รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

1. ชื่อแผนบูรณาการ : **แผนงานวิจัยบูรณาการ การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมปาล์มน้ำมันเพื่อการผลิตอย่างยั่งยืน**

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

กิจกรรม : -

3. ชื่อการทดลอง : วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอราโดยใช้เทคนิค Nucleic acid Lateral Flow

Research and development of tenera oil palm test kit by using Nucleic Acid Lateral Flow technique

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง :	ประสาน สืบสุข	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	: กุหลาบ คงทอง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	: รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	: อรรัตน์ วงศ์ศรี	สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน
	: สุวิมล กลศึก	ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

5. บทคัดย่อ

การจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าโดยวิธีการตรวจดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค Real-time PCR จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้จำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าโดยใช้ หลักการ Nucleic Acid Lateral Flow เพื่อใช้ตรวจคัดกรองการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบดูราในแปลงเพาะกล้า และคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบพิสิเฟอราในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน จากการตรวจสอบลำดับเบสของยีน MADS-box ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหนาของกะลา พบการเปลี่ยนลำดับเบสแบบสนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 (A/T) มีความสัมพันธ์กับลักษณะความหนากะลาในประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli Tanzania และลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 จึงนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย พบว่าให้ผลการตรวจที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง สามารถใช้ควบคุมคุณภาพการผลิตพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราให้สูงขึ้น ลดการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบดูราในแปลงผลิตต้นกล้าพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ก่อนจำหน่าย เกษตรกรได้ต้นพันธุ์ดีไปปลูก ส่งผลให้ผลผลิตสูงขึ้น และใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบพิสิเฟอรา ตั้งแต่ระยะต้นกล้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลา แรงงาน และลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

คำสำคัญ : ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย ต้นกล้าปาล์มน้ำมัน สนิปส์

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 01-189-61-01-00-00-01-61

Abstract

Molecular detection of oil palm fruit forms in seedling stage by Real-time PCR techniques are limited and require expensive equipment and reagents. This research developed DNA Easy Kit, a simple DNA test kit to identify the characteristics of oil palm fruit forms (dura, pisifera and tenera) at seedling stage using Nucleic Acid Lateral Flow technique. It was aimed to detect and eliminate duar-form seedling during nursery growth before field planting and select male pisifera-form parents in oil palm breeding programme. The research work was carried out using the analysis and detection of sequence of MADS-box genes in the oil palm population of the Deli, Tanzania and Suratthani 7. It was found that SNP at 274 (A/T) were related to the shell thickness of oil palm. The DNA test Kit for fruit form detection was developed was carried out. The results showed that the detection of oil palm fruit forms by DNA test Kit was 100% of specificity, accuracy, comparable to the Real-time PCR technique which required expensive equipment and reagents. This Kit was applicable for quality control of Tenera oil palm seedling production for reducing or eliminating dura-form contamination in Suratthani 7 hybrid seedling before distributing to farmers and distinguishing male pisifera-form parents efficiently. It can reduce planting areas, labor, time and expenses in oil palm breeding process.

Keywords : DNA Easy Kit, oil palm seedling, single nucleotide polymorphism

6. คำนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีความสำคัญอย่างมากสำหรับอุตสาหกรรม เพื่อการอุปโภคบริโภคและผลิตไบโอดีเซลสำหรับใช้เป็นพลังงานทดแทน ในระบบการค้าน้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเมล็ดในปาล์ม น้ำมันมะพร้าว น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันรำข้าว นั้นทั้งระบบมีปริมาณน้ำมันปาล์มในสัดส่วนสูงถึงร้อยละ 66-70 จากยุทธศาสตร์ปฏิรูปปาล์มน้ำมันและน้ำมันทั้งระบบ ปี 2560-2579 ซึ่งเป็นแผนขับเคลื่อนเพื่อแก้ปัญหาปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มของประเทศได้สรุปสภาพ ในส่วนของการผลิตปาล์มน้ำมัน พบว่าประสิทธิภาพการผลิตต่ำ ผลผลิตต่อไร่ต่ำ และอัตราการสกัดน้ำมันต่ำ ไม่สามารถแข่งขันได้ การขับเคลื่อนเพื่อแก้ปัญหาปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มของประเทศในปัจจุบันมีการวางแผนการผลิตโดยคำนึงถึงปริมาณผลผลิตให้สมดุลกับความต้องการใช้ จึงกำหนดเป้าหมายให้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมากกว่าการขยายพื้นที่ปลูก ปาล์มน้ำมัน โดยเพิ่มผลผลิตของประเทศจาก 2.5 เป็น 3.5 ตันต่อไร่ต่อปี รวมทั้งเพิ่มอัตราการสกัดน้ำมันจากร้อยละ 18 เป็นร้อยละ 23 การปลูกปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีจะทำให้ประสิทธิภาพของผลผลิตเพิ่มมากขึ้น ปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปาล์มน้ำมัน คือลักษณะของผลปาล์ม ที่เป็นผลมาจากยีนควบคุมลักษณะความหนาของกะลา (SHELL gene) สามารถแบ่งลักษณะผลได้ 3 ชนิด ได้แก่ 1) ดูรา (Dura) มียีนควบคุมลักษณะผลเป็นแบบยีนเด่น (homozygous dominance) ลักษณะผลมีกะลาหนา 2-8 มิลลิเมตร มีเปลือกนอกบาง 35-60% ของน้ำหนักผล นิยมปลูกเป็นต้น

แม่พันธุ์ 2) พิสิเฟอรา (Pisifera) มียีนควบคุมลักษณะผลเป็นแบบยีนด้อย (homozygous recessive) ลักษณะผลไม่มีกะลา มีข้อเสียคือช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมัน ซึ่งทำให้ผลฝ่อ ทะลายเล็ก เนื่องจากผลไม่พัฒนา ผลผลิตทะลายต่ำมาก ไม่ใช้ปลูกเป็นการค้า แต่ใช้เป็นพ่อพันธุ์ และ 3) เทเนอรา (Tenera) มียีนควบคุมลักษณะผลเป็นแบบพันธุ์ทาง (heterozygous) เกิดจากการผสมข้ามระหว่างดูราและพิสิเฟอรา ลักษณะผลมีกะลาบาง 0.5-4 มิลลิเมตร มีชั้นเปลือกนอกมาก 60-90% ของน้ำหนักผล นิยมปลูกเป็นการค้าเนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันที่สูงกว่าชนิดอื่น (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

ระบบการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีนั้น มีการควบคุมการผสมเกสรของต้นพ่อ-แม่พันธุ์ เพื่อสร้างลูกผสมที่มีลักษณะผลแบบเทเนอรา ซึ่งให้ผลผลิตน้ำมันสูง แต่บางครั้งในกระบวนการควบคุมผสมเกสรอาจจะเกิดความผิดพลาดได้ จึงได้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีผลแบบดูราลักษณะกะลาหนาปนอยู่ เมื่อนำไปปลูกทำให้ผลผลิตต่ำ (ผลผลิตทะลายสดลดลง 15-35%) เพื่อป้องกันการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันคุณภาพต่ำ และไม่ตรงตามพันธุ์ออกจำหน่าย โดยไม่มีการตรวจสอบคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมันที่ผลิตออกมาจำนวนมาก แม้จะมีกระบวนการผลิตที่เข้มงวดและรัดกุม ก็อาจเกิดการปนของปาล์มน้ำมันที่ไม่ต้องการได้ จึงต้องมีการตรวจสอบเพื่อควบคุมคุณภาพต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา เพื่อรองรับการตรวจรับรองคุณภาพของต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้มีคุณภาพได้มาตรฐานตาม พรบ. พันธุ์พืช พ.ศ. 2518 (ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2541) เพื่อช่วยสร้างความเชื่อมั่นให้กับเกษตรกรที่ซื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันไปปลูก และยังช่วยยกระดับผลผลิตปาล์มน้ำมัน และน้ำมันปาล์มของประเทศไทยให้สูงขึ้นด้วย การใช้ต้นกล้าปาล์มที่ไม่ได้มาตรฐานไปปลูก จะทราบได้เมื่อปลูกเวลาผ่านไป 2-3 ปี จนกระทั่งติดผล ทำให้เกษตรกรได้ผลผลิตต่ำ ปัจจุบันกรมวิชาการเกษตรสามารถวิจัยและพัฒนาการตรวจสอบพันธุ์และชนิดของกล้าปาล์มได้ แต่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงเพื่อช่วยในการวิเคราะห์ตรวจสอบ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้จำแนกลักษณะผลและความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้า ชุดตรวจประกอบด้วยชุดน้ำยาผสมสำเร็จรูปพร้อมใช้งาน และแผ่นตรวจ ทำงานโดยใช้ หลักการ Nucleic Acid Lateral Flow ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำ และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR ที่เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ ใช้งานได้ง่าย และรวดเร็ว โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง เพื่อใช้ตรวจคัดกรองการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบดูราในแปลงเพาะกล้าสำหรับสนับสนุนการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีสู่เกษตรกร ทำให้ยกระดับผลผลิตปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มให้สูงขึ้น และใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ที่มีกะลาแบบพิสิเฟอราในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันตั้งแต่ระยะต้นกล้า ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli Dura, Tanzania Pisifera และ ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 (Tenera) จากแปลงปาล์มน้ำมันศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

2. ไพรเมอร์โพรบและโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับวิเคราะห์ลำดับเบส

3. สารเคมี ได้แก่ ชุดสกัดสกัดดีเอ็นเอจากพืช Taq DNA polymerase, TaqMan GTX Master Mix TaqMan probes ดีเอ็นเอมาตฐาน 100 bp DNA Ladder agarose สีย้อมดีเอ็นเอ ชุดทดสอบ Nucleic acid Lateral Flow และสารเคมีอื่น ๆ

4. วัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ปิเปตต์ทิป microtube 1.5 ml PCR tube 0.2 ml PCR plate 96 well capillary กระดาษพิมพ์ชนิด Thermal paper และวัสดุวิทยาศาสตร์อื่น ๆ

5. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องผสมสารละลาย เครื่องหมุนเหวี่ยง เครื่องชั่งสาร เครื่องวัดการดูดกลืนแสง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermal Cycler GeneAmp PCR System เครื่อง QuantStudio 5 Real-Time PCR เครื่องแยกสารด้วยไฟฟ้า เครื่อง UV transilluminator (Biorad) ชุดถ่ายภาพเครื่องอัตโนมัติ ฯลฯ

วิธีการ

1. การตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ของยีน MADS-box ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลำดับของดีเอ็นเอบนยีน MADS-box ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะผลและความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน 3 กลุ่มพันธุ์ ประกอบด้วย กลุ่มพันธุ์ Deli Tanzania และพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 โดยการค้นหาข้อมูลและออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน MADS-box จากปาล์มน้ำมันทั้ง 3 กลุ่มพันธุ์ แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของแต่ละกลุ่มพันธุ์ เพื่อหาตำแหน่งของลำดับดีเอ็นเอที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปส์ นำไปใช้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์ของยีน MADS-box ที่สัมพันธ์กับลักษณะผลและความหนาของกะลาในปาล์มน้ำมัน มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1.1 เก็บรวบรวมตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน 3 กลุ่มพันธุ์ ประกอบด้วย กลุ่มพันธุ์แม่ Deli ชนิดDura จำนวน 23 ตัวอย่าง กลุ่มพันธุ์พ่อ Tanzania ชนิด Dura Pisifera และTenera จำนวน 5 32 และ 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ และกลุ่มพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด Tenera จำนวน 20 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Plant Genomic DNA Mini Kit (Geneaid) ตามรายละเอียดของวิธีการในชุดสกัด จากนั้นตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน MADS-box ในปาล์มน้ำมัน โดยการนำข้อมูลลำดับเบสของจีโนมปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) จากฐานข้อมูล NCBI หมายเลข Accession NC_025994.1 บนโครโมโซมที่ 2 ไปเปรียบเทียบลำดับเบสกับยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมันที่มีรายงานโดยหทัยรัตน์ และคณะ (2557) และ Singh et al. (2013) เพื่อหาตำแหน่งที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม BatchPrimer 3 จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้ไปต่อด้วยลำดับเบสด้านปลาย 5’ ด้วย M13 forward

(GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA) และ M13 revers (AGGAAACAGCTATGACCAT) ของไพรเมอร์แต่ละเส้น เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการหาลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้ไปสังเคราะห์ไพรเมอร์กับบริษัท Integrated DNA Technologies, USA

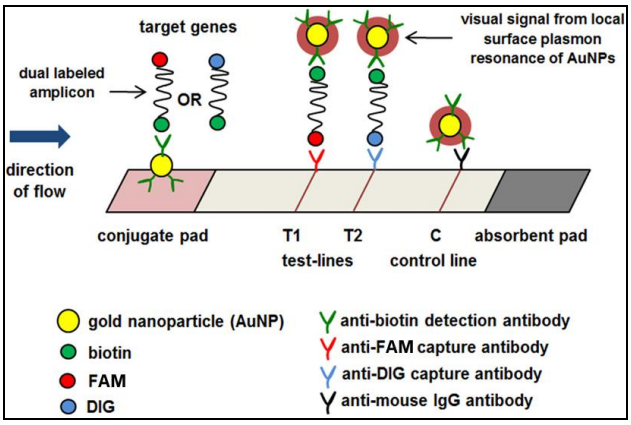
1.3 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากข้อ 1.2 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดน้ำยา Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen,USA) ตามรายละเอียดของวิธีการในชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เหลือไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์ RBC HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience) ตามรายละเอียดของวิธีการในชุดทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์

1.4 การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน MADS-box ด้วยเครื่อง ABI 3730 Genetic Anlyzer จากนั้นเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน MADS-box ระหว่างปาล์มน้ำมันแต่ละกลุ่มพันธุ์ โดยการทำ Contig Assembly ด้วยโปรแกรม CodonCode Aligne เพื่อหาความเหมือนและความแตกต่างกันของลำดับเบสของแต่ละกลุ่มพันธุ์ เมื่อพบตำแหน่งของเบสที่มีการเปลี่ยนแปลง(ตำแหน่งสนิปส์) ที่สัมพันธ์กับลักษณะผลและความหนาของกะลาในปาล์มน้ำมัน นำข้อมูลของตำแหน่งสนิปส์และเบสบริเวณใกล้เคียงนำไปใช้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์บนยีน MADS-box ด้วยเทคนิค TaqMan SNP Genotyping Assays และ Allele-specific Primers ต่อไป

2. การพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยเทคนิค NALF เพื่อใช้ตรวจจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นวิธีการนำเอาเทคนิค Nucleic Acid Lateral Flow (NALF) ซึ่งเป็นวิธีตรวจดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์เป้าหมายที่ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการแยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยแผ่นเจล นำมาพัฒนาเพื่อใช้ตรวจดีเอ็นเอในตำแหน่งที่เกิดสนิปส์ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน โดยปกติแล้วการตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ที่ได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้ได้ใช้เทคโนโลยี TaqMan SNP Genotyping และต้องอาศัยเครื่อง Real-time PCR ซึ่งใช้เครื่องมือ สารเคมีราคาแพง และต้องการบุคคลกรที่มีความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาชุดตรวจสอบอย่างง่ายโดยใช้เทคนิค NALF มาใช้แทน มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

2.1 การผลิตแผ่นตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค NALF โดยออกแบบแผ่นตรวจสอบให้สามารถตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายได้ 2 ชนิด (2 test line) ตามวิธีที่รายงานโดย Kamphee et al. (2015) และให้ตรงกับจำนวนรูปแบบของตำแหน่งสนิปส์ที่ต้องการตรวจลักษณะผลและความหนาของกะลาในพันธุ์ปาล์มน้ำมัน โดยสั่งผลิตแผ่นตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีส่วนประกอบต่าง ๆ ตามภาพต้นแบบ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงการออกแบบแผ่นตรวจ NALF โดยอาศัยหลักการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ติดฉลากด้วยสารสองชนิด ประกอบด้วย 2 test line คือ T1 เป็น anti-FAM mAb จับกับผลผลิตพีซีอาร์ที่ติดฉลากด้วย Biotin และ FAM ใช้ตรวจลักษณะกะลาแบบดูรา T2 เป็น anti-DIG mAb จับกับ Biotin และ DIG ใช้ตรวจลักษณะกะลาแบบพิสิเฟอรา ส่วน C เป็น control line

2.2 การออกแบบไพรเมอร์ตรวจสอบลักษณะผลเพื่อใช้กับแผ่นตรวจ NALF โดยนำลำดับเบสของยีน MADS-box บริเวณตำแหน่งสนิปส์ที่สัมพันธ์กับลักษณะผลของปาล์มน้ำมัน พร้อมทั้งลำดับเบสบริเวณใกล้เคียงไปออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม BatchPrimer 3 ที่มีการตั้งค่าเป็น allele-specific primers and allele-flanking primers และนำลำดับเบสที่ได้ไปสังเคราะห์ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์แต่ละเส้นจะต้องต่อด้วยเบสที่คู่สมกับไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วยสารที่สามารถจับกับ aniti-FAM และ anti-DIG) ที่อยู่บนแผ่นตรวจ NALF ที่ออกแบบไว้ โดยไพรเมอร์เส้นที่ 1 ด้าน forward primer จำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์แบบ A ที่สัมพันธ์กับลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันพันธุ์แม่ชนิดดูรา และต่อลำดับเบส GAAGGTGACCAAGTTCATGCT ที่ด้านปลาย 5’ เพื่อใช้กับไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย FAM ไพรเมอร์เส้นที่ 2 ด้าน forward primer จำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์แบบ T ที่สัมพันธ์กับลักษณะผลที่ไม่มีกะลาของปาล์มน้ำมันพันธุ์พ่อชนิดพิสิเฟอรา และต่อลำดับเบส GAAGGTCGGAGTCAACGG ATT ที่ด้านปลาย 5’ เพื่อใช้กับไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย DIG ไพรเมอร์เส้นที่ 3 ด้าน revers primer จำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และต่อลำดับเบส GCGGATAACAATTTCACACAGG ที่ด้านปลาย 5’ เพื่อใช้กับไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย Biotin

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อใช้ตรวจลักษณะผลของปาล์มน้ำมันโดยใช้แผ่นตรวจ NALF

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบผสมรวมที่ประด้วยเอนไซม์ และสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องใช้ไว้ในหลอดเดียวกันเป็น master mix เพื่อใช้กับชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย ให้ผู้ที่นำชุดตรวจสอบไปใช้สามารถใช้งานได้สะดวก ไม่จำเป็นต้องเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยตัวเอง โดยใช้ไพรเมอร์ตามข้อ 2.2 และดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามข้อ 1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนนี้จะใช้เทคนิค Nested PCR ซึ่งเป็นการทำพีซีอาร์แบบสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกจะเป็นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตำแหน่ง

ของสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบรวม 1 (master mix 1) โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละหลอด ประกอบไปด้วย 2x rhAmp SNP genotyping master mix 5 ไมโครลิตร, 5uM ของไพรเมอร์ด้าน forward และ 10 uM ของไพรเมอร์ด้าน revers ตามข้อ 2.2 อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นสำหรับทำพีซีอาร์ 2.5 ไมโครลิตร การนำไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ใช้ master mix 1 ปริมาตร 9 ไมโครลิตร และเติมดีเอ็นเอความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร ตั้งสภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 68 องศาเซลเซียส 20 วินาที จำนวน 10 รอบ หลังจากนั้นเป็นการทำพีซีอาร์ขั้นตอนที่สองเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับลำดับเบสที่ต่อเข้ากับปลายด้าน 5’ ของไพรเมอร์แต่ละเส้น โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบรวม 2 (master mix 2) โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละหลอด ประกอบไปด้วย 5x HOT FIREPol blend master mix 4 ไมโครลิตร, 10uM ของไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย FAM, DIG และ Biotin ตามข้อ 2.2 อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นสำหรับทำพีซีอาร์ 4.5 ไมโครลิตร การนำไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบที่สองทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ใช้ master mix 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติมลงในหลอดของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนแรก 10 ไมโครลิตร และตั้งสภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 12 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 20 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ

2.4 การตรวจดีเอ็นเอด้วยแผ่นตรวจ NALF โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้ในข้อ 2.3 ผสมรวมกับสารละลาย NALF buffer 80 ไมโครลิตร ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในช่องหยอดตัวอย่างของแผ่นตรวจ NALF รอเวลาประมาณ 2-5 นาที จะเกิดแถบสีบน test line และ control line ตามชนิดของตัวอย่างที่ทดสอบ บันทึกผลการปรากฏแถบสีที่เกิดขึ้นบนแผ่นตรวจ

3. การศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย

3.1 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจความหนาของกะลาระหว่างการใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้วิธี Real-time PCR

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการเปรียบเทียบวิธีการตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับวิธี Real-time PCR โดยใช้เทคโนโลยี TaqMan SNP genotyping ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ เพื่อนำไปใช้เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

3.1.1 การพัฒนาวิธีการตรวจลักษณะผลของปาล์มน้ำมันด้วยเทคโนโลยี TaqMan SNP Genotyping โดยใช้เครื่อง Real-time PCR การออกแบบโพรบและไพรเมอร์ โดยนำลำดับเบสของยีน MADS-box พร้อมระบุตำแหน่งสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ นำไปออกแบบโพรบและไพรเมอร์ตามเทคโนโลยี TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, USA) โดยออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ ให้ขนาบข้างตำแหน่งของสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ และออกแบบโพรบ 2 เส้น ที่มีความจำเพาะและเป็นเบสคู่สมกับตำแหน่งสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ โพรบแต่ละเส้นจะติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถจำแนกแยกสนิปส์ที่มีความจำเพาะกับลักษณะผลของปาล์มน้ำมันต้นแม่ดูรา และต้นพ่อพิสิเฟอราออกจากกันได้

โดยติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์สี FAM และ VIC ที่ปลายด้าน 5’ ตามลำดับ ส่วนปลายด้าน 3’ ของโพรบทั้งสองเส้นติดฉลากด้วย nonfluorescent quencher (NFQ) เมื่อนำไพรเมอร์และโพรบที่ได้ไปตรวจสอบกับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่อง Real-time PCR จะมีการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณของแสงฟลูออเรสเซนต์ตามชนิดของสีที่ติดฉลากไว้ ทำให้สามารถจำแนกชนิดของสนิปส์ที่เกิดขึ้นบนดีเอ็นเอตามลักษณะผลของปาล์มน้ำมันชนิดดูรา และพิสิเฟอราได้ จากนั้นนำไปใช้การตรวจสอบลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้เทคโนโลยี TaqMan SNP genotyping โดยการนำดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่สกัดได้ในข้อ 1.1 ที่ประกอบตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะความหนาของกะลาแบบดูรา 10 ตัวอย่าง พิสิเฟอรา 10 ตัวอย่าง และเทเนอรา 12 ตัวอย่าง ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์และโพรบ TaqMan SNP genotyping Assays ที่ได้ออกแบบไว้ โดยปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย TaqMan® GTXpress™ master mix (2X) 10 ไมโครลิตร TaqMan genotyping assay mix (40X) 0.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมัน 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นสำหรับพีซีอาร์ 8.5 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QuantStudio 5 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) โดยตั้งค่ามีสภาวะการทำปฏิกิริยา 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 3 วินาที 60 องศาเซลเซียส 20 วินาที จำนวน 40 รอบ ค่าการเกิดสีของฟลูออเรสเซนต์จะถูกบันทึกไว้ตามจำนวนรอบที่ทำพีซีอาร์ การวิเคราะห์ตำแหน่งสนิปส์ จะสร้าง allelic discrimination plot ของแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม QuantStudio Design & Analysis Software โดย allele ของพันธุ์แม่ชนิดดูรา จะอยู่ที่แกน X และ allele ของพันธุ์พ่อชนิดพิสิเฟอรา จะอยู่แกน Y ลูกผสมชนิดเทเนอราจะอยู่กึ่งกลางระหว่างแกนทั้งสอง

3.1.2 ใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย ตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน ปฏิบัติตามวิธีการในข้อ 2.3 และ 2.4 โดยใช้ตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่มีกะลาแบบดูรา 10 ตัวอย่าง พิสิเฟอรา 10 ตัวอย่าง และเทเนอรา 12 ตัวอย่างและเป็นตัวอย่างเดียวกับการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้วิธี Real-time PCR ในแง่ของความสามารถในการจำแนกลักษณะความหนากะลาได้ถูกต้อง ความรวดเร็ว ความซับซ้อน ต้นทุนของเครื่องมือ และสารเคมีในการตรวจวิเคราะห์

เวลาและสถานที่

- ระยะเวลาดำเนินการทดลอง ตุลาคม พ.ศ. 2560 – กันยายน พ.ศ.2562
- สถานที่ดำเนินงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ของยีน MADS-box ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน

ผลจากการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เพิ่มปริมาณยีน MADS-box จากปาล์มน้ำมัน โดยนำข้อมูลจากรายงานของ Singh et al. (2013) ไปค้นหาลำดับจีโนมปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) จากฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีส่วนของยีน MADS-box ปรากฏอยู่บนลำดับเบสของจีโนมปาล์มน้ำมันบนโครโมโซมที่ 2 หมายเลข

Accession NC_025994.1 เมื่อนำลำดับดีเอ็นเอดังกล่าวไปออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีน MADS-box พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับเบส ด้าน forward premer (TTGCTTTTAATTTTGCTTG AATACC) และ ด้าน reverse primer (GGCAAAACTCAAACCCTTTTT) ครอบคลุมตั้งแต่ตำแหน่งที่ 3078403-3077678 ในโครโมโซมที่ 2 ของฐานข้อมูลจีโนมของปาล์มน้ำมัน จึงนำไพรเมอร์ที่ได้ไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน MADS-box กับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน 3 กลุ่มพันธุ์ คือ กลุ่มพันธุ์แม่ Deli กลุ่มพ่อพันธุ์ Tanzania และกลุ่มพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ที่เกิดจากการผสมระหว่างสองกลุ่มพันธุ์ดังกล่าว พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลผลิตพีซีอาร์ชัดเจน มีความยาว 769 คู่เบส และเมื่อนำผลผลิตของพีซีอาร์ของยีน MADS-box ไปอ่านลำดับเบสของเส้นดีเอ็นเอทั้งสองทิศทาง และเปรียบเทียบกันระหว่าง 3 กลุ่มพันธุ์ พบว่าลำดับดีเอ็นเอของยีน MADS-box มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไป 3 ตำแหน่ง โดยมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปส์ (SNP) 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 274 และ 485 และการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบการแทรกหรือขาดหายไป (Insertion/Deleltion) 1 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง 406-409 (Table 1) โดยการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอทั้งสามตำแหน่งมีความสัมพันธ์กับชนิดของลักษณะผลปาล์มน้ำมันในแต่ละกลุ่มดังนี้

1.1 สนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 พบในปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์แม่ Deli ชนิด Dura มีลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ homozygous A/A ในขณะที่ปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์พ่อ Tanzania Pisifera มีลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ homozygous T/T สำหรับปาล์มน้ำมันที่พันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด Tenera ที่เกิดจากการผสมระหว่างสองกลุ่มพันธุ์ดังกล่าว ปรากฏลำดับดีเอ็นเอแบบ heterozygous A/T ของแต่ละอัลลีล

1.2 สนิปส์ที่ตำแหน่ง 485 พบในปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์แม่ Deli Dura มีลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ homozygous G/G ในขณะที่ปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์พ่อ Tanzania Pisifera มีลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ homozygous C/C สำหรับปาล์มน้ำมันที่พันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด Tenera ปรากฏลำดับดีเอ็นเอแบบ heterozygous G/C ของแต่ละอัลลีล

1.3 การแทรกหรือขาดหายไปของเบสที่ตำแหน่ง 406-409 เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอขนาด 4 คู่เบส ทำให้ปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์แม่ Deli Dura <u>ไม่มี</u>ลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ TTAA ในตำแหน่งดังกล่าว ในขณะที่ปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์พ่อ Tanzania Pisifera <u>มี</u>ลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ TTAA สำหรับปาล์มน้ำมันที่พันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด Tenera รูปแบบของลำดับดีเอ็นเอจะเป็นแบบผสมกันระหว่างที่มีและไม่ลำดับดีเอ็นเอแบบ TTAA ของแต่ละอัลลีล

เห็นได้ว่าพันธุ์ลูกผสมจะได้รับการถ่ายทอดชิ้นดีเอ็นเอจากพันธุ์พ่อและแม่อย่างละครึ่ง ซึ่งในกรณีปาล์มน้ำมันนั้นเป็นพืชที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด (diploid, 2n=2x=32) แต่ละยีนจะมี 2 อัลลีล ที่เป็นคู่กัน โดยแต่ละอัลลีลจะเหมือนหรือแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลำดับดีเอ็นเอของแต่ละอัลลีลที่ได้รับจากปาล์มพันธุ์พ่อและแม่ ผลจากการอ่านลำดับเบสของยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมชนิด Tenera (พันธุ์สุราษฎร์ธานี 7) จะมีอัลลีลที่ได้รับจากพันธุ์พ่อและแม่อย่างละครึ่ง ที่ปรากฏให้เห็นด้วยลำดับดีเอ็นเอที่ ตำแหน่ง 274, 406-409 และ 485 เป็นแบบ heterozygous ในลูกผสม

การหาตำแหน่งสนิปส์ของยีน MADS-box ในปาล์มน้ำมัน พบว่าสนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 ที่มีการเปลี่ยนลำดับเบสจาก A เป็น T ให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Singh et al., (2013) ซึ่งเป็นตำแหน่งสนิปส์ที่มี

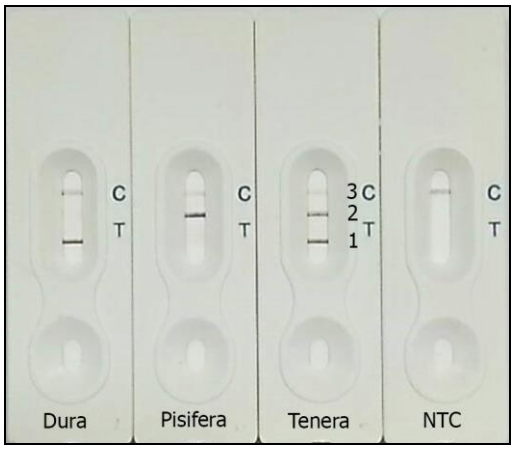
ความสัมพันธ์กับลักษณะความหนาของกะลาลักษณะ 3 แบบ คือ ดูรา พิสิเฟอรา และ เทเนอรา ซึ่งเป็นผลมาจากยีน SHELL gene: Sh ที่ควบคุมความหนาของกะลา ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอแบบสนิปส์ที่ได้ในขั้นตอนนี้จะนำไปใช้การออกแบบไพรเมอร์และโพรบเพื่อการตรวจสอบลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค TaqMan SNP genotyping โดยใช้เครื่อง Real-time PCR และการพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยเทคนิค Nucleic Acid Lateral Flow ในขั้นตอนต่อไป

2. การพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยเทคนิค NALF เพื่อใช้ตรวจจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน

ผลจากการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะและเหมาะสมกับการตรวจสอบตำแหน่ง สนิปส์ของยีน MADS-box ที่สัมพันธ์กับลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน พบว่าได้ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 (A/T) 3 เส้น ได้แก่ 1) MADS274-A (AACGCCGAAATGG ACTGCTGAAGTAA) เป็น forward primer ที่จำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์ A/A ของปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผลแบบดูรา 2) MADS274-T (AACGCCGAAATGGACTGCTGAAGTAT) เป็น forward primer ที่จำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์ T/T ของปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผลแบบพิสิเฟอรา และ 3) MADS274R (GGCTTGGCCATAGAACAAATGAAGC) เป็น reverse primer ที่อยู่ทางด้าน 3’ ของสายดีเอ็นเอในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลักษณะดูรา และพิสิเฟอรา โดยไพรเมอร์ดังกล่าวให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 193 คู่เบส และเมื่อนำไปเพิ่มดีเอ็นเอกับปาล์มน้ำมันแม่พันธุ์ชนิด Deli Dura พ่อพันธุ์ชนิด Tanzania Pisifera และพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด Tenera เมื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ พบว่าการใช้ไพรเมอร์ Mads274F-A และ Mads274R สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในปาล์มน้ำมันแม่พันธุ์ชนิด Deli Dura และพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด Tenera แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในพันธุ์พ่อชนิด Tanzania Pisifera สำหรับไพรเมอร์ Mads274F-T และ Mads274R สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในปาล์มน้ำมันพันธุ์พ่อชนิด Tanzania Pisifera และพันธุ์ลูกผสมชนิด Tenera (สุราษฎร์ธานี 7) แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในพันธุ์แม่ชนิด Deli Dura แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้นั้นมีความจำเพาะและสามารถใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่ลักษณะผลแบบ Dura, Pisifera และ Pisifera ได้อย่างถูกต้อง จึงได้นำไพรเมอร์ทั้ง 3 เส้นไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Duplex PCR โดยนำไพรเมอร์ MADS274F-A และ MADS 274F-T และ ไพรเมอร์ MADS274R มารวมกันเพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในหลอดเดียว พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ผลถูกต้อง และมีความจำเพาะกับสนิปส์ตำแหน่ง A และ T นอกจากนี้ยังพบว่าการนำไพรเมอร์ทั้ง 3 เส้นที่นำมารวมกันนั้นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากบริเวณอื่น ๆ ของจีโนมปาล์มน้ำมัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

ผลจากการทดสอบชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยแผ่นตรวจ NALF พบว่าสามารถใช้ตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างถูกต้อง กล่าวคือ มีรูปแบบการเกิดแถบสีขึ้นบนแผ่นตรวจสอบ NALF ตามชนิดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้รับการติดฉลาก ดังนี้ 1) ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์แบบ A ที่ติดฉลากด้วย FAM และ Biotin ให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับ Test line ที่ 1 ซึ่งเป็นผลจากการจับกันของ

FAM ที่ติดฉลากอยู่บนสายดีเอ็นเอ กับ anti-FAM capture antibody และ 2) ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์แบบ T ที่ติดฉลากด้วย DIG และ Biotin ให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับ Test line ที่ 2 ซึ่งเป็นผลจากการจับกันของ DIG ที่ติดฉลากอยู่บนสายดีเอ็นเอ กับ anti-DIG capture antibody แถบสีบนแผ่น NALF เกิดจากการรวมตัวของ AuNP-anti-biotin (Gold Conjugate –anti biotin) ที่จับกับ Biotin ซึ่งติดอยู่สายดีเอ็นเอ สำหรับการเกิดแถบสีบน Control line เป็นแถบสีที่บ่งบอกถึงความปกติหรือผิดปกติของแผ่นตรวจสอบ ถ้าหากเกิดแถบสีบน Control line แสดงว่าแผ่นตรวจสอบ NALF สามารถใช้งานได้ แต่ถ้าไม่เกิดแถบสีบน control line แสดงว่าแผ่นตรวจสอบนั้นไม่มีความน่าเชื่อถือในการใช้งาน (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงผลการใช้แผ่น NALF ตรวจลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันชนิด Dura Pisifera และ Tenera ที่ตรวจจากตำแหน่งสนิปส์ที่ 274 (A/T) ของยีน MADS-box

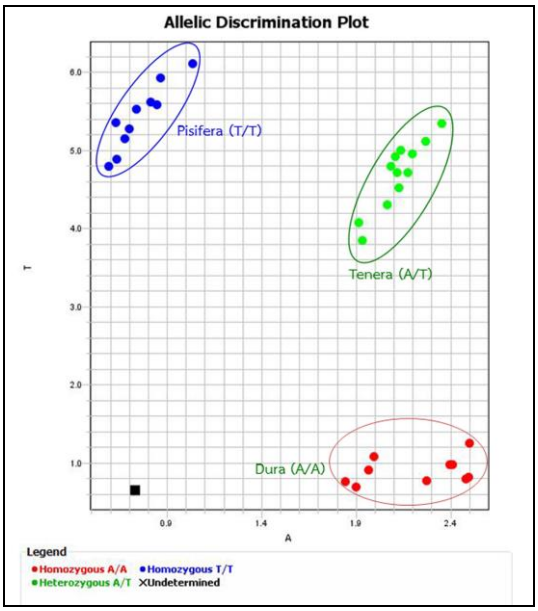
ผลจากการเตรียมชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อให้ผู้ใช้ชุดตรวจสามารถใช้งานได้สะดวก โดยไม่จำเป็นต้องเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์เอง วิธีการพัฒนาชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายจึงได้เตรียมส่วนผสมของสารเคมีและเอนไซม์ต่าง ๆ ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้อยู่ในหลอดเดียวกันเป็นส่วนผสมแบบรวม master mix 1 และ master mix 2 โดยให้ผู้ใช้งานชุดตรวจเติมเฉพาะดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบเท่านั้น นอกจากนี้ได้นำส่วนผสมของ master ทั้งสองไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 6 เดือน ไปทดสอบใช้งาน พบว่าสามารถให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

3. การศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย

3.1 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจความหนาของกะลาระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้วิธี Real-time PCR

การพัฒนาวิธีการตรวจลักษณะผลของปาล์มน้ำมันใช้วิธี Real-time PCR ได้ไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมกับการตรวจสอบด้วยเทคโนโลยี TaqMan SNP genotyping เพื่อใช้ตรวจดีเอ็นเอที่ตำแหน่งสนิปส์ที่ 274 (A/T) ที่อยู่บนยีน MADS-box และให้ความแตกต่างในการตรวจจำแนกลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli Dura และ Tanzania Pisifera ด้วยไพเมอร์ 2 เส้น คือ forward primer (CCTCAGCATCACAAA

GGACAGA) และ reverse primer (CTGCAAACGCCGAAATGGA) ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 65 คู่เบส และได้โพรบที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนส์ 2 เส้น ได้แก่โพรบติดฉลากด้วย VIC มีขนาด 19 คู่เบส (VIC-CAACTCATAAGCTTTCTTC-NFQ) ที่มีความจำเพาะกับลักษณะกะลาแบบดูรา และโพรบที่ติดฉลากด้วย FAM มีขนาด 16 คู่เบส (FAM-CTCATAAGCATTCTTC-NFQ) ที่มีความจำเพาะกับลักษณะกะลาแบบพิสิเฟอรา เพื่อยืนยันความใช้ได้ของไพรเมอร์โพรบที่ออกแบบไว้ ได้นำไปตรวจจำแนกลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันในกลุ่มประชากร Deli Tanzania และลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ให้ผลการตรวจวิเคราะห์แสดงเป็นค่า Allelic Discrimination Plot พบว่าอัลลีลของกลุ่มพันธุ์แม่ชนิดดูราจะอยู่ในแนวแกน X และอัลลีลของกลุ่มพันธุ์พ่อพิสิเฟอราจะอยู่ในแกน Y ส่วนของผสมเทอราจะอยู่ระหว่างแกนทั้งสอง (ภาพที่ 3) จะเห็นได้ว่าตำแหน่งสนิปส์ที่ 274 (A/T) เป็นตำแหน่งที่สามารถตรวจจำแนกลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันในกลุ่มประชากร Deli Tanzania และลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ได้ถูกต้องกับทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบ และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการหาลำดับเบส (sequencing) ทุกตัวอย่าง (Table 2) ให้ผลตรงกับผลการพิสูจน์ที่ทราบแล้วว่าเป็นปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะกะลาแบบใด



ภาพที่ 3 แสดง allelic discrimination plot จากการตรวจลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันชนิดดูรา พิสิเฟอรา และ เทเนอรา ด้วยสนิปส์ตำแหน่งที่ 274 (A/T) โดยใช้เทคนิค Real-time PCR

จากการเปรียบเทียบวิธีการตรวจความหนาของกะลาระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้วิธี Real-time PCR ที่ใช้ตัวอย่างปาล์มน้ำมันเดียวกัน พบว่าการตรวจด้วยชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายจะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีที่เป็นลักษณะกะลาแบบดูรา 10 ตัวอย่าง พิสิเฟอรา 10 ตัวอย่าง และเทเนอรา 12 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องตรงตามลักษณะกะลาที่ปรากฏให้เห็น และให้ผลการตรวจสอดคล้องกับการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR ที่พบค่า Allelic Discrimination Plot ที่ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือตัวอย่างที่มีลักษณะผลแบบดูรา 10 ตัวอย่าง พิสิเฟอรา 10 ตัวอย่าง และเทเนอรา 12 ตัวอย่าง (Table 3)

จะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันโดยใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย และการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการตรวจที่สอดคล้องไปในทางเดียวกัน มีความถูกต้องตรงและสัมพันธ์กับลักษณะกะลาที่ปรากฏให้เห็น จึงถือได้ว่าวิธีการตรวจโดยใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายในการตรวจลักษณะกะลาปาล์มน้ำมันเป็นวิธีใหม่ที่ไม่มีรายงานมาก่อน ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ถูกต้อง มีค่าใช้จ่ายของสารเคมี เครื่องมือ ความยุ่งยากในการตรวจวิเคราะห์น้อยกว่าการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR (Table 4) จึงสามารถนำมาใช้แทนการตรวจโดยวิธี Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐานในห้องปฏิบัติการได้

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบลำดับเบสของยีน MADS-box ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหนาของกะลา พบการเปลี่ยนลำดับเบสแบบสนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 (A/T) มีความสัมพันธ์กับลักษณะความหนากะลาในประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli Tanzania และลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ได้นำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายสำหรับตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง เทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง สามารถนำไปใช้ตรวจคัดกรองเพื่อลดการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบดูราในแปลงผลิตต้นกล้าพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ก่อนจำหน่าย ทำให้เกษตรกรได้พันธุ์ปาล์มที่ดีมีมาตรฐานตรงตามพันธุ์ มีความเชื่อมั่นในคุณภาพของต้นกล้า ได้ผลผลิตปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มสูงขึ้น และสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบพิสิเฟอรา ตั้งแต่ระยะต้นกล้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลา แรงงาน และลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่จะส่งผลให้เกิดการปรับปรุงพันธุ์แบบก้าวกระโดดในปาล์มน้ำมัน อีกทั้งชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือระดับพื้นฐานตามศูนย์วิจัยปาล์มในต่างจังหวัดได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. หน่วยงานที่ผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งภาครัฐ และภาคเอกชน สามารถนำชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายไปใช้ตรวจต้นกล้าปาล์มน้ำมันชนิดลูกผสมเทเนอราเพื่อคัดกรองการปนของต้นดูราในแปลงเพาะกล้า และยกระดับคุณภาพกระบวนการผลิตพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราให้สูงขึ้น

2. เกษตรกรได้รับต้นกล้าปาล์มลูกผสมชนิดเทเนอราที่ดีมีมาตรฐานตรงตามพันธุ์ และเพิ่มความเชื่อมั่นในคุณภาพของต้นกล้า

3. นักปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันสามารถนำชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายไปใช้ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบพิสิเฟอราได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า ทำให้ช่วยลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา

4. นักวิจัยและผู้ควบคุมคุณภาพของแปลงผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่อยู่ตามศูนย์วิจัยปาล์มในต่างจังหวัดที่มีเครื่องมือระดับพื้นฐานสามารถนำชุดตรวจดีเอ็นเอไปใช้ได้โดยมีขั้นตอนการตรวจที่ไม่ยุ่งยาก

5. ผลงานวิจัยนี้สามารถประยุกต์ใช้เป็นแนวทางต้นแบบในพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อตรวจและจำแนกลักษณะที่สำคัญในปาล์มน้ำมัน เช่น การตรวจดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะผลดิบสีเขียวและผลสุดสีส้มในปาล์มน้ำมัน เป็นต้น

6. เป็นประโยชน์ในทางเศรษฐกิจของประเทศ เนื่องจากชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายที่สร้างขึ้นใช้เองนี้สามารถทดแทนการนำเข้าเครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ โดยไม่ต้องสูญเสียเงินตราออกไปต่างประเทศ อีกทั้งยังส่งผลให้ต้นทุนค่าตรวจตัวอย่างลดลง นับเป็นการสร้างชุดตรวจดีเอ็นเอที่เป็นนวัตกรรมใหม่ของกรมวิชาการเกษตร ที่ก้าวหน้า และเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันกระบี่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการทดลอง

12. เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการปาล์มน้ำมัน. โรงพิมพ์ดอกเบี้ย กรุงเทพฯ. 188 หน้า

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ อรรัตน์ วงศ์ศรี และนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ. 2558. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล. รายงานผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2558. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 17-44.

Kamphee, H. Chaiprasert, A. Prammananan, T. Wiriyachaiporn, N. Kanchanatavee, A. and T. Dharakul. 2015. Rapid Molecular Detection of MultidrugResistant Tuberculosis by PCR-Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay. *PLoS ONE* 10(9): 1-17.

Singh, R. E.T. Low, L.C. Ooi, M. Ong-Abdullah, N.C. Ting, J. Nagappan, R. Nookiah, M.D. Amiruddin, R. Rosli, M.A. Manaf, K.L. Chan, M.A. Halim, N. Halim, N. Azizi, N. Lakey, S.W. Smith, M.A. Budiman, M. Hogan, B. Bacher, A.V. Brunt, C. Wang, J.M. Ordway, R. Sambanthamurthi and R.A. Martienssen. 2013. The oil palm SHELL gene control oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. *Nature* 500 (7462): 340-344.

13. ภาคผนวก

Table 1 Summary of SNPs and In/Del positions for genotyping of oil palms. Data were generated from nucleotide sequences of MADS-box gene from 3 oil palm populations.

Population	Fruit form	No. of sample	SNP (274)	SNP (485)	In/Del (406-409)
Deli	Dura	23	A/A	G/G	-
ST7	Tenera	20	A/T	G/C	-/TTAA

Tanzania	Dura	5	A/A	C/C	-
	Pisifera	32	T/T	C/C	TTAA
	Tenera	5	A/T	C/C	-/TTAA

Table 2 Comparison of phenotype and genotype (Sequencing and Real-time PCR) for detection of fruit form (dura, pisifera and tenera) in oil palm samples.

Population	Phenotype				Genotype						G/P Concordnace*
					Sequencing			Real-time PCR			
	D[a]	P[b]	T[c]	Total	D[a]	P[b]	T[c]	D[a]	P[b]	T[c]	100%
Deli	23	-	-	23	23	-	-	23	-	-	100%
Tanzania	5	32	5	43	5	32	5	5	32	5	100%
ST7	-	-	20	20	-	-	20	-	-	20	100%

Remarks: [a] = Dura, [b] = Pisifera [c] = Tenera * = Genotype/Phenotype concordance

Table 3 Comparison of DNA Easy Kit and Real-time PCR technique for detection of fruit form (dura, pisifera and tenera) in oil palm samples.

Population	Phenotype (Fruit form)				Genotype						DNA Easy Kit /Real-time PCR Concordnace
					DNA Easy Kit			Real-time PCR			
	D[a]	P[b]	T[c]	Total	D[a]	P[b]	T[c]	D[a]	P[b]	T[c]	100%
Deli	10	-	-	10	10	-	-	10	-	-	100%
Tanzania		10	-	10	-	10	-	-	10	-	100%
ST7	-	-	12	12	-	-	12	-	-	12	100%

Remarks: [a] = Dura, [b] = Pisifera [c] = Tenera

Table 4 Comparison of reagent and equipment costs for DNA Easy Kit and Real-time PCR technique detection.

Cost	DNA Easy Kit	Real-time PCR
Reagents (Baht)	35	185
NALF strip (Baht)	100	-
Equipment (Baht)	50,000	2,500,000