การพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้ตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้า

Development of DNA Easy Kit for Shell Thickness Detection in Oil Palm Seedling

ประสาน สืบสุข[1/*] กุหลาบ คงทอง[1/] รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล[1/]
อรรัตน์ วงศ์ศรี[2/] ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์[1/] สุวิมล กลศึก[3/] ดนัย นาคประเสริฐ[1/]
Prasarn Seubsuk[1/] Kularb Kongthong[1/] Rungnapa Pitaktansakul[1/]
Onrat Wongsri[2/] Khanitha Wongwathanarat[1/] Suwimon Kolasuk[3/] Danai Nakprasert[1/]

Received 5 Oct 2020/Revised 15 Dec 2020/Accepted 17 Dec 2020

ABSTRACT

Molecular detection of oil palm fruit forms and shell thickness at seedling stage by Real-time PCR technique is limited and requires expensive equipment and reagents. This research aimed at developing 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 would be used to detect and eliminate the dura-form seedlings in the nursery, and select male pisifera-form parents in oil palm breeding programme. This research was conducted at the Biotechnology Research and Development Office and the Surat Thani Oil Palm Research Center from October 2017 to December 2019. We conducted the analysis and detection of sequence of MADS-box genes in the oil palm population of the Deli, Tanzania and Surat Thani 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. Results showed that the detection of oil palm fruit forms by DNA Easy Kit was 100% specific, accurate and comparable to those of Real-time PCR technique. This Kit was applicable for quality control of tenera oil palm seedling production for reducing or eliminating dura-form contamination in Surat Thani 7 hybrid seedling before distributing to farmers, and distinguishing male pisifera-form parents

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 50 ถ.พหลโยธิน เขตจตุจักร กทม. 10900

[1/] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, 50 Phahonyothin Road, Chatuchak, Bangkok, 10900

[2/] สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร 50 ถ.พหลโยธิน เขตจตุจักร กทม. 10900

[2/] Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Department of Agriculture, 50 Phahonyothin Road, Chatuchak, Bangkok, 10900

[3/] ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร ตำบลท่าอุแท อำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84160

[3/] Suratthani Oil Palm Research Center, Department of Agriculture, Tha Uthae Sub-District, Kanchanadit District, Surat Thani Province, 84160

***Corresponding author: praseu@yahoo.com**

efficiently. This test kit can reduce planting areas, labour, time and expenses in oil palm breeding process.

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

บทคัดย่อ

การจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้า โดยวิธีการตรวจดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค Real-time PCR จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย เพื่อใช้จำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้า โดยใช้หลักการ Nucleic Acid Lateral Flow เพื่อตรวจคัดกรองการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบ Dura ในแปลงเพาะกล้า และคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบ Pisifera ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ดำเนินการวิจัยที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 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 สามารถนำชุดตรวจนี้ไปใช้ตรวจเพื่อควบคุมคุณภาพการผลิตพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสม tenera ให้สูงขึ้น ลดการปนของต้นที่มีลักษณะกะลาแบบ dura ในแปลงผลิตต้นกล้าพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ก่อนจำหน่าย ทำให้เกษตรกรได้ต้นพันธุ์ดีไปปลูก ส่งผลให้ผลผลิตสูงขึ้น และใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบ pisifera ตั้งแต่ระยะต้นกล้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลาแรงงาน และลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

คำสำคัญ: ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย, ต้นกล้าปาล์มน้ำมัน, สนิปส์, ความหนากะลา

บทนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมากสำหรับอุตสาหกรรมน้ำมันพืช เพราะสามารถนำมาสกัดเป็นน้ำมันเพื่อบริโภคและผลิตไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน การปลูกปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีจะทำให้ประสิทธิภาพการเพิ่มผลผลิตมากขึ้น ปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปาล์มน้ำมัน คือ ลักษณะของผลปาล์มที่เป็นผลมาจากยีนควบคุมลักษณะความหนาของกะลา 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) พันธุ์นี้มีข้อเสีย คือ ช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมัน 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 และเป็น

พันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงกว่าปาล์มชนิดอื่น (กรมวิชาการเกษตร, 2547) จะเห็นได้ว่า ลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน 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%) เพื่อป้องกันการผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันคุณภาพต่ำและไม่ตรงตามพันธุ์ออกจำหน่าย จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบเพื่อควบคุมคุณภาพต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสม tenera ช่วยสร้างความเชื่อมั่นให้กับเกษตรกรที่ซื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันไปปลูก และยังช่วยยกระดับผลผลิตปาล์มน้ำมัน และน้ำมันปาล์มของประเทศไทยให้สูงขึ้นด้วย โดยทั่วไปการใช้ต้นกล้าปาล์มที่ไม่ได้มาตรฐานไปปลูก เกษตรกรจะทราบได้เมื่อปลูกผ่านไปเป็นเวลา 2-3 ปี จนกระทั่งติดผล ทำให้เกษตรกรได้ผลผลิตต่ำ

ที่ผ่านมากรมวิชาการเกษตรสามารถตรวจสอบพันธุ์และชนิดของต้นกล้าปาล์มได้โดยใช้เทคโนโลยี TaqMan SNP Genotyping และต้องอาศัยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งวิธีการนี้ต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง นอกจากนี้ ยังต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้น จึงได้มีงานวิจัยการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพันธุ์และชนิดของต้นกล้าโดยใช้เทคนิค Nucleic Acid Lateral Flow (NALF) (Kamphee *et al*., 2015) พัฒนาเป็นชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย อาศัยหลักการแยกสารผสมที่ต้องการตรวจด้วยระบบ chromatography บนแผ่น nitrocellulose membrane ผนวกกับปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติบอดีที่จำเพาะกับสารที่ติดฉลากอยู่กับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำสูง และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR นอกจากนั้นเทคนิคนี้ยังใช้งานได้ง่าย และรวดเร็ว โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง งานวิจัยนี้วัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย เพื่อใช้ตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้า สำหรับตรวจคัดกรองการปนของต้นปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะกะลาแบบ dura ในแปลงเพาะกล้า อีกทั้งยังใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ที่มีกะลาแบบ pisifera ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันตั้งแต่ระยะต้นกล้า ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พืชที่ศึกษา

ประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli Tanzania และพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 จากแปลงพ่อ-แม่พันธุ์ และแปลงผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จากศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันกระบี่

2. การโคลนยีน MADS-box จากปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli Tanzania และพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลำดับของดีเอ็นเอ บนยีน MADS-box ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะผลและความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน 3 กลุ่มพันธุ์ ประกอบด้วย กลุ่มพันธุ์ Deli Tanzania และพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 โดยการค้นหา

ข้อมูลและออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน MADS-box จากปาล์มน้ำมันทั้ง 3 กลุ่มพันธุ์ แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของแต่ละกลุ่มพันธุ์ หาตำแหน่งของลำดับดีเอ็นเอที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปส์ เพื่อนำไปใช้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบ ให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์ของยีน MADS-box ที่สัมพันธ์กับลักษณะผลและความหนาของกะลาในปาล์มน้ำมัน มีขั้นตอนการดำเนินงาน ดังนี้

2.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันจากต้นกล้าอายุ 8-12 เดือน กลุ่มพันธุ์แม่ Deli ชนิด dura จำนวน 23 ตัวอย่าง กลุ่มพันธุ์พ่อ Tanzania ชนิด dura pisifera และ tenera จำนวน 5, 32 และ 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ และกลุ่มพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด tenera จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Plant Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ตามรายละเอียดของวิธีการในชุดสกัด จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°ซ.

2.2 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน MADS-box ในปาล์มน้ำมัน เนื่องจากตำแหน่งไพรเมอร์ที่รายงานโดย Singh *et al.* (2013) เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ไม่ใช่ชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายปนอยู่ในผลผลิตพีซีอาร์ จึงต้องหาตำแหน่งไพรเมอร์ที่เหมาะสมใหม่ ซึ่งต้องอาศัยข้อมูลลำดับเบสที่ขนาบข้างยีน MADS-box โดยนำลำดับเบสของยีน ที่รายงานโดย หทัยรัตน์และคณะ (2560) และ Singh *et al.* (2013) ไปค้นหาลำดับเบสขนาบข้างบนจีโนมปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) จากฐานข้อมูล NCBI แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม BatchPrimer 3 จากนั้น นำไพรเมอร์ที่ได้ไปต่อกับลำดับเบสด้านปลาย 5' ด้วย M13 adapter ของไพรเมอร์แต่ละเส้น เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการหาลำดับเบสของยีน MADS-box นำลำดับเบสที่ได้ไปสังเคราะห์ไพรเมอร์โดยบริษัท Integrated DNA Technologies, USA

2.3 การเพิ่มปริมาณยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากข้อ 2.2 มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ชุดน้ำยา Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) ตามรายละเอียดของวิธีการในชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ของยีน MADS-box ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เหลือไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์ RBC HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ตามรายละเอียดของวิธีการในชุดทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์

2.4 การหาตำแหน่งสนิปส์บนยีน MADS-box โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ในข้อ 2.3 ไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) จากนั้น เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน MADS-box ระหว่างปาล์มน้ำมันแต่ละกลุ่มพันธุ์ โดยการทำ Contig Assembly ด้วยโปรแกรม CodonCode Aligner เพื่อหาความเหมือนและความแตกต่างกันของลำดับเบสของแต่ละกลุ่มพันธุ์ เมื่อพบตำแหน่งของเบสที่มีการเปลี่ยนแปลง (ตำแหน่งสนิปส์) ที่สัมพันธ์กับลักษณะผลและความหนาของกะลาในปาล์มน้ำมัน นำข้อมูลของตำแหน่งสนิปส์และเบสบริเวณใกล้เคียงไปใช้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบ ให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์บนยีน MADS-box ด้วยเทคนิค TaqMan SNP Genotyping Assays และ Allele-specific Primers ต่อไป

3. การพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยเทคนิค NALF เพื่อใช้ตรวจจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน

นำเทคนิค Nucleic Acid Lateral Flow (NALF) ซึ่งเป็นวิธีตรวจดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์เป้าหมายที่ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการแยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยแผ่นเจล นำมาพัฒนาเพื่อใช้ตรวจดีเอ็นเอในตำแหน่งที่เกิดสนิปส์ ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน มีขั้นตอนการดำเนินงาน ดังนี้

3.1 แผ่นตรวจ NALF ทำงานโดยอาศัยหลักการแยกสารผสมที่ต้องการตรวจด้วยระบบ chromatography บนแผ่น nitrocellulose membrane ออกแบบแผ่นตรวจสอบให้สามารถตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายได้ 2 ชนิด (2 test lines) และตรงกับจำนวนรูปแบบของตำแหน่งสนิปส์ที่ต้องการตรวจ ตามวิธีที่รายงานโดย Kamphee *et al*. (2015) กล่าวคือ การเกิดแถบสีบนแผ่นตรวจสอบ NALF จะเกิดขึ้นตามชนิดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้รับการติดฉลาก ดังนี้ 1) ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากชิ้นดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย FAM (Fluorescein Amidites) และ Biotin ให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับ Test line ที่ 1 ซึ่งเป็นผลจากการจับกันของ FAM ที่ติดฉลากอยู่บนสายดีเอ็นเอ กับ anti-FAM capture antibody และ 2) ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากชิ้นดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย DIG (Digoxigenin) 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

3.2 การออกแบบไพรเมอร์ตรวจสอบลักษณะความหนากะลา เพื่อใช้กับแผ่นตรวจ NALF โดยนำลำดับเบสของยีน MADS-box บริเวณตำแหน่งสนิปส์ที่สัมพันธ์กับลักษณะความหนากะลาของปาล์มน้ำมัน พร้อมทั้งลำดับเบสบริเวณใกล้เคียงไปออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม BatchPrimer 3 ที่มีการตั้งค่าเป็น allele-specific primers and allele-ranking primers และนำลำดับเบสที่ได้ไปสังเคราะห์ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์แต่ละเส้นจะต้องต่อด้วยเบสที่คู่สมกับไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วยสาร ที่สามารถจับกับ aniti-FAM antibody และ anti-DIG antibody ที่อยู่บนแผ่นตรวจ NALF ที่ออกแบบไว้ โดยไพรเมอร์เส้นที่ 1 ด้าน forward primer จำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์แบบ A ที่สัมพันธ์กับลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันพันธุ์แม่ชนิด dura และต่อลำดับเบสของ FAM adapter ที่ด้านปลาย 5’ เพื่อใช้กับไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย FAM ไพรเมอร์เส้นที่ 2 ด้าน forward primer จำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์แบบ T ที่สัมพันธ์กับลักษณะผลที่ไม่มีกะลาของปาล์มน้ำมันพันธุ์พ่อชนิด pisifera และต่อลำดับเบสของ DIG adapter ที่ด้านปลาย 5’ เพื่อใช้กับไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย DIG ไพรเมอร์เส้นที่ 3 ด้าน reverse primer จำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และต่อลำดับเบสของ Biotin adapter ที่ด้านปลาย 5’ เพื่อใช้กับไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย Biotin

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อใช้ตรวจลักษณะความหนากะลาของปาล์มน้ำมันโดยใช้แผ่นตรวจ NALF การศึกษาในขั้นตอนนี้ เป็นการเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบผสมรวมที่ประกอบด้วยเอนไซม์ และสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องใช้ไว้ในหลอดเดียวกันเป็น master mix เพื่อใช้กับชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย ให้ผู้ที่นำชุดตรวจสอบไปใช้สามารถใช้งานได้สะดวก ไม่จำเป็นต้องเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยตัวเอง โดยใช้ไพรเมอร์ตามข้อ 3.2 และดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามข้อ 1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนนี้จะใช้เทคนิค Nested PCR (Murai *et al*., 1992) ซึ่งเป็นการทำพีซีอาร์แบบสองขั้นตอน

ขั้นตอนแรกจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตำแหน่งของสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบรวม 1 (master mix 1) ปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละหลอด ประกอบไปด้วย 2x rhAmp SNP genotyping master mix 5 ไมโครลิตร, 5μM ของ forward primer และ 10 μM ของ reverse primer ตามข้อ 3.2 อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นสำหรับทำพีซีอาร์ 3 ไมโครลิตร การนำไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ใช้ master mix 1 ปริมาตร 9 ไมโครลิตร และเติมดีเอ็นเอความเข้มข้น 10 นาโนกรัม /ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ตั้งสภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 95°ซ. 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95°ซ. 10 วินาที 65°ซ. 30 วินาที และ 68°ซ. 20 วินาที จำนวน 10 รอบ หลังจากนั้น เป็นการทำพีซีอาร์ขั้นตอนที่สอง เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับลำดับเบสที่ต่อเข้ากับปลายด้าน 5' ของไพรเมอร์แต่ละเส้น โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบรวม 2 (master mix 2) ปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละหลอด ประกอบไปด้วย 5x HOT FIREPol blend master mix 4 ไมโครลิตร, 10 μM ของไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย FAM, DIG และ Biotin ตามข้อ 3.2 อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นสำหรับทำพีซีอาร์ 4.5 ไมโครลิตร การนำไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบที่สองทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ใช้ master mix 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติมลงในหลอดของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนแรก 10 ไมโครลิตร และตั้งสภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 95°ซ. 12 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95°ซ. 10 วินาที 55°ซ. 30 วินาที 72°ซ. 20 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72°ซ. 5 นาที จำนวน 1 รอบ

3.4 การตรวจดีเอ็นเอด้วยแผ่นตรวจ NALF โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้ในข้อ 3.3 ผสมรวมกับสารละลาย NALF buffer (75.4mM $Na_2HPO_4 7H_2O$, 24.6 mM $NaH_2PO_4 H_2O$) 80 ไมโครลิตร ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในช่องหยอดตัวอย่างของแผ่นตรวจ NALF รอเวลาประมาณ 2-5 นาที จะเกิดแถบสีบน test line และ control line ตามชนิดของตัวอย่างที่ทดสอบ บันทึกผลการปรากฏแถบสีที่เกิดขึ้นบนแผ่นตรวจ

4. การศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย

4.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจความหนาของกะลาระหว่างการใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้เทคนิค Real-time PCR โดยใช้เทคโนโลยี TaqMan SNP genotyping ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ที่จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์ ที่ต้องการตรวจสอบ เพื่อนำไปใช้เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย มีขั้นตอนการดำเนินงาน ดังนี้

4.1.1 การพัฒนาวิธีการตรวจลักษณะความหนากะลาของปาล์มน้ำมันด้วยเทคโนโลยี TaqMan SNP Genotyping (Applied Biosystems, USA) โดยใช้เครื่อง Real-time PCR การออกแบบโพรบและไพรเมอร์ โดยนำลำดับเบสของยีน MADS-box พร้อมระบุตำแหน่งสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ ไปออกแบบตามเทคโนโลยี 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 จะมีการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ และตรวจสอบสัญญาณของแสงฟลูออเรสเซนต์ตามชนิดของสีที่ติดฉลากไว้ ทำให้สามารถจำแนกชนิดของสนิปส์ที่เกิดขึ้นบนดีเอ็นเอตามลักษณะผลของปาล์มน้ำมันชนิด dura และ pisifera ได้ จากนั้นนำไปใช้การตรวจสอบลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันด้วยวิธี Real-time PCR ใช้เทคโนโลยี TaqMan SNP Genotyping โดยการนำดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่สกัดได้ในข้อ 2.1 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°ซ. 20 วินาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95°ซ. 3 วินาที 60°ซ. 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

4.1.2 ใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน ปฏิบัติตามวิธีการในข้อ 3.3 และ 3.4 โดยใช้ตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่มีกะลาแบบ dura 10 ตัวอย่าง pisifera 10 ตัวอย่าง และ tenera 12 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกับการตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้เทคนิค Real-time PCR ในด้านความสามารถในการจำแนกลักษณะความหนากะลาได้ถูกต้อง ต้นทุนของเครื่องมือ และสารเคมีในการตรวจวิเคราะห์

4.2 การทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย (method validation)

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ของชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายในเชิงคุณภาพ ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะความหนาของกะลาแบบ dura pisifera และ tenera แต่ละการทดสอบทำ 10 ซ้ำ นำไปทดสอบความถูกต้อง (accuracy) ของวิธีตรวจวิเคราะห์ที่วัดได้ว่ามีค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากน้อยเท่าไร โดยนำผลการตรวจที่ได้จากการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายเปรียบเทียบค่าจริงที่ปาล์มน้ำมันแต่ละต้นมีลักษณะความหนาของกะลาแบบต่าง ๆ และทดสอบความแม่นยำ (precision) โดยทดสอบค่า repeatability เพื่อหาความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ ในสภาวะเดียวกัน โดยใช้วิธีเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน และทดสอบ reproducibility เพื่อหาความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ โดยใช้วิธีเดียวกัน แต่มีผู้วิเคราะห์ต่างกัน เครื่องมือต่างกัน ทำในห้องปฏิบัติการต่างกัน และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (limit of detection; LOD) โดยตรวจสอบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอปาล์มน้ำมัน 8 ระดับ ได้แก่ 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 และ 0 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

5. การใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายตรวจจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้าในแปลงผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสม

นำชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายที่พัฒนานี้ ไปทดสอบใช้ตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์สุราษฎร์ธานี 7

ที่เกิดจากการผสมกันระหว่าง Deli dura กับ Tanzania pisifera ในแปลงผลิตต้นกล้าของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันกระบี่ กรมวิชาการเกษตร จ.กระบี่ โดยใช้ตัวอย่างใบจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 8-12 เดือน เก็บตัวอย่างโดยวิธีการสุ่มแบบมีระบบ (Systematic Sampling) จากประชากรต้นกล้าทั้งหมด 655 ต้น เก็บตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวแทนสำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอ จำนวน 10 % (66 ต้น) นำใบกล้าปาล์มน้ำมันมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 2.1 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบจำแนกลักษณะความหนาของกะลาด้วยชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย ตามวิธีการในข้อ 3.3-3.4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การโคลนยีน MADS-box จากปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli Tanzania และพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7

ผลจากการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เพิ่มปริมาณยีน MADS-box จากปาล์มน้ำมัน พบว่ามีส่วนของยีน MADS-box ปรากฏอยู่บนลำดับเบสของจีโนมปาล์มน้ำมันบนโครโมโซมที่ 2 หมายเลข Accession NC__025994.1 และสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับเบส ด้าน forward primer และ ด้าน reverse primer (Table 1) ครอบคลุมตั้งแต่ตำแหน่งที่ 3078403-3077678 ในโครโมโซมที่ 2 ของฐานข้อมูลจีโนมของปาล์มน้ำมัน การนำไพรเมอร์ที่ได้ไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน MADS-box กับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน 3 กลุ่มพันธุ์ คือ กลุ่มพันธุ์แม่ Deli กลุ่มพ่อพันธุ์ Tanzania และกลุ่มพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ที่เกิดจากการผสมระหว่างสองกลุ่มพันธุ์ พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลผลิตพีซีอาร์ชัดเจน มีความยาว 769 คู่เบส และเมื่อนำผลผลิตของพีซีอาร์ของยีน MADS-box ไปอ่านลำดับเบสของเส้นดีเอ็นเอทั้งสองทิศทาง และเปรียบเทียบกันระหว่าง 3 กลุ่มพันธุ์ พบว่า ลำดับดีเอ็นเอของยีน MADS-box มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไป 3 ตำแหน่ง โดยมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปส์ (SNP) 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 274 และ 485 และการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบการแทรกหรือขาดหายไป (Insertion /Deletion) 1 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง 406-409 (Table 2) โดยการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอทั้งสามตำแหน่งมีความสัมพันธ์กับชนิดของลักษณะผลปาล์มน้ำมันในแต่ละกลุ่มพันธุ์ดังนี้

1.1 สนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 พบในปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์แม่ Deli dura มีลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ homozygous A/A ในขณะที่ปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์พ่อ Tanzania pisifera มีลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ homozygous T/T สำหรับปาล์มน้ำมันที่พันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด tenera ที่เกิดจากการผสมระหว่างสองกลุ่มพันธุ์ดังกล่าว ปรากฏลำดับดีเอ็นเอแบบ heterozygous A/T ของแต่ละอัลลีล

1.2 สนิปส์ที่ตำแหน่ง 485 พบในปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์แม่ Deli dura มีลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ homozygous G/G ในขณะที่ปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์พ่อ Tanzania pisifera มีลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ homozygous C/C สำหรับปาล์มน้ำมันที่พันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด tenera ปรากฏลำดับดีเอ็นเอแบบ heterozygous G/C ของแต่ละอัลลีล

1.3 การแทรกหรือขาดหายไปของเบสที่ตำแหน่ง 406-409 เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอขนาด 4 คู่เบส ทำให้ปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์แม่ Deli dura ไม่มีลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ TTAA ในตำแหน่งดังกล่าว ในขณะที่ปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์พ่อ Tanzania pisifera มีลำดับดีเอ็นเอเป็นแบบ TTAA สำหรับปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด tenera รูปแบบของลำดับดีเอ็นเอจะเป็นแบบผสมกันระหว่างที่มีและไม่มีลำดับดีเอ็นเอแบบ TTAA ของแต่ละอัลลีล

จะเห็นได้ว่า พันธุ์ลูกผสมได้รับการถ่ายทอดชิ้นดีเอ็นเอจากพันธุ์พ่อและแม่อย่างละครึ่ง ซึ่งใน

กรณีปาล์มน้ำมันนั้นเป็นพืชที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด (diploid, 2n=2x=32) แต่ละยีนจะมี 2 อัลลีล ที่เป็นคู่กัน โดยแต่ละอัลลีลจะเหมือนหรือแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับลำดับดีเอ็นเอของแต่ละอัลลีลที่ได้รับจากปาล์มพันธุ์พ่อและแม่ ผลจากการอ่านลำดับเบสของยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมชนิด tenera (พันธุ์สุราษฎร์ธานี 7) จะมีอัลลีลที่ได้รับจากพันธุ์พ่อและแม่อย่างละครึ่ง ที่ปรากฏให้เห็นด้วยลำดับดีเอ็นเอที่ ตำแหน่ง 274, 406-409 และ 485 เป็นแบบ heterozygous ในลูกผสม

การหาตำแหน่งสนิปส์ของยีน MADS-box ในปาล์มน้ำมัน พบว่า สนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 ที่มีการเปลี่ยนลำดับเบสจาก A เป็น T ให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Singh *et al.* (2013) ซึ่งเป็นตำแหน่งสนิปส์ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความหนาของกะลาลักษณะ 3 แบบ คือ dura pisifera และ tenera ซึ่งเป็นผลมาจากยีน *SHELL* gene: *Sh* ที่ควบคุมความหนาของกะลา ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอแบบสนิปส์ที่ได้ในขั้นตอนนี้ จะนำไปใช้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบเพื่อการตรวจสอบลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค TaqMan SNP Genotyping โดยใช้เครื่อง Real-time PCR และการพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยเทคนิค Nucleic Acid Lateral Flow ในขั้นตอนต่อไป

2. ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยเทคนิค NALF เพื่อใช้ตรวจจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน

ผลจากการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะและเหมาะสมกับการตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ของยีน MADS-box ที่สัมพันธ์กับลักษณะ

Table 1 Names and sequences of primers and probes used in this study

Primer name	Sequences (5′ → 3′)	Ta (°C)
MADS-box	F: TTGCTTTTAATTTTGCTTG AATACC R: GGCAAAACTCAAACCCTTTTT	55
M13 adapter	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA R: AGGAAACAGCTATGACCAT	55
FAM adapter DIG adapter Biotin adapter	GAAGGTGACCAAGTTCATGCT GAAGGTCGGAGTCAACGG ATT GCGGATAACAATTTCACACAGG	55
MADS274-A MADS274-T MADS274R	AACGCCGAAATGGACTGCTGAAGAA AACGCCGAAATGGACTGCTGAAGTAT GGCTTGGCCATAGAACAAATGAAGC	65
TaqMan primer TaqMan probe	F: CCTCAGCATCACAAAGGACAGA R: CTGCAAACGCCGAAATGGA VIC-CAACTCATAAGCTTTCTTC-NFQ FAM-CTCATAAGCATTCTTC-NFQ	60

Table 2 Summary of SNPs and In/Del positions for genotyping of oil palms.

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

Data were generated from nucleotide sequences of MADS-box gene from 3 oil palm populations

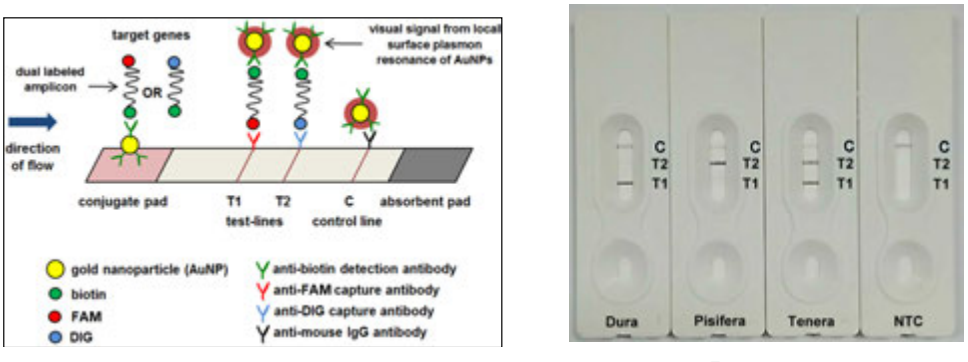
ความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค NALF พบว่า ได้ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 (A/T) 3 เส้น (Table 1) ได้แก่ 1) MADS274-A เป็น forward primer ที่จำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์ A/A ของปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผลแบบ dura 2) MADS274-T เป็น forward primer ที่จำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์ T/T ของปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผลแบบ pisifera และ 3) MADS274R เป็น reverse primer ที่อยู่ทางด้าน 3' ของสายดีเอ็นเอในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลักษณะ dura และ pisifera โดยไพรเมอร์ดังกล่าวให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 193 คู่เบส และเมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับปาล์มน้ำมันแม่พันธุ์ชนิด Deli dura พ่อพันธุ์ชนิด Tanzania pisifera และพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ชนิด tenera เมื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ พบว่า การใช้ไพรเมอร์ 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 แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้นั้นมีความจำเพาะและสามารถใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะผลแบบ dura, pisifera และ tenera ได้อย่างถูกต้อง จึงได้นำไพรเมอร์ทั้ง 3 เส้น ไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Duplex PCR โดยนำไพรเมอร์ MADS274F-A และ MADS 274F-T และ ไพรเมอร์ MADS274R มารวมกันเพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในหลอดเดียว พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ผลถูกต้อง และมีความจำเพาะกับสนิปส์ตำแหน่ง A/A และ T/T นอกจากนี้ ยังพบว่าการนำไพรเมอร์ทั้ง 3 เส้นที่นำมารวมกันนั้น สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากบริเวณอื่น ๆ ของจีโนมปาล์มน้ำมัน

ผลจากการทดสอบชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยแผ่นตรวจ NALF พบว่า สามารถใช้ตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างถูกต้อง กล่าวคือ มีรูปแบบการเกิดแถบสีขึ้นบนแผ่นตรวจสอบ NALF ตามชนิดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้รับการติดฉลาก ดังนี้ 1) ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์แบบ A/A ที่ติดฉลากด้วย FAM และ Biotin (Figure 1) ให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับ Test line ที่ 1 และเกิดแถบสีบน control line 2) ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปส์แบบ T/T ที่ติดฉลากด้วย DIG และ Biotin ให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับ Test line ที่ 2 และเกิดแถบสีบน control line สำหรับการเกิดแถบสีบน Control line เป็นแถบสีที่บ่งบอกถึงความปกติหรือผิดปกติของแผ่น

ตรวจสอบ ถ้าหากไม่เกิดแถบสีบน control line แสดงว่าแผ่นตรวจสอบนั้นไม่มีความน่าเชื่อถือในการใช้งาน (Figure 2)

ผลจากการเตรียมส่วนผสมของสารเคมีและเอนไซม์ต่าง ๆ ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้อยู่ในหลอดเดียวกันเป็นส่วนผสมแบบรวม master mix 1 และ master mix 2 เพื่อเป็นน้ำยาสำเร็จรูปใช้กับชุดตรวจสอบอย่างง่าย ให้ผู้ใช้งานเติมเฉพาะดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจเท่านั้น พบว่า การเตรียมส่วนผสมแบบรวมให้ผลการตรวจถูกต้องเหมือนเดิม สะดวกต่อการใช้งาน โดยไม่จำเป็นต้องเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์เอง

Figure 1 Schematic illustration of SNP genotyping primers for NALF assay. The A/T substitution of a heterozygote individual is presented as an example. Two allele-specific amplicons are generate using two pairs of primer, one pair (A allele specific forward primer-FAM and reverse primer-Biotin) producing an amplicon representing the A allele and the other pair (T allele specific forward primer-DIG and reverse primer-Biotin) producing an amplicon representing the T allele



A B

Figure 2 Schematic illustration of NALF design. The NALF device functions to indicate the presence of dual labeled amplicons in PCR products. At the conjugate pad, AuNP-anti biotin to biotin on one end of the amplicon, and the complex flows towards the test-line, T1 and T2. T1 is lined with anti-FAM mAb to capture biotin-FAM labeled amplicons, indicative of dura-form oil palm assay. T2 is lined with anti-DIG mAb to capture biotin-DIG labeled amplicons for pisifera-form oil palm assay. The excess AuNP-anti-biotin is captured at C (control line) by anti-mouse IgG. (Kamphee *et al*., 2015) (A). The result of fruit form detection on Deli and Tanzania samples (dura, pisifera and tenera) by DNA Easy Kit designed from SNP at 274 (A/T) nucleotide sequence (B)

3. ประสิทธิภาพของชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย

3.1 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจความหนาของกะลาระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้วิธี Real-time PCR

การพัฒนาวิธีการตรวจลักษณะผลของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค Real-time PCR ได้ไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมกับการตรวจสอบด้วยเทคโนโลยี TaqMan SNP genotyping เพื่อใช้ตรวจดีเอ็นเอที่ตำแหน่งสนิปส์ที่ 274 (A/T) ที่อยู่บนยีน MADS-box และให้ความแตกต่างในการตรวจจำแนกลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli dura และ Tanzania pisifera ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 65 คู่เบส และได้โพรบที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนส์ 2 เส้น ได้แก่ โพรบติดฉลากด้วย VIC มีขนาด 19 คู่เบส ที่มีความจำเพาะกับลักษณะกะลาแบบ dura และโพรบที่ติดฉลากด้วย FAM มีขนาด 16 คู่เบส ที่มีความจำเพาะกับลักษณะกะลาแบบ pisifera เพื่อยืนยันความใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบไว้ ได้นำไปตรวจจำแนกลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันในกลุ่มประชากร Deli Tanzania และลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ตามรูปแบบอัลลีลที่พบ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มพันธุ์แม่ชนิด dura กลุ่มพันธุ์พ่อชนิด pisifera และกลุ่มพันธุ์ลูกผสมเทอรา (Figure 3) จะเห็นได้ว่าตำแหน่งสนิปส์ที่ 274 (A/T) เป็นตำแหน่งที่สามารถตรวจจำแนกลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันในกลุ่มประชากร Deli Tanzania และลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ได้ถูกต้องกับทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบ และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการหาลำดับเบส (sequencing) ทุกตัวอย่าง (Table 3) ให้ผลตรงกับผลการพิสูจน์ที่ทราบแล้วว่าเป็นปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะกะลาแบบใด

จากการเปรียบเทียบวิธีการตรวจความหนาของกะลาระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายกับการใช้วิธี Real-time PCR ที่ใช้ตัวอย่างปาล์มน้ำมันเดียวกัน พบว่า การตรวจด้วยชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย จะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีที่เป็นลักษณะกะลาแบบ dura 10 ตัวอย่าง pisifera 10 ตัวอย่าง และ tenera 12 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องตรงตามลักษณะกะลาที่ปรากฏให้เห็น และให้ผลการตรวจสอดคล้องกับการตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR ที่พบค่า Allelic Discrimination Plot สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือตัวอย่างที่มีลักษณะผลแบบ dura 10 ตัวอย่าง pisifera 10 ตัวอย่าง และ tenera 12 ตัวอย่าง (Table 4)

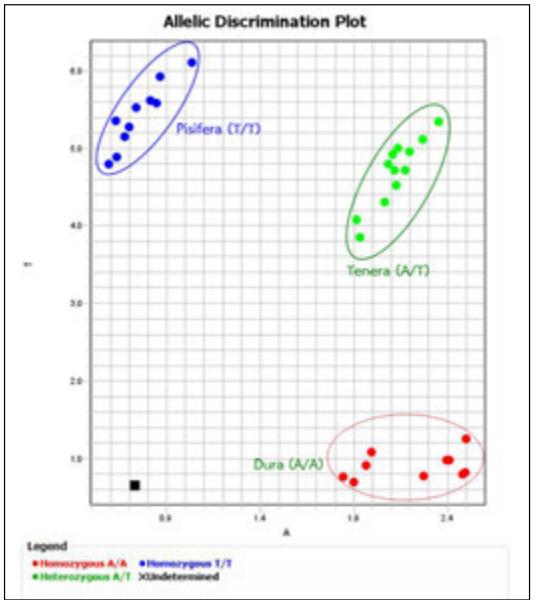


Figure 3 The result of fruit form detection on Deli and Tanzania samples (dura, pisifera and tenera) by primer and probe designed from SNP at 274 (A/T). The amplification and allelic discrimination plot were generated by Real-time PCR

วิธีการตรวจลักษณะกะลาของปาล์มน้ำมันโดยใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย และการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR พบว่า ทั้งสองวิธีให้ผลการตรวจที่สอดคล้องไปในทางเดียวกัน มีความถูกต้องตรงกัน และสัมพันธ์กับลักษณะกะลาที่ปรากฏให้เห็น จึงถือได้ว่าวิธีการตรวจโดยใช้ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายที่พัฒนาขึ้นในการ

ตรวจลักษณะกะลาปาล์มน้ำมัน เป็นวิธีใหม่ที่ไม่มีรายงานมาก่อน ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ถูกต้อง มีค่าใช้จ่ายของสารเคมี เครื่องมือ ความยุ่งยากในการตรวจวิเคราะห์น้อยกว่าการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR กล่าวคือ ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายมีค่าใช้จ่ายในการตรวจ ตัวอย่างละ 135 บาท และใช้ระยะเวลาในการตรวจ 2 ชม. 30 นาที ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี Real-time PCR มีค่าใช้จ่ายในการตรวจตัวอย่างละ 185 บาท ใช้ระยะเวลาในการตรวจ 2 ชม. และต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง (Table 5) ชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายนี้จึงสามารถนำมาใช้แทนการตรวจโดยวิธี Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐานในห้องปฏิบัติการได้

3.2 การทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่าย

จากการทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย ในเชิงคุณภาพ พบว่า ให้ผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกับค่าที่แท้จริง 100 % สำหรับผลการทดสอบความแม่นยำโดยการทดสอบ repeatability พบว่า การทดสอบที่ทำในสภาวะเดียวกัน โดยใช้วิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้อง 100 % และ

Table 3 Comparison of phenotype and genotype (Sequencing and Real-time PCR) for detection of fruit form (dura, pisifera and tenera) in oil palm samples

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

Remarks: [a] = dura, [b] = pisifera [c] = tenera * = Genotype/Phenotype concordance

Table 4 Comparison of DNA Easy Kit and Real-time PCR technique for detection of fruit form (dura, pisifera and tenera) in oil palm samples

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

Remarks: [a] = dura, [b] = pisifera [c] = tenera

Table 5 Comparison of reagent and equipment costs for DNA Easy Kit and Real-time PCR technique detection

Component	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

การทดสอบ reproducibility ที่ตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีเดียวกัน แต่มีผู้วิเคราะห์ต่างกัน เครื่องมือต่างกัน และทำในห้องปฏิบัติการต่างกัน ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ 100 % เช่นกัน

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (limit of detection; LOD) ของชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย พบว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันที่ระดับ 10 1 0.1 และ 0.01 นาโนกรัม/ไมโครลิตร มีแถบสีเกิดขึ้นบนแผ่นตรวจชัดเจน ขณะที่ระดับความเข้มข้น 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เกิดแถบสีจาง ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 0.0001 0.00001 และ 0 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ไม่ปรากฏแถบสีบนแผ่นตรวจ แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย มีค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ คือที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 0.01 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

4. การใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายตรวจจำแนกลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้าในแปลงผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสม

ผลจากการนำชุดตรวจสอบดีเอ็นเออย่างง่ายไปใช้ตรวจคัดกรองการปนของต้น dura ในแปลงผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์สุราษฎร์ธานี 7 อายุ 8-12 เดือน พบการปนของต้นกล้าที่มีลักษณะกะลาแบบ dura 4.54 % ของจำนวนที่ตรวจคัดกรองทั้งหมด 66 ต้น ซึ่งอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดยมาตรฐานการปนของต้น dura ตามคำแนะนำไม่ควรเกิน 5 % เนื่องจากกรณีที่ผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์มีการควบคุมคุณภาพการผลิตที่ดีนั้น ความแปรปรวนอันเนื่องมาจากพันธุกรรมของต้นกล้าในแปลงเพาะกล้าควรจะน้อยกว่า 5 % นอกจากนี้ เพื่อยืนยันผลตรวจของชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย จึงได้นำดีเอ็นเอของต้นกล้าที่ตรวจพบลักษณะกะลาแบบ dura ไปตรวจยืนยันผลด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่า ให้ผลตรวจตรงกันทั้งสองวิธี ได้มีรายงานการตรวจการปนของต้นปาล์มน้ำมันชนิด dura และ pisifera ในแปลงปลูกและแปลงผลิตต้นกล้าในประเทศมาเลเซีย ตรวจพบการปนของต้น dura และ pisifera 9.2 และ 1.5 % ตามลำดับ จากตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด 10,224 ตัวอย่าง (Ooi *et al*., 2016)

การใช้ชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อตรวจคัดกรองต้น dura ของปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าที่พัฒนาได้ครั้งนี้ สามารถนำไปใช้ควบคุมคุณภาพต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ กล่าวคือ หลังจากการตรวจคัดกรองในระดับดีเอ็นเอด้วยชุดตรวจอย่างง่ายแล้วหากพบต้น dura ก็สามารถคัดออกได้ ซึ่งจะทำให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันชุดที่ผลิตมีคุณภาพที่ดียิ่งขึ้น เป็นการยกระดับคุณภาพกระบวนการผลิตพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสม tenera ให้สูงขึ้น เกษตรกรได้พันธุ์ปาล์มที่ได้มาตรฐานตรงตามพันธุ์ มีความเชื่อมั่นในคุณภาพของต้นกล้า ส่งผลให้ผลผลิตปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มสูงขึ้นด้วย

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบลำดับเบสของยีน MADS-box ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหนาของ

กะลา พบการเปลี่ยนลำดับเบสแบบสนิปส์ที่ตำแหน่ง 274 (A/T) มีความสัมพันธ์กับลักษณะความหนากะลาในประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli Tanzania และลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 และได้นำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย สำหรับตรวจลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงเทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำ 100 % โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง สามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอได้ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.01 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ได้นำชุดตรวจสอบไปใช้จริงในการตรวจคัดกรองเพื่อลดการปนของต้นปาล์มที่มีลักษณะกะลาแบบ dura ในแปลงผลิตต้นกล้าพันธุ์ลูกผสมสุราษฎร์ธานี 7 ก่อนจำหน่าย ทำให้เกษตรกรได้พันธุ์ปาล์มที่ดีมีมาตรฐานตรงตามพันธุ์ มีความเชื่อมั่นในคุณภาพของต้นกล้า และสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาแบบ pisifera ตั้งแต่ระยะต้นกล้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดพื้นที่ปลูก ระยะเวลา แรงงาน และลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่จะส่งผลให้เกิดการปรับปรุงพันธุ์แบบก้าวกระโดดในปาล์มน้ำมัน อีกทั้งชุดตรวจดีเอ็นเออย่างง่ายสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือระดับพื้นฐานตามศูนย์วิจัยปาล์มในต่างจังหวัดได้ นับเป็นการสร้างชุดตรวจดีเอ็นเอ ที่เป็นนวัตกรรมใหม่ของกรมวิชาการเกษตร ที่ก้าวหน้า และเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

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

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ อรรัตน์ วงศ์ศรี และนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ. 2560. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล. *ว. วิชาการเกษตร 35*(2): 117 - 135

Kamphee, H., A. Chaiprasert, T. Prammananan, N. Wiriyachaiporn, A. Kanchanatavee and T. Dharakul. 2015. Rapid Molecular Detection of Multidrug Resistant 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.