ F3 5'-TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA-3' และ R3 5'- AAAGCGTGCTTCCTTCATGT-3' พบว่ามีสนิป single nucleotide polymorphisms (SNPs) 1 ตำแหน่ง ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มและปาล์มน้ำมันผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดงได้ โดยปาล์มน้ำมันผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดงมีเบส

กรมวิชาการเกษตร

T (ภาพที่ 1.3-8 ตัวอย่างลำดับที่ 1-5) และปาล์มน้ำมันผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มมีเบส A (ภาพที่ 1.3-8 ตัวอย่างลำดับที่ 6-10)

ภาพที่ 1.3-8 การทำ multiple sequence alignment เปรียบเทียบลำดับเบสปาล์มน้ำมันผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดงมีเบส T (ตัวอย่างลำดับที่ 1-5) และปาล์มน้ำมันผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มมีเบส A (ตัวอย่างลำดับที่ 6-10)

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

การทดลอง 1.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมที่มีศักยภาพการให้ผลผลิตสูง

1. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนปาล์มน้ำมัน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตร MS ได้ดีกว่าสูตร N6 และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีกว่า Picloram โดยสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดแคลลัสดีที่สุด คิดเป็น 59.2 เปอร์เซ็นต์

2. สามารถชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม Dicamba เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 60.0 เปอร์เซ็นต์

3. สามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล sorbitol 0.2 โมลาร์ คิดเป็น 60.0 เปอร์เซ็นต์

4. จากการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ได้ ซึ่งยังอยู่ในระยะที่กำลังพัฒนาอาจจำเป็นต้องใช้ระยะเวลามากกว่านี้หรือมีการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมกับชนิดและชิ้นส่วนของปาล์มน้ำมันต่อไป

การทดลอง 1.2 การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันในระดับดีเอ็นเอ การเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งสำคัญบนยีนควบคุมความหนากะลาและการคัดเลือกต้นพ่อพิสิเฟอรา

1. เชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีความเกี่ยวเนื่องกับปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ IRH629 มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมความหนากะลาที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC}

2. เชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีความเกี่ยวเนื่องกับปาล์มน้ำมั สายพันธุ์ IRH629 และปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ HC129 มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมความหนากะลาที่ตำแหน่ง SNP_{ENGC} และ SNP_{TaYa}

3. เชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีความเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ C9023:73 และ HC129:1056 มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บนยีนควบคุมความหนากะลาที่ตำแหน่ง SNP_{TaYa}

4. การคัดเลือกต้นพิสิเฟอราในระดับดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ ทำให้สามารถคัดเลือกต้นพิสิเฟอราที่แสดงลักษณะกะลาสอดคล้องกับจีโนไทด์ของยีนควบคุมความหนากะลา เพิ่มความถูกต้องเที่ยงตรง และช่วยให้การผลิตลูกผสมเทเนอรามีประสิทธิภาพมากขึ้น

การทดลอง 1.3 การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะสีผลแบบ Virescens ในปาล์มน้ำมัน

1. สามารถแยกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มและปาล์มน้ำมันผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดง ด้วยไพรเมอร์ F3 5’-TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA-3’ และ R3 5’-

กรมวิชาการเกษตร

AAAGCGTGCTTCCTTCATGT-3’ โดยปาล์มน้ำมันผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 650 -700 bp ส่วนปาล์มน้ำมันผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดงมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700-800 bp ชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว

2. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ขนาบด้วยไพรเมอร์ F3 5’-TTAATTGCAGGTAGGCTTCCA-3’ และ R3 5’ -AAAGCGTGCTTCCTTCATGT-3’ มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างและปาล์มน้ำมันผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดงได้ โดยปาล์มน้ำมันผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มมีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งดังกล่าวเป็น A ส่วนปาล์มน้ำมันผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดงมีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งดังกล่าวเป็น T

3. การแยกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้มและปาล์มน้ำมันผลดิบสีดำผลสุกสีดำแดง จะมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันผลดิบสีเขียวผลสุกสีส้ม อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันผลความใช้ได้ของไพรเมอร์คู่และตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว จึงควรศึกษาเพิ่มเติมด้วยจำนวนตัวอย่างที่มากพอ

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

บรรณานุกรม

กษิดิศ ดิษฐบรรจง ชยานิจ ดิษฐบรรจง สุรกิตติ ศรีกุล อรรัตน์ วงศ์ศรี และภุมรินทร์ วนิชชนานันท์. 2556. การเกิด somatic embryogenesis และ organogenesis ในปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา. การจัดประชุมสัมมนาวิชาการปาล์มน้ำมันประจำปี 2555 วันที่ 12-13 มีนาคม 2556 ณ. โกลเด้น ไพน์ บีช รีสอร์ท ปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์.

ชยานิจ ดิษฐบรรจง กษิดิศ ดิษฐบรรจง ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ อรรัตน์ วงศ์ศรี และ อรุณี ใจเถิง. 2552. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน *ใน* เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 : สาขาพืช วันที่ 17-20 มีนาคม 2552 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 641 หน้า

เตือนจิตร เพ็ชรรุณ อรรัตน์ วงศ์ศรี สุวิมล กลศึก กษิดิศ ดิษฐบรรจง ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ และ ชยานิจ ดิษฐบรรจง. 2558. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามสปีชีส์ (*Elaeis guineensis* X *E. oleifera*). รายงานผลงานวิจัยปี 2553-2558. ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี. 632 หน้า,

ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ ชยานิจ ดิษฐบรรจง กษิดิศ ดิษฐบรรจง เตือนจิตร เพ็ชรรุณ และอรรัตน์ วงศ์ศรี. 2558. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินต่อการชักนำการเกิดและการพัฒนาแคลลัสปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. รายงานผลงานวิจัยปี 2553-2558. ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี. 632 หน้า,

ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์, เตือนจิตร เพ็ชรรุณ และ นัยเนตร ทานากะ เจริญสันติ. 2560. การศึกษาเทคนิคและปัจจัยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน *ใน* รายงานโครงการวิจัยการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 59-84.

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

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

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

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

Te-chato, S. 1998. Callus induction from cultured zygotic embryo of oil palm subsequent to plantlet regeneration. Songklanakarin J. Sci. Tech. 20:1-6.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Teixeira, J. B., Sondahi, M. R., Nakamura, T. and Kirby, E. G. 1994. Establishment of oil palm cell suspension culture and plant regeneration. Plant cell Tissue and Organ Culture. 45:159-164.

Rival, A., Beule, T., Barre, P., Hamon, S., Duval, Y., and Noirot, M. (1997). Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Rep.* 16, 884–887.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

กิจกรรมที่ 1 วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ตารางผนวกที่ 1 ตำแหน่งสนิปส์ (SNPs) ที่ใช้ตรวจชนิดของพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน 5 ตำแหน่ง โดยสรุป จากข้อมูลการอ่านลำดับพันธุกรรมของยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมัน 10 กลุ่มพันธุ์ จำนวน 129 ตัว อย่างพันธุ์

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	This study
	Pisifera	3	G	G	T	A	C	
	Tenera	3	G	**C/G**	T	A	C	
Ekona	Dura	3	G	C	T	A	C	This study
	Pisifera	3	G	C	C	A	C	
	Tenera	4	G	C	**T/C**	A	C	
Ghana	Dura	4	G	C	T	A	C	This study
	Pisifera	4	G	C	C	A	C	
	Tenera	3	G	C	**T/C**	A	C	
La Me	Dura	13	G	C	T	A	C	This study
	Pisifera	13	G	C	T	A	A	
	Tenera	11	G	C	T	A	**C/A**	
Nigeria	Dura	3	G	C	T	A	C	Singh *et al.* 2013
	Pisifera	3	G	C	C	A	C	
	Tenera	3	G	C	**T/C**	A	C	
Tansania	Dura	4	C	C	T	A	C	1.Singh *et al.* 2013 2. This
	Pisifera	4	G	C	T	T	C	
	Tenera	4	**C/G**[2]	C	T	**A/T**[1]	C	
Yangambi	Dura	3	G	C	T	A	C	This study
	Pisifera	3	G	C	T	T	C	
	Tenera	2	G	C	T	**A/T**	C	
AVROS	Dura	4	G	C	T	A	C	This study
	Pisifera	4	G	C	T	A	A	
	Tenera	4	G	C	T	A	**C/A**	
Calabar	Dura	5	G	C	T	A	C	This study
	Pisifera	5	G	C	C	A	C	
	Tenera	5	G	C	**T/C**	A	C	

กรมวิชาการเกษตร

หมายเหตุ : ที่มา หทัยรัตน์ และคณะ (2557)

กรมวิชาการเกษตร