รายงานโครงการวิจัย

# วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

# Research and development of oil palm test strip by using biotechnology

หัวหน้าโครงการวิจัย

ประสาน สืบสุข

Prasarn Seubsuk

ปี พ.ศ. 2563

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

# วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

# Research and development of oil palm test strip by using biotechnology

หัวหน้าโครงการวิจัย

ประสาน สืบสุข

Prasarn Seubsuk

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2563

# คำปรารภ

รายงานโครงการวิจัยเรื่อง วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ เป็นรายงานผลงานวิจัย ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยตั้งแต่ ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้จำแนกลักษณะผลและความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอราในระยะต้นกล้า และการทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบ เนื่องจากการจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าโดยวิธีการตรวจดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Real-time PCR จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้จำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าโดยใช้หลักการ Nucleic Acid Lateral Flow สำหรับใช้ตรวจคัดกรองการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบ Dura ในแปลงเพาะกล้า และคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบ Pisifera ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานเล่มนี้จะมีประโยชน์แก่นักวิจัย นักวิชาการเกษตร ตลอดจนผู้สนใจโดยทั่วไป ที่จะได้ศึกษาและนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

(นายประสาน สืบสุข)
หัวหน้าโครงการฯ
29 มีนาคม 2563

กรมวิชาการเกษตร

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | 1 |
| ผู้วิจัย | 2 |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ | 2 |
| บทนำ | 3 |
| บทคัดย่อ | 4 |
| 1. วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา โดยใช้เทคนิค Nucleic acid Lateral Flow | 6 |
| 2. การทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสม ชนิดเทเนอรา | 18 |
| บทสรุปและข้อเสนอแนะ | 29 |
| เอกสารอ้างอิง | 30 |


กรมวิชาการเกษตร

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ได้ดำเนินการได้โดยได้รับการสนับสนุนจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่ให้การสนับสนุนทุนในการศึกษาวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทดลองและปฏิบัติงาน ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันกระบี่ ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณนักวิจัยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและทำงานวิจัยอย่างมุ่งมั่น และดำเนินงานวิจัยให้บรรลุวัตถุประสงค์ สนับสนุนให้งานวิจัยสามารถถ่ายทอดองค์ความรู้ และนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ได้ให้การสนับสนุนงานในด้านอื่นๆ แต่มิได้เอ่ยนามไว้ ซึ่งล้วนมีส่วนช่วยส่งเสริมให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินงานจนประสบผลสำเร็จ ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

กรมวิชาการเกษตร

## ผู้วิจัย


| | |
|---|---|
| หัวหน้าโครงการ นายประสาน สืบสุข | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| ผู้ร่วมวิจัย 1. นางสาวกุหลาบ คงทอง | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| 2. นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภา |
| 3. นางสาวอรรัตน์ วงศ์ศรี | สังกัด สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน |
| 4. นางสาวสุวิมล กลศึก | สังกัด ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี |


## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | | |
|---|---|---|
| ม.ล. = มิลลิลิตร | ก.ก. = กิโลกรัม | ซ.ม. = เซนติเมตร |
| ชม. = ชั่วโมง | % = เปอร์เซ็นต์ | $^{\circ}$C = องศาเซลเซียส |
| µl = ไมโครลิตร | µM = ไมโครโมล | ml = มิลลิลิตร |
| ng = นาโนกรัม | mg = มิลลิกรัม | g = กรัม |

กรมวิชาการเกษตร

## บทนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมากสำหรับอุตสาหกรรมน้ำมันพืช เพราะสามารถนำมาสกัดเป็นน้ำมันเพื่อบริโภคและผลิตไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน การปลูกปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีจะทำให้ประสิทธิภาพการเพิ่มผลผลิตมากขึ้น ปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปาล์มน้ำมัน คือลักษณะของผลปาล์ม ที่เป็นผลมาจากยีนควบคุมลักษณะความหนาของกะลา สามารถจำแนกออกได้เป็น 3 แบบ ตามลักษณะผลได้แก่ 1) ดูรา (dura) เป็นพันธุ์ที่ลักษณะผลมีกะลาหนา 2-8 มม. มีเปลือกนอกบาง 35-60 % ของน้ำหนักผล และมียีนควบคุมลักษณะผลเป็นแบบยีนเด่น (homozygous dominance) พันธุ์ปาล์มกลุ่มนี้นิยมปลูกเป็นต้นแม่พันธุ์ 2) พิสิเฟอรา (pisifera) เป็นพันธุ์ที่ลักษณะผลไม่มีกะลาและมียีนควบคุมลักษณะผลเป็นแบบยีนด้อย (homozygous recessive) พันธุ์นี้มีข้อเสียคือช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมัน ซึ่งทำให้ผลฝ่อ ทะลายเล็ก เนื่องจากผลไม่พัฒนา ผลผลิตทะลายต่ำมาก ไม่ใช้ปลูกเป็นการค้า แต่ใช้เป็นพ่อพันธุ์ และ 3) เทเนอรา (tenera) ลักษณะผลมีกะลาบาง 0.5-4 มม. มีชั้นเปลือกนอกมาก 60-90 % ของน้ำหนักผล และมียีนควบคุมลักษณะผลเป็นแบบพันธุ์ทาง (heterozygous) พันธุ์นี้เกิดจากการผสมข้ามระหว่าง dura และ pisifera และเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงกว่าปาล์มชนิดอื่น (กรมวิชาการเกษตร, 2547) จะเห็นได้ว่าลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน เป็นผลมาจากยีนควบคุมความหนาของกะลา (SHELL gene) ซึ่งยีนนี้จะแสดงออกได้ต้องอาศัย MADS-box gene ซึ่งเป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนให้เป็นไปอย่างปกติ (Singh *et al*., 2013)

การผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีนั้น แม้จะมีกระบวนการผลิตที่เข้มงวดและรัดกุม มีการควบคุมการผสมเกสรของต้นพ่อ-แม่พันธุ์ เพื่อสร้างลูกผสมที่มีลักษณะผลแบบ tenera ซึ่งให้ผลผลิตน้ำมันสูง แต่บางครั้งในกระบวนการควบคุมการผสมเกสรอาจจะเกิดความผิดพลาดได้ ทำให้ได้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีผลแบบ dura ที่มีลักษณะกะลาหนาปนอยู่ เมื่อนำไปปลูกทำให้ผลผลิตต่ำ (ผลผลิตทะลายสดลดลง 15-35 %) เพื่อป้องกันการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันคุณภาพต่ำ และไม่ตรงตามพันธุ์ออกจำหน่าย จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบเพื่อควบคุมคุณภาพต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสม tenera ช่วยสร้างความเชื่อมั่นให้กับเกษตรกรที่ซื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันไปปลูก และยังช่วยยกระดับผลผลิตปาล์มน้ำมัน และน้ำมันปาล์มของประเทศไทยให้สูงขึ้นด้วย โดยทั่วไปการใช้ต้นกล้าปาล์มที่ไม่ได้มาตรฐานไปปลูก เกษตรกรจะทราบได้เมื่อปลูกผ่านไปเป็นเวลา 2-3 ปี จนกระทั่งติดผล ทำให้เกษตรกรได้ผลผลิตต่ำ

ที่ผ่านมากรมวิชาการเกษตรสามารถตรวจสอบพันธุ์และชนิดของต้นกล้าปาล์มได้โดยใช้เทคโนโลยี TaqMan SNP Genotyping และต้องอาศัยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งวิธีการนี้ต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง นอกจากนี้ยังต้องใช้บุคคลกรที่มีความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้น จึงได้มีงานวิจัยการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพันธุ์และชนิดของต้นกล้าโดยใช้เทคนิค Nucleic Acid Lateral Flow (NALF) (Kamphee *et al*., 2015) พัฒนาเป็นชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย อาศัยหลักการแยกสารผสมที่ต้องการตรวจด้วยระบบ chromatography บนแผ่น

กรมวิชาการเกษตร

nitrocellulose membrane ผนวกกับปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติบอดีที่จำเพาะกับสารที่ติดฉลากอยู่กับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำสูง และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR นอกจากนั้นเทคนิคนี้ยังใช้งานได้ง่าย และรวดเร็ว โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้ตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้า สำหรับใช้ตรวจคัดกรองการปนของต้นปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะกะลาแบบ dura ในแปลงเพาะกล้า อีกทั้งยังใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ที่มีกะลาแบบ pisifera ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันตั้งแต่ระยะต้นกล้า ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน


**บทคัดย่อ**

การจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าโดยวิธีการตรวจดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Real-time PCR จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้จำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าโดยใช้ หลักการ Nucleic Acid Lateral Flow สำหรับใช้ตรวจคัดกรองการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบ dura ในแปลงเพาะกล้า และคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบ pisifera ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ดำเนินการวิจัยที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึง เดือนธันวาคม 2562 จากการตรวจสอบลำดับเบสของยีน MADS-box ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหนาของกะลา พบการเปลี่ยนลำดับเบสแบบสนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 (A/T) มีความสัมพันธ์กับลักษณะความหนากะลาในประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli Tanzania และลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 จึงนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ให้ผลการตรวจที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำ 100 % และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ สามารถใช้ควบคุมคุณภาพการผลิตพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสม tenera ให้สูงขึ้น ลดการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบ dura ในแปลงผลิตต้นกล้าพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ก่อนจำหน่าย ทำให้เกษตรกรได้ต้นพันธุ์ดีไปปลูก ส่งผลให้ผลผลิตสูงขึ้น และใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบ pisifera ตั้งแต่ระยะต้นกล้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลา แรงงาน และลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน


**คำสำคัญ :** ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย, ต้นกล้าปาล์มน้ำมัน, สนิปส์, ความหนากะลา

กรมวิชาการเกษตร

## Abstract

Molecular detection of oil palm fruit forms, shell thickness in seedling stage by Real-time PCR techniques are limited and require expensive equipment and reagents. This research developed DNA Easy Kit, a simple DNA test kit to identify the characteristics of oil palm fruit forms (dura, pisifera and tenera) at seedling stage using Nucleic Acid Lateral Flow technique. It was aimed to detect and eliminate dura-form seedling during nursery growth before field planting and select male pisifera-form parents in oil palm breeding programme. The research was conducted at the Biotechnology Research and Development Office and the Suratthani Oil Palm Research Center during October 2017 to December 2019. The research work was carried out using the analysis and detection of sequence of MADS-box genes in the oil palm population of the Deli, Tanzania and Suratthani 7. It was found that SNP at 274 (A/T) were related to the shell thickness of oil palm. The DNA Easy Kit for fruit form detection was developed and the method validation was carried out. The results showed that the detection of oil palm fruit forms by DNA Easy Kit was 100% of specificity, accuracy, comparable to the Real-time PCR technique which required expensive equipment and reagents. This Kit was applicable for quality control of tenera oil palm seedling production for reducing or eliminating dura-form contamination in Suratthani 7 hybrid seedling before distributing to farmers and distinguishing male pisifera-form parents efficiently. It can reduce planting areas, labor, time and expenses in oil palm breeding process.


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

กรมวิชาการเกษตร

## การทดลองที่ 1

# วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอราโดยใช้เทคนิค Nucleic acid Lateral Flow

# Research and Development of Tenera Oil Palm Test Kit by Using Nucleic Acid Lateral Flow technique

ประสาน สืบสุข  กุหลาบ คงทอง  รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล  อรรัตน์ วงศ์ศรี  สุวิมล กลศึก

**คำสำคัญ** ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย ต้นกล้าปาล์มน้ำมัน สนิปส์

## บทคัดย่อ

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

ศรีวิชัยการเกษตร

## Abstract

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


## คำนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีความสำคัญอย่างมากสำหรับอุตสาหกรรม เพื่อการอุปโภคบริโภค และผลิตไบโอดีเซลสำหรับใช้เป็นพลังงานทดแทน 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

กรมวิชาการเกษตร

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

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

กรมวิชาการเกษตร

## ระเบียบวิธีการวิจัย

เป็นการพัฒนาวิธีการจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าโดยวิธีการตรวจดีเอ็นเอหลักการ Nucleic Acid Lateral Flow สำหรับใช้ตรวจคัดกรองการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบ Dura ในแปลงเพาะกล้า และคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบ Pisifera ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน เพื่อใช้ทดแทนวิธีการตรวจแบบเดิมที่ใช้เทคนิค Real-time PCR ที่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง

**สถานที่ทดลอง :** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

**ระยะเวลาทำการวิจัย :** ตุลาคม 2560 -กันยายน 2562

**วิธีดำเนินการ**

**อุปกรณ์**

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

2. ไพรเมอร์โพรบและโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับวิเคราะห์ลำดับเบส

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

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

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

**วิธีการ**

**1. การตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ของยีน MADS-box ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน**

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

กรมวิชาการเกษตร

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

1.2 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน MADS-box ในปาล์มน้ำมัน โดยการนำข้อมูลลำดับเบสของจีโนมปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) จากฐานข้อมูล NCBI หมายเลข Accession NC_025994.1 บนโครโมโซมที่ 2 ไปเปรียบเทียบลำดับเบสกับยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมันที่มีรายงานโดย หทัยรัตน์ และคณะ (2557) และ Singh et al. (2013) เพื่อหาตำแหน่งที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม BatchPrimer 3 จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้ไปต่อด้วยลำดับเบสด้านปลาย 5’ ด้วย M13 forward (GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA) และ M13 revers (AGGAAACAGCTATGACCAT) ของไพรเมอร์แต่ละเส้น เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการหาลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้ไปสังเคราะห์ไพรเมอร์กับบริษัท Integrated DNA Technologies, USA

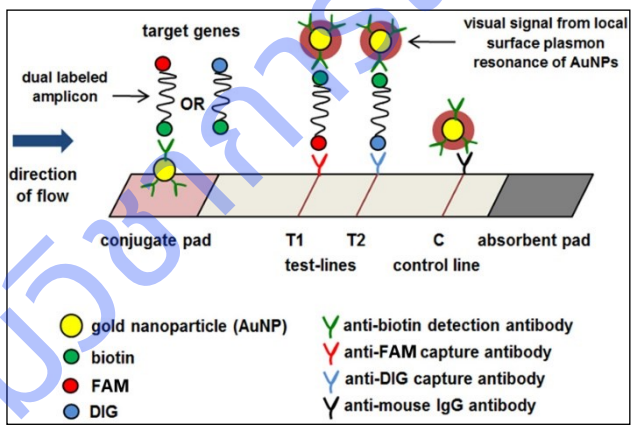
1.3 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากข้อ 1.2 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดน้ำยา Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen,USA) ตามรายละเอียดของวิธีการในชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส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

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

**2. การพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยเทคนิค NALF เพื่อใช้ตรวจจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน**

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

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




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

2.2 การออกแบบไพรเมอร์ตรวจสอบลักษณะผลเพื่อใช้กับแผ่นตรวจ NALF โดยนำลำดับเบสของยีน MADS-box บริเวณตำแหน่งสนิปส์ที่สัมพันธ์กับลักษณะผลของปาล์มน้ำมัน พร้อมทั้งลำดับเบสบริเวณใกล้เคียงไปออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม BatchPrimer 3 ที่มีการตั้งค่าเป็น

กรมวิชาการเกษตร

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

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อใช้ตรวจลักษณะผลของปาล์มน้ำมันโดยใช้แผ่นตรวจ NALF

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบผสมรวมที่ประด้วยเอนไซม์ และสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องใช้ไว้ในหลอดเดียวกันเป็น master mix เพื่อใช้กับชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย ให้ผู้ที่นำชุดตรวจสอบไปใช้สามารถใช้งานได้สะดวก ไม่จำเป็นต้องเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยตัวเอง โดยใช้ไพรเมอร์ตามข้อ 2.2 และดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามข้อ 1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนนี้จะใช้เทคนิค Nested PCR ซึ่งเป็นการทำพีซีอาร์แบบสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกจะเป็นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตำแหน่งของสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบรวม 1 (master mix 1) โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละหลอดประกอบไปด้วย 2x rhAmp SNP genotyping master mix 5 ไมโครลิตร, 5uM ของไพรเมอร์ด้าน forward และ 10 uM ของไพรเมอร์ด้าน revers ตามข้อ 2.2 อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นสำหรับทำพีซีอาร์ 2.5 ไมโครลิตร การนำไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ใช้ master mix 1 ปริมาตร 9 ไมโครลิตร และเติมดีเอ็นเอความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร ตั้งสภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 68 องศาเซลเซียส 20 วินาที จำนวน 10 รอบ หลังจากนั้นเป็นการทำพีซีอาร์ขั้นตอนที่สองเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับลำดับเบสที่ต่อเข้ากับปลายด้าน 5’ ของไพรเมอร์แต่ละเส้น โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบรวม 2 (master mix 2) โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละหลอด ประกอบไปด้วย 5x HOT FIREPol blend master mix 4 ไมโครลิตร, 10uM ของไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย FAM, DIG และ Biotin ตามข้อ 2.2 อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นสำหรับทำพีซีอาร์ 4.5 ไมโครลิตร การนำไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบที่สองทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ใช้ master mix 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติมลงในหลอดของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนแรก 10 ไมโครลิตร และตั้งสภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 12 นาที จำนวน 1 รอบ

กรมวิชาการเกษตร

ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 20 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ

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

## ผลการทดลองและอภิปราย (Results and Discussion)

### 1. การตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ของยีน MADS-box ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน

ผลจากการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เพิ่มปริมาณยีน MADS-box จากปาล์มน้ำมัน โดยนำข้อมูลจากรายงานของ Singh et al. (2013) ไปค้นหาลำดับจีโนมปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) จากฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีส่วนของยีน MADS-box ปรากฏอยู่บนลำดับเบสของจีโนมปาล์มน้ำมันบนโครโมโซมที่ 2 หมายเลข Accession NC_025994.1 เมื่อนำลำดับดีเอ็นเอดังกล่าวไปออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีน MADS-box พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับเบส ด้าน forward premer (TTGCTTTTAATTTTGCTTG AATACC) และ ด้าน reverse primer (GGCAAAACTCAAACCCTTTTT) ครอบคลุมตั้งแต่ตำแหน่งที่ 3078403-3077678 ในโครโมโซมที่ 2 ของฐานข้อมูลจีโนมของปาล์มน้ำมัน จึงนำไพรเมอร์ที่ได้ไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน MADS-box กับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน 3 กลุ่มพันธุ์ คือ กลุ่มพันธุ์แม่ Deli กลุ่มพ่อพันธุ์ Tanzania และกลุ่มพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ที่เกิดจากการผสมระหว่างสองกลุ่มพันธุ์ดังกล่าว พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลผลิตพีซีอาร์ชัดเจน มีความยาว 769 คู่เบส และเมื่อนำผลผลิตของพีซีอาร์ของยีน MADS-box ไปอ่านลำดับเบสของเส้นดีเอ็นเอทั้งสองทิศทาง และเปรียบเทียบกันระหว่าง 3 กลุ่มพันธุ์ พบว่าลำดับดีเอ็นเอของยีน MADS-box มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไป 3 ตำแหน่ง โดยมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปส์ (SNP) 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 274 และ 485 และการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบการแทรกหรือขาดหายไป (Insertion/Deletion) 1 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง 406-409 (ตารางที่ 1) โดยการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอทั้งสามตำแหน่งมีความสัมพันธ์กับชนิดของลักษณะผลปาล์มน้ำมันในแต่ละกลุ่มดังนี้

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

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

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

1.3 การแทรกหรือขาดหายไปของเบสที่ตำแหน่ง 406-409 เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอขนาด 4 คู่เบส ทำให้ปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์แม่ Deli Dura ไม่มีลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ TTAA ในตำแหน่งดังกล่าว ในขณะที่ปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์พ่อ Tanzania Pisifera มีลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ TTAA สำหรับปาล์มน้ำมันที่พันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด Tenera รูปแบบของลำดับดีเอ็นเอจะเป็นแบบผสมกันระหว่างที่มีและไม่ลำดับดีเอ็นเอแบบ TTAA ของแต่ละอัลลีล

**ตารางที่ 1** การเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอแบบ SNPs และ In/Del ของ MADS-box gene ที่มีความสัมพันธ์กับชนิดของลักษณะผลปาล์มน้ำมันในแต่ละกลุ่ม

| Population | Fruit form | No. of sample | SNP (274) | SNP (485) | In/Del (406-409) |
|---|---|---|---|---|---|
| Deli | Dura | 23 | A/A | G/G | - |
| ST7 | Tenera | 20 | A/T | G/C | -/TTAA |
| Tanzania | Dura | 5 | A/A | C/C | - |
| | Pisifera | 32 | T/T | C/C | TTAA |
| | Tenera | 5 | A/T | C/C | -/TTAA |

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

การหาตำแหน่งสนิปส์ของยีน MADS-box ในปาล์มน้ำมัน พบว่าสนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 ที่มีการเปลี่ยนลำดับเบสจาก A เป็น T ให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Singh et al., (2013) ซึ่งเป็นตำแหน่งสนิปส์ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความหนาของกะลาลักษณะ 3 แบบ คือ ดูรา พิสิเฟอรา และ เทเนอรา ซึ่งเป็นผลมาจากยีน SHELL gene: Sh ที่ควบคุมความหนาของกะลา ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอแบบสนิปส์ที่ได้ในขั้นตอนนี้จะนำไปใช้การออกแบบไพรเมอร์และโพรบเพื่อการตรวจสอบลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค TaqMan SNP genotyping โดยใช้เครื่อง

กรมวิชาการเกษตร

Real-time PCR และการพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยเทคนิค Nucleic Acid Lateral Flow ในขั้นตอนต่อไป

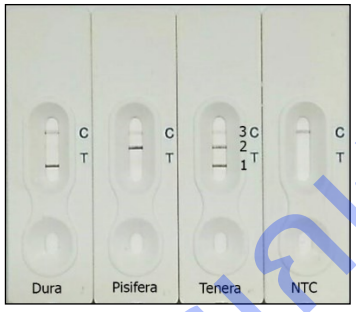
**2. การพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยเทคนิค NALF เพื่อใช้ตรวจจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน**

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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




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

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

## สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การตรวจสอบลำดับเบสของยีน MADS-box ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหนาของกะลา พบการเปลี่ยนลำดับเบสแบบสนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 (A/T) มีความสัมพันธ์กับลักษณะความหนากะลาในประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli Tanzania และลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ได้นำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายสำหรับตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง สามารถนำไปใช้ตรวจคัด

กรมวิชาการเกษตร

กรองเพื่อลดการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบดูราในแปลงผลิตต้นกล้าพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ก่อนจำหน่าย ทำให้เกษตรกรได้พันธุ์ปาล์มที่ดีมีมาตรฐานตรงตามพันธุ์ มีความเชื่อมั่นในคุณภาพของต้นกล้า ได้ผลผลิตปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มสูงขึ้น และสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบพิสิเฟอรา ตั้งแต่ระยะต้นกล้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลา แรงงาน และลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่จะส่งผลให้เกิดการปรับปรุงพันธุ์แบบก้าวกระโดดในปาล์มน้ำมัน อีกทั้งชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือระดับพื้นฐานตามศูนย์วิจัยปาล์มในต่างจังหวัดได้

กรมวิชาการเกษตร

## การทดลองที่ 2

# การทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา
# Validation of Tenera-Type Hybrid Oil Palm Test Kit

ประสาน สืบสุข กุหลาบ คงทอง รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล อรรัตน์ วงศ์ศรี สุวิมล กลศึก

**คำสำคัญ** ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย ต้นกล้าปาล์มน้ำมัน สนิปส์ การทดสอบความใช้ได้

**บทคัดย่อ**

การจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าโดยวิธีการตรวจดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Real-time PCR จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง จึงได้มีงานวิจัยการพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้จำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าที่ได้ดำเนินการไปแล้ว งานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบ พบว่าให้ผลการตรวจที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง สามารถใช้ควบคุมคุณภาพการผลิตพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราให้สูงขึ้น ลดการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบดูราในแปลงผลิตต้นกล้าพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ก่อนจำหน่าย เกษตรกรได้ต้นพันธุ์ดีไปปลูก ส่งผลให้ผลผลิตสูงขึ้น และใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบพิสิเฟอรา ตั้งแต่ระยะต้นกล้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลาแรงงาน และลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

**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

กรมวิชาการเกษตร

pisifera-form parents efficiently. It can reduce planting areas, labor, time and expenses in the oil palm breeding process.

## คำนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีความสำคัญอย่างมากสำหรับอุตสาหกรรม เพื่อการอุปโภคบริโภค และผลิตไบโอดีเซลสำหรับใช้เป็นพลังงานทดแทน 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) ลักษณะผลไม่มีกะลา มีข้อเสียคือช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมัน ซึ่งทำให้ผลฝ่อ ทะลายเล็ก เนื่องจากผลไม่พัฒนา ผลผลิตทะลายต่ำมาก ไม่ใช้ปลูกเป็นการค้า แต่ใช้เป็นพ่อพันธุ์ และ 3) เทเนอรา (Tenera) มียีนควบคุมลักษณะผลเป็นแบบพันธุ์ทาง (heterozygous) เกิดจากการผสมข้ามระหว่างดูราและพิสิเฟอรา ลักษณะผลมีกะลาบาง 0.5-4 มิลลิเมตร มีชั้นเปลือกนอกมาก 60-90% ของน้ำหนักผล นิยมปลูกเป็นการค้าเนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันที่สูงกว่าชนิดอื่น (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

ระบบการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีนั้น มีการควบคุมการผสมเกสรของต้นพ่อ-แม่พันธุ์ เพื่อสร้างลูกผสมที่มีลักษณะผลแบบเทเนอรา ซึ่งให้ผลผลิตน้ำมันสูง แต่บางครั้งในกระบวนการควบคุมผสมเกสรอาจจะเกิดความผิดพลาดได้ จึงได้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีผลแบบดูราลักษณะกะลาหนาปนอยู่ เมื่อนำไปปลูกทำให้ผลผลิตต่ำ (ผลผลิตทะลายสดลดลง 15-35%) เพื่อป้องกันการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันคุณภาพต่ำ และไม่ตรงตามพันธุ์ออกจำหน่าย โดยไม่มีการตรวจสอบคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมันที่ผลิตออกมาจำนวนมาก แม้จะมีกระบวนการผลิตที่เข้มงวดและรัดกุม ก็อาจเกิดการปนของปาล์มน้ำมันที่ไม่ต้องการได้ จึงต้องมีการตรวจสอบเพื่อควบคุมคุณภาพต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา เพื่อรองรับการตรวจรับรองคุณภาพของต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้มีคุณภาพได้มาตรฐานตาม

กรมวิชาการเกษตร

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

## ระเบียบวิธีการวิจัย

เป็นการทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้า ซึ่งเป็นงานต่อเนื่องจากงานวิจัยการพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้จำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าที่ได้ดำเนินการไปแล้ว เพื่อให้ผลการตรวจที่มีความจำเพาะความถูกต้อง และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง

**สถานที่ทดลอง :** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

**ระยะเวลาทำการวิจัย :** ตุลาคม 2562 -กันยายน 2563

## 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

กรมวิชาการเกษตร

System เครื่องแยกสารด้วยไฟฟ้า เครื่อง UV transilluminator (Biorad) ชุดถ่ายภาพเครื่องอัตโนมัติ ฯลฯ

**วิธีการ**

**1. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจความหนาของกะลาระหว่างการใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้เทคนิค Real-time PCR**

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการเปรียบเทียบวิธีการตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับเทคนิค Real-time PCR โดยใช้เทคโนโลยี TaqMan SNP genotyping ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ที่จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ 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’ ของโพรบทั้งสองเส้นติดฉลากด้วย nonfluorescent quencher (NFQ) เมื่อนำไพรเมอร์และโพรบที่ได้ไปตรวจสอบกับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่อง Real-time PCR จะมีการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณของแสงฟลูออเรสเซนต์ตามชนิดของสีที่ติดฉลากไว้ ทำให้สามารถจำแนกชนิดของสนิปส์ที่เกิดขึ้นบนดีเอ็นเอตามลักษณะผลของปาล์มน้ำมันชนิด dura และ pisifera ได้ จากนั้นนำไปใช้การตรวจสอบลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้เทคโนโลยี TaqMan SNP genotyping โดยการนำดีเอ็น

เอของปาล์มน้ำมันที่สกัดได้ในข้อ 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

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบผสมรวมที่ประกอบด้วยเอนไซม์ และสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องใช้ไว้ในหลอดเดียวกันเป็น master mix เพื่อใช้กับชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย ให้ผู้ที่นำชุดตรวจสอบไปใช้สามารถใช้งานได้สะดวก 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 ตั้งสภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30

กรมวิชาการเกษตร

วินาที และ 68 องศาเซลเซียส 20 วินาที จำนวน 10 รอบ หลังจากนั้นเป็นการทำพีซีอาร์ขั้นตอนที่สองเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับลำดับเบสที่ต่อเข้ากับปลายด้าน 5’ ของไพรเมอร์แต่ละเส้น โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบรวม 2 (master mix 2) โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละหลอดประกอบไปด้วย 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

กรมวิชาการเกษตร

**3. การใช้ชุดตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอราตรวจจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้าในแปลงผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสม**

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการนำชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายไปใช้ตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์สุราษฎร์ธานี 7 ที่เกิดจากการผสมกันระหว่าง Deli Dura กับ Tanzania Pisifera โดยใช้ตัวอย่างใบจากต้นกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 8-12 เดือน จากแปลงผลิตต้นกล้าของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันกระบี่ เก็บตัวอย่างโดยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบมีระบบ (Systematic Sampling) จากประชากรต้นกล้าทั้งหมด 655 ต้น เก็บตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวแทนสำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอ จำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ (66 ต้น) นำใบมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 1.1 นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบจำแนกลักษณะความหนาของกะลาด้วยชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย ตามวิธีการในข้อ 2.3-2.4

## ผลการทดลองและอภิปราย

**1. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจความหนาของกะลาระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้วิธี Real-time PCR**

จากการเปรียบเทียบวิธีการตรวจความหนาของกะลาระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้วิธี Real-time PCR ที่ใช้ตัวอย่างปาล์มน้ำมันเดียวกัน พบว่าการตรวจด้วยชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย จะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีที่เป็นลักษณะกะลาแบบ 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 2)

จะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันโดยใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายและการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการตรวจที่สอดคล้องไปในทางเดียวกัน มีความถูกต้องตรงกันและสัมพันธ์กับลักษณะกะลาที่ปรากฏให้เห็น จึงถือได้ว่าวิธีการตรวจโดยใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายในการตรวจลักษณะกะลาปาล์มน้ำมันเป็นวิธีใหม่ที่ไม่มีรายงานมาก่อน ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ถูกต้อง มีค่าใช้จ่ายของสารเคมี เครื่องมือ 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 3) จึงสามารถนำมาใช้แทนการตรวจโดยวิธี Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐานในห้องปฏิบัติการได้

กรมวิชาการเกษตร

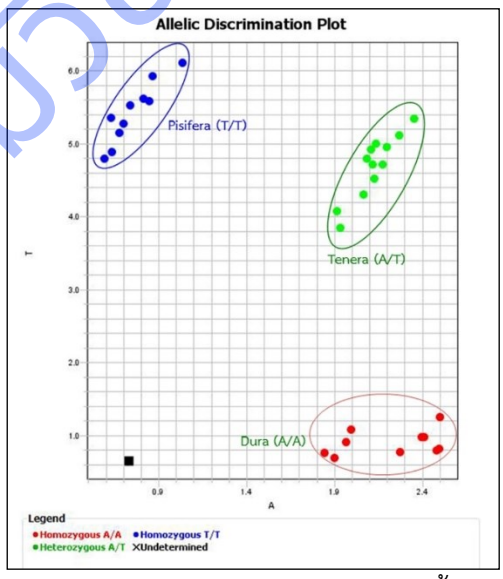
**ตารางที่ 1** แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบระหว่างการใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายและวิธี Real-time PCR ตรวจลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมัน (dura, pisifera and tenera)

| 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 3** 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 4 (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 5)

**ภาพที่ 5** 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 6) 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)

กรมวิชาการเกษตร

**ภาพที่ 6** แสดงการตรวจพบการปนของต้นดูรา (หมายเลข 4 และ 6) ในแปลงผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์สุราษฎร์ธานี 7

การใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อตรวจคัดกรองต้นดูราของปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าที่พัฒนาได้ครั้งนี้สามารถใช้ควบคุมคุณภาพต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ กล่าวคือหลังจากการตรวจคัดกรองในระดับดีเอ็นเอด้วยชุดตรวจอย่างง่ายแล้ว หากพบต้นดูราก็สามารถคัดออกได้ ซึ่งจะทำให้ต้นกล้าปาล์มมันชุดที่ผลิตขึ้นดังกล่าวมีคุณภาพที่ดียิ่งขึ้น เป็นการยกระดับคุณภาพกระบวนการผลิตพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราให้สูงขึ้น เกษตรกรได้พันธุ์ปาล์มที่ได้มาตรฐานตรงตามพันธุ์ มีความเชื่อมั่นในคุณภาพของต้นกล้า ส่งผลให้ผลผลิตปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มสูงขึ้นด้วย

## สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

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

กรมวิชาการเกษตร

## บทสรุปและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบลำดับเบสของยีน MADS-box ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหนาของกะลา พบการเปลี่ยนลำดับเบสแบบสนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 (A/T) มีความสัมพันธ์กับลักษณะความหนากะลาในประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli Tanzania และลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 และได้นำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายสำหรับตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง เทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำ 100 % โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง สามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอได้ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.01 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ได้นำชุดตรวจสอบไปใช้จริงในการตรวจคัดกรองเพื่อลดการปนของต้นปาล์มที่มีลักษณะกะลาแบบ dura ในแปลงผลิตต้นกล้าพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ก่อนจำหน่าย ทำให้เกษตรกรได้พันธุ์ปาล์มที่ดีมีมาตรฐานตรงตามพันธุ์ มีความเชื่อมั่นในคุณภาพของต้นกล้า ได้ผลผลิตปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มสูงขึ้น และสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบ pisifera ตั้งแต่ระยะต้นกล้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลาแรงงาน และลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่จะส่งผลให้เกิดการปรับปรุงพันธุ์แบบก้าวกระโดดในปาล์มน้ำมัน อีกทั้งชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือระดับพื้นฐานตามศูนย์วิจัยปาล์มในต่างจังหวัดได้ นับเป็นการสร้างชุดตรวจดีเอ็นเอที่เป็นนวัตกรรมใหม่ของกรมวิชาการเกษตร ที่ก้าวหน้า และเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

กรมวิชาการเกษตร

## เอกสารอ้างอิง (References)

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., A. Chaiprasert; T. Prammananan, N. Wiriyachaiporn, A. Kanchanatavee 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., N. Tachibana, A. Okayama; E. Shishime, K. Tsuda 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.C.-L., E.-T.L. Low, M.O. Abdullah, R. Nookiah, N.C. Ting, J. Nagappan *et al*. 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.L. Low, L.C.-L. Ooi, M. Ong-Abdullah, N.C. Ting, J. Nagappan *et al*. 2013. The oil palm SHELL gene control oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. *Nature* 500 (7462): 340-344.

กรมวิชาการเกษตร