รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

1. ชื่อแผนบูรณาการ : **แผนงานวิจัยบูรณาการ การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมปาล์มน้ำมันเพื่อการผลิตอย่างยั่งยืน**

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

กิจกรรม : -

3. ชื่อการทดลอง : การทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา

Validation of tenera-type hybrid oil palm test kit

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 จึงได้มีงานวิจัยการพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้จำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าที่ได้ดำเนินการไปแล้ว งานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบ พบว่าให้ผลการตรวจที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง สามารถใช้ควบคุมคุณภาพการผลิตพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราให้สูงขึ้น ลดการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบดูราในแปลงผลิตต้นกล้าพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ก่อนจำหน่ายเกษตรกรได้ต้นพันธุ์ดีไปปลูก ส่งผลให้ผลผลิตสูงขึ้น และใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบพิสิเฟอรา ตั้งแต่ระยะต้นกล้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลา แรงงาน และลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

คำสำคัญ : ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย ต้นกล้าปาล์มน้ำมัน สนิปส์ การทดสอบความใช้ได้

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 01-189-61-01-00-00-02-63

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Molecular detection of oil palm fruit forms in the seedling stage by Real-time PCR techniques is limited and requires expensive equipment and reagents. In previous research, we had developed DNA Easy Kit, a simple DNA test kit to identify the characteristics of oil palm fruit forms (dura, pisifera and tenera) at the seedling stage. This research was a validation of a tenera-type hybrid oil palm test kit. 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 the oil palm breeding process.

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

กรมวิชาการเกษตร

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 จึงกำหนดเป้าหมายให้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมากกว่าการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 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 นิยมปลูกเป็นต้นแม่พันธุ์ 2) พิสิเฟอรา (Pisifera) มียีนควบคุมลักษณะผลเป็นแบบยีนด้อย (homozygous recessive) ลักษณะผล

ไม่มีกะลา 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 ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้พัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้จำแนกลักษณะผลและความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้า ชุดตรวจประกอบด้วยชุดน้ำยาผสมสำเร็จรูปพร้อมใช้งาน และแผ่นตรวจ ทำงานโดยใช้ หลักการ Nucleic Acid Lateral Flow ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา เพื่อทดสอบความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำ และเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเทคนิค Real-time PCR ที่เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

2. ไพรเมอร์โพรบและโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับวิเคราะห์ลำดับเบส

3. สารเคมี ได้แก่ ชุดสกัดสกัดดีเอ็นเอจากพืช Taq DNA polymerase, 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 เครื่องแยกสารด้วยไฟฟ้า เครื่อง UV transilluminator (Biorad) ชุดถ่ายภาพเครื่องอัตโนมัติ ฯลฯ

วิธีการ

งานวิจัยการทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรานี้เป็นงานวิจัยที่ดำเนินการต่อจากงานวิจัยเรื่อง วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอราโดยใช้เทคนิค Nucleic acid Lateral Flow ที่ได้ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้วในปี 2562 ผลการวิจัยได้พัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้จำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าโดยใช้ หลักการ Nucleic Acid Lateral Flow เพื่อใช้ตรวจคัดกรองการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบดูราในแปลงเพาะกล้า และคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบพิสิเฟอราในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน แต่ชุดตรวจสอบที่ได้นั้นยังไม่มีการทดสอบความใช้ได้ในงานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบดังกล่าว โดยมีวิธีการดังนี้

1. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจความหนาของกะลาระหว่างการใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้เทคนิค Real-time PCR

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการเปรียบเทียบวิธีการตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับเทคนิค Real-time PCR โดยใช้เทคโนโลยี TaqMan SNP genotyping ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ที่จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์และ โพรบที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ เพื่อนำไปใช้เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน กลุ่มพันธุ์แม่ Deli ชนิด dura กลุ่มพันธุ์พ่อ Tanzania ชนิด dura pisifera และ tenera และกลุ่มพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด tenera โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Plant Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ตามรายละเอียดของวิธีการในชุดสกัด จากนั้นตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การพัฒนาวิธีการตรวจลักษณะความหนากะลาของปาล์มน้ำมันด้วยเทคโนโลยี TaqMan SNP Genotyping (Applied Biosystems, USA) 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 ทำให้สามารถจำแนกแยกสนิปส์ที่มีความจำเพาะกับลักษณะความหนากะลาของปาล์มน้ำมันต้นแม่ dura และต้นพ่อ pisifera ออกจากกันได้ โดยติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์สี VIC และ FAM ที่ปลายด้าน 5’ ตามลำดับ ส่วนปลายด้าน 3’

กรมวิชาการเกษตร

ของโพรบทั้งสองเส้นติดฉลากด้วย nonfluorescent quencher (NFQ) เมื่อนำไพรเมอร์และโพรบที่ได้ไปตรวจสอบกับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่อง Real-time PCR จะมีการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณของแสงฟลูออเรสเซนต์ตามชนิดของสีที่ติดฉลากไว้ ทำให้สามารถจำแนกชนิดของสนิปส์ที่เกิดขึ้นบนดีเอ็นเอตามลักษณะผลของปาล์มน้ำมันชนิด dura และ pisifera ได้ จากนั้นนำไปใช้การตรวจสอบลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้เทคโนโลยี TaqMan SNP genotyping โดยการนำดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่สกัดได้ในข้อ 1.1 ประกอบด้วยตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะความหนาของกะลาแบบ dura 10 ตัวอย่าง pisifera 10 ตัวอย่าง และ tenera 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 ของพันธุ์แม่ชนิด dura จะอยู่ที่แกน X และ allele ของพันธุ์พ่อชนิด pisifera จะอยู่แกน Y ลูกผสมชนิด tenera จะอยู่กึ่งกลางระหว่างแกนทั้งสอง

1.3 ใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย ตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน โดยใช้ตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่มีกะลาแบบ dura 10 ตัวอย่าง pisifera 10 ตัวอย่าง และ tenera 12 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกับการตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้เทคนิค Real-time PCR ในแง่ของความสามารถในการจำแนกลักษณะความหนากะลาได้ถูกต้อง ต้นทุนของเครื่องมือ และสารเคมีในการตรวจวิเคราะห์ โดยมีวิธีปฏิบัติดังนี้

1.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อใช้ตรวจลักษณะความหนากะลาของปาล์มน้ำมันโดยใช้แผ่นตรวจ NALF

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบผสมรวมที่ประกอบด้วยเอนไซม์และสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องใช้ไว้ในหลอดเดียวกันเป็น master mix เพื่อใช้กับชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายให้ผู้ที่นำชุดตรวจสอบไปใช้สามารถใช้งานได้สะดวก ไม่จำเป็นต้องเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยตัวเอง โดยใช้ไพรเมอร์ตามข้อ 2.2 และดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามข้อ 1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนนี้จะใช้เทคนิค Nested PCR (Murai *et al*. (1992) ซึ่งเป็นการทำพีซีอาร์แบบสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกจะเป็นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตำแหน่งของสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบรวม 1 (master mix 1) โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละหลอด ประกอบไปด้วย 2x rhAmp SNP genotyping master mix 5 ไมโครลิตร, 5uM ของ forward primer และ 10 uM ของ reverse primer 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 ตั้งสภาวะการ

กรมวิชาการเกษตร

ทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 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

1.3.2 การตรวจดีเอ็นเอด้วยแผ่นตรวจ NALF โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้ในข้อ 1.3.1 ผสมรวมกับสารละลาย NALF buffer (75.4mM $Na_2HPO_47H_2O$, 24.6 mM $NaH_2PO_4H_2O$) 80ไมโครลิตร ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในช่องหยอดตัวอย่างของแผ่นตรวจ NALF รอเวลาประมาณ 2-5 นาที จะเกิดแถบสีบน test line และ control line ตามชนิดของตัวอย่างที่ทดสอบ บันทึกผลการปรากฏแถบสีที่เกิดขึ้นบนแผ่นตรวจ

2. การทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) ของชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอราในเชิงคุณภาพ โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะความหนาของกะลาแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา แต่ละการทดสอบทำ 10 ซ้ำ นำไปทดสอบความถูกต้อง (accuracy) ของวิธีตรวจวิเคราะห์ที่วัดได้ว่ามีค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากน้อยเท่าไร โดยนำผลการตรวจที่ได้จากการใช้ชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอราเปรียบเทียบค่าจริงที่ปาล์มน้ำมันแต่ละต้นมีลักษณะความหนาของกะลาแบบต่าง ๆ และทดสอบความแม่นยำ (precision) โดยทดสอบค่า repeatability เพื่อหาความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ ในสภาวะเดียวกัน โดยใช้วิธีเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน และทดสอบ reproducibility เพื่อหาความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ โดยใช้วิธีเดียวกัน แต่มีผู้วิเคราะห์ต่างกัน เครื่องมือต่างกัน ทำในห้องปฏิบัติการต่างกัน และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (limit of detection; LOD) โดยตรวจสอบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันระดับ 8 ระดับ ได้แก่ 10 1 0.1 0.01 0.001 0.0001 0.00001 และ 0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3. การใช้ชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอราตรวจจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้าในแปลงผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสม

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการนำชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายไปใช้ตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์สุราษฎร์ธานี 7 ที่เกิดจากการผสมกันระหว่าง Deli Dura กับ Tanzania Pisifera โดยใช้

ศรีนครินทร์

ตัวอย่างใบจากต้นกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 8-12 เดือน จากแปลงผลิตต้นกล้าของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันกระบี่ เก็บตัวอย่างโดยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบมีระบบ (Systematic Sampling) จากประชากรต้นกล้าทั้งหมด 655 ต้น เก็บตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวแทนสำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอ จำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ (66 ต้น) นำใบมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 1.1 นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบจำแนกลักษณะความหนาของกะลาด้วยชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายตามวิธีการในข้อ 2.3-2.4

เวลาและสถานที่

- ระยะเวลาดำเนินการทดลอง ตุลาคม พ.ศ. 2563 – กันยายน พ.ศ.2563
- สถานที่ดำเนินงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันกระบี่

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจความหนาของกะลาระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้วิธี Real-time PCR

จากการเปรียบเทียบวิธีการตรวจความหนาของกะลาระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้วิธี Real-time PCR ที่ใช้ตัวอย่างปาล์มน้ำมันเดียวกัน พบว่าการตรวจด้วยชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายจะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีที่เป็นลักษณะกะลาแบบ dura 10 ตัวอย่าง pisifera 10 ตัวอย่าง และ tenera 12 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องตรงตามลักษณะกะลาที่ปรากฏให้เห็น และให้ผลการตรวจสอดคล้องกับการตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR ที่พบค่า Allelic Discrimination Plot ที่ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือตัวอย่างที่มีลักษณะผลแบบ dura 10 ตัวอย่าง pisifera 10 ตัวอย่าง และ tenera 12 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

จะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันโดยใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย และการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการตรวจที่สอดคล้องไปในทางเดียวกัน มีความถูกต้องตรงกันและสัมพันธ์กับลักษณะกะลาที่ปรากฏให้เห็น จึงถือได้ว่าวิธีการตรวจโดยใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายในการตรวจลักษณะกะลาปาล์มน้ำมันเป็นวิธีใหม่ที่ไม่มีรายงานมาก่อน ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ถูกต้อง มีค่าใช้จ่ายของสารเคมีเครื่องมือ ความยุ่งยากในการตรวจวิเคราะห์น้อยกว่าการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR กล่าวคือ ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายมีค่าใช้จ่ายในการตรวจตัวอย่างละ 135 บาท และใช้ระยะเวลาในการตรวจ 2 ชั่วโมง 30 นาที ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี Real-time PCR มีค่าใช้จ่ายในการตรวจตัวอย่างละ 185 บาท ใช้ระยะเวลาในการตรวจ 2 ชั่วโมง และต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง (ตารางที่ 2) จึงสามารถนำมาใช้แทนการตรวจโดยวิธี Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐานในห้องปฏิบัติการได้

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

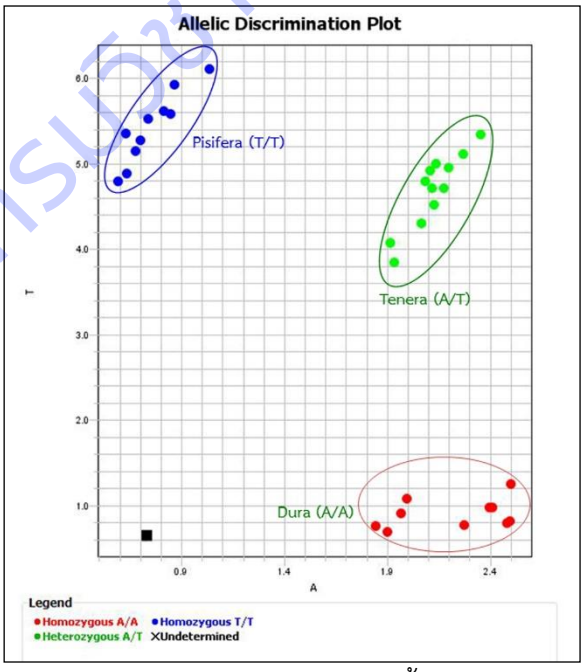
ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบระหว่างการใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายและวิธี Real-time PCR ตรวจลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมัน (dura, pisifera and tenera)

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

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายของสารเคมีและเครื่องมือของการตรวจลักษณะกะลาปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายและวิธี Real-time PCR

Cost	DNA Easy Kit	Real-time PCR
Reagents (Baht)	35	185
NALF strip (Baht)	100	-
Time (hour : minute)	2 : 30	2 : 00
Equipment (Baht)	50,000	2,500,000



ภาพที่ 1 แสดงผลการตรวจสอบลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันชนิด dura, pisifera และ tenera โดยใช้เทคนิค Real-time PCR

กรมวิชาการเกษตร

2. การทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา

จากการทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย ในเชิงคุณภาพ โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะความหนาของกะลาแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา แต่ละการทดสอบทำ 10 ซ้ำ พบว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกับค่าที่แท้จริง ร้อยละ 100 สำหรับผลการทดสอบความแม่นยำโดยการทดสอบ repeatability พบว่าการทดสอบที่ทำในสภาวะเดียวกัน โดยใช้วิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องร้อยละ 100 สำหรับการทดสอบ reproducibility ที่ตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีเดียวกัน แต่มีผู้วิเคราะห์ต่างกัน เครื่องมือต่างกัน และทำในห้องปฏิบัติการต่างกัน ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ร้อยละ 100 เช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 2 (Dura Pisifera และ Tenera)

dura

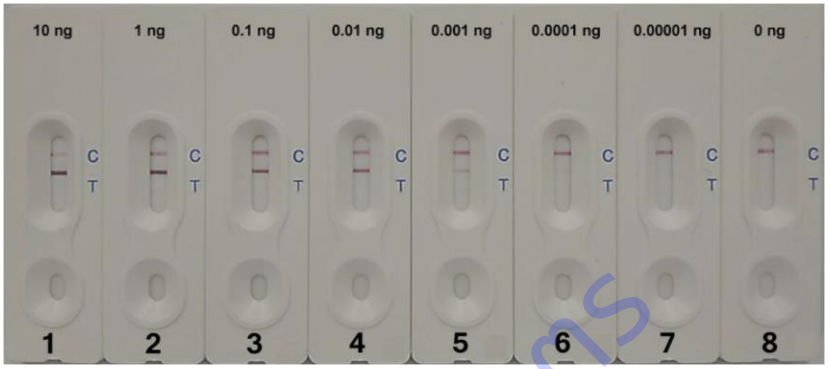
pisifera

tenera

ภาพที่ 2 แสดงการเกิดแถบสีบนแผ่นตรวจ NALF ที่เกิดการทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย ในเชิงคุณภาพ โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะความหนาของกะลาแบบ dura pisifera และ tenera

กรมวิชาการเกษตร

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (limit of detection; LOD) ของชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันที่ระดับ 10 1 0.1 และ 0.01 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีแถบสีเกิดขึ้นบนแผ่นตรวจชัดเจน และที่ระดับความเข้มข้น 0.001 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีแถบสีจางเกิดบนแผ่นตรวจ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 0.0001 0.00001 และ 0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไม่ปรากฏแถบสีบนแผ่นตรวจ แสดงให้เห็นชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายมีค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้คือที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 0.01 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุด (LOD) ของชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย ที่ใช้ตรวจดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่ระดับความเข้มข้น 0-10 ng

3. การใช้ชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอราตรวจจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้าในแปลงผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสม

ผลจากการนำชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายไปใช้ตรวจคัดกรองการปนของต้นดูราในแปลงผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์สุราษฎร์ธานี 7 อายุ 8-12 เดือน ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันกระบี่ มีประชากรต้นกล้าทั้งหมด 655 ต้น พบการปนของต้นกล้าที่มีลักษณะกะลาแบบดูราร้อยละ 4.54 ของจำนวนที่ตรวจคัดกรองทั้งหมด 66 ต้น (ภาพที่ 4) ซึ่งอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดยมาตรฐานการปนของต้นดูราตามคำแนะนำไม่ควรเกิน 5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากกรณีที่ผู้เมล็ดพันธุ์มีการควบคุมคุณภาพการผลิตที่ดีนั้น ความแปรปรวนอันเนื่องมาจากพันธุกรรมของต้นกล้าในแปลงเพาะกล้าควรจะน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ ได้มีรายงานการตรวจการปนของต้นปาล์มน้ำมันชนิดดูราและพิสิเฟอราในแปลงปลูกและแปลงผลิตต้นกล้าในประเทศมาเลเซีย ตรวจพบการปนของต้นดูราและพิสิเฟอรา ร้อยละ 9.2 และ 1.5 ตามลำดับ จากตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด 10,224 ตัวอย่าง (Ooi et al, 2016)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 4 แสดงการตรวจพบการปนของต้นดูรา (หมายเลข 4 และ 6) ในแปลงผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์สุราษฎร์ธานี 7

การใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อตรวจคัดกรองต้นดูราของปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าที่พัฒนาได้ครั้งนี้สามารถใช้ควบคุมคุณภาพต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ กล่าวคือหลังจากการตรวจคัดกรองในระดับดีเอ็นเอด้วยชุดตรวจอย่างง่ายแล้ว หากพบต้นดูราก็สามารถคัดออกได้ ซึ่งจะทำให้ต้นกล้าปาล์มมันชุดที่ผลิตขึ้นดังกล่าวมีคุณภาพที่ดียิ่งขึ้น เป็นการยกระดับคุณภาพกระบวนการผลิตพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราให้สูงขึ้น เกษตรกรได้พันธุ์ปาล์มที่ได้มาตรฐานตรงตามพันธุ์ มีความเชื่อมั่นในคุณภาพของต้นกล้า ส่งผลให้ผลผลิตปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มสูงขึ้นด้วย

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายพบว่าสามารถตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง เทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง มีค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 0.01 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ได้นำไปใช้จริงในการตรวจคัดกรองเพื่อลดการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบดูราในแปลงผลิตต้นกล้าพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ก่อนจำหน่าย ทำให้เกษตรกรได้พันธุ์ปาล์มที่ดีมีมาตรฐานตรงตามพันธุ์ มีความเชื่อมั่นในคุณภาพของต้นกล้า ได้ผลผลิตปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มสูงขึ้น และสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบพิสิเฟอรา ตั้งแต่ระยะต้นกล้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลา แรงงาน และลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่จะส่งผลให้เกิดการปรับปรุงพันธุ์แบบก้าวกระโดดในปาล์มน้ำมัน อีกทั้งชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือระดับพื้นฐานตามศูนย์วิจัยปาล์มในต่างจังหวัดได้ และชุดตรวจสอบดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอราอย่างง่าย เหมาะแก่การพัฒนาเพื่อจำหน่ายเชิงพานิชย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กรมวิชาการเกษตร

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

หน่วยงานที่ผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งภาครัฐ และภาคเอกชน สามารถนำชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายไปใช้ตรวจต้นกล้าปาล์มน้ำมันชนิดลูกผสมเทเนอราเพื่อคัดกรองการปนของต้นดูราในแปลงเพาะกล้า และยกระดับคุณภาพกระบวนการผลิตพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราให้สูงขึ้น

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันกระบี่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการทดลอง

12. เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการปาล์มน้ำมัน. โรงพิมพ์ดอกเบี้ย กรุงเทพฯ. 188 หน้า

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ อรรัตน์ วงศ์ศรี และนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ. 2558. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล. รายงานผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 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.

Murai, K. Tachibana, N. Okayama, A. Shishime, E. Tsuda, K. and T. Oshikawa. 1992. Sensitivity of Polymerase Chain Reaction Assay for Rickettsia tsutsugamushi in Patients' Blood Samples. *Microbiol. Immunol*. 36 (11): 1145-1153.

Ooi, L. Low, E. Abdullah, M. Nookiah, R. Sambanthamurthi, R. and Singh. R. 2016. Non-tenera Contamination and the Economic Impact of SHELL Genetic Testing in the Malaysian Independent Oil Palm Industry. *Front. Plant Sci.* 7:771.

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 –

กรมวิชาการเกษตร