เทคนิคการตรวจกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมอย่างรวดเร็วโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์

Rapid Detection Technique of Oil Palm Seedlings Using SNPs Molecular Markers

ภรณี สว่างศรี[1] รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล[1] อรรัตน์ วงศ์ศรี[2] สุวิมล กลศึก[2] ชยานิจ ดิษฐบรรจง[1]
ดนัย นาคประเสริฐ[1] หทัยรัตน์ อุไรรงค์[1]
Paranee Sawangsri[1] Rungnapa Pitaktansakul[1] Onrat Wongsri[2] Suwimon Kolasuk[2]
Chayanit Distabanjong[1] Danai Nakprasert[1] Hathairat Urairong[1]

ABSTRACT

Mass production of oil palm seedlings may be contaminated due to the presence of dura type resulting in reduction of seedling quality. Inspection of dura type in nursery is necessary for maintain high quality of tenera oil palm. The application of real time PCR technique is employed for this detection process. This technique is rapid, low cost and precise. The research was conducted at the Biotechnology Research and Development Office and the Suratthani Oil Palm Research Center during July 2015 to June 2017. The research work was carried out by analysis of bulk sample using SNPs molecular markers in Surat-Thani 7, tenera oil palm (Tanzania group). Five percent of seedlings (500 seedlings out of 10,000 seedlings) were collected for bulk DNA extraction (10 seedlings/sample), those comprised of 50 samples. Detection threshold was investigated by analysis of fluorescent intensity (ΔRn) from each allele (A, T), by ΔRn allele T/A ratio, in 50 extracted DNA samples compare with dura contaminated standard value (0 - 100 percent). The result revealed that 24 out of 50 of the samples were contaminated with dura type whereas the others 26 samples showed no contamination. Among 26 samples, all single seedling was tested to confirm the previous result. There were 3 dura seedlings found in the 26 sample-groups that equivalent to 0.6 percent of false result (from 500 seedlings). This technique reveals the acceptable and practicable for oil palm contaminated testing. In addition, the application of MassARRAY technique was employed for SNPs molecular markers analysis for 4 locations of SNPs markers simultaneously. This technique can distinguished oil palm group and tenera type by a single test.

Keywords : oil palm seedling, rapid detection, bulk sample, SNPs, MassARRAY

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology Research and Development Office)
[2] ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี (Suratthani Oil Palm Research Center)

บทคัดย่อ

การผลิตกล้าปาล์มน้ำมันชนิดลูกผสมเทเนอราในปริมาณมาก อาจมีการปนของปาล์มน้ำมันชนิดดูรา ทำให้คุณภาพของกล้าปาล์มน้ำมันลดลง เพื่อควบคุมคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมันให้ตรงตามพันธุ์ จำเป็นต้องมีการตรวจคัดกรองต้นดูราที่ปนมาในแปลงเพาะกล้า งานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิค Real time PCR มาพัฒนาเพื่อให้ตรวจสอบคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมันได้อย่างรวดเร็ว ประหยัด และเชื่อถือได้ ดำเนินการวิจัยที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2558 ถึง เดือนมิถุนายน 2560 โดยการตรวจวิเคราะห์แบบรวมตัวอย่าง (Bulk Sample) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ (SNP_{TAYA} A/T) ทำการทดลองในปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 กลุ่มพันธุ์ Tanzania โดยจัดกลุ่มประชากรเป็นกลุ่มๆ ละ 10,000 ต้น สุ่มเก็บตัวอย่างกล้าปาล์มน้ำมัน 5 เปอร์เซ็นต์ (500 ต้น) นำมารวมตัวอย่างเพื่อสกัดดีเอ็นเอรวม 10 ต้น/ตัวอย่าง รวม 50 ตัวอย่าง วิเคราะห์ข้อมูลจากค่า Fluorescent intensity (ΔRn) ของแต่ละ allele (A, T) โดยใช้ค่า ΔRn allele T/A ratio ของตัวอย่าง ดีเอ็นเอทั้ง 50 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานการปนของต้นดูราในลูกผสมเทเนอรา 0 - 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อวิเคราะห์ค่าขีดจำกัดของการตรวจคัดกรอง ผลการตรวจคัดกรองแบบรวมตัวอย่างในครั้งนี้ พบการปนของต้นดูรา 24 ตัวอย่าง และสามารถปล่อยผ่านได้ 26 ตัวอย่าง และเมื่อนำทั้ง 26 ตัวอย่างมาตรวจแบบต้นต่อต้น พบว่ามีต้นดูราปน 3 ต้น คิดเป็นค่าความผิดพลาดในการปล่อยผ่าน 0.6 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 500 ต้น แสดงว่าวิธีการตรวจแบบรวมตัวอย่างเป็นวิธีการที่ใช้ได้และให้ความแม่นยำสูง นอกจากนี้ในกรณีไม่ทราบประวัติพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน ได้พัฒนาเทคนิค MassARRAY ในการตรวจวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์พร้อมกัน 4 ตำแหน่ง ในปาล์มน้ำมันชนิดลูกผสมเทเนอราในกลุ่มพันธุ์ต่างๆ ทำให้สามารถระบุกลุ่มพันธุ์และจำแนกลูกผสมเทเนอราได้ในคราวเดียวกัน

คำหลัก : กล้าปาล์มน้ำมัน การตรวจอย่างรวดเร็ว การรวมตัวอย่าง สนิปส์ MassARRAY

คำนำ

จากร่างแผนยุทธศาสตร์ (Roadmap) ปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์ม โดยกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ในปี 2558 - 2569 กำหนดเป้าหมายให้เพิ่มพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 3.8 แสนไร่/ปี จึงทำให้มีกล้าปาล์มน้ำมันคุณภาพต่ำและไม่ตรงตามพันธุ์ออกจำหน่าย โดยยังไม่มีวิธีการตรวจสอบคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมันที่ผลิตออกมาเป็นจำนวนมาก แม้จะมีกระบวนการผลิตที่เข้มงวดและรัดกุมก็อาจเกิดการปนของปาล์มน้ำมันที่ไม่ต้องการได้ ดังนั้นหากมีการตรวจสอบเพื่อควบคุมคุณภาพ (Quality control) กล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราอย่างถูกต้อง เพื่อรองรับการตรวจรับรองคุณภาพของต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้มีคุณภาพได้มาตรฐานตาม พรบ. พันธุ์พืช พ.ศ. 2518 (ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2541) จะช่วยสร้างความเชื่อมั่นให้กับเกษตรกรที่ซื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันไปปลูก และยังช่วยยกระดับคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมัน ผลผลิตปาล์มน้ำมัน และน้ำมันปาล์มของประเทศไทยให้สูงขึ้นด้วย

ปาล์มน้ำมันแบ่งตามลักษณะผลเป็น 3 แบบ ได้แก่ ดูรา ผลมีกะลาหนา, พิสิเฟอรา ผลไม่มีกะลา และเทเนอรา เป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างต้นแม่พันธุ์ชนิดดูราและพ่อพันธุ์ชนิดพิสิเฟอรา ผลมีกะลาบาง โดยที่ลูกผสมเทเนอราให้ผลผลิตสูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ แหล่งผลิตปาล์มน้ำมันทั่วโลกจึงใช้ปาล์มน้ำมันชนิดเทเนอราปลูกเป็นการค้า (กรมวิชาการเกษตร, 2547) ซึ่งในอดีตการจำแนกปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ชนิด ในระยะกล้าไม่สามารถทำได้ จำเป็นต้องรอถึง 3 ปี จนกว่าต้นปาล์มน้ำมันจะติดผลจึงจะสามารถตรวจสอบได้โดยวิธีการผ่าเมล็ด ปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิด เช่น RFLP, RAPD, AFLP และ SSR ถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การสร้างแผนที่ยีนสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ตลอดจนการจำแนกลักษณะผลปาล์มน้ำมัน จนมีความก้าวหน้าเป็นลำดับ (Mayes *et al*., 2001) ต่อมา Singh และคณะ (2013) พบว่ายีนควบคุมความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันเหมือนกับยีน seed stick ใน *Arabidopsis thaliana* และพบตำแหน่งบน MAD box gene ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (single nucleotide polymorphism, SNP) ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ควบคุมความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน 2 ตำแหน่ง ในพันธุ์ Congo (AVROS) และ Tanzania ซึ่ง หทัยรัตน์ และคณะ (2558) ได้นำการค้นพบนี้มาศึกษาเพิ่มเติมในพันธุกรรมปาล์มน้ำมันที่ปลูกในประเทศไทย โดยตรวจพบตำแหน่งสนิปส์เพิ่มเติมอีก 3 ตำแหน่ง พร้อมทั้งออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบชนิดของผลหรือยีนควบคุมความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน มีผลทำให้สามารถตรวจสอบปาล์มน้ำมันชนิดดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ได้ตั้งแต่ระยะกล้าโดยไม่ต้องรอจนปาล์มน้ำมันติดผล แต่วิธีการดังกล่าวเป็นการตรวจแบบต้นต่อต้น หากนำไปใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแปลงผลิตซึ่งมีปริมาณต้นกล้าเป็นจำนวนมากนั้น ในทางปฏิบัติไม่สามารถทำได้ เพราะจะทำให้มีต้นทุนและค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

งานวิจัยนี้เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิค Real time PCR ในการตรวจคัดกรองการปนของต้นดูราในสภาพแปลงเพาะกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราอย่างรวดเร็วโดยวิธีรวมตัวอย่าง และพัฒนาวิธีการตรวจสอบหรือพิสูจน์กล้าพันธุ์ปาล์มน้ำมันในกรณีที่ไม่ทราบประวัติพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Tanzania ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย ปาล์มน้ำมันชนิดดูรา จำนวน 14 ต้น ชนิดพิสิเฟอรา จำนวน 10 ต้น ชนิดลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 จำนวน 105 ต้น และ ต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 7 อายุ 5 เดือน จำนวน 500 ต้น

2. อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และชุดน้ำยา เช่น Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific) TaqMan® GTX Master Mix, TaqMan® MGB probes, PCR Accessory Set (Agena Bioscience), iPlEX® Gold Reagent Set (Agena Bioscience)

3. เครื่อง PCR (Gene Amp 9700) เครื่อง QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems®) และ เครื่อง MassARRAY®

วิธีการ

1. การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองการปนของต้นดูราโดยการรวมตัวอย่าง (Bulk Sample)

การศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ (SNP) ในการตรวจคัดกรองการปนของต้นดูราในปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 (กลุ่มพันธุ์ Tanzania) โดยนำเทคนิค Real time PCR มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการ

วิเคราะห์แบบรวมตัวอย่าง โดยนำค่าความเข้มของสีฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent intensity, ΔRn) ของแต่ละ allele (A, T) มาใช้เป็นค่าบ่งชี้ในการวิเคราะห์การปนของต้นดูรา มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1.1 การตรวจสอบเพื่อยืนยันความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ในการตรวจสอบปาล์มน้ำมันชนิดดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา

นำเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ SNP_{TAYA} ที่มีรายงานว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของปาล์มน้ำมันในกลุ่มพันธุ์ Tanzania ทั้ง 3 ชนิด คือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา (หทัยรัตน์ และคณะ, 2558) มาทดสอบเพื่อยืนยันความใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบ และเพื่อให้แน่ใจว่าตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีความแม่นยำจึงต้องเลือกใช้ต้นที่ให้ผลผลิตทะลาย เพื่อให้สามารถตรวจสอบลักษณะสัณฐานความหนาของกะลาและบ่งชี้ได้ว่าเป็นปาล์มน้ำมันดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอราอย่างถูกต้อง หรือเพื่อให้แน่ใจว่าลักษณะทางจีโนไทป์ที่ตรวจวิเคราะห์โดยเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์นั้น มีความสอดคล้องกับลักษณะทางฟีโนไทป์ของปาล์มน้ำมัน โดยการเก็บตัวอย่างใบสำหรับใช้เป็นตัวแทนปาล์มน้ำมันชนิดดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอราของประชากรกลุ่ม Tanzania จำนวน 129 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ชนิดดูรา 14 ตัวอย่าง พิสิเฟอรา 10 ตัวอย่าง และเทเนอรา 105 ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีการของ Agrawal *et al*. (1992)

ตรวจสอบชนิดปาล์มน้ำมันโดยเทคนิค Real time PCR แบบต้นต่อต้น โดยนำดีเอ็นเอทั้ง 129 ตัวอย่าง มาทำการตรวจจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน ตามวิธีการของ หทัยรัตน์ และคณะ (2558) ด้วยไพรเมอร์ และ TaqMan® MGB probes SNP_{TAYA} ซึ่งมีตำแหน่งสนิปส์ A/T สำหรับใช้ตรวจสอบปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 7 โดยแต่ละสนิปส์ออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ ขนาบข้างตำแหน่งของสนิปส์นั้น (Forward primer 5'-GCCGGCAGGTCACTTTCT-3' Reverse primer 5'-GGAGAAGACAATAAGGGCAACCT-3') และออกแบบ โพรบ 2 เส้น ที่เป็น<u>เบสคู่สม</u>กับบริเวณโดยรอบตำแหน่งสนิปส์ (A/T) นั้น โดยโพรบเส้นแรกติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์สี VIC ที่ปลาย 5' นิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งสนิปส์เป็นลำดับเบสคู่สมของปาล์มน้ำมันต้นดูรา allele A และปลาย 3' ของโพรบติดฉลากด้วย Quencher และ Minor Groove Binder (MGB) ดังนี้ VIC-5'-CAACTCATAAGCtTTCTTC-Q-(MGB)-3' ส่วนโพรบเส้นที่ 2 ออกแบบคล้ายโพรบเส้นแรก แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งสนิปส์จะเป็นลำดับเบสคู่สมของต้นพิสิเฟอรา allele T และติดฉลากสี FAM ที่ปลาย 5' ดังนี้ FAM-5'-CTCATAAGCaTTCTTC-Q-(MGB)-3'

<u>การบันทึกข้อมูล</u> บันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูลค่าของสีฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นตามจำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR ในรูปแบบกราฟ Amplification plot และวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งสนิปส์จากกราฟ Allelic Discrimination plot ของตัวอย่างด้วยโปรแกรม QuantStudio™ Design & Analysis Software โดย allele A จะอยู่ที่แกน X และ Allele T จะอยู่แกน Y ลูกผสมจะอยู่กึ่งกลางระหว่างแกนทั้งสอง

1.2 การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองโดยการรวมตัวอย่าง (Bulk sample)

ทำมาตรฐานการปนของต้นดูรา 0 - 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ทราบถึงขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์การปนของต้นดูราด้วยเทคนิค Real time PCR และนำข้อมูลไปใช้ในการวิเคราะห์ค่าการปนและกำหนดจำนวนต้นต่อการรวมเป็น 1 ตัวอย่างดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์แบบรวมตัวอย่าง

หาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (Limit of Detection) โดยทำมาตรฐานการปนของต้นดูราในลูกผสมเทเนอรา ที่ระดับ 0 5 10 20 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำตัวอย่างใบมาใช้ทำมาตรฐานการปน โดยคัดเลือกจากต้นปาล์มที่ได้รับการตรวจสอบยืนยันแล้วว่าลักษณะ

ทางจีโนไทป์มีความสอดคล้องกับลักษณะทางฟีโนไทป์ในข้อ 1.1 โดยเลือกใช้ต้นดูราและเทเนอรา อย่างละ 1 ต้น เตรียมตัวอย่างใบโดยเจาะส่วนปลายใบของต้นปาล์มแต่ละชนิดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ทำการผสมรวมตัวอย่างใบ จำนวน 20 ชิ้นต่อ 1 ตัวอย่างรวม ตัวอย่างเช่น มาตรฐานการปน 5 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย เทเนอรา 19 ชิ้น ดูรา 1 ชิ้น หรือ มาตรฐานการปน 10 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย เทเนอรา 18 ชิ้น ดูรา 2 ชิ้น เป็นต้น

1.2.2 นำตัวอย่างรวมที่ได้จากการทำมาตรฐานการปนของต้นดูราในลูกผสมเทเนอรา ที่ระดับ 0 - 100 เปอร์เซ็นต์ มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตรวจวิเคราะห์สนิปส์ A/T ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบ SNP_{TAYA} นำหลอดปฏิกิริยาเข้าเครื่อง QuantStudio™ 5 Real time PCR (Applied Biosystems®, USA) และตั้งค่าสภาวะการทำปฏิกิริยาที่ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 50 รอบ

<u>การบันทึกข้อมูล</u> บันทึกการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของค่า Fluorescent intensity (ΔRn) ที่ได้จากการวิเคราะห์สนิปส์ allele A และ allele T ในแต่ละตัวอย่างมาตรฐานการปนด้วยโปรแกรม QuantStudio™ Design & Analysis Software เพื่อนำไปคำนวณค่าสัดส่วนของ ΔRn allele T/A สำหรับใช้ในการวิเคราะห์การปนของต้นดูรา

1.3 ตรวจคัดกรองการปนของต้นดูราในแปลงผลิตกล้าปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 7

เมื่อได้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์แบบรวมตัวอย่างแล้ว นำเทคนิคดังกล่าวมาตรวจวิเคราะห์การปนของต้นดูราในสภาพแปลงผลิตต้นกล้าของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีการ ดังนี้

1.3.1 การสุ่มเก็บและรวมตัวอย่างต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

สุ่มเก็บตัวอย่างใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ในแปลงเพาะกล้าของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ใช้การสุ่มตัวอย่างแบบมีระบบ (Systematic Sampling) โดยกำหนดขนาดประชากรกล้าปาล์มน้ำมัน เป็นกลุ่มๆ ละ 10,000 ต้น สุ่มต้นกล้า จำนวน 5 เปอร์เซ็นต์ (500 ต้น) นำมาจัดตัวอย่างใหม่ โดยใช้จำนวนต้นกล้าต่อ 1 ตัวอย่างในการสกัดดีเอ็นเอ ตามผลจากการทดลองที่ 1.2 เก็บตัวอย่างใบจากทุกต้น (แต่ละต้นในแต่ละตัวอย่างทำเครื่องหมายกำกับเพื่อสะดวกในการตรวจสอบย้อนกลับแบบต้นต่อต้น) ตัดส่วนปลายใบให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ต้นละ 2 ชิ้น ชิ้นละเท่าๆกัน นำมาสกัดดีเอ็นเอแบบรวมต้น ด้วยวิธี CTAB จะได้ตัวอย่างดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง จาก 500 ต้น เจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

1.3.2 การตรวจวิเคราะห์การปนของต้นดูราแบบรวมตัวอย่าง

ตรวจวิเคราะห์การปนของต้นดูราแบบรวมตัวอย่าง โดยเทคนิค Real time PCR ตามวิธีในข้อ 1.2.2 พร้อมกันนี้ได้ทำดีเอ็นเอชุดควบคุม ได้แก่ ต้นพิสิเฟอราและดูรา สำหรับตรวจเช็คประสิทธิภาพของโพรบ และต้นลูกผสมเทเนอรา 20 ต้น ควบคู่กับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในแต่ละครั้ง

<u>การบันทึกข้อมูล</u> บันทึกการเปลี่ยนแปลงค่า ΔRn ของการตรวจวิเคระห์ตำแหน่งสนิปส์ A/T เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณค่าสัดส่วนของ ΔRn allele T/A สำหรับวิเคราะห์ค่าการปนของต้นดูราในประชากรลูกผสมเทเนอราในแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ โดยการนำค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real time PCR ที่ได้จากข้อ 1.2 มาทำการคัดกรองการปนของต้นดูรา

1.3.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ (Method validation)

นำต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราที่ได้จากการสุ่มและนำมาตรวจวิเคราะห์การปนของต้นดูราแบบรวมตัวอย่าง ในข้อ 1.3.1 และ 1.3.2 ทั้ง 500 ต้น มาทำการตรวจสอบยืนยันความใช้ได้ของวิธีการตรวจคัดกรองแบบรวมตัวอย่างด้วยเทคนิค Real time PCR โดยเปรียบเทียบกับการตรวจวิเคราะห์สนิปส์แบบต้นต่อต้น ตามวิธีการของ หทัยรัตน์ และคณะ (2558) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในปัจจุบันและมีความแม่นยำสูง

<u>การบันทึกข้อมูล</u> บันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูลค่าของสีฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น ในรูปแบบกราฟ Amplification plot และวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งสนิปส์จากกราฟ Allelic Discrimination plot

2. การพัฒนาการตรวจสอบพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานีอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค MassARRAY (ในกรณีไม่ทราบประวัติพันธุ์)

เทคนิค MassARRAY เป็นเทคโนโลยีสมัยใหม่ในการตรวจวิเคราะห์ตำแหน่งสนิปส์ โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์ความแตกต่างและความจำเพาะของน้ำหนักโมเลกุล (mass) ของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถนำมาตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมได้คราวละหลายตำแหน่งเป็น multiplexed assays

ในกรณีตัวอย่างที่ไม่ทราบประวัติพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ SNP_{DA}, SNP_{ENGC}, SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAV} สามารถใช้ในการจำแนกปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีในกลุ่มพันธุ์ DAMI, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Tanzania, Yangambi, AVROS และ Calabar โดยอาศัยเทคนิค Real time PCR ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์สนิปส์ทีละตำแหน่ง แต่การพัฒนาการตรวจสอบพันธุ์ด้วยเทคนิค MassARRAY ช่วยให้สามารถตรวจวิเคราะห์สนิปส์ได้พร้อมกันทั้ง 4 ตำแหน่ง ในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างพันธุ์ Tanzania โดยมีชนิดดูราและพิสิเฟอราเป็นตัวเปรียบเทียบ มีขั้นตอนดังนี้

2.1 การออกแบบไพรเมอร์

2.1.1 PCR primer จำนวน 1 คู่ ออกแบบขนาบข้างตำแหน่งสนิปส์ทั้ง 4 ตำแหน่ง

2.1.2 Extension primers ออกแบบไพรเมอร์ Forward จำนวน 4 เส้น ให้แต่ละเส้นมีน้ำหนักโมเลกุล (mass) แตกต่างกัน โดยแต่ละเบสมี mass ดังนี้ A (adenine) = 313.21 Da, T (thymine) = 304.2 Da, C (cytosine) = 289.18 Da, G (guanine) = 329.21 Da ทำให้สามารถอ่านและวิเคราะห์ความแตกต่างและความจำเพาะของน้ำหนักโมเลกุลของเบสตรงตำแหน่งสนิปส์ได้พร้อมกันทั้ง 4 ตำแหน่ง และให้มีปลาย 3’ ของไพรเมอร์แต่ละเส้นอยู่ในตำแหน่งก่อนถึงตำแหน่งสนิปส์

2.2 การตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ด้วยเทคนิค MassARRAY

2.2.1 สกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีการของ Agrawal และคณะ (1992) ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ และเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

2.2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Amplification) ครอบคลุมส่วนของสนิปส์ทั้ง 4 ตำแหน่ง โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในข้อ 2.1.1 เตรียมปฏิกิริยาโดยใช้ชุดน้ำยา PCR Accessory Set (Agena Bioscience) ปฏิบัติตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ นำหลอดปฏิกิริยาไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง PCR Gene Amp 9700 โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 45 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ

2.2.3 กำจัด dNTPs ที่เหลือในผลผลิต PCR จากข้อ 2.2.2 ด้วยการเติม Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP treatment) ในปฏิกิริยา ดังนี้ 10X SAP buffer 0.17 ไมโครลิตร SAP Enzyme (1.7 ยูนิต/

ไมโครลิตร) 0.3 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น (HPLC-grade) 1.53 ไมโครลิตร ตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 37 องศาเซลเซียส 40 นาที ตามด้วย 85 องศาเซลเซียส 5 นาที

2.2.4 ทำปฏิกิริยา Single-base extension โดยใช้ผลผลิต PCR จากข้อ 2.2.3 และ Forward primer ในข้อ 2.1.2 ที่ออกแบบให้ปลาย 3' อยู่ติดกับตำแหน่งสนิปส์ เติมชุดน้ำยา iPlEX® Gold Reagent Set (Agena Bioscience) ที่มี ddNTPs หรือ iPlEX® Termination Mix เพื่อหยุดปฏิกิริยาหลังจากขยายนิวคลีโอไทด์ไปเพียง 1 เบส (Single-base extension Termination) ของทั้ง 4 ตำแหน่ง โดยเตรียมปฏิกิริยาตามคำแนะนำของบริษัท นำหลอดปฏิกิริยาเข้าเครื่อง PCR Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (95 องศาเซลเซียส 5 วินาที ตามด้วย 52 องศาเซลเซียส 5 วินาที 80 องศาเซลเซียส 5 วินาที จำนวน 5 รอบ) จำนวน 40 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอดปฏิกิริยา

2.2.5 นำ Extension product เข้าเครื่อง MassARRAY ทำขั้นตอนการเติม resin และอ่านผลบน SpectroCHIP Array เพื่อวัดขนาดของมวลของไพรเมอร์+1 เบส (สนิปส์)

<u>การบันทึกข้อมูล</u> บันทึกตำแหน่งการเกิดกราฟของแต่ละตำแหน่งสนิปส์ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม TyperAnalyzer®

สถานที่ดำเนินการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และ ศูนย์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย กรกฎาคม 2558 – มิถุนายน 2560

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองการปนของต้นดูราโดยการรวมตัวอย่าง (Bulk Sample)

1.1 การตรวจสอบเพื่อยืนยันความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ในการตรวจปาล์มน้ำมันชนิดดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา

ผลการตรวจสอบชนิด allele ปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ชนิด ของประชากรกลุ่มพันธุ์ Tanzania ไพรเมอร์และโพรบ SNP_{TaYa} A/T สามารถจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมันตามลักษณะจีโนไทป์ (*SHELL* gene) ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะของฟีโนไทป์ (ความหนาของกะลา) ได้ถูกต้องทั้งหมด 129 ตัวอย่าง ผลการแสดงกราฟ Amplification plot ของสีฟลูออเรสเซนต์ VIC กับ FAM จะค่อยๆ ขึ้นในรอบที่ 21 เป็นต้นไป ซึ่งตำแหน่งสนิปส์ที่มี allele เหมือนต้นแม่ดูราเท่านั้นที่จะจับกับดีเอ็นเอของดูราได้ โดยเมื่อมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ สี VIC ทางปลาย 5' จะถูกตัด (Hydrolysis) ออกห่างจาก Quencher ที่อยู่ปลาย 3' ของ โพรบ ทำให้ปรากฏเส้นกราฟของ VIC เพิ่มขึ้นตามจำนวน copy ของสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นใหม่และจำนวนรอบของ PCR ที่เพิ่มขึ้น (Figure 1a) แต่หากนำดีเอ็นเอของต้นพ่อพิสิเฟอรามาตรวจตำแหน่งสนิปส์ เมื่อมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ สี FAM ทางปลาย 5' จะถูกตัด (Hydrolysis) ออกห่างจาก Quencher ที่อยู่ปลาย 3'ของโพรบ ทำให้ปรากฏเส้นกราฟของ FAM (Figure 1b) และถ้านำดีเอ็นเอของลูกผสมชนิดเทเนอรามาตรวจจะให้ผลเป็นกราฟ 2 เส้น ทั้งของต้นแม่ดูราและต้นพ่อพิสิเฟอรา (Figure 1c) เมื่อจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ด้วยกราฟ Allelic Discrimination Plot พบว่า allele ของแม่ดูราจะอยู่ในแนวแกน X และ allele ของพ่อพิสิเฟอราจะอยู่ในแนวแกน Y ส่วนลูกผสมเทเนอราจะอยู่กึ่งกลางระหว่างแกนทั้งสอง (Figure 1d) โดยผลการตรวจจำแนกชนิดปาล์มน้ำมันของประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Tanzania ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบลักษณะผลและความหนาของกะลา จึงเป็นการยืนยันความ

ใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบ SNP_{TAYA} และสอดคล้องกับรายงานของ Singh *et al.* (2013) ซึ่งตรวจพบตำแหน่งบน MAD box gene ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (SNP) ในกลุ่มพันธุ์ Tanzania และให้เหตุผลเพิ่มเติมว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ MAD box gene ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนนั้น จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน และคาดว่ากรดอะมิโนตัวใหม่ไม่สามารถจะจับกับโปรตีนนั้นเพื่อสร้างกะลา (Shell) ของปาล์มน้ำมันจึงทำให้ผลชนิดพิสิเฟอราไม่มีกะลา

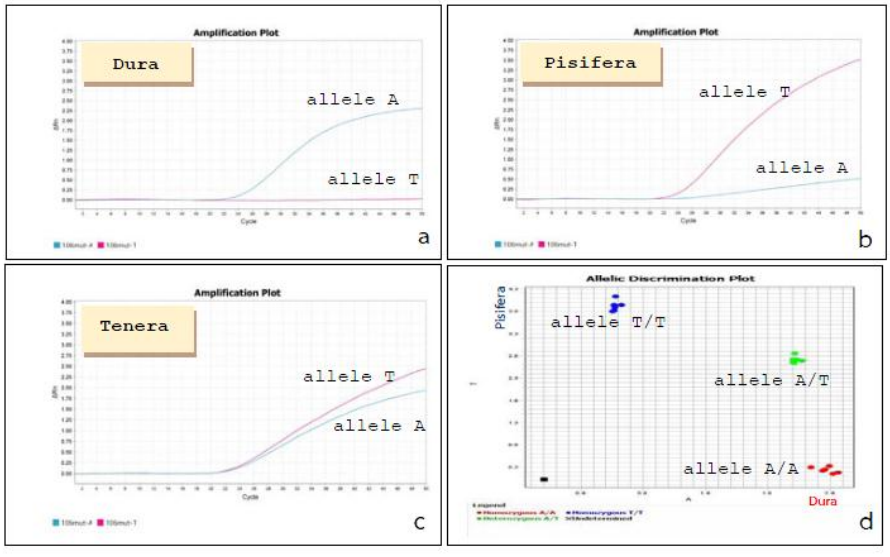

Figure 1 SNP_{TAYA} (A/T) genotyping generated by Real-time PCR displayed allele variation; homozygous A/A of dura (a), homozygous T/T of pisifera (b), heterozygous A/T of tenera (c), allelic discrimination plot showed the precisely distinguish fruit type (dura, tenera, pisifera) (d).

1.2 การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองโดยการรวมตัวอย่าง (Bulk sample)

จากการทำมาตรฐานการปนของตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Tanzania ทั้งชนิดดูราและเทเนอราที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะความหนาของกะลา และลักษณะทางจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ มาทำการผสมตัวอย่างมาตรฐานการปนของต้นดูราในประชากรต้นลูกผสมเทเนอรา เพื่อหาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์แบบรวมตัวอย่างโดยเครื่อง Real time PCR พบว่า เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีการปนของต้นดูรา 0 - 100 เปอร์เซ็นต์ ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยวิเคราะห์ผลจากกราฟ Amplification plot ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของค่า Fluorescent intensity (ΔRn) ของโพรบทั้ง 2 เส้น (allele A, allele T) เมื่อจำนวนรอบของผลผลิต PCR ที่มากขึ้น แสดงให้เห็นว่า เส้นกราฟของ allele A จากตัวอย่างที่มีเปอร์เซ็นต์การปนของต้นดูรามากกว่าจะขึ้นได้เร็วกว่า และเส้นกราฟของ allele A ในตัวอย่างที่ไม่มีต้นดูราปน (เทเนอรา 100 เปอร์เซ็นต์) ขึ้นในจำนวนรอบที่ช้าสุด ทั้งนี้ในกรณีของตัวอย่างเทเนอราที่ไม่มีดูราปน ปริมาณ allele A ที่แสดงผล ได้มาจากต้นเทเนอราเพียงแหล่งเดียว ในขณะที่ตัวอย่างที่มีเปอร์เซ็นต์การปนของต้นดูราที่มากขึ้น ปริมาณ allele A ที่แสดงผลนั้น ได้มาจากทั้งต้นเทเนอราและต้นดูรา จึงมีผลให้สัดส่วน allele A มีค่า Fluorescent intensity (ΔRn) ที่สูงกว่า และแสดงผลได้เร็วกว่าในจำนวนรอบที่น้อยกว่า โดยเส้นกราฟของ allele A ดูรา ที่ขึ้นได้เร็วสุด คือ ดูราปน 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ดูราปน 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 0 เปอร์เซ็นต์ จากกราฟ Amplification Plot เมื่อดูค่าความเข้มของสี Fluorescent ที่เกิดจากกราฟของโพรบที่จับกับ allele A ของดูรา หรือค่า ΔRn ในรอบสุดท้าย คือ รอบที่ 50 พบว่าตัวอย่างที่มีการปน 0, 5, และ 10 เปอร์เซ็นต์ เส้นกราฟอยู่ใกล้กัน

ตรวจดูยาก นอกนั้นตัวอย่างที่มีดูราปนตั้งแต่ 20 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ค่า ΔRn ที่รอบสุดท้าย (50) แยกออกจากกันอย่างชัดเจน (Figure 2)

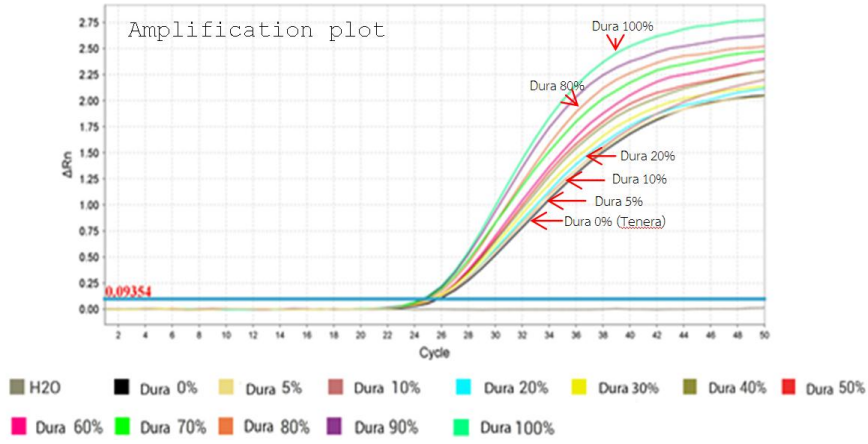

Figure 2 Percentage of dura contamination (0-100%).

การแสดงค่า Fluorescent intensity หรือค่า ΔRn allele A และ T โดยเทคนิค Real time PCR (Table 1) ตัวอย่างที่เป็นเทเนอราอย่างเดียวไม่มีดูราปน (ดูราปน 0 เปอร์เซ็นต์) พบค่า ΔRn allele A และ T มีค่า 2.141 กับ 3.565 ตามลำดับ และที่เปอร์เซ็นต์ปนของดูรามากขึ้น ค่า ΔRn allele A จะเพิ่มขึ้น ขณะที่ ΔRn allele T ลดลง ดังจะเห็นได้จาก เมื่อมีดูราปน 50 เปอร์เซ็นต์ ค่า ΔRn allele A เพิ่มขึ้นเป็น 2.326 ขณะที่ ΔRn allele T ลดลงเหลือเพียง 2.561 อย่างไรก็ตามที่ดูราปน 50 เปอร์เซ็นต์นี้ ค่า allele A ของดูราก็ยังต่ำกว่าเทเนอรา แต่เมื่อดูราปนที่ 60 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าค่า ΔRn allele A มีค่าสูงกว่า allele T คือ มีค่า 2.476 และ 2.329 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่า ΔRn allele A กับ T ในแต่ละตัวอย่างขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นด้วย ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันโดยตรงได้ ดังนั้นการที่จะเปรียบเทียบแต่ละตัวอย่างจึงใช้ค่าสัดส่วนของ ΔRn allele T/A ratio ซึ่งพบว่า ที่ดูราปน 0 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 1.665 และ 1.664 แต่เมื่อมีดูราปน 10 เปอร์เซ็นต์ ค่า ΔRn allele T/A ratio มีค่า 1.516 ซึ่งต่างจากดูราปน 5 เปอร์เซ็นต์ อย่างชัดเจน และเมื่อดูราปนมากขึ้นค่า ΔRn allele T/A ratio จะลดลง ซึ่งแสดงว่าที่ดูราปน 10 เปอร์เซ็นต์ คือ ขีดจำกัดของการตรวจสอบ (Limit of Detection) การปนดูราในเทเนอรา

ดังนั้นในการรวมตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันจาก 10 ต้นต่อตัวอย่างรวม 1 ตัวอย่างดีเอ็นเอ ถ้ามีดูราปน 1 ต้น ซึ่งเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ เทคนิคดังกล่าวจะสามารถตรวจสอบได้ โดยจะต้องระมัดระวังไม่ให้มีการตรวจผิดพลาดจากค่า Limit of Detection ของการตรวจวิเคราะห์การปนของดูรา แต่เพื่อป้องกันการเกิด false positive ในการตรวจวิเคราะห์ จึงขยับค่า Limit of Detection ให้สูงขึ้นเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ค่า ΔRn allele T/A ratio ของดูราปน 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ รวมกันแล้วหาร 2 จะได้ค่าที่ 1.445 ซึ่งหมายถึงว่า ถ้าผลตรวจของตัวอย่างรวมมีค่า ΔRn allele T/A ratio สูงกว่า 1.445 สามารถปล่อยตัวอย่างรวมนั้นผ่านได้ (ไม่มีดูราปน) แต่ถ้าค่านี้ต่ำกว่า 1.445 แสดงว่ามีดูราปน ค่าอัตราส่วนต่ำมากแสดงว่าอาจมีต้นดูราปนมากกว่า 1 ต้น โดยโอกาสของการเกิดการปนของดูรามีความสัมพันธ์กับสัดส่วนของค่า ΔRn allele T/A ratio ซึ่งสอดคล้องกับค่าเฉลี่ยของค่า ΔRn allele T/A ratio ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ต้นลูกผสมเทเนอราจำนวน 20 ต้น มีค่าเท่ากับ 1.673 (ไม่แสดงผล)

การนำค่า Fluorescent intensity (ΔRn) ของโพรบทั้ง 2 เส้น (allele A และ T) มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์การตรวจคัดกรองการปนของต้นดูราในงานวิจัยนี้ เนื่องจากในการตรวจวิเคราะห์ SNPs Genotyping แบบต้นต่อต้น โดยเทคนิค Real time PCR ค่า ΔRn ดังกล่าว โปรแกรม (software) อัตโนมัติของเครื่องนำมาใช้ในการวิเคราะห์จัดจำแนกกลุ่มของประชากรในรูปแบบ Allelic discrimination plot แต่เมื่อมีการรวมตัวอย่างดูราในประชากรเทเนอราจริง พบว่าโปรแกรมไม่สามารถวิเคราะห์การปนของต้นดูราโดยตรงได้ งานวิจัยนี้จึงได้นำเอาข้อมูลความสัมพันธ์ของค่าสีฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งพบว่ามีความผันแปรตามสัดส่วนการปนของดูรามาใช้เป็นข้อมูลในการคำนวณการตรวจวิเคราะห์การปนของต้นดูราได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์ Allelic discrimination plot เมื่อทำการทดลองปนต้นดูราในสัดส่วน 0-100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3) แสดงให้เห็นว่า ในการตรวจวิเคราะห์ด้วย Allelic discrimination plot นั้น เมื่อมีการปนของดูราที่ 0 - 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่สามารถตรวจวิเคราะห์การปนของดูราได้เลย ส่วนการปนดูราที่ 60-80 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์ไม่สามารถจำแนกกลุ่มได้ชัดเจนแต่มีแนวโน้มมาทางชนิดดูรา แต่เมื่อมีการปนของดูราที่ 90 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถจำแนกได้เป็นชนิดดูรา

Table 1 Fluorescent intensity of allele A (ΔRn allele A) and allele T (ΔRn allele T) from SNP_{TAYA} assay (0-100% dura contamination in tenera seedlings).

Dura contamination (%)	Call	ΔRn allele A	ΔRn allele T	ΔRn allele T/A ratio
Dura 0%	Heterozygous A/T	2.141	3.565	1.665
Dura 5%	Heterozygous A/T	2.089	3.478	1.664
Dura 10%	Heterozygous A/T	2.278	3.454	1.516
Dura 20%	Heterozygous A/T	2.188	3.009	1.375
Dura 30%	Heterozygous A/T	2.198	2.955	1.345
Dura 40%	Heterozygous A/T	2.341	3.028	1.294
Dura 50%	Heterozygous A/T	2.326	2.561	1.101
Dura 60%	Undetermined	2.476	2.329	0.941
Dura 70%	Undetermined	2.536	2.345	0.925
Dura 80%	Undetermined	2.623	1.763	0.672
Dura 90%	Homozygous A/A	2.725	1.204	0.442
Dura 100%	Homozygous A/A	2.833	0.524	0.185

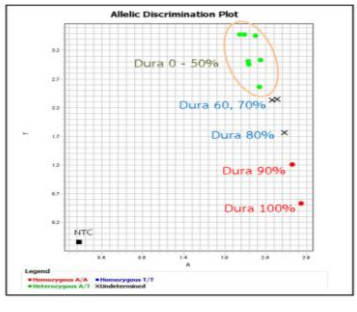

Figure 3 Allelic discrimination plot generated by Real-time PCR were able to differentiate percentage of dura contamination in tenera oil palm.

1.3 ตรวจคัดกรองการปนของต้นดูราในแปลงผลิตกล้าปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 7

จากผลการหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (Limit of Detection) ในข้อ 1.2 พบว่าค่าขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์การปนของต้นดูรา มีค่าเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการรวมตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน 10 ต้นต่อตัวอย่างรวม ถ้ามีดูราปน 1 ต้น เทคนิค Real time PCR จะสามารถตรวจสอบได้

ในการรวมตัวอย่างเพื่อตรวจคัดกรองการปนของต้นดูราในแปลงผลิตกล้า จึงได้นำกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการสุ่ม จำนวน 500 ต้น นำมาจัดตัวอย่างใหม่ โดยรวมต้น 10 ต้นต่อ 1 ตัวอย่างในการสกัดดีเอ็นเอ

จากกรณีศึกษาในครั้งนี้ ผลการตรวจคัดกรองการปนของต้นดูราแบบรวมตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ด้วยเทคนิค Real time PCR พบว่า จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ ΔRn allele T/A ratio ของตัวอย่างการสกัดดีเอ็นเอรวม จำนวน 50 ตัวอย่าง เมื่อใช้ค่าขีดจำกัดของการตรวจคัดกรอง ΔRn allele T/A ratio เท่ากับ 1.445 ในการตรวจคัดกรองการปนของต้นดูรา พบว่า จากการวิเคราะห์แบบสกัดรวมตัวอย่าง จำนวน 50 ตัวอย่าง (Table 2) ตรวจไม่ผ่าน จำนวน 24 ตัวอย่าง (48 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งหากโอกาสการปนของต้นดูราอย่างน้อยสุดต่อตัวอย่าง เท่ากับ 1 ต้น การตรวจพบการปนดูราคิดเป็น 4.8 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนประชากรที่ได้จากการสุ่มทั้งหมด 500 ต้น และให้ผลตรวจคัดกรองผ่าน จำนวน 26 ตัวอย่าง (52 เปอร์เซ็นต์)

เมื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการดังกล่าว ด้วยเทคนิค Real time PCR แบบต้นต่อต้น พบว่า ตัวอย่างดีเอ็นเอรวมที่ตรวจคัดกรองโดยวิธีรวมตัวอย่าง ในส่วนที่ตรวจคัดกรองผ่าน จำนวน 26 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบการปนของต้นดูราเลย 23 ตัวอย่าง และมีตัวอย่างที่ผิดพลาดในการปล่อยผ่าน 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 28, 40 และ 47 ใน Table 2) ตัวอย่างละ 1 ต้น รวม 3 ต้น คิดเป็น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น false negative อาจเกิดจากในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมตัวอย่างนั้น ชิ้นส่วนใบของต้นดูราที่ปนอาจติดไปกับอุปกรณ์ที่ใช้ในการบดตัวอย่าง ทำให้สกัดได้ปริมาณดีเอ็นเอของต้นดูราที่ปนมาในปริมาณน้อยมาก จนไม่เพียงพอที่จะทำให้ไพรเมอร์และโพรบสามารถตรวจจับได้ เป็นผลให้การตรวจวิเคราะห์ไม่พบการปนของต้นดูราในตัวอย่างดังกล่าว ดังนั้นในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอรวมนั้นมีความสำคัญ จำเป็นต้องมีความระมัดระวังเป็นอย่างมาก การบดตัวอย่างใบต้องละเอียดสม่ำเสอและผสมคลุกเคล้ากันอย่างสมบูรณ์ ตัวอย่างใบที่เลือกสกัดควรมีความสม่ำเสมอและเป็นใบที่อายุใกล้เคียงกัน สำหรับส่วนที่ตรวจคัดกรองไม่ผ่าน จำนวน 24 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์แบบต้นต่อต้น ตรวจพบต้นดูราจำนวนทั้งหมด 35 ต้น

การศึกษาในครั้งนี้ ถึงแม้จะมีความผิดพลาดจากการตรวจคัดกรองในการปล่อยผ่าน (false negative) ของต้นดูรา 3 ตัวอย่าง ให้กับเกษตรกร คิดเป็นดูราปน 0.6 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่นำมาตรวจคัดกรองทั้งหมด 500 ต้น ซึ่งยังอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดยมาตรฐานการปนของต้นดูราตามคำแนะนำไม่ควรเกิน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยในกรณีที่ผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์มีการควบคุมคุณภาพการผลิตที่ดีนั้น ความแปรปรวนอันเนื่องมาจากพันธุกรรมของต้นกล้าในแปลงเพาะกล้าควรจะน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ (Chow, 2540) จึงนับว่าวิธีการตรวจคัดกรองแบบรวมตัวอย่างที่พัฒนาขึ้นนี้ เป็นวิธีที่ใช้ได้และมีความแม่นยำ ข้อดีของการตรวจคัดกรองแบบรวมตัวอย่างคือ ประหยัดและรวดเร็ว เพราะไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอทุกตัวอย่าง ถึงแม้จะยังไม่สามารถระบุต้นที่ปนได้เมื่อเทียบกับวิธีการตรวจแบบต้นต่อต้นซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงและต้องใช้แรงงานมาก และไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจคุณภาพต้นกล้าปาล์มน้ำมันซึ่งมีปริมาณการผลิตเป็นจำนวนมากได้

วิธีการตรวจคัดกรองที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถช่วยในการปรับปรุงคุณภาพต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ กล่าวคือ ภายหลังจากการตรวจคัดกรองแล้วสามารถนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไม่ผ่าน มาตรวจวิเคราะห์แบบต้นต่อต้นก็สามารถคัดต้นดูรานั้นทิ้งได้ ซึ่งจะทำให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันชุดดังกล่าวมีคุณภาพที่ดีขึ้น ได้มาตรฐานตรงตามพันธุ์ เกษตรกรมีความเชื่อมั่นในคุณภาพของต้นกล้า และส่งผลให้ผลผลิตปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มสูงขึ้นด้วย ในกรณีที่ตรวจพบตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตรวจคัดกรองมีจำนวนมาก สามารถนำมาตรวจวิเคราะห์แบบต้นต่อต้นอย่างรวดเร็วได้ด้วยการประยุกต์ใช้เทคนิค Direct PCR โดยนำชิ้นส่วนหรือน้ำคั้นจากใบปาล์มมาทำปฏิกิริยา PCR ได้โดยตรงโดยไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอ (หทัยรัตน์ และคณะ, 2558)

Table 2 Fluorescent intensity of dura allele A (ΔRn allele A) and pisifera allele T (ΔRn allele T) using SNP_{TAYA} assay and dura contamination in each sample.

DNA Sample no.	Call	Bulk sample			Dura contamination (single plant detection by Real time PCR)
		ΔRn allele A	ΔRn allele T	ΔRn allele T/A ratio	
1	Heterozygous A/T	2.380	3.249	1.365	2
2	Heterozygous A/T	2.021	3.483	1.723	-
3	Heterozygous A/T	2.056	3.070	1.494	-
4	Heterozygous A/T	2.203	2.792	1.267	2
5	Heterozygous A/T	2.459	3.082	1.254	1
6	Heterozygous A/T	2.280	2.901	1.272	2
7	Heterozygous A/T	2.210	2.635	1.192	2
8	Heterozygous A/T	2.368	2.502	1.057	2
9	Heterozygous A/T	2.034	3.182	1.564	-
10	Heterozygous A/T	2.206	2.709	1.228	1
11	Heterozygous A/T	2.287	3.216	1.406	1
12	Heterozygous A/T	2.204	3.460	1.570	-
13	Heterozygous A/T	2.255	3.300	1.463	-
14	Heterozygous A/T	2.264	3.211	1.418	1
15	Heterozygous A/T	2.196	2.213	1.008	2
16	Heterozygous A/T	2.015	2.883	1.431	-
17	Heterozygous A/T	2.047	3.010	1.470	-
18	Heterozygous A/T	2.177	2.950	1.355	1
19	Heterozygous A/T	2.278	2.468	1.084	3
20	Heterozygous A/T	2.047	3.301	1.612	-
21	Heterozygous A/T	2.278	2.874	1.262	2
22	Heterozygous A/T	2.184	2.854	1.307	2
23	Heterozygous A/T	2.319	3.072	1.325	1
24	Heterozygous A/T	2.238	3.203	1.432	1
25	Heterozygous A/T	2.133	3.374	1.582	-
26	Heterozygous A/T	2.259	2.908	1.287	2
27	Heterozygous A/T	2.311	2.851	1.234	2
28*	Heterozygous A/T	1.970	2.864	1.454	1
29	Heterozygous A/T	2.095	2.860	1.365	1
30	Heterozygous A/T	2.040	3.168	1.553	-
31	Heterozygous A/T	2.048	3.070	1.499	-
32	Heterozygous A/T	2.090	2.857	1.367	1
33	Heterozygous A/T	2.000	2.947	1.474	-
34	Heterozygous A/T	2.171	3.248	1.496	-
35	Heterozygous A/T	2.091	3.426	1.638	-
36	Heterozygous A/T	2.366	3.489	1.475	-
37	Heterozygous A/T	2.334	3.111	1.333	2
38	Heterozygous A/T	2.083	2.983	1.433	-
39	Heterozygous A/T	1.988	3.120	1.569	-
40*	Heterozygous A/T	2.240	3.371	1.505	1
41	Heterozygous A/T	2.179	2.993	1.374	1
42	Heterozygous A/T	2.088	3.175	1.521	-
43	Heterozygous A/T	2.029	3.036	1.496	-
44	Heterozygous A/T	1.964	2.967	1.510	-
45	Heterozygous A/T	2.011	2.955	1.469	-
46	Heterozygous A/T	2.108	3.314	1.572	-
47*	Heterozygous A/T	2.105	3.179	1.510	1
48	Heterozygous A/T	2.213	3.477	1.571	-
49	Heterozygous A/T	2.154	3.307	1.536	-
50	Heterozygous A/T	2.013	3.253	1.616	-
					38

*Red rows indicated escape results within 26 non-detected samples.

2. การพัฒนาการตรวจสอบพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี ด้วยเทคนิค MassARRAY (ในกรณีไม่ทราบประวัติพันธุ์)

การตรวจสอบพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค MassARRAY ในกรณีตัวอย่างที่ไม่ทราบประวัติพันธุ์ เพื่อการตรวจสนิปส์ทั้ง 4 ตำแหน่ง ได้แก่ SNP_{ENGC} SNP_{LoAv} SNP_{DA} และ SNP_{TAYA} โดยงานวิจัยนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 1 ชุด ซึ่งประกอบด้วย

- PCR primer จำนวน 1 คู่ ขนาบข้างสนิปส์ทั้ง 4 ตำแหน่ง (Forward 5' ACGTTGGATGAAGCCGGCAGGTCACTTTC 3' Reverse 5' ACGTTGGATGCTGGAGAAGACAATAAGGGC 3') ได้ขนาด PCR product 126 คู่เบส

- Extension primers จำนวน 4 เส้น ที่มีปลาย 3' ที่ติดกับตำแหน่งสนิปส์ทั้ง 4 ตำแหน่ง โดยมีลำดับของไพรเมอร์มีดังนี้

Mass_SNP_{ENGC}(T/C) 5' GCCGAAATGGACTG<u>C</u> 3' ตำแหน่ง C ที่ปลาย 3' ติดกับตำแหน่งสนิปส์ T/C

Mass_SNP_{LoAv}-(C/A) 5' CAATAAGGGCAACCTC<u>A</u> 3' ตำแหน่ง A ที่ปลาย 3' ติดกับตำแหน่งสนิปส์ C/A

Mass_SNP_{DA}-(C/G) 5' GCAGGTCACTTTCTGCAA<u>A</u> 3' ตำแหน่ง A ที่ปลาย 3' ติดกับตำแหน่งสนิปส์ C/G

Mass_SNP_{TAYA}-(A/T) 5' GGACAGACAACTCATAAG<u>C</u> 3' ตำแหน่ง C ที่ปลาย 3' ติดกับตำแหน่งสนิปส์ A/T

เมื่อทำปฏิกิริยา Single-base extension โดยใช้ extension primers ที่ออกแบบไว้ พบว่าตัวอย่างปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Tanzania ชนิดดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ตรวจพบกราฟที่เป็นตำแหน่งสนิปส์ 1 ตำแหน่ง คือ SNP_{TAYA} (allele A และ allele T) (Figure 4) ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากค่า mass ของ extension primer + Single-base extension กล่าวคือ ผลการตรวจดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันชนิดดูรา ตรวจพบกราฟของ allele A ขึ้นที่ตำแหน่ง mass 6455.10 M/Z (ซึ่งเป็นค่า mass ของ extension primers + mass ของ allele A) (Figure 4a) ปาล์มน้ำมันชนิดพิสิเฟอรา ตรวจพบกราฟของ allele T ขึ้นที่ตำแหน่ง mass 6399.20 M/Z (ซึ่งเป็นค่า mass ของ extension primers + mass ของ allele T) (Figure 4b) ส่วนปาล์มน้ำมันชนิดลูกผสมเทเนอรา (พันธุ์สุราษฎร์ธานี 7) ตรวจพบกราฟของ allele A และ allele T ขึ้นทั้ง 2 ตำแหน่งที่ mass 6455.10 และ 6399.20 M/Z ตามลำดับ (ซึ่งเป็นค่า mass ของ extension primers + mass ของ allele A และ ค่า mass extension primers + mass ของ allele T (Figure 4c) สำหรับอีก 3 ตำแหน่ง กลุ่มพันธุ์ Tanzania ตรวจไม่พบสนิปส์

นอกเหนือจากกลุ่มพันธุ์ Tanzania แล้ว ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบยังสามารถตรวจจำแนกชนิดในกลุ่มพันธุ์อื่นๆที่มีรายงานการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ทั้ง 4 ตำแหน่ง ได้แก่ กลุ่มพันธุ์ DAMI, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Yangambi, AVROS และ Calaba ซึ่งสามารถระบุชนิดและประวัติพันธุ์ของปาล์มน้ำมันได้ในคราวเดียว โดยการตรวจวิเคราะห์เพียง 1 ปฏิกิริยาเท่านั้น ราคาของการตรวจสนิปส์ทั้ง 4 ตำแหน่ง ตัวอย่างละ 400 บาท เฉลี่ย 100 บาทต่อสนิปส์ ซึ่งถูกกว่า เมื่อเทียบกับการตรวจด้วยเทคนิค Real time PCR (ราคา 200 บาทต่อสนิปส์) หากเป็นต้นที่ไม่ทราบประวัติพันธุ์มาก่อน ก็จำเป็นต้องตรวจทั้ง 4 ตำแหน่งๆละ 1 ปฏิกิริยา รวม 4 ปฏิกิริยา ต่อ 1 ตัวอย่าง รวมเป็นเงิน 800 บาทต่อตัวอย่าง

นอกจากนี้ ในอนาคตหากมีรายงานสนิปส์ที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติอื่นๆ เช่น ลักษณะต้นเตี้ย ลักษณะสีผลแบบ virescens ฯลฯ ก็สามารถออกแบบไพรเมอร์เพิ่มเติมแล้วนำมาวิเคราะห์รวมกันในปฏิกิริยาเดียวกันได้ สูงสุดถึง 40 สนิปส์ ซึ่งจะทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างและได้ผลการตรวจวิเคราะห์พร้อมกันในคราวเดียว ซึ่งเทคนิค MassARRAY จะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาในการตรวจวิเคราะห์ให้รวดเร็วยิ่งขึ้น อีกทั้งยังมีความแม่นยำสูง เนื่องจากเป็นการวัดน้ำหนักโมเลกุลของเบสในตำแหน่ง

สนิปส์นั้นบนสายดีเอ็นเอ MassARRAY จึงเป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายจากนักวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ ซึ่งปัจจุบันเริ่มมีรายงานการใช้เทคนิคดังกล่าวในการตรวจวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ในข้าว แต่ยังไม่พบรายงานการตรวจตำแหน่งสนิปส์ในปาล์มน้ำมัน

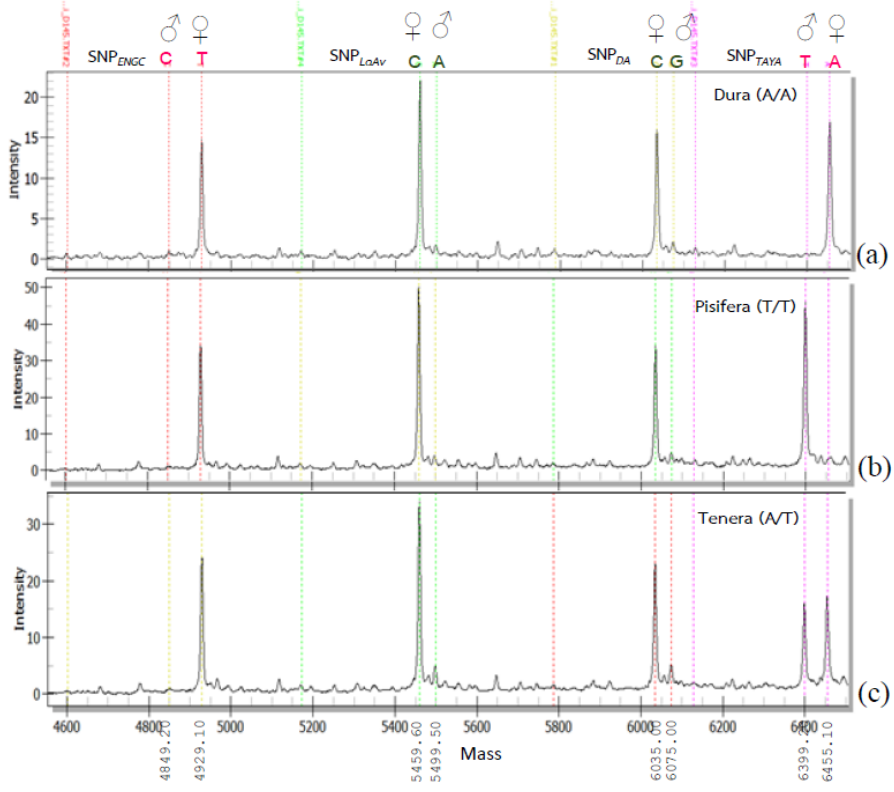

Figure 4 SNP Genotyping test for multiplex detection of four mutation positions; SNP_{ENGC} SNP_{LaAV} SNP_{DA} and SNP_{TaYa} by using MassARRAY, homozygous A/A of dura with in SNP_{TaYa} position (a), homozygous T/T of pisifera with in SNP_{TaYa} position (b), heterozygous A/T of tenera with in SNP_{TaYa} position (c).

สรุปผลการทดลอง

1. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ในการตรวจคัดกรองแบบรวมตัวอย่าง (10 ต้นต่อ 1 ตัวอย่างดีเอ็นเอ) สามารถนำไปตรวจวิเคราะห์และสร้างระบบการตรวจสอบการปนของต้นดูราในแปลงผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันชนิดลูกผสมเทเนอราได้รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย และสามารถตรวจวิเคราะห์กล้าปาล์มในปริมาณมากๆได้ โดยควรทำการตรวจคัดกรองในช่วงกล้าปาล์มน้ำมันมีอายุ 8 - 12 เดือน หลังจากการคัดต้นที่ไม่สมบูรณ์ออกเรียบร้อยแล้ว จะช่วยให้ได้ต้นกล้าที่มีคุณภาพและคุ้มค่ากับการตรวจ หากมีตัวอย่างที่ตรวจไม่ผ่าน จึงนำมาทำการตรวจวิเคราะห์แบบต้นต่อต้นต่อไป

2. การพัฒนาเทคนิค MassARRAY สามารถตรวจสอบหรือพิสูจน์กล้าพันธุ์ปาล์มน้ำมันในกรณีที่ไม่ทราบประวัติพันธุ์ได้อย่างแม่นยำ รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากสามารถตรวจวิเคราะห์สนิปส์ได้ 4 ตำแหน่ง พร้อมกันในคราวเดียว

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. เทคโนโลยีการการตรวจคัดกรองคุณภาพของต้นกล้าปาล์มน้ำมันชนิดลูกผสมเทเนอรา (สุราษฎร์ธานี 7) โดยวิธีรวมตัวอย่าง สามารถตรวจคัดกรองการปนของต้นดูราในแปลงเพาะกล้าให้มีการปนของปาล์มน้ำมันชนิดดูราน้อยที่สุดได้ในระยะเวลารวดเร็ว ช่วยควบคุมคุณภาพกล้าพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้มีคุณภาพได้มาตรฐานตาม พรบ.พันธุ์พืช พ.ศ. 2518 (ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2541)

2. เกษตรกรจะได้รับกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมเทเนอราที่มีคุณภาพดี ถูกต้องตรงตามพันธุ์และให้ผลผลิตสูงไปปลูก เป็นการช่วยเพิ่มผลผลิตต่อไร่

3. หน่วยงานที่เกี่ยวข้องสามารถนำเทคนิค MassARRAY ไปใช้ในการจำแนกกลุ่มพันธุ์และชนิดของปาล์มน้ำมัน เพื่อประโยชน์ในการสร้างแปลงพ่อหรือแม่พันธุ์ในการผลิตต้นกล้าที่มีคุณภาพ รวมทั้งใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการปาล์มน้ำมัน. โรงพิมพ์ดอกเบี้ย กรุงเทพฯ. 188 หน้า.

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ อรรัตน์ วงศ์ศรี และ นัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ. 2558. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล. รายงานผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2558. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 17-44.

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

Chow W.Y. 2540. การจัดการเพาะชำต้นกล้าปาล์ม การคัดเลือกและการคัดทิ้ง. ใน: ปาล์มน้ำมัน การใช้ปุ๋ยและการจัดการสวนปาล์มน้ำมัน. ฝ่ายวิจัยปาล์มน้ำมัน สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 87-93.

Mayes, S., P.L. Jack and R.H. Corley. 2001. The use of molecular marker to investigate the genetic structure of oil palm breeding program. Heredity 85 (3): 288-293.

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. 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 controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. Nature 500 (7462): 340-4.