# การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปในยีน *Piezo-type mechanosensitive ion channel homolog* (*Piezo*) และประสิทธิภาพในการคัดเลือกลักษณะความต้านทานโรคยอดเน่าในสับปะรด

# Development of SNP Marker in *Piezo-type Mechanosensitive Ion Channel Homolog* (*Piezo*) Gene and Efficiency Testing of the SNP Marker in Screening for Heart Rot Disease Resistance in Pineapple

**จีราพร แก่นทรัพย์[1/*] มัลลิกา นวลแก้ว[2/] อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว[3/] สุภาวดี ง้อเหรียญ[1/]**

**Jeeraporn Kansup[1/*] Mallika Nualkaew[2/] Amornrat Kidjaidiew[3/] Suphawadee Ngorian[1/]**

*Received 17 May 2025/Revised 18 Jun. 2025/Accepted 24 Jul. 2025*

## ABSTRACT

Heart rot disease caused by fungi *Phytophthora* spp. is a major problem in pineapple production. This research was conducted to develop a primer set specific for a nonsynonymous SNP marker in the pineapple *Piezo-type mechanosensitive ion channel homolog* (*Piezo*) gene, S13_8307911, which exhibits nucleotide sequence differences between heart rot disease-resistant and susceptible varieties. PCR conditions were optimized to detect this SNP marker using tetra-primer ARMS–PCR technique. The efficiency of the SNP markers for selecting heart rot disease resistance was assessed in a hybrid pineapple sample set of 22 lines exhibiting resistance under natural conditions, using genotype–phenotype concordance as a measure of prediction accuracy. The results showed that SNP marker S13_8307911, compared with S6_3252739 in the *E3 ubiquitin-protein ligase MED25 binding RING-H2 protein 1* gene and S15_644992 in the *Pathogenesis-related protein-4-like* gene, exhibited marker prediction accuracies of 95.5%, 100%, and 81.8%, respectively. These findings suggest that the identified SNP markers have potential for application in marker-assisted selection of pineapple varieties resistant to heart rot disease. However, further validation in larger and genetically diverse populations is necessary to confirm their stability and predictive performance before implementation in breeding programs.

**Keywords:** DNA marker; SNP; heart rot disease; pineapple; tetra-primer ARMS–PCR

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ถ.รังสิต-นครนายก อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[1/] Biotechnology Research and Development Office, Rangsit-Nakhon Nayok Rd., Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

[2/] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี 76120

[2/] Phetchaburi Agricultural Research and Development Center, Cha-am, Phetchaburi 76120, Thailand

[3/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช 50 ถ.พหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[3/] Plant Protection Research and Development Office, 50 Phahonyothin Rd, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*** Corresponding author: jkansupthdoa@gmail.com**

## บทคัดย่อ

โรคยอดเน่าจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. เป็นปัญหาสำคัญในการผลิตสับปะรด เครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อโรคยอดเน่าอย่างรวดเร็วและแม่นยำ งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการพัฒนาชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดสนิปแบบ nonsynonymous ในยีน *Piezo-type mechanosensitive ion channel homolog* (*Piezo*) ของสับปะรด ตำแหน่ง S13_8307911 ที่พบว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรคยอดเน่า และได้หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS–PCR ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายในการคัดเลือกลักษณะความต้านทานต่อโรคยอดเน่าในกลุ่มตัวอย่างสับปะรดลูกผสม จำนวน 22 สายต้น ที่แสดงลักษณะต้านทานโรคภายใต้สภาพแวดล้อมธรรมชาติ โดยประเมินจากความสอดคล้องระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ หรือความแม่นยำ พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป S13_8307911 เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป S6_3252739 ในยีน *E3 ubiquitin-protein ligase MED25 binding RING-H2 protein 1* และ S15_644992 ในยีน *Pathogenesis-related protein-4-like* มีความแม่นยำของเครื่องหมาย 95.5 100 และ 81.8% ตามลำดับ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเครื่องหมายสนิปดังกล่าวมีศักยภาพสำหรับประยุกต์ใช้เพื่อการคัดเลือกพันธุ์สับปะรดต้านทานโรคยอดเน่า อย่างไรก็ตาม ควรมีการประเมินเพิ่มเติมในประชากรขนาดใหญ่และมีพื้นฐานพันธุกรรมที่หลากหลายเพื่อยืนยันความเสถียรและความแม่นยำก่อนนำไปใช้ในโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์



**คำสำคัญ:** เครื่องหมายดีเอ็นเอ; สนิป; โรคยอดเน่า; สับปะรด; เตตระไพรเมอร์ เออาร์เอ็มเอส พีซีอาร์


## บทนำ

สับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) เป็นพืชไม้ผลเมืองร้อน (tropical fruit crop) ที่สำคัญของโลก มีการผลิตทั่วโลกประมาณ 27 ล้านตัน/ปี ประเทศผู้ผลิตสำคัญ ได้แก่ คอสตาริกา ฟิลิปปินส์ บราซิล จีน อินโดนีเซีย และไทย ซึ่งมีสัดส่วนการผลิตรวมกันคิดเป็น 49.18% ของปริมาณผลผลิตโลก ในปี พ.ศ. 2566 ประเทศไทยมีพื้นที่เก็บเกี่ยว 351,841 ไร่ ผลผลิต 1.3 ล้านตัน มูลค่าส่งออกกว่า 18,309 ล้านบาท (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2566) แปรรูปเป็นสับปะรดกระป๋อง หรือน้ำสับปะรดเข้มข้น และบริโภคผลสด อย่างไรก็ตาม การผลิตสับปะรดในประเทศมักประสบปัญหาความเสียหายที่เกิดจากโรคพืช โรคยอดเน่าจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. การติดเชื้อในช่วงที่ต้นสับปะรดอายุน้อยจะทำให้ใบอ่อนหยุดเติบโตและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เกิดรอยโรคที่ฉ่ำน้ำและรอยเน่าที่โคนต้นทำให้ใบหลุดร่วงได้ง่าย ในกรณีที่รุนแรงการตายของต้นสับปะรดอาจสูงถึง 100% (Ratti et al., 2018) หากติดเชื้อในช่วงที่ต้นสับปะรดโตเต็มที่จะทำให้ผลเน่า (Serrato-Diaz et al., 2022)

Leelasetthakul (1972) รายงานการเกิดโรคยอดเน่าในสับปะรดครั้งแรกในประเทศไทย โดยมีสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* ซึ่งพบการระบาดในพันธุ์ที่ปลูกเชิงการค้าในขณะนั้น โดยเฉพาะกลุ่มพันธุ์ปัตตาเวียที่เป็นพันธุ์หลักของประเทศ ทั้งนี้ ความรุนแรงของโรคมีความแตกต่างกันตามพันธุ์สับปะรด โดยมีรายงานว่าพันธุ์ MD2 ซึ่งเป็นพันธุ์บริโภคสดที่ได้รับความนิยมในหลายประเทศ มีความอ่อนแอต่อโรคยอดเน่า (Sanewski et al.,

2016) ซึ่งพันธุ์ MD2 และพันธุ์ MG3 เป็นสับปะรดลูกผสมที่เกิดจากสายพันธุ์พ่อแม่เดียวกัน ขณะที่พันธุ์อินทรชิตขาวและพันธุ์อินทรชิตแดง (Singapore Spanish) ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองเก่าแก่ของประเทศไทย (จารุพันธ์, 2526) และมีรายงานว่าพันธุ์ดังกล่าวมีความต้านทานต่อโรคยอดเน่า (จารุพันธ์, 2526; Clark and Finn, 2010)

นักวิจัยได้พยายามปรับปรุงพันธุ์สับปะรดเพื่อเพิ่มความต้านทานต่อโรคยอดเน่า อย่างไรก็ตาม การประเมินลักษณะความต้านทานในสภาพแปลงปลูกต้องใช้ระยะเวลานานและได้รับอิทธิพลจากปัจจัยแวดล้อม ดังนั้น การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานจึงเป็นแนวทางที่มีศักยภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพการคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เทคนิค marker-assisted selection (MAS) (Collard and Mackill, 2008)

จีราพรและคณะ (2566) ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสับปะรดด้วยวิธี genotyping-by-sequencing (GBS) และนำข้อมูลผลการวิเคราะห์มาค้นหาตำแหน่งที่ให้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสับปะรดกลุ่มพันธุ์ต้านทานและกลุ่มพันธุ์อ่อนแอต่อโรคยอดเน่า โดยเลือกเฉพาะตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์หนึ่งเบส (single nucleotide polymorphism, SNP) หรือเรียกว่า สนิป ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์และเป็นฮอโมไซกัส จากการคัดกรองพบสนิปจำนวนมาก และเมื่อพิจารณาเฉพาะตำแหน่งสนิป แบบ nonsynonymous ที่เป็นการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน พบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดสนิป จำนวน 14 ตำแหน่ง ใน 9 ยีน เช่น ยีน *E3 ubiquitin-protein ligase MED25 binding RING-H2 protein 1* (*MBR1*) (รหัส LOC109711953) ที่ตำแหน่งสนิป S6_3252739 และยีน *Pathogenesis-related protein-4-like* (*PR-4*) (รหัส LOC109720991) ที่ตำแหน่งสนิป S15_644992 ซึ่งทั้งสองยีนมีบทบาทโดยตรงในกระบวนการป้องกันโรคของพืช (Duplan and Rivas, 2014; Ali et al., 2018) โดยมีการพัฒนาไพรเมอร์และหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเครื่องหมายสนิป S6_3252739 และ S15_644992 ด้วยเทคนิค tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain (tetra-primer ARMS–PCR) แล้ว

นอกจากนี้ ยังพบเครื่องหมายสนิปในยีน *Piezo-type mechanosensitive ion channel homolog* (*Piezo*) (รหัส LOC109719476) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการรับรู้แรงเชิงกลและการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยมีรายงานว่าอาจมีบทบาทเชื่อมโยงกับกระบวนการตอบสนองต่อความเครียดและการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคในพืช แม้จะเป็นบทบาททางอ้อม (Kim and Hyun, 2023) อย่างไรก็ตาม บทบาทของยีน *Piezo* ต่อความต้านทานโรคยอดเน่าในสับปะรดยังไม่มีรายงานอย่างชัดเจน จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาเพิ่มเติมและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเครื่องหมายสนิปในยีน *Piezo* และหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS–PCR นอกจากนี้ประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายสนิป S13_8307911 เปรียบเทียบกับเครื่องหมายที่มีรายงานก่อนหน้า ได้แก่ เครื่องหมายสนิป S6_3252739 ในยีน *E3 ubiquitin-protein ligase MED25 binding RING-H2 protein 1* และ S15_644992 ในยีน *Pathogenesis-related protein -4-like*

## อุปกรณ์และวิธีการ

**1. การค้นหาเครื่องหมายสนิป**

สกัดดีเอ็นเอของสับปะรดกลุ่มพันธุ์ต้านทานต่อโรคยอดเน่า ได้แก่ พันธุ์อินทรชิตขาว และพันธุ์อินทรชิตแดง และกลุ่มพันธุ์อ่อนแอต่อโรคยอดเน่า ได้แก่ พันธุ์ MD2 และพันธุ์ MG3 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสับปะรดด้วยวิธี GBS บริษัท Novogene (China) (https://www.novogene.com/amea-en) นำข้อมูลผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาค้นหาตำแหน่งที่ให้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสับปะรดกลุ่มพันธุ์ต้านทานและกลุ่มพันธุ์อ่อนแอต่อโรคยอดเน่า โดยเลือกเฉพาะตำแหน่งสนิปที่เป็นฮอโมไซกัสและมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์ ตามวิธีการของจีราพรและคณะ (2566) และออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจสอบเครื่องหมายสนิปดังกล่าว

**2. การออกแบบไพรเมอร์และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่องหมายสนิป S13_8307911**

นำข้อมูลเครื่องหมายสนิป S13_8307911 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมบริเวณใกล้เคียงไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปสำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS–PCR โดยใช้โปรแกรม Primer1 (http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html) ซึ่ง 1 ตำแหน่งของเครื่องหมายสนิปใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 เส้นในการตรวจสอบ ประกอบด้วย outer forward primer (OF) outer reverse primer (OR) inner forward primer (IF) และ inner reverse primer (IR) ดัง Table 1

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของการตรวจสอบเครื่องหมายสนิปด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ GoTaq® green master mix (Promega, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอปริมาณ 50 นาโนกรัม 1X GoTaq® green master mix ไพรเมอร์ OF 0.25 µM ไพรเมอร์ OR 0.25 µM ไพรเมอร์ IF 0.25 µM และไพรเมอร์ IR 0.25 µM ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) กำหนดอุณหภูมิของ annealing 3 ค่า ดังนี้ 55 60 และ 65°ซ. โดยใช้โปรแกรมดังต่อไปนี้ predenature ที่ 95°ซ. 2 นาที ตามด้วย 3 steps cycling จำนวน 35 รอบ กำหนดอุณหภูมิ ดังนี้ denature ที่ 94°ซ. 40 วินาที annealing ที่ 55 60 และ 65°ซ. 40 วินาที (เพื่อหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม) extension ที่ 72°ซ. 30 วินาที และ final extension ที่ 72°ซ. 5 นาที 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสในอะกาโรสเจลเข้มข้น 2.5%

**3. การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายสนิปในการคัดเลือกลักษณะความต้านทานต่อโรคยอดเน่า**

ตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายสนิป S13_8307911 โดยเปรียบเทียบกับเครื่องหมายสนิป 2 เครื่องหมาย ได้แก่ S6_3252739 และ S15_644992 ด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS–PCR ในการคัดเลือกหรือระบุความต้านทานต่อโรคยอดเน่าในสับปะรดลูกผสมที่แสดงลักษณะต้านทานโรคในแปลงปลูกตามธรรมชาติ 22 สายต้น ได้แก่ PB54-028-002, PB54-028-015, PBB59-009-007, PB59-001-043, PB59-002-010, PB59-002-017, PB59-003-003, PB59-003-070, PB59-005-031, PB59-005-056, PB59-007-021, PB59-007-033, PB59-013-011, PB59-015-010, PB59-015-036, PB59-020-023, PB59-020-104, PB59-025-010, PB59-026-024, PB59-027-004, PB59-032-012 และ PB59-044-002

เก็บตัวอย่างใบของสับปะรดลูกผสมมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Devi et al., 2013) นำดีเอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม Biodrop (UK) ปรับความเข้มข้นเป็น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปแต่ละเครื่องหมาย (Table 1) ส่วนประกอบของปฏิกิริยาและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นไปตามที่อธิบายไว้ในหัวข้อที่ 2 โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 65 60 และ 60°ซ. สำหรับเครื่องหมาย S13_8307911, S6_3252739 และ S15_644992 ตามลำดับ ตรวจวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล 2.5% จากนั้นวิเคราะห์ความสอดคล้องเปรียบเทียบระหว่างเครื่องหมายสนิป และลักษณะความต้านทานต่อโรคยอดเน่าเพื่อประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายสนิปแต่ละเครื่องหมายในการคัดเลือกหรือระบุลักษณะความต้านทานต่อโรคยอดเน่า

**Table 1** Primers used in the tetra-primer ARMS-PCR for detection of SNP S13_8307911, S6_3252739 and S15_644992

| SNP position | | Primer set and sequences | Product size |
|---|---|---|---|
| S13_8307911 | S13-OF | 5' TGCTCAATGGGACAGCTAATAGCTTTAG 3' | Control fragment: 419 bp |
| | S13-OR | 5' TATTTGTTAAAACTTCTCACACGCATGC 3' | |
| | S13-IF | 5' CATGCAGGTAGATTCAGTTAGCGTCA 3' | A allele: 204 bp |
| | S13-IR | 5' GAGGAGTCCCATTGTTCATAACAAGTTC 3' | G allele: 269 bp |
| S6_3252739 | S6-OF | 5' AATTGACCTATGAGGTTGTCGACATGCT 3' | Control fragment: 315 bp |
| (จีราพรและคณะ, | S6-OR | 5' GGAAACGAGAAAGGAAAAGAAATGTGAAA 3' | |
| 2566) | S6-IF | 5' TTTCAATTTCCTTGATCAGCATCGCGA 3' | A allele: 164 bp |
| | S6-IR | 5' TGACATATTATCTATGTCCATTCTCAGGC 3' | G allele: 207 bp |
| S15_644992 | S15-OF | 5' GACAAACACAGCAACAGGAGCACAAG 3' | Control fragment: 282 bp |
| (จีราพรและคณะ, | S15-OR | 5' TGCGCATAGAAAAGCTTTTATTGCATTT 3' | |
| 2566) | S15-IF | 5' GACCAGCTAGACACTAATGGACAAGACT 3' | T allele: 195 bp |
| | S15-IR | 5' AGTCGACGATGAGATAGCCGTTGGCGAC 3' | G allele: 143 bp |

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. การค้นหาเครื่องหมายสนิป

ผลการวิเคราะห์ GBS จาก 4 ตัวอย่างพันธุ์ ได้ข้อมูลสนิปทั้งหมด 532,359 ตำแหน่ง เมื่อเลือกเฉพาะตำแหน่งสนิปที่เป็นฮอโมไซกัสและมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์ ได้ 12,579 ตำแหน่ง จากนั้นเลือกเฉพาะตำแหน่งสนิปแบบ nonsynonymous ได้ 14 ตำแหน่งใน 9 ยีน เช่น ยีน *MBR1* (รหัส LOC109711953) ที่ตำแหน่งสนิป S6_3252739 และยีน *PR-4* (รหัส LOC109720991) ที่ตำแหน่ง สนิป S15_644992 ซึ่งทำหน้าที่ในระบบต้านทานโรคของพืชโดยตรง (จีราพรและคณะ, 2566) นอกจากนี้ยังพบเครื่องหมายสนิปในยีน *Piezo* (รหัส LOC109719476) ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับระบบต้านทานโรคเช่นเดียวกันแม้เป็นแบบโดยอ้อม

เครื่องหมายสนิปในยีน *Piezo* อยู่ตำแหน่งที่ 8,307,911 บนโครโมโซมที่ 13 (S13_8307911) จากฐานข้อมูล *Ananas comosus* reference genome

ASM154086v1 โดยสับปะรดกลุ่มพันธุ์ต้านทานต่อโรคยอดเน่า ได้แก่ พันธุ์อินทรชิตขาว และพันธุ์อินทรชิตแดง มีจีโนไทป์ชนิดฮอโมไซกัส แอลลีล AA ขณะที่กลุ่มพันธุ์อ่อนแอต่อโรคยอดเน่า ได้แก่ พันธุ์ MD2 และ MG3 มีจีโนไทป์ชนิดฮอโมไซกัส แอลลีล GG โดยเป็นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากแอสพาราจีน (asparagine, Asn/N) ซึ่งมีสมบัติทางเคมีเป็นไฮโดรฟิลิกโมเลกุลแสดงความมีขั้วแต่ไม่มีประจุในโมเลกุล กลายเป็นกรดแอสปาร์ติก (aspartic acid, Asp/D) ที่มีสมบัติทางเคมีเป็นกรด โมเลกุลแสดงความมีขั้วพร้อมทั้งมีประจุในโมเลกุลด้วย (Table 2)

ยีน *Piezo* แปลรหัสเป็นโปรตีนช่องไอออนที่ไวต่อแรงกด ทำหน้าที่รับรู้การกระตุ้นทางกลที่ส่งตรงไปยังเยื่อหุ้มเซลล์หรือโดยอ้อมผ่านส่วนประกอบที่ยึดติดอยู่ ทำให้เกิดการตอบสนองทางกลของเซลล์ ช่องไอออนนี้ $Ca^{2+}$ สามารถซึมผ่านได้ (Kim and Hyun, 2023) โปรตีน Piezo ในสัตว์มีบทบาทสำคัญในการเป็นสื่อกลางก่อมะเร็งในเนื้องอกหลายชนิด ทำหน้าที่ควบคุมการแพร่กระจาย การอพยพ และการบุกรุกของเซลล์มะเร็งผ่านกลไกต่าง ๆ (Yu and Liao, 2021) และ Piezo มีบทบาทสำคัญในการตายของเซลล์ที่ขึ้นอยู่กับ $Ca^{2+}$ เนื่องจากภาวะสมดุลของไอออนภายในเซลล์ที่ผิดปกติส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์โดยกระตุ้นให้เซลล์หดตัว (apoptosis) หรือการบวม (necrosis) (Kunzelmann, 2016) ในพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* และมอส *Physcomitrium patens* โปรตีน Piezo ได้รับการพิสูจน์ว่ามีตำแหน่งอยู่บนเยื่อหุ้มพลาสมาและเยื่อหุ้มแวคิวโอล (vacuole) และมีส่วนร่วมในการควบคุมสัณฐานวิทยาของรากและแวคิวโอล (Heng et al., 2021) นอกจากนี้ Zhang et al. (2019) รายงานว่า AtPiezo ยับยั้งการติดเชื้อไวรัสแบบ systemic ใน *A. thaliana* โดยพืชพันธุ์กลาย (mutant) ที่มียีน *AtPiezo* ผิดปกติจะแสดงการติดเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) และ turnip mosaic virus (TuMV) มากกว่าพืชปกติ (wild type) อีกทั้งเมื่อใช้เชื้อไวรัส TuMV ที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรมติดฉลากโปรตีนสีเขียวเรืองแสง (green fluorescent protein, GFP) สำหรับติดตามการแพร่กระจายของไวรัสภายในต้นพืชพบว่า ในพืชพันธุ์กลายจะมีการแพร่กระจายของไวรัสได้เร็วกว่าในพืชปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *AtPiezo* มีส่วนเกี่ยวข้องในการจำกัดการแพร่กระจายของไวรัสภายในพืช อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งดังกล่าว จำเป็นต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไป

**Table 2** Nucleotide and amino acid variation of SNP S13_8307911 in the *Piezo* gene between heart rot–resistant and susceptible pineapple varieties

| Nucleotide and amino acid change | Heart rot disease resistant variety | | Heart rot disease susceptible variety | |
|---|---|---|---|---|
| | Intorachit Khaw | Intorachit Daeng | MD2 | MG3 |
| SNP | AA | AA | GG | GG |
| Amino acid | Asparagine | Asparagine | Aspartic acid | Aspartic acid |

**2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ที่ออกแบบได้**

ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบเครื่องหมายสนิป S13_8307911 ในยีน *Piezo* พบว่า อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม คือ 65°ซ. แสดงแถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่ชัดเจนและมีแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะปรากฏน้อยที่สุด (Figure 1C และ Figure 2) ในกลุ่มพันธุ์ต้านทานต่อโรคยอดเน่าที่

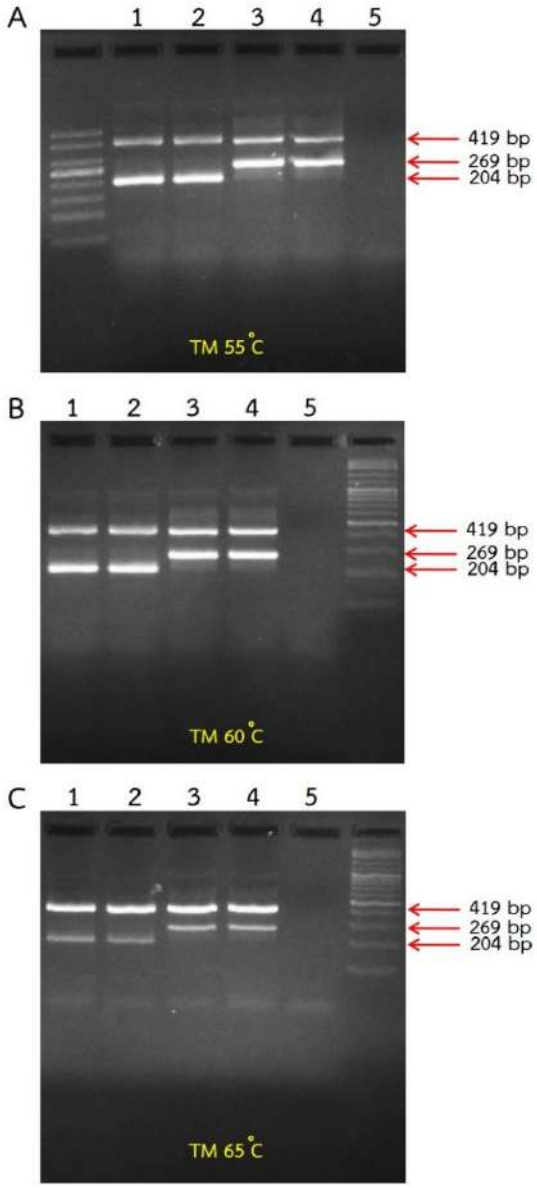



**Figure 1** DNA amplification with primer of S13_8307911 marker using tetra-primer ARMS-PCR technique with each annealing temperature. The PCR was conducted in pineapple varieties Intorachit Khaw (lane 1), Intorachit Deang (lane 2), MD2 (lane 3), MG3 (lane 4) and distilled water as a negative control (lane 5). The annealing temperature in PCR was optimized among 55 (A), 60 (B) and 65 (C) degrees Celsius

มีจีโนไทป์ชนิดฮอโมไซกัส แอลลีล AA ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 419 คู่เบสที่เป็นแถบดีเอ็นเอควบคุม และขนาด 204 คู่เบสที่เป็นแถบดีเอ็นเอจากแอลลีล A (Figure 2 lane 9, 10) ขณะที่กลุ่มพันธุ์อ่อนแอที่มีจีโนไทป์ชนิดฮอโมไซกัส แอลลีล GG ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 419 คู่เบสที่เป็นแถบดีเอ็นเอควบคุม และขนาด 269 คู่เบสที่เป็นแถบดีเอ็นเอจากแอลลีล G (Figure 2 lane 11, 12)

**3. การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายสนิปในการคัดเลือกลักษณะความต้านทานต่อโรคยอดเน่า**

การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายสนิปนี้ พิจารณาจากความแม่นยำของเครื่องหมาย (marker accuracy) หรือความสอดคล้องระหว่างจีโนไทป์ที่ตรวจพบจากเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะฟีโนไทป์ความต้านทานโรคที่ปรากฏจริงในแปลงปลูก ค่าดังกล่าวสะท้อนถึงความสามารถของเครื่องหมายในการทำนายลักษณะทางพันธุกรรมที่แสดงออกในพืช ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของเครื่องหมายสนิป 3 เครื่องหมาย ได้แก่ S13_8307911, S6_3252739 และ S15_644992 แสดงใน Figure 3 และ Table 3 เครื่องหมาย S13_8307911 ในยีน *Piezo* ตรวจพบแอลลีล A ซึ่งสัมพันธ์กับความต้านทานในกลุ่มตัวอย่างลูกผสม 21 จาก 22 สายต้น คิดเป็นความสอดคล้องระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ 95.5% เครื่องหมาย S6_3252739 ในยีน *MBR1* พบแอลลีลต้านทานในลูกผสมทั้ง 22 สายต้น (100%) ขณะที่เครื่องหมาย S15_644992 ในยีน PR-4 ตรวจพบแอลลีลต้านทานใน 18 สายต้น คิดเป็น 81.8%

เมื่อพิจารณาค่าความแม่นยำของเครื่องหมาย พบว่า S6_3252739 มีค่าความแม่นยำสูงสุด รองลงมาคือ S13_8307911 และ S15_644992 ตามลำดับ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานในพืชชนิดอื่น เช่น Ige et al. (2021) และ Codjia et al. (2022)

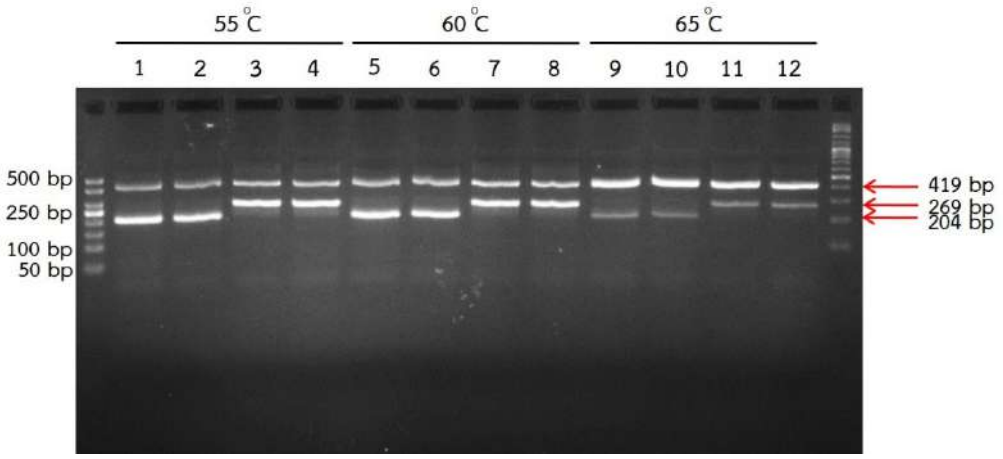



**Figure 2** DNA amplification with primer of S13_8307911 marker using tetra-primer ARMS-PCR technique compared among different annealing temperature 55, 60 and 65 degrees Celsius. The PCR was conducted in pineapple varieties Intorachit Khaw (lane 1, 5, 9), Intorachit Deang (lane 2, 6, 10), MD2 (lane 3, 7, 11) and MG3 (lane 4, 8, 12). Using primer of S13_8307911 marker, the control fragment is 419-bp-band. The A allele is represented by 204-bp-band and found in heart rot disease resistant varieties, while the G allele is represented by 269-bp-band and found in heart rot disease susceptible varieties

ซึ่งรายงานค่าความแม่นยำของเครื่องหมาย 77–80% สำหรับเครื่องหมายต้านทานโรคใบด่างในมันสำปะหลัง แม้ว่าเครื่องหมายสนิปทั้งหมดในการศึกษานี้จะเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบ nonsynonymous ซึ่งอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของโปรตีนโดยตรง อย่างไรก็ตาม สนิปดังกล่าวอาจไม่ใช่ตำแหน่งกลายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุหลักของลักษณะ (causal mutation) แต่เป็นเพียงตำแหน่งที่อยู่ใกล้หรือมีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะ ดังนั้น ความแตกต่างของค่าความแม่นยำในการพยากรณ์ระหว่างเครื่องหมายอาจสะท้อนระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเครื่องหมายกับยีนที่ควบคุมลักษณะ ในบางกรณีเครื่องหมายและยีนดังกล่าวอาจไม่ได้ถ่ายทอดร่วมกันอย่างสมบูรณ์ในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา ส่งผลให้ความสอดคล้องระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ลดลง นอกจากนี้ ความต้านทานต่อโรคยอดเน่าอาจเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait) ที่ถูกควบคุมโดยหลายยีนร่วมกัน ส่งผลให้ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งแตกต่างกัน การใช้เครื่องหมายหลายตำแหน่งร่วมกันอาจช่วยเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกพันธุ์ได้

อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ดำเนินการทดสอบในกลุ่มตัวอย่าง 22 สายต้น ซึ่งยังมีขนาดจำกัดและอาจไม่ครอบคลุมความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด ดังนั้น ควรมีการประเมินเพิ่มเติมในประชากรขนาดใหญ่และมีพื้นฐานพันธุกรรมที่หลากหลาย เช่น สายต้นลูกผสมจำนวน 300 สายต้นจากหลายคู่ผสม ร่วมกับการใช้วิธีปลูกเชื้อแบบซูโอสปอร์ (zoospore inoculation) ของเชื้อรา *Phytophthora* spp. เพื่อยืนยันเสถียรภาพของเครื่องหมายก่อนการประยุกต์ใช้ในโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์อย่างเหมาะสม

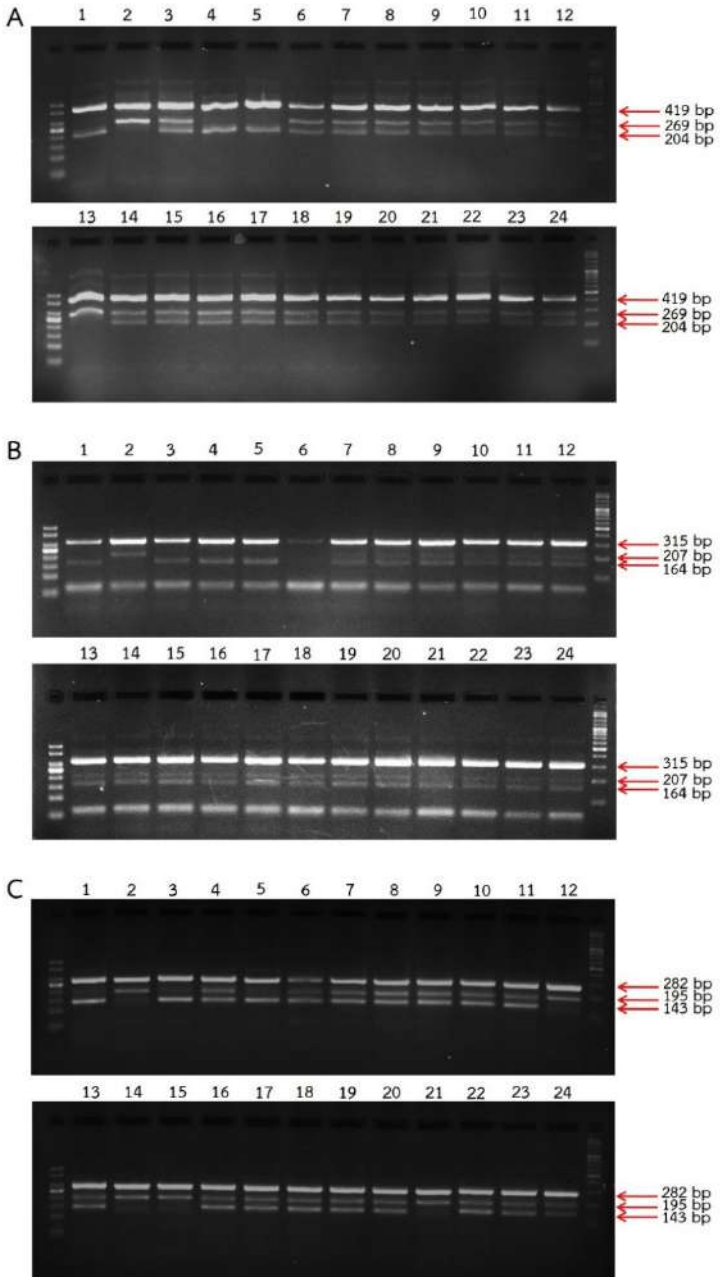



**Figure 3** DNA amplification with primers of S13_8307911 (A), S6_3252739 (B) and S15_644992 (C) markers using tetra-primer ARMS-PCR technique. The PCR was conducted in Intorachit Khaw (lane 1), MG3 (lane 2) and hybrid population of 22 lines exhibiting heart rot disease resistance phenotypes in natural field settings (lane 3–24)

## สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสับปะรดจาก 4 ตัวอย่างพันธุ์โดยใช้วิธี genotyping-by-sequencing พบเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปแบบ nonsynonymous ที่ให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์ต้านทาน และกลุ่มพันธุ์อ่อนแอต่อโรคยอดเน่าในสับปะรดในยีน *Piezo* ที่ตำแหน่ง S13_8307911 และได้ทำการพัฒนาชุดไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบเครื่องหมาย

**Table 3** Genotype of SNP markers S13_8307911, S6_3252739 and S15_644992 in hybrid population of 22 lines exhibiting heart rot disease resistance phenotypes in natural field settings

| Lane | Variety/hybrid name | S13_8307911 | S6_3252739 | S15_644992 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Intorachit Khaw (heart rot disease resistant) | AA | AA | GG |
| 2 | MG3 (heart rot disease susceptible) | GG | GG | TT |
| 3 | PB54-028-002 | AG | AA | GG |
| 4 | PB54-028-015 | AA | AA | GT |
| 5 | PBB59-009-007 | AA | AA | GG |
| 6 | PB59-001-043 | AG | AA | GT |
| 7 | PB59-002-010 | AG | AG | GT |
| 8 | PB59-002-017 | AG | AG | GT |
| 9 | PB59-003-003 | AG | AG | GT |
| 10 | PB59-003-070 | AG | AG | GT |
| 11 | PB59-005-031 | AG | AG | GT |
| 12 | PB59-005-056 | AG | AG | TT |
| 13 | PB59-007-021 | GG | AG | GT |
| 14 | PB59-007-033 | AG | AG | TT |
| 15 | PB59-013-011 | AG | AG | TT |
| 16 | PB59-015-010 | AG | AG | GT |
| 17 | PB59-015-036 | AG | AG | GT |
| 18 | PB59-020-023 | AG | AG | GT |
| 19 | PB59-020-104 | AG | AG | GT |
| 20 | PB59-025-010 | AG | AG | GT |
| 21 | PB59-026-024 | AG | AG | TT |
| 22 | PB59-027-004 | AG | AG | GT |
| 23 | PB59-032-012 | AG | AG | GT |
| 24 | PB59-044-002 | AG | AG | GT |

สนิปดังกล่าวด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS–PCR พร้อมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเพื่อให้สะดวกต่อการใช้งาน ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายในการคัดเลือกลักษณะความต้านทานต่อโรคยอดเน่าในกลุ่มตัวอย่าง 22 สายต้น ซึ่งแสดงฟีโนไทป์ต้านทานในสภาพแปลงปลูกตามธรรมชาติ พบว่าเครื่องหมาย S13_8307911 (ในยีน *Piezo*) มีความแม่นยำของเครื่องหมาย 95.5% ขณะที่เครื่องหมาย S6_3252739 (ในยีน *E3 ubiquitin-protein ligase MED25 binding RING-H2 protein 1*) และ S15_644992 (ในยีน *Pathogenesis-related protein-4-like*) มีความแม่นยำของเครื่องหมาย 100% และ 81.8% ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการประยุกต์ใช้สำหรับการคัดเลือกพันธุ์สับปะรดต้านทานโรคยอดเน่า

## คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

## เอกสารอ้างอิง

จารุพันธ์ ทองแถม. 2526. สับปะรดและอุตสาหกรรมสับปะรดในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 158 หน้า.

จีราพร แก่นทรัพย์ มัลลิกา นวลแก้ว อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว สุภาวดี ง้อเหรียญ รังสิมันตุ์ ธีระวงศ์ภิญโญ และ ภรณี สว่างศรี. 2566. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปในยีน *E3 ubiquitin- protein ligase MBR1* และยีน *pathogenesis-related protein PR-4-like* ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคเน่าในสับปะรด, หน้า 1-9. ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 20, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2566. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2567. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กรุงเทพฯ. 238 หน้า.

Ali, S., B.A. Ganai, A.N. Kamili, A.A. Bhat, Z.A. Mir, J.A. Bhat, A. Tyagi, S.T. Islam, M. Mushtaq, P. Yadav, S. Rawat and A. Grover. 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. Microbiological Research. 212-213: 29-37.

Clark, J.R. and C.E. Finn. 2010. Register of new fruit and nut cultivars list 45. HortScience. 45(5): 716–756.

Codjia, E.D., B. Olasanmi, P.A. Agre, R. Uwugiaren, A.D. Ige and I.Y. Rabbi. 2022. Selection for resistance to cassava mosaic disease in African cassava germplasm using single nucleotide polymorphism markers. South African Journal of Science. 118: 11607.

Collard, B.C.Y. and D.J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 363(1491): 557–572.

Devi, K.D., K. Punyarani, N.S. Singh and H.S. Devi. 2013. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales-suitable for diverse PCR based downstream applications. SpringerPlus. 2(1): 669.

Duplan, V. and S. Rivas. 2014. E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. Frontiers in Plant Science. 5: 42.

Heng, H., H. Guoqiang, S. Jin, Z. Fengli and Z. Dabing. 2021. Bioinformatics analysis for Piezo in rice. Reproduction and Breeding. 1(2): 108-113.

Ige, A.D., B. Olasanmi, E.G.N. Mbanjo, I.S. Kayondo, E.Y. Parkes, P. Kulakow, C. Egesi, G.J. Bauchet, E. Ng, L.A.B. Lopez-Lavalle, H. Ceballos and I.Y. Rabbi. 2021. Conversion and validation of uniplex SNP markers for selection of resistance to cassava mosaic disease in cassava breeding programs. Agronomy. 11: 420.

Kunzelmann, K. 2016. Ion channels in regulated cell death. Cellular and Molecular Life Sciences. 73(11): 2387–2403.

Kim, Y.J. and J. Hyun. 2023. Mechanosensitive ion channels in apoptosis and ferroptosis: Focusing on the role of Piezo1. BMB Reports. 56(3): 145-152.

Leelasetthakul, K. 1972. Pineapple Disease. Office of Agriculture Thailand, Bangkok.

Ratti, M.F., M.S. Ascunce, J.J. Landivar and E.M. Goss. 2018. Pineapple heart rot isolates from Ecuador reveal a new genotype of *Phytophthora nicotianae*. Plant Pathology. 67(8): 1803-1813.

Sanewski, G., L. Ko, J. DeFaveri and A. Kilian. 2016. Genetic resistance to the root rot pathogen *Phytophthora cinnamomi* in *Ananas*. pp. 281-286. In: XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): IV 1111.

Serrato-Diaz, L., L. Simbana, Y. Vélez-Negrón and L. Vargas. 2022. Detection and incidence of pineapple heart rot disease caused by *Phytophthora nicotianae* in commercial farms of Puerto Rico. The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico. 106(2): 233-246.

Yu, J.L. and H.Y. Liao. 2021. Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (Piezo1) in human cancer. Biomedicine and Pharmacotherapy. 140: 111692.

Zhang, Z., X. Tong, S.Y. Liu, L.X. Chai, F.F. Zhu, X.P. Zhang, J.Z. Zou and X.B. Wang. 2019. Genetic analysis of a Piezo-like protein suppressing systemic movement of plant viruses in *Arabidopsis thaliana*. Scientific Reports. 9(1): 3187.