

การค้นหาลำดับของสารพันธุกรรม ยีน ที่ควบคุมความหอม  
ของมะพร้าว น้ำหอมและมะพร้าว น้ำหอมกะทิ

Genetic of Aromatic Gene in Aromatic Coconut

วีรา คล้ายพุก<sup>1/</sup> ปริญา หรุ่นหิม<sup>2/</sup> วิไลวรรณ ทวีศรี<sup>1/</sup> ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล<sup>3/</sup> ทิพย์ ไกรทอง<sup>2/</sup>  
และสมชาย วัฒนโยธิน<sup>1/</sup>

คำสำคัญ: 2-Acetyl-1-pyrroline กลิ่นมะพร้าว น้ำหอม Aromarker

บทคัดย่อ

ในการสกัดดีเอ็นเอมะพร้าว น้ำหอม Reaction mix ที่เหมาะสมคือ H<sub>2</sub>O ๗.๖ µl, ๑๐X buffer ๑.๕ µl, ๒.๕ mM dNTP mix ๑.๒ µl, ๒๕ mM MgCl<sub>2</sub> ๐.๙ µl, ๑๐ µM F๑ Primer ๐.๓µl, ๑๐ µM R๑ Primer ๐.๓ µl, Taq polymerase ๐.๒ µl ดีเอ็นเอต้นแบบ ๓ µl และ Condition PCR ที่เหมาะสมคือ Pre denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที จำนวน 35 รอบ Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ Long Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดย Aromarker มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนในข้าวหอมมะลิ แต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับมะพร้าว น้ำหอมและใบเตย

---

<sup>1/</sup> สถาบันวิจัยพืชสวน

<sup>2/</sup> ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

<sup>3/</sup> ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

## Genetic of Aromatic Gene in Aromatic Coconut

Veera Klaipuk<sup>1/</sup> Parinda Hrunheem<sup>2/</sup> Wilaiwan Twishsri<sup>1/</sup> Suchirat Sakuanrungrsirikul<sup>3/</sup>  
Tippaya Kraitong<sup>2/</sup> and Somchai Watanayothin<sup>1/</sup>

Keywords: 2-Acetyl-1-pyrroline, coconut aroma, Aromarker

### Abstract

This study experimentally tests the hypothesis that aromatic gene in aromatic coconut can use the same primer of Fragrant Rice because aroma impact compound; 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP) in aromatic coconut, Fragrant pandan and fragrant rice were same. We found that the suitable Reaction mix for extract aromatic coconut DNA was H<sub>2</sub>O ๗.๖ µl, ๑๐X buffer ๑.๕ µl, ๒.๕ mM dNTP mix ๑.๒ µl, ๒๕ mM MgCl<sub>๒</sub> ๐.๙ µl, ๑๐ µM F๑ Primer ๐.๓µl, ๑๐ µM R๑ Primer ๐.๓ µl, *Taq* polymerase ๐.๒ µl and DNA template ๓ µl. And the suitable condition PCR was Pre denaturation at 94°C, 5 min, 1 time. Denaturation at 94 °C, 40 sec, 35 times. Annealing at 50 °C, 1 min, 35 times. Extension at 72 °C, 1 min, 35 times. And Long Extension at 72 °C, 10 min. And Aromarker was specific in Fragrant Rice.

---

<sup>1/</sup> Horticulture Research Institute

<sup>2/</sup> Chumphon Horticultural Research Center

<sup>3/</sup> Khon Kaen Field Crops Research Center

## คำนำ

มะพร้าวน้ำหอม (aromatic coconut) (*Cocos nucifera* Linn.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีมูลค่าส่งออกหลายร้อยล้านบาทต่อปี เป็นมะพร้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย โดยกลายมาจากพันธุ์หมูสีเขียว พบครั้งแรกที่ อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม (จุลพันธุ์ และคณะ, 2550; วิไลวรรณ, 2558) สารประกอบสำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นในมะพร้าวน้ำหอม คือ 2-Acetyl-1-pyrroline หรือ 2AP ซึ่งเป็นสารประกอบตัวเดียวกับกับสารที่ทำให้เกิดกลิ่นในใบเตย และข้าวหอมมะลิ (นริศฯ, 2553; ศูนย์สื่อสารวิทยาศาสตร์ไทย, 2552) สาร 2AP ในข้าว พบว่าถูกควบคุมด้วยยีน *Badh๒* และสามารถตรวจสอบได้ด้วย Aromarker (ไวพจน์, 2556)

งานวิจัยนี้จึงได้นำ Aromarker มาทดสอบในการตรวจสอบยีนในมะพร้าวน้ำหอม โดยเปรียบเทียบกับข้าวหอมมะลิ และใบเตย เพื่อเป็นแนวทางในการค้นหาชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม ที่ควบคุมความหอมในมะพร้าวน้ำหอม และมะพร้าวน้ำหอมกะทิต่อไป

## วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

### อุปกรณ์

1. ใบจากต้นกล้าพันธุ์มะพร้าวน้ำหอม และพันธุ์ไทยต้นสูง จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร จังหวัดชุมพร ข้าวหอมมะลิ และใบเตย

#### ชื่อตัวอย่างมะพร้าวเรียงตามลำดับ

๑. CP TT ๐๑	}	มะพร้าวพันธุ์ไทยต้นสูง
๒. CP TT ๐๒		
๓. CP TT ๐๓		
๔. CP TT ๐๕		
๕. CP TT ๐๔		
๖. CPNH ๐๓	}	มะพร้าวน้ำหอม
๗. CPNH ๐๔		
๘. CPNH ๐๕		
๙. CPNH ๐๒		
๑๐. CPNH ๐๑		

2. สารเคมี

#### 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- Doyle & Meili buffer (CTAB, Tris-HCl, EDTA, PVP-๔๐T, ๒-Mercaptone Ethanol และ NaCl)

- 10 mg/ug Proteinase K

- Rnase A
- 20% SDS
- 3.8% Sodium citrate
- 5 M NaCl
- dicholomethan : Isoamly (๒๔:๑)
- Chloroform : Isoamyl Alcohol (24:1)
- 3M Sodium Acetete
- 70% Ethanol
- Isopropanol
- absolute ethanol
- SE buffer
- ไนโตรเจนเหลว
- Mercaptonethanol

## 2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ (PCR)

- *Taq* DNA Polymerase
- dNTP (dATP dTTP cTP gTP)
- DNA Sample
- MgCl<sub>2</sub>
- 0.5 x TE buffer
- buffer A (10X)
- buffer S (10X)
- buffer V2 (10X)
- Primer
  1. Aroma-F1: 5'-TGC TCC TTT GTC ATC ACA CC-3'
  2. Aroma-R1: 5'-TTT CCA CCA AGT TCC AGT GA-3'

## 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Gel Electrophoresis

- agarose gel
- 6 X loading buffer
- ethidium bromide
- 0.5 X TBE buffer

## 3. เครื่องมือและอุปกรณ์

- หลอดไมโครเซนตริฟิว (microcentrifuge tube)
- ไมโครปิเปต (micropipette)

- ทิป (tip)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- เครื่องเซนตริฟิว (centrifuge)
- เครื่องไมโครเซนตริฟิว (microcentrifuge)
- ปิเปต
- ตู้อบ
- เครื่อง UV Transilluminator
- ตู้ฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- เครื่อง Thermal Cycler
- เครื่อง Gel Electrophoresis
- ถังมือยาง
- ปีกเกอร์
- มีด/กรรไกร
- Parafilm
- แรค (Rack)
- กระจกตวง

## วิธีการ

### ๑. การเตรียมสารสกัดดีเอ็นเอ (Extraction buffer) (Doyle & Meili buffer)

๒% CTAB, ๐.๑ M Tris-HCl pH ๘.๐, ๐.๐๒ M EDTA pH ๘.๐, ๑% PVP-๔๐T, ๒-Mercaptone Ethanol และ ๑.๔ M NaCl

#### เตรียมปริมาตร ๑,๐๐๐ ml

- |                           |        |
|---------------------------|--------|
| ๑. ชั่ง CTAB              | ๒๐ g   |
| ๒. ชั่ง NaCl              | ๘๑.๘ g |
| ๓. ตวง ๑M Tris-HCl pH ๘.๐ | ๑๐๐ ml |
| ๔. ตวง ๐.๕ M EDTA pH ๘.๐  | ๔๐ ml  |

นำสารและสารละลายข้อ ๑-๔ มาละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร ๘๐๐ ml

๕. ชั่ง PVP-๔๐T ๑๐ g แล้วใส่ลงในสารละลายจนละลายเป็นเนื้อเดียว โดยใช้ความร้อนและการปั่นตลอดเวลาจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปรับ pH ให้ได้ pH ๘.๐, แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ ๑๐๐๐ ml ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ ๑๒๑°C ความดัน ๑๕ ปอนด์ นาน ๑๕ นาที

โดยก่อนนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอพืช ต้องเติมสารละลาย Mercaptonethanol ในอัตราส่วน ๑:๑,๐๐๐ ไมโครลิตร (μl)

### 2. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

#### ใบมะพร้าว

การสกัดดีเอ็นเอตัดแปลงมาจาก Li, M และ Midmore (1999) นำใบมะพร้าว 0.1 กรัม บดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว เติม extraction buffer ปริมาตร ๒,๔๐๐ ไมโครลิตร ลงในโกร่งบดตัวอย่าง บดใน extraction buffer อีกรอบ แล้วถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวส์ จากนั้นปั่นไว้ที่อุณหภูมิ ๖๕°C เป็นเวลา ๓๐ นาที จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดสารละลายใส่ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ใหม่ เติม dicholomethan : Isoamly (๒๔:๑) ปริมาตร ๕๐๐ ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดสารละลายใส่ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ใหม่ เติม Isopropanol ปริมาตร ๖๐๐ ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑ นาที ทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม ethanol ความเข้มข้น ๗๐ % ปริมาตร ๕๐๐ ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑ นาที เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยวิธีเดิมซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเทส่วนน้ำทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูและซับให้แห้งหรือปล่อยให้แห้งในอากาศเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนตะกอนดีเอ็นเอแห้งดีแล้ว ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (dH<sub>2</sub>O) ปริมาตร ๑๘๐ ไมโครลิตร เพื่อให้ดีเอ็นเอละลาย จากนั้นเติม ๕ M NaCl ปริมาตร ๒๐ ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม ethanol ความเข้มข้น ๙๐ % ปริมาตร ๒๐๐ ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑ นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol ความเข้มข้น ๗๐ % ปริมาตร ๕๐๐ ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑ นาที ล้างตะกอนซ้ำด้วยวิธีเดิม 3 ครั้ง เทส่วนน้ำทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูและซับให้แห้งหรือปล่อยให้แห้งในอากาศ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE ผสมกับ RNase ปริมาตร ๔๐-๕๐ ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

#### เมล็ดข้าวหอมมะลิ (ดัดแปลงจาก Li,M and Midmore, ๑๙๙๙.)

บดตัวอย่างเมล็ดข้าวด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด (ตัวอย่าง ๐.๑ กรัม : extraction buffer ๘๐๐ ไมโครลิตร) จากนั้นเติม extraction buffer ลงในโกร่งบดตัวอย่าง (ประมาณ ๒,๔๐๐ ไมโครลิตร) บดใน extractionbuffer อีกรอบ ดูดตัวอย่างจากโกร่งลงในหลอด Microcentrifuge นำไปปั่นที่อุณหภูมิ ๖๕°C ประมาณ ๓๐ นาที, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดส่วนใสลงในหลอด Microcentrifuge ใหม่ เติม dicholomethan : Isoamly (๒๔:๑) ๕๐๐ µl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดส่วนใสลงใน Microcentrifuge ใหม่เติม Isopropanol ๖๐๐ µl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับไปมา จนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที ๑ นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ๗๐ % ethanol ๕๐๐ µl, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๑ นาที (ล้างตะกอนซ้ำ ๓ รอบ) ตากตะกอนดีเอ็นเอประมาณ ๑ ชั่วโมง เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้งดีแล้ว ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (dH<sub>2</sub>O) ๑๘๐ µl เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายหลังจากนั้น เติม ๕ M NaCl ๒๐ µl เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ แล้วเติม ๙๕% ethanol ๒๐๐ µl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑ นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol ๗๐ % ๕๐๐ µl, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๑ นาที (ล้างตะกอนซ้ำ ๓ รอบ) ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ก่อนละลายด้วย TE + RNase ๔๐-๕๐ µl ตรวจคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

#### ใบเตย (ดัดแปลงจาก Li,M and Midmore, ๑๙๙๙.)

บดตัวอย่างใบเตยด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด (ตัวอย่าง ๐.๑ กรัม : extraction buffer ๘๐๐ ไมโครลิตร) จากนั้นเติม extraction buffer ลงในโถงบดตัวอย่าง (ประมาณ ๒,๔๐๐ ไมโครลิตร) บดใน extraction buffer อีกรอบ ดูดตัวอย่างจากโถงลงในหลอด Microcentrifuge นำไปปั่นที่อุณหภูมิ ๖๕°C ประมาณ ๓๐ นาที, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดส่วนใสลงในหลอด Microcentrifuge ใหม่ เติม dicholomethan : Isoamly (๒๔:๑) ๕๐๐ µl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดส่วนใสลงใน Microcentrifuge ใหม่เติม Isopropanol ๖๐๐ µl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับไปมา จนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที ๑ นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ๗๐ % ethanol ๕๐๐ µl, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๑ นาที (ล้างตะกอนซ้ำ ๓ รอบ) ตากตะกอนดีเอ็นเอประมาณ ๑ ชั่วโมง เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้งดีแล้ว ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (dH<sub>2</sub>O) ๑๘๐ µl เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายหลังจากนั้นเติม ๕ M NaCl ๒๐ µl เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ แล้วเติม ๙๕% ethanol ๒๐๐ µl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑ นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol ๗๐ % ๕๐๐ µl, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๑ นาที (ล้างตะกอนซ้ำ ๓ รอบ) ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ก่อนละลายด้วย TE + RNase๔๐-๕๐ µl ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

### 3. การตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

นำดีเอ็นเอมาวัดหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ชนิด nano drop แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น ๑๐๐ ng/µl สำหรับเป็นสารตั้งต้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งใช้ปริมาตรสุทธิของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ๑๕ µl, ประกอบด้วย H<sub>2</sub>O ๗.๖ µl, ๑๐X buffer ๑.๕ µl, ๒.๕ mM dNTP mix ๑.๒ µl, ๒๕ mM MgCl<sub>2</sub> ๐.๙ µl, ๑๐ µM F๑ Primer ๐.๓µl, ๑๐ µM R๑ Primer ๐.๓ µl, Taq polymerase ๐.๒ µl และดีเอ็นเอต้นแบบ ๓ µl

ที่	Primer	Sequence
๑	Aroma-F๑	๕'-TGC TCC TTT GTC ATC ACA CC-๓'
๒	Aroma-R๑	๕'-TTT CCA CCA AGT TCC AGT GA-๓'

#### PCR program

Pre denaturation	๙๔ °C	๕ นาที	} ๓๕
Denaturation	๙๔ °C	๔๐ วินาที	
Annealing	๕๕ °C	๑ นาที	
Extension	๗๒ °C	๑ นาที	
Long Extension	๗๒ °C	๑๐ นาที	
Hold	๒๕ °C	∞	

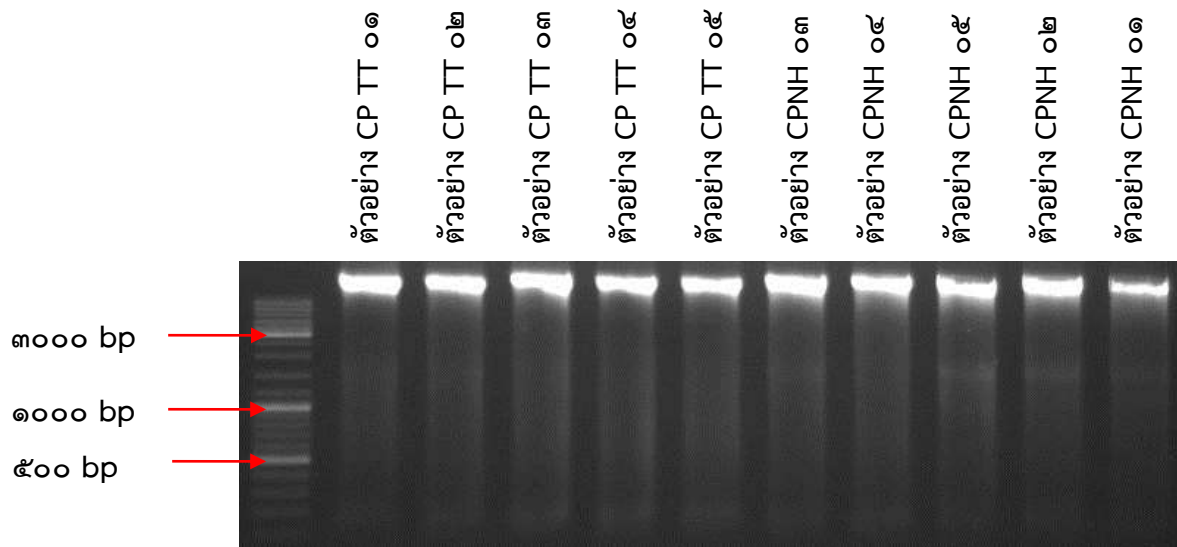
ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์วิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ๑.๐%

## ผลการวิจัย

### 1. ผลการสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบของมะพร้าวน้ำหอมและมะพร้าวพันธุ์ไทยต้นสูง โดยทำการสกัดดีเอ็นเอ ดัดแปลงจาก Li, M และ Midmore (1999) เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี แต่มีการปนเปื้อนของโปรตีนและอาร์เอ็นเอ (ภาพที่ 1)





**รูปภาพ ๑** DNA ตัวอย่างต้นที่ ๑, ๒, ๓, ๔, ๕, ๖, ๗, ๘, ๙ และ ๑๐ (ตามลำดับ) ของมะพร้าวที่สกัดได้แล้วตรวจดู DNA ด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

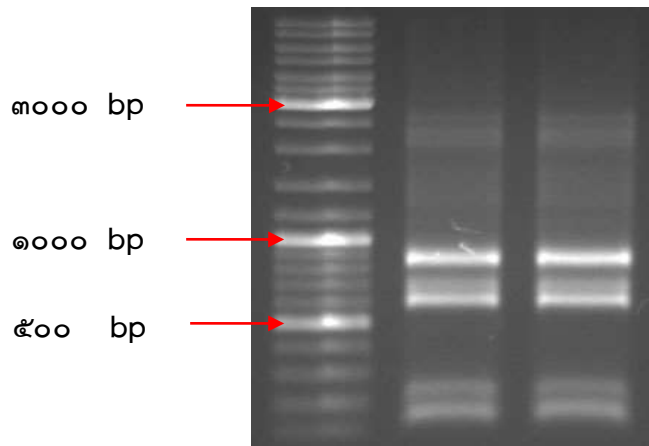
## 2. ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ Aromarker เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร ๑๕ ไมโครลิตร ประกอบด้วย H<sub>2</sub>O ๗.๖ µl, ๑๐X buffer ๑.๕ µl, ๒.๕ mM dNTP mix ๑.๒ µl, ๒๕ mM MgCl<sub>2</sub> ๐.๙ µl, ๑๐ µM F๑ Primer ๐.๓µl, ๑๐ µM R๑ Primer ๐.๓ µl, Taq polymerase ๐.๒ µl และดีเอ็นเอต้นแบบ ๓ µl

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมี PCR profile คือ

1. Pre denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที  
(ขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ)
5. Long Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
6. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ โดยวิธี agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% พบว่า แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ติดกันเป็นแพ (ภาพที่ 2)



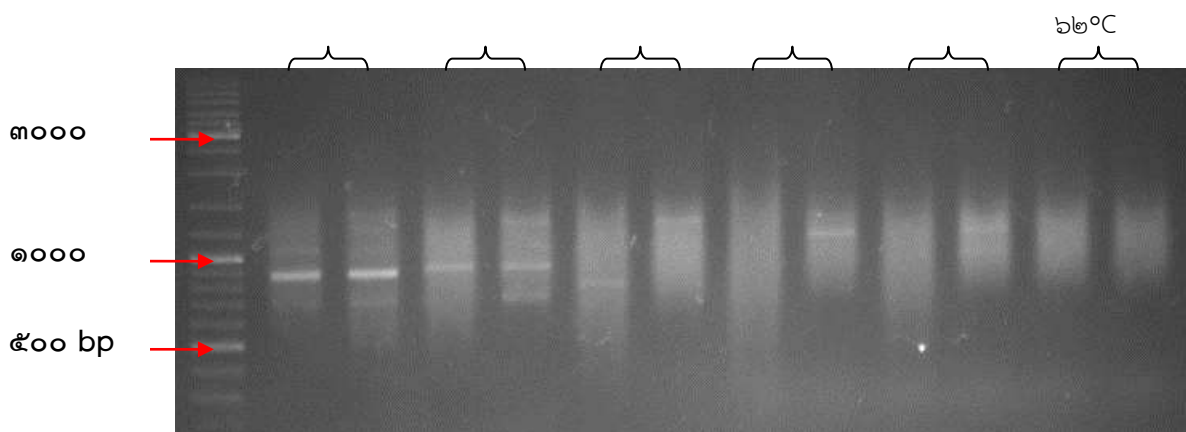
**รูปภาพ ๒** PCR products ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ของมะพร้าวที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

**๓. ผลการศึกษาอุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสม**

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ Aromarker เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร ๑๕ ไมโครลิตร ประกอบด้วย H<sub>2</sub>O ๗.๖ µl, ๑๐X buffer ๑.๕ µl, ๒.๕ mM dNTP mix ๑.๒ µl, ๒๕ mM MgCl<sub>๒</sub> ๐.๙ µl, ๑๐ µM F๑ Primer ๐.๓µl, ๑๐ µM R๑ Primero.๓ µl, Taq polymerase ๐.๒ µl และดีเอ็นเอต้นแบบ ๓ µl

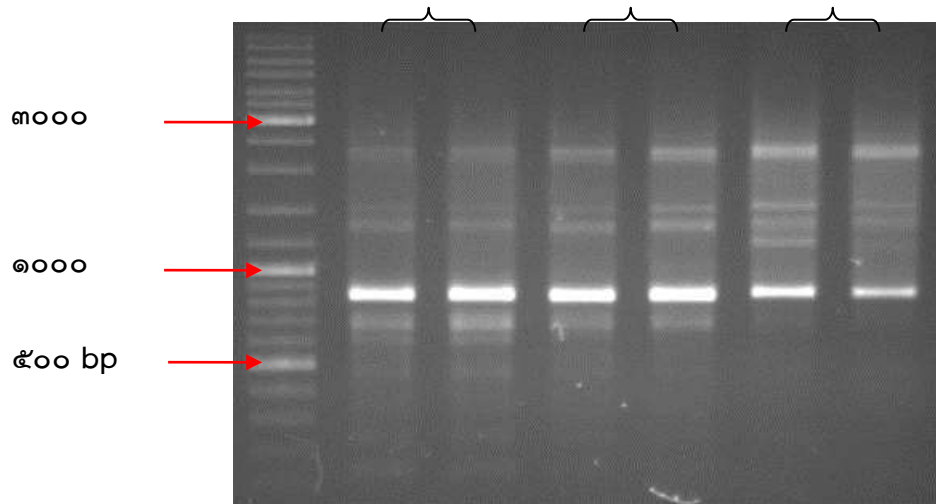
เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยกำหนด PCR profile เหมือนในการทดลองที่ 2 แต่ทดสอบ Annealing ที่อุณหภูมิ ๕๒, ๕๔, ๕๖, ๕๘, ๖๐ และ ๖๒ องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ โดยวิธี agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% พบว่า อุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสม คือ ๕๒ องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3)



**รูปภาพ ๓** PCR productsตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ของมะพร้าวที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

จากนั้นศึกษาอุณหภูมิ Annealing เพิ่มเติมที่ ๔๘, ๕๐ และ ๕๒ องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสม คือ ๕๐ องศาเซลเซียส (ภาพที่ ๔)



**รูปภาพ ๔** PCR products ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ของมะพร้าวที่ได้แล้วตรวจสอบด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

#### ๔. ผลการศึกษาปริมาณของ $MgCl_2$

ทำการศึกษ ปริมาณของ  $MgCl_2$  ใน Reaction mix ที่ระดับความเข้มข้น ๐.๙, ๑.๒ และ ๑.๕ ไมโครลิตร ดังนี้

##### Reaction mix ๑๕ $\mu$ l

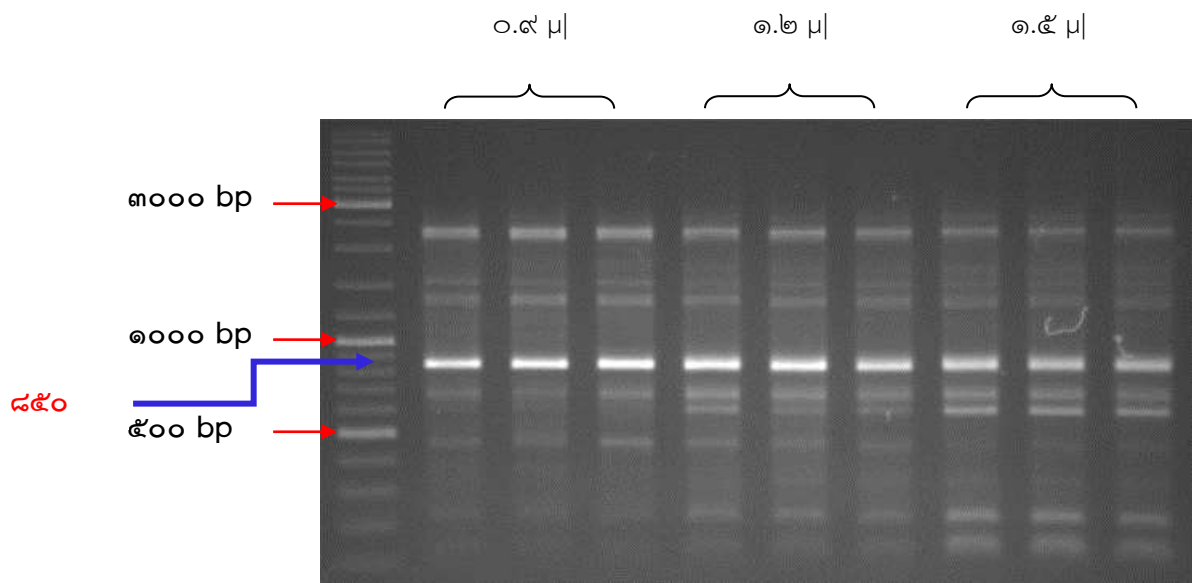
$H_2O$	๗.๖	$\mu$ l
๑๐X buffer	๑.๕	$\mu$ l
๒.๕ mM dNTP mix	๑.๒	$\mu$ l
๒๕ mM $MgCl_2$	๐.๙	$\mu$
	๑.๒	$\mu$ l
	๑.๕	$\mu$ l
๑๐ $\mu$ M F๑ Primer	๐.๓	$\mu$ l
๑๐ $\mu$ M R๑ Primer	๐.๓	$\mu$ l
<i>Taq</i> polymerase ๕U/ $\mu$ l	๐.๒	$\mu$ l
DNA template	๓	$\mu$ l
Mineral Oil		

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมี PCR profile คือ

๑. Pre denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

4. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (ขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ)
5. Long Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
6. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% พบว่า ปริมาณของ ๒๕ mM MgCl<sub>2</sub> ใน Reaction mix ที่เหมาะสมคือ ๐.๙ ไมโครลิตร (ภาพที่ ๕)



**รูปภาพ ๕** PCR products ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ ของมะพร้าวที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

#### ๕. ผลการสังเคราะห์ลำดับเบส

เมื่อทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ ที่ได้จาก Reaction mix และ Condition PCR จากผลการทดลองที่ผ่านมา ดังนี้

##### Reaction mix ๑๕ μl

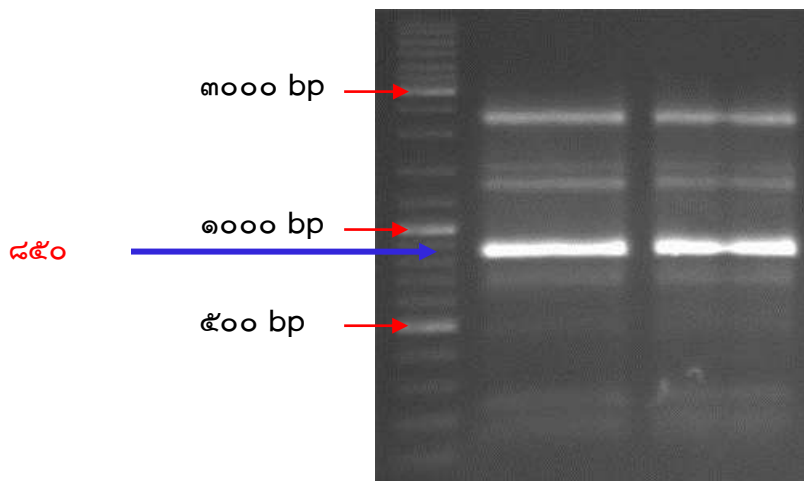
H <sub>2</sub> O	๗.๖	μl
๑๐X buffer	๑.๕	μl
๒.๕ mM dNTP mix	๑.๒	μl
๒๕ mM MgCl <sub>2</sub>	๐.๙	μl
๑๐ μM F๑ Primer	๐.๓	μl
๑๐ μM R๑ Primer	๐.๓	μl
Taq polymerase ๕U/μl	๐.๒	μl
DNA template	๓	μl
Mineral Oil		



## PCR program

Pre denaturation	๙๔ °C	๕ นาที	}	๓๕
Denaturation	๙๔ °C	๔๐ วินาที		
Annealing	๕๐ °C	๑ นาที		
Extension	๗๒ °C	๑ นาที		
Long Extension	๗๒ °C	๑๐ นาที		
Hold	๒๕ °C	∞		

นำผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ มาตรวจสอบ โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% (ภาพที่ ๖)



**รูปภาพ ๖** PCR products ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ของมะพร้าวที่ได้แล้วตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ก่อนนำไปคัดเจล

หลังจากตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการแล้วตัดส่วนผลผลิตพีซีอาร์ ซึ่งมีขนาด ๘๕๐ bp หลังจากนั้นทำการแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด HiYield™ (Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit) โดยนำชิ้นส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ลงในหลอด Micro tube เติม DF Buffer ให้ท่วมเจล ประมาณ ๔๐๐ µl นำไปปั่นที่อุณหภูมิ ๖๐°C ประมาณ ๑๐ นาที (หรือจนกระทั่งอุณหภูมิละลายจนหมด) เมื่อละลายแล้วดูดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ลงในหลอดฟิลเตอร์ที่มากับชุดน้ำยาสำเร็จรูปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๑ นาที แล้วล้างด้วย Wash Buffer ประมาณ ๔๐๐ µl (๒ รอบ) จากนั้นทำให้หลอดแห้งโดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๒ นาที เปลี่ยนฟิลเตอร์ลงในหลอด Micro tube ใหม่ (เพื่อเก็บผลผลิตพีซีอาร์) เติมน้ำ ๓๐ µl ทิ้งไว้ประมาณ ๑๐-๑๕ นาที แล้วปั่นเหวี่ยง ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๒ นาที เก็บส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปหาลำดับสียงเคราะห์

## ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของมะพร้าวพันธุ์ CPNH ๐๑

>coconut

```
GAAAAAAATCAACTAAGAGAGCATTGCACACCAATCTTTCCGGATCAATCACCATCCTCATGATGATCCTA
TGGTCGGAAGCATTATGAGTTAATAATGATTATTCATATCTTAAATTTTCAACTTTTGAAAATATGAAT
TATCATTACCATTAACCTCAAAGGATGTATCACAGACACTAAGTGCACATATGCGATAGAAAATCATCCATT
TTATTGATTATAGTCAAATTATAATTTTGGCCCTAGAATTGTATTACAAGCGTCAGCCAATTCTGGCTTT
TATGGCATATATATCTAACAACTTTTCATTTGTCCTAAAGCTAATTGGCTACAAGTCTAAGTCCCATCTTC
TCAAGATGGGCTTCGATCTTCTGCTAGCCTAACAGCTTTATAAGTGGGTCTGCCATATTATCTATGGAGT
TGACTCTCTTGACCTCGACATAACTCTTGTTGAGGTAATCGCGGATGAGGTGGTATCGCCGCTCAATGTG
CTTGGATTTTTGGTAAGACCTTGGCTCCTTAGCAGGGGCTATGGCGCCATTATTATCACAGTATAGAGGA
ATGGCATCTGATGGTATTACTCCGATTTCTGCAGTAACTTCTTGTACCAAAAATGCTTCCTTCACAGCCTC
AAATGCAGCGATATATTCTGCTTCCATAGTGGAATCTGCTATCACCATTTGCTTGAAACTCTTCCATCTTA
CAGCACCACCATTGTACACAAACAGACTTCCAGATGTCGACTTCGATCATCTATATCGACAGAATCCGGG
TTC
```

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ บนฐานข้อมูล NCBI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ดังกล่าวนี้ไม่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ความหอมจึงอาจเป็นไปได้ว่าไพรเมอร์คู่นี้อาจจะไม่ใช่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนน้ำหอมของมะพร้าวน้ำหอม หรือ อีกประการหนึ่งเนื่องจากยังไม่มีรายงานหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนน้ำหอมในมะพร้าวน้ำหอม ยีนนี้ก็อาจจะ เกี่ยวข้องกับยีนความหอมก็ได้ซึ่งทั้งหมดก็ต้องทำการทดลองต่อไป

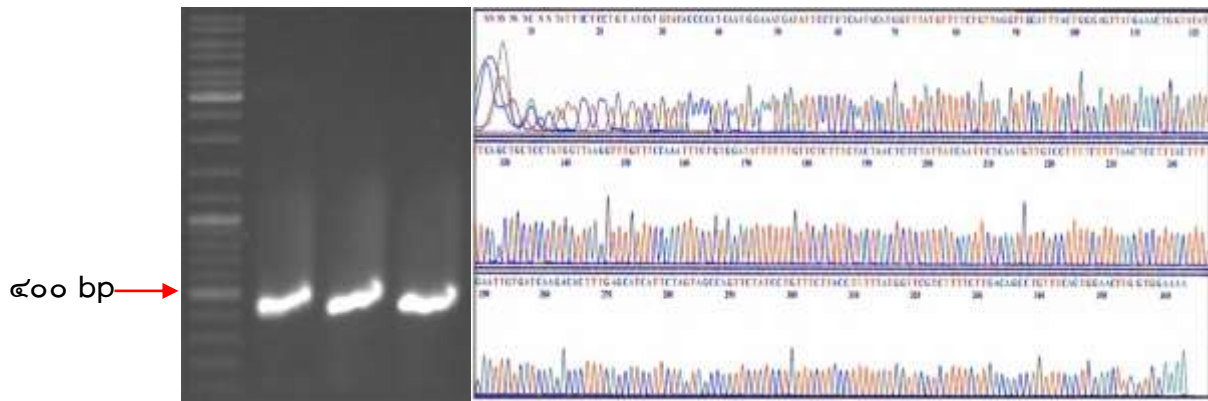
### ๖. ผลการเพิ่มปริมาณยีนและตรวจลำดับเบสยีนสร้างสาร ๒AP ในข้าวหอมมะลิ

นำดีเอ็นเอข้าวหอมมะลิที่สกัดได้มาทดสอบไพรเมอร์ชนิดเดียวกันกับที่ทดสอบในมะพร้าวน้ำหอม ก่อนหน้านี้

ที่	Primer	Sequence
๑	Aroma-F๑	๕'-TGC TCC TTT GTC ATC ACA CC-๓'
๒	Aroma-R๑	๕'-TTT CCA CCA AGT TCC AGT GA-๓'

### ผลการตรวจลำดับเบสในข้าวหอมมะลิ

นำผลผลิตพีซีอาร์ ข้าวหอมมะลิ มาตรวจสอบ โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% (ภาพที่ ๗)



**รูปภาพ ๗** PCR products ตัวอย่างข้าวหอมมะลิที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ก่อนนำไปตัดเจล และผลการตรวจลำดับเบส

ผลการเพิ่มปริมาณยีนในข้าวหอมมะลิ ได้ขึ้นยีนขนาดประมาณ ๔๐๐ bp และไม่มีแถบดีเอ็นเออื่นปรากฏ แสดงให้เห็นว่า ไพรเมอร์มีความจำเพาะกับยีนนี้ในข้าว สกัดขึ้นยีน ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด HiYield™ (Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit) เก็บส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้เพื่อศึกษาลำดับเบส

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างข้าวหอมมะลิและยีน Badh๒ (JQ๓๐๘๔๒๗) ที่สร้างสาร ๒AP ในข้าว มาจัดเรียง โดยใช้ ClustalW (ภาพที่ ๘) พบว่า มีลำดับเบสที่เหมือนกัน แสดงว่าไพรเมอร์ที่ใช้และสภาวะในการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ถูกต้อง

JQ308427	AGCCGGTGCTCCTTTGTCATCACACCCTGGTGTAGACAAGGTACAGCTATTCCCTCCTGTA	
2100rice	-----TGCTCCTTTGTCATCACACCCTGGTGTAGACAAGGTACAGCTATTCCCTCCTGTA	54
*****		
JQ308427	ATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTCTG	
2160rice	ATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTCTG	114
*****		
JQ308427	TTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTATATATTTTCAGCTGCTCCTATGGTTA	
2220rice	TTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTATATATTTTCAGCTGCTCCTATGGTTA	174
*****		
JQ308427	AGGTTTGTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTGTTCTCTTTCTACTAACTCTCTATTAT	
2280rice	AGGTTTGTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTGTTCTCTTTCTACTAACTCTCTATTAT	234
*****		
JQ308427	CAATTCTCAATGTTGTCCTTTTCTTTAACTCCTTTACTTTTTAGAATTGTGATCAAGAC	
2340rice	CAATTCTCAATGTTGTCCTTTTCTTTAACTCCTTTACTTTTTAGAATTGTGATCAAGAC	294
*****		
JQ308427	ACTTTGAGCATCATTCTAGTAGCCAGTTCTATCCTGTTTCTTACCTTTTTATGGTTCGTC	
2400rice	ACTTTGAGCATCATTCTAGTAGCCAGTTCTATCCTGTTTCTTACCTTTTTATGGTTCGTC	354
*****		
JQ308427	TTTTCTTGACAGCCTGTTTCACTGGAACCTGGTGGAAAAGTCCTATAGTGGTGTGGAT	
2460rice	TTTTCTTGACAGCCTGTTTCACTGGAACCTGGTGG-----	389
*****		

**รูปภาพ ๘** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างข้าวหอมมะลิและยีน Badh๒ (JQ๓๐๘๔๒๗)



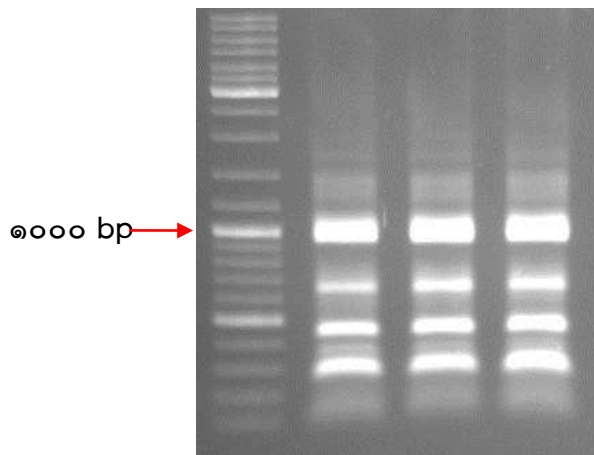
### ๗. ผลการเพิ่มปริมาณยีนและตรวจลำดับเบสยีนสร้างสาร ๒AP ในใบเตย

นำดีเอ็นเอใบเตยที่สกัดได้มาทดสอบไฟเมอร์ชนิดเดียวกันกับที่ทดสอบในมะพร้าว น้ำหอม และข้าวหอมมะลิ ก่อนหน้านี้

ที่	Primer	Sequence
๑	Aroma-F๑	๕'-TGC TCC TTT GTC ATC ACA CC-๓'
๒	Aroma-R๑	๕'-TTT CCA CCA AGT TCC AGT GA-๓'

#### ผลการตรวจลำดับเบสในใบเตย

นำผลผลิตพีซีอาร์ ใบเตย มาตรวจสอบ โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% (ภาพที่ ๙)



**รูปภาพ ๙** PCR products ตัวอย่างใบเตยที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ก่อนนำไปคัดเจล

การทดลองตรวจสอบยีนสร้างสาร ๒AP ในใบเตย พบว่าได้แถบดีเอ็นเอมากกว่า ๑ แถบ และการทดลองสกัดชิ้นยีนขนาดประมาณ ๑๐๐๐ bp ผลการตรวจลำดับเบสพบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีไม่บริสุทธิ์ มีสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างกัน แต่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันปะปนกันอยู่ ทำให้ไม่สามารถอ่านลำดับเบสได้ชัดเจน

#### สรุป

จากการทดสอบ Reaction mix และ Condition PCR พบว่า Reaction mix ที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอมะพร้าว น้ำหอม คือ  $H_2O$  ๗.๖  $\mu L$ , ๑๐X buffer ๑.๕  $\mu L$ , ๒.๕ mM dNTP mix ๑.๒  $\mu L$ , ๒๕ mM  $MgCl_2$  ๐.๙  $\mu L$ , ๑๐  $\mu M$  F๑ Primer ๐.๓  $\mu L$ , ๑๐  $\mu M$  R๑ Primer ๐.๓  $\mu L$ , Taq polymerase ๐.๒  $\mu L$  และดีเอ็นเอต้นแบบ ๓  $\mu L$  และ Condition PCR ที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอมะพร้าว น้ำหอม คือ Pre denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที จำนวน 35 รอบ Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ Long Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยไฟเมอร์ Aromarker มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนในข้าวหอมมะลิ แต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับมะพร้าว น้ำหอม และใบเตย



## เอกสารอ้างอิง

- จุลพันธุ์ เพ็ชรพิรุณ จิตสำเร็จ พยัคพงศ์ อานูภาพ ธีระกุล และ คชนอง คลอดเพ็ง (2550) การปรับปรุงพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมโดยการคัดเลือกพันธุ์และผสมพันธุ์. ในรายงานผลงานวิจัยประจำปี 2548-2550 ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร. หน้า11-31
- นริศา เหลาะดูทวี, ณัฐธา เลหากุลจิตต์, อรพิน เกิดชูชื่น และโศรดา วัลภา. 2553. การเพอร์แวนเพอเรนชันสารหอมระเหยของสารสกัดใบเตย. ว. วิทย. กษ. 41(3/1) (พิเศษ): 653-656
- วิไลวรรณ ทวีศรี. 2558. พันธุ์มะพร้าวในประเทศไทย. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 32 หน้า
- ไวพจน์ กันจู, สุกัญญา เรืองขำ, สุมณ ห้อยมาลา, อนุชา พลับปลา, อภิชาติ วรรณวิจิตร และธีรยุทธ ตูจันดา. 2556. การตรวจสอบความหอมในเชื้อพันธุกรรมข้าวไร้ไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน Os2AP และการวิเคราะห์คุณภาพทุ่งตัมและความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ด. Thai J. Genet. 6(1): 11-24).
- ศูนย์สื่อสารวิทยาศาสตร์ไทย. 2552. ข้าวชาวดอกมะลิและลิทธิบัตรเทคโนโลยีการใช้น้ำมันควบคุมความหอมในข้าว. ใน เอกสารประกอบการเสวนา เรื่อง “อนาคตข้าวไทย...ก้าวอย่างสำคัญหลังจากจดสิทธิบัตรเทคโนโลยีการใช้น้ำมันควบคุมความหอมในข้าว” ศูนย์สื่อสารวิทยาศาสตร์ไทย สวทช. วันที่ 13 สิงหาคม 2552 อาคาร สวทช. ถนนพระรามที่หก.