

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี rhAmp SNP Genotyping ตรวจสอบยีนควบคุมความหอม
เพื่อการรับรองคุณภาพแปลงแม่พันธุ์มะพร้าวน้ำหอมแท้
Application of rhAmp SNP Genotyping for Detection of Aroma-Associated Genes
and Quality Certification of Authentic Aromatic Coconut Mother Palms

ประสาน สืบสุข¹ กุหลาบ คงทอง¹ สุภาวดี จ้อเหรียญ¹ วิไลวรรณ ทวิชศรี²
ยุดา สลับศรี³ หยกทิพย์ สุตารีย์⁴ ศิวัช พลายเสน⁵ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์¹
Prasarn Seubsuk¹ Kularb Kongthong¹ Suphawadee Ngorian¹ Wilaiwan Twishsri²
Payuda Salabsri³ Yokthip Sudaree⁴ Siwat Plaisen⁵ Piyarat Thammakijawat¹

บทคัดย่อ

มะพร้าว น้ำหอมเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่กำลังประสบปัญหาการปะปนพันธุ์ที่ไม่หอมจากการผสมข้ามพันธุ์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพผลผลิตและความเชื่อมั่นในอุตสาหกรรมมะพร้าวไทย งานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคโนโลยี rhAmp SNP genotyping เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของยีน *badh2* ที่ควบคุมการสร้างสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) สำหรับการรับรองคุณภาพต้นแม่พันธุ์และต้นกล้า จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบตำแหน่ง single nucleotide polymorphism (SNP) จำเพาะบริเวณ exon 14 บนโครโมโซมที่ 1 ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับลักษณะความหอม โดยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถจำแนกจีโนไทป์ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ มะพร้าว น้ำหอมแท้ มะพร้าวไม่หอม และมะพร้าวพันธุ์ทาง ผลการตรวจสอบความแม่นยำเทียบกับปริมาณสารหอม 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS ในตัวแทนผลมะพร้าว พบว่ามีความถูกต้องร้อยละ 100 เมื่อนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในแปลงแม่พันธุ์และต้นกล้าจำนวน 4,355 ตัวอย่าง จาก 8 แหล่งผลิต พบว่าระดับความบริสุทธิ์มีความแปรปรวนตั้งแต่ร้อยละ 88.05 ถึง 100 ซึ่งข้อมูลนี้ช่วยระบุแหล่งผลิตและบริหารจัดการแปลงแม่พันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ จุดเด่นสำคัญของงานวิจัยนี้คือการวิเคราะห์ความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์และการลงทุน โดยพบว่าเทคโนโลยีนี้มีต้นทุนการตรวจเพียง 200 บาทต่อตัวอย่าง ซึ่งถือเป็นการลงทุนที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับผลตอบแทน โดยเฉพาะการลงทุนตรวจรับรองแม่พันธุ์เพียงครั้งเดียว แต่สามารถสร้างผลกำไรในระยะยาวได้อย่างยั่งยืน การรับรองสายพันธุ์ช่วยยกระดับมาตรฐานสินค้าสู่เกรดพรีเมียม ส่งผลให้ราคาจำหน่ายต้นกล้าปรับตัวสูงขึ้นจากเดิม 50 บาท เป็น 90 บาท หรือคิดเป็นส่วนต่างกำไร

¹กองวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ รังสิต ธัญบุรี ปทุมธานี 12110

¹Biotechnology Research and Development Office, Rangsit, Thanyaburi, Pathum Thani, 12110

²สถาบันวิจัยพืชสวน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

²Horticultural Research Institute, Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900

³ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรราชบุรี ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี 70120

³Ratchaburi Agricultural Research and Development Center, Khao Cha-Ngum, Photharam, Ratchaburi, 70120

⁴ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ต.วิสัยใต้ อ.สวี จ.ชุมพร 86130

⁴Chumphon Horticultural Research Centre, Wisai Tai, Sawi, Chumphon, 86130

⁵กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

⁵Postharvest and Processing Research and Development Division, Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900

ที่เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 80 จากการประเมินผลตอบแทนในระดับแปลงผลิต พบว่าสามารถสร้างรายได้ส่วนเพิ่มให้แก่เกษตรกรได้สูงถึง 108,000 บาทต่อไร่ต่อปี นวัตกรรมนี้จึงไม่เพียงช่วยลดความเสี่ยงและแก้ปัญหการปะปนทางพันธุกรรม แต่ยังเป็นกลไกสำคัญในการสร้างมูลค่าเพิ่มและยกระดับขีดความสามารถในการแข่งขันของอุตสาหกรรมมะพร้าวหอมไทยในตลาดโลก

คำหลัก: มะพร้าวหอม, ยีน *badh2*, เทคนิค rhAmp SNP genotyping, ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม

ABSTRACT

Aromatic coconut is an economically important crop currently facing challenges regarding contamination by non-aromatic varieties due to cross-pollination, which directly impacts produce quality and confidence in the Thai coconut industry. This research aimed to develop and apply rhAmp SNP genotyping technology to verify the genetic identity of the *badh2* gene, which regulates the synthesis of the aromatic compound 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), for the quality certification of mother plants and seedlings. Nucleotide sequence analysis identified a specific single nucleotide polymorphism (SNP) located at exon 14 on chromosome 1, directly associated with the aromatic trait. The developed assay successfully classified genotypes into three distinct groups: true aromatic, non-aromatic, and heterozygous coconuts. Validation against 2AP quantification using GC-MS in coconut fruit samples demonstrated 100% accuracy. When applied to assess genetic purity in 4,355 mother plant and seedling samples from 8 production sources, purity levels were found to vary from 88.05% to 100%, effectively aiding in the identification of production sources and the management of high-risk mother plant plots. A key highlight of this research is the analysis of economic viability and investment. The technology offers a testing cost of only 200 baht per sample, representing a very low investment compared to the returns, particularly as a one-time investment for mother plant certification that generates sustainable long-term profits. Varietal certification elevates product standards to premium grade, driving an increase in seedling selling prices from 50 baht to 90 baht, representing an 80% increase in profit margin. Returns assessment at the plot level indicated that this approach can generate additional income for farmers of up to 108,000 baht per rai per year. Consequently, this innovation not only mitigates risks and resolves genetic contamination issues but also serves as a vital mechanism for creating value-added products and enhancing the competitiveness of the Thai aromatic coconut industry in the global market.

Keywords: aromatic coconut, *badh2* gene, rhAmp SNP genotyping, genetic purity

คำนำ

มะพร้าว นับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและมีศักยภาพสูงของประเทศไทย โดยเฉพาะพันธุ์น้ำหอม ซึ่งเป็นมะพร้าวกลุ่มต้นเดี่ยวสีเขียวที่มีคุณสมบัติพิเศษคือความหอมหวานของน้ำและเนื้อมะพร้าวที่เป็นเอกลักษณ์ กลิ่นหอมดังกล่าวเกิดจากสารระเหยสำคัญคือ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งเป็นสารให้ ความหอมชนิดเดียวกับที่พบในข้าวหอมมะลิและใบเตย ความนิยมในมะพร้าว น้ำหอมไทยได้ขยายตัว อย่างต่อเนื่องในตลาดโลก สร้างมูลค่าการส่งออกมหาศาล อย่างไรก็ตาม อุตสาหกรรมมะพร้าว น้ำหอม ของไทยกำลังเผชิญกับความท้าทายที่สำคัญจากปัญหาการปะปนของพันธุ์ที่ไม่หอม ซึ่งมักเกิดจาก การผสมข้ามพันธุ์ตามธรรมชาติ เนื่องจากมะพร้าวเป็นพืชที่สามารถผสมข้ามได้ง่าย การปะปนนี้ส่งผลให้ เกษตรกรต้องรับความเสี่ยงในการปลูกต้นกล้าที่ไม่ใช่พันธุ์แท้ ซึ่งไม่สามารถจำแนกได้ด้วยตาเปล่าในระยะ ต้นกล้า และต้องรอเวลานานถึง 3-4 ปีกว่าจะทราบผลเมื่อต้นเริ่มให้ผลผลิต การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ในระดับพันธุกรรมจึงเป็นแนวทางสำคัญในการแก้ไขปัญหาอย่าง ยั่งยืน เพื่อสร้างความเชื่อมั่นและยกระดับมาตรฐานการผลิตมะพร้าว น้ำหอมของไทยสู่สากล

ความก้าวหน้าทางพันธุศาสตร์โมเลกุลได้นำไปสู่การค้นพบยีนควบคุมความหอมในพืชหลายชนิด สำหรับในมะพร้าว น้ำหอม การศึกษาโดยใช้เทคนิค transcriptome sequencing และการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้บ่งชี้ว่ายีนที่ควบคุมการสร้างสารหอมคือ *badh2* ซึ่งทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase โดยในมะพร้าวพันธุ์ไม่หอม ซึ่งยีนนี้จะทำหน้าที่ยับยั้งการสะสม ของสาร 2AP แต่ในมะพร้าว น้ำหอมได้มีการค้นพบความผันแปรทางพันธุกรรมแบบ สนิปส์ (single nucleotide polymorphism; SNP) ที่มีความจำเพาะเจาะจง โดยพบการแทนที่ของเบสจากกวานีน (G) เป็นไซโตซีน (C) บน exon ที่ 14 ของยีน *badh2* ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนและทำให้ เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ นำไปสู่การสะสมของสารหอม 2AP ในที่สุด (Vongvanrungruang *et al.*, 2016 และ Saensuk *et al.*, 2016) องค์ความรู้พื้นฐานเหล่านี้ยืนยันได้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล ที่จำเพาะต่อจุดกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นบนยีนที่มีการแสดงออก (Functional Marker) เป็นเครื่องมือที่มี ประสิทธิภาพสูงในการคัดแยกมะพร้าว น้ำหอมแท้ออกจากมะพร้าวที่ไม่หอมหรือมะพร้าวลูกผสมได้

ในปัจจุบันเทคโนโลยีการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP genotyping ได้รับการพัฒนา อย่างรวดเร็วเพื่อให้รองรับการตรวจสอบจำนวนมาก แม่นยำ และมีต้นทุนที่เหมาะสม เทคนิคเป็นที่นิยม เช่น TaqMan และ KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) แม้จะมีประสิทธิภาพดีแต่ยังมีข้อจำกัด บางประการ โดย TaqMan มีต้นทุนต่อตัวอย่างที่สูงและมีความยืดหยุ่นในการออกแบบ assay น้อยกว่า ในขณะที่ KASP มีต้นทุนต่ำกว่า ให้สัญญาณการแยกที่ไม่ชัดเจนในบางกรณี ซึ่งส่งผลต่อความแม่นยำ ในการอ่านผล ล่าสุดได้มีการพัฒนาเทคโนโลยี rhAmp SNP genotyping (RNase H2-dependent PCR) ซึ่งใช้กลไกการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ RNase H2 และ primer แบบ DNA-RNA hybrid ที่ถูก บล็อกไว้ (blocked primers) โดยปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการจับคู่กัน อย่างสมบูรณ์ (perfect match) ของ primer กับดีเอ็นเอต้นแบบเท่านั้น ทำให้มีความจำเพาะสูงมาก ลดปัญหาสัญญาณรบกวนจาก primer-dimer และสามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลได้อย่างแม่นยำ กว่าเทคนิคเดิม จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างแพลตฟอร์ม พบว่าเทคนิค rhAmp ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีคุณภาพสัญญาณสูง มีการแยกกลุ่มของจีโนไทป์ที่ชัดเจน และมีต้นทุนต่อหน่วย ที่คุ้มค่าสำหรับการใช้งานในระดับพันธุกรรม (Ayalew *et al.*, 2019)

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคโนโลยี rhAmp SNP genotyping ในการ ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของยีน *badh2* เพื่อพัฒนาระบบการรับรองคุณภาพพันธุ์มะพร้าว

น้ำหอมที่มีประสิทธิภาพสูง รวดเร็ว และแม่นยำ โดยมีเป้าหมายเพื่อใช้เป็นเครื่องมือมาตรฐานในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของต้นแม่พันธุ์และคัดกรองต้นกล้าในกระบวนการผลิตเชิงพาณิชย์ การนำเทคโนโลยีนี้มาใช้ไม่เพียงแต่จะช่วยแก้ปัญหาการปะปนพันธุ์ที่ไม่หอมในแปลงปลูก ซึ่งเป็นปัญหาที่เกษตรกรเผชิญมาอย่างต่อเนื่อง แต่ยังเป็นการยกระดับเทคโนโลยีการปรับปรุงพันธุ์พืชของกรมวิชาการเกษตรให้มีความทันสมัย รองรับการแข่งขันในตลาดโลก และส่งเสริมความยั่งยืนให้กับอุตสาหกรรมมะพร้าว น้ำหอมของประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างใบเพศลัดที่ไม่มีโรคหรือแมลงเข้าทำลายจากต้นแม่พันธุ์ ต้นกล้าของมะพร้าว น้ำหอม และมะพร้าวไม่หอมจากแปลงรวบรวมพันธุ์แปลงปลูกของแหล่งต่าง ๆ ประกอบด้วย แปลงปลูกศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร และแปลงเกษตรกรผู้ผลิตมะพร้าว น้ำหอมในพื้นที่การค้าหลัก 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดราชบุรี (3 แหล่งผลิต) จังหวัดนครปฐม (1 แหล่งผลิต) และจังหวัดสมุทรสาคร (3 แหล่งผลิต)
2. สารเคมีที่ใช้ในงานชีวโมเลกุล ได้แก่ ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช HOT FIREPol Blend Master Mix (Solis BioDyne, Estonia) rhAmp genotyping Master Mix และ rhAmp Reporter Mix และอื่น ๆ
3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermal Cycler GeneAmp PCR System (Applied Biosystems, USA) เครื่อง Real-time PCR (QuantStudio 5 Real-Time PCR) (Applied Biosystems, USA) และเครื่องด้านชีวโมเลกุลอื่น ๆ

วิธีการ

1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อยีนความหอมในมะพร้าว

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการตรวจสอบความแปรผันของลำดับดีเอ็นเอบนยีน *badh2* ซึ่งเป็นยีนหลักที่ควบคุมลักษณะความหอม (สาร 2-acetyl-1-pyrroline; 2AP) กับมะพร้าวกลุ่มสีเขียวต้นเดี่ยวที่เป็นพันธุ์มะพร้าว น้ำหอม และมะพร้าวไม่หอม ดังนี้

1.1 การสกัดและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ ดำเนินการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบของมะพร้าว น้ำหอม และมะพร้าวไม่หอม โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Plant Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ตามขั้นตอนที่ระบุโดยผู้ผลิต จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (BioDrop, UK) และตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพเจลแล้วทำการเจือจางดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้นที่ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อคงสภาพสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการวิเคราะห์ลำดับยีน *badh2* ในขั้นตอนต่อไป

1.2 การออกแบบ primer ที่จำเพาะกับยีนความหอมในมะพร้าว ค้นหาลำดับเบสของยีน *badh2* จากฐานข้อมูล NCBI และนำมาวิเคราะห์หาตำแหน่งของยีนบนจีโนมของมะพร้าว นำลำดับเบสที่ได้มาออกแบบ primer ให้ชนบางข้าง (Flanking sequences) ของยีน *badh2* โดยใช้โปรแกรม BatchPrimer 3 จากนั้นจึงสังเคราะห์ primer จากบริษัท Integrated DNA Technologies (IDT), USA (Table 1) เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

1.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *badh2* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดำเนินการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายของยีน *badh2* จากตัวอย่างมะพร้าว น้ำหอมและมะพร้าวไม่หอม โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับยีนความหอม ปฏิกิริยาพีซีอาร์ดำเนินการโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป HOT FIREPol Blend Master Mix (Solis BioDyne, Estonia) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Hot-start DNA Polymerase ช่วยเพิ่มความจำเพาะและความแม่นยำในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาและตั้งค่าสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามรายละเอียดที่ระบุในคู่มือของชุดน้ำยา จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *badh2* มาตรวจสอบความถูกต้องของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ภายใต้แสงยูวี (UV Transilluminator) บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอเพื่อยืนยันความจำเพาะของ primer ก่อนนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

1.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการตรวจหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *badh2* โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการตรวจสอบขนาดความถูกต้องแล้วไปหาลำดับเบสด้วยเทคโนโลยี Fast Next Generation Sequencing เพื่อให้ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมและแม่นยำ จากนั้นนำข้อมูลดิบในรูปแบบไฟล์ FASTQ ที่ได้ไปทำการประมวลผลผ่านระบบชีวสารสนเทศบนแพลตฟอร์ม Galaxy Australia (<https://usegalaxy.org.au>) โดยการจัดเรียงลำดับเบส (read mapping) เข้ากับลำดับอ้างอิง (reference sequence) ของลำดับดีเอ็นเอที่ครอบคลุมยีน *badh2* บนจีโนมมะพร้าว โดยใช้โปรแกรม minimap 2 พร้อมทั้งตรวจสอบและเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอระหว่างมะพร้าวพันธุ์น้ำหอม กับมะพร้าวไม่หอม ผ่านโปรแกรม IGV (integrative genomics viewer) เพื่อระบุตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของเบสต่าง ๆ และระบุตำแหน่งสโนิปส์ที่สัมพันธ์กับลักษณะความหอมและการกลายพันธุ์เฉพาะของแต่ละอัลลีล โดยข้อมูลตำแหน่งสโนิปส์ที่ระบุได้จากการศึกษานี้จะถูกนำไปใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอในระบบ rhAmp SNP genotyping สำหรับการตรวจสอบและรับรองพันธุ์มะพร้าวไม่หอมในระดับแม่นยำสูงต่อไป

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสโนิปส์ของยีนควบคุมความหอมมะพร้าวด้วยวิธี rhAmp SNP genotyping

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการตรวจหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสโนิปส์บนยีน *badh2* ที่ควบคุมการสร้างสารหอม และจำแนกจีโนไทป์ของมะพร้าว น้ำหอม (aromatic) ออกจากมะพร้าวไม่หอม (non-aromatic) และพันธุ์ทาง (heterozygous) ด้วยเทคนิค rhAmp SNP genotyping และการพิสูจน์ความแม่นยำของตำแหน่งสโนิปส์ กับวิธีวิเคราะห์สารหอมด้วยเครื่อง GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

2.1 การออกแบบชุด primer สำหรับตรวจสอบด้วยเทคโนโลยี rhAmp โดยนำข้อมูลความแตกต่างของลำดับเบส (ตำแหน่งสโนิปส์) บนยีน *badh2* ที่สัมพันธ์กับลักษณะความหอมในมะพร้าวมาใช้ออกแบบ rhAmp SNP Assay หรือชุด primer สำหรับตรวจสอบด้วยระบบ rhAmp SNP genotyping (Integrated DNA Technologies, USA) ทำการออกแบบ rhAmp primers จำนวน 3 เส้น คือ 1) allele-specific primer 1 (ASP1) ที่จำเพาะต่อเบส C ตรวจสอบด้วยสี FAM ซึ่งเป็นอัลลีลหอม 2) allele-specific primer 2 (ASP2) ที่จำเพาะต่อเบส G ตรวจสอบด้วยสี Yakima Yellow ซึ่งเป็นอัลลีลไม่หอม และ 3) locus-specific reverse primer (LSRP) (Table 1)

2.2 การตรวจสอบตำแหน่งสโนิปส์ด้วยวิธี rhAmp SNP genotyping ดำเนินการตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอแบบสโนิปส์ที่สัมพันธ์กับลักษณะความหอมในมะพร้าวโดยใช้ primer ที่จำเพาะกับตำแหน่งสโนิปส์ในข้อ 2.1 เพิ่มปริมาณและตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้

ชุดน้ำยาตรวจสอบของระบบ rhAmp SNP genotyping โดยเตรียมปฏิกิริยาปรีมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย rhAmp genotyping Master Mix and Reporter (2X) (ที่มีนิวคลีโอไทด์ติดฉลาก FAM และ Yakima Yellow อยู่ในส่วนผสม) 5.3 ไมโครลิตร, rhAmp SNP Assay (20X) 0.5 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอต้นแบบ (10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร, nuclease-free water 3.2 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QuantStudio 5 Real-Time PCR โดยตั้งค่าสภาวะการทำปฏิกิริยาดังที่แสดงในคู่มือการใช้งาน rhAmp SNP genotyping (Integrated DNA Technologies, USA) คือ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 68 องศาเซลเซียส 20 วินาที ต่อเนื่องกัน 40 รอบ การวิเคราะห์และบันทึกข้อมูลตำแหน่งสปีส์โดยสร้าง allelic discrimination plot ด้วยโปรแกรม QuantStudio Design & Analysis Software เพื่อจำแนกกลุ่มตัวอย่าง แปลผลข้อมูลโดยพิจารณาการกระจายตัวของข้อมูลจากกราฟ allelic discrimination plot ซึ่งสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างตามค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์บนแกน X และแกน Y ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 จีโนไทป์ homozygous C/C ลักษณะกราฟของกลุ่มข้อมูลปรากฏขีดแกน Y สัญลักษณ์สีมีจุดสีน้ำเงิน (blue) กลุ่มที่ 2 จีโนไทป์ homozygous G/G ลักษณะกราฟของกลุ่มข้อมูลปรากฏขีดแกน X สัญลักษณ์สีมีจุดสีแดง (red) กลุ่มที่ 3 จีโนไทป์ heterozygous C/G ลักษณะกราฟของกลุ่มข้อมูลปรากฏอยู่กึ่งกลาง ระหว่างแกน X และ Y สัญลักษณ์สีมีจุดสีเขียว (green) บันทึกข้อมูลรูปแบบการเกิดสปีส์แบบต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจยืนยันความหอมของมะพร้าว ต่อไป

2.3 การพิสูจน์ความแม่นยำของการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยี rhAmp SNP genotyping กับลักษณะฟีโนไทป์ความหอมจากสาร 2AP ด้วยวิธีวิเคราะห์สารหอมด้วยเครื่อง GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) ดวงมวล (2560) โดยนำตัวอย่างน้ำมะพร้าวจากผลที่มีอายุ 8 เดือน จากต้นแม่พันธุ์ที่มีจีโนไทป์ homozygous C/C, heterozygous C/G และ homozygous G/G มาสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งเป็นสารหลักที่ให้ความหอมเทียบกับสารมาตรฐาน 2AP เพื่อยืนยันผลความหอมทางเคมีที่แม่นยำ

3. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี rhAmp SNP genotyping เพื่อตรวจยืนยันความหอมในต้นแม่พันธุ์และต้นกล้ามะพร้าวน้ำหอม

นำเทคโนโลยีที่มีความแม่นยำสูง rhAmp SNP genotyping ที่พัฒนาได้ มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมเพื่อระบุยืนยันความหอมในแปลงแม่พันธุ์ และต้นกล้า โดยเก็บตัวอย่างจากแปลงศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร และแปลงเกษตรกรผู้ปลูกมะพร้าวน้ำหอม มีขั้นตอนการดำเนินงาน ดังนี้

3.1 ตัวอย่างกลุ่มต้นแม่พันธุ์ ดำเนินการเก็บตัวอย่างใบมะพร้าวเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม โดยการเก็บตัวอย่างจากแปลงเกษตรกร จังหวัดราชบุรี จังหวัดนครปฐม จังหวัดสมุทรสาคร และศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร จังหวัดชุมพร รวม 8 แหล่งผลิต รวมทั้งหมด 2,139 ตัวอย่าง (Table 2) เพื่อประเมินคุณภาพด้านยืนยันความหอมของต้นแม่พันธุ์ในแปลงผลิต

3.2 ตัวอย่างกลุ่มต้นกล้า ดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างจากต้นกล้าของแปลงแม่พันธุ์ในระยะเตรียมจำหน่าย หรือเตรียมปลูก จากแหล่งผลิตของเกษตรกร จังหวัดราชบุรี จังหวัดนครปฐม และ จังหวัดสมุทรสาคร รวม 5 แหล่งผลิต รวมทั้งหมด 2,216 ตัวอย่าง (Table 3) เพื่อติดตามการกระจายตัวทางพันธุกรรมของต้นกล้า

3.3 การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค rhAmp SNP genotyping นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบจีโนไทป์ของยีนความหอม (*badh2*) บริเวณ exon 14 ซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) โดยใช้เทคนิค rhAmp SNP genotyping ด้วยชุด primer ที่จำเพาะเจาะจง (Table 1) เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยการผสมสารเคมี ตามวิธีการในข้อ 2.2 และอ่านผลสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพื่อจำแนกกลุ่มพันธุ์กรรม

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลและเกณฑ์การประเมิน การวิเคราะห์จีโนไทป์จะถูกจำแนกออกเป็น 3 รูปแบบ ตามลักษณะอัลลีลที่ปรากฏ ได้แก่ 1) homozygous C/C จีโนไทป์แบบหอมแท้ (aromatic) 2) heterozygous C/G จีโนไทป์แบบพันธุ์ทาง 3) homozygous G/G จีโนไทป์แบบไม่หอม (non-aromatic) ข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อคำนวณร้อยละความบริสุทธิ์ทางพันธุ์กรรมของแต่ละแหล่งผลิต และทำการจัดกลุ่มศักยภาพของแปลงแม่พันธุ์และแหล่งผลิตต้นกล้า โดยเกณฑ์การจัดกลุ่มแบ่งตามระดับความบริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการรับรองมาตรฐานและการบริหารจัดการแปลงต่อไป

เวลาและสถานที่ดำเนินการวิจัย

เริ่มดำเนินการวิจัย พฤษภาคม 2565 ถึง กันยายน 2568 ณ กองวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อยีนความหอมในมะพร้าว

1.1 การออกแบบ primer และการตรวจสอบความจำเพาะ จากการสืบค้นข้อมูลพันธุ์กรรมของยีน *badh2* ซึ่งเป็นยีนหลักที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์สารหอม (2AP) ในมะพร้าว พบว่ายีนดังกล่าวปรากฏอยู่บนจีโนมมะพร้าวโครโมโซมที่ 1 (GenBank accession GCA 003604295.2, CM084730.1) คณะผู้วิจัยจึงได้ดำเนินการออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะ จำนวน 3 คู่ (Table 1) โดยครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายตั้งแต่ตำแหน่งที่ 41,202,727 ถึง 41,207,762 ของโครโมโซมที่ 1 เมื่อนำ primer ที่ออกแบบได้ไปทดสอบประสิทธิภาพด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์กับตัวอย่างจีโนมที่ดีเอ็นเอของมะพร้าวน้ำหอมและมะพร้าวไม่หอม พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอเดี่ยวที่มีความคมชัด ตรงตามขนาดที่คาดการณ์ไว้ คือมีขนาด 1,413 1,802 และ 1,900 คู่เบส ตามลำดับ (Table 1) และไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมาย

1.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบความแตกต่างในยีน *badh2* จากการนำผลผลิตพีซีอาร์ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยี Fast Next Generation Sequencing และนำข้อมูลดิบ FASTQ files มาประมวลผลผ่านระบบ galaxy australia โดยใช้โปรแกรม minimap2 สำหรับการจัดเรียงลำดับเบสเทียบกับจีโนมอ้างอิง ผลการวิเคราะห์ยืนยันว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นส่วนของยีน *badh2* อย่างแท้จริง จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างกลุ่มตัวอย่างมะพร้าวน้ำหอมและมะพร้าวไม่หอมด้วยโปรแกรม integrative genomics viewer พบความแตกต่างทางพันธุ์กรรมแบบสลับอย่างชัดเจนที่บริเวณ exon ที่ 14 ของยีน ณ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 41,206,736 (อ้างอิงตาม accession CM084730.1) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะฟีโนไทป์ (Figure 1A) คือ 1) กลุ่มมะพร้าวไม่หอม (non-aromatic) ตรวจพบเบสเป็น G โดยพบรูปแบบจีโนไทป์ 2 ลักษณะ คือ homozygous G/G (ไม่หอมแท้) และ heterozygous C/G (ไม่หอมพันธุ์ทาง) 2) กลุ่มมะพร้าวน้ำหอม (aromatic) ตรวจพบการแทนที่ของเบสเป็น C โดยมีรูปแบบจีโนไทป์เป็น

homozygous C/C (หอมแท้) เพียงรูปแบบเดียว ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Vongvanrungruang *et al.*, 2016 และ Saensuk *et al.*, 2016 ที่ได้พบการเปลี่ยนแปลงของเบสดังกล่าวสัมพันธ์กับความหอมในมะพร้าว น้ำหอม และยังพบว่าลำดับเบสที่อยู่บนข้างตำแหน่งสนิปส์มีความเหมาะสมกับการนำไปออกแบบ primer เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจโดยใช้ rhAmp SNP genotyping ในขั้นตอนต่อไป

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสนิปส์ของยีนควบคุมความหอมมะพร้าวด้วยวิธี rhAmp SNP genotyping

2.1 การตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ด้วยวิธี rhAmp SNP genotyping จากการพัฒนาชุด primer rhAmp SNP Assay เพื่อจำแนกกลุ่มประชากรมะพร้าว 3 กลุ่ม ได้แก่ มะพร้าวน้ำหอม, มะพร้าวไม่หอม และมะพร้าวลูกผสม (พันธุ์ทาง) พบว่าสภาวะที่มีความเหมาะสมที่สุดในการทดสอบคือการใช้ปริมาณ ดีเอ็นเอต้นแบบที่ระดับ 10 นาโนกรัม ร่วมกับชุดน้ำยา rhAmp genotyping master mix และ rhAmp reporter mix ตามข้อกำหนดของผู้ผลิต ภายใต้สภาวะดังกล่าว ปฏิกริยาสามารถเพิ่มปริมาณ ขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายและส่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ชนิด FAM และ Yakima Yellow ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ทำให้สามารถวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูลผ่านกราฟ allelic discrimination plot และจำแนกรูปแบบจีโนไทป์ที่สัมพันธ์กับลักษณะความหอมได้เป็น 3 กลุ่ม อย่างชัดเจนและแม่นยำ (Figure 1B) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 จีโนไทป์แบบ homozygous dominance (G/G) ผลการวิเคราะห์ปรากฏเป็นจุดสีแดง (Red Cluster) บนกราฟ ซึ่งบ่งชี้ถึงสภาพของยีนเด่นที่เข้าคู่กัน สัมพันธ์กับการแสดงออกทางฟีโนไทป์ ในลักษณะไม่หอม จัดเป็นกลุ่มมะพร้าวไม่หอมแท้ (non-aromatic homozygous)

กลุ่มที่ 2 จีโนไทป์แบบ heterozygous dominance (C/G) ผลการวิเคราะห์ปรากฏเป็นจุดสีเขียว (green cluster) บ่งชี้ถึงสภาพทางพันธุกรรมที่มีทั้งยีนเด่นและยีนด้อยจับคู่กัน จัดเป็นกลุ่มพันธุ์ทาง (heterozygous/carrier) ซึ่งในทางสัณฐานวิทยาจะไม่แสดงลักษณะความหอม

กลุ่มที่ 3 จีโนไทป์แบบ homozygous recessive (C/C) ผลการวิเคราะห์ปรากฏเป็นจุดสีน้ำเงิน (blue cluster) บ่งชี้ถึงคู่ของยีนด้อยที่เหมือนกัน ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับการแสดงออกทางฟีโนไทป์ในลักษณะหอม จัดเป็นกลุ่มมะพร้าวน้ำหอมแท้ (aromatic homozygous) ซึ่งเป็นลักษณะทางพันธุกรรม เป้าหมายที่ต้องการในการคัดเลือก

2.2 การพิสูจน์ความแม่นยำของการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยี rhAmp SNP genotyping จากการตรวจสอบความแม่นยำของเทคนิค rhAmp SNP genotyping เพื่อจำแนกความหอมในมะพร้าว เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นหอมหลักด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Table 2) พบว่ารูปแบบ จีโนไทป์ที่ตรวจสอบได้มีความสอดคล้องกับลักษณะฟีโนไทป์ของความหอม โดยสามารถจำแนกกลุ่ม ตัวอย่างออกได้เป็น 3 กลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรม ได้แก่ กลุ่มที่เป็น homozygous ของอัลลีล ความหอม (C/C) จำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งตรวจพบปริมาณสาร 2-AP ในระดับสูง ระหว่าง 202.12 ถึง 547.34 มิลลิกรัมต่อลิตร และจัดเป็นกลุ่มที่มีความหอม กลุ่มที่สองคือกลุ่ม heterozygous อัลลีล พันธุ์ทาง (C/G) จำนวน 8 ตัวอย่าง และกลุ่มที่สามคือ homozygous ของอัลลีลไม่หอม (G/G) จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งทั้งสองกลุ่มหลังนี้ตรวจไม่พบสาร 2-AP (ND) หรือพบในปริมาณที่ต่ำกว่าขีดจำกัดของการ วัดปริมาณ (<LOQ ที่ 16.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำให้จัดเป็นกลุ่มไม่มีความหอม ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเทคนิค rhAmp SNP genotyping ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพสูงในการคัดแยกมะพร้าวน้ำหอมออกจากมะพร้าวที่ไม่มีความหอม โดยมีความแม่นยำร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน GC-MS ในตัวอย่างผลมะพร้าวที่ทดสอบ

การศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิค rhAmp SNP genotyping เพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกความหอมในมะพร้าว แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการพัฒนาวิธีที่มีความแม่นยำและคุ้มค่าสูง โดยจากการทดสอบสถานะที่เหมาะสมด้วยการใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ 10 นาโนกรัม ร่วมกับชุดน้ำยา rhAmp genotyping Master Mix และ Reporter Mix พบว่าปฏิกิริยาสามารถสร้างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ชนิด FAM และ Yakima Yellow ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ส่งผลให้สามารถจำแนกกลุ่มประชากรมะพร้าวออกเป็น 3 กลุ่มจีโนไทป์ได้อย่างชัดเจนผ่านกราฟ allelic discrimination plot ได้แก่ กลุ่ม homozygous ยีนเด่น (G/G) ซึ่งเป็นมะพร้าวไม่หอมแท้ กลุ่ม heterozygous (C/G) หรือมะพร้าวพันธุ์ทางที่ไม่แสดงลักษณะความหอม และกลุ่มเป้าหมายคือ homozygous ยีนด้อย (C/C) ซึ่งเป็นมะพร้าวน้ำหอมแท้ ความโดดเด่นของผลงานวิจัยนี้คือประสิทธิภาพที่เหนือกว่าวิธีมาตรฐานเดิมอย่าง TaqMan SNP genotyping ทั้งในด้านความแม่นยำและต้นทุน โดยกลไกสำคัญที่ทำให้ rhAmp มีความแม่นยำสูงเกิดจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ RNase H2 และ RNA-DNA hybrid primers ช่วยลดการจับกันเองของ primer (primer-dimer) และลดการเกิดผลผลิตที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ayalew *et al.* (2019) Broccanello *et al.*, (2018) ที่ได้อธิบายไว้ว่าระบบของ rhAmp ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างของอัลลีล (allele discrimination) ได้อย่างคมชัด ช่วยลดอัตราการเกิดผลบวกปลอม (false positive) และสร้างความเชื่อมั่นต่อผลวิเคราะห์ได้ดีกว่าเทคนิคดั้งเดิม เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลวิเคราะห์ทางพันธุกรรม ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบเทียบเคียงกับลักษณะฟีโนไทป์จริงโดยการวัดปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ด้วยเทคนิค GC-MS ผลปรากฏว่ามีความสอดคล้องกับผลตรวจจีโนไทป์แบบร้อยละ 100 กล่าวคือ กลุ่มที่มีจีโนไทป์แบบ C/C ตรวจพบสาร 2AP ในระดับสูง (202.12-547.34 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในขณะที่กลุ่ม C/G และ G/G ไม่พบสารหอมหรือพบน้อยกว่าขีดจำกัดการวัด ผลการทดลองนี้ไม่เพียงแต่ยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล แต่ยังยืนยันลักษณะทางพันธุศาสตร์ของความหอมในมะพร้าวว่าเป็นลักษณะด้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saensuk *et al.*, (2016) ที่ระบุว่าความหอมถูกควบคุมโดยยีน *betaine aldehyde dehydrogenase 2 (badh2)* หรือ *amadh* โดยการกลายพันธุ์ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ส่งผลให้เกิดการสะสมของสาร 2-AP ซึ่งเป็นกลไกเดียวกับที่พบในข้าวหอมมะลิ Bradbury *et al.*, (2005)

การวิเคราะห์ความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์และผลตอบแทนจากการลงทุนในด้านความคุ้มค่าของการนำนวัตกรรมมาประยุกต์ใช้ เทคนิค rhAmp SNP genotyping มีจุดเด่นสำคัญที่ต้นทุนค่าสารเคมีเพียง 55 บาทต่อตัวอย่าง ซึ่งต่ำกว่าวิธี TaqMan ที่มีต้นทุน 90 บาทต่อตัวอย่างเกือบเท่าตัว โดยเมื่อพิจารณาต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ทั้งกระบวนการจะอยู่ที่ 200 บาทต่อตัวอย่าง ซึ่งถือเป็นสัดส่วนการลงทุนที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับผลตอบแทนที่ได้รับ โดยต้นทุนดังกล่าวเทียบเท่ากับมูลค่าการจำหน่ายต้นกล้าเพียง 2-3 ต้น หรือผลมะพร้าวสดเพียง 1-2 ทะลายเท่านั้น แต่สิ่งที่ได้รับกลับมาก็คือการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลผลิตอย่างเป็นรูปธรรม จากการวิเคราะห์รายได้ในแม่พันธุ์แปลงสมุทรสาคร 1 จำนวน 257 ต้น (คิดเป็นพื้นที่ปลูกประมาณ 6.4 ไร่ ที่จำนวน 40 ต้นต่อไร่) ซึ่งมีศักยภาพในการผลิตต้นกล้าได้ 2,700 ต้นต่อไร่ต่อปี พบว่าการผ่านกระบวนการตรวจสอบและรับรองสายพันธุ์ด้วยเทคโนโลยีแม่นยำสูงจะช่วยยกระดับมาตรฐานจากสินค้าทั่วไปสู่สินค้าเกรดพรีเมียม ส่งผลให้กลไกราคาขยับตัวสูงขึ้นโดยสามารถจำหน่ายได้ในราคา 90 บาทต่อต้น เพิ่มขึ้นจากราคาเดิมที่เฉลี่ยอยู่ที่ 50 บาทต่อต้น หรือคิดเป็นส่วนต่างที่สร้างมูลค่าเพิ่มได้ถึงร้อยละ 80 ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับแล้ว การจำหน่ายต้นกล้าที่ผ่านการรับรองจะสร้างรายได้ส่วนเพิ่มให้แก่เกษตรกรสูงถึง 108,000 บาทต่อไร่ต่อปี และเมื่อพิจารณา

ผลตอบแทนรวมจากแม่พันธุ์ทั้ง 257 ตัน จะสามารถสร้างมูลค่าเพิ่มรวมได้กว่า 693,900 บาทต่อปี ในขณะที่ต้นทุนการตรวจคัดเลือกแม่พันธุ์ทั้งแปลงเพื่อรับรองสายพันธุ์ใช้เงินลงทุนเพียงครั้งเดียว ประมาณ 51,400 บาท ซึ่งสามารถคืนทุนได้ทันทีจากการจำหน่ายต้นกล้าคุณภาพสูงเพียงไม่กี่รุ่นการผลิต ดังนั้นการลงทุนตรวจวิเคราะห์ยืนยันความหอมจึงไม่เพียงแต่มีความคุ้มค่าในระยะสั้น แต่ยังเป็นการสร้างโอกาสในการทำกำไรและสร้างความเชื่อมั่นทางการตลาดในระยะยาวได้อย่างยั่งยืน

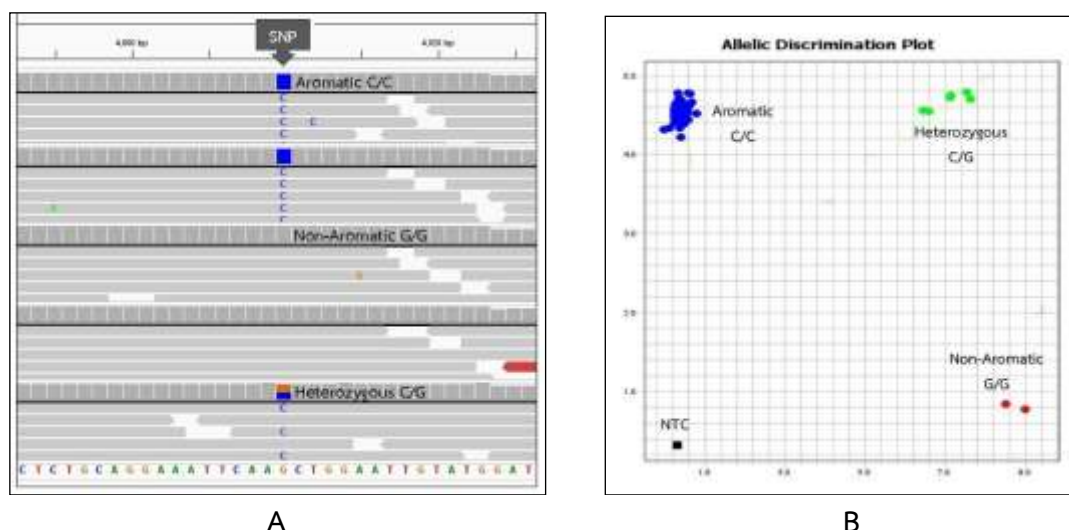


Figure 1 Identification of the aroma-associated SNP in the *badh2* gene. (A) Sequence alignment showing the SNP site (arrow) distinguishing aromatic (C/C), non-aromatic (G/G), and heterozygous (C/G) variants. (B) Allelic discrimination plot showing distinct genotyping clusters. Blue dots correspond to the aromatic genotype (C/C), red dots to the non-aromatic genotype (G/G), and green dots to the heterozygous genotype (C/G). The black square indicates the no-template control (NTC).

3. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี rhAmp SNP genotyping ระบุยืนยันความหอมเพื่อการรับรองคุณภาพแม่พันธุ์มะพร้าวน้ำหอมแท้

3.1 การตรวจสอบยืนยันความหอมของมะพร้าวน้ำหอมในแปลงแม่พันธุ์

จากการนำเทคโนโลยี rhAmp SNP genotyping มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบจีโนไทป์ของยืนยันความหอม (*badh2*) เพื่อประเมินคุณภาพต้นแม่พันธุ์มะพร้าวน้ำหอมในแปลงเกษตรกรและศูนย์วิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร (Table 3) รวมทั้งสิ้น 8 แหล่งปลูก จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 2,139 ตัน ผลการวิเคราะห์ภาพรวมพบความแตกต่างของความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในแต่ละแปลงอย่างชัดเจน โดยสามารถจำแนกกลุ่มแปลงแม่พันธุ์ตามระดับความบริสุทธิ์ของจีโนไทป์หอมได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมร้อยละ 100 เป็นแปลงแม่พันธุ์ที่พบต้นมียืนยันความหอมแท้ทุกต้น พบว่ามีแปลงแม่พันธุ์ จำนวน 2 แปลง จัดว่ามีผลการตรวจสอบดีเยี่ยม โดยต้นแม่พันธุ์ทุกต้นมีจีโนไทป์เป็นแบบ homozygous C/C (หอมแท้) คิดเป็นร้อยละ 100 และไม่พบต้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมปะปน (non-aromatic) เลย ได้แก่ แปลงราชบุรี 1 (190 ตัน) และแปลงสมุทรสาคร 3 (277 ตัน) แสดงให้เห็นถึงมาตรฐานการจัดการที่ยอดเยี่ยม เกษตรกรมีการคัดเลือกสายพันธุ์ตั้งต้นที่แม่นยำสูง และมีการจัดการสภาพแวดล้อมที่สามารถป้องกันการปะปนจากละอองเกสรภายนอกได้

อย่างสมบูรณ์ แปลงเหล่านี้จึงเหมาะสมที่สุดที่จะได้รับการรับรองเป็นแปลงแม่พันธุ์ต้นแบบสำหรับการผลิตต้นกล้ามะพร้าวหอมแท้คุณภาพสูง

กลุ่มที่ 2 มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมร้อยละ 95-99 เป็นแปลงแม่พันธุ์ที่พบต้นมีถิ่นความหอมสูง กลุ่มนี้ตรวจพบสัดส่วนของต้นแม่พันธุ์หอมแท้สูงมาก และพบการปะปนของต้นที่ไม่หอมเพียงเล็กน้อย ได้แก่ แปลงสมุทรสาคร 1 (257 ต้น) มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 98.83 โดยพบต้นปะปนเพียง 3 ต้น ประกอบด้วยต้นพันธุ์ทาง 2 ต้น และไม่หอมแท้ 1 ต้น แปลงสมุทรสาคร 2 (240 ต้น) มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 97.50 พบต้นปะปน 6 ต้น ประกอบด้วยต้นพันธุ์ทาง 5 ต้น และไม่หอมแท้ 1 ต้น แปลงดังกล่าวถึงแม้ระดับความบริสุทธิ์จะสูง แต่การตรวจพบต้นไม่หอมที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous C/G หรือ homozygous G/G แม้เพียงเล็กน้อย เช่น แปลงสมุทรสาคร 2 พบ C/G จำนวน 6 ต้น คิดเป็นร้อยละ 2.08 ถือเป็นจุดที่ต้องเฝ้าระวัง เพราะต้นเหล่านี้สามารถทำหน้าที่เป็นตัวให้อัลลีลไม่หอม (G) ผ่านละอองเกสรไปผสมกับแม่พันธุ์ต้นดีในแปลงได้

กลุ่มที่ 3 มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมร้อยละ 90-94 เป็นแปลงแม่พันธุ์ที่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมปานกลาง กลุ่มนี้เริ่มพบสัดส่วนของต้นที่ไม่หอม (non-aromatic) ทั้งจีโนไทป์แบบ heterozygous C/G และ homozygous G/G ในปริมาณที่ต้องเฝ้าระวัง ได้แก่ แปลงราชบุรี 3 (229 ต้น) มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 94.76 พบต้นปะปนรวม 12 ต้น ประกอบด้วยต้นพันธุ์ทาง 10 ต้น และไม่หอมแท้ 2 ต้น แปลงศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร แปลงที่ 8 (510 ต้น) มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 91.57 พบต้นปะปนรวม 43 ต้น ประกอบด้วยต้นพันธุ์ทาง 17 ต้น และไม่หอมแท้ 26 ต้น และแปลงราชบุรี 2 (185 ต้น) มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 90.81 ซึ่งพบต้นปะปนรวมสูงถึง 17 ต้น คิดเป็นร้อยละ 9.19 ประกอบด้วยต้นพันธุ์ทาง 14 ต้น และไม่หอมแท้ 3 ต้น

กลุ่มที่ 4 มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมต่ำกว่าร้อยละ 90 จัดเป็นแปลงที่มีความเสี่ยงสูง พบการปะปนของพันธุกรรมไม่หอมในระดับวิกฤต ได้แก่ แปลงนครปฐม 1 (251 ต้น) มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 88.05 โดยตรวจพบต้นปะปนรวมถึง 30 ต้น (ร้อยละ 11.95) ประกอบด้วยต้นพันธุ์ทาง 13 ต้น และไม่หอมแท้ 17 ต้น ซึ่งถือเป็นระดับการปะปนที่สูงและมีความเสี่ยงต่อการกระจายอัลลีลไม่หอมผ่านละอองเกสร บ่งชี้ว่าแปลงนี้อาจไม่ได้ใช้ต้นพันธุ์จากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ถูกต้อง หรือมีการนำผลจากต้นลูกผสมมาปลูกต่อทำให้เกิดการกระจายตัวของพันธุกรรม แปลงลักษณะนี้หากใช้เป็นแหล่งเก็บทำพันธุ์ จะทำให้ได้ต้นกล้าที่ได้จะมีโอกาสเป็นต้นไม่หอมสูงมาก

3.2 การตรวจยืนยันความหอมเพื่อติดตามการกลายพันธุ์ในระยะต้นกล้า

การตรวจยืนยันความหอมเพื่อติดตามคุณภาพในระยะต้นกล้า ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ในต้นกล้าจาก 5 แหล่งผลิต จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 2,216 ต้น (Table 4) แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของแม่พันธุ์กับการกระจายตัวทางพันธุกรรมในรุ่นลูก ดังนี้

แหล่งที่ 1 การผลิตคุณภาพดีเยี่ยม ได้แก่ แปลงราชบุรี 1 ตรวจสอบต้นกล้า 368 ต้น ไม่พบการปะปนทางพันธุกรรมเลย มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 100 สะท้อนให้เห็นถึงประสิทธิภาพสูงสุดในการคัดเลือกแม่พันธุ์และการจัดการแปลงที่ปลอดจากละอองเกสรแปลกปลอม

แหล่งที่ 2 การผลิตที่มีความบริสุทธิ์สูง ได้แก่ แปลงสมุทรสาคร 1 ตรวจสอบต้นกล้า 447 ต้น มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 97.09 พบต้นกล้าปะปนรวมถึง 13 ต้น (ร้อยละ 2.91) ประกอบด้วยต้นพันธุ์ทาง 7 ต้น และไม่หอมแท้ 6 ต้น และแปลงสมุทรสาคร 2 ตรวจสอบต้นกล้า 576 ต้น มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.49 พบต้นกล้าปะปนรวมถึง 26 ต้น (ร้อยละ 4.51) ประกอบด้วยต้นพันธุ์ทาง 21 ต้น และไม่หอมแท้ 5 ต้น

แหล่งที่ 3 การผลิตที่มีความเสี่ยงสูง พบการปะปนในระดับวิกฤตที่แปลงนครปฐม 1 ตรวจสอบต้นกล้า 286 ต้น ประกอบด้วยต้นกล้าหอมแท้ 228 ต้น (ร้อยละ 79.70) พบต้นกล้าปะปนรวมถึง 58 ต้น (ร้อยละ 20.28) ประกอบด้วยต้นพันธุ์ทาง 35 ต้น (ร้อยละ 12.30) และไม่หอมแท้ 23 ต้น (ร้อยละ 8.00) ในกรณีของแปลงนี้มีการตรวจพบต้นกล้าที่มีไม่หอมแท้ถึงร้อยละ 8.00 เป็นหลักฐานชัดเจนว่ามีการเก็บผลพันธุ์จากต้นแม่ที่ไม่ใช่มะพร้าว น้ำหอมแท้ หรือมีการปะปนของมะพร้าวพันธุ์อื่นภายในแปลงแม่พันธุ์เอง และการพบต้นกล้าที่เป็นพันธุ์ทางในสัดส่วนที่สูงถึงร้อยละ 12.30 แสดงว่าแม่ต้นแม่จะเป็นหอมแท้ แต่ได้รับละอองเกสรจากมะพร้าวไม่หอมที่อยู่บริเวณใกล้เคียง หรือจากต้นปะปนภายในแปลง ทำให้ลูกที่ออกมากลายเป็นพันธุ์ทาง

การบริหารจัดการต้นกล้าที่เหมาะสมถือเป็นจุดสำคัญที่จะต้องมีการคัดกรองสายพันธุ์ที่แม่นยำ ในกรณีที่ต้นกล้าที่ไม่บริสุทธิ์ปนอยู่สูงในแปลงบ่งชี้ว่าการคัดเลือกโดยใช้สัญญาณวิทยายานอกเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอ เพราะไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของยีนได้ จึงส่งให้เกิดความเสี่ยงต่อเกษตรกรผู้ซื้อหากนำต้นกล้าชุดนี้ไปจำหน่าย เกษตรกรที่ซื้อไปปลูกจะมีความเสี่ยงสูงที่จะได้ต้นที่ไม่หอม ซึ่งจะส่งผลเสียทางเศรษฐกิจในระยะยาว เนื่องจากต้องใช้เวลาปลูกนาน 3-4 ปีกว่าจะทราบผลผลิต ดังนั้นความจำเป็นในการใช้เทคโนโลยี rhAmp SNP genotyping เพื่อคัดกรองต้นกล้าที่มีจีโนไทป์ C/C ส่งมอบให้ลูกค้า เพื่อรักษามาตรฐานความเชื่อมั่นของแหล่งผลิต ทั้งนี้เพื่อให้แปลงแม่พันธุ์มะพร้าว น้ำหอมทุกแปลงยกระดับคุณภาพได้มาตรฐานเทียบเท่ากับแปลงที่บริสุทธิ์ร้อยละ 100 ควรดำเนินการตรวจสอบและจัดการแปลงแม่พันธุ์โดยต้องย้อนกลับไปตรวจสอบผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ของต้นแม่พันธุ์ทุกต้นในแปลง และตัดโค่นต้นที่ตรวจพบว่าไม่หอมและเป็นพันธุ์ทางทิ้งทันที เพื่อตัดวงจรละอองเกสรไม่หอม และควรมีการจัดทำระบบรับรองคุณภาพที่ใช้ผลการตรวจทางพันธุกรรมเป็นเอกสารการันตีความบริสุทธิ์ของต้นกล้า เพื่อสร้างจุดเด่นและมูลค่าเพิ่มให้กับธุรกิจกล้าพันธุ์มะพร้าว น้ำหอม และสร้างมาตรฐานให้กับอุตสาหกรรมมะพร้าว น้ำหอมไทย

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการระบุเครื่องหมายโมเลกุล SNP จำเพาะบนยีน *badh2* บริเวณ exon 14 ที่ควบคุมการสร้างสารหอม 2AP ในมะพร้าว และพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบด้วยเทคโนโลยี rhAmp SNP genotyping ซึ่งใช้วัฏกรรม RNase H2 ร่วมกับ RNA-DNA hybrid primers ทำให้มีความจำเพาะและแม่นยำสูงกว่าเทคนิคดั้งเดิม โดยการพิสูจน์ความแม่นยำเทียบกับปริมาณสารหอมจริงด้วยเทคนิค GC-MS พบความถูกต้องร้อยละ 100 สามารถจำแนกจีโนไทป์มะพร้าว น้ำหอมแท้ (C/C) ออกจากพันธุ์ทาง (C/G) และไม่หอม (G/G) ได้อย่างเด็ดขาดแม้ไม่แสดงลักษณะภายนอกเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในแปลงผลิตเชิงพาณิชย์ จำนวน 4,355 ตัวอย่าง พบความบริสุทธิ์แปรปรวนตั้งแต่ร้อยละ 88.05-100 ซึ่งช่วยคัดกรองแหล่งผลิตเสี่ยงวิกฤตที่มีการปะปนสูงถึงร้อยละ 20.28 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในด้านความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์และการลงทุน พบว่าเทคโนโลยีนี้มีศักยภาพสูงในการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับเกษตรกร โดยมีต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ทั้งกระบวนการเพียง 200 บาทต่อตัวอย่าง ซึ่งถือเป็นสัดส่วนที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับผลตอบแทนที่ได้รับ โดยเฉพาะการตรวจรับรองแม่พันธุ์ที่เป็นการลงทุนเพียงครั้งเดียว แต่สามารถสร้างผลกำไรในระยะยาวจากการจำหน่ายต้นกล้าคุณภาพสูง โดยสามารถยกระดับราคาค่าต้นกล้ารับรองพันธุ์จากเดิมเฉลี่ย 50 บาท เป็น 90 บาทต่อต้น คิดเป็นส่วนต่างที่สร้างมูลค่าเพิ่มได้ถึงร้อยละ 80 จากการประเมินผลตอบแทนในระดับแปลงผลิต พบว่าการจำหน่ายต้นกล้าที่ผ่านการรับรองจะสามารถสร้างรายได้ส่วนเพิ่มให้แก่เกษตรกรได้สูงถึง 108,000 บาทต่อไร่ต่อปี เทคโนโลยีนี้จึงไม่ได้เป็นเพียงเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ แต่เป็นกลไกสำคัญในการแก้ปัญหา

การปะปนทางพันธุกรรม สร้างมาตรฐานสินค้าเกรดพรีเมียม และยกระดับขีดความสามารถในการแข่งขันของอุตสาหกรรมมะพร้าวน้ำหอมไทยได้อย่างยั่งยืน

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การศึกษาวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบยีนความหอมในมะพร้าวด้วยวิธี rhAmp SNP genotyping ในครั้งนี้ ก่อให้เกิดประโยชน์ที่เป็นรูปธรรมต่อการยกระดับขีดความสามารถในการแข่งขันของภาคการเกษตรและอุตสาหกรรมมะพร้าวน้ำหอมไทย โดยสามารถนำองค์ความรู้และนวัตกรรมที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้เพื่อสร้างผลกระทบเชิงบวก ดังนี้

1. ด้านการบริหารจัดการพันธุกรรมของแปลงแม่พันธุ์ให้กับเกษตรกร เทคโนโลยีนี้ทำหน้าที่เป็นเครื่องมือคัดกรองที่มีความแม่นยำสูง เพื่อจำแนกและกำจัดต้นปะปนออกจากแปลงผลิตได้อย่างเด็ดขาด เป็นการตัดวงจรการถ่ายทอดพันธุกรรมที่ไม่พึงประสงค์ผ่านละอองเกสร ทำให้การจัดการแปลงแม่พันธุ์เป็นไปตามมาตรฐานสากลและรับประกันความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแหล่งผลิตในระยะยาว

2. ด้านเศรษฐกิจและการสร้างมูลค่าเพิ่ม นวัตกรรมนี้ช่วยสร้างธุรกิจใหม่ที่เน้น "การลงทุนต่ำแต่สร้างผลกำไรสูง" ซึ่งเป็นการลงทุนเพียงครั้งเดียวสำหรับต้นแม่พันธุ์ แต่ส่งผลต่อความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจมหาศาล สร้างมูลค่าเพิ่มด้วยการรับรองสายพันธุ์ช่วยยกระดับสินค้าสู่เกรดพรีเมียม ทำให้เกษตรกรจะมีรายได้ส่วนเพิ่มจากการจำหน่ายต้นกล้าที่ผ่านการรับรอง ซึ่งช่วยลดความเสี่ยงและสร้างความมั่นคงทางรายได้ให้กับเกษตรกรอย่างยั่งยืน ในขณะเดียวกันก็ช่วยลดความเสี่ยงให้กับเกษตรกรผู้ซื้อต้นกล้า โดยป้องกันความเสียหายจากการนำต้นกล้าที่กลายพันธุ์ไปปลูก ซึ่งต้องใช้เวลาดูแลรักษานาน การตรวจสอบตั้งแต่ระยะต้นกล้าจึงช่วยลดต้นทุนค่าเสียโอกาสและการสูญเสียทรัพยากรการผลิตของเกษตรกรได้อย่างมหาศาล

3. ด้านการตลาดและการส่งออก การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ส่งผลโดยตรงต่อความสม่ำเสมอของรสชาติและกลิ่นหอมของผลผลิตมะพร้าวสด ซึ่งเป็นอัตลักษณ์สำคัญของมะพร้าวน้ำหอมไทย การควบคุมคุณภาพตั้งแต่ต้นน้ำช่วยแก้ปัญหาผลผลิตด้อยคุณภาพ สร้างความเชื่อมั่นให้กับคู่ค้าในตลาดพรีเมียมและตลาดต่างประเทศ เพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของสินค้าเกษตรอัตลักษณ์ไทยในเวทีโลก

4. ด้านวิชาการและเทคโนโลยีการปรับปรุงพันธุ์ การตรวจยีนความหอมด้วยวิธี rhAmp SNP genotyping ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพเหนือกว่าเทคนิคเดิม ในแง่ของความแม่นยำในการจำแนกอัลลีล และความคุ้มค่า จึงเหมาะสมที่จะกำหนดเป็นวิธีมาตรฐานของกรมวิชาการเกษตร และประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือช่วยคัดเลือก (marker-assisted selection) เพื่อเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์มะพร้าวพันธุ์ใหม่ให้รวดเร็ว แม่นยำยิ่งขึ้น และใช้วางแผนปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุกรรมมะพร้าวน้ำหอม ซึ่งเป็นอัตลักษณ์ของท้องถิ่นให้คงอยู่ต่อไปในระยะยาว นอกจากนี้ข้อมูลตำแหน่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาบนยีน *badh2* ยังเป็นฐานข้อมูลสำคัญสำหรับการปรับปรุงพันธุ์มะพร้าวด้วยเทคโนโลยีการแก้ไขยีน (gene editing)

5. ด้านการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีสู่พืชเศรษฐกิจอื่น องค์ความรู้และระบบตรวจสอบ rhAmp SNP genotyping ที่พัฒนาสำเร็จนี้เป็นต้นแบบเทคโนโลยีที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบชุดตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลสปีส์สำหรับพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ ในการจำแนกสายพันธุ์ เพื่อยกระดับงานวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตรของไทยให้เป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ

เอกสารอ้างอิง

- ดวงกมล ศศิวัฒนพร. 2560. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพและกลิ่นในมะพร้าวพันธุ์น้ำหอมระหว่างการพัฒนาผลและการเก็บรักษา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาการพืชสวน). ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- อลิษา ภูประเสริฐ, วชิรญา อิ่มสบาย, ศิวเรศ อารีกิจ และ ราตรี บุญเรืองรอด. 2562. อิทธิพลของละอองเกสรที่มีผลต่อความหอมของมะพร้าวพันธุ์น้ำหอม. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 6(4): 25-31.
- Ayalew, H., P.W. Tsang, C. Chu, J. Wang, S. Liu, C. Chen. 2019. Comparison of TaqMan, KASP and rhAmp SNP genotyping platforms in hexaploid wheat. PLoS ONE 14(5): e0217222.
- Bradbury, L.M.T., T.L. Fitzgerald, R.J. Henry, Q. Jin and D.L.E. Waters. 2005. The gene for fragrance in rice. Plant Biotechnology Journal 3(3): 363–370.
- Broccanello, C., C. Chiodi, A. Funk, J.M. McGrath, L. Panella and P. Stevanato. 2018. Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants. Plant Methods 14: 28.
- Saensuk, C., S. Wanchana, K. Choowongkamon, S. Wongpornchai, T. Kraithong, W. Imsabai, E. Chaichoompu, V. Ruanjaichon, T. Toojinda, A. Vanavichit and S. Arikat. 2016. *De novo* transcriptome assembly and identification of the gene conferring a “pandan-like” aroma in coconut (*Cocos nucifera*). Plant Science 252: 324-334.
- Vongvanrungruang, A., C. Mongkolsirawatana, T. Boonkaew, O. Sawatdichaikul, K. Srikulnath and S. Peyachoknagul. 2016. Single base substitution causing the fragrant phenotype and development of a type-specific marker in aromatic coconut (*Cocos nucifera*). Genetics and Molecular Research 15(3): gmr.15038748.

Table 1 List of primer sequences designed for the amplification of the aromatic gene from coconut genomic DNA and the rhAmp SNP genotyping assay.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Ta (°C)	Size range (bp)
CnBadh2-F1	F: CCGATTTATGACTACCCGATG	57	1413
	R: GGATTGGACTGAGATTTTAAGATGA		
CnBadh2-F2	F: TGCTTTTGGACAAATGGTCA	55	1802
	R: CCACCTCCACACAAAATGGT		
CnBadh2-F3	F: GACGCCCTCAGGTTAGTCAT	57	1900
	R: TTGAAGGTTGCAGGGCTTAC		
rhAmp SNP assay	ASP1: TTGCTCTGCAGGAAATTCAAGrCTGGA	27	173
	ASP2: TTGCTCTGCAGGAAATTCAACrCTGGA	27	
	LSRP: GCACGTCAAGATACAGACTCGTAAAGrCTCAG	32	

Table 2 Validation of rhAmp SNP genotyping accuracy compared with 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) analysis using GC-MS.

Genotype Group	No. of samples	2-AP Content (mg/L)	Phenotypic Classification
Homozygous C/C	10	202.12 - 547.34	Aromatic
Heterozygous C/G	8	ND - <LOQ	Non-aromatic
Homozygous G/G	2	ND	Non-aromatic

Remarks <LOQ : indicates values below the limit of quantitation at 16.0 mg/L

ND : Not Detected

Table 3 Total number of plants and aromatic gene analysis results of aromatic coconut mother plants.

No.	Plot name	Total plants	Aromatic C/C n (%)	Non-aromatic		
				G/G n (%)	C/G n (%)	Total n (%)
1	Ratchaburi 1	190	190 (100.0)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
2	Ratchaburi 2	185	168 (90.81)	3 (1.62)	14 (7.57)	17 (9.19)
3	Ratchaburi 3	229	217 (94.76)	2 (0.87)	10 (4.37)	12 (5.24)
4	Samut Sakhon 1	257	254 (98.83)	1 (0.39)	2 (0.78)	3 (1.17)
5	Samut Sakhon 2	240	234 (97.50)	1 (0.42)	5 (2.08)	12 (5.00)
6	Samut Sakhon 3	277	277 (100.0)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
7	Nakhon Pathom 1	251	221 (88.05)	17 (6.77)	13 (5.18)	30 (11.95)
8	Chumphon HRC	510	467 (91.57)	26 (5.10)	17 (3.33)	43 (8.43)

Note: Plot names are designated based on location to protect personal information.

Table 4 Total number of seedlings and aromatic gene analysis results of aromatic coconut seedlings by plot.

No.	Plot name	Total plants	Aromatic C/C n (%)	Non-aromatic		
				G/G n (%)	C/G n (%)	Total n (%)
1	Ratchaburi 1	368	368 (100.0)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
2	Ratchaburi 3	539	495 (91.84)	15 (2.78)	29 (5.38)	44 (8.16)
3	Samut Sakhon 1	447	434 (97.09)	6 (1.34)	7 (1.57)	13 (2.91)
4	Samut Sakhon 2	576	550 (95.49)	5 (0.87)	21 (3.65)	26 (4.51)
5	Nakhon Pathom 1	286	228 (79.70)	23 (8.00)	35 (12.30)	58 (20.28)

Note: Plot names are designated based on location to protect personal information.