รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

Research and Development on Seed Testing

นิภาภรณ์ พรรณรา

Nipapon Punnara

2562

รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

Research and Development on Seed Testing

นิภาภรณ์ พรรณรา

Nipapon Punnara

2562

คำปรารภ

รายงานผลการวิจัยสิ้นสุดของโครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ฉบับนี้มีจำนวนทั้งหมด 9 การทดลอง ซึ่งนักวิชาการเกษตรของศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่และศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ได้ร่วมกันดำเนินการวิจัยมาตั้งแต่ปี 2559-2562 ในรายงานฉบับนี้มีผลงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพได้ผลที่รวดเร็วและประหยัดต้นทุน ทันต่อความต้องการเมล็ดพันธุ์ของตลาดโลก การนำเข้า-ส่งออกสามารถออกใบรับรองผลวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศได้ง่ายขึ้นซึ่งเป็นไปตามวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ตามมาตรฐานระดับสากลของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (ISTA)

คณะผู้ดำเนินการหวังว่ารายงานนี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาระบบการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ เพื่อสร้างความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับระดับนานาชาติ ลดข้อกีดกันทางการค้าและส่งเสริมอุตสาหกรรมการส่งออกเมล็ดพันธุ์

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	1
ผู้วิจัย	2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	2
บทนำ.....	3
บทคัดย่อ.....	5
1. การพัฒนาวิธีการประเมินคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเขียวโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า	7
2. การศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายเตตราโซเลียมสำหรับประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง	22
3. การศึกษาวิธีการใช้ความร้อนทำลายการพักตัวของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง	34
4. การศึกษาวิธีการตรวจสอบความแข็งแรงในห้องปฏิบัติการกับความสามารถในการงอกได้ในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง	42
5. การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายเตตราโซเลียมในการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง	54
6. การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium sporotrichiodes*, *Fusarium moniliforme* และ *Cephalosporium acremonium* ที่ปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดส่งออก	65
7. การตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ในเมล็ดพันธุ์พืชเพื่อการนำเข้า-ส่งออกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล	86
8. การศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์กาแฟในห้องปฏิบัติการ	102
9. การศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพที่มีประสิทธิภาพในการประเมินอายุการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน	116
บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	130
บรรณานุกรม.....	131

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการกองวิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืช ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่และผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานวิจัย ขอบคุณคณะกรรมการที่ปรึกษาทางวิชาการทั้งระดับกองและระดับกรมที่ให้คำชี้แนะ ปรับปรุง แก้ไข รวมถึงการติดตามงานในแต่ละช่วงเวลา ขอบคุณคณะทีมงานนักวิจัยที่ร่วมกันดำเนินงานวิจัย ตั้งแต่เริ่มโครงการในปี 2559 จนสิ้นสุดงานวิจัยและรายงานผล ฉบับสมบูรณ์ในปี 2562 ขอบคุณกองแผนงานและวิชาการที่คอยประสานงานติดตามรายงานตามระบบวิจัย กรมวิชาการเกษตร สุดท้ายขอขอบพระคุณพี่น้องห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ที่ทำให้งานวิจัยของโครงการวิจัยนี้มีคุณค่า และมีการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ผู้วิจัย

นิภาภรณ์ พรรณรา	Nipapon Punnara	ศวม.เชียงใหม่
ภภัสสร วัฒนกุลภาคิน	Papassorn Wattanakulpakin	ศวม.พิษณุโลก
สุมนา จำปา	Sumana Jumpa	ศวม.เชียงใหม่
ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	Supalak Sattayasamitsathit	ศวม.พิษณุโลก
ปัทมพร วาสนาเจริญ	Pattamaporn Vassanacharoe	ศวร.เชียงใหม่
กัณทิมา ทองศรี	Kantima Thongsri	ศวม.พิษณุโลก
สนอง บัวเกตุ	Sanong Bougate	ศวม.พิษณุโลก
ละอองดาว แสงหล้า	Laongdown Sangla	ศวร.เชียงใหม่

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ศวม.เชียงใหม่	=	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่
ศวม.พิษณุโลก	=	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก
ศวร.เชียงใหม่	=	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่

บทนำ

ระบบการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่ได้มาตรฐานและใช้กันอยู่ทั่วไปมี 2 ระบบ คือ ระบบของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (International Seed Testing Association : ISTA) นิยมใช้กันทั่วโลก และระบบของสมาคมวิเคราะห์เมล็ดพันธุ์พืช (Association of Official Seed Analysis : AOSA) ประเทศที่นิยมใช้คือ ประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา ในส่วนของกรมวิชาการเกษตรใช้กฎของ ISTA ซึ่งกฎของ ISTA มีการปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงทุกปีโดยคณะกรรมการสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติที่เป็นสมาชิก ซึ่งวิธีการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ของ ISTA มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ครอบคลุมชนิดพืชหลากหลาย ทั้งพืชอาหาร พืชอุตสาหกรรม และไม้ยืนต้น แต่วิธีการทดสอบบางวิธีการยังไม่ครอบคลุมพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย และวิธีการทดสอบบางอย่างสามารถนำมาพัฒนาปรับใช้ในการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้น การพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพได้ผลที่รวดเร็วและประหยัดต้นทุน ทันต่อความต้องการเมล็ดพันธุ์ของตลาดโลก การนำเข้า-ส่งออกสามารถออกใบรับรองผลวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศได้ง่ายขึ้นซึ่งเป็นไปตามวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ตามมาตรฐานระดับสากลของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (ISTA) มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาระบบการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ เพื่อสร้างความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับระดับนานาชาติ ลดข้อกีดกันทางการค้าและส่งเสริมอุตสาหกรรมการส่งออกเมล็ดพันธุ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง ข้าวโพดและกาแฟในห้องปฏิบัติการที่รวดเร็ว ถูกต้อง มีประสิทธิภาพ ประหยัดและมีความสัมพันธ์กับการนำเมล็ดพันธุ์นั้นไปปลูกในสภาพไร่ สามารถประเมินอายุการเก็บรักษาได้
2. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium sporotrichiodes, Fusarium moniliforme* และ *Cephalosporium chaetomium* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดส่งออกด้วยเทคนิคที่ให้ผลแม่นยำเชื่อถือได้และรวดเร็ว
3. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในกลุ่ม Pospiviroid ด้วยไพรเมอร์และตัวตรวจตามที่มีความจำเพาะสูง

วิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 การพัฒนาวิธีการประเมินคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเขียวโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า (ปีเริ่มต้น 2559 – สิ้นสุด 2560)

การทดลองที่ 2 การศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายเตตราโซเลียมสำหรับประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง (ปีเริ่มต้น 2559 – สิ้นสุด 2561)

การทดลองที่ 3 การศึกษาวิธีการใช้ความร้อนทำลายการพักตัวของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2562)

การทดลองที่ 4 การศึกษาวิธีการตรวจสอบความแข็งแรงในห้องปฏิบัติการกับความสามารถในการงอกได้ในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2562)

การทดลองที่ 5 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายเตตราโซเลียมในการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง (ปีเริ่มต้น 2560 – สิ้นสุด 2561)

การทดลองที่ 6 การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium sporotrichiodes*, *Fusarium moniliforme* และ *Cephalosporium acremonium* ที่ปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดส่งออก (ปีเริ่มต้น 2560 – สิ้นสุด 2561)

การทดลองที่ 7 การตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ในเมล็ดพันธุ์พืชเพื่อการนำเข้า-ส่งออกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2562)

การทดลองที่ 8 การศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์กาแฟในห้องปฏิบัติการ (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2562)

การทดลองที่ 9 การศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพที่มีประสิทธิภาพในการประเมินอายุการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2562)

บทคัดย่อ

การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ กรมวิชาการเกษตรใช้กฎของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (International Seed Testing Association : ISTA) ซึ่งกฎของ ISTA มีการปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงทุกปีโดยคณะกรรมการสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติที่เป็นสมาชิก ซึ่งวิธีการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ของ ISTA มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ครอบคลุมชนิดพืชหลากหลาย ทั้งพืชอาหาร พืชอุตสาหกรรม และไม้ยืนต้น แต่วิธีการทดสอบบางวิธีการยังไม่ครอบคลุมพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย และวิธีการทดสอบบางอย่างสามารถนำมาพัฒนาปรับใช้ในการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น กองวิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชจึงได้จัดทำโครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ เริ่มดำเนินการตั้งแต่ปี 2559 สิ้นสุดปี 2562 จำนวน 9 การทดลอง สถานที่ดำเนินการ ได้แก่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลกและศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ผลการดำเนินงานวิจัย พบว่า ได้วิธีตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์เพื่อประเมินความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง และข้าวโพดหวาน ได้วิธีทดสอบความงอกเมล็ดพันธุ์กาแฟในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ รวมถึงได้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์และการตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ในเมล็ดพันธุ์พืชเพื่อการนำเข้า-ส่งออกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล เป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วและมีความถูกต้องสูง เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชสำหรับการนำเข้า-ส่งออก

ABSTRACT

Department of Agriculture use International Seed Testing Association rules (ISTA). ISTA rules are updated every year by International Seed Testing Association Board. The development of ISTA's seed quality testing methods includes a variety of plants, food and cash crops. However, some testing methods do not cover cash crops in Thailand. Some testing methods have been developed to monitor seed quality more effectively. Research and development is necessary to achieve an effective inspection methods. Therefore, Seed and Research Development Division has established a research and development program for seed quality testing methods. It has been operating 9 experiments since 2016 – 2019. Including Chiangmai seed research and development center, Phitsanulok Seed and development center and Chiang Mai Field Crops Research Center. The results showed that seed quality testing methods were effective to assess the seed vigor in

mung bean, soybean, peanut and sweet corn. And the method for coffee germination testing in the seed quality testing laboratory. As well as the PCR multiplex technique and the rapid detection of Pospiviroid virus in plant seeds imported and exported by molecular biology technology. It is a fast and accurate method for the detection of pesticide residues in import and export.

การทดลองที่ 1 การพัฒนาวิธีการประเมินคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเขียวโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า

Development of Methods for Evaluating Seed Quality of Soybean and Mungbean by Electrical Conductivity Test

ผู้วิจัย

นิภาภรณ์ พรรณรา	Nipapon Punnara	ศวม.เชียงใหม่
ภภัสสร วัฒนกุลภาคิน	Papassorn Wattanakulpakin	ศวม.พิษณุโลก
สุมนา จำปา	Sumana Jumpa	ศวม.เชียงใหม่
ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	Supalak Sattayasamitsathit	ศวม.พิษณุโลก
กัณทิมา ทองศรี	Kantima Thongsri	ศวม.พิษณุโลก
สนอง บัวเกตุ	Sanong Bougate	ศวม.พิษณุโลก

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการประเมินคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเขียวโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ในปี 2559 - 2560 วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ กรรมวิธีทดลองประกอบด้วยระดับความแข็งแรงที่ทดสอบด้วยความงอกภายหลังการเร่งอายุ ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเขียว จำนวน 3 กรรมวิธี คือ 1. ความแข็งแรงต่ำ (ความงอกภายหลังการเร่งอายุ < 55%) 2. ความแข็งแรงปานกลาง (ความงอกภายหลังการเร่งอายุ 55 – 69%) 3. ความแข็งแรงสูง (ความงอกภายหลังการเร่งอายุ ≥ 70%) ผลการทดลองพบว่า ค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับความงอกภายหลังการเร่งอายุค่อนข้างสูงโดยให้ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (*r*) มากกว่า 0.7 ขึ้นไปทั้งสามฤดูปลูก ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างค่าการนำไฟฟ้าและความงอกภายหลังการเร่งอายุของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวให้ผลในทิศทางเดียวกันกับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ดังนั้น ค่าการนำไฟฟ้าเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประเมินความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเขียวได้

คำสำคัญ : เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง, เมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว, ความงอก, ความแข็งแรง, ค่าการนำไฟฟ้า

ABSTRACT

The development of method for soybean and mungbean seed quality evaluation by electrical conductivity (EC) test was studied at the Phitsanulok Seed Research and Development Center from 2016 to 2017. The completely randomized design with 4 replicates was used for this experiment. Soybean and mungbean seeds were divided into 3 groups by their vigor levels determined by germination after accelerated aging (GAA) test that were 1. high vigor (HV) (GAA ≥ 70%) 2. medium vigor (MV) (GAA, 55 – 69%) and 3.low vigor (LV) (GAA < 55%). The negative correlation between EC value and GAA was found in soybean seeds that showed highly correlation coefficients (*r*) up to 0.7 for all 3 planting seasons. The same correlation between EC value and GAA also revealed in mungbean seeds. Therefore, this research suggests that the EC test is the useful method to evaluate the vigor of soybean and mungbean seeds.

Keywords: Soybean seed, mungbean seed, germination, vigor, electrical conductivity

บทนำ (Introduction)

การปลูกพืชต้องอาศัยปัจจัยที่สำคัญ 3 ประการคือ ดินหรือพื้นที่ที่ใช้ปลูกพืช เมล็ดพันธุ์และสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิด ปัจจัยทั้งสามประการนี้เป็นสิ่งจำเป็นพื้นฐานสำหรับการปลูกพืชทุกชนิดและการปลูกพืชจะประสบความสำเร็จมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับคุณภาพเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ปลูกเป็นประการสำคัญ การตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เป็นการควบคุมคุณภาพเมล็ดพันธุ์ให้ได้มาตรฐาน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการวางแผนการปลูกพืชการจัดการระหว่างการผลิตและการควบคุมคุณภาพของผลผลิต

วัตถุประสงค์ของการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ คือ

1. เพื่อให้ทราบว่าเมล็ดพันธุ์มีคุณภาพอยู่ในระดับใด ได้มาตรฐานตามที่กำหนดหรือไม่
2. เพื่อหาข้อเท็จจริงที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์
3. เพื่อให้ทราบว่าเมล็ดพันธุ์จำเป็นต้องมีการตากหรือลดความชื้นลงมากน้อยเพียงใด ตลอดจนถึงความจำเป็นในการปรับปรุงสภาพของเมล็ดพันธุ์
4. เพื่อให้ทราบว่าเมล็ดพันธุ์มีคุณภาพตรงตามมาตรฐานที่กำหนดไว้หรือไม่ เนื่องจากในประเทศต่างๆที่มีกฎหมาย ได้กำหนดคุณภาพและมาตรฐานขั้นต่ำสุดของเมล็ดพันธุ์ชนิดต่างๆไว้ ถ้า

เมล็ดพันธุ์มีคุณภาพต่ำกว่าที่กฎหมายกำหนด เมล็ดพันธุ์เหล่านั้นจะนำมาจำหน่ายจ่ายแจกเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ไม่ได้

5. การประเมินคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการกำหนดราคาของเมล็ดพันธุ์โดยเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพสูงย่อมมีราคาแพงกว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพต่ำ

ระบบการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่ได้มาตรฐานและใช้กันอยู่ทั่วไปมี 2 ระบบ คือ

1) ระบบของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (International Seed Testing Association : ISTA) นิยมใช้กันทั่วโลก
2) ระบบของสมาคมวิเคราะห์เมล็ดพันธุ์พืช (Association of Official Seed Analysis : AOSA) ประเทศที่นิยมใช้คือ ประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา

ปัจจุบันประเทศไทยใช้กฎของทั้ง 2 สมาคม การเลือกใช้กฎขึ้นอยู่กับแต่ละหน่วยงาน (จวงจันทร์, 2529) ในส่วนของกรมวิชาการเกษตรใช้กฎของ ISTA ซึ่งกฎของ ISTA มีการปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงทุกปีโดยคณะกรรมการสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติที่เป็นสมาชิก ซึ่งวิธีการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ของ ISTA มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ครอบคลุมชนิดพืชหลากหลายทั้งพืชอาหาร พืชอุตสาหกรรม และไม้ยืนต้น แต่วิธีการทดสอบบางวิธีการยังไม่ครอบคลุมพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย และวิธีการทดสอบบางอย่างสามารถนำมาพัฒนาปรับใช้ในการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

การวัดความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่กำหนดโดย ISTA (2014) นิยมใช้วิธีการเร่งอายุในการตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองแต่การทดสอบต้องใช้เวลา 11 วัน จึงจะทราบผลการวิเคราะห์ ซึ่งในบางครั้งไม่ทันต่อความต้องการระหว่างการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ และการคัดเลือกเมล็ดพันธุ์เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะวิธีวัดค่าการนำไฟฟ้า เป็นวิธีการวัดหาค่าความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ระยะเวลาการทดสอบ เพียง 2 วัน ก็สามารถทราบผลได้ ซึ่งทำให้ทันต่อการนำเมล็ดพันธุ์ไปใช้ประโยชน์หรือจัดการกับเมล็ดพันธุ์นั้นๆได้ แต่ค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองยังไม่มีหลักเกณฑ์ถึงการจำแนกระดับความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ที่อาจจะแตกต่างกันในแต่ละระดับความแข็งแรง ส่วนวิธีการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวนั้น ISTA ไม่ได้ระบุวิธีการทดสอบความแข็งแรง การทดสอบความแข็งแรงที่ใช้ในปัจจุบันอ้างอิงจากวิธีการเร่งอายุในถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้น จึงคาดว่าวิธีการวัดค่าการนำไฟฟ้าซึ่งเป็นวิธีแนะนำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองสามารถพัฒนามาใช้กับถั่วเขียวได้เช่นเดียวกัน

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

- อุปกรณ์
    - เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
    - เมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72
    - เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า
    - อุปกรณ์สำหรับเพาะความงอกในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

- วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การพัฒนาวิธีการประเมินคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ได้แก่

1. ความแข็งแรงต่ำ (Accelerated Aging Test < 55%)
2. ความแข็งแรงปานกลาง (Accelerated Aging Test 55 – 69%)
3. ความแข็งแรงสูง (Accelerated Aging Test ≥ 70%)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ตามกรรมวิธีที่กำหนด
2. ตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ดังนี้

- การตรวจสอบความงอก โดยการเพาะทราย เก็บไว้ในห้องเพาะความงอกอุณหภูมิสลับ 20<->30 องศาเซลเซียส ประเมินความงอกที่ อายุ 8 วัน

- การเร่งอายุ นำเมล็ดไปเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์100% เมื่อครบกำหนด นำเมล็ดไปเพาะความงอกด้วยทราย เก็บไว้ในห้องเพาะความงอกอุณหภูมิ 20<->30 องศาเซลเซียส ประเมินความงอกที่ อายุ 8 วัน

- ความงอกในสภาพไร่ นำเมล็ดไปปลูกในสภาพแปลง ประเมินความงอกที่อายุ 14 วัน

- การวัดค่าการนำไฟฟ้า วิธีการดังนี้

1) ควรวัดความชื้นของเมล็ดพันธุ์โดยวิธีของ ISTA (2014) หรือเครื่องวัดความชื้นอื่นๆ ก่อนปรับความชื้นของเมล็ดพันธุ์ให้อยู่ระหว่าง 10 – 14% (มาตรฐานน้ำหนักสด)

2) ตวงน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ต้องเก็บน้ำที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสประมาณ 24 ชั่วโมงก่อนนำน้ำมาใช้ ขวดรูปชมพู่ที่ใช้ต้องมีขนาดเดียวกัน เพราะขนาดของก้นภาชนะจะมีผลทำให้ค่าที่ได้เปลี่ยนไป ภาชนะต้องสะอาด ควรล้างน้ำสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นและอบให้แห้งก่อนนำมาใช้

3) นับเมล็ดซ้ำละ 50 เมล็ด จำนวน 4 ซ้ำ ชั่งน้ำหนักใช้ทศนิยม 2 ตำแหน่ง ใส่เมล็ดในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุน้ำในปริมาณที่กำหนด แกว่งเบาๆ เพื่อให้เมล็ดทั้งหมดจมน้ำ ปิดฝาด้วยกระดาษฟอยล์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสประมาณ 24 ชั่วโมง จำนวนขวดรูปชมพู่ที่เตรียมในแต่ละครั้งต้องไม่มากเกินกว่าที่จะวัดให้เสร็จภายใน 15 นาที

4) มีการทวนสอบเครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้าก่อนการใช้งาน

5) เปิดเครื่องวัดการนำไฟฟ้าก่อนใช้อย่างน้อย 15 นาที และควรเตรียมบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ไว้สำหรับล้าง conductivity cell เมื่อเสร็จสิ้นแต่ละตัวอย่าง

6) เมื่อแช่น้ำครบ 24 ชั่วโมง ควรวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายที่ได้จากการแช่เมล็ดทันที โดยวัดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ควรแกว่งขวดรูปชมพู่ เบาๆ 10 – 15 วินาที ก่อนวัดแล้วจึงแกะฝาออก จุ่ม conductivity cell ของเครื่องวัดการนำไฟฟ้าลงในสารละลาย (ไม่ต้องกรองเมล็ดออก) ควรระวังอย่าให้ conductivity cell สัมผัสกับเมล็ด อาจต้องวัดหลายๆครั้งจนได้ค่าคงที่ เมื่อเสร็จการวัดแต่ละตัวอย่าง ต้องล้าง conductivity cell ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับก่อนที่จะวัดตัวอย่างต่อไป

7) วัดค่าการนำไฟฟ้าของน้ำกลั่น เพื่อใช้เป็น control และนำค่าที่อ่านได้ของแต่ละตัวอย่างลบด้วยค่าจาก control

วิธีการคำนวณค่าการนำไฟฟ้า

ค่าการนำไฟฟ้า = ค่าการนำไฟฟ้าของแต่ละตัวอย่าง/น้ำหนักเมล็ดของแต่ละตัวอย่าง(กรัม)

การรายงานผล: รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ใช้หน่วยเป็น µS/cm/g

3. นำค่าที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์วิธีการต่างๆของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60

การบันทึกข้อมูล

1. ความงอกของเมล็ดพันธุ์
2. ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ ค่าการนำไฟฟ้า ความงอกหลังจากเร่งอายุ และความงอกในสภาพไร่

ขั้นตอนที่ 2 การพัฒนาวิธีการประเมินคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ได้แก่

1. ความแข็งแรงต่ำ (Accelerated Aging Test < 55%)
2. ความแข็งแรงปานกลาง (Accelerated Aging Test 55 – 69%)
3. ความแข็งแรงสูง (Accelerated Aging Test ≥ 70%)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 ตามกรรมวิธีที่กำหนด

2. ตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ดังนี้

- การตรวจสอบความงอก โดยการเพาะทราย เก็บไว้ในห้องเพาะความงอกอุณหภูมิสลับ 20<->30 องศาเซลเซียส ประเมินความงอกที่ อายุ 7 วัน

- การเร่งอายุ นำเมล็ดไปเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ 100% เมื่อครบกำหนด นำเมล็ดไปเพาะความงอกด้วยทราย เก็บไว้ในห้องเพาะความงอกอุณหภูมิ 20<->30 องศาเซลเซียส ประเมินความงอกที่ อายุ 7 วัน

- ความงอกในสภาพไร่ นำเมล็ดไปปลูกในสภาพแปลง ประเมินความงอกที่อายุ 14 วัน

- การวัดค่าการนำไฟฟ้า ใช้วิธีเหมือนกับขั้นตอนที่ 1

3. นำค่าที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์วิธีการต่างๆของถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72

การบันทึกข้อมูล

1. ความงอกของเมล็ดพันธุ์
2. ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ ค่าการนำไฟฟ้า ความงอกหลังจากเร่งอายุและความงอกในสภาพไร่

- เวลาและสถานที่ - เริ่มต้น ตุลาคม 2558 – สิ้นสุด กันยายน 2560

สถานที่ทำการทดลอง : ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

ผลการวิจัย (Results) และอภิปรายผล (Discussion)

การพัฒนาวิธีการประเมินคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า

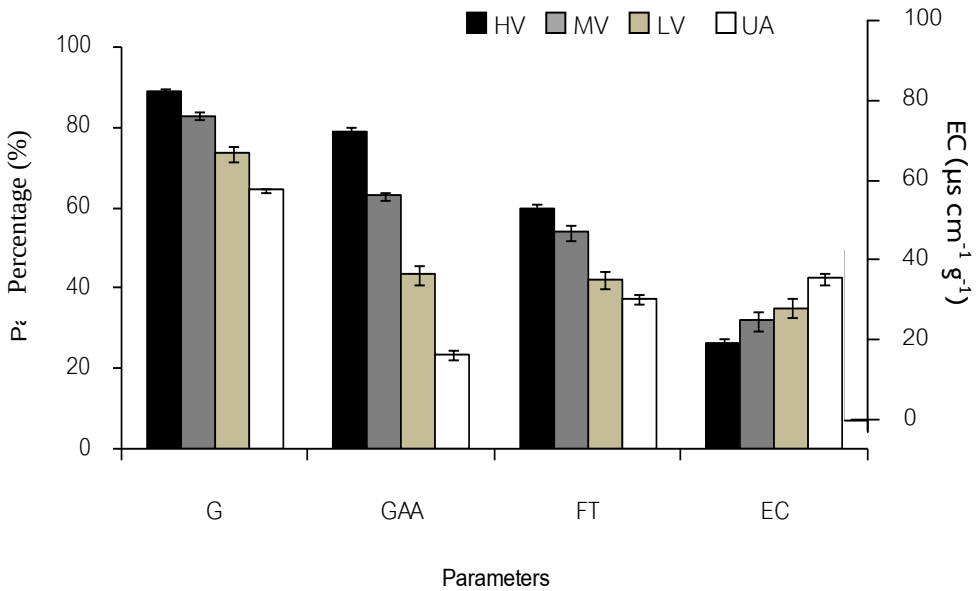
นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บเกี่ยวช่วงปลายฤดูฝน ตุลาคม-พฤศจิกายน 2558 ช่วงฤดูแล้ง ปลายกุมภาพันธ์-ต้นมีนาคม 2559 และช่วงปลายฤดูฝน ตุลาคม-พฤศจิกายน 2559 มาทดสอบ ความงอก และความแข็งแรงโดยการเร่งอายุ (Germination after accelerated aging; GAA) จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บเกี่ยวในแต่ละช่วงฤดูปลูกมาจัดกลุ่มตามความแข็งแรงที่ทดสอบโดย GAA แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ ความแข็งแรงสูง (High vigor, HV; GAA>70%) ความแข็งแรงปานกลาง (Medium vigor, MV; GAA>55-69%) ความแข็งแรงต่ำ (Low vigor, LV; GAA>35-54%) และ ไม่ยอมรับ (Unacceptable, UA; GAA<35%) (ดัดแปลงจากมาตรฐานของ AOSA, 1983) แล้วนำเมล็ดพันธุ์แต่ละกลุ่มมาทดสอบคุณภาพ ได้แก่ ความงอก การเร่งอายุ ความงอกในสภาพไร่และค่าการนำไฟฟ้า แล้วคำนวณหาค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (correlation, *r*) ระหว่างค่าการนำไฟฟ้ากับความงอก ความงอกภายหลังการเร่งอายุ และความงอกในสภาพไร่

สำหรับช่วงปลายฤดูฝน ตุลาคม-พฤศจิกายน 2558 มีเมล็ดพันธุ์ที่นำมาทดสอบจำนวน 132 ตัวอย่าง พบเมล็ดพันธุ์ความแข็งแรงสูง จำนวน 38 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 28.8) ความแข็งแรงปานกลาง 33 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 25.0) ความแข็งแรงต่ำ 31 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 23.5) และ ไม่

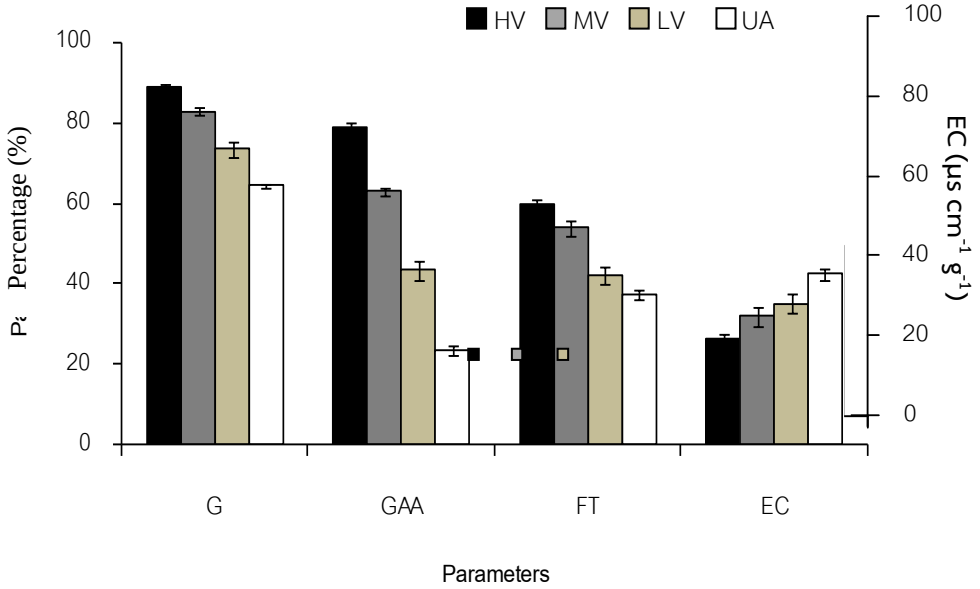
ยอมรับ 30 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 22.7) โดยร้อยละความงอก (G) ความงอกภายหลังการเร่งอายุ (GAA) ความงอกในสภาพไร่ (FT) และค่าการนำไฟฟ้า (EC) แสดงดังรูปที่ 1 และ ตารางที่ 1 เมล็ดพันธุ์กลุ่มความแข็งแรงสูง (HV) มีความงอก ความแข็งแรงซึ่งวัดโดย GAA และ FT สูงกว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงต่ำ สำหรับค่าการนำไฟฟ้าจะให้ผลตรงกันข้ามคือเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงสูงจะมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำ เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) พบว่าค่าความงอกมาตรฐานมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตามกับความงอกภายหลังการเร่งอายุ ซึ่งมีค่า r = 0.7625** แต่ความงอกมาตรฐานและความงอกภายหลังการเร่งอายุมีความสัมพันธ์กับค่าการนำไฟฟ้าแบบผกผัน โดยมีค่า r = -0.6948** และ -0.7529** ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

สำหรับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บเกี่ยวช่วงฤดูแล้ง ปลายกุมภาพันธ์-ต้นมีนาคม 2559 จำนวนทั้งหมด 46 ตัวอย่าง พบเมล็ดพันธุ์กลุ่มความแข็งแรงสูงจำนวน 29 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 63.0) ปานกลาง 13 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 28.3) ความแข็งแรงต่ำ 4 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 8.7) และไม่พบกลุ่มที่ไม่ยอมรับ (ความงอกภายหลังการเร่งอายุต่ำกว่าร้อยละ 35) ในฤดูการเพาะปลูกนี้ ร้อยละความงอก ความงอกภายหลังการเร่งอายุ และค่าการนำไฟฟ้า ให้ผลในทำนองเดียวกันกับช่วงฤดูปลายฝน 2558 (รูปที่ 2 และตารางที่ 1) นอกจากนี้พบว่าความงอกมาตรฐานมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตามกับความงอกภายหลังการเร่งอายุ ค่า r = 0.5578** ส่วนความงอกมาตรฐานและความงอกภายหลังการเร่งอายุมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับค่าการนำไฟฟ้าโดยมีค่า r = -0.6848** และ -0.7405** ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สำหรับการทดสอบความงอกในสภาพไร่ไม่ได้แสดงในการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากสภาพอากาศแปรปรวนในช่วงที่ทำการทดสอบในแปลง ทำให้ข้อมูลที่ได้มีความแปรปรวนค่อนข้างมาก

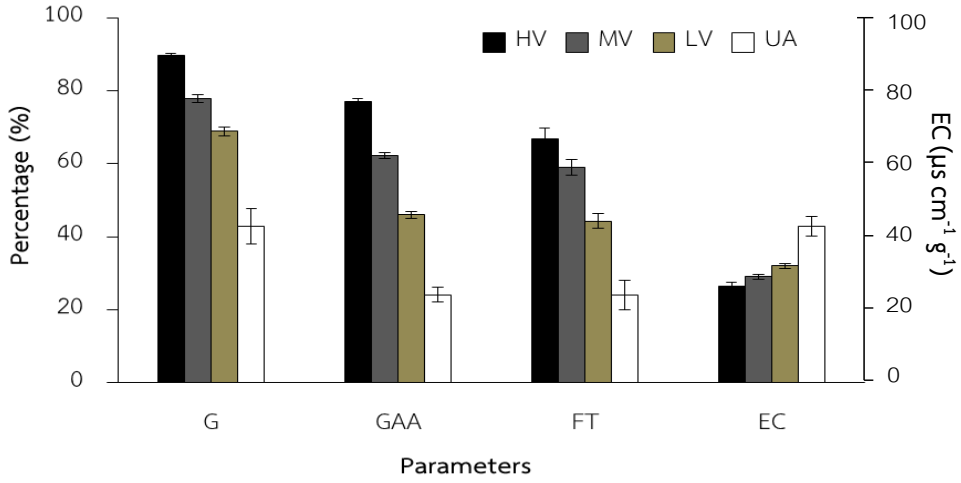
นอกจากนี้เมื่อทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บเกี่ยวช่วงปลายฤดูฝน ตุลาคม-พฤศจิกายน 2559 จำนวน 87 ตัวอย่าง พบเมล็ดพันธุ์กลุ่มความแข็งแรงสูงจำนวน 15 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 17.2) ปานกลาง 28 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 32.2) ความแข็งแรงต่ำ 34 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 39.1) และไม่ยอมรับ 10 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 11.5) เมื่อนำตัวอย่างมาทดสอบคุณภาพพบว่าให้ผลสอดคล้องกับทั้งสองช่วงปลูก (รูปที่ 3 และตารางที่ 1) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความงอกกับความงอกภายหลังการเร่งอายุแบบแปรผันตามเท่ากับ 0.8732** สำหรับค่าการนำไฟฟ้ามีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับความงอก ความงอกภายหลังการเร่งอายุและความงอกในสภาพไร่โดยมีค่า r เท่ากับ -0.8009** -0.7005** และ -0.7642** ตามลำดับ (ตารางที่ 2) จากการรายงานของ Vieira *et al.* (2004) พบว่า ค่าการนำไฟฟ้ามีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับความงอกในสภาพไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองโดยมีค่า r = -0.5233 และพบความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับความงอกในห้องปฏิบัติการที่ระดับความชื้นในดิน -0.03, -0.20, -0.40 และ -0.60 MPa เท่ากับ -0.8040, -0.8919, -0.7553 และ -0.4545 ตามลำดับ



รูปที่ 1 ความงอกมาตรฐาน (%G), ความงอกภายหลังการเร่งอายุ (%GAA), ความงอกในสภาพไร่ (%FT) และ ค่าการนำไฟฟ้า (EC, µs cm^{-1} g^{-1}) ที่ระดับความแข็งแรงสูง (high vigor; HV), ปานกลาง (medium vigor; MV), ต่ำ (low vigor; LV) และ ไม่ยอมรับ (unacceptable; UA) ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บเกี่ยวปลายฤดูฝน ตุลาคม-พฤศจิกายน 2558



รูปที่ 2 ความงอกมาตรฐาน (%G), ความงอกภายหลังการเร่งอายุ (%GAA) และค่าการนำไฟฟ้า (EC, µs cm^{-1} g^{-1}) ที่ระดับความแข็งแรงสูง (high vigor; HV), ปานกลาง (medium vigor; MV) และ ต่ำ (low vigor; LV) ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บเกี่ยวฤดูแล้ง ปลายกุมภาพันธ์-ต้นมีนาคม 2559



รูปที่ 3 ความงอกมาตรฐาน (%G), ความงอกภายหลังการเร่งอายุ (%GAA), ความงอกในสภาพไร่(%FT) และ ค่าการนำไฟฟ้า (EC, µs cm^{-1} g^{-1}) ที่ระดับความแข็งแรงสูง (high vigor; HV), ปานกลาง (medium vigor; MV) ต่ำ (low vigor; LV) และ ไม่ยอมรับ (unacceptable; UA) ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บเกี่ยวปลายฤดูฝน ตุลาคม-พฤศจิกายน 2559

ตารางที่ 1 ความงอกมาตรฐาน (%G) ความงอกภายหลังการเร่งอายุ (%GAA) ความงอกในสภาพไร่ (%FT) และ ค่าการนำไฟฟ้า (EC, μs cm^{-1} g^{-1}) ที่ระดับความแข็งแรงสูง (High vigor, HV) ปานกลาง (Medium vigor, MV) ต่ำ (Low vigor, LV) และไม่ยอมรับ (Unacceptable, UA) ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บเกี่ยวปลายฤดูฝน 2558 (ตุลาคม-พฤศจิกายน 2558) ฤดูแล้ง 2559 (ปลายกุมภาพันธ์-ต้นมีนาคม 2559) และปลายฤดู ฝน 2559 (ตุลาคม-พฤศจิกายน 2559)

ระดับความแข็งแรง	วิธีการตรวจสอบคุณภาพ	ฤดูฝน 2558	ฤดูแล้ง 2559	ฤดูฝน 2559
HV	G	89	92	90
	GAA	79	82	77
	FT	60	nd	67
	EC	26.150	31.030	26.476
MV	G	83	90	78
	GAA	63	63	62
	FT	54	nd[1/]	59
	EC	31.976	37.000	29.088
LV	G	74	79	69
	GAA	43	47	46
	FT	42	nd	44
	EC	35.157	46.750	32.046
UA	G	64	nd	43
	GAA	24	nd	24
	FT	37	nd	24
	EC	42.455	nd	42.896

หมายเหตุ; [1/]nd = no data, ข้อมูลไม่ได้แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติเนื่องจากแต่ละช่วงฤดูปลูกมีจำนวนตัวอย่างไม่เท่ากัน

ตารางที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) ระหว่างความงอกภายหลังการเร่งอายุ (GAA) และ ความงอกมาตรฐาน (G), ความงอกในสภาพไร่(FT) และ ค่าการนำไฟฟ้า (EC) ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บเกี่ยวปลายฤดูฝน (ตุลาคม-พฤศจิกายน 2558) ฤดูแล้ง (ปลายกุมภาพันธ์-ต้นมีนาคม 2559) และปลายฤดูฝน (ตุลาคม-พฤศจิกายน 2559)

ช่วงฤดูปลูก	วิธีการตรวจสอบคุณภาพ	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) [1/]			
		GAA	G	FT	EC
ฤดูปลายฝน/2558	GAA	1.0000	0.7625**	0.5718**	-0.7529**
	G		1.0000	0.5761**	-0.6948**
	FT			1.0000	-0.5149**
	EC				1.0000
ฤดูแล้ง/2559	GAA	1.0000	0.5578**	-	-0.7405**
	G		1.0000	-	-0.6848**
	FT			1.0000	-
	EC				1.0000
ฤดูปลายฝน/2559	GAA	1.0000	0.8732**	0.7740**	-0.7005**
	G		1.0000	0.7834**	-0.8009**
	FT			1.0000	-0.7642**
	EC				1.0000

หมายเหตุ; [1/]**Significant difference at the 1% level of probability

การพัฒนาวิธีการประเมินคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 ที่เก็บเกี่ยวฤดูแล้ง 2559 และฤดูฝน 2560 ในงานผลิตเมล็ดพันธุ์ของศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก มาทดสอบ ความงอก และความแข็งแรงโดยการเร่งอายุ (Germination after accelerated aging; GAA) จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวที่เก็บเกี่ยวในแต่ละช่วงฤดูปลูกมาจัดกลุ่มตามความแข็งแรงที่ทดสอบโดย GAA แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ความแข็งแรงสูง (High vigor, HV; GAA≥70%) ความแข็งแรงปานกลาง (Medium vigor, MV; GAA 55-69%) ความแข็งแรงต่ำ (Low vigor, LV; GAA <55%) (ดัดแปลงจากมาตรฐานของ AOSA, 1983) แล้วนำเมล็ดพันธุ์แต่ละกลุ่มมาทดสอบคุณภาพ ได้แก่ ความงอก การเร่งอายุ ความงอกในสภาพไร่และค่าการนำไฟฟ้า แล้วคำนวณหาค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (correlation, *r*) ระหว่างค่าการนำไฟฟ้ากับความงอก ความงอกภายหลังการเร่งอายุ และความงอกในสภาพไร่

สำหรับเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 ที่เก็บเกี่ยวฤดูแล้ง 2559 มีเมล็ดพันธุ์ที่นำมาทดสอบ จำนวน 60 ตัวอย่าง หลังจากการทดสอบคุณภาพโดยวิธีการเร่งอายุ พบว่า เป็นเมล็ดพันธุ์ที่มี

ความแข็งแรงสูง (HV) ทั้งหมด (คิดเป็นร้อยละ 100) โดยร้อยละความงอก (G) ความงอกภายหลังการเร่งอายุ (GAA) ความงอกในสภาพไร่ (FT) และค่าการนำไฟฟ้า (EC) แสดงดังตารางที่ 3 โดยมีความงอกเฉลี่ย 91% ความงอกหลังจากเร่งอายุ 88% และค่าการนำไฟฟ้า 32.76 μs cm^{-1} g^{-1} ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) พบว่าค่าความงอกมาตรฐานมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตามกับความงอกภายหลังการเร่งอายุ ซึ่งมีค่า *r* = 0.0181 แต่ความงอกมาตรฐานและความงอกภายหลังการเร่งอายุมีความสัมพันธ์กับค่าการนำไฟฟ้าแบบผกผัน โดยมีค่า *r* = -0.0127 และ -0.4572** ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ซึ่งในงานผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวจะมีแต่เมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวที่มีความแข็งแรงสูงเป็นส่วนใหญ่ ส่วนงานผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจะมีเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงทุกระดับเนื่องจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเป็นพืชน้ำมัน ทำให้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเสื่อมคุณภาพได้เร็วกว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว

สำหรับเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 ที่เก็บเกี่ยวฤดูฝน 2560 มีเมล็ดพันธุ์ที่นำมาทดสอบ จำนวน 109 ตัวอย่าง หลังจากการทดสอบคุณภาพโดยวิธีการเร่งอายุ พบว่า เป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงสูง (HV) จำนวน 76 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 69.7) ความแข็งแรงปานกลาง 24 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 22.0) และความแข็งแรงต่ำ 9 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 8.3) โดยร้อยละความงอก (G) ความงอกภายหลังการเร่งอายุ (GAA) ความงอกในสภาพไร่ (FT) และค่าการนำไฟฟ้า (EC) แสดงดังตารางที่ 3 เมล็ดพันธุ์กลุ่มความแข็งแรงสูง (HV) มีความงอก ความแข็งแรงซึ่งวัดโดย GAA และ FT สูงกว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงต่ำ สำหรับค่าการนำไฟฟ้าจะให้ผลตรงกันข้ามคือเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงสูงจะมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำ เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) พบว่าค่าความงอกมาตรฐานมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตามกับความงอกภายหลังการเร่งอายุ ซึ่งมีค่า *r* = 0.7956** แต่ความงอกมาตรฐานและความงอกภายหลังการเร่งอายุมีความสัมพันธ์กับค่าการนำไฟฟ้าแบบผกผัน โดยมีค่า *r* = -0.6504** และ -0.7229** ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

การวัดความแข็งแรงด้วยวิธีการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายในเมล็ดพันธุ์ เช่น ถั่วเหลือง, ข้าวโพด และข้าวสาลี เป็นต้น ซึ่งสภาวะที่ใช้ทดสอบจะแตกต่างกันไปตามชนิดเมล็ดพันธุ์ (Hampton and Tekrony, 1995; AOSA, 1983) ความแข็งแรงที่ทดสอบโดยความงอกภายหลังการเร่งอายุนอกจากเป็นวิธีที่สามารถประเมินอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์แล้ว (Delouche and Baskin,1973; Milosevic *et al.*, 2010) ยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับความงอกในสภาพไร่ (Lovato *et al.*, 2001; Milosevic *et al.*, 2010) สอดคล้องกับคำแนะนำของ Hampton and Tekrony (1995) ซึ่งกล่าวว่า ความงอกในสภาพไร่มีความสัมพันธ์กับค่าการนำไฟฟ้าและความงอกภายหลังการเร่งอายุ แต่อย่างไรก็ตามการวัดความแข็งแรงโดยวิธีการเร่งอายุในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองใช้เวลาค่อนข้างนานคือ 11 วัน สำหรับค่าการนำไฟฟ้าเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถบอกถึงความแข็งแรงในเมล็ดพันธุ์ได้โดยใช้เวลาเพียง 2 วัน ซึ่งค่าการนำไฟฟ้ามีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับความงอกและความแข็งแรง จากงานวิจัยของ Kolasinska (2000) พบว่าการวัดค่าการนำไฟฟ้าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบความแข็งแรงในเมล็ด common bean ซึ่งพบ

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการนำไฟฟ้ากับการงอกในสภาพอากาศเย็น การวัดค่าการนำไฟฟ้าเป็นการบ่งชี้ถึงค่าของสารละลายที่รั่วไหลออกมาภายนอกเซลล์ โดยปกติเซลล์เมมเบรนมีโครงสร้างเป็นลิปิดไบเลเยอร์ (lipid bilayer) มีคุณสมบัติในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน ทำหน้าที่ในการกักเก็บสารสารละลายต่างๆ ไม่ให้รั่วไหลออกภายนอกเซลล์ (วันชัย, 2537) ในเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงสูง เซลล์เมมเบรนยังสามารถทำหน้าที่ในการกักเก็บได้ดี แต่เมื่อความแข็งแรงในเมล็ดลดลงความสามารถในการกักเก็บสารละลายของเซลล์เมมเบรนจะลดลง เนื่องจากความเสียหายหรือการเสียรูปร่างของเซลล์เมมเบรน (Delouche and Baskin, 1973; Robert, 1973) ทำให้สารละลายภายในรั่วไหลออกสู่ภายนอกได้ง่ายขึ้น เมื่อวิเคราะห์ค่าการนำไฟฟ้าจึงมีค่าสูงขึ้นตามความแข็งแรงที่ลดลง (ศานิต, 2552) ซึ่งจากผลการศึกษานี้พบว่าค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับความงอกภายหลังการเร่งอายุ และมีค่าค่อนข้างสูง (มากกว่า 0.7) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความสัมพันธ์อื่นๆ ทั้งสามฤดูปลูก สำหรับค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวก็เป็นไปในทิศทางเดียวกับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ดังนั้นการวัดค่าการนำไฟฟ้าอาจเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อประเมินความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60และเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท72 แทนวิธีการเร่งอายุ ซึ่งใช้เวลาเพียงสองวันในขณะที่วิธีการเร่งอายุใช้เวลาถึง 11 วัน

ตารางที่ 3 ความงอกมาตรฐาน (%G) ความงอกภายหลังการเร่งอายุ (%GAA) ความงอกในสภาพไร่ (%FT) และ ค่าการนำไฟฟ้า (EC, µs cm^{-1} g^{-1}) ที่ระดับความแข็งแรงสูง (High vigor, HV) ปานกลาง (Medium vigor, MV) ต่ำ (Low vigor, LV) ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 ที่เก็บเกี่ยวฤดูแล้ง 2559 และฤดูฝน 2560

ระดับความแข็งแรง	วิธีการตรวจสอบคุณภาพ	ฤดูแล้ง 2559	ฤดูฝน 2560
HV	G	91	94
	GAA	88	85
	FT	58	58
	EC	32.76	28.44
MV	G	-	81
	GAA	-	63
	FT	-	59
	EC	-	38.39
LV	G	-	77
	GAA	-	48
	FT	-	40
	EC	-	41.85

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) ระหว่างความงอกภายหลังการเร่งอายุ (GAA) และ ความงอกมาตรฐาน (G), ความงอกในสภาพไร่(FT) และ ค่าการนำไฟฟ้า (EC) ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท72 ที่เก็บเกี่ยว ฤดูแล้ง 2559 และฤดูฝน 2560

ช่วงฤดูปลูก	วิธีการตรวจสอบคุณภาพ	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) [1/]			
		GAA	G	FT	EC
ฤดูแล้ง/2559	GAA	1.0000	0.0181	-0.0469	-0.4572**
	G		1.0000	0.0695	-0.0127
	FT			1.0000	0.0186
	EC				1.0000
ฤดูฝน/2560	GAA	1.0000	0.7956**	0.1965	-0.7229**
	G		1.0000	0.1222	-0.6504**
	FT			1.0000	-0.2482**
	EC				1.0000

หมายเหตุ; [1/]**Significant difference at the 1% level of probability

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

ค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับความงอกภายหลังการเร่งอายุค่อนข้างสูงโดยให้ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (*r*) มากกว่า 0.7 ขึ้นไปทั้งสามฤดูปลูก สำหรับค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวก็เป็นไปในทิศทางเดียวกับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ดังนั้น ค่าการนำไฟฟ้าเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประเมินความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเขียวได้

การทดลองที่ 2 การศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายเตตราโซเลียม สำหรับประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง

Study on Concentration and Duration of Immersion of Tetrazolium Solutions for the Evaluation of the Viability of Peanut Seed

ผู้วิจัย

นิภาภรณ์ พรรณรา	Nipapon Punnara	ศวม.เชียงใหม่
ภภัสสร วัฒนกุลภาคิน	Papassorn Wattanakulpakin	ศวม.พิษณุโลก
สุมนา จำปา	Sumana Jumpa	ศวม.เชียงใหม่
ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	Supalak Sattayasamitsathit	ศวม.พิษณุโลก
กัณทิมา ทองศรี	Kantima Thongsri	ศวม.พิษณุโลก
สนอง บัวเกตุ	Sanong Bougate	ศวม.พิษณุโลก

บทคัดย่อ

วิธีเตตราโซเลียมเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้เพื่อหาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายที่เหมาะสมในการแช่สารละลายเตตราโซเลียมเพื่อประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง วางแผนการทดลองแบบ 4x3 factorial ใน completely randomize design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ระดับของความเข้มข้นสารละลายเตตราโซเลียม 4 ระดับ คือ ความเข้มข้น 1 0.50 0.10 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์และปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการแช่สารละลายเตตราโซเลียม 3 ระยะเวลา คือ 4 5 และ 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียม 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการแช่ 4-6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสให้ผลการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานมากที่สุด และที่ระดับความเข้มข้น 0.5 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการแช่สารละลาย 6 ชั่วโมง ให้ผลการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานมากที่สุด ดังนั้นหากใช้ความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียม 1 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 4 ชั่วโมง หรือความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 6 ชั่วโมง สามารถประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงได้

คำสำคัญ : วิธีเตตราโซเลียม ถั่วลิสง

Abstract

Tetrazolium test is a quick and effective in assessing the viability of the seeds. The aim of this study was to determine the concentration and duration of the infusion solution suitable for infusion solution, tetrazolium test to assess the viability of seeds, peanuts. The experimental design was 4x3 factorial in completely randomize design (CRD) with 4 replications with two factors, factor 1 levels of concentration solution, tetrazolium solution 4 levels of concentration 1 0.50 0.10 and 0.05 percent and a factor of 2 duration of Immersion. tetrazolium solution immersion 3 period is 4 5 and 6 hours at 35 ° C. The concentrations of tetrazolium solution 1 percent in the immersion period of 4-6 hours at 35 ° C to assess the viability of the seed germination of peanut close to the very highest standards. And at concentrations of 0.5, 0.1 and 0.05 percent in the period to 6 hours of immersion solutions by evaluating the viability of peanut seed germination close to the very highest standards. Thus, if the concentration of tetrazolium solution immersion for 4 hours, 1 percent or 0.5 percent, immersion for 6 hours to assess the viability of peanut seeds.

Key word : Tetrazolium test peanut seed

บทนำ (Introduction)

ถั่วลิสงเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจ จัดอยู่ในกลุ่มพืชผลิตไม่เพียงพอกับความต้องการใช้ภายในประเทศ เพราะถั่วลิสงเป็นพืชอาหารที่บริโภคง่าย เป็นส่วนประกอบอาหารคาวหวานต่าง ๆ และเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป บางส่วนนำไปสกัดน้ำมัน และกากใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ สำหรับความต้องการใช้ถั่วลิสงภายใน ประเทศมีสูงถึงปีละ 100,000 ตัน เป็นผลทำให้ผลผลิตไม่เพียงพอกับความต้องการใช้ จึงต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ แต่เนื่องจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรกำหนดให้ถั่วลิสงเป็นพืชที่รักษาระดับพื้นที่เพาะปลูก ดังนั้นแนวทางที่จะรักษาระดับพื้นที่เพาะปลูก ก็คือ การเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ ลดต้นทุนการผลิต หรือเพิ่มผลตอบแทนแก่เกษตรกร การเพิ่มผลผลิตถั่วลิสงมีปัจจัยหลายประการ เช่น พันธุ์ การเตรียมพื้นที่ปลูก การดูแลรักษา ตลอดจนถึงคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากคุณภาพเมล็ดพันธุ์เป็นสิ่งที่บ่งถึงจำนวนต้นต่อพื้นที่ปลูก เมล็ดพันธุ์เป็นต้นทุนหลักของการผลิตถั่วลิสงของเกษตรกร เมล็ดพันธุ์ดีจึงสามารถลดต้นทุนการผลิตลงได้ เกษตรกรจึงมีความต้องการเมล็ดพันธุ์ดีเพิ่มมากขึ้น

เทคนิคการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีเตตราโซเลียม (Tetrazolium test) เป็นวิธีการที่สามารถตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว บางครั้งหรือบางกรณีอาจมีความจำเป็นต้องการทราบผลอย่างรีบด่วน หรือในกรณีเฉพาะคือเมล็ดมีการพักตัว อาจนำเมล็ดพักตัวเหล่านั้นมาตรวจสอบความมีชีวิต โดยใช้เวลาเพียง 1 วัน ก็สามารถทราบถึงคุณภาพเมล็ดพันธุ์ได้ ซึ่ง

สมาคมผู้ตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ (Association of Official Seed Analyze, AOSA) ได้จัดทำมาตรฐานการตรวจสอบขึ้นในปี ค.ศ. 1970 แนะนำวิธีการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงโดยวิธี Tetrazolium test โดยใช้สารละลายเตตราโซเลียมความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 3-4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามสารเตตราโซเลียมมีราคาแพง เป็นสารที่มีพิษ (poisonous) เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic) และเป็นอันตรายหากสูดดมหรือกลืน หากสัมผัสดูดซึมได้ทางผิวหนัง ตา และ ระบบการหายใจ ดังนั้นหากสามารถเลือกใช้ระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมโดยผลการประเมินความมีชีวิตไม่ต่างจากความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถลดต้นทุนของการทดสอบวิธีนี้และยังลดอันตรายกับผู้ปฏิบัติงานอีกด้วย ซึ่ง Bittencourt and Vieira (1997) พบว่า ใช้สารละลายเตตราโซเลียมความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 3 ชั่วโมง 40 องศาเซลเซียส สามารถประเมินเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตได้ เมื่อนำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ของศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลกพบว่า การติดสีของเมล็ดพันธุ์จางมาก ทำให้การประเมินความมีชีวิตค่อนข้างยาก ซึ่งจะทำให้ได้ค่าความมีชีวิตไม่สัมพันธ์กับความงอกมาตรฐาน จึงทำการศึกษาเพื่อหาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายที่เหมาะสมเพื่อประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

- อุปกรณ์
    1. อุปกรณ์สุ่มเก็บตัวอย่าง ได้แก่ หลาวสุ่มตัวอย่าง, ถุงพลาสติก, ปากกาเคมี
    2. วัสดุอุปกรณ์ ได้แก่ กระดาษเพาะ, ปากคีบ (forceps)
    3. สารเคมี ได้แก่ สารละลายเตราโซเลียม
    4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope พร้อมอุปกรณ์กล้องถ่ายภาพ
    5. เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7
- วิธีการทดลอง

    วางแผนการทดลองแบบ 4x3 factorial in CRD มี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด ประกอบด้วย

    - ปัจจัยที่ 1 คือ ระดับของความเข้มข้นสารละลายเตตราโซเลียม 4 ระดับ คือ
        1. ความเข้มข้น 1.00 %
        2. ความเข้มข้น 0.50 %
        3. ความเข้มข้น 0.10 %
        4. ความเข้มข้น 0.05 %
    - ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการแช่สารละลายเตตราโซเลียม 3 ระยะ คือ
        1. เวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
        2. เวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
        3. เวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 ตรวจสอบความงอกมาตรฐาน โดยการเพาะความงอกด้วยทราย จำนวน 100 เมล็ด/ซ้ำ ระยะเวลา 10 วัน แล้วประเมินความงอกมาตรฐาน

การตรวจสอบความงอกมาตรฐาน (standard germination test) สุ่มเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง จำนวน 4 ซ้ำๆละ 100 เมล็ดมาเพาะในทราย (sand method) นำกล่องทรายใส่ไว้ในห้องเพาะ ที่อุณหภูมิคงที่ 25± 2องศาเซลเซียส ตรวจประเมินความงอกต้นอ่อน 10 วันหลังเพาะ ตามวิธีการของ ISTA (2015)

2. เตรียมเมล็ดพันธุ์สำหรับการตรวจสอบเตตราโซเลียม (Tetrazolium test) นำเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงมาบ่มโดยหุ้มด้วยกระดาษเพาะเปียกชื้น ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดมาแช่ในสารละลายเตตราโซเลียมตามกรรมวิธีที่กำหนด เก็บในที่มืด จากนั้นนำเมล็ดที่ผ่านการแช่สารละลายเตตราโซเลียมมาล้างและแช่เมล็ดด้วยน้ำสะอาดเพื่อหยุดปฏิกิริยาของสารละลายเตตราโซเลียม ศึกษารูปแบบการติดสีและประเมินความงอกจากรูปแบบการติดสี

3. เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 6 เดือน ทุกเดือน สุ่มตัวอย่างมาตรวจสอบความงอกมาตรฐานของเมล็ดพันธุ์ และนำเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงแช่สารละลายเตตราโซเลียมตามกรรมวิธีที่กำหนด ศึกษารูปแบบการติดสีและประเมินความงอกจากรูปแบบการติดสี

การบันทึกข้อมูล

1. ความงอกมาตรฐานของเมล็ดพันธุ์
2. ความงอกของเมล็ดพันธุ์ประเมินจากการติดสีของเมล็ดพันธุ์
3. รูปแบบการติดสีสารละลายเตตราโซเลียม

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา - ตุลาคม 2558 – กันยายน 2561

สถานที่ดำเนินการ - ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

ผลการวิจัย (Results) และอภิปรายผล (Discussion)

1. เตรียมเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 จากการปลูกฤดูแล้งเดือนธันวาคม 2558 และปลายฤดูฝนเดือนมิถุนายน 2559 ตรวจสอบความงอกมาตรฐาน โดยการเพาะเมล็ดในทราย จำนวน 100 เมล็ด/ซ้ำ (4 ซ้ำ) ตรวจนับความงอกที่อายุ 10 วันหลังเพาะ แล้วประเมินความงอกมาตรฐาน (ISTA, 2015)

2. การตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ ด้วยวิธีเตตราโซเลียม (Tetrazolium test)

โดยนำเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงมาบ่มโดยหุ้มด้วยกระดาษเพาะเปียกชื้นในกล่องพลาสติก (ขนาด กว้าง x ยาว x สูง 10x12x6 เซนติเมตร) แล้วเก็บในตู้เพาะความงอก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดมาแช่ในสารละลายเตตราโซเลียมตามกรรมวิธีที่กำหนด เก็บ

รักษาในที่มืด แล้วนำเมล็ดที่ผ่านการแช่สารละลายเตตราโซเลียมมาล้างและแช่เมล็ดด้วยน้ำสะอาด เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสารละลายเตตราโซเลียม ประเมินรูปแบบการติดสีและประเมินความงอกจากรูปแบบการติดสี

วิธีการประเมินการติดสีของสารละลายเตตราโซเลียม จัดรูปแบบการติดสีของเมล็ดพันธุ์ได้ 8 รูปแบบรูปแบบที่ 1 ราก ต้นอ่อนและใบเลี้ยงติดสีเป็นสีแดง (ภาพที่ 1 A) เป็นเมล็ดที่มีชีวิตจะมีการติดสีที่สมบูรณ์ทั้งเมล็ด หรือใบเลี้ยงติดสีมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

รูปแบบที่ 2 ไม่มีการติดสีบริเวณต้นอ่อน (ภาพที่ 1 B1)

รูปแบบที่ 3 ไม่ติดสีบริเวณต้นอ่อนและใบเลี้ยง ภาพที่ 1 B2)

รูปแบบที่ 4 ไม่ติดสีบริเวณราก (ภาพที่ 1 B3)

รูปแบบที่ 5 ไม่ติดสีบริเวณรากและใบเลี้ยง (ภาพที่ 1 B4)

รูปแบบที่ 6 ไม่ติดสีบริเวณรากและต้นอ่อน(ภาพที่ 1 B5)

รูปแบบที่ 7 ไม่ติดสีทั้งราก ต้นอ่อนและใบเลี้ยง (ภาพที่ 1 B6)

รูปแบบที่ 2 – 7 จัดเป็นเมล็ดพันธุ์ไม่มีชีวิต

รูปแบบที่ 8 ไม่ติดสีเลยทั้งเมล็ด (ภาพที่ 1 C) ซึ่งจัดเป็นเมล็ดตาย

เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 ฤดูแล้ง (เดือนธันวาคม 2558) นำไปลดความชื้นเหลือ 9% นำมาตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน และย้อมด้วยสารละลายเตตราโซเลียมที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับคือ 1, 0.5, 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาในการแช่ 4, 5 และ 6 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมที่ใช้การแช่สารละลายที่ระยะเวลาต่างๆ โดยการย้อมสีที่ระดับความเข้มข้น 1% ในระยะเวลาแช่ไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้ง 3 ระยะ ในระยะเวลาในการแช่ 4 ชั่วโมงมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 81% และการแช่ที่ 5 และ 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 80% และ 81% ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียม 0.5% ที่ระยะเวลาในการแช่ 5 ชั่วโมงและ 6 ชั่วโมงมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 78-81%) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5% ที่ระยะเวลาในการแช่ 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุดที่ 78 และ 72 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน พบว่าการแช่สารละลายเตตราโซเลียมที่ระดับความเข้มข้น 1% ที่ระยะเวลา 4 และ 5 ชั่วโมงมีค่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน 87% ภายหลังทำการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงหลังการเก็บรักษาเดือนที่ 1 พบว่า เปอร์เซ็นต์การย้อมสีที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ในระยะเวลาในการแช่ 5 ชั่วโมงมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 80% ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับที่ระยะเวลาในการแช่สารละลาย 6 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานมากที่สุด (80 เปอร์เซ็นต์) หลังการเก็บรักษาเดือนที่ 2 การย้อมสีที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ในระยะเวลาในการแช่ 5 ชั่วโมงมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 70% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับที่ระยะเวลาในการแช่สารละลาย 6 ชั่วโมงมีค่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานมากที่สุด (71 เปอร์เซ็นต์) หลังการเก็บรักษา

เดือนที่ 3 การย้อมสีที่ระดับความเข้มข้น 0.5% และ1% ในระยะเวลาในการแช่ 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 50% ค่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานมากที่สุด (58 เปอร์เซ็นต์) และที่ระยะเวลาในการแช่สารละลายความเข้มข้น 0.5% ทั้ง 3 ระยะเวลาในการแช่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และหลังการเก็บรักษาเดือนที่ 4 พบว่าการย้อมสีที่ระดับความเข้มข้น 1% และ0.5% ในระยะเวลาในการแช่ 5 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 43% เมื่อเปรียบเทียบกับความงอกมาตรฐาน พบว่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน 46 เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บรักษาเดือนที่ 5 พบว่า การย้อมสีที่ระดับความเข้มข้น 1% และ 0.5% ในระยะเวลาการแช่ 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 23% และ มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 21% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับความงอกมาตรฐาน พบว่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน 25 เปอร์เซ็นต์ และ หลังการเก็บรักษาเดือนที่ 6 พบว่า การย้อมสีที่ระดับความเข้มข้น 1% และ 0.5% ในระยะเวลาการแช่ 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 6% เมื่อเปรียบเทียบกับความงอกมาตรฐาน พบว่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน 7 เปอร์เซ็นต์

เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 ปลายฤดูฝน (เดือนมิถุนายน 2559) ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก และเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงที่อายุ 98-125 วันนำไปลดความชื้นเหลือ 9% นำไปตรวจสอบความงอกมาตรฐานได้เปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน และย้อมด้วยสารละลายเตตราโซเลียมที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับคือ 1, 0.5, 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาในการแช่ 4, 5 และ 6 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมที่ใช้การแช่สารละลายที่ระยะเวลาต่างๆ โดยการย้อมสีที่ระดับความเข้มข้น 1% ในระยะเวลาแช่แตกต่างกันทางสถิติทั้ง 3 ระยะ ในระยะเวลาในการแช่ 6 ชั่วโมงมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 94% และที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียม 0.5% ที่ระยะเวลาในการแช่ 6 ชั่วโมงมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ 93% เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1% ระยะเวลาในการแช่ 4 ชั่วโมง และ 0.5% ที่ระยะเวลาในการแช่ 5 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 94 และ 97 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน (94 เปอร์เซ็นต์) มากที่สุด เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 เดือนพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1% ระยะเวลาในการแช่ 5 ชั่วโมง และ 0.5% ที่ระยะเวลาในการแช่ 5 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ 97 และ 89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน (94 เปอร์เซ็นต์) มากที่สุด เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือนพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1% ระยะเวลาในการแช่ 4 ชั่วโมง และ 0.5% ที่ระยะเวลาในการแช่ 6 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ 83 และ 79 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน (80 เปอร์เซ็นต์) มากที่สุด ภายหลังเก็บรักษา 4 เดือน พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมที่ใช้การแช่สารละลายที่ระยะเวลาต่างๆ โดยการย้อมสีที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาแช่ไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้ง 3 ระยะ โดยที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์แช่นาน 4 ชั่วโมงมีเปอร์เซ็นต์

ความมีชีวิตสูงที่สุด 68 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน พบว่าการแช่สารละลายเตตราโซเลียมที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการแช่ 4 ชั่วโมง และระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมงมีค่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน 78 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 5 เดือน พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 4 ชั่วโมง และความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ 5 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานมากที่สุด (61 60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ภายหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 4 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานมากที่สุด (39 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) (ตารางที่ 2)

จากการประเมินการติดสีของสารละลายเตตราโซเลียม สามารถจัดรูปแบบการติดสีของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงได้ 8 รูปแบบรูปแบบที่ 1 ราก ต้นอ่อนและใบเลี้ยงติดสีเป็นสีแดง (ภาพที่ 2 A) เป็นเมล็ดที่มีชีวิตจะมีการติดสีที่สมบูรณ์ทั้งเมล็ด หรือใบเลี้ยงติดสีมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

รูปแบบที่ 2 ไม่มีการติดสีบริเวณต้นอ่อน (ภาพที่ 2 B1)

รูปแบบที่ 3 ไม่ติดสีบริเวณต้นอ่อนและใบเลี้ยง ภาพที่ 2 B2)

รูปแบบที่ 4 ไม่ติดสีบริเวณราก (ภาพที่ 2 B3)

รูปแบบที่ 5 ไม่ติดสีบริเวณรากและใบเลี้ยง (ภาพที่ 2 B4)

รูปแบบที่ 6 ไม่ติดสีบริเวณรากและต้นอ่อน(ภาพที่ 2 B5)

รูปแบบที่ 7 ไม่ติดสีทั้งราก ต้นอ่อนและใบเลี้ยง (ภาพที่ 2 B6)

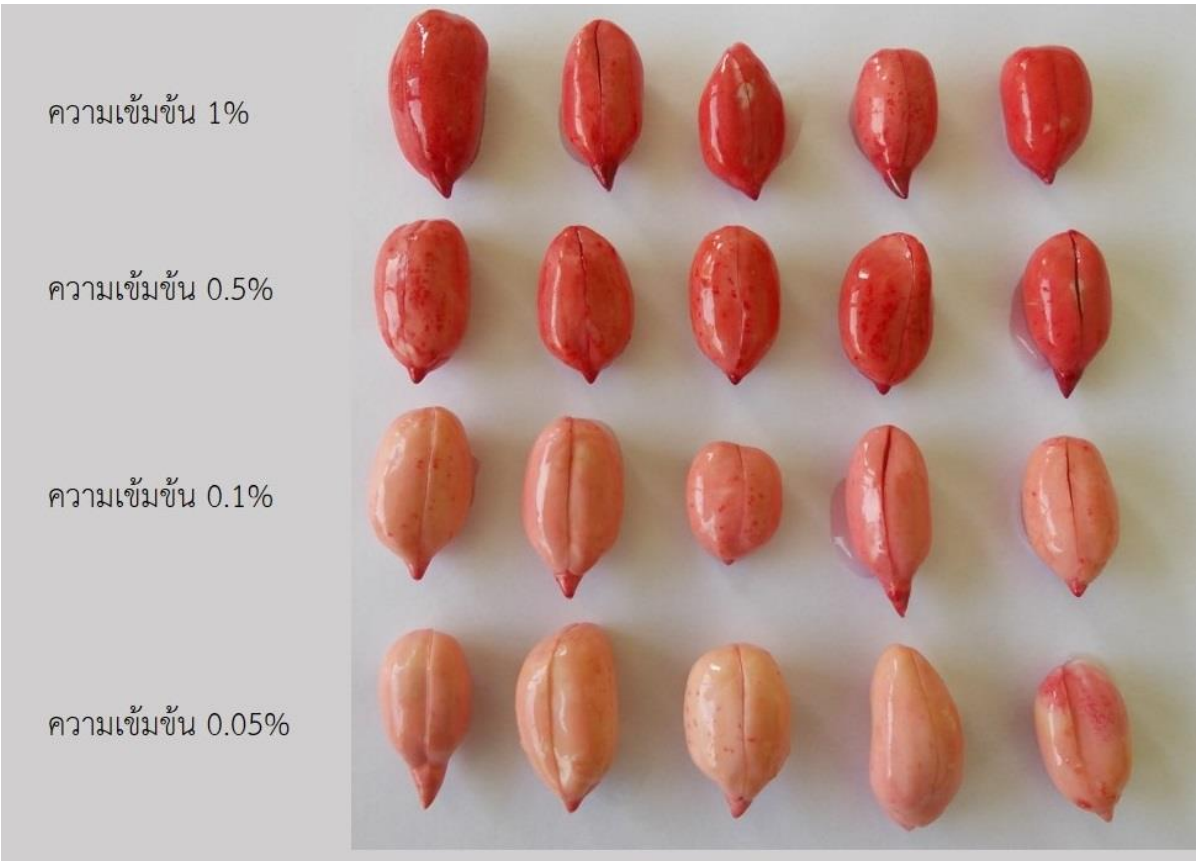
รูปแบบที่ 2 – 7 จัดเป็นเมล็ดพันธุ์ไม่มีชีวิต

รูปแบบที่ 8 ไม่ติดสีเลยทั้งเมล็ด (ภาพที่ 2 C) ซึ่งจัดเป็นเมล็ดตาย

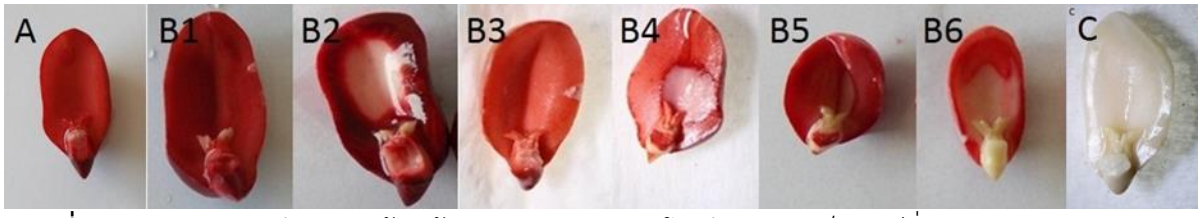
จากการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมที่ใช้ในการแช่สารละลายที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่า ถ้าความเข้มข้นของสารลดต่ำลง จะต้องใช้ระยะเวลาในการแช่สารละลายเตตราโซเลียมยาวนานขึ้น กล่าวคือ ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการแช่สารละลาย 4-6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน ในขณะที่ความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียม 0.5 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ต้องแช่สารละลายนานถึง 6 ชั่วโมงจะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่มีแนวโน้มใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน (ตารางที่ 1 และตารางที่ 2) การทดลองของ Bittencourt (1997) พบว่า การลดความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมเป็น 0.05 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ผลการติดสีมีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่อเทียบกับความงอกมาตรฐาน นั่นคือความเข้มข้นที่ลดลงจะทำให้ความสามารถในการติดสีสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการแช่นานขึ้น หากต้องการจะลดระดับความเข้มข้นของสารลงความเข้มข้นที่สามารถประเมินความมีชีวิตได้คือที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียม 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการแช่ 6 ชั่วโมง ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียม 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาในการแช่สารละลาย 6 ชั่วโมงทำให้ประเมินการติดสีได้ยากเนื่องจากความเข้มของการติดสีจางมาก เมื่อแช่เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงในสารละลายเตตราโซเลียมที่ระดับความเข้มข้นต่างกันแต่ระยะเวลาในการแช่เท่ากันจะให้รูปแบบการติดสีที่เหมือนกันแต่จะมีความเข้มของการติดสีต่างกัน (ภาพที่ 2)

การทดสอบเตตราโซเลียมที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการแช่สารละลาย 4 ชั่วโมงเนื้อเยื่อมีการติดสีชัดเจน การประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ทำได้ไม่ยากนัก ซึ่งความแม่นยำในการตรวจสอบนั้นพัฒนาขึ้นได้โดยการฝึกเปรียบเทียบผลการตรวจสอบเตตราโซเลียมกับการตรวจสอบความงอก และสอดคล้องกับคำแนะนำของสมาคมผู้ตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ (Association of Official Seed Analyze, AOSA) จัดทำขึ้นในปี ค.ศ. 1970



ภาพที่ 1 ระดับความเข้มของเมล็ดพันธุ์จากการย้อมด้วยสารละลายเตตราโซเลียมของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 2 รูปแบบการติดสีจากการย้อมด้วยสารละลายเตตราโซเลียมของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง

(A) เมล็ดมีชีวิต

(B1-B6) เมล็ดพันธุ์ไม่มีชีวิต

(C) เมล็ดตาย

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงฤดูแล้ง ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียม 4 ระดับ ที่ระยะเวลาการแช่ต่างๆ ก่อนการเก็บรักษาและภายหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน

ระยะเวลาในการแช่สารละลาย (factor 2) (ชั่วโมง)	ระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียม (factor 1) (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)						
		0	1	2	3	4	5	6
4 hr.	1%	81a	83a	72a	47a	25c	17b	4b
5 hr.		80a	78ab	68a	40b	43a	18b	5ab
6 hr.		78a	72b	73a	50a	35b	23a	6ab
4 hr.	0.50%	59b	72b	60b	45ab	28b	16b	3b
5 hr.		81a	80a	63b	39b	43a	16b	4b
6 hr.		78a	84a	69a	49a	37a	21a	6a
4 hr.	0.10%	55c	62b	58b	45b	25a	6b	2b
5 hr.		71b	75a	61b	22c	28a	9ab	3ab
6 hr.		78a	56b	68a	51a	26a	10a	4a
4 hr.	0.05%	52b	60b	54a	39a	18b	4b	2b
5 hr.		57b	72a	47b	45a	22b	9a	3ab
6 hr.		72a	49c	59a	44a	30a	8a	4a
ANOV (F-test)	factor 1	**	**	**	**	**	**	**
ANOV (F-test)	factor 2	**	**	**	**	**	**	**
ANOV (F-test)	1x2	**	**	*	**	**	*	*
CV (%)	-	5.3	7.1	6.2	9.4	16.8	16.6	19.9
Germination (%)	-	87	80	71	58	46	25	7

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%จากการทดสอบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงปลายฤดูฝน ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียม 4 ระดับ ที่ระยะเวลาการแช่ต่างๆ ก่อนการเก็บรักษาและภายหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน

ระยะเวลาในการแช่สารละลาย (factor 2) (ชั่วโมง)	ระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียม (factor 1) (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)						
		0	1	2	3	4	5	6
4 hr.	1%	81 c	94 b	86 b	83 a	68 a	61 a	39 a
5 hr.		91 b	99 a	97 a	85 a	67 a	63 a	35 b
6 hr.		94 a	100 a	100 a	84 a	62 a	63 a	38 a
4 hr.	0.50%	89 b	88 b	82 c	69 b	64 a	50 b	31 b
5 hr.		84 c	97 a	89 b	82 a	62 a	60 a	38 a
6 hr.		93 a	99 a	98 a	79 a	64 a	63 a	40 a
4 hr.	0.10%	85 a	77 c	79 b	61 b	52 b	25 c	31 b
5 hr.		79 c	87 b	87 a	69 a	63 a	36 b	34ab
6 hr.		80 b	91 a	89 a	73 a	65 a	69 a	36 a
4 hr.	0.05%	62 c	75 b	73 b	65 a	45 b	26 c	28 c
5 hr.		66 b	84 a	81 a	67 a	59 a	34 b	32 b
6 hr.		74 a	82 a	79 a	67 a	59 a	47 a	37 a
ANOV (F-test)	factor 1	**	**	**	**	**	**	**
ANOV (F-test)	factor 2	**	**	**	**	**	**	**
ANOV (F-test)	1x2	**	*	*	*	**	**	**
CV (%)	-	5.1	2.8	2.8	5.4	9	6.7	5.8
Germination (%)	-	99	94	94	80	78	61	40

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%จากการทดสอบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การทดสอบเตตราโซเลียมที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการแช่สารละลาย 4 ชั่วโมง เนื้อเยื่อมีการติดสีชัดเจน ให้ผลการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ได้ใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกมากที่สุด ซึ่งความแม่นยำในการตรวจสอบนั้นพัฒนาขึ้นได้โดยการฝึกเปรียบเทียบผลการตรวจสอบเตตราโซเลียมกับการตรวจสอบความงอก สอดคล้องกับคำแนะนำของสมาคมผู้ตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ (Association of Official Seed Analyze, AOSA) จัดทำขึ้นในปี ค.ศ. 1970 ดังนั้น หากใช้สารละลายเตตราโซเลียมความเข้มข้นต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการแช่สารละลายอาจไม่เพียงพอต่อการติดสีของเนื้อเยื่อของเมล็ดทำให้ยากที่จะแยกความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อที่มีชีวิตและเนื้อเยื่อที่ไม่มีชีวิต ดังนั้น การประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงโดยการลดระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์จะต้องใช้ระยะเวลาในการแช่สารละลายนานขึ้น จะสามารถลดต้นทุนและอันตรายที่เกิดจากการใช้สารเตตราโซเลียมได้

การทดลองที่ 3 การศึกษาวิธีการใช้ความร้อนทำลายการพักตัวของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง

Study of Heat Treatments on the Breaking of Dormancy in Peanut

ผู้วิจัย

นิภาภรณ์ พรรณรา	Nipapon Punnara	ศวม.เชียงใหม่
ภภัสสร วัฒนกุลภาคิน	Papassorn Wattanakulpakin	ศวม.พิษณุโลก
สุมนา จำปา	Sumana Jumpa	ศวม.เชียงใหม่
ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	Supalak Sattayasamitsathit	ศวม.พิษณุโลก
กัณทิมา ทองศรี	Kantima Thongsri	ศวม.พิษณุโลก

บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับทำลายการพักตัวเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 6 และ ขอนแก่น 84-7 ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ในฤดูแล้ง ปี 2561 และ 2562 วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ กรรมวิธีทดลองประกอบด้วย การอบที่อุณหภูมิ 50°C ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และการอบที่อุณหภูมิ 40°C ระยะเวลา 72 90 108 126 144 และ 168 ชั่วโมง ผลการทดลอง พบว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 6 หลังการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ มีความงอกร้อยละ 43- 46 แต่เมื่อผ่านการอบที่อุณหภูมิ 40°C ระยะเวลา 108 ชั่วโมง มีความงอกเพิ่มขึ้นร้อยละ 73 -75% ส่วนเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 หลังการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ มีความงอกเพียงร้อยละ 5- 8 แต่เมื่อผ่านการอบที่อุณหภูมิ 40°C ระยะเวลา 168 ชั่วโมง มีความงอกเพิ่มขึ้นร้อยละ 74-76 สูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆ สำหรับความเร็วในการงอกของถั่วลิสงทั้ง 2 พันธุ์ เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับความงอก ดังนั้น วิธีการใช้ความร้อนทำลายการพักตัวที่เหมาะสมถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 6 คือ การอบที่อุณหภูมิ 40°C ระยะเวลา 108 ชั่วโมง ส่วนวิธีการใช้ความร้อนทำลายการพักตัวถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 คือ การอบที่อุณหภูมิ 40°C ระยะเวลา 168 ชั่วโมง

คำสำคัญ : เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง การพักตัว

ABSTRACT

A study to determine the temperature and the time for breaking the dormancy of peanut seeds in two cultivars, Khon Kaen 84-7 and 6. The research was conducted in Phitsanulok Seed Research and Development Center in dry season 2018-2019. Two temperature, 40 and 50 °C for 72 90,108,126,144, 168 hours were tested in the completely randomized design with four replications. The results showed that the germination percentages of peanut var. Khon Kaen 6 were 43-46 after seed processing, however the germination percentages were increased to 73-75 after breaking seed dormancy by incubated seed as 40°C for 108 hours. Moreover, the germination percentage of peanut var. Khon Kaen 84-7 were 5-8 after seed processing, however the germination percentages were increased to 74-76 after breaking seed dormancy by incubated seed as 40°C for 168 hours. Consequently, heat treatments breaking dormancy methods, seed incubated in 40°C for 108 and 168 hours, were found to break seed dormancy of peanut Khon Kaen 6 and Khon Kaen 84-7 cultivar, respectively.

Keyword : Peanut Seed Dormancy

บทนำ (Introduction)

การทดสอบความงอกเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงปกติจะใช้เวลา 10 วันจึงจะทราบผล แต่ถั่วลิสงบางพันธุ์ที่เป็นพวกเวอร์จิเนีย (Virginia) เมล็ดมีระยะการพักตัวหลังเก็บเกี่ยวประมาณ 30 – 360 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ของถั่วลิสง เช่น ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 ระยะเวลาการพักตัวประมาณ 42 วัน ส่วนถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 6 ระยะเวลาการพักตัวประมาณ 28 วัน การพักตัวของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงมีข้อดี คือ ทำให้เมล็ดที่สุกแก่แล้วไม่งอกคาต้นหรือเน่าเสียหายในดิน และยังทำให้เมล็ดพันธุ์เก็บรักษาไว้ได้นาน การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์จำเป็นต้องมีการทำลายการพักตัวเพื่อให้ทราบความงอกเมื่อนำไปปลูก จวงจันทร์และโชคชัย (2531) แนะนำให้ใช้ความร้อนทำลายการพักตัวของถั่วลิสงโดยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง แต่ ISTA (2014) ระบุวิธีการทำลายการพักตัวถั่วลิสงโดยการอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C ซึ่งถั่วลิสงแต่ละพันธุ์มีระยะเวลาในการพักตัวต่างกัน เพื่อให้การทำงานในห้องปฏิบัติการ ทำงานได้ต่อเนื่องและได้ผลที่ถูกต้อง ควรจะหาระยะเวลาในการอบสำหรับการทำลายการพักตัวของถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 และ ขอนแก่น 6 ก่อนการทดสอบความงอก

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์

- เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 และ ขอนแก่น 6
- ตู้อบความร้อน
- อุปกรณ์สำหรับเพาะความงอกในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

แบบและวิธีการทดลอง

ถั่วลิสงแต่ละพันธุ์วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ได้แก่

1. อบที่อุณหภูมิ 50 ºC ระยะเวลา 72 ชั่วโมง
2. อบที่อุณหภูมิ 40 ºC ระยะเวลา 72 ชั่วโมง
3. อบที่อุณหภูมิ 40 ºC ระยะเวลา 90 ชั่วโมง
4. อบที่อุณหภูมิ 40 ºC ระยะเวลา 108 ชั่วโมง
5. อบที่อุณหภูมิ 40 ºC ระยะเวลา 126 ชั่วโมง
6. อบที่อุณหภูมิ 40 ºC ระยะเวลา 144 ชั่วโมง
7. อบที่อุณหภูมิ 40 ºC ระยะเวลา 168 ชั่วโมง

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7และพันธุ์ขอนแก่น 6 ที่เพิ่งเก็บเกี่ยวนำมาทดสอบความชื้น ความบริสุทธิ์ ความงอกเริ่มต้นของเมล็ดพันธุ์และความเร็วในการงอก

2. นำเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง พันธุ์ขอนแก่น 84-7และพันธุ์ขอนแก่น 6 นำไปทำลายการพักตัวตามกรรมวิธีที่กำหนด หลังจากนั้นนำเมล็ดมาเพาะในทรายเป็นเวลา 10 วัน แล้วประเมินความงอกของเมล็ดพันธุ์และความเร็วในการงอก (ISTA, 2019)

วิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์มีดังนี้

1) การตรวจสอบความชื้น โดยการตัดเป็นชิ้นขนาดไม่เกิน 7 มม. อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 17 ชั่วโมง
2) การตรวจสอบความงอก โดยการเพาะทราย จำนวน 100 เมล็ด/ซ้ำ เก็บไว้ในห้องเพาะความงอกอุณหภูมิ 20<->30 ºC ประเมินความงอกที่ อายุ 10 วัน

- ความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์ = ผลบวกของ $\left[\dfrac{\text{จำนวนต้นกล้าที่งอก}}{\text{จำนวนวันหลังเพาะ}} \right]$

3. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลหากรรมวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำลายการพักตัวเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7และพันธุ์ขอนแก่น 6

การบันทึกข้อมูล

1.ความชื้นของเมล็ดพันธุ์

2.ความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์

3. ความงอกของเมล็ดพันธุ์ก่อนและหลังการทำลายการพักตัว

4. ความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์ก่อนและหลังการทำลายการพักตัว

- เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม 2560 – สิ้นสุด กันยายน 2562 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

ผลการวิจัย (Results) และอภิปรายผล (Discussion)

ปี 2561 เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 6 หลังปรับปรุงสภาพ มีความชื้น 9.4% ความบริสุทธิ์ 98.5% ความงอก 43% (เมล็ดสดไม่งอก 36%) เมื่อทำลายการพักตัวตามกรรมวิธีที่แตกต่างกัน พบว่า การอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 108 ชั่วโมง มีความงอกสูงสุด คือ 73% เป็นเมล็ดสดไม่งอกเพียง 1% (ตารางที่ 1) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 144 ชั่วโมง ซึ่งมีความงอก 63% สำหรับความเร็วในการงอกเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับความงอก โดยที่การอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 108 ชั่วโมงมีความเร็วในการงอกสูงสุด คือ 9.13 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการการอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 144 ชั่วโมงที่มีความเร็วในการงอก 7.81 ส่วนการอบที่อุณหภูมิ 50 °C ระยะเวลา 72 ชั่วโมง การอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และการอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 90 ชั่วโมง ความงอกไม่มีความแตกต่างทางสถิติ คือ 43 46 และ 36% ตามลำดับ ซึ่งความเร็วในการงอกของวิธีการทำลายการพักตัวของทั้ง 3 กรรมวิธี (5.34 5.69 และ 4.44) เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับความงอกซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน ปี 2562 เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 6 หลังปรับปรุงสภาพ มีความชื้น 9.2% ความบริสุทธิ์ 99.0% ความงอก 46% (เมล็ดสดไม่งอก 39%) เมื่อทำลายการพักตัวตามกรรมวิธีที่แตกต่างกัน พบว่า การอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 108 ชั่วโมง เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปี 2561 โดยมีความงอกสูงสุด คือ 75% (เมล็ดสดไม่งอก 2%) มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีอื่นๆ สำหรับความเร็วในการงอก การอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 108 ชั่วโมง มีความเร็วในการงอกสูงสุดเช่นเดียวกันกับความงอก คือ 9.31 มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีอื่นๆ ส่วนการอบที่อุณหภูมิ 50 °C ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และการอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 90 ชั่วโมง ความงอกไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (45 และ 34%)

ปี 2561 ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 หลังปรับปรุงสภาพ มีความชื้น 9.2% ความบริสุทธิ์ 98.0% ความงอก 5% (เมล็ดสดไม่งอก 90%) เมื่อทำลายการพักตัวตามกรรมวิธีที่แตกต่างกัน พบว่า

การอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 168 ชั่วโมง มีความงอกสูงสุด คือ 74% เป็นเมล็ดสดไม่งอก 6% (ตารางที่ 2) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการอบที่อุณหภูมิ 50 °C ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีความงอก 63% ซึ่งความเร็วในการงอกเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับความงอก โดยที่การอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 168 ชั่วโมง มีความเร็วในการงอก 9.19 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการอบที่อุณหภูมิ 50 °C ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีความเร็วในการงอก 7.81 ส่วนการอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 72 และ 90 ชั่วโมง ความงอกและความเร็วในการงอกไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ความงอก 11 และ 22% และ ความเร็วในการงอก 1.34 และ 2.75 ตามลำดับ ส่วนปี 2562 ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 หลังปรับปรุงสภาพ มีความชื้น 9.3% ความบริสุทธิ์ 98.5% ความงอก 8% (เมล็ดสดไม่งอก 92%) เมื่อทำลายการพักตัวตามกรรมวิธีที่แตกต่างกัน พบว่า การอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 168 ชั่วโมง มีความงอกสูงสุด คือ 76% (เมล็ดสดไม่งอก 4%) มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีอื่นๆ เนื่องจากถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 มีระยะเวลาการพักตัวนานกว่าถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 6 ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายการพักตัวจึงนานกว่าถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 6 ซึ่งการอบอุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีความงอกต่ำสุด คือ 12% ส่วนความเร็วในการงอกเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับความงอก โดยที่การอบที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 168 ชั่วโมง มีความเร็วในการงอกสูงสุด คือ 9.44 มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีอื่นๆ ส่วนการอบอุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีความเร็วในการงอกต่ำสุด คือ 1.44

ตารางที่ 1 ความงอก (%) และความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 6 ที่ทำลายการพักตัวตามกรรมวิธีที่แตกต่างกัน ณ ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ในฤดูแล้ง 2561 และ ฤดูแล้ง 2562

กรรมวิธีทำลายการพักตัว	**ฤดูแล้ง 2561**		**ฤดูแล้ง 2562**	
	ความงอก (%)	**ความเร็วในการงอก**	**ความงอก (%)**	**ความเร็วในการงอก**
1.อบที่อุณหภูมิ 50°Cระยะเวลา 72 ชั่วโมง	43cd	5.34cd	45cd	5.56c
2.อบที่อุณหภูมิ 40°Cระยะเวลา 72 ชั่วโมง	46cd	5.69cd	47c	5.81c
3.อบที่อุณหภูมิ 40°Cระยะเวลา 90 ชั่วโมง	36d	4.44d	34d	4.19d
4.อบที่อุณหภูมิ 40°Cระยะเวลา 108 ชั่วโมง	73a	9.13a	75a	9.31a
5.อบที่อุณหภูมิ 40°Cระยะเวลา 126 ชั่วโมง	54bc	6.75bc	53bc	6.63c
6.อบที่อุณหภูมิ 40°Cระยะเวลา 144 ชั่วโมง	63ab	7.81ab	62b	7.75b
7.อบที่อุณหภูมิ 40°Cระยะเวลา 168 ชั่วโมง	54bc	6.75bc	53bc	6.63c
F-test	**	**	**	**
CV (%)	15.38	17.70	13.70	11.00
เมล็ดถั่วลิสงไม่ทำลายการพักตัว	43	5.35	46	5.72

ในคอลัมน์เดียวกัน ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

ตารางที่ 2 ความงอก (%) และความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 ที่ทำลายการพักตัวตามกรรมวิธีที่แตกต่างกัน ณ ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ในฤดูแล้ง 2561 และ ฤดูแล้ง 2562

กรรมวิธีทำลายการพักตัว	**ฤดูแล้ง 2561**		**ฤดูแล้ง 2562**	
	ความงอก (%)	**ความเร็วในการงอก**	**ความงอก (%)**	**ความเร็วในการงอก**
1.อบที่อุณหภูมิ 50°Cระยะเวลา 72 ชั่วโมง	63ab	7.81ab	62b	7.69b
2.อบที่อุณหภูมิ 40°Cระยะเวลา 72 ชั่วโมง	11d	1.34e	12f	1.44f
3.อบที่อุณหภูมิ 40°Cระยะเวลา 90 ชั่วโมง	22d	2.75e	24e	3.00e
4.อบที่อุณหภูมิ 40°Cระยะเวลา 108 ชั่วโมง	40c	5.00d	42d	5.25d
5.อบที่อุณหภูมิ 40°Cระยะเวลา 126 ชั่วโมง	50bc	6.25cd	52c	6.44c
6.อบที่อุณหภูมิ 40°Cระยะเวลา 144 ชั่วโมง	55bc	6.88bc	57bc	7.13bc
7.อบที่อุณหภูมิ 40°Cระยะเวลา 168 ชั่วโมง	74a	9.19a	76a	9.44a
F-test	**	**	**	**
CV (%)	21.94	17.82	13.46	13.42
เมล็ดถั่วลิสงไม่ทำลายการพักตัว	5	0.60	8	0.97

ในคอลัมน์เดียวกัน ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 6 เมล็ดมีระยะพักตัวหลังเก็บเกี่ยวประมาณ 28 วัน ส่วนถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 เมล็ดมีระยะหลังเก็บเกี่ยวประมาณ 42 วัน ในกรณีที่ต้องการใช้เมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยวทันที จึงมีความจำเป็นต้องทำลายการพักตัวเพื่อจะให้ทราบความงอกก่อนที่จะนำเมล็ดพันธุ์ไปใช้ประโยชน์ สมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (ISTA) กำหนดให้อบที่อุณหภูมิ 40°C ก่อนเพาะความงอกในห้องปฏิบัติการ ซึ่งระยะเวลาการพักตัวของถั่วลิสงแต่ละพันธุ์แตกต่างกัน ดังนั้น วิธีการใช้ความร้อนทำลายการพักตัวถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 6 คือ การอบที่อุณหภูมิ 40°C ระยะเวลา 108 ชั่วโมง ส่วนวิธีการใช้ความร้อนทำลายการพักตัวถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 84-7 คือ การอบที่อุณหภูมิ 40°C ระยะเวลา 168 ชั่วโมง

การทดลองที่ 4 การศึกษาวิธีการตรวจสอบความแข็งแรงในห้องปฏิบัติการกับความสามารถในการงอกได้ในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

Comparison of Vigor Test in the Laboratory and Field Test of Soybean Seeds

ผู้วิจัย

ปัทมพร วาสนาเจริญ	Pattamaporn Vassanacharoe	ศวร.เชียงใหม่
ละอองดาว แสงหล้า	Laongdown Sangla	ศวร.เชียงใหม่

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการตรวจสอบความแข็งแรงในห้องปฏิบัติการที่ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกับการงอกได้ในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ดำเนินการวิจัยในฤดูแล้งและฤดูฝนปี 2561-2652 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 60 สจ 5 เชียงใหม่ 1 และเชียงใหม่ 84-2 อายุการเก็บรักษาที่ 0 2 4 และ 6 เดือน จำนวน 4 พันธุ์ มาตรวจสอบความแข็งแรงเปรียบเทียบผลกับการงอกได้ในไร่ ประกอบด้วย 8 กรรมวิธี ได้แก่ วิธีทดสอบการงอกได้ในไร่ วิธีทดสอบความงอก วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุ วิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็น วิธีทดสอบดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ วิธีทดสอบการนำไฟฟ้า วิธีการย้อมสี และวิธีทดสอบอัตราการเจริญของต้นกล้า ผลการทดลอง พบว่า ทั้งฤดูแล้งและฤดูฝน วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุให้ค่าความงอกที่ใกล้เคียงกับค่าการงอกได้ในไร่มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ วิธีทดสอบความงอกและวิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็น เมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างการงอกได้ในไร่และกรรมวิธีทดสอบต่าง ๆ พบว่า วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุ วิธีทดสอบความงอก วิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็น วิธีทดสอบดัชนีการงอกของเมล็ด มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่เข้าใกล้ 1 แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงบวกที่แน่นแฟ้นและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นลงในทิศทางเดียวกันกับค่าการงอกได้ในไร่ เท่ากับ 0.9481 0.9209 0.9199 และ 0.8109 ตามลำดับ

คำสำคัญ : การงอกได้ในไร่ ความแข็งแรง ถั่วเหลือง ถั่วเหลืองฝักสด การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์

Abstracts

The research was to study a method of seed vigor test in laboratory that related to the field germination of four soybean varieties i.e. Chiang Mai 60, SJ 5, Chiang Mai 1 and Chiang Mai 84-2, an experiment was conducted at Chiang Mai Field Crops Research Center (CMFCRC), 2018-2019. There were 8 methods i.e. 1) field test 2) germination test 3) accelerated aging test (AA-Test) 4) cool test 5) germination index 6) conductivity test 7) tetrazolium-test (TZ-Test) and 8) seedling growth rate. Four soybean seed from 0, 2, 4 and 6 months after storage in uncontrolled temperature room was separately used in this study. The result found that accelerated aging test gave the percentage of germination similar to field germination test both in the in dry and rainy season. The germination test, cool test and germination index were later. The correlation coefficient of field germination and various methods showed that the methods for accelerated aging test, germination test, cool test and germination index gave a positive correlation with the field germination with 0.9481, 0.9209, 0.9199 and 0.8109 respectively. This indicates showed a strong positive relationship between four vigor test and field germination.

Key words: field germination test, vigor test, soybean, vegetable soybean, seed storage

บทนำ (Introduction)

คุณภาพเมล็ดพันธุ์เป็นปัจจัยที่สำคัญยิ่งในกระบวนการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจะมีการเสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็วหลังจากเก็บเกี่ยว ในกระบวนการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อจำหน่ายให้แก่เกษตรกรนั้นจำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์เพื่อให้ได้เมล็ดพันธุ์ที่มีความงอกตามมาตรฐานที่กำหนด การตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปจะทำการตรวจสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์และความแข็งแรง ซึ่งในการตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในแต่ละวิธีที่แตกต่างกันออกไปนั้นจะให้ความแม่นยำในการตรวจสอบแตกต่างกันไป ซึ่งความแม่นยำในการตรวจสอบความแข็งแรงของเม็ดพันธุ์จะช่วยในการคาดคะเนคุณสมบัติของเมล็ดเพื่อใช้ประเมินความสามารถในการงอกได้ในไร่ของเมล็ดในชุดนั้น ๆ ศานิต (2552) การทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์เป็นการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์อีกรูปแบบหนึ่ง ซึ่งมีความสำคัญในการผลิตเมล็ดพันธุ์และตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ก่อนจำหน่ายให้แก่เกษตรกร เนื่องจากเมล็ดพันธุ์หลายล๊อตที่มีผลการตรวจสอบความงอกที่ใกล้เคียงกันเมื่อนำไปปลูกในไร่นาหรือเก็บรักษาเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้วพบว่า เมล็ดมีความงอกแตกต่างกัน เนื่องจากการทดสอบความงอกมาตรฐานในระดับห้องปฏิบัติการนั้นสภาพแวดล้อมในการทดสอบความงอกมีความเหมาะสมในสภาพที่ควบคุม แต่เมื่อนำเมล็ดไปปลูกในแปลงที่มีสภาพแวดล้อมที่มีความแปรปรวนไม่เอื้อต่อการงอกของเมล็ดจะทำให้เมล็ดพันธุ์มีความ

งอกแตกต่างกันออกไป ดังนั้นการเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์เพื่อหาวิธีการตรวจสอบที่แม่นยำและเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและให้เกิดความแม่นยำในการประเมินความสามารถในการในการงอกได้ในไร่ จึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาระบบการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองให้เกิดความแม่นยำมากที่สุด เพื่อประสิทธิภาพการผลิตในแปลง ลดต้นทุนการผลิตในส่วนเมล็ดพันธุ์และมีการใช้เมล็ดพันธุ์ในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อลดสูญเสียเมล็ดพันธุ์ดี

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

- อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 สจ 5 เชียงใหม่ 1 และเชียงใหม่ 84-2
2. สารเคมีสำหรับตรวจสอบความแข็งแรงในห้องปฏิบัติการ เช่น สารเตตระโซเลียม
3. วัสดุอุปกรณ์สำหรับตรวจสอบความแข็งแรงในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ กระดาษเพาะ ถาดเพาะ ตะแกรงชุดทดสอบการเร่งอายุ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เพาะความงอก เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง เป็นต้น
4. วัสดุอุปกรณ์สำหรับตรวจสอบความแข็งแรงในไร่ ได้แก่ จอบ ถุงมือ ถังพลาสติก เชือก เป็นต้น

- วิธีการ

วางแผนการทดลองเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและค่าสหสัมพันธ์ จำนวน 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 วิธีทดสอบการงอกได้ในไร่ (Field test)

กรรมวิธีที่ 2 วิธีทดสอบความงอก (Germination test)

กรรมวิธีที่ 3 วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุ (Accelerated aging test: AA-Test)

กรรมวิธีที่ 4 วิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็น (Cool germination test)

กรรมวิธีที่ 5 วิธีทดสอบดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ (Germination index)

กรรมวิธีที่ 6 วิธีทดสอบการนำไฟฟ้า (Conductivity test)

กรรมวิธีที่ 7 วิธีการย้อมสี (Tetrazolium test: TZ-Test)

กรรมวิธีที่ 8 วิธีทดสอบอัตราการเจริญของต้นกล้า (Seedling growth rate)

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

ทำการปลูกถั่วเหลืองในฤดูแล้งและฤดูฝน จำนวน 4 พันธุ์ ที่ระยะปลูก 20x50 เซนติเมตร หยอดเมล็ดหลุมละ 3-4 เมล็ด ก่อนปลูกคลุกเมล็ดด้วยปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมและสารเมทาแลกซิล อัตรา 5 กรัมต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม เมื่อต้นงอกถอนให้เหลือจำนวน 3 ต้นต่อหลุม การปฏิบัติดูแล การป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูปฏิบัติตามวิธีแนะนำของกรมวิชาการเกษตร เมื่อถั่วเหลืองสุกแก่ที่ระยะ R7.5 ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิต ตากลดความชื้น ปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์เพื่อตรวจสอบความแข็งแรงตามกรรมวิธีต่าง ๆ จำนวน 8 กรรมวิธี หลังจากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

ทั้ง 4 พันธุ์ เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน ทำการตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ตามกรรมวิธีต่าง ๆ ทุก ๆ 2 เดือน เมื่อ 0 2 4 และ 6 เดือน รวม 4 ครั้ง

วิธีทดสอบการงอกได้ในไร่ โดยปลูกถั่วเหลืองในแปลงทดสอบ จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด โดยใช้ระยะระหว่างแถว 10 เซนติเมตร ระยะระหว่างต้น 2-4 เซนติเมตร ทำร่องเพาะลึกประมาณ 1.5 เซนติเมตร กลบดิน รดน้ำให้ชุ่ม ตรวจนับต้นงอกเมื่ออายุ 2 สัปดาห์หลังปลูก

วิธีทดสอบความงอก โดยการเพาะระหว่างกระดาษชื้น (Between paper) นำเมล็ดถั่วเหลือง จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด เพาะในกระดาษเพาะความงอกที่ชื้นจำนวน 3 ชั้น วางเมล็ดระหว่างกระดาษชื้น 2 ชั้นแล้วปิดด้วยกระดาษชื้นอีก 1 ชั้น ม้วนกระดาษเพาะใส่ในตะกร้าพลาสติกก่อนใส่ถุงพลาสติก และรัดปากถุงด้วยยางวงหลวม ๆ ให้อากาศถ่ายเทได้ วางในแนวตั้ง แล้วนำไปไว้ในตู้เพาะความงอกอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ประเมินความงอกที่ อายุ 8 วัน

วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุ นำเมล็ดถั่วเหลืองจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 250 กรัม วางบนตะแกรงในขวดโหลสำหรับเร่งอายุ นำมาเร่งอายุในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 41 องศาเซสเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดไปเพาะความงอกด้วยการเพาะระหว่างกระดาษชื้น ประเมินค่าร้อยละของความงอกที่อายุ 8 วัน

วิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็น นำเมล็ดถั่วเหลือง จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด เพาะในกระดาษเพาะความงอกที่ชื้นจำนวน 3 ชั้น วางเมล็ดระหว่างกระดาษชื้น 2 ชั้นแล้วปิดด้วยกระดาษชื้นอีก 1 ชั้น ม้วนกระดาษเพาะใส่ในตะกร้าพลาสติกก่อนใส่ถุงพลาสติก และรัดปากถุงด้วยยางวงหลวม ๆ ให้อากาศถ่ายเทได้ วางในแนวตั้ง แล้วนำไปไว้ในตู้เพาะความงอกอุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ประเมินความงอกที่ อายุ 8 วัน

วิธีทดสอบดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ เพาะเมล็ดถั่วเหลืองโดยวิธีการเพาะความงอกระหว่างกระดาษ จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด ทำการตรวจนับการงอกของเมล็ดทุก ๆ วัน นับจากวันแรกที่เมล็ดงอก การประเมินผลค่าดัชนีการงอก

ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ = ผลรวมของ (จำนวนต้นกล้าที่งอก) / (จำนวนวันหลังเพาะ)

วิธีทดสอบอัตราการเจริญของต้นกล้า เพาะเมล็ดถั่วเหลืองโดยการเพาะความงอกระหว่างกระดาษ จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 25 เมล็ด เมื่อต้นกล้าอายุ 8 วัน นำต้นกล้าไปอบหาน้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน โดยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ประเมินผลจากค่าความแข็งแรงของเมล็ดจากน้ำหนักแห้งของต้นกล้าที่ได้

อัตราการเจริญของต้นกล้า = น้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน / จำนวนต้นกล้าปกติ

วิธีทดสอบการนำไฟฟ้า นำเมล็ดถั่วเหลืองจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 25 เมล็ด แช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 75 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำน้ำกลั่นที่แช่เมล็ดไปวัดหาค่าการนำไฟฟ้า ด้วยเครื่อง electrical conductivity meter

วิธีการย้อมสี นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 200 กรัม แช่น้ำไว้ 1 คืน เมื่อครบกำหนดนำ เมล็ดไปแช่ในสารละลายเตตระโซเลียมความเข้มข้นร้อยละ 1.0 วางไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้อง นาน 2-4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดและเมล็ดติดสีสม่ำเสมอนำเมล็ดไปล้างในน้ำไหล หลังจากนั้นนำเมล็ดมาผ่าครึ่ง ตรวจสอบลักษณะการติดสีของโครงสร้างที่สำคัญของเมล็ดพันธุ ประเมินความแข็งแรง (AOSA, 1981; AOSA, 1983; ISTA, 1996)

- การบันทึกข้อมูล

1. ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ที่กรรมวิธีต่าง ๆ
2. การเจริญเติบโตของต้นกล้าที่กรรมวิธีต่าง ๆ
3. ค่าการนำไฟฟ้า
4. การติดสีของเมล็ด

- เวลาและสถานที่

ดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2560 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2562 ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่

ผลการวิจัย (Results)และอภิปรายผล (Discussion)

ฤดูแล้ง

ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่อายุการเก็บรักษา 0 เดือน พบว่า ความงอกในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เท่ากับ ร้อยละ 92 วิธีทดสอบความงอกให้ค่าความงอกใกล้เคียงกับความงอกในไร่สูงสุด รองลงมา ได้แก่ วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุและวิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็น เท่ากับ ร้อยละ 98 86 และ 84 ตามลำดับ (Table 1)

ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่อายุการเก็บรักษา 2 เดือน พบว่า ความงอกในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เท่ากับ ร้อยละ 89 วิธีทดสอบความงอกให้ค่าความงอกใกล้เคียงกับความงอกในไร่สูงสุด รองลงมา ได้แก่ วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุและวิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็น เท่ากับ ร้อยละ 93 81 และ 77ตามลำดับ (Table 2)

ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่อายุการเก็บรักษา 4 เดือน พบว่า ความงอกในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เท่ากับ ร้อยละ 72 วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุให้ค่าความงอกใกล้เคียงกับความงอกในไร่สูงสุด รองลงมา ได้แก่ วิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็นและวิธีทดสอบความงอก เท่ากับ ร้อยละ 75 86 และ 68 ตามลำดับ (Table 3)

ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่อายุการเก็บรักษา 6 เดือน พบว่า ความงอกในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เท่ากับ ร้อยละ 68 วิธีทดสอบความงอกให้ค่าความงอกใกล้เคียงกับความงอกใน

สภาพไร่สูงสุด รองลงมา ได้แก่ วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุและวิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็น เท่ากับ ร้อยละ 71 62 และ 58 ตามลำดับ (Table 4)

การเจริญเติบโตของต้นกล้า

การเจริญเติบโตของต้นกล้าถั่วเหลืองที่อายุเก็บรักษา 0 เดือน พบว่า ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์เฉลี่ย เท่ากับ 40 ต้นต่อ 7 วัน อัตราการเจริญของต้นกล้า เท่ากับ 0.045 กรัมต่อต้น (Table 1)

การเจริญเติบโตของต้นกล้าถั่วเหลืองที่อายุเก็บรักษา 2 เดือน พบว่า ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์เฉลี่ย เท่ากับ 38 ต้นต่อ 7 วัน อัตราการเจริญของต้นกล้า เท่ากับ 0.044 กรัมต่อต้น (Table 2)

การเจริญเติบโตของต้นกล้าถั่วเหลืองที่อายุเก็บรักษา 4 เดือน พบว่า ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์เฉลี่ย เท่ากับ 34 ต้นต่อ 7 วัน อัตราการเจริญของต้นกล้า เท่ากับ 0.049 กรัมต่อต้น (Table 3)

การเจริญเติบโตของต้นกล้าถั่วเหลืองที่อายุเก็บรักษา 6 เดือน พบว่า ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์เฉลี่ย เท่ากับ 31 ต้นต่อ 7 วัน อัตราการเจริญของต้นกล้า เท่ากับ 0.057 กรัมต่อต้น (Table 4)

ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์เป็นวิธีการประเมินความแข็งแรงของเมล็ดจากอัตราเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์ ในเมล็ดที่แข็งแรงกว่าย่อมงอกได้เร็ว (จวงจันทร์, 2529) เมล็ดถั่วเหลืองที่มีอายุการเก็บรักษาสั้นที่ 2 และ 4 เดือน มีค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์สูงซึ่งแสดงถึงเมล็ดที่มีความแข็งแรงสูงกว่าเมล็ดถั่วเหลืองที่อายุเก็บรักษา 6 เดือน

การทดสอบทางชีวเคมี

การทดสอบทางชีวเคมีของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ 0 เดือน พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ย เท่ากับ 80 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ความแข็งแรงจากการย้อมติดสีอยู่ในระดับในระดับสูง (TZ-energy 1) (Table 1)

การทดสอบทางชีวเคมีของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ 2 เดือน พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ย เท่ากับ 102 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ความแข็งแรงจากการย้อมติดสีอยู่ในระดับปานกลาง (TZ-energy 2) (Table 2)

การทดสอบทางชีวเคมีของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ 4 เดือน พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ย เท่ากับ 204 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ความแข็งแรงจากการย้อมติดสีอยู่ในระดับปานกลางค่อนต่ำ (TZ-energy 2.5) (Table 3)

การทดสอบทางชีวเคมีของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ 6 เดือน พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ย เท่ากับ 229 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ความแข็งแรงจากการย้อมติดสีอยู่ในระดับปานกลางค่อนต่ำ (TZ-energy 2.5) (Table 4)

ค่าการนำไฟฟ้าแสดงถึงการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ เมล็ดที่มีการเสื่อมคุณภาพจะสูญเสียคุณสมบัติในการเก็บกักสารต่าง ๆ เนื่องจากการเสื่อมสภาพของผนังต่าง ๆ ภายในเซลล์ แสดงผลต่อเนื่องในการย้อมติดสีของเมล็ด เนื้อเยื่อที่แข็งแรงและมีชีวิตจะติดสีได้มากกว่าเมล็ดที่มีความแข็งแรงต่ำ อันเนื่องมาจากการเสื่อมคุณภาพของเมล็ด เมล็ดที่มีคุณภาพดีค่านำไฟฟ้าจะต่ำเนื่องจากการรั่วไหลของสารมีไม่มาก (จวงจันทร์, 2529)

ฤดูฝน

ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่อายุการเก็บรักษา 0 เดือน พบว่า ความงอกในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เท่ากับ ร้อยละ 88 วิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็นให้ค่าความงอกใกล้เคียงกับความงอกในไร่สูงสุด รองลงมา ได้แก่ วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุและวิธีทดสอบความงอก เท่ากับ ร้อยละ 98 83 และ 87 ตามลำดับ (Table 5)

ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่อายุการเก็บรักษา 2 เดือน พบว่า ความงอกในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เท่ากับ ร้อยละ 81 วิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็นให้ค่าความงอกใกล้เคียงกับความงอกในไร่สูงสุด รองลงมา ได้แก่ วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุและวิธีทดสอบความงอก เท่ากับ ร้อยละ 78 77 และ 91ตามลำดับ (Table 6)

ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่อายุการเก็บรักษา 4 เดือน พบว่า ความงอกในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เท่ากับ ร้อยละ 64 วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุให้ค่าความงอกใกล้เคียงกับความงอกในไร่สูงสุด รองลงมา ได้แก่ วิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็นและวิธีทดสอบความงอก เท่ากับ ร้อยละ 65 66 และ 77 ตามลำดับ (Table 7)

ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่อายุการเก็บรักษา 6 เดือน พบว่า ความงอกในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เท่ากับ ร้อยละ 55 วิธีทดสอบความงอกให้ค่าความงอกใกล้เคียงกับความงอกในไร่สูงสุด รองลงมา ได้แก่ วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุและวิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็น เท่ากับ ร้อยละ 56 54 และ 62ตามลำดับ (Table 8)

การเจริญเติบโตของต้นกล้า

การเจริญเติบโตของต้นกล้าถั่วเหลืองที่อายุเก็บรักษา 0 เดือน พบว่า ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์เฉลี่ย เท่ากับ 41 ต้นต่อ 7 วัน อัตราการเจริญของต้นกล้า เท่ากับ 0.035 กรัมต่อต้น (Table 5)

การเจริญเติบโตของต้นกล้าถั่วเหลืองที่อายุเก็บรักษา 2 เดือน พบว่า ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์เฉลี่ย เท่ากับ 36 ต้นต่อ 7 วัน อัตราการเจริญของต้นกล้า เท่ากับ 0.045 กรัมต่อต้น (Table 6)

การเจริญเติบโตของต้นกล้าถั่วเหลืองที่อายุเก็บรักษา 4 เดือน พบว่า ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์เฉลี่ย เท่ากับ 34 ต้นต่อ 7 วัน อัตราการเจริญของต้นกล้า เท่ากับ 0.055 กรัมต่อต้น (Table 7)

การเจริญเติบโตของต้นกล้าถั่วเหลืองที่อายุเก็บรักษา 6 เดือน พบว่า ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์เฉลี่ย เท่ากับ 29 ต้นต่อ 7 วัน อัตราการเจริญของต้นกล้า เท่ากับ 0.081 กรัมต่อต้น (Table 8)

การทดสอบทางชีวเคมี

การทดสอบทางชีวเคมีของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ 0 เดือน พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ย เท่ากับ 89 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ความแข็งแรงจากการย้อมติดสีอยู่ในระดับในระดับสูง (TZ-energy 1) (Table 5)

การทดสอบทางชีวเคมีของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ 2 เดือน พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ย เท่ากับ 116 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ความแข็งแรงจากการย้อมติดสีอยู่ในระดับปานกลาง (TZ-energy 2) (Table 6)

การทดสอบทางชีวเคมีของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ 4 เดือน พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ย เท่ากับ 232 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ความแข็งแรงจากการย้อมติดสีอยู่ในระดับปานกลางค่อนต่ำ (TZ-energy 2.5) (Table 7)

การทดสอบทางชีวเคมีของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ 6 เดือน พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ย เท่ากับ 326 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ความแข็งแรงจากการย้อมติดสีอยู่ในระดับปานกลางค่อนต่ำ (TZ-energy 2.75) (Table 8)

จากผลการทดลองในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ พบว่า คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษาที่ระยะเวลานานขึ้น 4 และ 6 เดือน มีค่าการเสื่อมของเมล็ดพันธุ์เพิ่มขึ้นและแสดงออกในการทดสอบการติดสีของเมล็ดที่น้อยลง โดยค่า TZ-energy สูงขึ้น และค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดที่เพิ่มขึ้น ในถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ ในทั้ง 2 ฤดู แสดงถึงการเสื่อมคุณภาพและสูญเสียความมีชีวิตในเมล็ด โดยความแข็งแรงที่ระดับ 1 (TZ-energy1) หมายถึง ความแข็งแรงที่ระดับสูง ความแข็งแรงที่ระดับ 2 (TZ-energy2) และ 3 (TZ-energy3) หมายถึง ความแข็งแรงที่ระดับปานกลางและต่ำ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ วันชัย (2542) กล่าวไว้ว่า เมล็ดพืชหลังการเจริญเติบโตและพัฒนาถึงจุดที่สมบูรณ์ที่สุดแล้วจะเกิดการเสื่อมสภาพและอ่อนแอจนกระทั่งตายไปในที่สุด ค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์เชียงใหม่ 1 และ เชียงใหม่ 84-2 สูงกว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองฝักแห้งพันธุ์เชียงใหม่ 60 และ สจ 5 ที่ (Table 1-8) เนื่องจากลักษณะการสุกแก่ของถั่วเหลืองฝักสดจะมีการสุกแก่ของฝักในต้นไม่พร้อมกัน ซึ่งยากต่อการกำหนดวันเก็บเกี่ยว การเก็บเกี่ยวโดยทั่วไปจะเก็บเกี่ยวเพียง 1-2 รอบ ทำให้เมล็ดพันธุ์ที่ได้มีระดับการสุกแก่ที่ต่างกัน วัลลภ (2529) กล่าวไว้ว่า โดยทั่วไปคุณภาพเมล็ดพันธุ์จะสูงสุดที่ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา ความแข็งแรงเมล็ดพันธุ์สูงสุด หากยังไม่ได้เก็บเกี่ยวยังค้างอยู่ในแปลงจะเกิดการเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของความชื้นและอุณหภูมิในแปลง ทำให้เมล็ดมีอัตราการใช้อาหารสะสมสูง กระตุ้นให้เมล็ดเกิดการเสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็ว ซึ่งได้แสดงผลการเสื่อมคุณภาพและความแข็งแรงที่ลดลง ในส่วนของค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้สูงขึ้น และระดับ TZ-energy ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในเมล็ดที่เก็บรักษาเป็นเวลานานในทุกพันธุ์

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างการงอกได้ในไร่และกรรมวิธีทดสอบต่างๆ พบความสัมพันธ์ของตัวแปรทั้งในสัมพันธ์เชิงบวกและสัมพันธ์เชิงลบ สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่มีค่าเข้าใกล้ 1 หรือ -1 แสดงถึงการมีความสัมพันธ์กันในระดับสูง ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงบวกที่

ใกล้กับค่า 1 แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงบวกที่แน่นแฟ้นในทางที่สอดคล้องกัน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นลงในทิศทางเดียวกันของตัวแปร 2 ตัวแปร แต่ในสัมพันธ์เชิงลบไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนว่าทั้ง 2 ตัวแปรมีความสัมพันธ์ในทางทิศทางที่ขัดแย้งกัน (นงลักษณ์, 2537) ผลการวิเคราะห์ พบว่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงบวกของกรรมวิธีต่าง ๆ ต่อการงอกได้ในไร่ มีสัมประสิทธิ์สหสมพันธ์ในเชิงบวกที่ระดับความสัมพันธ์ของตัวแปรในระดับสูงมากจำนวน 3 วิธี ได้แก่ วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุ โดยให้ค่าใกล้ 1 มากสุด รองลงมา ได้แก่ วิธีทดสอบความงอกมาตรฐาน วิธีทดสอบการงอกในสภาพอากาศเย็น เท่ากับ 0.9481 0.9209 และ 0.9199 ตามลำดับ และสัมประสิทธิ์สหสมพันธ์ในเชิงบวกที่ระดับความสัมพันธ์ของตัวแปรในระดับสูง จำนวน 1 วิธี คือ วิธีทดสอบดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ เท่ากับ 0.8109 ในทางตรงข้าม สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงลบของตัวแปรกรรมวิธีต่างๆ ต่อการงอกได้ในไร่ พบว่า วิธีทดสอบการนำไฟฟ้า วิธีการย้อมสี มีค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ที่ระดับความสัมพันธ์ของตัวแปรในระดับสูง โดยให้ค่าใกล้ -1 มากสุด เท่ากับ -0.8516 และ -0.8469 ตามลำดับ สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างวิธีทดสอบอัตราการเจริญของต้นกล้า มีระดับความสัมพันธ์ของตัวแปรในระดับปานกลาง เท่ากับ -0.3737 (Table 9) ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์มีค่าเข้าใกล้ -1 หรือ 1 แสดงถึงการมีความสัมพันธ์กันในระดับสูง แต่หากมีค่าเข้าใกล้ 0 แสดงถึงการมีความสัมพันธ์กันในระดับน้อยหรือไม่มีเลย เมื่อค่า r ระดับของความสัมพันธ์อยู่ระหว่าง 0.90-1.00 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันในระดับสูงมาก 0.70-0.90 มีความสัมพันธ์กันในระดับสูง 0.50-0.70 มีความสัมพันธ์กันในระดับปานกลาง 0.30-0.50 มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ และ 0.00-0.30 มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำมาก (Hinkle, 1998 อ้างโดย นงลักษณ์, 2537)

Table 1 The vigor of four soybean seed varieties after treated at 0 month at Chiang Mai Field Crop Research Center in the dry season, 2018

Variety	Field Test (%)	Germination Test (%)	AA-Test (%)	Cool Test (%)	Germination Index Plants/7 days	Seedling Growth Rate (g/plant)	Conductivity µS/cm/g.seed	TZ-Test*
CM60	97	98	84	86	44	0.030	71	1
SJ5	98	100	92	90	47	0.027	64	1
CM84-2	88	98	86	82	36	0.062	95	1
CM1	86	97	80	78	34	0.061	91	1
Average	92	98	86	84	40	0.045	80	1

* 1 = TZ-energy1 : Hight ; 2 = TZ-energy2 : Medium ; 3 = TZ-energy3 : low

Table 2 The vigor of four soybean seed varieties after treated at 2 month at Chiang Mai Field Crop Research Center in the dry season, 2018

Variety	Field Test (%)	Germination Test (%)	AA-Test (%)	Cool Test (%)	Germination Index Plants/7 days	Seedling Growth Rate (g/plant)	Conductivity µS/cm/g.seed	TZ-Test*
CM60	90	92	82	80	42	0.031	92	2
SJ5	96	98	90	86	45	0.026	86	1
CM84-2	84	90	76	69	32	0.059	125	2
CM1	87	92	75	72	32	0.061	104	2
Average	89	93	81	77	38	0.044	102	2

* 1 = TZ-energy1 : Hight ; 2 = TZ-energy2 : Medium ; 3 = TZ-energy3 : low

Table 3 The vigor of four soybean seed varieties after treated at 4 month at Chiang Mai Field Crop Research Center in the dry season, 2018

Variety	Field Test (%)	Germination Test (%)	AA-Test (%)	Cool Test (%)	Germination Index Plants/7 days	Seedling Growth Rate (g/plant)	Conductivity µS/cm/g.seed	TZ-Test*
CM60	81	87	80	76	38	0.031	104	2
SJ5	88	90	91	80	40	0.029	114	2
CM84-2	54	80	60	56	28	0.072	304	3
CM1	65	85	68	60	30	0.062	295	3
Average	72	86	75	68	34	0.049	204	2.5

* 1 = TZ-energy1 : Hight ; 2 = TZ-energy2 : Medium ; 3 = TZ-energy3 : low

Table 4 The vigor of four soybean seed varieties after treated at 6 month at Chiang Mai Field Crop Research Center in the dry season, 2018

Variety	Field Test (%)	Germination Test (%)	AA-Test (%)	Cool Test (%)	Germination Index Plants/7 days	Seedling Growth Rate (g/plant)	Conductivity µS/cm/g.seed	TZ-Test*
CM60	69	72	68	62	36	0.035	125	2
SJ5	78	80	75	72	40	0.034	127	2
CM84-2	55	65	49	48	22	0.079	346	3
CM1	68	68	55	50	26	0.079	317	3
Average	68	71	62	58	31	0.057	229	2.5

* 1 = TZ-energy1 : Hight ; 2 = TZ-energy2 : Medium ; 3 = TZ-energy3 : low

Table 5 The vigor of four soybean seed varieties after treated at 0 month at Chiang Mai Field Crop Research Center in the rainy season, 2018

Variety	Field Test (%)	Germination Test (%)	AA-Test (%)	Cool Test (%)	Germination Index Plants/7 days	Seedling Growth Rate (g/plant)	Conductivity µS/cm/g.seed	TZ-Test*
CM60	90	100	90	89	46	0.026	88	1
SJ5	92	100	84	95	48	0.024	72	1
CM84-2	84	94	78	80	34	0.044	104	1
CM1	86	98	80	82	37	0.048	91	1
Average	88	98	83	87	41	0.035	89	1

* 1 = TZ-energy1 : High ; 2 = TZ-energy2 : Medium ; 3 = TZ-energy3 : low

Table 6 The vigor of four soybean seed varieties after treated at 2 month at Chiang Mai Field Crop Research Center in the rainy season, 2018

Variety	Field Test (%)	Germination Test (%)	AA-Test (%)	Cool Test (%)	Germination Index Plants/7 days	Seedling Growth Rate (g/plant)	Conductivity µS/cm/g.seed	TZ-Test*
CM60	87	94	82	78	40	0.031	90	1
SJ5	88	96	80	81	43	0.049	82	1
CM84-2	72	85	68	75	30	0.056	160	2
CM1	78	89	77	79	32	0.045	131	2
Average	81	91	77	78	36	0.045	116	2

* 1 = TZ-energy1 : High ; 2 = TZ-energy2 : Medium ; 3 = TZ-energy3 : low

Table 7 The vigor of four soybean seed varieties after treated at 4 month at Chiang Mai Field Crop Research Center in the rainy season, 2018

Variety	Field Test (%)	Germination Test (%)	AA-Test (%)	Cool Test (%)	Germination Index Plants/7 days	Seedling Growth Rate (g/plant)	Conductivity µS/cm/g.seed	TZ-Test*
CM60	65	75	67	70	36	0.036	135	2
SJ5	74	86	78	72	40	0.031	122	2
CM84-2	50	72	52	55	29	0.081	337	3
CM1	68	75	67	62	29	0.071	336	3
Average	64	77	66	65	34	0.055	232	2.5

* 1 = TZ-energy1 : High ; 2 = TZ-energy2 : Medium ; 3 = TZ-energy3 : low

Table 8 The vigor of four soybean seed varieties after treated at 6 month at Chiang Mai Field Crop Research Center in the rainy season, 2018

Variety	Field Test (%)	Germination Test (%)	AA-Test (%)	Cool Test (%)	Germination Index Plants/7 days	Seedling Growth Rate (g/plant)	Conductivity µS/cm/g.seed	TZ-Test*
CM60	57	67	55	58	32	0.038	152	3
SJ5	63	72	62	65	38	0.038	144	2
CM84-2	45	55	47	46	21	0.095	387	3
CM1	55	67	52	54	24	0.081	345	3
Average	55	65	54	56	29	0.063	257	2.75

* 1 = TZ-energy1 : High ; 2 = TZ-energy2 : Medium ; 3 = TZ-energy3 : low

Table 9 The correlation coefficient of field test and vigor tests in soybean seed after testing at Chiang Mai Field Crop Research Center in the dry and rainy season, 2018

	Field Test	Germination Test	AA-Test	Cool Test	Germination Index	Seedling growth rate	Conductivity
Germination Test	0.9209						
AA-Test	0.9481	0.9266					
Cool Test	0.9199	0.9254	0.94				
Germination Index	0.8109	0.7577	0.8523	0.8773			
Seedling growth rate	-0.6832	-0.5966	-0.7512	-0.7669	-0.8699		
Conductivity	-0.8516	-0.7971	-0.8516	-0.8812	-0.8441	0.8465	
TZ-Test	-0.8469	-0.8378	-0.8237	-0.8852	-0.7939	0.6473	0.8218

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

จากการทดลองเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบความแข็งแรงในห้องปฏิบัติการกับความสามารถในการงอกได้ในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 60 สจ 5 เชียงใหม่ 1 และเชียงใหม่ 84-2 ได้วิธีการตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ ที่ให้ค่าใกล้เคียงกับการงอกได้ไร่ จำนวน 3 วิธี ได้แก่ วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุ วิธีทดสอบความงอกมาตรฐาน และ วิธีทดสอบการงอกในสภาพอาการเย็น วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุให้ความแม่นยำใกล้เคียงการงอกในไร่สูงสุด รองลงมา ได้แก่ วิธีทดสอบความงอกมาตรฐาน และ วิธีทดสอบการงอกในสภาพอาการเย็น ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างที่มีค่าใกล้กับ 1

แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงบวกที่แน่นแฟ้นในทางที่สอดคล้องกันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นลงในทิศทางเดียวกันของตัวแปร วิธีทดสอบโดยการเร่งอายุให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ใกล้เคียง 1 มากที่สุด รองลงมาได้แก่ วิธีทดสอบความงอกมาตรฐาน และ วิธีทดสอบความสามารถในการงอกในสภาพอากาศเย็น

การทดลองที่ 5 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายเตตราโซเลียมในการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

Study on Suitable Concentration of Tetrazolium Solutions for Evaluation Viability of Soybean Seed

ผู้วิจัย

นิภาภรณ์ พรรณรา	Nipapon Punnara	ศวม.เชียงใหม่
ภภัสสร วัฒนกุลภาคิน	Papassorn Wattanakulpakin	ศวม.พิษณุโลก
สุมนา จำปา	Sumana Jumpa	ศวม.เชียงใหม่
ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	Supalak Sattayasamitsathit	ศวม.พิษณุโลก
กัณทิมา ทองศรี	Kantima Thongsri	ศวม.พิษณุโลก
สนอง บัวเกตุ	Sanong Bougate	ศวม.พิษณุโลก

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายเตตราโซเลียมในการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ปี 2560 ในฤดูแล้งและปลายฤดูฝน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ กรรมวิธีทดลองประกอบด้วย ความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมที่ใช้แช่เมล็ดพันธุ์ 5 ระดับ คือ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0% ผลการทดลอง พบว่า สารละลายเตตราโซเลียมที่ความเข้มข้น 0.2% สามารถใช้ประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้ไม่ต่างจากที่ระดับความเข้มข้น 1.0% ในเมล็ดพันธุ์จากทุกระดับความแข็งแรง ประหยัดค่าสารเคมีลดลงเหลือเพียง 35 บาท/ตัวอย่าง เมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้น 1% ที่มีค่าสารเคมี 175 บาท/ตัวอย่าง

คำสำคัญ : เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง สารละลายเตตระโซเลียม

ABSTRACT

To determine suitable concentration of tetrazolium solution for viability of soybean seed evaluation, a study was conducted at Phitsanulok Seed Research and Development Center in dry and late rainy season 2017. Completely randomized design with 4 replicate was used as an experimental design. Treatments consisted of 5 concentrations of TZ solutions i.e. 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0%. Results showed that TZ solution at 0.2% concentration was the most suitable treatment viability of soybean seed evaluation. The 0.2% concentration solution provide no significant difference in the seed viability test compared to the 1.0% concentration but lower cost of chemical used. Chemical cost of TZ solution used at 0.2% concentration was 35 baht/sample, lower than that of the 1.0% concentration for 175 baht/sample.

Keyword: Soybean Seed Tetrazolium Solution

บทนำ (Introduction)

การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ด้านความมีชีวิตด้วยวิธีเตตระโซเลียม (Tetrazolium test) เป็นวิธีที่รวดเร็ว สะดวกและประหยัดเวลา โดยใช้เวลาเพียง 1 วัน ก็สามารถทราบถึงคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้ ซึ่ง ISTA (1995) แนะนำให้ใช้กับถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 1.0% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการย้อม 3-4 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบด้วยวิธีเตตระโซเลียมสารเคมี (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) มีราคาแพงและมีอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน เนื่องจากสารเตตระโซเลียมเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้น หากสามารถปรับลดความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมได้โดยที่ผลการประเมินความมีชีวิตไม่ต่างจากความเข้มข้นที่ 1.0% จะสามารถลดต้นทุนของการทดสอบวิธีนี้ และยังลดอันตรายให้กับผู้ปฏิบัติงานได้อีกด้วย ซึ่ง วสุ (2547) พบว่า การใช้ความเข้มของสารละลายเตตราโซเลียมที่ 0.1 % ย้อมเมล็ดพันธุถั่วเหลือง จะทำให้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง งอกได้เป็นปกติ จึงได้นำไปใช้พัฒนาการจัดทำรูปแบบมาตรฐานการติดสี (standard patterns) ของเตตราโซเลียมในถั่วเหลืองที่เป็นรูปธรรมและแม่นยำยิ่งขึ้น โดยถ่ายภาพเมล็ดพันธุถั่วเหลืองที่ผ่านการย้อมด้วยสารละลายเตตราโซเลียม 0.1 % แล้วนำเมล็ดดังกล่าวไปทดสอบความงอกเพื่อยืนยันผลความมีชีวิตและความแข็งแรง การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเตตราโซเลียมวิธีนี้ เรียกว่า เทคนิคการงอกของเมล็ดย้อม (germination of TZ stained seed technique) แต่ที่ระดับความเข้มข้นนี้ เมื่อนำมาประเมินความมีชีวิตถั่วเหลืองในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ของ ศวม.พิษณุโลก พบว่า ประเมินความมีชีวิตค่อนข้างยาก การติดสีจางมาก ทำให้ค่าความมีชีวิตที่ได้ไม่

สัมพันธ์กับความงอกมาตรฐาน จึงทำการศึกษาเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้เพื่อประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

-อุปกรณ์

- เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
- สารเคมี 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride
- อุปกรณ์สำหรับเพาะความงอกในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

-วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ได้แก่

1. ความเข้มข้น 0.2%
2. ความเข้มข้น 0.4%
3. ความเข้มข้น 0.6%
4. ความเข้มข้น 0.8%
5. ความเข้มข้น 1.0%

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. คัดเลือกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในงานผลิตเมล็ดพันธุ์ชั้นพันธุ์ขยายของ ศวม.พิษณุโลก จำนวน 30 ตัวอย่าง ดังนี้

1.1 เมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงสูง (ความงอกหลังจากการเร่งอายุ ≥ 70%) จำนวน 10 ตัวอย่าง

1.2 เมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงปานกลาง (ความงอกหลังจากการเร่งอายุ 55 - 69%) จำนวน 10 ตัวอย่าง

1.3 เมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงต่ำ (ความงอกหลังจากการเร่งอายุ < 55%) จำนวน 10 ตัวอย่าง

2. แบ่งเมล็ดพันธุ์แต่ละตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

- ส่วนที่ 1 ตรวจสอบความงอกมาตรฐาน โดยการเพาะความงอกด้วยทราย จำนวน 100 เมล็ด/ซ้ำจำนวน 4 ซ้ำ ระยะเวลา 8 วัน แล้วประเมินความงอกมาตรฐาน (ISTA, 2015) และตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ โดยวิธีเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง

- ส่วนที่ 2 ตรวจสอบเตตราโซเลียม (Tetrazolium test) โดยนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองบ่มโดยหุ้มด้วยกระดาษเพาะเปียกชื้น ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดมาแช่ในสารละลายเตตราโซเลียมตามกรรมวิธีที่กำหนด เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดที่ผ่านการแช่สารละลายเตตราโซเลียมมาล้างและแช่เมล็ดด้วยน้ำสะอาดเพื่อหยุดปฏิกิริยาของสารละลายเตตราโซเลียม นำมาศึกษารูปแบบการติดสีและประเมินความมีชีวิตจากรูปแบบการติดสี

3. วิเคราะห์ค่าทางสถิติ (ANOVA) และความสัมพันธ์ระหว่างความงอกมาตรฐานกับความมีชีวิตที่ประเมินจากการติดสี

การบันทึกข้อมูล

1. ความงอกมาตรฐานของเมล็ดพันธุ์
2. ความงอกภายหลังจากการเร่งอายุ
3. จำนวนเมล็ดพันธุ์ที่มีชีวิตภายหลังจากการย้อมสี
4. รูปแบบการติดสีสารละลายเตตราโซเลียม

-เวลาและสถานที่ : เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561
ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

ผลการวิจัย (Results) และอภิปรายผล (Discussion)

ปี 2560 ฤดูแล้ง

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีระดับความแข็งแรงสูง(ความงอกหลังจากการเร่งอายุ ≥ 70%) จำนวน 10 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบความมีชีวิตด้วยวิธีเตตราโซเลียมทุกระดับความเข้มข้นความมีชีวิตไม่มีความแตกต่างทางสถิติถึงแม้ว่าจะใช้สารเตตราโซเลียมที่ความเข้มข้นต่ำถึง 0.2% (Table 1) ส่วนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีระดับความแข็งแรงปานกลาง (ความงอกหลังจากการเร่งอายุ 55 - 69%) (Table 2) มีจำนวน 7 ตัวอย่าง ที่ความมีชีวิตทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ มีอยู่จำนวน 3 ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างทางสถิติ แต่ทั้ง 3 ตัวอย่างนี้ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 1.0% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งอาจเกิดจากการเตรียมตัวอย่างที่ไม่สม่ำเสมอหรือความไม่ชำนาญของผู้ทดสอบ สำหรับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีระดับความแข็งแรงต่ำ (ความงอกหลังจากการเร่งอายุ < 55%) (Table 3) มีจำนวน 9 ตัวอย่าง ที่ความมีชีวิตทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกับที่ระดับความแข็งแรงอื่นๆ ซึ่งมีอยู่จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมมีความแตกต่างทางสถิติ แต่ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 1.0% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีระดับความแข็งแรงปานกลาง ซึ่งค่าความงอกมาตรฐานและค่าความมีชีวิตจากการย้อมด้วยสารละลายเตตราโซเลียมมีค่าใกล้เคียงกัน

ปี 2560 ปลายฤดูฝน

เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปี 2560 ฤดูแล้ง โดยเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีระดับความแข็งแรงสูง(ความงอกหลังจากการเร่งอายุ ≥ 70%) จำนวน 10 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบความมีชีวิตด้วยวิธีเตตราโซเลียมทุกระดับความเข้มข้นความมีชีวิตไม่มีความแตกต่างทางสถิติถึงแม้ว่าจะใช้สารเตตราโซเลียมที่ความเข้มข้นต่ำถึง 0.2% (Table 4) ส่วนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีระดับความแข็งแรงปานกลาง (ความงอกหลังจากการเร่งอายุ 55 - 69%) (Table 5) มีจำนวน 9 ตัวอย่าง ที่ความมีชีวิตทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ มีอยู่จำนวน 1 ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างทางสถิติ แต่ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 1.0% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งอาจเกิดจากการเตรียมตัวอย่างที่ไม่สม่ำเสมอ สำหรับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีระดับความแข็งแรงต่ำ (ความงอกหลังจากการเร่งอายุ < 55%) (Table 6) มีจำนวน 6 ตัวอย่าง ที่ความมีชีวิตทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกับที่ระดับความแข็งแรงอื่นๆ ซึ่งมีอยู่จำนวน 4 ตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมมีความแตกต่างทางสถิติ แต่ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 1.0% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีระดับความแข็งแรงปานกลาง ซึ่งค่าความงอกมาตรฐานและค่าความมีชีวิตจากการย้อมด้วยสารละลายเตตราโซเลียมมีค่าใกล้เคียงกัน

อย่างไรก็ตามการประเมินความมีชีวิตจากการติดสีด้วยวิธีเตตราโซเลียมของถั่วเหลืองสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ(ISTA) แนะนำที่ความเข้มข้น 1.0% เช่นเดียวกันกับ Delouche et al.(1962) แนะนำการย้อมสีเมล็ดพันธุถั่วเหลืองโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียม 1% แช่นาน 2-4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หรือ แช่นาน 5-7 ชั่วโมง สำหรับอุณหภูมิห้อง ส่วน AOSA (1983) แนะนำว่า ในเมล็ดพันธุถั่วเหลือง ควรใช้สารละลายความเข้มข้น 1% แช่นาน 3-4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ในการเร่งปฏิกิริยาของสารละลายเตตราโซเลียมสามารถใช้เครื่อง Vitascope ที่อาศัยหลักการเร่งการทำปฏิกิริยาของสารละลายในสภาพสุญญากาศ (vacuum) และมีอุณหภูมิสูง สามารถลดระยะเวลาในการย้อมลงได้เหลือประมาณ 10–50 นาที โดยในเมล็ดพันธุถั่วเหลืองสามารถลดระยะเวลาลงเหลือประมาณ 15-20 นาที แต่จากผลการทดลองพบว่า สามารถใช้ความเข้มข้นของสารละลายเตตราโซเลียมที่ 0.2% ในการประเมินความมีชีวิตซึ่งไม่แตกต่างกับที่ความเข้มข้น 1.0% แต่สามารถลดค่าใช้จ่ายค่าสารเคมีได้ลงอีกด้วย

Table 1. Viability of 10 seed lots of soybean with high vigour (accelerated aging test ≥ 70%) evaluated by different concentration of TZ solution at Phitsanulok Seed Testing Laboratory in dry season 2017

Concentrations tetrazolium solutions	Viability (%)									
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
O.2%	93	89	95	85	98	94	95	96	98	90
O.4%	93	91	95	88	99	93	94	97	99	90
O.6%	91	91	94	87	99	95	94	95	97	89
0.8%	91	88	93	89	98	94	94	98	97	90
1.0%	91	91	94	89	98	96	93	97	97	89
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	1.2	2.1	3.1	2.8	1.5	2.8	3.0	2.0	1.7	2.0
Standard germination test (%)	91	92	90	90	95	99	95	89	95	83
Germination after accelerated aging (%)	76	72	73	70	78	78	78	83	84	80

Mean in the same column, followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Table 2. Viability of 10 seed lots of soybean with medium vigour (accelerated aging test 55 – 69%) evaluated by different concentration of TZ solution at Phitsanulok Seed Testing Laboratory in dry season 2017

Concentrations tetrazolium solutions	Viability (%)									
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
O.2%	89	82a	89ab	88	95a	80	86	83	87	87
O.4%	89	81ab	85b	87	89b	81	83	82	82	87
O.6%	88	77b	86b	89	95a	83	85	84	85	86
0.8%	88	83a	89ab	88	94a	81	85	85	82	87
1.0%	88	81ab	91a	85	93ab	78	84	85	83	87
F-test	ns	**	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	2.1	2.7	2.6	2.3	2.6	2.8	3.9	3.3	3.0	2.2
Standard germination test (%)	89	83	93	77	85	80	83	85	78	84
Germination after accelerated aging (%)	68	60	64	59	56	59	62	57	60	63

Mean in the same column, followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Table 3. Viability of 10 seed lots of soybean with low vigour (accelerated aging test < 55%) evaluated by different concentration of TZ solution at Phitsanulok Seed Testing Laboratory in dry season 2017

Concentrations tetrazolium solutions	Viability (%)									
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
O.2%	81	73a	73	74	85	79	77	83	84	82
O.4%	80	70ab	76	71	81	80	77	82	85	83
O.6%	82	68ab	77	73	83	80	76	84	79	81
0.8%	77	64b	76	75	85	81	76	84	84	82
1.0%	76	70ab	75	69	81	79	78	83	83	81
F-test	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	3.5	4.0	3.9	3.9	3.3	3.2	1.4	3.7	4.1	3.4
Standard germination test (%)	86	75	77	79	87	79	76	79	85	76
Germination after accelerated aging (%)	44	31	42	41	46	40	41	47	33	43

Mean in the same column, followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Table 4. Viability of 10 seed lots of soybean with high vigour (accelerated aging test ≥ 70%) evaluated by different concentration of TZ solution at Phitsanulok Seed Testing Laboratory in late rainy season 2017

Concentrations tetrazolium solutions	Viability (%)									
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
O.2%	95	90	91	91	92	98	96	92	93	93
O.4%	94	90	88	90	92	98	96	95	93	92
O.6%	94	88	91	89	92	96	93	94	93	93
0.8%	91	89	87	91	92	98	93	92	94	92
1.0%	88	86	89	89	95	96	93	91	93	89
F-test	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	3.5	4.7	3.5	3.3	3.2	1.6	2.5	2.1	2.6	2.6
Standard germination test (%)	92	92	88	90	94	96	90	90	90	93
Germination after accelerated aging (%)	89	73	76	74	73	91	74	75	85	79

Mean in the same column, followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Table 5. Viability of 10 seed lots of soybean with medium vigour (accelerated aging test 55 – 69%) evaluated by different concentration of TZ solution at Phitsanulok Seed Testing Laboratory in late rainy season 2017

Concentrations tetrazolium solutions	Viability (%)									
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
O.2%	88	85ab	85	91	84	92	93	90	88	93
O.4%	90	89a	82	88	81	90	91	88	88	93
O.6%	89	83b	84	91	81	90	94	88	84	89
0.8%	87	82b	88	93	83	87	93	87	86	91
1.0%	88	84b	85	91	85	87	94	87	87	92
F-test	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	3.4	3.2	4.1	2.8	3.3	3.4	2.6	4.0	3.3	3.3
Standard germination test (%)	91	90	91	91	80	87	88	86	84	84
Germination after accelerated aging (%)	56	58	58	60	67	66	62	58	68	63

Mean in the same column, followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Table 6. Viability of 10 seed lots of soybean with low vigour (accelerated aging test < 55%) evaluated by different concentration of TZ solution at Phitsanulok Seed Testing Laboratory in late rainy season 2017

Concentrations tetrazolium solutions	Viability (%)									
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
O.2%	92	88	90a	80b	83	86	84	85ab	77	83ab
O.4%	89	87	88ab	78b	82	85	85	87a	76	80b
O.6%	88	85	87ab	83a	81	88	84	82b	77	81b
0.8%	90	87	90ab	80b	82	85	84	88a	77	83ab
1.0%	90	85	87b	80b	80	84	88	83b	75	88a
F-test	ns	ns	**	*	ns	ns	ns	*	ns	*
CV (%)	1.9	1.8	1.5	2.2	2.3	3.2	3.0	3.0	3.9	4.3
Standard germination test (%)	93	88	85	86	83	84	89	86	81	83
Germination after accelerated aging (%)	43	51	50	38	38	37	49	51	32	43

Mean in the same column, followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Figure1. Viability of soybean seed from tetrazolium test

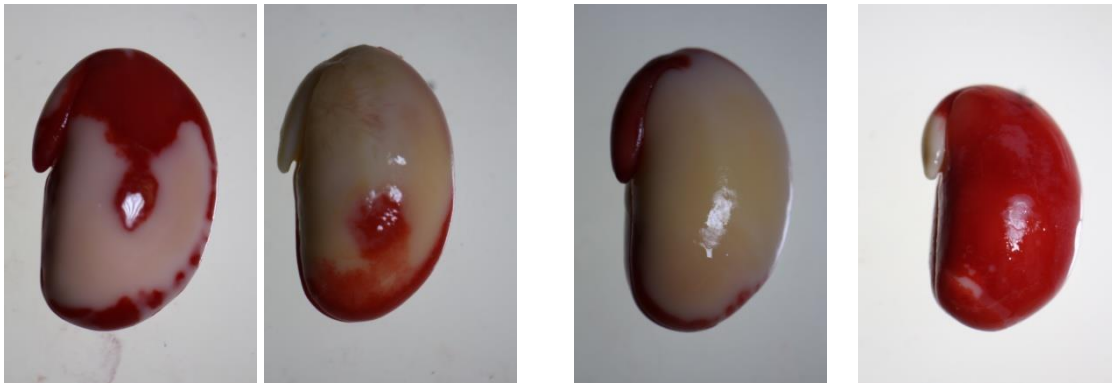


Figure2. Non - viability of soybean seed from tetrazolium test

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

สารละลาย TZ (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) ที่ความเข้มข้น 0.2% มีความเหมาะสมในการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง โดยประเมินความมีชีวิตไม่แตกต่างกันกับที่ระดับความเข้มข้น 1.0% ทุกระดับความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง และสามารถลดค่าสารเคมีเหลือเพียง 35บาท/ตัวอย่าง จาก175 บาท/ตัวอย่าง

การทดลองที่ 6 การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium sporotrichiodes*, *Fusarium moniliforme* และ *Cephalosporium acremonium* ที่ปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดส่งออก

Development of Multiplex Polymerase Chain Reaction Technique for Detection of *Fusarium sporotrichiodes, Fusarium moniliforme* and *Cephalosporium acremonium* Contaminated in Exported Maize Seeds

ผู้วิจัย

นิภาภรณ์ พรรณรา	Nipapon Punnara	ศวม.เชียงใหม่
ภภัสสร วัฒนกุลภาคิน	Papassorn Wattanakulpakin	ศวม.พิษณุโลก
สุมนา จำปา	Sumana Jumpa	ศวม.เชียงใหม่
ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	Supalak Sattayasamitsathit	ศวม.พิษณุโลก
สนอง บัวเกตุ	Sanong Bougate	ศวม.พิษณุโลก

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium* และ *Fusarium sporotrichiodes* เป็นเชื้อสาเหตุโรคในข้าวโพดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและธัญพืชอื่นๆทั่วโลก โดยเชื้อ *Fusarium moniliforme* ซึ่งมีการผลิตสารพิษที่มีความเป็นพิษสูงต่อคนและสัตว์ที่บริโภคข้าวโพดหรือผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดที่ปนเปื้อนเชื้อหรือสารพิษจากเชื้อ นอกจากนี้เชื้อ *Cephalosporium acremonium* และ *Fusarium sporotrichiodes* เป็นเชื้อสาเหตุโรคในข้าวโพดส่งผลต่อผลผลิตข้าวโพดซึ่งนำไปสู่การสูญเสียทางเศรษฐกิจ ดังนั้นหลายๆประเทศจึงกำหนดเป็นเชื้อกักกัน อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่พบเชื้อ *Fusarium sporotrichiodes* แต่พบเชื้อกักกันชนิดอื่นคือ เชื้อ *Bipolaris maydis* ดังนั้น การพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยเชื้อกักกันทั้ง 3 สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย ให้มีความรวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำ เพื่อนำไปตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชเพื่อการส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจึงเป็นสิ่งจำเป็น และยังช่วยในระบบการจัดการเชื้อในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์อีกด้วย จากการพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อใช้ตรวจเชื้อกักกันทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าชุดไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium* และ *Bipolaris maydis* ได้แก่ Fum5-Fum6, F-R และ JB589-JB591 ตามลำดับ โดยไพรเมอร์ Fum5-Fum6 ถูกออกแบบจากบริเวณยีน polyketide synthase ส่วนไพรเมอร์ F-R และ JB589-JB591ออกแบบจากบริเวณ 18S rRNA gene ไพรเมอร์ที่ใช้ต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มขยายขนาดที่มีขนาดจำเพาะของแต่ละคู่เบสแต่ละเชื้อ 180 bp (*Cephalosporium acremonium*), 425 bp (*Fusarium moniliforme*) และ 346 bp (*Bipolaris maydis*) และเมื่อนำไปทดสอบความไวและความถูกต้องของวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดพบว่าสามารถตรวจได้ในระดับที่เมล็ดข้าวโพดติดเชื้อต่ำสุด 1%

Abstract

Fusarium moniliforme, Cephalosporium acremonium and *Fusarium sporotrichiodes* are economic important fungal pathogen of maize and other cereals worldwide. *Fusarium moniliforme* produce mycotoxin which are a potential health hazard for humans and animals that consume maize and maize products frequently. Maize diseases directly affect the production of corn, potentially leading to great economic losses. Therefore, many countries have quarantined maize seed that are infected with specific fungal pathogens. *Fusarium sporotrichiodes* not found in Thailand but we found *Bipolaris maydis* that is quarantined fungal pathogen. Therefore, in this study the development of polymerase chain reaction (PCR) detection methods to identify three quarantined fungal pathogen. The pathogen specific primer sets Fum5-Fum6, F-R and JB589-JB591 were tested for *Fusarium* -

moniliforme, *Cephalosporium acremonium* and *Bipolaris maydis*, respectively. The Fum5-Fum6 primer set was designed from polyketide synthase gene region; the F-R and JB589-JB591 were designed from 18S rRNA gene. The quarantine fungal pathogen primer pairs were amplified to specific number of base pairs in each of the following fungal pathogen: 180 bp (*Cephalosporium acremonium*), 425 bp (*Fusarium moniliforme*) and 346 bp (*Bipolaris maydis*). The detection limit for multiplex pcr primer sets was 1% of maize seed that are infected with specific fungal pathogens.

บทนำ (Introduction)

ประเทศไทยมีการส่งออกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ไปยังหลายประเทศทั่วโลกเพื่อเป็นเมล็ดพันธุ์และวัตถุดิบหลักที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชีย-แปซิฟิก ภูมิภาคอาเซียน และประเทศแถบเอเชียใต้ มีปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นจากปี 2555 และต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการส่งออกข้าวโพดเพื่อไปจำหน่ายยังต่างประเทศจะมีขั้นตอนการกักกันพืช และการปฏิบัติตามกฎระเบียบควบคุมการนำเขาหรือการสงออกเมล็ดพันธุ เพื่อควบคุมการเคลื่อนไหวของศัตรูพืชที่ติดมากับผลิตผลหรือเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ ซึ่งศัตรูพืชคือ แมลงและเชื้อโรค สำหรับเชื้อโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ส่วนใหญ่จะพบเชื้อราซึ่งเป็นเชื้อราที่มีอยู่ทั่วไปในโรงเก็บและเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคสามารถติดตอผานทางเมล็ดพันธุได้แมในอัตราต่ำและเชื้อราบางชนิดยังสามารถผลิตสารพิษ เช่น *Fusarium moniliforme* มีการผลิตสารพิษ (mycotoxins) ที่มีความเป็นพิษสูงต่อคนและสัตว์ (Moller *et al*., 1999) ดังนั้นเชื้อราชนิดนี้จึงจัดเปนเชื้อโรคที่อยูในรายชื่อสิ่งต้องห้ามในหลายๆ ประเทศผูนำเข้า และสงออกเมล็ดพันธุขาวโพดรวมถึงประเทศไทยตามพระราชบัญญัติกักพืชพ.ศ. 2507 แกไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 ซึ่งกำหนดให้ขาวโพดเปนพืชกำกัด ต้องมีใบปลอดโรคกอนที่จะสงออกหรือนำเขาจากต่างประเทศ โดยเชื้อ *Cephalosporium acremonium* ห้ามตรวจพบสำหรับการส่งออกไปประเทศศรีลังกา ส่วนเชื้อรา *Bipolaris maydis* ห้ามตรวจพบสำหรับการส่งออกไปประเทศบังคลาเทศและประเทศแซมเบีย หากประเทศปลายทางตรวจพบเชื้อราดังกล่าวจะปฏิเสธการรับซื้อหรือเผาทำลายเมล็ดพันธุ์ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจดังนั้น การนำเข้า ส่งออก ต้องมีวิธีการตรวจเชื้อที่มีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการตรวจสอบโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มีวิธีที่ใช้ตรวจสอบเชื้อรา คือ การตรวจสอบโดยเพาะเมล็ดพันธุ์บนกระดาษชื้น (Blotter method) ซึ่งเป็นวิธีที่เลียนแบบจากธรรมชาติ โดยเพาะเมล็ดพันธุ์ในที่ชื้น เมื่อเมล็ดงอกเชื้อโรคที่ติดมาก็เจริญตามออกมา เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบเฉพาะเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ ทำได้โดยวางเมล็ดพันธุ์ลงบนกระดาษกรอง ที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มในตู้เพาะที่อุณหภูมิ 28^0 ซ ภายใต้แสง NUV (near ultra violet ที่ความยาวคลื่น 365 nm) เป็นเวลา 7 วัน จึงนำมาตรวจดูเชื้อราภายใต้กล้องสเตอริโอ โดยใช้ลักษณะรูปร่างของเชื้อราที่พบเห็นทั้งลักษณะของเส้นใยเชื้อรา (hypha) ก้านชูสปอร์ (conidiophores) แตกกิ่งก้านหรือไม่แตกกิ่งก้าน สร้างผนังกั้น (septum) หรือไม่สร้างรูปร่างของสปอร์ (conidial shape/spore shape)

และจำนวนเซลล์ และโครงสร้างที่ให้กำเนิดสปอร์ (fruiting body) (Mathur and Kongsdal, 2003) ซึ่งตองอาศัยความรู้และประสบการณ์ในการตรวจสอบ นอกจากนี้ยังพบเชื้อราชนิดอื่นที่เจริญพร้อมกัน มีการสร้างเส้นใยปกคลุมบนเมล็ดข้าวโพดทำให้ยากต่อการตรวจสอบเชื้อ และต้องใช้เวลาในการเพาะเชื้อนานประมาณ 7 วัน ซึ่งมีความไม่เหมาะสมต่อวิธีการและต่อปริมาณตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ในจำนวนมาก ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นวิธีทางชีววิทยาในระดับโมเลกุลที่มีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูงให้ผลที่แม่นยำ เชื่อถือได้และรวดเร็ว สามารถทราบผลได้ในเวลา 1-2 วัน เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงจากเทคนิคพีซีอาร์พื้นฐานโดยทำให้สามารถเพิ่มขยายหลายๆ ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน ซึ่งสามารถนำมาตรวจสอบเชื้อมากกว่า 1 ชนิด ในการทำปฏิกิริยาหลอดเดียวกันเทคนิคนี้นิยมนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดส่งออก 3 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อ *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* พร้อมกันในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 1 ครั้ง ซึ่งเทคนิคนี้จะมีประสิทธิภาพสูง แม่นยำ และรวดเร็วในการตรวจสอบ

วิธีการตรวจสอบเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสันฐานวิทยา/โครงสร้างของเชื้อราเป็นวิธีที่ใช้กันมานานและยังคงถือเป็นวิธีมาตรฐานแต่วิธีการดังกล่าวยังมีความไม่เหมาะสมทั้งในเรื่องความถูกต้องและระยะเวลาในการตรวจสอบ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ขึ้นมากมายสำหรับการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ ทั้งน้ำ อาหาร ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม และสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์โดยมีรายงานการศึกษาไว้อย่างต่อเนื่อง (Frampton and Restaino, 1993) เทคนิคใหม่ ๆ ดังกล่าวมีประสิทธิภาพแตกต่างกันออกไปและมีความแตกต่างกันในรายละเอียดของวิธีการ ส่วนใหญ่จะเน้นในเรื่องของความสะดวกและรวดเร็วในการตรวจ โดยไม่พึ่งการเพาะเชื้อซึ่งอาศัยเวลานาน ทำให้ได้รับความสนใจมากเนื่องจากสามารถทราบผลได้เร็ว ตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละมากๆ และยังแก้ปัญหาในกรณีของเชื้อที่เจริญช้า เชื้อที่เพาะไม่ขึ้น หรือการที่เชื้อตายก่อนการตรวจสอบ ซึ่งเทคนิคที่น่าสนใจในการนำมาปรับใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างกว้างขวางและเป็นรูปธรรมได้มากยิ่งขึ้นกว่าเดิมเป็นเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ได้แก่ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจในตัวอย่างได้อย่างจำเพาะ แต่เทคนิคพีซีอาร์ทั่วไปสามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อครั้งละ 1 สายพันธุ์ ทำให้เสียเวลาและมีค่าใช้จ่ายสูง ในปัจจุบันเทคนิคพีซีอาร์ได้มีการพัฒนาตลอดเวลา ทำให้สามารถตรวจสอบเชื้อมากกว่า 1 ชนิด ในการทำปฏิกิริยาหลอดเดียวกัน เรียกว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) ซึ่งเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์จะใช้ไพรเมอร์มากกว่า 2 คู่ ขึ้นไปในการทำปฏิกิริยาพร้อมๆ กัน โดยไพรเมอร์แต่ละคู่จะได้รับการออกแบบให้จำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายแต่ละตัวและต้องไม่มีเบสคู่สมกลับมาจับกันเอง เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มีความรวดเร็วในการตรวจสอบใช้เวลาเพียง 1 วันก็สามารถทราบผล (Markoulatos *et al*., 2002) แต่ปัญหาที่มักเกิดขึ้นบ่อยในการทำพีซีอาร์ คือ ไม่ได้ผลผลิตพีซีอาร์

หรือได้ในปริมาณต่ำ หรือได้แบบไม่จำเพาะ เกิดขึ้นซึ่งมักเกิดจากความไม่คุณลักษณะของไพร์เมอร์ที่ออกแบบ และสภาวะในการเพิ่มปริมาณจากความผิดพลาดของไพรเมอร์ การเกิดไพรเมอร์-ไดเมอร์ เป็นต้น การลดหรือการกำจัดปัญหาที่เกิดดังกล่าวทำได้โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมหลายๆ องค์ประกอบรวมทั้งการใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะสูงเพื่อให้ได้ผลิตผลจากปฏิกริยาพีซีอาร์เป็นตามที่ต้องการ

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์: เครื่องพีซีอาร์, เครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอ, เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า, เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง, อ่างทำน้ำร้อน, โกร่งบดยา, หลอดปั่นแยกตะกอนขนาด 1.5 มิลลิลิตร, ปิเปตดูดสารปรับปริมาตรได้ขนาด 1-1000 ไมโครลิตร

สารเคมี: Tris-base, Glycine, Boric acid, Loading dye, DNA ladder, SYBR®safe, 2-Mercaptoethanol, Cetyltrimethylamonium bromide, Chloroform, Isoamyl alcohol, Absolute ethanol, Ammonium acetate, Ethylene diamine tetraacetate, Master Mix 2X (Gene direct), 2X Master/MultiMAX PCR Kit (intron), ไพรเมอร์สังเคราะห์จาก Bio Basic Inc.

เชื้อที่ใช้ในการทดลอง: เชื้อรา *Bipolaris maydis, Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium*, *Aspergillus niger, Aspergillus flavus* และ *Penicillium sp.*

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

นำเชื้อรา *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* ที่แยกมาจากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยดูลักษณะเส้นใย รูปร่างสปอร์ ลักษณะก้านชูสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่างๆ

2. การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อราและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเปนเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญเก็บเกี่ยวเสนใยใสในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ลางเสนใยด้วยสารละลาย EDTA ความเขมขน 0.5 M และบดใหเปนผงละเอียดดวยไนโตรเจนเหลว นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยการใชชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) นำตัวอยางดีเอ็นเอที่สกัดไดมาตรวจสอบความเขมขนและความบริสุทธิ์ดวยเครื่องวัดปริมาณความเขมขนสารปริมาณนอยโดยแรงตึงผิว (nanodrop) ที่ใชปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร/ตัวอยาง/ครั้ง โดยทำการวัดที่คาการดูดซับแสง (Absorbance) ที่ความยาวชวงแสง 260 นาโนเมตร (A260) ซึ่งหนวยความเขมขนของดีเอ็นเอที่วัดไดคือ นาโนกรัม/ไมโครลิตร สวนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดไดจะดูจากสัดสวนการดูดซับแสงของตัวอยางที่ความยาวชวงแสง 260 นาโนเมตร (A260) และ 280 นาโน

เมตร (A280) ซึ่งหากดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูง ควรมีคาเทากับ 1.8 (A260/A280 = 1.8) หากคาสัดสวนที่ไดมีคานอย กว่า 1.8 แสดงวาผลผลิตดีเอ็นเอที่ไดมีการปนเปอนจากโปรตีน หรือสารเคมีอื่นๆ นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีสโดยใช้ ในอะกาโรส 1 เปอรเซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ที่ 80 Volt เป็นเวลา 30 นาที ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสีย้อม SYBR safe โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Molecular weight Marker) ตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต บันทึกผลด้วยการถ่ายภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอ

3. การหายีนเป้าหมายและออกแบบไพรเมอร์

การหายีนเป้าหมายที่มีความจำเพาะต่อเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของของเชื้อรา การออกแบบ primer ใช้โปรแกรม Primer3 โดย Primer sequence ที่ถูกเลือกนำมาใช้เหล่านี้ได้ผ่านการตรวจสอบความจำเพาะโดยใช้โปรแกรม Blast ของ NCBI

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดโดยวิธีพีซีอาร์

เตรียม PCR reaction mixture โดยปรับพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ ปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ความเข้มข้นของ primer ปริมาณของ Taq DNA polymerase จากนั้นนำใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler ตั้งอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบให้เหมาะสมตามชนิดของเชื้อ

5. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

ทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 2 วิธี คือ ใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ต่อดีเอ็นเอต้นแบบจากเชื้อหลายชนิดผสมกัน และใช้ไพรเมอร์ผสมต่อดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ชนิด ร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อราชนิดอื่นอีก 2 ชนิด คือ *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* จากนั้นนำมาทำพีซีอาร์ตามสภาวะที่เหมาะสม

6. การทดสอบความไวของวิธีพีซีอาร์

ทำการทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อมาเจือจางที่ความเข้มข้น 100 ng, 10 ng, 5 ng, 2.5 ng, 100 pg, 50 pg และ 10 pg จากนั้นนำมาทำพีซีอาร์ตามสภาวะที่เหมาะสม

7. การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มขยายไปหาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อราที่ต้องการ

8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

โดยการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ความเข้มข้นของ primer อุณหภูมิ annealing, extension time, ปริมาณของ Taq DNA polymerase และจำนวนรอบที่ใช้ในปฏิกิริยา

9. การทดสอบความไวและความถูกต้องของวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด

นำเมล็ดข้าวโพดมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที และตากทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นแบ่งเมล็ดข้าวโพดมาจำนวนหนึ่ง จุ่มในสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา

Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis และ *Cephalosporium acremonium* ที่มีความเข้มข้นของแต่ละเชื้อ $2x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเมล็ดมาตากไว้ให้แห้งบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อภายในอุณหภูมิห้อง ตรวจสอบประสิทธิภาพการปลูกเชื้อในเมล็ดข้าวโพดโดยการหยิบเมล็ดที่ปลูกเชื้อแล้วด้วยปากคีบที่สะอาดวางบนกระดาษชื้น (blotter method) ที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ วาง 20 เมล็ดต่อจาน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง NUV ที่ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวันหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน นำเมล็ดมาตรวจดูภายใต้กล้อง stereo microscope คัดเลือกเมล็ดที่ติดเชื้อมาปะปนกับเมล็ดปกติ โดยใน 100 เมล็ดให้มีเมล็ดที่ติดเชื้อ 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 เมล็ด ทำการสกัดดีเอ็นเอและนำไปเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยใช้วิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในสภาวะที่เหมาะสมตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีสโดยใช้ ในอะกาโรส 1 เปอรเซ็นต์ใน 1X TBE buffer ที่ 80 Volt เป็นเวลา 30 นาที ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสีย้อม SYBR safe โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Molecular weight Marker) ตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต บันทึกผลด้วยการถ่ายภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอ

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561 รวม 2 ปี

สถานที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

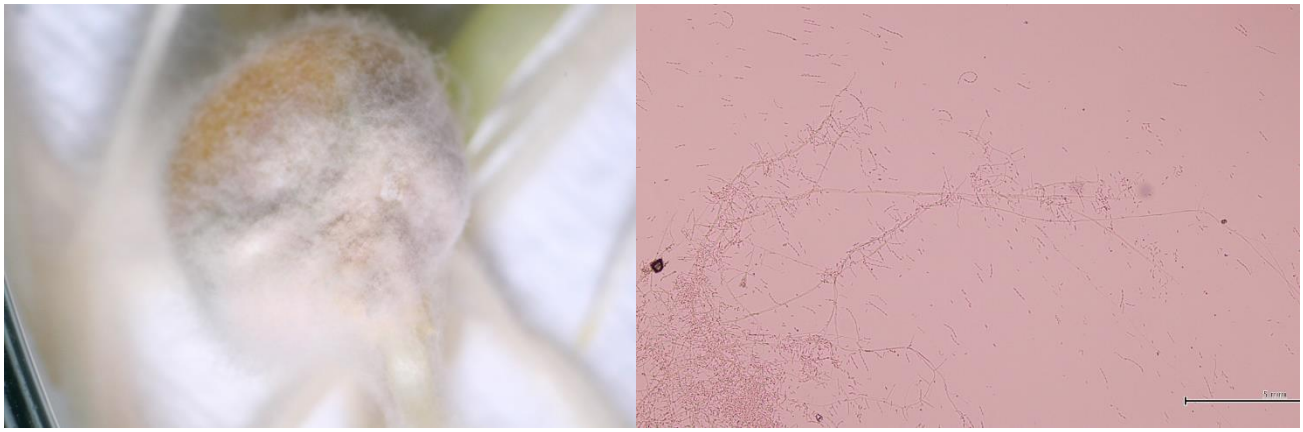
ผลการวิจัย (Results) และอภิปรายผล (Discussion)

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

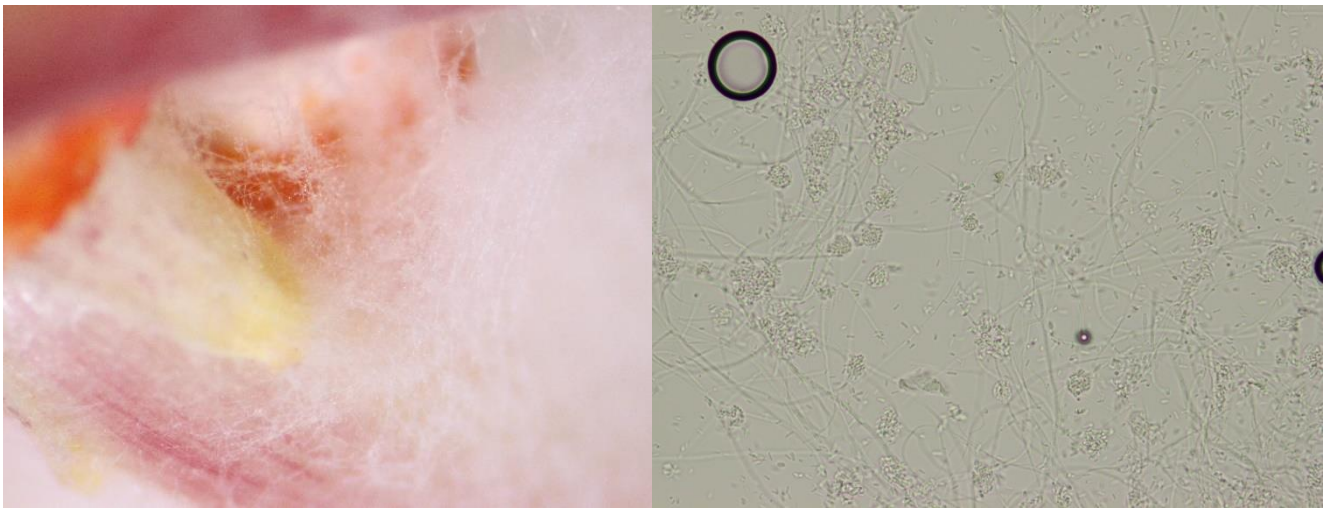
เชื้อรา *Fusarium moniliforme* เส้นใย มีผนังกั้น สีขาวอมชมพู ก้านชูสปอร์ ตั้งตรงจะพบอยู่แบบเดี่ยวๆ สีขาวอมชมพูพบโคนิเดียที่ส่วนปลายสปอร์ แบบแรกเรียกว่า มาโครโคนิเดียมมีขนาดใหญ่ รูปร่างยาวตรง โค้งแหลมเรียวที่ปลาย มีผนังกั้น 4-6 เซลล์ แบบที่สองเรียกว่าไมโครโคนิเดียมมีขนาดเล็กรูปร่างคล้ายกระบอก (clavate) มี 1-2 เซลล์ สร้างเป็นเส้นสายต่อกันเป็นลูกโซ่จำนวนมากบนแขนงเส้นใยเชื้อรา ลักษณะเชื้อราที่ตรวจพบบนเมล็ดพันธุ์ เชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวฟูสปอร์ขนาดเล็กสร้างเป็นเส้นสายยาวคล้ายลูกโซ่กระจายตัวบนผิวเมล็ด (ภาพที่ 1)

เชื้อรา *Cephalosporium acremonium* เป็นเชื้อราชนิดที่มีผนังกั้น ไม่มีสีเส้นใยมีสีขาวอาจมีสีชมพูหรือสีเหลือง ลักษณะจำเพาะของเชื้อคือ ก้านชูยาว เรียว (delicate) คล้ายเส้นผม (hair-in appearance) โคนิเดียมีเซลล์เดียว รูปรี (elliptical) หรือรูปไข่อยู่เป็นกลุ่ม (irregular cluaters) ที่ปลายก้านชู ลักษณะเชื้อราที่ตรวจพบบนเมล็ดพันธุ์ เชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว สปอร์ขนาดเล็กสร้างจับตัวเป็นหยดน้ำ (ภาพที่ 2)

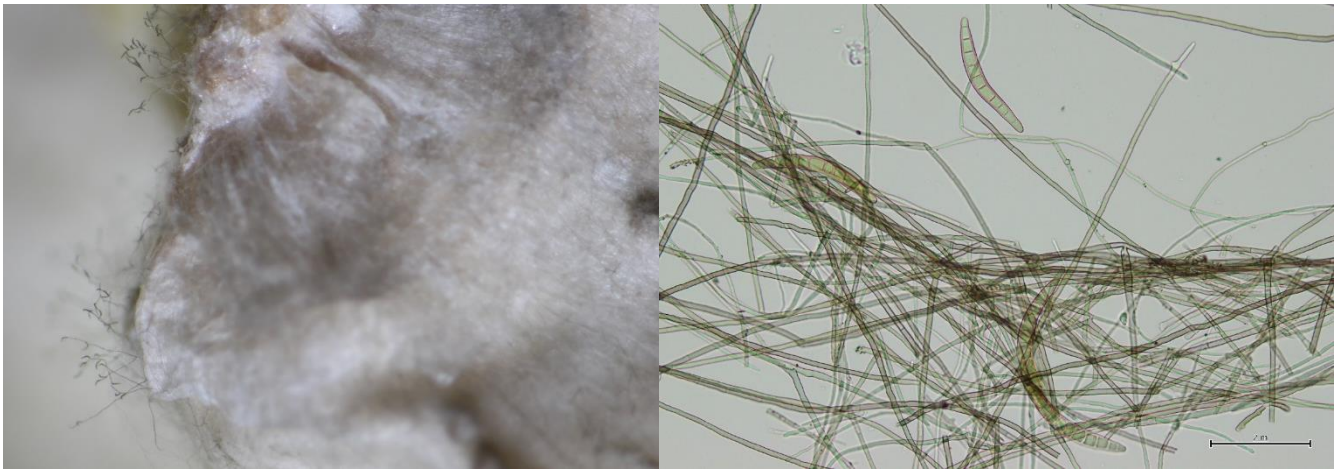
เชื้อรา *Bipolaris maydis* เชื้อมีสปอร์ยาวโค้ง ปลายเรียวมน ไม่มี hilum เส้นใยสีเขียวมะกอก (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 1 ลักษณะเชื้อรา *Fusarium moniliforme* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดและโครงสร้างไมโครโคนิเดีย



ภาพที่ 2 ลักษณะเชื้อรา *Cephalosporium acremonium* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดและโครงสร้างโคนิเดีย



ภาพที่ 3 ลักษณะเชื้อรา *Bipolaris maydis* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดและโครงสร้างโคนิเดีย

2. การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Bipolaris maydis, Fusarium moniliforme, Cephalosporium acremonium, Aspergillus niger, Aspergillus flavus และ Penicillium sp.* ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป พบว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูงมีคาเทากับ 1.8 (A260/A280 = 1.8) โดยเชื้อ *Fusarium moniliforme* มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 19.8 ng/µl ขณะที่เชื้อ *Cephalosporium acremonium* มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 23.5 ng/µl ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้จากทั้งสองเชื้อมีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ดีเอ็นเอที่สกัดได้ยังมีปริมาณไม่มากเนื่องจากขั้นตอนสกัดไม่ได้มีการใช้ไนโตรเจนเหลว อาจจะทำให้การย่อยผนังเซลล์เชื้อราไม่สมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ สามารถนำไปใช้ต่อในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณด้วยพีซีอาร์ต่อไป

3. การหายีนเป้าหมายและออกแบบไพรเมอร์

จากการหายีนเป้าหมายที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Primer3 โดยเชื้อ *Fusarium moniliforme* ได้ยีนเป้าหมายคือ polyketide synthase, *gao*B และบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) region และเชื้อ *Bipolaris maydis* และเชื้อ *Cephalosporium acremonium* ได้ยีนเป้าหมายคือ 18S rRNA สำหรับนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต่อไป ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ได้แต่ละชนิดแสดงดังในตารางที่ 1 ซึ่งปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ได้แก่ ความยาวของไพรเมอร์ ซึ่งโดยทั่วไปควรจะอยู่ในช่วง 18-22 เบส ค่าอุณหภูมิการหลอม (Tm) ของไพรเมอร์ควรจะมีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนักเนื่องจากต้องใช้ทำปฏิกริยาไปพร้อมกันของแต่ละคู่ไพรเมอร์ ควรอยู่ในช่วง 55°C-60°C ความแตกต่างของค่า Tm ของแต่ละไพรเมอร์ไม่ควรเกิน 3°-5° C ความจำเพาะของไพรเมอร์เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาในการออกแบบไพรเมอร์ต่อลำดับเบสของบริเวณเป้าหมาย เนื่องจากใน

การเตรียมมัลติเพล็กซ์จะมีองค์ประกอบที่เกิดการแข่งขันกันจับได้หลายบริเวณอยู่ในหลอดเดียวกัน และปัจจัยสุดท้ายคือหลีกเลี่ยงการเกิดไพรเมอร์ไดเมอร์ คือ ไพรเมอร์เกิดการจับกันเองซึ่งสามารถตรวจสอบได้ในขณะที่ทำการออกแบบ ซึ่งในการทำมัลติเพล็กซ์มีไพรเมอร์ที่เติมลงไปหลายคู่จึงมีโอกาสเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะได้

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายในเชื้อราแต่ละชนิด

เชื้อราเป้าหมาย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5′⟶3′)	ยีนเป้าหมาย	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย(bp)
Fusarium moniliforme	Fum1F: GAG GCC CGA GCG AGC ACT GG Fum4R: CCA GCC GCG GAA ATT AGG GAT GTG	polyketide synthase	1456
	Fum5F: GTC CTA CGC GAT ACA TCC CAC CAC AAT Fum6R: GAT CAA GCT CGG GGC CGT CGT TCA TAG	polyketide synthase	419
	Fum5F: GTC CTA CGC GAT ACA TCC CAC CAC AAT Fum4R: CCA GCC GCG GAA ATT AGG GAT GTG	polyketide synthase	534
	Fum1F: CGA GGC CCG AGC GAG CAC TGG Fum6R: GAT CAA GCT CGG GGC CGT CGT TCA TAG	polyketide synthase	1340
	FUM1F: CCATCACAGTGGGACACAGT FUM1R: CGTATCGTCAGCATGATGTAGC ITS F: AACTCCCAAACCCCTGTGAACATA, ITS R: TTTAACGGCGTGGCCGC	polyketide synthase internal transcribed spacer (ITS) region	183 431
	FV-F2: CACTGGTGGTAACGATGCG FV-R: CACCCTGAGTGCCCTTGGTG	*gao*B	370
Fusarium sporotrichiodes	Fspor F1: CGCACAACGCAAACTCATC LanspoR1: TACAAGAAGACGTGGCGATAT	tri5 gene	641
Cephalosporium acremonium	nu-SSU-F: AAGGCATGGAATAATAATAGGA nu-SSU-R: TTGCAAT GCCT ATCC CCAGGA ARS-F: TCCTCCTAAACCTCATGCATTT ARS-R: ACGCAAAAACAGCCAAAGAC pyr4-F: TCTTTGAGGACCGCAAGTTT pyr4-R: GTCCTCGTCATCATCGTCCT IPS-F: GGTCGCTCTTCTGATTTTCG	18S rRNA gene	285

	IPS-R: GTTCACCGCGTAAAAGAAGC cds-F: GCTTTTGCTGATGCCTTAAAA cds-R: GCACTTCATCCTGCAAGTAAAA 18S-F: GGAACCCCATACCCTTCACT 18S-R: GGCGGTCCTATAAACCAACA 5.8S-F: AGCGTCATTTCAACCCTCAG 5.8S-R: CCTACCTGATCCGAGGTCAA pks1-F: CCGATACTTTCTGCCAGCTC pks1-R: GAGGCCTGCTTATTCACAGC F: CTAGGCTCTCCAACCCATTG R: AGCCAAGAGATCCGTTGTTG FMR 8303-F: CCTGTCTGAGCGTCATTTCA FMR 8303-R: CAGCGGGTATTCCTACCTGA		
Bipolaris maydis	JB589F: CCT TTT TTT TAT GCA GTT GCA JB591R: CTC CTG ATA CAG AGT GCA AAA	18S rRNA gene	346
	JB589F: CCT TTT TTT TAT GCA GTT GCA JB596R: GAG GTC AAA AGT TAA AAA TCG TAA	18S rRNA gene	397
	JB587F: CAG TTG CAA TCA GCG TCA GTA JB596R: GAG GTC AAA AGT TAA AAA TCG TAA	18S rRNA gene	331
	JB587F: CAG TTG CAA TCA GCG TCA GTA JB591R: CTC CTG ATA CAG AGT GCA AAA	18S rRNA gene	333

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยทำการทดสอบไพรเมอร์ทั้งหมด 24 คู่ โดยใช้น้ำยา PCR master mix (One PCR) ยี่ห้อ Genedirect® โดยมีองค์ประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อดังนี้

PCR reaction mixture	ปริมาตรที่เติม (ไมโครลิตร)
Template DNA	0.5
Forward Primer	0.5
Reverse Primer	0.5
Master Mix (One PCR)	
Distilled Water	Up to 25
Total reaction volume	25

และสภาวะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

PCR Steps		อุณหภูมิ	เวลา
Initial denature		93°C	7 นาที
35 รอบ	Denaturation	93°C	30 วินาที
	Annealing	60°C	1 นาที
	Extention	72°C	3 นาที
Final extension		72°C	7 นาที

พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis, Cephalosporium acremonium, Aspergillus niger, Aspergillus flavus* และ *Penicillium sp.* ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน และบางไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ และมีการเกิดไพรเมอร์ ไดเมอร์ สรุปดังแสดงในตารางที่ 2 เนื่องจากการเพิ่มขยายดีเอ็นเอใช้สภาวะเดียวกันทั้งหมดซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมต่อบางคู่ไพรเมอร์และอย่างไรก็ตามในขั้นตอนนี้จะทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis, Cephalosporium acremonium* ในสภาวะเดียวกันเพื่อนำไปสู่ขั้นตอนการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ และสามารถคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ Fum5-Fum6 สำหรับเชื้อ *Fusarium moniliforme* คู่ไพรเมอร์ JB589-JB591 สำหรับเชื้อ *Bipolaris maydis* และคู่ไพรเมอร์ F-R *Cephalosporium acremonium* เนื่องจากให้ขนาดที่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 2 การทดสอบไพรเมอร์ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis, Cephalosporium acremonium, Aspergillus niger, Aspergillus flavus และ Penicillium sp.*

Primer/Fungi	*Fusarium moniliforme*	*Bipolaris maydis*	*Cephalosporium acremonium*	*Aspergillus niger*	*Aspergillus flavus*	*Penicillium* sp.
Fum 1-4	+	-	-	-	-	-
Fum 5-6	+	-	-	-	-	-
Fum 5-4	+	-	-	-	-	-
Fum 1-6	+	-	-	-	-	-
FUM1	+	-	-	-	-	-
ITS F-R	+	+	+	-	-	-
FV F2-R	+	-	-	+	-	-
Fverti-FR	+	-	-	+	-	-

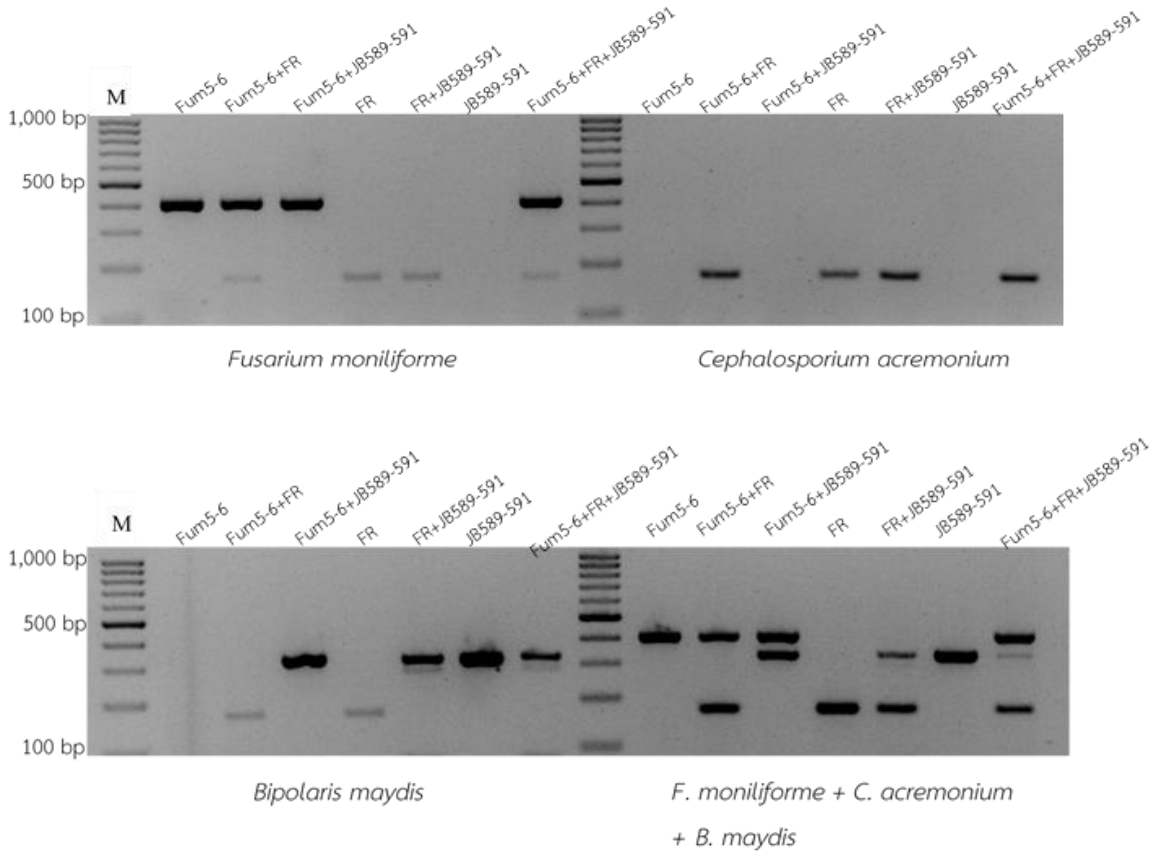
53-6FR	+	+	+	+	+	+
Acr_str_AcS351-Acr_str_AcS391	-	-	+	-	-	-
LrDNAF63-LR3	-	-		+	+	-
Cep F1-R2	+	-	+	+	-	-
Cep F3-R4	+	-	+	+	+	-
Cep F5-R6	+	-	+	-	-	-
18S	+	+	+	+	+	+
FR	-	-	+	-	-	-
FHK	+	-	+	-	-	-
5.8S	+	-	+	-	-	-
IPS	-	-	+	-	-	-
JB589-591	-	+	-	-	-	-
JB589-596	-	+	-	-	-	-
JB587-596	-	+	-	-	-	-
ITS1-4	+	+	+	+	+	+

+ = เพิ่มขยายดีเอ็นเอได้

- = ไม่สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอได้

5. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

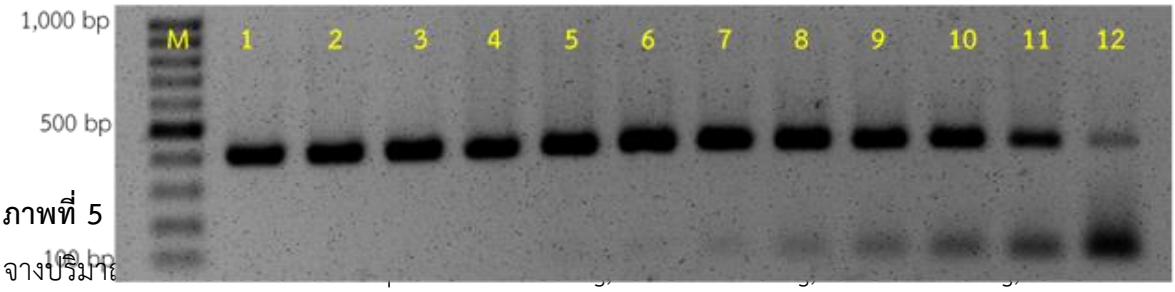
จากไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือกได้จากขั้นตอนข้างต้น จึงทำมาทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ โดยทดสอบกับไพรเมอร์ 1 คู่ ไพรเมอร์ผสม 2 คู่ และไพรเมอร์ผสม 3 คู่ กับดีเอ็นเอของเชื้อรา 1 สายพันธุ์ และดีเอ็นเอของเชื้อราผสม 3 สายพันธุ์เพื่อดูความจำเพาะ โดยใช้สภาวะการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเหมือนกัน พบว่าไพรเมอร์ Fum5-6 สามารถเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอเฉพาะเชื้อ *Fusarium moniliforme* เมื่อในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีไพรเมอร์ 1, 2 และ 3 คู่ โดยให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 425 bp เช่นเดียวกับไพรเมอร์ JB589-591 สามารถเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอของเชื้อ *Bipolaris maydis* ได้เท่านั้น เมื่อในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีไพรเมอร์ 1, 2 และ 3 คู่ โดยให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 346 bp ส่วนไพรเมอร์ FR ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดสำหรับเชื้อ *Cephalosporium acremonium* โดยให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 180 bp (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Fusarium moniliforme, Cephalosporium acremonium, Bipolaris maydis* และเชื้อผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ต่อความจำเพาะของไพรเมอร์

6. การทดสอบความไวของวิธีพีซีอาร์

จากการทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อรา *Fusarium moniliforme* โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อราเป้าหมายมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำมาทำพีซีอาร์ตามสภาวะที่เหมาะสม พบว่าไพรเมอร์ Fum5-6 มีความสามารถในการตรวจเชื้อได้ในระดับต่ำสุดของปริมาณเชื้อที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 39.06 pg ซึ่งยังให้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจน แต่เมื่อดีเอ็นเอลดลงเหลือ 19.53 pg พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีความเลือนลางแต่แถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์เห็นชัดเจนดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5

จางปริมาณ

= 5 ng; lane 5 = 2.5 ng; lane 6 = 1.25 ng; lane 7 = 625 pg; lane 8 = 312.5 pg; lane 9 = 156.25 pg; lane 10 = 78.125 pg; lane 11 = 39.06 pg; lane 12 = 19.53 pg

7. การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส

การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส จากการนำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มขยายด้วยไพรเมอร์ Fum 1-4 ไปหาลำดับเบส พบมีความเหมือนกับเชื้อรา *Fusarium moniliforme* (syn. *Gibberella moniliformis*) ถึง 99% และในการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสที่ผ่านการเพิ่มขยายด้วยไพรเมอร์ Fum 5-6 ไปหาลำดับเบสพบว่า มีความเหมือนกับเชื้อรา *Fusarium moniliforme* (syn. *Gibberella moniliformis*) ถึง 99% การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสจากการนำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มขยายด้วยไพรเมอร์ FR ไปหาลำดับเบสพบว่าเป็นเชื้อรา *Cephalosporium acremonium* (syn. *Acremonium strictum*) ส่วนไพรเมอร์ JB 589-591 ไปหาลำดับเบส พบมีความเหมือนกับเชื้อรา *Bipolaris maydis* ถึง 99% เช่นเดียวกัน

Gibberella moniliformis polyketide synthase (PKS11) gene, partial cds

Sequence ID: AY495601.1Length: 8298Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 3760 to 4754GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1757 bits(951)	0.0	982/995(99%)	10/995(1%)	Plus/Plus

```
Query  4     GTGCTTGTCG--ATTGGCCCTCACAGCGCATTATCTGGACCACTCCGTCAAATCTTCAAG  61
             ||| ||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3760  GTGTTTGTCGAAATTGGCCCTCACAGCGCATTATCTGGACCACTCCGTCAAATCTTCAAG  3819

Query  62    GCTCATGGCAGGGGTAAAGAAGCCTATGTCTCAGCTATGATTCGTGGCGAAGACTGCACT  121
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3820  GCTCATGGCAGGGGTAAAGAAGCCTATGTCTCAGCTATGATTCGTGGCGAAGACTGCACT  3879

Query  122   GAGTCGTTGCTCAAGCTTGCTGGTGAGCTATTCTGCCATGGGACATCACTCCAGTTGTCA  181
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3880  GAGTCGTTGCTCAAGCTTGCTGGTGAGCTATTCTGCCATGGGACATCACTCCAGTTGTCA  3939
```

```
Query  182   AATGTCACTGCCGACGGTGATGTTGTAGTCGACTTGCCCCCTTATCCATGGAACCATGAC  241
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3940  AATGTCACTGCCGACGGTGATGTTGTAGTCGACTTGCCCCCTTATCCATGGAACCATGAC  3999

Query  242   CGAGAATATTGGTCTGAGAGCCGAGTCAGCAAGGATTGGAGATTCCGCAAATTCCCCAAC  301
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4000  CGAGAATATTGGTCTGAGAGCCGAGTCAGCAAGGATTGGAGATTCCGCAAATTCCCCAAC  4059

Query  302   CATGAGCTCCTTGGCTCACGAACCCTTGAAAGCAGCAGTCTACAACCTGAGTGGCGCAAT  361
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4060  CATGAGCTCCTTGGCTCACGAACCCTTGAAAGCAGCAGTCTACAACCTGAGTGGCGCAAT  4119

Query  362   TTGATCAGGCTTGATGGGATTCCGTGGCTCCGAGATCACCAGGTCCTCAATGACGTTGTC  421
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4120  TTGATCAGGCTTGATGGGATTCCGTGGCTCCGAGATCACCAGGTCCTCAATGACGTTGTC  4179

Query  422   TTTCCTTGCGCGGGCTACCTAGCGATGGCGGTGGAAGCGGTCCGACAGGTAGCTGGCACA  481
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4180  TTTCCTTGCGCGGGCTACCTAGCGATGGCGGTGGAAGCGGTCCGACAGGTAGCTGGCACA  4239

Query  482   TCTGAAATAGGAGGCTTCACTCTGAAAAGTGTTGTCGTCCAGTCTGCTCTGGTTCTGACC  541
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4240  TCTGAAATAGGAGGCTTCACTCTGAAAAGTGTTGTCGTCCAGTCTGCTCTGGTTCTGACC  4299

Query  542   GAATCGAAACCGGTGGAAGTACTTACAAGTCTAAGACCAGTTAGGTTAACCAACACTCTG  601
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  4300  GAATCGAAACCGGTGGAAGTACTTACAAGTCTAAGACCAGTCAGGTTAACCAACACTCTG  4359

Query  602   GACTCGGCTTGGTGGGAATTCTCCATCGTAGCACACAATGGCACCAGCTGGATCAAGCAC  661
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4360  GACTCGGCTTGGTGGGAATTCTCCATCGTAGCACACAATGGCACCAGCTGGATCAAGCAC  4419

Query  662   TGCGAGGGACAGGTCAGGCCAGGCCAGGATGCTCATCAGAAAACGGCCGTCTTGCCGCAA  721
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4420  TGCGAGGGACAGGTCAGGCCAGGCCAGGATGCTCATCAGAAAACGGCCGTCTTGCCGCAA  4479

Query  722   AGCGAGCCCATCAGCCAACACTACCCCCGCCTCGTGGACAATTTGTATCCTGAGCTTCTG  781
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4480  AGCGAGCCCATCAGCCAACACTACCCCCGCCTCGTGGACAATTTGTATCCTGAGCTTCTG  4539
```

```
Query  782   AGAATCGGCTTACGATATGGGCCCTCTTTCCGTGGTCTGGACAATGTCTCGTGTGTGCCA  841
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4540  AGAATCGGCTTACGATATGGGCCCTCTTTCCGTGGTCTGGACAATGTCTCGTGTGTGCCA  4599

Query  842   AATGGCAAGAAGGCCGCCGCAATGCTACGCGAAACAACAGTATCTGAGTCGTCCTACGCG  901
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4600  AATGGCAAGAAGGCCGCCGCAATGCTACGCGAAACAACAGTATCTGAGTCGTCCTACGCG  4659

Query  902   ATACATCCCACCACA-TCGAC-ACTGC-TC-AGCTG--TTTCCCTGCTAGCTGCGACG-A  954
             ||||||||||||||| ||||| ||||| || |||||  ||||||||||||||||||| |
Sbjct  4660  ATACATCCCACCACAATCGACCACTGCCTCCAGCTGTTTTTCCCTGCTAGCTGCGACGGA  4719

Query  955   GCA-TCTACAGAGTCGAGAAGCTGTGCGTTCCCAC  988
             ||| ||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  4720  GCATTCTACAGAGCCGAGAAGCTGTGCGTTCCCAC  4754
```

Acremonium strictum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), clone (53)33

Sequence ID: AM161135.1Length: 537Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 73 to 347GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
497 bits(269)	6e-137	274/276(99%)	2/276(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    AGCGCGCGGTGCCTCCGGGCTCCGGGCGTCCGCCGGGGACAACCAAACCCTGATTTTATC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  73   AGCGCGCGGTGCCTCCGGGCTCCGGGCGTCCGCCGGGGACAACCAAACCCTGATTTTATC  132

Query  61   GTGTATCTCTGAGGGGCGAAAGCCCGAAAACAAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGAT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133  GTGTATCTCTGAGGGGCGAAAGCCCGAAAACAAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGAT  192

Query  121  CTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193  CTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  252

Query  181  AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCGGCACTCCGGCGGGCA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253  AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCGGCACTCCGGCGGGCA  312

Query  241  TGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAGG-CCC  275
            |||||||||||||||||||||||||| ||||| |||
Sbjct  313  TGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCC-TCAGGGCCC  347
```

Bipolaris maydis MWIT1 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence
Sequence ID: LC326252.1Length: 560Number of Matches: 1
Range 1: 171 to 470GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
547 bits(296)	7e-152	299/300(99%)	1/300(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TGT-ATTATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG  59
            ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  171  TGTAATTATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG  230

Query  60   CGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA  119
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  231  CGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA  290

Query  120  CATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAG  179
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  291  CATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAG  350

Query  180  CTTTGCTTGGTGTTGGGCGTTTTTGTCTCCCTCTTTGCTGGGAGACTCGCCTTAAAACGA  239
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  351  CTTTGCTTGGTGTTGGGCGTTTTTGTCTCCCTCTTTGCTGGGAGACTCGCCTTAAAACGA  410

Query  240  TTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATATTTTGCACTCTGTATCAGGAGA  299
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  411  TTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATATTTTGCACTCTGTATCAGGAGA  470
```

8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงจากเทคนิคพีซีอาร์พื้นฐานโดยทำให้สามารถเพิ่มขยายหลายๆ ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน ไพรเมอร์แต่ละคู่ต้องออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เป็นคู่สม (Complementary) กันและให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีขนาดความยาวแตกต่างกัน เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ผลผลิตเหล่านั้นโดยวิธี agarose gel electrophoresis ได้ ซึ่งข้อสำคัญสำหรับเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ คือ ต้องปรับหาสภาวะพอเหมาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ให้สามารถเพิ่มขยายทุกๆดีเอ็นเอเป้าหมาย ได้ประสิทธิภาพดีเท่าเทียมกันซึ่งนับว่าเป็นข้อจำกัดของเทคนิคนี้ เนื่องจากมีหลายองค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีความสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเข้มข้นแมกนีเซียม (วัชรี, 2536)

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อรา *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium* และ *Bipolaris maydis* พบว่าการใช้น้ำยาพีซีอาร์ MultiMax PCR Solution สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ได้ซึ่งในปฏิกริยามีองค์ประกอบดังนี้

PCR reaction mixture	**ปริมาตรที่เติม (ไมโครลิตร)**
Template DNA	1
Primer mix (final conc. 3μM each)	2
2X Master/MultiMax PCR Solution	10
Distilled Water	Up to 20
Total reaction volume	20

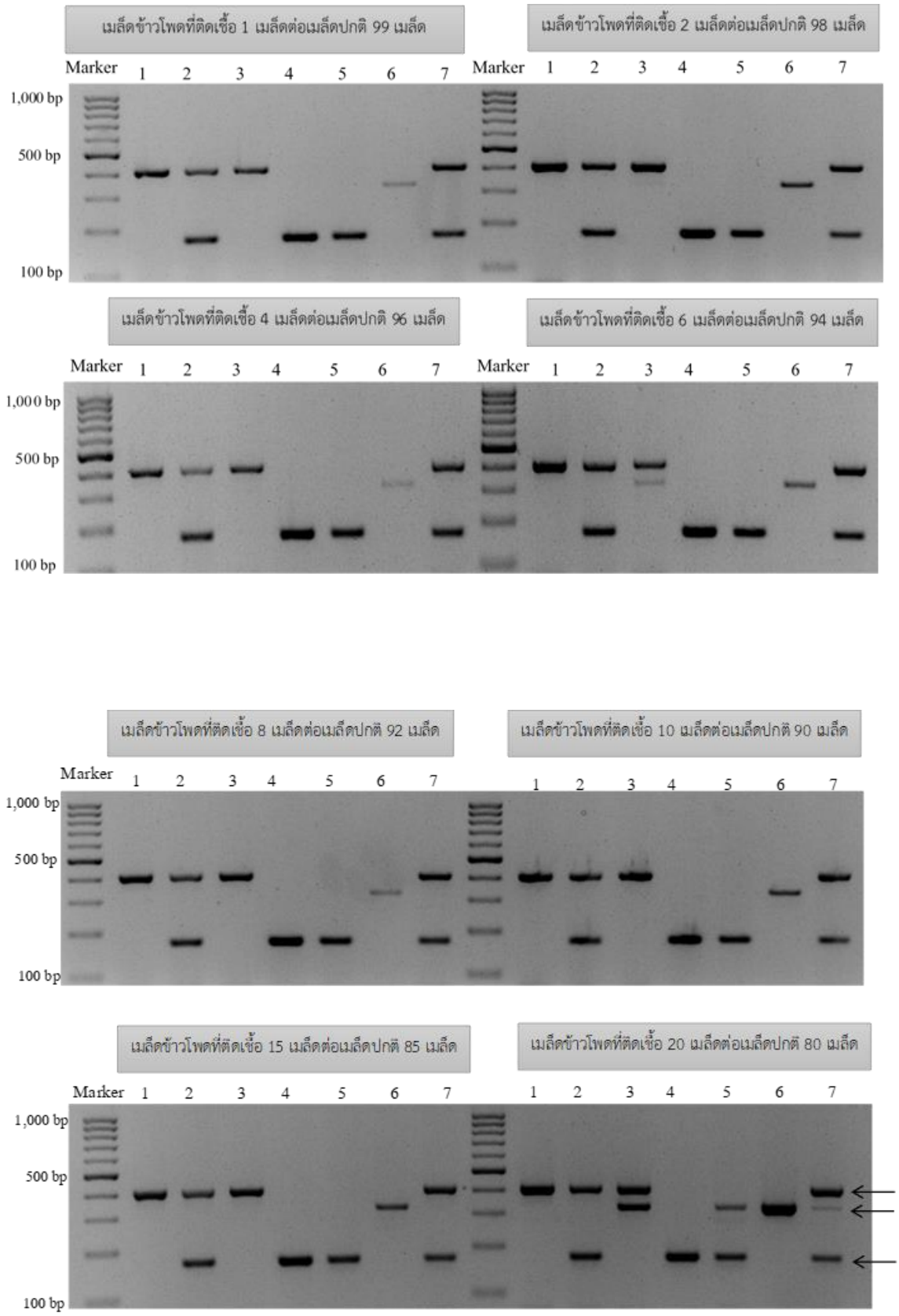
และกำหนดสภาวะของการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ดังนี้

PCR Steps		**อุณหภูมิ**	**เวลา**
Initial denature		95°C	5 นาที
35 รอบ	Denaturation	95°C	20 วินาที
	Annealing	60°C	1 นาที
	Extention	72°C	1 นาที
Final extension		72°C	5 นาที

9. การทดสอบความไวและความถูกต้องของวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด

ในการศึกษาความไวของมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์นั้นเทียบได้กับ PCR ชุดเดียว เนื่องจากไพรเมอร์แต่ละคู่ต้องการอุณหภูมิและระยะเวลาในการหลอมที่แตกต่างกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการกำหนดอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม จากการนำเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดมาจุ่มในสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium moniliforme*, *Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* และคัดเลือกเมล็ดที่ติดเชื้อมาปะปนกับเมล็ดปกติ โดยใน 100 เมล็ดให้มีเมล็ดที่ติดเชื้อในระดับต่างๆ กัน ทำการสกัดดีเอ็นเอและนำไปเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยทดสอบไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้และเปรียบเทียบกับมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าในระดับที่เมล็ดข้าวโพดติดเชื้อทุกระดับ ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนเมื่อใช้ไพรเมอร์ Fum5-6 (lane 1, 2, 3 และ 7) โดยมีขนาด 425 bp ขณะที่ไพรเมอร์ FR (lane 2, 4, 5 และ 7) มีขนาด 180 bp ส่วนไพรเมอร์ JB589-JB591 ให้แถบดีเอ็นเอที่ค่อนข้างจางที่สุด (lane 3, 5, 6 และ 7) โดยมีขนาด 346 bp ซึ่งต้องมีเมล็ดข้าวโพดที่ติดเชื้อ 20 เมล็ดต่อเมล็ดปกติ 80 เมล็ดขึ้นไปจึงจะแสดงแถบ

ดีเอ็นเอได้ชัด จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความไวของไพรเมอร์ทั้ง 3 ที่ทดสอบในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดจริงมีระดับไม่เท่ากัน ซึ่งต้องมีทดสอบเพิ่มและเปรียบเทียบผลกับวิธีการดั้งเดิมจนกว่าจะแน่ใจว่าผลที่ได้ถูกต้อง



ภาพที่ 6 ผลของการทดสอบความไวและความถูกต้องของไพรเมอร์ 1, 2 และ 3 คู่ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่ติดเชื้อผสม 3 สายพันธุ์ คือ *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium* และ *Bipolaris maydis* ในระดับต่างๆกัน Lane 1 = ไพรเมอร์ Fum5-6; lane 2 = ไพรเมอร์ Fum5-6 + FR; lane 3 = ไพรเมอร์ Fum5-6 + JB589-591; lane 4 = ไพรเมอร์ FR; lane 5 = ไพรเมอร์ FR + JB589-591; lane 6 = ไพรเมอร์ JB589-591; lane 7 = ไพรเมอร์ Fum5-6 + FR + JB589-591

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

1. เชื้อรา *Fusarium moniliforme*, *Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคในข้าวโพดที่สำคัญทางเศรษฐกิจ จึงเป็นเชื้อกักกันในหลายๆ ประเทศ แต่การตรวจสอบเชื้อราที่ปนเปื้อนบนเมล็ดพันธุ์เพื่อการนำเข้าและส่งออกจะใช้วิธีการทั่วไป คือเพาะบนกระดาษชื้นและดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อต้องใช้ความชำนาญของเจ้าหน้าที่ตรวจสอบ

2. ในการตรวจสอบสภาพจริงบนเมล็ดพันธุ์จะมีเชื้ออยู่หลายชนิดทั้งเชื้อในโรงเก็บ เช่น *Aspergillus niger, Aspergillus flavus และ Penicillium sp.* ที่มักเจริญได้รวดเร็ว และคลุมผิวเมล็ดเกือบทั้งหมด ทำให้การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคทำได้ยาก และมีโอกาสผิดพลาดได้จึงควรมีวิธีที่สามารถตรวจสอบได้รวดเร็วและแม่นยำและมีระดับความไวที่ต้องการ

3. เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจเชื้อกักกันทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium* และ *Bipolaris maydis* โดยชุดไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ Fum5-Fum6, F-R และ JB589-JB591 ตามลำดับ โดยไพรเมอร์ Fum5-Fum6 ถูกออกแบบจากบริเวณยีน polyketide synthase ส่วนไพรเมอร์ F-R และ JB589-JB591ออกแบบจากบริเวณ 18S rRNA gene ไพรเมอร์ที่ใช้ต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มขยายขนาดที่มีขนาดจำเพาะของแต่ละคู่เบสแต่ละเชื้อ 180 bp (*Cephalosporium acremonium*), 425 bp (*Fusarium moniliforme*) และ 346 bp (*Bipolaris maydis*)

4. เมื่อนำไปทดสอบความไวและความถูกต้องของวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดพบว่าสามารถตรวจได้ในระดับที่เมล็ดข้าวโพดติดเชื้อต่ำสุด 1%

5. วิธีนี้ยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคในกรณีที่ข้าวโพดปนเปื้อนด้วยเชื้อโรคต่างๆ มากมายเนื่องจากไพรเมอร์คู่ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีปฏิกิริยาตอบสนองโดยเฉพาะกับเชื้อโรคเป้าหมาย แต่ไม่ตอบสนองกับเชื้อโรคอื่น เช่น *Aspergillus niger, Aspergillus flavus และ Penicillium sp.*

6. แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการนำเทคนิคนี้ไปทดสอบในตัวอย่างข้าวโพดจริงเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้กันอยู่ทั่วไปคือการเพาะบนกระดาษชื้นอีกหลายครั้งๆ เพื่อให้มั่นใจว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจตัวอย่างได้จริง และมีความแม่นยำสูง เพื่อให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากลต่อไป

การทดลองที่ 7 การตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ในเมล็ดพันธุ์พืชเพื่อการนำเข้า-ส่งออกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

Detection of Pospiviroid in Seed for Import-Export by Molecular Technique

ผู้วิจัย

ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	Supalak Sattayasamitsathit	ศวม.พิษณุโลก
ภภัสสร วัฒนกุลภาคิน	Papassorn Wattanakulpakin	ศวม.พิษณุโลก
กัณทิมา ทองศรี	Kantima Thongsri	ศวม.พิษณุโลก

บทคัดย่อ

พอสพิไวรอยด์เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในหลายประเทศ ดังนั้นจึงเป็นเชื้อกักกันที่สำคัญในการส่งออกเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ วิธีการในการตรวจวินิจฉัยจำเป็นต้องมีประสิทธิภาพและมีความถูกต้องแม่นยำสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการใช้เทคนิคไพโรซีเควนซิ่งเพื่อนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ โดยอาศัยหลักการของ synthesis sequencing และการตรวจจับ PPi ที่หลุดออกมาในขณะที่เกิดกระบวนการ polymerization เทคนิคนี้มีการพัฒนาประสิทธิภาพโดยเทียบกับวิธีทดสอบมาตรฐานด้วยเทคนิค real time RT-PCR (TaqMan) โดยการใช้ข้อมูลชีวสารสนเทศและข้อมูลจีโนมจากฐานข้อมูลธนาคารพันธุกรรมเพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาไพโรซีเควนซิ่ง พบว่าไพรเมอร์ PPV1 มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรอยด์ 8 ชนิด ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Mexican papita viroid, Tomato planta macho viroid, Chrysanthemum stunt viroid, Citrus exocortis viroid, Tomato apical stunt viroid* และ *Iresine viroid* ซึ่งให้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 197 คู่เบส ขณะที่ไพรเมอร์ PPV2 มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรอยด์ *Columnea latent viroid* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 194 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ไพโรซีเควนซิ่งให้ลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันมีความจำเพาะแต่ละชนิดของไวรอยด์ ดังนั้น จึงเป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วและมีความถูกต้องสูงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจไวรอยด์ในเมล็ดพันธุ์เพื่อการรับรองการปลอดศัตรูพืชสำหรับการนำเข้า-ส่งออก

คำสำคัญ: พอสพิไวรอยด์ ไพโรซีเควนซิ่ง เมล็ดพันธุ์

Abstract

Pospiviroid can cause disease of considerable economic importance many countries. Therefore, it is an internationally important quarantine pest. Developing an efficient and accurate diagnostic method, it is necessary. In the study of the use of pyrosequencing technique for detection of viroid, it can be used quickly and high reliability. Pyrosequencing is a technique for DNA sequencing based on the bioluminescence analysis of pyrophosphate. This method improves test efficiencies compared to the standard test methods of real time RT-PCR (TaqMan). Bioinforrnatics and genome data bases from GenBank were used to design primer and optimized condition for pyrosequencing. It was found that the PPV1 is a specific primers for 8 Pospiviroid detection such as *Potato spindle tuber viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Mexican papita viroid, Tomato planta macho viroid, Chrysanthemum stunt viroid, Citrus exocortis viroid, Tomato apical stunt viroid* and *Iresine viroid* whereas primer PPV2 is a specific primer for detection of *Columnea latent viroid* to yield a cDNA fragment about 197 and 194 base pairs, respectively. When analyzed, pyrosequencing gave different nucleotide sequences with specificity of each type of Viroid. Therefore, it is a fast and highly accurate detection method. Suitable for use in the detection of viroid in seeds for certification of pest-free for import-export seed.

Key words; Pospiviroid, pyrosequencing, seed

บทนำ (Introduction)

ประเทศไทยมีการส่งออกและนำเข้าเมล็ดพันธุ์เป็นจำนวนมากโดยเฉพาะเมล็ดผัก ซึ่งการส่งออกไปยังประเทศในแถบยุโรปมีการกำหนดศัตรูพืชกักกันหลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อไวรอยด์ ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็ก โมเลกุลประกอบด้วยอาร์เอ็นเอวงแหวนสายเดียวที่มีความยาว 239-401 นิวคลีโอไทด์ จีโนมที่มีขนาดเล็กของไวรอยด์จะไม่มีโปรตีนห่อหุ้มดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจสอบด้วยเทคนิคทางด้านซีรั่มได้ (Verhoeven *et al*., 2004) และไวรอยด์เพิ่มจำนวนโดยเอนไซม์ของพืชอาศัย ไวรอยด์สามารถแบ่งได้เป็น 2 แฟมิลี่ ได้แก่ Avsunviroidae และ Pospiviroidae (Flores et al., 2000) จีนัสของ Pospiviroid เป็นหนึ่งที่มีจำนวนชนิดของเชื้อไวรอยด์มากที่สุด ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), *Columnea latent viroid* (CLVd), *Mexican papita viroid* (MPVd), *Tomato plancha macho viroid* (TPMVd), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), *Iresine viroid* (IrVd) เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญของผักหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 49 เปอร์เซ็นต์ เชื้อชนิดนี้มีพืชอาศัยที่กว้าง เช่น มะเขือเทศ,

มันฝรั่ง, แตงกวา, พริก, มะเขือชนิดต่าง ๆ และไม้ประดับ อีกทั้งยังสามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ นอกจากนี้ประเทศไทยก็มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อใช้ทำพันธุ์ในประเทศ และผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออกในปริมาณที่มาก จึงทำให้เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวมีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าและแพร่ระบาดทำความเสียหายในประเทศไทยได้ ปัจจุบันยังพบว่ามีไวรอยด์อีกหลายชนิดที่ทำความเสียหายให้แก่พืช ซึ่งปัญหาสำคัญในการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ คือเชื้อไม่สามารถแยกบริสุทธิ์และเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ได้ จึงมีการใช้เทคนิคทางการตรวจ เช่น Biological indexing หรือการใช้พืชทดสอบ ซึ่งเป็นวิธีการเริ่มแรกที่ใช้ในงานตรวจวินิจฉัยโรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรอยด์ เป็นวิธีการที่ง่ายแต่ไม่สามารถใช้ตรวจจำแนกได้ครอบคลุมทั้งหมดข้อเสียที่สำคัญของวิธีการนี้คือ ต้องใช้พืชทดสอบหลายๆ ชนิดในการตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรอยด์ ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจตัวอย่างปริมาณมาก เนื่องจากต้องใช้พื้นที่โรงเรือนมากและสิ้นเปลืองแรงงานสูง นอกจากนี้ยังกินเวลาในการรอให้พืชทดสอบแสดงอาการตั้งแต่ 2 อาทิตย์ จนถึงหลายเดือน แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่สามารถนำมาใช้กับไวรอยด์บางชนิดได้ เช่น CCCVd และ CTiVd เนื่องจากไม่มีพืชทดสอบที่เหมาะสม และวิธีการปลูกเชื้อมีความยุ่งยาก ต้องใช้เครื่องมือที่มีแรงดันสูงในการปลูกเชื้อ รวมถึงระยะเวลาที่เชื้อแสดงอาการอาจกินเวลานานกว่า 4 ปี เทคนิคไพโรซีเควนซิ่งเป็นการพัฒนาโดยอาศัยหลักการของ synthesis sequencing และการตรวจจับ PPi ที่หลุดออกมาในขณะที่เกิดกระบวนการ polymerization การทำงานนั้นอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิดด้วยกันคือ klenow fragment ทำหน้าที่ต่อสายดีเอ็นเอ เอนไซม์ ATP sulfurylase ทำหน้าที่เปลี่ยน PPi ที่เกิดขึ้นให้เป็น ATP ซึ่งจะเป็นพลังงานให้กับเอนไซม์ luciferase ให้เป็น oxyluciferin ซึ่งสามารถให้แสงออกมาได้ โดยแสงที่เกิดขึ้นจะถูกตรวจจับด้วยเซ็นเซอร์ของกล้อง CCD นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ apyrase ทำหน้าที่ในการกำจัด dNTPs และ ATP ที่หลงเหลืออยู่ในระบบ (Gruber et al., 2002; Nordstrom et al., 2000) ซึ่งใช้ระยะเวลาการตรวจสอบเพียง 2 วัน ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ให้ครอบคลุมทุกชนิดของไวรอยด์กลุ่มนี้ โดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลขั้นสูงสามารถตรวจ Pospiviroid พร้อมกันได้หลายชนิดจึงความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเพื่อนำมาใช้ตรวจสอบติดตามเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าหรือส่งออกไปต่างประเทศและเพิ่มความสามารถในการแข่งขันเพราะจะทำให้ประเทศคู่ค้ามีความเชื่อมั่นในระบบการตรวจสอบ นอกจากนี้การเปิดเสรีทางการค้าทำให้แต่ละประเทศกำหนดเกณฑ์มาตรฐานสินค้าเกษตรขึ้นมาเพื่อใช้เป็นข้อกีดกันทางการค้า ดังนั้นผลงานวิจัยนี้สามารถนำมาช่วยลดปัญหาเหล่านั้นได้ และยังเป็นวิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อโรคศัตรูพืชกักกันที่มีประสิทธิภาพด้วยเช่นกัน

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์

1. Pospiviroid positive sequence
2. Two set of PyroMark Assay (PPV1 and PPV2)
3. RNA extraction kit (MACHEREY-NAGEL)
4. PyroMark OneStep RT-PCR Kit (200) cat no. 978803
5. PyroMark Q48 Advanced Reagents (4 x 48) cat no. 974002
6. PyroMark Q48 Magnetic Beads (300) cat no. 974203
7. PyroMark Q48 Absorber Strips (100)
8. PyroMark Q48 Discs (50)
9. Nano drop
10. PyroMark Q48 Autopre

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสังเคราะห์เชื้อไวรอยด์เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)

สังเคราะห์ชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอของเชื้อ Pospiviroid 9 ชนิด ได้แก่ Potato spindle tuber viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Mexican papita viroid, Tomato planta macho viroid, Chrysanthemum stunt viroid, Citrus exocortis viroid, Tomato apical stunt viroid, Iresine viroid และ Columnea latent viroid เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)

2. การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ทำการค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ pospiviroid ทั้ง 9 ชนิด เพื่อนำไปออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อหาลำดับเบสของไพรเมอร์

3. การตรวจเชื้อไวรอยด์ด้วยวิธี pyrosequencing

เจือจางไพรเมอร์ให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาเจือจางให้ได้ปริมาณ 2 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เตรียมน้ำยา PyroMark OneStep RT-PCR reagent, CoralLoad Concentrate, primer solutions และ 25 mM $MgCl_2$ โดยแช่ในน้ำแข็ง กำหนดปริมาตรน้ำยาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตร/reaction (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 5x*	5.0	1X
dNTP Mix	1.0	1X
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5	
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1.0	
10 µM Forward primer	0.625*/1.25**	0.25 µM/0.5 µM
10 µM Reverse primer (biotin label)	0.625*/1.25**	0.25 µM/0.5 µM
RNase free water	4.25/3.0	
RNA template (2 ng/ul)	10.0	20 ng/rxn
Final volume	25.0	

*PPV2 primer/**PPV1 primer

ใช้ปิเปตดูด Master mix ผสมให้เข้ากันและดูดใส่หลอดพีซีอาร์เติม template DNA (≤ 500 ng/reaction) ในแต่ละหลอดพีซีอาร์ (20 ng extracted RNA 10ul (2ng/ul)) ตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycler โดยกำหนดสภาวะดังนี้

Reverse transcription	30 min 50°C	Hold
Initial PCR activation step	15 min 95°C	Hold
3-step cycling		
Denaturation	30s 94°C	45 cycles
Annealing	30s 62°C	
Extension	30s 72°C	
Final extension	10min 72°C	Hold

นำหลอดพีซีอาร์ในเครื่อง thermal cycler และเริ่มต้นทำปฏิกิริยา นำ PCR product ไปตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลก่อนวิเคราะห์ด้วย Pyrosequencing จากนั้นนำ PCR product ปริมาตร 10 µl ไปวิเคราะห์ด้วย Pyrosequencing Pospiviroid analysis sequence ผลิตผลซึ่งได้ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี RT-PCR มาแล้ว 20 ไมโครลิตรผสม กับ streptavidin SepharoseTM beads 200 ไมโครกรัม และ PyroMarkTM binding buffer 3 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เพื่อให้ streptavidin จับกับสาย DNA ได้ทั่วถึง จากนั้นใส่คู่ sequencing primers เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่ผสมกับ annealing buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เพื่อจับกับ DNA สายเดี่ยว ก่อนนำ ไปหาลำดับเบสโดยใช้น้ำยา PyroMark Q48 Advanced Reagent

(Qiagen, Hilden, Germany) หลังจากนั้น เติม enzyme substrate และ nucleotides (A, C, G, and T) ลงใน cartridge ปริมาณตามการคำนวณจากโปรแกรม เมื่อนำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง อ่านลำดับเบสนิวคลิโอไทด์

4. การตรวจเชื้อไวรอยด์ในเมล็ดพันธุ์ผักด้วยวิธี pyrosequencing

การเตรียมตัวอย่าง

ตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ที่ติดมากับเมล็ดพันธุโดยใชเทคนิคไพโรซีเควนซิ่งรวมกับเรียลไทม์พีซีอาร์ (วิธีการมาตรฐาน) โดยสุมตรวจเมล็ดพันธุ์ผักของบริษัทที่จะส่งออก ได้แก่ เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ จำนวน 50 ตัวอย่างและพริก 50 ตัวอย่าง ชั่งเมล็ดพืชแต่ละตัวอย่าง (3,000 หรือ 20,000 เมล็ด) โดยแบ่งเป็น 3 ตัวอย่างย่อย ตัวอย่างละ 1000 เมล็ด หรือ 50 ตัวอย่างย่อย ตัวอย่างละ 400 เมล็ด และนำแต่ละตัวอย่างย่อยไปบดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดตัวอย่าง จนได้เป็นผงละเอียด

การสกัดอาร์เอ็นเอจากชุดสกัดสำเร็จรูปของบริษัท MACHEREY-NAGEL โดยมีขั้นตอนดังนี้

ถ่ายผงตัวอย่างที่บดละเอียดใส่หลอด 1.5 มล. เติมบัฟเฟอร์ PFL 500 ไมโครลิตร ลงในหลอด และเติมบัฟเฟอร์ PFR 10-50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 1 นาทีกรองตัวอย่างโดยสวมคอลัมน์ NucleoSpin RNA Plant Filter Column ในหลอดเก็บตัวอย่าง ดูดส่วนใสจากข้างต้น ใส่ลงในคอลัมม์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ปรับสภาวะการจับของอาร์เอ็นเอโดยเติมบัฟเฟอร์ PFB 500 µl ลงในส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 และผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที สวมคอลัมน์ NucleoSpin RNA Plant Column ในหลอดเก็บตัวอย่างดูดส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ลงในคอลัมน์นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์ในหลอดเก็บตัวอย่างทิ้งและนำมาสวมกับคอลัมน์อีกครั้ง ดูดส่วนใสที่เหลือใส่ลงในคอลัมน์และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์และหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง นำหลอดเก็บตัวอย่างอันใหม่มาสวมกับคอลัมน์เดิม ล้างและทำให้แห้งแผ่น silica membrane ล้างครั้งที่ 1 โดยเติมบัฟเฟอร์ PFW1 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์และหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง นำหลอดเก็บตัวอย่างอันใหม่มาสวมกับคอลัมน์เดิม ล้างครั้งที่ 2 โดยเติมบัฟเฟอร์ PFW2 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์ในหลอดเก็บตัวอย่างทิ้งและนำมาสวมกับคอลัมน์อีกครั้ง ล้างครั้งที่ 3 โดยเติมบัฟเฟอร์ PFW2 500 µl ลงในคอลัมน์ที่ได้ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 1 นาทีเทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์และหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง ชะอาร์เอ็นเอออกจากคอลัมน์ สวมคอลัมน์ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มล. เติมน้ำที่ปราศจาก RNase 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

5. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิคไพโรซีเควนซิ่ง

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางให้ได้ปริมาณ 2 นาโนกรัม/ไมโครลิตรและนำไปทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนในข้อ 7.2.3

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาที่ดำเนินการ ปีที่เริ่มต้น...2561...ปีที่สิ้นสุด....2562...

สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

ผลการวิจัย (Results) และอภิปรายผล (Discussion)

1. การเตรียมเชื้อไวรอยด์เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)

เนื่องจากเชื้อไวรอยด์ในกลุ่มพอสพิไวรอยด์หลายชนิดยังไม่มีรายงานในประเทศไทยดังนั้นในการตรวจสอบเชื้อดังกล่าวจำเป็นต้องมีตัวควบคุมเชิงบวกเพื่อเป็นการประกันผลที่ได้ เชื้อไวรอยด์ในจีนัส Pospiviroid มีจีโนมขนาดเล็กขนาด 356-375 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นจึงสามารถสังเคราะห์ได้ทั้งจีโนมโดยพอสพิไวรอยด์ที่ทำการสังเคราะห์มีขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน (Table 1)

2. การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Pospiviroid ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Mexican papita viroid, Tomato planta macho viroid, Chrysanthemum stunt viroid, Citrus exocortis viroid, Tomato apical stunt viroid, Iresine viroid* และ *Columnea latent viroid* ในฐานข้อมูลพันธุกรรม GeneBank ของเชื้ออ้างอิงหมายเลขAccession no. GU911350.1, NC_003637.1, NC_001558.1, EU879922.1, KF683201.1, AB006737.1, AB054599.1, KF484878.1 และ NC_003538.1 ตามลำดับมาเทียบเคียงสำหรับการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค pyrosequencing ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบใหม่ (Figure 1) โดยใช้โปรแกรม PyroMark® Assay Design SW 2.0 ในการออกแบบและมีการพิจารณาคัดเลือกไพรเมอร์โดยกำหนดให้มีปริมาณ GC อยู่ระหว่าง 30-80% และ มีค่า Tm 60 องศาเซลเซียส พบว่าได้ไพรเมอร์ 2 ชุด คือ PPV 1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Forward คือ TCAGGGATCCCCGGGGAA และ reverse คือ TCCAGTTGTCTCCACCGGGTAGT และไพรเมอร์สำหรับการทำซีเควนซิ่งคือ CCCGGGGAAACCTGGA โดยการออกแบบได้มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ 8 ชนิดได้แก่ *Potato spindle tuber viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Mexican papita viroid, Tomato planta macho viroid, Chrysanthemum stunt viroid, Citrus exocortis viroid, Tomato apical stunt viroid* และ *Iresine viroid* โดยมีขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 197 bp ส่วนไพรเมอร์ PPV2 ได้มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ *Columnea latent viroid* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Forward คือ AGCCCCGGGGCAACTCAG และ reverse คือ

AGCAACTCGGTGATGCCAC และไพรเมอร์สำหรับการทำซีเควนซิ่งคือ CCCGGGGCAACTCAG โดยมีขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 194 bp (Table 2)

3. การตรวจเชื้อไวรอยด์ด้วยวิธี pyrosequencing

เมื่อนำเชื้อพอสพิไวรอยด์ทั้ง 9 ชนิดที่สังเคราะห์ได้เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงบวกไปตรวจด้วยเทคนิคไพโรซีเควนซิ่งโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้คือ PPV1-SP และ PPV1-SP และมีการติดฉลากด้วยไบโอติน ผลการวิเคราะห์ electrophorograms พบว่าให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อ (Figure 2) โดย *Potato spindle tuber viroid* มีลำดับนิวคลีไอไทด์คือ GCGAACTGGCAACAAGGACGGTGGGGAGTGCCCAGCGGCC; *Tomato chlorotic dwarf viroid* มีลำดับนิวคลีไอไทด์คือ

GCGAACTGGCAAAAGGCGGCAGGGAGCTTGTGGAAGGCGAAACAGGA;

Mexican papita viroid มีลำดับนิวคลีไอไทด์คือ

GCGAACTGGCAAAGGAGTCGCGGCTGGGGAGTCTCCTCAGACAGGA; *Tomato planta viroid* มีลำดับนิวคลีไอไทด์คือ GCGAACTGGCGAAGGAGTCGCGGCTGGGGAGTCT; *Chrysanthemum stunt viroid* มีลำดับนิวคลีไอไทด์คือ GGAAGTCCGACGAGATCGCGGTTGGGGCTTA; *Citrus exocortis viroid* มีลำดับนิวคลีไอไทด์ คือ GGAAGTCGAGGTCGGGGGGGTACAGCTGCTTC; *Tomato apical stunt viroid* มีลำดับนิวคลีไอไทด์คือ GGAAGTCGAGGTCGGGGGCTTCGGACTACT; *Iresine viroid viroid* มีลำดับนิวคลีไอไทด์คือ GCGAACTCGGCAAGGAGGCCTGGCGGTAGGTGCGC และ *Columnea latent viroid* มีลำดับนิวคลีไอไทด์คือ ACCGAGCGGGGTCTCGTGGTCGAGGGCGTTGCCCTGTT

เทคนิคไพโรซีเควนซิ่งสำหรับการนำมาใช้ตรวจเชื้อมีความถูกต้องสูงเนื่องจากมีการ synthesis sequencing และการตรวจจับ PPi ที่หลุดออกมาในขณะที่เกิดกระบวนการ polymerization การทำงานนั้นอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิดด้วยกันคือ klenow fragment ทำหน้าที่ต่อสายดีเอ็นเอ เอนไซม์ ATP sulfurylase ทำหน้าที่เปลี่ยน PPi ที่เกิดขึ้นให้เป็น ATP ซึ่งจะเป็นพลังงานให้กับเอนไซม์ luciferase ให้เป็น oxyluciferin ซึ่งสามารถให้แสงออกมาได้ โดยแสงที่เกิดขึ้นจะถูกตรวจจับด้วยเซ็นเซอร์ของกล้อง CCD นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ apyrase ทำหน้าที่ในการกำจัดdNTPs และ ATP ที่หลงเหลืออยู่ในระบบ เทคนิคนี้มีความถูกต้องแม่นยำกว่าวิธีการตรวจสอบ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ทั่วไป เนื่องจากเทคนิคพีซีอาร์มีข้อจำกัดด้วยความไวของพีซีอาร์ และมีโอกาสการจับที่ผิดพลาดของไพรเมอร์ระหว่างการเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอซึ่งอาจจะนำไปสู่การจับกันอย่างไม่

จำเพาะมีผลให้เกิดผลเชิงบวก (false positives) หรือผลเชิงลบ (false negatives) ที่ผิดพลาดได้และการเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะได้ การประกันความถูกต้องของวิธีการโดยหน่วยงานจากต่างประเทศ เช่น OIE และ China entry-exit inspection และ quarantine industry standards รายงานว่าผลผลิตพีซีอาร์จะต้องมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เสมอ อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำเป็นต้องใช้เวลาที่ยาวนานโดยทั่วไปอยู่ประมาณ 15-20 วัน

ดังนั้นวิธีไพโรซีเควนซิ่งสามารถลดระยะเวลาให้สั้นลงเหลือแค่ 3-4 ชั่วโมงเท่านั้นในการวิเคราะห์ ยิ่งไปกว่านั้นวิธีการนี้ยังให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดผลเชิงบวกที่ผิดพลาด (false positives) เทคนิคไพโรซีเควนซิ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากมีความรวดเร็วในการตรวจสอบและสามารถใช้ตรวจในเชื้อโรคสำคัญๆ หลายชนิด เช่น ไวรัส (De Battisti *et al*., 2013; Gharizadeh *et al*., 2005)

4. การตรวจเชื้อไวรอยด์ในเมล็ดพันธุ์ผักด้วยวิธี pyrosequencing

จากการสุ่มเมล็ดพันธุ์พริก มะเขือเทศ จำนวน 100 ตัวอย่าง มาตรวจเชื้อไวรอยด์ทั้ง 9 ชนิด โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ 2 คู่ คือ PPV1 และ PPV2 โดยกำหนดสภาวะที่เหมาะสม พบว่าตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักทั้ง 100 ตัวอย่างไม่มีการติดเชื้อไวรอยด์ซึ่งไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นและเมื่อเทียบกับวิธีการมาตรฐาน Real-time PCR (Taqman) ก็ไม่พบเชื้อเช่นกัน ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (positive control) มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น (Figure 3) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าเมล็ดพันธุ์ผักยังไม่มีการติดเชื้อไวรอยด์แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการสุ่มตรวจเมล็ดพันธุ์ให้มากขึ้น

Table 1 Synthesis of viroid sequence

Viroid species	Size	GC%	Sequence
Potato spindle tuber viroid	309 bp	58.77 %	AAAAGAAAAAAGAAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGA ACTGGCAACAAGGACGGTGGGGAGTGCCCAGCGGCCGACAGGAGTAATTCCCGCCGAAACAG GGTTTTCACCCTTCCTTTCTTCGGGTGCCTTCCTCGCGCCCGCAGGACCACCCCTCGCCCCCT TTGCGCTGTCGCTTCGGATACTACCCGGTGGAAACAACTGAAGCTCCCGAGAACCGCTTTTTC TCTATCTTACTTGCTTCGGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCT
Tomato chlorotic dwarf viroid	360 bp	57.35 %	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGTGCAGAAAAGAAAAAAGAT AGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAAAAGGC GGCAGGGAGCTTGTGGAAGGCGAAACAGGAGTAATCCCGCGTAGAAACAGGGTTTTCACCCT TCCTTTCTTCTGCGGTTTCCTTCCTTTGCGCGCCACTCGACCCCTCGCCCCCTTGCGCTGTCG CTTCGGCAACTACCCGGTGGATACAACTGAAGCTCCCGAGAACCGCTTTTTCTCTATCTTGCT GCTACCGGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCT
Mexican papita viroid	360 bp	58.78 %	CGGGATCTTTTCCTTGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCAGCCCAGGAAAGAAAAAAG AAAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAAAGG AGTCGCGGCTGGGGAGTCTCCTCAGACAGGAGTAATCCCCGCTGAAACAGGGTTTTCACCCT TCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCCTCTGTGGTCGACACCCTCGCCCGCCTCTCTGCGCTGTCGCT TCGGATACTACCCGGTGGAAACAACTGAAGCTCCCGAGAACCGCTTTTTCTCTATCTTGCTGG CGCAGGGGCGAGGGTGGAAAGCCCTGGAACCCGCTGGATGGGTCCCT
Tomato planta macho viroid	360 bp	57.55 %	CGGGATCTTTTCCTTGTGGTTCCTGTGGTACACACCTGACCTCCTGACCAGAAAAGAAAAAAG AATTGCGGCCAAAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCGAAGGA GTCGCGGCTGGGGAGTCTCCCAGACAGGAGTAATCCCCGCTGAAACAGTTTTCACCCTTCCTT TCTTCGGGTTTCCTTCCTCTGCGGTCGACACCCTCGCCCGCTTCTCTTGCGCTGTCGCTTCGG AGACTACCCGGTGGAAACAACTGAAGCTCCCAAGCGCCGCTTTTTCTCTATCTTGCTGGCTCC

			GGGGCGAGGGTGGAAAACCCTGGAACCCTTCGAAAAGGGTCCCT
Chrysanthemum stunt viroid	354 bp	54.13 %	CGGGACTTACTTGTGGTTCCTGTGGTGCACTCCTGACCCTGCTGCTTTACAAGAAAAAGAAAT GAGGCGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAGTCCGACGAGATCGCGG TTGGGGCTTAGGACCCCACTCCTGCGAGACAGGAGTAATCCTAAACAGGGTTTTCACCCTTCC TTTAGTTTCCTTCCTCTCCTGGAGAGGTCTTCTGCCCTAGCCCGGTCTTCGAAGCTTCCTTTG GCTACTACCCGGTGGAAACAACTGAAGCTTCAACGCCTTTTTTTCCAATCTTCTTTAGCACCG GGCTAGGGAGTAAGCCCGTGGAACCTTAGTTTTGTTCCCT
Citrus exocortis viroid	373 bp	59.24 %	CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGAAAAAGAAAAAAAG AGGCGGCGGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGGTCGG GGGGGTACAGCTGCTTCGGTCGCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGAGCTCGT CTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCACGCCCCCTCGCCCG GAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGAAACAACTGAAGCTTCAACCCCAAACCGCTTTTCT TATATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTAGATTGGGTCCCT
Tomato apical stunt viroid	364 bp	57.09 %	CGGGAACTTTCTTGAGGTTCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCATCAAGAAAAAAGAAT GGCGCGGAGGAGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGGTCGG GGGCTTCGGACTACTCCTTCGTGAGACAGGAGTAATCCCCGCTGAAACAGGGTTTTCACCCTT CCTTTCTTCGGGTTTCCTTCCTCTCGCCTGGAGAGGTCTTCGGCCCTCGCCCGGAGCTTCTCT CTGGAGACTACCCGGTGGAAACAACTGAAGCTTCAACCCTCTCGCGCTTTTTCTCTA TCTTTGTTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCGTGGAACCCTGGAAGGAGTCCCT
Iresine viroid	370 bp	60.4%	TGTGGTTCCAATGGTTGCACCCCTGACCTGCAATGCAAAAAGAAAAAAGATGGGGCGGCGGC AACAACGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAACTCGGCAAGGAGGCCTGGCGGTA GGTGCGCGGAGTCGACCGCGTAAAGACCGGAGAACTCCACGCGGCGGAAGAAACAGGAGCTC GTCTCCTTCCTTTCTGCGCCCGCAGGACTCACTCGGCAGCGGCGTCTTCTCCGCACCCTCGCC CGCTTCCGCGCTGGTCGCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACAACTGTAGCTTGAAGCC CGCCCGCCCTTTTTCTTCTATCTTCTGCTGCGCGGCGAGGGTGGGCTTCTAAAGGAAACCCT
Columnea latent viroid	369 bp	57.92 %	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTACACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAAAGAAAAAAG AACGGGAGGGAGAGCGCAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGG TCTCGTGGTCAGGGCGTTGCCCTGTTCAGACAGGAGTAATCCCAGCTGAAACAGGGTTTTCAC CCTTCCTTTCTTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAACCTCTTGACCAGC GCAGGTGCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTGCTCGAGCCTCAACCTCCTTTTT CTCTATCTTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTAGGTTCCT

Table 2 Sequences of primer used for pospiviroid detection

Target	Primer sequence	Length (bp)	Tm	% GC	Product size
Assay1 (PPV1*)	PPV1-FP: TCAGGGATCCCCGGGGAA	19	78.0	63.2	197
C=T/A biotin	PPV1-RPB: TCCAGTTGTCTCCACCGGGTAGT	23	75.1	56.5	
	PPV1-SP: CCCGGGGAAACCTGGA	16	65.0	68.8	
Assay2 (PPV2*)	PPV2-FP: AGCCCCGGGGCAACTCAG	18	77.0	72.2	194
Biotin	PPV2-RPB: AGCAACTCGGTGATGCCAC	19	71.3	57.9	
	PPV2-SP: CCCGGGGCAACTCAG	15	61.9	73.3	

PPV1*: detection strain GU911350.1, NC_003637.1, NC_001558.1, EU879922.1, KF683201.1, AB006737.1, AB054599.1, KF484878.1

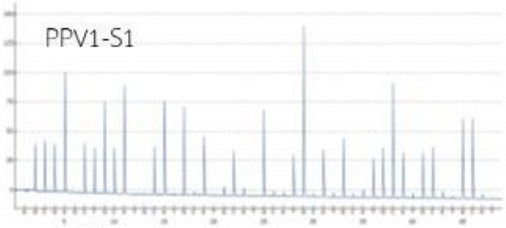
PPV2**: detection strain NC_003538.1

9 strains multiple alignment

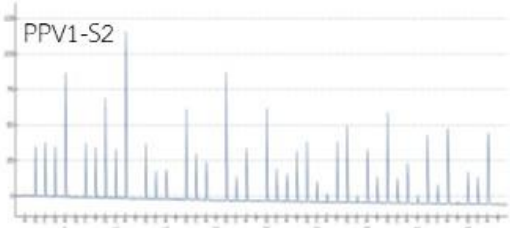
```
GU911350.1      ------------------------------------------------------------  0
NC 003538.1     --CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTACACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAAAGAA  58
NC 003637.1     CGGGATCTTTTCCTTGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCAGCCCAGGAAAGAAA-  59
NC 001558.1     CGGGATCTTTTCCTTGTGGTTCCTGTGGTACACACCTGACCTCCTGACCAGAAAAGAAA-  59
EU879922.1      ------------------------------------------------------------  0
KF683201.1      --CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGTGCAGAAAAGAAA-  57
AB006737.1      ------------------------------------------------------------  0
AB054599.1      --CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGAAAAAGAAA  58
KF484878.1      --CGGGAACTTTCTTGAGGTTCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCATCAAGAAAAA  58

GU911350.1      ------------------------------TTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGA  30
NC 003538.1     AAAAGAACGGGAGGGAGAGCGCAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGA  118
NC 003637.1     -AAAGAAAGGCGG----CTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGA  114
NC 001558.1     -AAAGAATTGC-G----GCCAAAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGA  113
EU879922.1      --------------------CGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGA  41
KF683201.1      -AAAGATAGGCGG----CTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGA  112
AB006737.1      ----------------------AGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAA  38
AB054599.1      AAAAGAGGCGGCG----GGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAA  114
KF484878.1      AGAATGGCGCGGA----GGAGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAA  114
                                               *    *** ******** ***   **   *

GU911350.1      ACTCGGCAAGGAGGCCTGGCGGTAGGTGCGCGGAGTCGACCGCGTAAAGACCGGAGAACT  90
NC 003538.1     GCGGGGTCTCGTGGTCGAGGGCGTTGC---CCT---------------GTTCAGACAGGA  160
NC 003637.1     ACTGGCAAAGGAGTCGCGGCTGGGGAGTC-TCC-----------------TCAGACAGGA  156
NC_001558.1     ACTGGCGAAGGAGTCGCGGCTGGGGAGTC-TCC-----------------CAGACAGGA  154
EU879922.1      ACTGGCAACAAGGACGGTGGGGAGTGCCCAGCG-----------------GCCGACAGGA  84
KF683201.1      ACTGGCAAAAGGCGGCAGGGAGCTTGTGGAAGG-----------------CGAAACAGGA  155
AB006737.1      GTCCGACGAGATCGCGGTTGGGGCTTAGGACCC---------------CACTCCTGCGAG  83
AB054599.1      GTCGAGGTCGGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCG---------------CCGCGGATCACT  159
KF484878.1      GTCGAGGTCGGGGGCTTCGGACTACTCCTTCGT---------------GAGACAGGAGTA  159

GU911350.1      CCACGCGGCGGAAGAAACAGGAGCTCGTCTCCTTCCTTTCTGTCGCCCGCAGGACTCACT  150
NC 003538.1     -GTAATCCCAGCTGAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTCTTCT-----GGTTTCCTTCCT  214
NC 003637.1     GTAA-TCCCCGCTGAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTCTTCG-----GGTTTCCTT---  207
NC 001558.1     GTAA-TCCCCGCTGAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTCTTCG-----GGTTTCCTT---  205
EU879922.1      GTAATTC-CCGCCGAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTCTTCG-----GGTGTCCTT---  135
KF683201.1      GTAATCCCGCGTAGAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTCTTCT-----GCGGTTTCC---  207
AB006737.1      ACAGGAGTAATCCTAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTAGTTT-----CCTTCC------  132
AB054599.1      GGCGTCCAGCGGAGAAACAGGAGCTCGTCTCCTTCCTTTCGCT-----GCTGGCTCCACA  214
KF484878.1      ----ATCCCCGCTGAAACAGGGTTTTCAC-----CCTTCCTTT-----CTTCGGGTTTCC  205
                              *******   *   *     * **

GU911350.1      CGGCAGCGGCGTCTTCTCCGCACCCTCGCCCGCTTCCGCGCTGGTCGCTCTGGCTACTAC  210
NC 003538.1     CTG---CTTCAGCGGCCTCGCCCGGAACCTCTTGAC---CAGCGCAGGTGCTGACGCGAC  268
NC 003637.1     -CC---TCTGTGGTCG-ACACCCTCGCCCGCCTCTC-TGCGCTGTCGCTTCGGATACTAC  261
NC 001558.1     -CC---TCTGCGGTCG-ACACCCTCGCCCGCTTCTCTTGCGCTGTCGCTTCGGAGACTAC  260
EU879922.1      -CC---TCGCGCCCGCAGGACCACCCCTCGCCCCCTTTGCGCTGTCGCTTCGGATACTAC  191
KF683201.1      -TT---CCTTTGCGCGCCACTCGACCCCTCGCCCCCTTGCGCTGTCGCTTCGGCAACTAC  263
AB006737.1      TCT---CCTGGAGAGGTCTTCTGCCCTAGCCCGGTCTTCGAAGCTTCCTTTGGCTACTAC  189
AB054599.1      TCC---GATCGTCGCTGAAGCGCCACGCCCCCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGCTACTAC  271
KF484878.1      TTC---CTCTCGCCTGGAGAGGTCTTCGGCCCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGAGACTAC  262
                                                                 *   *   * **

GU911350.1      CCGGTGGATACAACTGTAGCTTGAAGCCCGCCCGCCCTTTTTCTTCTATC--TTCTGCTG  268
NC 003538.1     CGGTGGCATCACCGAGTTGCTCGAGCCTCAACCTCCTTTTTCTCTATCTTAGCTTGGTCT  328
NC 003637.1     CCGGTGGAAACAACTGAAGCTCCCGAGAACCGC---TTTTTCTCTATCTT--GCTGGCGC  316
NC 001558.1     CCGGTGGAAACAACTGAAGCTCCCAAGCGCCGC---TTTTTCTCTATCTT--GCTGGCTC  315
EU879922.1      CCGGTGGAAACAACTGAAGCTCCCGAGAACCGC---TTTTTCTCTATCTT--ACTTGCTT  246
KF683201.1      CCGGTGGATACAACTGAAGCTCCCGAGAACCGC---TTTTTCTCTATCTT--GCTGCTAC  318
AB006737.1      CCGGTGGAAACAACTGAAGCTTCAACGCCTTT-------TTTTCCAATCT--TCTTTAGC  240
AB054599.1      CCGGTGGAAACAACTGAAGCTTCAACCCCAAACCGCTTTTCTTATATCTT--CACTGCTC  329
KF484878.1      CCGGTGGAAACAACTGAAGCTTCAACCCTCTCGCGCTTTTTCTCTATCTT--TGTTGCTC  320
                * *  * *       *  ***                 *

GU911350.1      CGCGGCGAGGGTGGGCTTCTAAAGGAAACCCT-------------  300
NC 003538.1     CCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTAGGTTCCT---  370
NC 003637.1     AGGGGCGAGGGTGGAAAGCCCTGGAACCCGCTGGATGGGTCCCT-  360
NC 001558.1     CGGGGCGAGGGTGGAAAACCCTGGAACCCTTCGAAAAGGGTCCCT  360
EU879922.1      CGGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCT---  288
KF683201.1      CGGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCT---  360
AB006737.1      ACCGGGCTAGGGAGTAAGCCCGTGGAACCTTAGTTTTGTTCCCT-  284
AB054599.1      TCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTAGATTGGGTCCCT-  373
KF484878.1      TCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCGTGGAACCCTGGAAGGAGTCCCT-  364
                   **     **        *     * *  *
```

Figure 1 The alignment of accession numbers of viroid species exhibiting sequence identity *Potato spindle tuber viroid* (Accession: EU879922.1), *Tomato chlorotic dwarf*

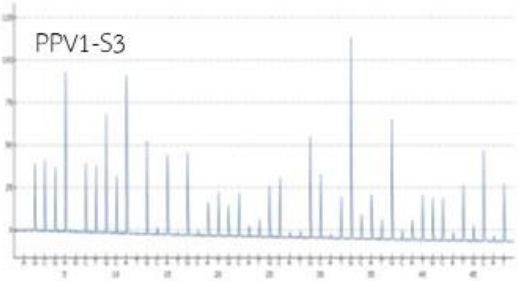
viroid (Accession: KF683201.1), *Mexican papita viroid* (Accession: NC_003637.1), Tomato *planta macho viroid* (Accession: NC_001558.1), *Chrysanthemum stunt viroid* (Accession: AB006737), *Citrus exocortis viroid* (Accession: AB054599.1), *Tomato apical stunt viroid* (Accession: KF484878.1), *Iresine viroid* (Accession: GU911350.1), *Columnea latent viroid* (Accession: NC_003538.1)



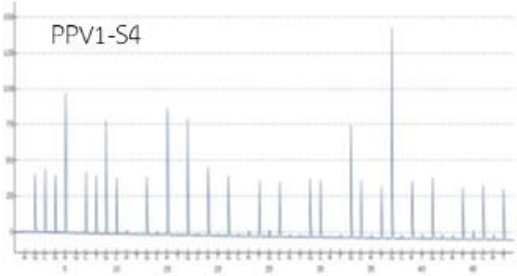
Basecalled Sequence: GCGAACTGGC AACAAGGACG GTGGGGAGTG CCCAGCGGCC



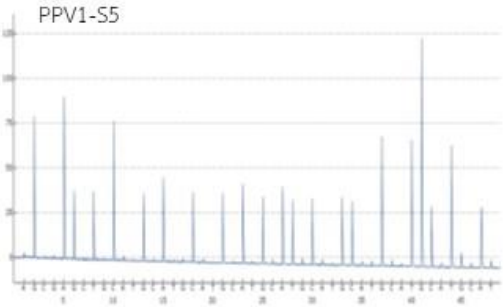
Basecalled Sequence: GCGAACTGGC AAAGGGCAGG GAGGCTGGTT GGATGGGCAG GAAGCAA



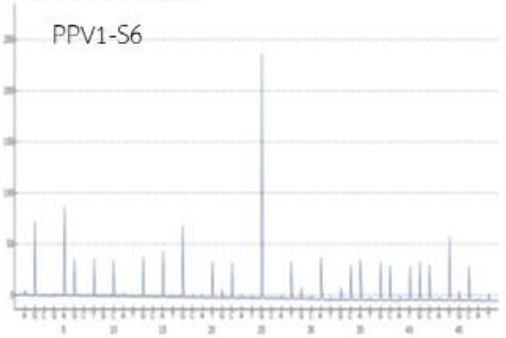
Basecalled Sequence: GCGAACTGGC AAG[G]AGTCGC GGCTGGGGGA GGGTCTTCCT



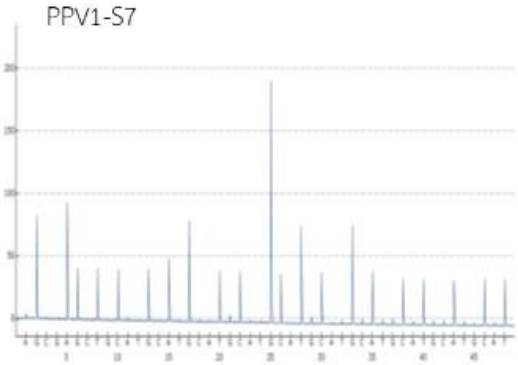
Basecalled Sequence: GCGAACTGGC GAAGGAGTCG CGGCTGGGGA GTCT



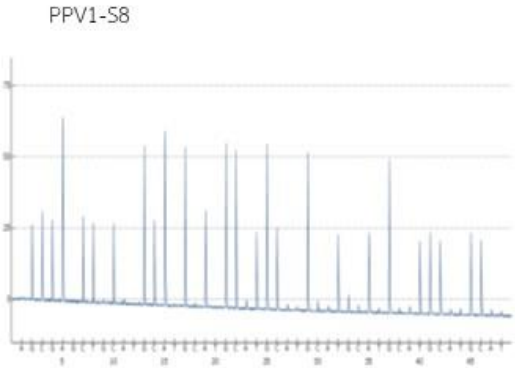
Basecalled Sequence: GGAAGTCCGA CGAGATCGCG GTTGGGGCTT A



Basecalled Sequence: GGAAGTCGAG GTCGGGGGG[G] TACAGCTGCT TC



Basecalled Sequence: GGAAGTCGAG GTCGGGGGCT TCGGACTACT



Basecalled Sequence: GCGAACTCGG CAAGGAGGCC TGGCGGTAGG TGCGC

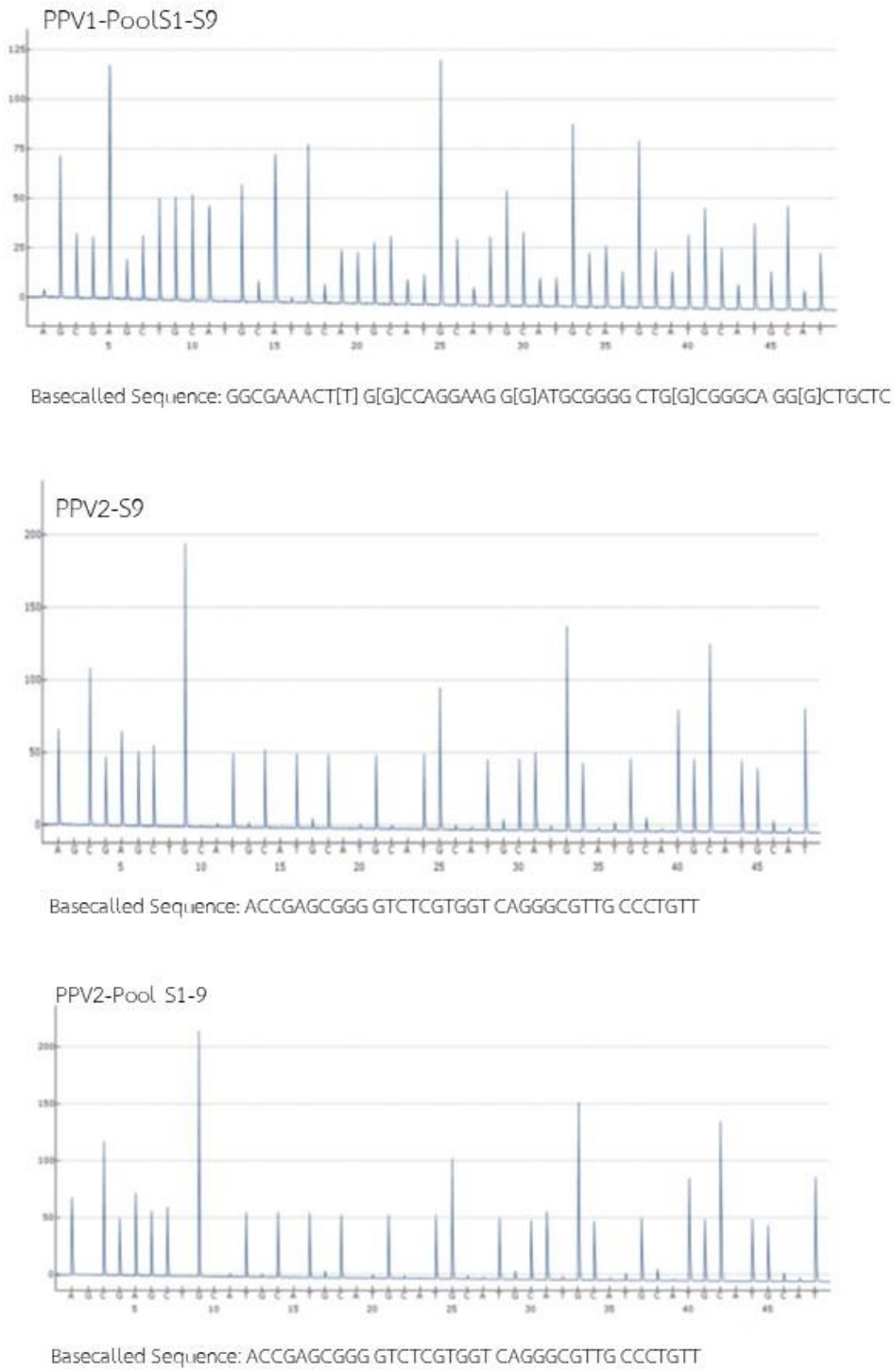


Figure 2 Pyrosequencing signal of Pospiviroid: *Potato spindle tuber viroid* (S1), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (S2), *Mexican papita viroid* (S3), *Tomato planta macho viroid* (S4), *Chrysanthemum stunt viroid* (S5), *Citrus exocortis viroid* (S6),*Tomato apical stunt viroid* (S7), *Iresine viroid* (S8) และ *Columnea latent viroid* (S9)

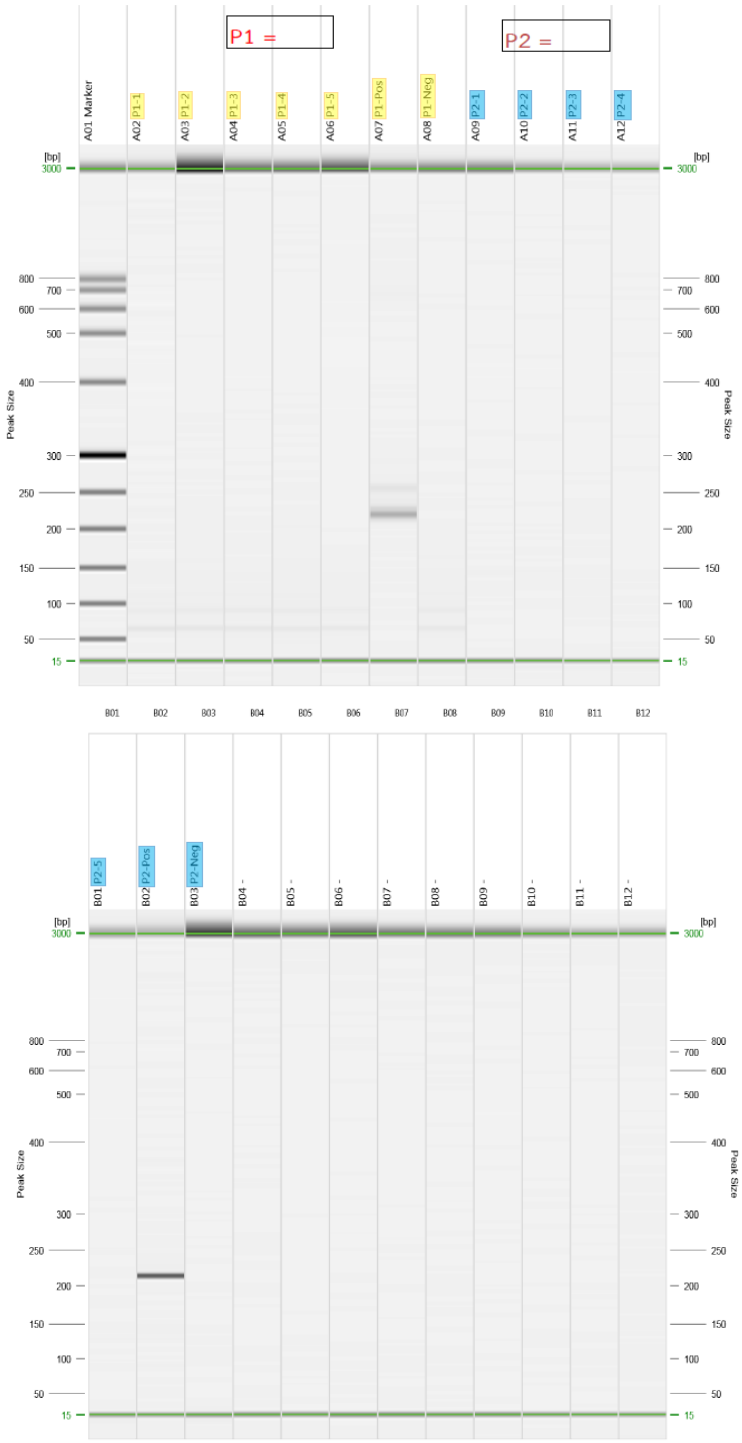


Figure 3 Image of the gels for PCR amplification

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

จากการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ให้ครอบคลุมทุกชนิดของไวรอยด์ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Mexican papita viroid, Tomato planta macho viroid, Chrysanthemum stunt viroid, Citrus exocortis viroid, Tomato apical stunt viroid*, *Iresine viroid* และ *Columnea latent viroid* โดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลขั้นสูงคือ เทคนิคไพโรซีเควนซิ่งเป็นการพัฒนาโดยอาศัยหลักการของ synthesis sequencing และการตรวจจับ PPi ที่หลุดออกมาในขณะที่เกิดกระบวนการ polymerization พบว่าสามารถตรวจ Pospiviroid พร้อมกันได้หลายชนิดซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเพื่อนำมาใช้ตรวจสอบติดตามเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าหรือส่งออกไปต่างประเทศและเพิ่มความสามารถในการแข่งขันเพราะจะทำให้ประเทศคู่ค้ามีความเชื่อมั่นในระบบการตรวจสอบ นอกจากนี้การเปิดเสรีทางการค้าทำให้แต่ละประเทศกำหนดเกณฑ์มาตรฐานสินค้าเกษตรขึ้นมาเพื่อใช้เป็นข้อกีดกันทางการค้า ดังนั้นผลงานวิจัยก็สามารถนำมาช่วยลดปัญหาเหล่านั้นได้ และยังเป็นวิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อโรคศัตรูพืชกักกันที่มีประสิทธิภาพด้วยเช่นกัน

การทดลองที่ 8 การศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์กาแฟในห้องปฏิบัติการ

Study of Coffee Seed Testing in laboratory Treatments on the Breaking of Dormancy in Peanut

ผู้วิจัย

นิภาภรณ์ พรรณรา	Nipapon Punnara	ศวม.เชียงใหม่
ภภัสสร วัฒนกุลภาคิน	Papassorn Wattanakulpakin	ศวม.พิษณุโลก
สุมนา จำปา	Sumana Jumpa	ศวม.เชียงใหม่
ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	Supalak Sattayasamitsathit	ศวม.พิษณุโลก
กัณทิมา ทองศรี	Kantima Thongsri	ศวม.พิษณุโลก

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์กาแฟในห้องปฏิบัติการ เพื่อหาวิธีการเตรียมเมล็ดกาแฟก่อนเพาะความงอกและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเพาะความงอกในเมล็ดกาแฟอาราบิก้าพันธุ์เชียงใหม่ 80 และพันธุ์ H528/46 ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ในปี 2561 และ 2562 วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยการแช่เมล็ดกาแฟก่อนเพาะความงอก เป็นระยะเวลา 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 และ 20-30 °C และลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก ผลการทดลอง พบว่า เมล็ดกาแฟ อาราบิก้าพันธุ์เชียงใหม่ 80 วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกมีความงอกและความเร็วในการงอกสูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆทั้ง 2 อุณหภูมิ โดยมีความงอกร้อยละ 84-86 เมื่อเพาะที่อุณหภูมิ 30 °C (ประเมินความงอกที่ 37 วัน) และ มีความงอกร้อยละ90 – 94 เมื่อเพาะที่อุณหภูมิ 20-30 °C (ประเมินความงอกที่ 49 วัน) การเพาะความงอกที่

อุณหภูมิ 30 °C มีความเร็วในการงอก (3.18 -3.49) สูงกว่าที่อุณหภูมิ 20-30 °C ซึ่งมีความเร็วในการงอกพียง 2.63 -2.73 ส่วนเมล็ดกาแฟอาราบิก้าพันธุ์ H528/46 วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกมีความงอกและความเร็วในการงอกสูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆทั้ง 2 อุณหภูมิ เช่นเดียวกับพันธุ์เชียงใหม่ 80 โดยการเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30 °C ความงอก 81-92% (ประเมินความงอกที่ 37 วัน) และ 84 – 93% ที่อุณหภูมิ 20-30 °C (ประเมินความงอกที่ 49 วัน) สำหรับความเร็วในการงอกการเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30 °C มีความเร็วในการงอก (2.90 -3.82) สูงกว่าที่อุณหภูมิ 20-30 °C ซึ่งมีความเร็วในการงอกพียง 2.39 -2.60 ดังนั้น วิธีการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์กาแฟในห้องปฏิบัติการ คือ การลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกก่อนเพาะความงอก อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะความงอก 30 °C ระยะเวลาทดสอบความงอกจำนวน 37 วัน

คำสำคัญ : เมล็ดกาแฟ วิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

ABSTRACT

A study of the present work was to evaluate the optimum temperature and soaking times for estimating germination testing methods in laboratory of Arabica coffee seeds in two cultivars, Chiangmai 80 and H528/46. The research was conducted in Phitsanulok Seed Research and Development Center in 2018-2019. Two temperature soaking, 30 and 20 - 30 °C for 0, 12, 24, 48 and 72 hours were tested in the factorial in CRD with four replications. The results showed that the removal of the embryos before germination test had highest germination percentages than other treatments in two temperature tested of Chiangmai 80 cultivar. The germination percentages was 84-86 when placed in the temperature conditions of 30 °C (germination rate at 37 days) and 90-94 when placed in the temperature conditions of 20-30 °C (germination rate at 49 days). The speed of germinations when placed in the temperature conditions of 30 °C (3 : 1 8 to 3 : 4 9) faster than placed in the temperature conditions of 20-30 °C that have speed of 2.63 – 2.73. Arabica coffee var.H528/46 germination percentages showed the same results as Chiangmai 80 cultivar. The germination percentages was 81-92 when placed in the temperature conditions of 30 °C (germination rate at 37 days) and 84-93 when placed in the temperature conditions of 20-30 °C (germination rate at 49 days). The speed of germinations when placed in the temperature conditions of 30 °C (2.1 8 to 3 .82) faster than placed in the temperature conditions of 20-30 °C that have speed of 2.39 – 2.60. Thus, the good methods for coffee seed quality testing in laboratory is

removed of the embryos before germination test and place in the temperature conditions of 30 °C for 37 days.

Keyword : Coffee Seed Seed Testing

บทนำ (Introduction)

เมล็ดพันธุ์กาแฟ เป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีการพักตัวของเมล็ดอันเนื่องมาจากสารยับยั้งการเจริญเติบโต ได้แก่กรดแอบสิซิค (ABA) (Mirian *et al*., 2006) ซึ่งเมื่อนำไปล้างน้ำจะทำให้การพักตัวหมดไป เนื่องจากน้ำได้ละลายและชะล้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตให้หมดไป(จวงจันทร์, 2529) ระยะเวลาจากการที่เมล็ดงอกขึ้นมาเป็นระยะหัวไม้ขีดใช้ระยะเวลาประมาณ 30 – 45 วัน และระยะที่มีใบเลี้ยงหรือระยะปีกผีเสื้อ ใช้เวลาประมาณ 46-60 วัน จึงจะทำการถอนต้นกาแฟไปปลูกต่อในถุงพลาสติกที่เตรียมไว้ ซึ่งเป็นวิธีการเตรียมต้นกล้าในโรงเรือน สำหรับวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์กาแฟในห้องปฏิบัติการไม่มีระบุในกฎของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (ISTA, 2016) ในส่วนของกรมวิชาการเกษตรได้ผลิตเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้า อย่างต่อเนื่อง ซึ่งในกระบวนการผลิตเมล็ดพันธุ์ไม่ได้ผ่านกระบวนการตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพเมล็ดพันธุ์ในห้องปฏิบัติการก่อนที่จะนำเมล็ดพันธุ์ไปใช้ ดังนั้นห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ของ ศวม.พิษณุโลก ซึ่งตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ตามกฎของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (International Seed Testing Association : ISTA) จึงหาวิธีตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์กาแฟที่เหมาะสมที่จะใช้ในการประเมินความงอกในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะสามารถประเมินความงอกของเมล็ดพันธุ์กาแฟได้ก่อนนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูก

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

- อุปกรณ์
  - เมล็ดพันธุ์กาแฟพันธุ์อาราบิก้าจำนวน 2 พันธุ์
  - อุปกรณ์สำหรับเพาะความงอกในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

- วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ 6x2 Factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่

ปัจจัยที่ 1 คือ การเตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนเพาะความงอก 6 วิธีการ

1) ไม่แช่น้ำ
2) แช่น้ำ 12 ชั่วโมง
3) แช่น้ำ 24 ชั่วโมง
4) แช่น้ำ 48 ชั่วโมง
5) แช่น้ำ 72 ชั่วโมง

6) ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก

ปัจจัยที่ 2 คือ อุณหภูมิในการเพาะความงอก 2 อุณหภูมิ

1) อุณหภูมิ 30 °C

2) อุณหภูมิ 20 -30 °C

(อุณหภูมิ 20 °C จำนวน 16 ชั่วโมง และ อุณหภูมิ 30 °C จำนวน 8 ชั่วโมง)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. นำเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์เชียงใหม่ 80 และพันธุ์ H528/46 มาเพาะทดสอบความงอกในห้องปฏิบัติการโดยใช้ทรายเป็นวัสดุเพาะ ตามกรรมวิธีที่กำหนด

2. ประเมินความงอกเมื่อต้นอ่อนกาแฟมีใบเลี้ยง ประเมินดังนี้

- ต้นอ่อนปกติ
- ต้นอ่อนผิดปกติ
- เมล็ดแข็ง
- เมล็ดสดไม่งอก
- เมล็ดตาย

- ความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์ = ผลบวกของ $\left[\dfrac{\text{จำนวนต้นกล้าที่งอก}}{\text{จำนวนวันหลังเพาะ}} \right]$

3. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยใช้ DMRT (Duncan’s New Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การบันทึกข้อมูล

1. ความงอกมาตรฐานของเมล็ดพันธุ์
2. ความเร็วในการงอก
3. จำนวนวันงอก

- เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม 2560 – สิ้นสุด กันยายน 2562
ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

ผลการวิจัย (Results) และอภิปรายผล (Discussion)

ผลการศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์กาแฟในห้องปฏิบัติการในปี 2561 ความงอกของเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์เชียงใหม่ 80 ที่ผ่านการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอกด้วยวิธีการต่างๆ พบว่า การเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 20 - 30°C มีผลให้ความงอกเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 53% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C และการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอกโดยการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก มีผลให้ความงอกเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 87% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับวิธีการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอกด้วยวิธีการอื่นๆ และพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเตรียมเมล็ดกาแฟก่อนเพาะความงอกกับอุณหภูมิที่แตกต่างในการเพาะความงอก โดยที่การเตรียมเมล็ดกาแฟก่อนเพาะความงอกโดยการไม่แช่น้ำมีความงอกแตกต่างกัน โดยที่การเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 20 - 30°C มีความงอก 70% และการเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C มีความงอก 33% ส่วนวิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก อุณหภูมิทั้ง 2 อุณหภูมิที่ใช้เพาะความงอก มีผลให้ความงอกไม่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30°C มีความงอก 84% และ ความงอก 90% ที่อุณหภูมิ 20 - 30°C (ตารางที่ 1) ซึ่งการเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C โดยการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก (ประเมินความงอกที่ 37 วัน) เนื่องจากเมล็ดกาแฟเริ่มงอกเป็นต้นกล้าปกติหลังจากเพาะ 20 วัน ส่วนการเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 20-30°C โดยการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก (ประเมินความงอกที่ 49 วัน) ส่วนความเร็วในการงอกพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเตรียมเมล็ดกาแฟก่อนเพาะความงอกกับอุณหภูมิที่แตกต่างในการเพาะความงอก กล่าวคือ วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกก่อนเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C มีความเร็วในการงอก 3.48 สูงกว่าเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 20-30°C ซึ่งมีความเร็วในการงอก 2.73 ซึ่งจะเห็นได้ว่า การเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C เมล็ดกาแฟสามารถงอกได้เร็วกว่าการเพาะที่อุณหภูมิ 20-30°C (ตารางที่ 2) ในปี 2562 เมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์เชียงใหม่ 80 ที่ผ่านการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอกด้วยวิธีการต่างๆ พบว่า การเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 20 - 30°C มีผลให้ความงอกเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 52% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C และการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอกโดยการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก มีผลให้ความงอกเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 90% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับวิธีการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอกด้วยวิธีการอื่นๆ และพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเตรียมเมล็ดกาแฟก่อนเพาะความงอกกับอุณหภูมิที่แตกต่างในการเพาะความงอก โดยที่วิธีการเตรียมเมล็ดโดยการไม่แช่น้ำและการแช่น้ำ 12 ชั่วโมง การเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 20 - 30°C มีความงอก 78และ 53% แตกต่างกับการเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C มีความงอก 48 และ 41% ส่วนกรรมวิธีอื่นๆไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 3) สำหรับความเร็วในการงอกพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเตรียม

เมล็ดกาแฟก่อนเพาะความงอกกับอุณหภูมิที่แตกต่างในการเพาะความงอก กล่าวคือ วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกก่อนเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C มีความเร็วในการงอก 3.19 สูงกว่าเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 20-30°C ซึ่งมีความเร็วในการงอก 2.63 (ตารางที่ 4) ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปี 2561

สำหรับเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์ ในปี 2561 พบว่า การเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C และ 20-30°C วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกก่อนเพาะความงอกมีความงอกสูงสุดคือ 92% และ 93% มีความแตกต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ และพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเตรียมเมล็ดกาแฟก่อนเพาะความงอกกับอุณหภูมิที่แตกต่างในการเพาะความงอก โดยที่วิธีการเตรียมเมล็ดโดยการไม่แช่น้ำและการแช่น้ำ 12 ชั่วโมง การเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 20 - 30°C มีความงอก 67 และ 34% แตกต่างกับการเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C มีความงอก 21 และ 9% ส่วนวิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกก่อนเพาะความงอกไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 5) สำหรับความเร็วในการงอกพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเตรียมเมล็ดกาแฟก่อนเพาะความงอกกับอุณหภูมิที่แตกต่างในการเพาะความงอก กล่าวคือ วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกก่อนเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C มีความเร็วในการงอก 3.82 สูงกว่าเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 20-30°C ซึ่งมีความเร็วในการงอก 2.60 (ตารางที่ 6) ในปี 2562 เมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์ H528/46 ที่ผ่านการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอกด้วยวิธีการต่างๆ พบว่า การเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C และ 20-30°C วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกก่อนเพาะความงอกมีความงอกสูงสุดคือ 81% และ 84% มีความแตกต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ และพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเตรียมเมล็ดกาแฟก่อนเพาะความงอกกับอุณหภูมิที่แตกต่างในการเพาะความงอก โดยที่วิธีการเตรียมเมล็ดโดยการไม่แช่น้ำและการแช่น้ำ 48 ชั่วโมง การเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 20 - 30°C มีความงอก 50 และ 25% แตกต่างกับการเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C มีความงอก 28 และ 11% ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 7) สำหรับความเร็วในการงอกพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเตรียมเมล็ดกาแฟก่อนเพาะความงอกกับอุณหภูมิที่แตกต่างในการเพาะความงอก พบว่า การเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C และ 20-30°C วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกก่อนเพาะความงอกมีความเร็วในการงอกสูงสุดคือ 2.90 และ 2.39 มีความแตกต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ แต่วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกก่อนเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30°C มีความเร็วในการงอกสูงกว่าเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 20-30°C (ตารางที่ 8) ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปี 2561

ตารางที่ 1 ความงอก (%) ของเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์เชียงใหม่ 80 ที่เตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนเพาะความงอก 6 วิธีการ และอุณหภูมิในการเพาะความงอก 2 อุณหภูมิ ณ ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ปี 2561

วิธีการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอก (P)	อุณหภูมิในการเพาะความงอก (T)		P – MEAN[1/]
	30°C[1/]	20-30 °C[1/]	
1. ไม่แช่น้ำ[2/]	33b B	70b A	51b
2. แช่น้ำ 12 ชั่วโมง[2/]	12c B	40d A	26c
3. แช่น้ำ 24 ชั่วโมง[2/]	33b A	27d A	30c
4. แช่น้ำ 48 ชั่วโมง[2/]	28b A	41cd A	34c
5. แช่น้ำ 72 ชั่วโมง [2/]	25bc B	54c A	39bc
6. ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก[2/]	84a A	90a A	87a
T –MEAN[2/]	36B	53A	44
F-test (T)	**		
F-test (P)	**		
F-test (TxP)	**		
CV (%)	20.81		

** significant at $p \leq 0.01$

[1/] In a column, values followed by a common lowercase letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

[2/] In a row, values followed by a capital letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

หมายเหตุ : วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30 °C ประเมินความงอกที่ 37 วัน ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ ประเมินความงอกที่ 49 วัน

ตารางที่ 2 ความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์เชียงใหม่ 80 ที่เตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนเพาะความงอก 6 วิธีการ และอุณหภูมิในการเพาะความงอก 2 อุณหภูมิ ณ ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ปี 2561

วิธีการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอก (P)	อุณหภูมิในการเพาะความงอก (T)		P – MEAN[1/]
	30°C[1/]	20-30 °C[1/]	
1. ไม่แช่น้ำ[2/]	0.87b B	1.58b A	1.22b
2. แช่น้ำ 12 ชั่วโมง[2/]	0.26c B	0.86cd A	0.56c
3. แช่น้ำ 24 ชั่วโมง[2/]	0.85b A	0.57d A	0.71c
4. แช่น้ำ 48 ชั่วโมง[2/]	0.64b A	0.87cd A	0.75c
5. แช่น้ำ 72 ชั่วโมง [2/]	0.59bc B	1.15c A	0.87c
6. ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก[2/]	3.48a A	2.73a B	3.10a
T –MEAN[2/]	11A	1.29A	1.20
F-test (T)	**		
F-test (P)	**		
F-test (TxP)	**		
CV (%)	17.99		

** significant at $p \leq 0.01$

[1/] In a column, values followed by a common lowercase letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

[2/] In a row, values followed by a capital letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

หมายเหตุ : วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30 °C ประเมินความงอกที่ 37 วัน ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ ประเมินความงอกที่ 49 วัน

ตารางที่ 3 ความงอก (%) ของเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์เชียงใหม่ 80 ที่เตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนเพาะความงอก 6 วิธีการ และอุณหภูมิในการเพาะความงอก 2 อุณหภูมิ ณ ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ปี 2562

วิธีการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอก (P)	อุณหภูมิในการเพาะความงอก (T)		P – MEAN[1/]
	30°C[1/]	20-30 °C[1/]	
1. ไม่แช่น้ำ[2/]	48b B	78b A	63b
2. แช่น้ำ 12 ชั่วโมง[2/]	41bc B	53c A	47c
3. แช่น้ำ 24 ชั่วโมง[2/]	20d A	29de A	25de
4. แช่น้ำ 48 ชั่วโมง[2/]	18d A	23e A	20e
5. แช่น้ำ 72 ชั่วโมง [2/]	33c A	35d A	34d
6. ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก[2/]	86a A	94a A	90a
T –MEAN[2/]	41B	52A	46
F-test (T)	**		
F-test (P)	**		
F-test (TxP)	**		
CV (%)	15.38		

** significant at $p \leq 0.01$

[1/] In a column, values followed by a common lowercase letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

[2/] In a row, values followed by a capital letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

หมายเหตุ : วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30 °C ประเมินความงอกที่ 37 วัน ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ ประเมินความงอกที่ 49 วัน

ตารางที่ 4 ความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์เชียงใหม่ 80 ที่เตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนเพาะความงอก 6 วิธีการ และอุณหภูมิในการเพาะความงอก 2 อุณหภูมิ ณ ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ปี 2562

วิธีการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอก (P)	อุณหภูมิในการเพาะความงอก (T)		P – MEAN[1/]
	30°C[1/]	20-30 °C[1/]	
1. ไม่แช่น้ำ[2/]	1.00b B	1.63b A	1.31b
2. แช่น้ำ 12 ชั่วโมง[2/]	0.90bc A	1.10c A	1.00c
3. แช่น้ำ 24 ชั่วโมง[2/]	0.41d A	0.61d A	0.51de
4. แช่น้ำ 48 ชั่วโมง[2/]	0.38d A	0.48d A	0.43e
5. แช่น้ำ 72 ชั่วโมง [2/]	0.71c A	0.73d A	0.72d
6. ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก[2/]	3.19a A	2.63a B	2.91a
T –MEAN[2/]	1.10	1.20	1.15
F-test (T)	ns		
F-test (P)	**		
F-test (TxP)	**		
CV (%)	15.27		

** significant at $p \leq 0.01$

[1/] In a column, values followed by a common lowercase letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

[2/] In a row, values followed by a capital letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

หมายเหตุ : วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30 °C ประเมินความงอกที่ 37 วัน ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ ประเมินความงอกที่ 49 วัน

ตารางที่ 5 ความงอก (%) ของเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์ H528/46 ที่เตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนเพาะความงอก 6 วิธีการ และอุณหภูมิในการเพาะความงอก 2 อุณหภูมิ ณ ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ปี 2561

วิธีการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอก (P)	อุณหภูมิในการเพาะความงอก (T)		P – MEAN[1/]
	30°C[1/]	20-30 °C[1/]	
1. ไม่แช่น้ำ[2/]	21cd B	67b A	44b
2. แช่น้ำ 12 ชั่วโมง[2/]	9d B	34c A	21c
3. แช่น้ำ 24 ชั่วโมง[2/]	28bc A	12d A	20c
4. แช่น้ำ 48 ชั่วโมง[2/]	44b A	22cd B	33bc
5. แช่น้ำ 72 ชั่วโมง [2/]	24cd A	28cd A	26c
6. ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก[2/]	92a A	93a A	93a
T –MEAN[2/]	36A	43A	39
F-test (T)	*		
F-test (P)	**		
F-test (TxP)	**		
CV (%)	28.89		

** significant at $p \leq 0.01$

[1/] In a column, values followed by a common lowercase letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

[2/] In a row, values followed by a capital letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

หมายเหตุ : วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30 °C ประเมินความงอกที่ 37 วัน ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ ประเมินความงอกที่ 49 วัน

ตารางที่ 6 ความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์ H528/46 ที่เตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนเพาะความงอก 6 วิธีการ และอุณหภูมิในการเพาะความงอก 2 อุณหภูมิ ณ ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ปี 2561

วิธีการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอก (P)	อุณหภูมิในการเพาะความงอก (T)		P – MEAN[1/]
	30°C[1/]	20-30 °C[1/]	
1. ไม่แช่น้ำ[2/]	0.53c B	1.41b A	0.97b
2. แช่น้ำ 12 ชั่วโมง[2/]	0.20c B	0.74c A	0.47b
3. แช่น้ำ 24 ชั่วโมง[2/]	0.69c A	0.26c A	0.47b
4. แช่น้ำ 48 ชั่วโมง[2/]	1.15b A	0.49c B	0.82b
5. แช่น้ำ 72 ชั่วโมง [2/]	0.56c A	0.60c A	0.58b
6. ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก[2/]	3.82a A	2.60a B	3.21a
T –MEAN[2/]	1.16	1.02	1.09
F-test (T)	ns		
F-test (P)	**		
F-test (TxP)	**		
CV (%)	28.42		

** significant at $p \leq 0.01$

[1/] In a column, values followed by a common lowercase letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

[2/] In a row, values followed by a capital letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

หมายเหตุ : วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30 °C ประเมินความงอกที่ 37 วัน ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ ประเมินความงอกที่ 49 วัน

ตารางที่ 7 ความงอก (%) ของเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์ H528/46 ที่เตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนเพาะความงอก 6 วิธีการ และอุณหภูมิในการเพาะความงอก 2 อุณหภูมิ ณ ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ปี 2562

วิธีการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอก (P)	อุณหภูมิในการเพาะความงอก (T)		P – MEAN[1/]
	30°C[1/]	20-30 °C[1/]	
1. ไม่แช่น้ำ[2/]	28b B	50b A	39b
2. แช่น้ำ 12 ชั่วโมง[2/]	12c A	16c A	14c
3. แช่น้ำ 24 ชั่วโมง[2/]	13c A	20c A	17c
4. แช่น้ำ 48 ชั่วโมง[2/]	11c B	25c A	18c
5. แช่น้ำ 72 ชั่วโมง [2/]	18c A	15c A	17c
6. ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก[2/]	81a A	84a A	83a
T –MEAN[2/]	27A	35A	31
F-test (T)	**		
F-test (P)	**		
F-test (TxP)	**		
CV (%)	20.73		

** significant at $p \leq 0.01$

[1/] In a column, values followed by a common lowercase letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

[2/] In a row, values followed by a capital letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

หมายเหตุ : วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30 °C ประเมินความงอกที่ 37 วัน ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ ประเมินความงอกที่ 49 วัน

ตารางที่ 8 ความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้าพันธุ์ H528/46 ที่เตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนเพาะความงอก 6 วิธีการ และอุณหภูมิในการเพาะความงอก 2 อุณหภูมิ ณ ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ปี 2562

วิธีการเตรียมเมล็ดก่อนเพาะความงอก (P)	อุณหภูมิในการเพาะความงอก (T)		P – MEAN[1/]
	30°C[1/]	20-30 °C[1/]	
1. ไม่แช่น้ำ[2/]	0.59b B	1.04b A	0.82b
2. แช่น้ำ 12 ชั่วโมง[2/]	0.27c A	0.34c A	0.30c
3. แช่น้ำ 24 ชั่วโมง[2/]	0.29c A	0.41c A	0.35c
4. แช่น้ำ 48 ชั่วโมง[2/]	0.22c B	0.53c A	0.37c
5. แช่น้ำ 72 ชั่วโมง [2/]	0.40bc A	0.32c A	0.36c
6. ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก[2/]	2.90a A	2.39a B	2.64a
T –MEAN[2/]	0.78	0.84	0.81
F-test (T)	ns		
F-test (P)	**		
F-test (TxP)	**		
CV (%)	18.00		

** significant at $p \leq 0.01$

[1/] In a column, values followed by a common lowercase letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

[2/] In a row, values followed by a capital letter are not significantly different by Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$)

หมายเหตุ : วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกเพาะความงอกที่อุณหภูมิ 30 °C ประเมินความงอกที่ 37 วัน ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ ประเมินความงอกที่ 49 วัน

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

สำหรับวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์กาแฟในห้องปฏิบัติการไม่มีระบุในกฎของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (ISTA,) ในส่วนของกรมวิชาการเกษตรได้ผลิตเมล็ดพันธุ์กาแฟอาราบิก้า อย่างต่อเนื่อง ซึ่งในกระบวนการผลิตเมล็ดพันธุ์ไม่ได้ผ่านกระบวนการตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพเมล็ดพันธุ์ในห้องปฏิบัติการก่อนที่จะนำเมล็ดพันธุ์ไปใช้ ดังนั้น วิธีการเตรียมเมล็ดกาแฟก่อนเพาะความงอกและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเพาะความงอกเมล็ดกาแฟอาราบิก้าพันธุ์เชียงใหม่ 80 และพันธุ์ H528/46 ในห้องปฏิบัติการ คือ วิธีการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกก่อนเพาะความงอก อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะความงอก 30 °C ระยะเวลาทดสอบความงอก จำนวน 37 วัน

การทดลองที่ 9 การศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพที่มีประสิทธิภาพในการประเมินอายุการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน

The Efficiency of Seed Quality Testing Methods on Sweet Corn Seed Storability Evaluation

ผู้วิจัย

ภภัสสร วัฒนกุลภาคิน	Papassorn Wattanakulpakin	ศวม.พิษณุโลก
ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	Supalak Sattayasamitsathit	ศวม.พิษณุโลก
กัณทิมา ทองศรี	Kantima Thongsri	ศวม.พิษณุโลก

บทคัดย่อ

วิธีการตรวจสอบคุณภาพเป็นเครื่องมือสำคัญในการประเมินอายุการเก็บรักษาและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพที่มีประสิทธิภาพต่อการประเมินอายุการเก็บรักษาและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน 3 พันธุ์ โดยทำการศึกษาสภาวะการเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 และ 43 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 84 และ 96 ชั่วโมง เพื่อใช้ประเมินความแข็งแรงและอายุการเก็บรักษา ผลการทดลองพบว่าสภาวะการเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง สามารถแยกความแข็งแรงเมล็ดพันธุ์และประเมินอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานได้ ภายหลังการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานทั้งสามพันธุ์ที่บรรจุในถุงโพลีเอทธิลีนเป็นเวลา 10 เดือนที่อุณหภูมิห้องโดยทำการวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดพันธุ์ทุกเดือน ผลการทดลองพบว่าความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานทั้งสามพันธุ์ลดลงตามอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้น โดยพันธุ์ SK และ PF มีอายุการเก็บรักษา 7 เดือน ในขณะที่พันธุ์ SW เก็บรักษาได้นาน 4 เดือน และจากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) ระหว่างความงอกและ

ความความแข็งแรง ได้แก่ ความงอกภายหลังการเร่งอายุ การแทงราก และความงอกในสภาพไร่ พบค่าความสัมพันธ์แบบเชิงบวกซึ่งให้ค่าค่อนข้างสูงทั้งสามพันธุ์ (0.7513 ≤ r ≥ 0.9828) สำหรับค่าการนำไฟฟ้าและปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ให้ค่าความสัมพันธ์เชิงลบกับความงอกและความแข็งแรงอื่นๆ โดยค่า r ที่วิเคราะห์ได้ค่อนข้างแปรปรวนซึ่งอาจมีผลจากความแตกต่างของพันธุ์ วิธีการตรวจสอบดังกล่าวจึงไม่แนะนำสำหรับการตรวจสอบความแข็งแรงในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน ดังนั้นการตรวจสอบความแข็งแรงโดยการเร่งอายุ การแทงราก และความงอกในสภาพไร่จึงเป็นวิธีการตรวจสอบความแข็งแรงที่เหมาะสมและแนะนำสำหรับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน
คำสำคัญ : เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

ABSTRACT

Seed quality testing method is an important tool for seed storability and vigor determination. This research purposed to study the advantage seed quality testing methods to evaluate seed storage and vigor of three varieties sweet corn seeds. The aging conditions; 41 and 43°C and incubation times for 72, 84 and 96 h were studied to obtain the suitable conditions for seed vigor and shelf life examination. The research found that the aging condition at 41°C for 96 h could categorize seed vigor levels among three varieties and evaluate storability of sweet corn seeds. Thereafter, three varieties of sweet corn seeds were packed in polyethylene bag and kept for 10 months at ambient temperature. The qualities of sweet corn seeds were observed every month. The experiment showed that the vigor of three varieties sweet corn seeds decreased with the increased storage time. The storability of var. SK and PF were 7 months, but only 4 months storage found in SW variety. Moreover, the analysis of correlation coefficients (r) between germination and vigor including germination after accelerated aging, radicle emergence, and field emergence exhibited the highly positive correlation for all varieties (0.7513 ≤ r ≥ 0.9828). The electrical conductivity and soluble sugar content showed the negative correlation with the germination and vigor. However, these correlations were varied among three varieties, depended on its varieties. Then, these two methods do not recommend for vigor test in sweet corn seeds. Our research suggests that germination after accelerated aging, radicle emergence, and field emergence tests are applicable methods and introduce for vigor test of sweet corn seeds.
Keyword: Sweet corn seeds Seed quality test

บทนำ (Introduction)

ข้าวโพดหวานเป็นผลิตผลทางการเกษตรที่ได้รับความนิยมในการบริโภคทั้งในรูปฝักสดและการแปรรูป ดังนั้นปริมาณความต้องการของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานจึงสูงตามไปด้วย จากรายงานของสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร พบว่าในปี 2558 ประเทศไทยส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานจำนวน 3,140 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 218 ล้านบาท ซึ่งเป็นอันดับที่ 6 ของเมล็ดพันธุ์ที่ส่งออกมากที่สุด 10 อันดับแรกของประเทศ หน่วยงานทั้งภาครัฐและภาคเอกชนที่ทำการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานจึงให้ความสำคัญในด้านการจัดการเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อให้ได้คุณภาพตามมาตรฐานการส่งออก ซึ่งตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช 2518 กำหนดให้เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานต้องมีความงอกและความบริสุทธิ์ เท่ากับ 60% และ 96% ตามลำดับ

คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ สามารถบ่งบอกได้ถึงความสามารถในการงอก การแข่งขันในสภาพแปลงปลูก และความสามารถในการเก็บรักษา (จวงจันทร์, 2529) คุณสมบัติเหล่านี้สามารถตรวจสอบได้โดยการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมทำควบคู่ไปกับการตรวจสอบความงอกมาตรฐาน เพื่อเป็นการประเมินศักยภาพของเมล็ดพันธุ์แต่ละกอง (Lot) ก่อนที่จะจำหน่ายหรือส่งออก วิธีตรวจสอบความแข็งแรงในปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น วิธีการเร่งอายุ การวัดค่าการนำไฟฟ้า ความเร็วในการงอก ดัชนีการงอก การทดสอบในสภาพอากาศเย็น เป็นต้น แต่วิธีการที่นิยมตรวจสอบความแข็งแรงในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานโดยทั่วไป เช่น วิธีการเร่งอายุ (Hampton and Tekrony, 1995; วราภรณ์ และ สุนันทา, 2547) เปอร์เซ็นต์การแทงราก (ISTA, 2016) การทดสอบในสภาพอากาศเย็น (AOSA, 1983) และ ค่าการนำไฟฟ้า (Hampton and Tekrony, 1995; วราภรณ์ และ สุนันทา, 2547) สำหรับวิธีการเร่งอายุพบว่ามีความสัมพันธ์กับการงอกในสภาพไร่ (Hampton and Tekrony, 1995; วราภรณ์ และ สุนันทา, 2547) และอายุการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน (Hampton and Tekrony, 1995; บุญมี และ วิทวัส, 2551) และถั่วเหลือง (AOSA, 1983, Hampton and Tekrony, 1995) นอกจากนี้พบค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าการนำไฟฟ้ากับความงอกในสภาพไร่ในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน (วราภรณ์ และ สุนันทา, 2547) และทานตะวัน (Szemruch et al. 2015) ในปี 2007 Zhao และคณะ พบว่า volatile aldehyde และ dehydrogenase activity มีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด super sweet และ sugar-enhanced sweet corn ตามลำดับ สุจิตรา (2544) พบว่าการเร่งอายุที่ 41 และ 42 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง และ 43 นาน 72 ชั่วโมง สามารถประเมินคุณภาพเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานที่เก็บ

รักษาได้นาน 4 เดือน จากงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์นั้นมีหลายวิธี และวิธีการเร่งอายุเป็นวิธีที่นิยมสำหรับประเมินอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามการเร่งอายุรวมเวลาประเมินผลของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานใช้เวลาประมาณ 10-11 วัน จึงควรมีการศึกษาและคัดเลือกวิธีการตรวจสอบคุณภาพที่ใช้กันในปัจจุบันมาประยุกต์ใช้ในการประเมินอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ โดยสิ่งที่ควรคำนึงถึงในการเลือกวิธีการตรวจสอบ คือ ความแม่นยำ ถูกต้อง รวดเร็ว ประหยัด และปลอดภัย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพที่มีประสิทธิภาพในการประเมินความสามารถในการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน และเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีการตรวจสอบคุณภาพในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน 3 พันธุ์ กรมวิชาการเกษตร 2 พันธุ์ และเอกชน 1 พันธุ์
2. สารเคมี ได้แก่ anthrone, glucose standard, electrical conductivity standard
3. อุปกรณ์สำหรับทดสอบความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ได้แก่

1. การเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง
2. การเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เวลา 84 ชั่วโมง
3. การเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เวลา 96 ชั่วโมง
4. การเร่งอายุที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง
5. การเร่งอายุที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เวลา 84 ชั่วโมง
6. การเร่งอายุที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เวลา 96 ชั่วโมง

วิธีดำเนินงาน/ขั้นตอนการวิจัย

1. นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานทั้ง 3 พันธุ์ มาเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 และ 43 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72, 84 และ 96 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 98±2 จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด ตามกรรมวิธีที่กำหนด จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ไปตรวจสอบคุณภาพ ดังนี้ ความชื้น ความงอกมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การแทงราก ระยะเวลาเฉลี่ยในการงอก ความงอกในสภาพไร่ ค่าการนำไฟฟ้า และปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ ตามวิธีการบันทึกข้อมูล (ข้อ 3)

2. นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานทั้ง 3 พันธุ์ มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 เดือน หรือจนกระทั่งเสื่อมความงอก โดยบรรจุด้วยถุงโพลีเอทธิลีน (ชนิดที่ใช้ในการค้า) จำนวน 150 กรัมต่อถุง ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ ตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน โดยทำการบันทึกผล ได้แก่ ความชื้น ความงอกมาตรฐาน การเร่งอายุ เปอร์เซ็นต์การแทงราก ระยะเวลาเฉลี่ยในการงอก ความงอกในสภาพไร่ ค่าการนำไฟฟ้า และปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ ตามวิธีการบันทึกข้อมูล (ข้อ 3) ทุกๆ 1 เดือน ตั้งแต่เดือนที่ 0 ถึงเดือนที่ 6 ของการเก็บรักษาหรือจนหมดอายุการเก็บรักษา (ความงอกต่ำกว่า 65% ตามข้อกำหนดของ พระราชบัญญัติพันธุ์พืช 2518)

3. การบันทึกข้อมูล

3.1 ความชื้น (moisture test, MC) นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานมาบดละเอียดด้วยเครื่องบด ชั่งน้ำหนัก 4.5±0.5 กรัมต่อซ้ำ อบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 ชั่วโมง นำไปไว้ในโถดูดความชื้นประมาณ 30 นาที คำนวณน้ำหนักที่หายไป รายงานผลเป็นร้อยละ (ISTA, 2016)

3.2 ความงอกมาตรฐาน (standard germination, G) ทำการเพาะเมล็ดโดยวิธีการเพาะระหว่างกระดาษ (between paper) จำนวน 100 เมล็ดต่อซ้ำ เก็บไว้ในห้องเพาะความงอกอุณหภูมิสลับ 20-30 องศาเซลเซียส ประเมินความงอกที่อายุ 7 วัน (ISTA, 2016)

3.3 ความงอกภายหลังการเร่งอายุ (Germination after accelerated aging, GAA) นำเมล็ดไปเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 98±2 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (Hampton and Tekrony, 1995) จำนวน 100 เมล็ดต่อซ้ำ เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดไปเพาะความงอกตามวิธีการทดสอบความงอกมาตรฐาน

3.4 เปอร์เซ็นต์การแทงราก (radical emergence percentage, RE) เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดแบบ between paper จำนวน 25 เมล็ดต่อม้วน จำนวน 8 ม้วนต่อตัวอย่าง นำไปเก็บไว้ในห้องเพาะที่อุณหภูมิ 20±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 66 ชั่วโมง±15 นาที หลังจากนั้นนับเฉพาะเมล็ดที่มีความยาวรากประมาณ 2 มิลลิเมตร รายงานผลเป็นร้อยละ (ISTA, 2016)

3.5 ความงอกในสภาพไร่ (field emergence, FE) นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานไปปลูกในแปลงปลูกจำนวน 100 เมล็ดต่อซ้ำ แล้วประเมินความงอกที่อายุ 14 วัน หลังปลูก

3.6 ค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity, EC)

เตรียมเมล็ดจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 50 เมล็ด ทำการบันทึกน้ำหนักเมล็ดในแต่ละซ้ำ ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ที่เตรียมไว้ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุน้ำกลั่นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แกว่งขวดเบาๆ เพื่อให้เมล็ดจมน้ำ ปิดฝาด้วยกระดาษฟอยล์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง conductivity meter (ISTA, 2016) แล้วนำมาคำนวณ ดังสูตร

ค่าการนำไฟฟ้า ($\mu s\ cm^{-1}g^{-1}$) = ค่าการนำไฟฟ้า ($\mu s\ cm^{-1}$) / น้ำหนักเมล็ด (กรัม)

3.7 ปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ (soluble sugar content, SS)

นำสารละลายจากการวัดค่าการนำไฟฟ้าของแต่ละตัวอย่างมาทดสอบปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ ตามวิธีของ Zhao et al. (2007) ปิเปตสารละลายจำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม anthrone จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำสารละลายที่ได้ไปวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟกลูโคสมาตรฐาน เพื่อคำนวณปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ รายงานผลในหน่วย มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเมล็ด (กรัม)

4. วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; *r*) นำผลการทดลองมาหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความงอกภายหลังการเร่งอายุกับคุณภาพด้านต่างๆ ในระหว่างการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานแต่ละสายพันธุ์

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น 1 ตุลาคม 2560 สิ้นสุด 30 กันยายน 2562

ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ตำบลวังทอง อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก

ผลการวิจัย (Results) และอภิปรายผล (Discussion)

คุณภาพเบื้องต้นของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานทั้งสามพันธุ์ก่อนการเก็บรักษาพบว่า พันธุ์ SW มีความชื้น เท่ากับ 12.7% ในขณะที่ PF และ SK มีความชื้นประมาณ 10% ความงอกพันธุ์ PF มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 98% รองลงมาคือ SK และ SW เท่ากับ 97 และ 94 ตามลำดับ ความแข็งแรงวัดโดยความงอกภายหลังการเร่งอายุ การแทงราก และความงอกในสภาพไร่ พบว่าพันธุ์ SK มีค่าเท่ากับ 95 79 และ 97% พันธุ์ PF เท่ากับ 96 89 และ 95% ส่วน SW มีค่าเท่ากับ 85 93 และ 92% ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความชื้น (MC) ความงอก (G) การแทงราก (RE) และความงอกในสภาพไร่ (FE) ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน 3 พันธุ์ ก่อนการเก็บรักษา

Varieties	MC (%)	G (%)	GAA (%)	RE (%)	FE (%)
SK	10.0	97	95	79	97
PF	10.2	98	96	89	95
SW	12.7	94	85	93	92

ตารางที่ 2 ความชื้น (MC) ความงอก (G) การแทงราก (RE) ค่าการนำไฟฟ้า (EC) ความงอกในสภาพไร่ (FE) และ ปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ (SS) ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน 3 พันธุ์ ที่ผ่านการเร่งอายุในสภาวะต่างๆ

Varieties	Aging conditions		MC	G	RE	FE	EC	SS
	Temperature (°C)	Time (h)	(%)	(%)	(%)	(%)	(μscm^{-1}g^{-1})	(μg glucose/g)
SK	41	72	12.0a	95a	71a	97a	61.200bc	111.62a
		84	12.0a	92a	65ab	89ab	56.975c	58.31b
		96	11.8a	86b	67ab	82bc	67.525ab	63.05b
	43	72	11.6b	94a	56bc	90ab	65.500ab	106.04a
		84	11.7b	94a	53c	92a	67.275ab	68.07b
		96	11.6b	87b	53c	78c	68.850a	61.83b
	F-test		**	**	**	**	*	ns
	C.V.		0.796	2.418	12.040	6.147	8.091	20.697
PF	41	72	11.4d	97ab	86	98a	58.950	72.14ab
		84	11.6c	95abc	85	93bc	67.075	57.24abc
		96	11.7ab	91d	92	82d	65.850	49.27c
	43	72	11.7ab	98a	88	96ab	61.825	76.22a
		84	11.8a	93bcd	90	93c	60.925	50.93abc
		96	11.8a	93bcd	91	91c	54.425	37.79c
	F-test		**	**	ns	**	ns	*
	C.V.		0.784	2.216	5.259	2.578	10.898	24.761
SW	41	72	10.7d	86ab	91a	87bc	61.300	78.85
		84	11.0d	81c	90a	82d	61.600	78.56
		96	10.7d	80c	88a	80d	60.325	73.84
	43	72	10.9c	90a	88a	93a	56.800	75.37
		84	11.2b	88a	88a	88b	51.775	72.07
		96	11.5a	83bc	74b	83cd	63.275	84.90
	F-test		**	**	**	**	ns	ns
	C.V.		0.589	3.571	4.099	3.399	9.968	24.217

หมายเหตุ; ในแนวเดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 3 อิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการเร่งอายุในสภาวะต่างๆต่อความชื้น (MC) ความงอก (G) การแทงราก (RE) ค่าการนำไฟฟ้า (EC) ความงอกในสภาพไร่ (FE) และ ปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ (SS) ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน 3 พันธุ์

Varieties	Aging conditions		MC	G	RE	FE	EC	SS
			(%)	(%)	(%)	(%)	($\mu scm^{-1}g^{-1}$)	(µg glucose/g)
SK	Temperature (°C)	41	11.96a	91.1	67.5a	89.2	8.92a	77.65
		43	11.63b	91.5	54.0b	86.4	8.23b	78.65
	Time (h)	72	11.8	94.6a	63.2	93.4a	8.37b	108.83a
		84	11.8	92.8a	60.0	90.0a	8.11b	63.19b
		96	11.7	86.5b	59.0	80.0b	9.24a	62.44b
F-test	Temperature		**	ns	**	ns	*	ns
	Time		ns	**	ns	**	*	**
	Temp. x Time		ns	ns	ns	ns	ns	ns
PF	Temperature (°C)	41	11.57b	94.2	87.5	90.9b	8.81	59.55
		43	11.76a	94.6	89.5	93.3a	8.12	54.98
	Time (h)	72	11.5c	97.0a	87.0	97.1a	8.19	74.18a
		84	11.7b	94.1b	87.3	92.9b	8.32	54.08b
		96	11.8a	92.0b	91.3	86.3c	8.89	43.53b
F-test	Temperature		**	ns	ns	*	ns	ns
	Time		**	**	ns	**	ns	**
	Temp. x Time		ns	ns	ns	**	ns	ns
SW	Temperature (°C)	41	10.7b	82.2b	89.3a	82.5b	13.50a	77.76
		43	11.2a	87.3a	83.2b	87.8a	12.65b	77.45
	Time (h)	72	10.8c	88.1a	89.3a	89.5a	12.98	74.61
		84	11.0b	84.4b	88.8a	84.6b	12.50	75.31
		96	11.1c	81.5b	80.8b	81.3c	13.75	82.88
F-test	Temperature		**	**	**	**	ns	ns
	Time		**	**	**	**	ns	ns
	Temp. x Time		**	ns	**	ns	ns	ns

หมายเหตุ; ในแนวเดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ภายหลังการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานทั้ง 3 พันธุ์ ที่อุณหภูมิ 41 และ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 84 และ 96 ชั่วโมง พบว่า เมล็ดพันธุ์มีความชื้นอยู่ในช่วง 10.7-12.0% การเร่งอายุที่อุณหภูมิสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้นมีแนวโน้มให้เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานมีความงอกและความแข็งแรงลดลง จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเร่งอายุ (อุณหภูมิ 41 และ 43 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 - 96 ชั่วโมง) ไม่ทำให้ความงอก การแทงราก ความงอกในสภาพไร่ ค่าการนำไฟฟ้า และปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้แตกต่างกันในพันธุ์ SK ส่วนในพันธุ์ PF พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความงอกในสภาพไร่เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามพันธุ์ SW ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการเร่งอายุส่งผลต่อความชื้นและการแทงราก แต่ไม่มีผลต่อความงอก ความงอกในสภาพไร่ ค่าการนำไฟฟ้า และปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ (ตารางที่ 2 และ 3) และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของระยะเวลาพบว่าระยะเวลาที่ 72 และ 84 ชั่วโมงให้ผลการทดสอบความงอก การแทงราก และความงอกในสภาพไร่ใกล้เคียงกันทั้งสามพันธุ์ แต่ที่เวลา 96 ชั่วโมง มีแนวโน้มทำให้เมล็ดพันธุ์มีความแข็งแรงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งสามพันธุ์ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสภาวะการเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 และ 43 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 - 84 ชั่วโมง ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกันแต่ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ทำให้คุณภาพเมล็ดพันธุ์ลดลงโดยเฉพาะความงอกและความงอกในสภาพไร่ ดังนั้นการเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 96 ชั่วโมง จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมมากกว่าสภาวะอื่นๆ เนื่องจากสามารถแยกความแข็งแรงได้ อีกทั้งเมื่อนำไปพิจารณาร่วมกับความงอกและความงอกในสภาพไร่ระหว่างการเก็บรักษา (ตารางที่ 4) พบว่าความงอกภายหลังการเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 96 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกับความงอกและความงอกในสภาพไร่ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานพันธุ์ SK และ PF ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือนที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 2 3 และ 4) ในขณะที่พันธุ์ SW ซึ่งมีความแข็งแรงต่ำกว่าพันธุ์อื่นๆ ความงอกภายหลังการเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ใกล้เคียงกับความงอกและความงอกในสภาพไร่ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือนที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 2 3 และ 4)

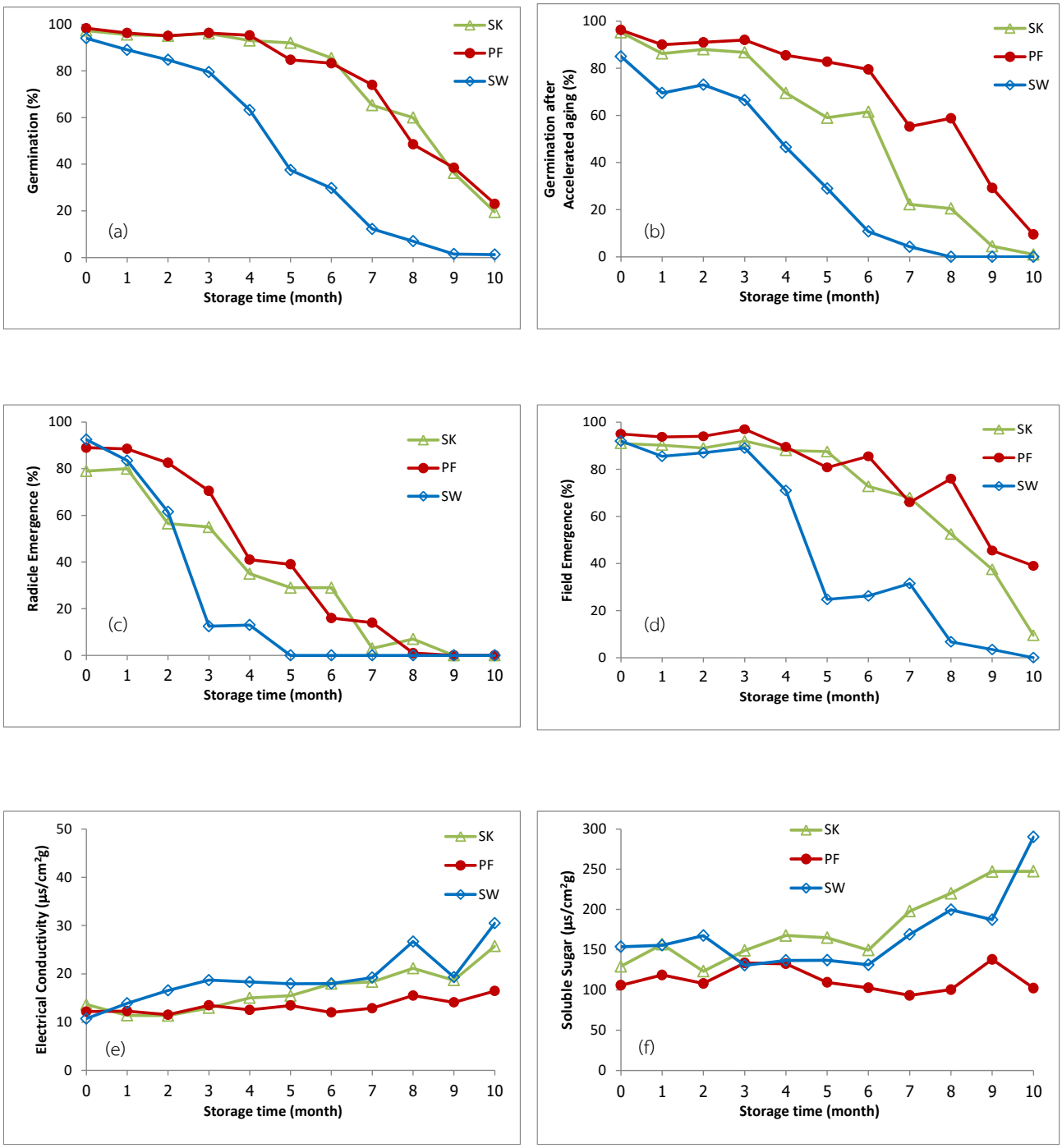
จากนั้นดำเนินการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานทั้งสามพันธุ์โดยบรรจุในถุงโพลีเอทธิลีนเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 เดือน (ความงอกเหลือเพียง 1-23%) พบว่าความชื้นของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานทุกพันธุ์ค่อนข้างคงที่ (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตาม SW มีแนวโน้มความชื้นสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ สำหรับความงอกมีค่าลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาทั้งสามพันธุ์ โดยพันธุ์ SW มีค่าน้อยที่สุดและลดลงรวดเร็วกว่าพันธุ์อื่นๆ ในเดือนที่ 10 โดยมีความงอกเหลืองเพียง 1% ในขณะที่พันธุ์ SK และ SW มีความงอก 20 และ 23% ตามลำดับ (รูปที่ 1a และตารางที่ 4) นอกจากนี้พบว่าพันธุ์ SK และ PF สามารถเก็บรักษาได้นาน 7 เดือนที่อุณหภูมิห้องสอดคล้องความงอกในสภาพไร่มีค่าเท่ากับ 68 และ 66% ในพันธุ์ SK และ PF ตามลำดับ ดังนั้นเมล็ดพันธุ์ SK และ PF สามารถเก็บรักษาได้นาน 7 เดือน เนื่องจากยังคงมีความงอกมากกว่าเกณฑ์มาตรฐานตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช 2518 คือไม่ต่ำกว่า 60% ส่วน SW สามารถเก็บรักษาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ได้เพียง 4 เดือนในสภาพอุณหภูมิห้องโดยยังมีความงอกเท่ากับ 63% และ ความงอกในสภาพไร่เท่ากับ 71% (รูปที่ 1a, 1d และตารางที่ 4)

สำหรับความแข็งแรงซึ่งวัดโดยความงอกภายหลังการเร่งอายุ การแทงราก และความงอกในสภาพไร่ ในเมล็ดพันธุ์ทั้งสามพันธุ์มีค่าลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น โดยพันธุ์ PF มีความงอกและความแข็งแรงสูงที่สุด รองลงมาคือ SK และ SW ตามลำดับ สอดคล้องกับค่าการนำไฟฟ้าและปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาเนื่องจากการเสื่อมสภาพของเซลล์เมมเบรนทำให้ความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเมมเบรนลดลงส่งผลให้การรั่วไหลของประจุและสารละลายต่างๆ ออกมานอกเซลล์มากขึ้น ค่าการนำไฟฟ้าและปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้จึงเพิ่มขึ้นตามความแข็งแรงที่ลดลง (รูปที่ 1a-1f และตารางที่ 4)

เมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) พบค่าความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความงอกและความแข็งแรง ได้แก่ ความงอกภายหลังการเร่งอายุ การแทงราก และความงอกในสภาพไร่ โดยพันธุ์ SK มีค่า *r* = 0.9255**, 0.7953**, 0.9679** ตามลำดับ ค่าความสัมพันธ์ระหว่างความงอกภายหลังการเร่งอายุกับการแทงรากและความงอกในสภาพไร่เท่ากับ *r* = 0.9195** และ 0.8870** ส่วนค่าความสัมพันธ์ระหว่างการแทงรากกับความงอกในสภาพไร่มีค่า *r* = 0.7529** นอกจากนี้พบค่าความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างค่าการนำไฟฟ้ากับความงอก ความงอกภายหลังการเร่งอายุ การแทงราก และความงอกในสภาพไร่ โดยมีค่า *r* = -0.8657**, -0.8902**, -0.8732** และ -0.8751** ตามลำดับ (ตารางที่ 5) สำหรับพันธุ์ PF พบค่าความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความงอกกับความงอกภายหลังการเร่งอายุ การแทงราก และความงอกในสภาพไร่ โดยมีค่า *r* = 0.9512**, 0.8119** และ 0.8741** ตามลำดับ อีกทั้งพบค่าความสัมพันธ์ระหว่างความงอกภายหลังการเร่งอายุกับการแทงรากและความงอกในสภาพไร่ *r* = 0.7929** และ 0.9189** ส่วนค่าความสัมพันธ์ระหว่างการแทงรากกับความงอกในสภาพไร่มีค่า *r* = 0.7378** นอกจากนี้พบค่าความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างค่าการนำไฟฟ้ากับความงอก ความงอกภายหลังการเร่งอายุ การแทงราก และความงอกในสภาพไร่ โดยมีค่า *r* = -0.6883**, -0.6175**, -0.5336** และ -0.5456** ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ในพันธุ์ SW พบค่าความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความงอกกับความงอกภายหลังการเร่งอายุ การแทงราก และความงอกในสภาพไร่ โดยมีค่า *r* = 0.9828**, 0.8115**, 0.9489** ตามลำดับ และพบค่าความสัมพันธ์ระหว่างความงอกภายหลังการเร่งอายุกับการแทงรากและความงอกในสภาพไร่ *r* = 0.8324** และ 0.9372** ส่วนค่าความสัมพันธ์ระหว่างการแทงรากกับความงอกในสภาพไร่มีค่า *r* = 0.7513** นอกจากนี้พบค่าความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างค่าการนำไฟฟ้ากับความงอก ความงอกภายหลังการเร่งอายุ การแทงราก และความงอกในสภาพไร่ โดยมีค่า *r* = -0.6922**, -0.6613**, -0.5915** และ -0.6613** ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

สำหรับค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้กับความงอกและความแข็งแรงอื่นๆ มีค่าความสัมพันธ์แบบเชิงลบและพบค่า *r* มากกว่า 0.5000 ในพันธุ์ SK และ SW ส่วนพันธุ์ PF มีค่าความสัมพันธ์ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้สามารถบอกถึงการเสื่อมสภาพของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานได้โดยปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้มากขึ้นสอดคล้องการเสื่อมสภาพที่มากขึ้นและความแข็งแรงต่ำลง ในทำนองเดียวกันค่าการนำไฟฟ้าซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งชี้การเสื่อมสภาพและความแข็งแรงที่ลดลง พบว่าค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าการนำไฟฟ้ากับความงอกและความแข็งแรงในพันธุ์ SK มีค่ามากกว่า 0.800 ในขณะที่พันธุ์ PF และ SW มีค่าอยู่ในช่วง 0.5336 – 0.6922 (ตารางที่ 5) ซึ่งการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้และค่าการนำไฟฟ้าในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานทั้งสามพันธุ์มีแนวโน้มไม่เหมือนกันดังนั้นวิธีการตรวจสอบดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อบ่งบอกถึงความแข็งแรงจึงไม่แนะนำสำหรับใช้เป็นวิธีตรวจสอบเพื่อประเมินความแข็งแรงหรือการประเมินอายุในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน

จากการวิเคราะห์ค่า *r* ระหว่างความงอกและวิธีการตรวจสอบความแข็งแรง ได้แก่ ความงอกภายหลังการเร่งอายุ ความงอกในสภาพไร่และการแทงรากพบค่าความสัมพันธ์ค่อนข้างสูงทั้งสามพันธุ์ตามที่กล่าวข้างต้น ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าวิธีการตรวจสอบความแข็งแรงทั้งสามวิธีเป็นวิธีการตรวจสอบความแข็งแรงที่แนะนำสำหรับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานได้ ทั้งนี้วิธีการแทงรากเป็นวิธีที่รวดเร็วที่สุดโดยใช้เวลาเพียง 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ซึ่งต้องใช้เวลาประมาณ 10-14 วัน อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบความแข็งแรงด้วยการแทงรากเป็นวิธีที่แนะนำสำหรับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (ISTA, 2019) อาจต้องทำการศึกษาวิจัยพัฒนาวิธีการแทงรากสำหรับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานโดยตรงเพื่อให้วิธีการทดสอบมีความเที่ยงตรงและแม่นยำมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 1 ความงอก (a) ความงอกภายหลังการเร่งอายุ (b) การแทงราก (c) ความงอกในสภาพไร่ (d) ค่าการนำไฟฟ้า (e) และปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ (f) ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน 3 พันธุ์ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 เดือน

ตารางที่ 4 ความชื้น (MC) ความงอก (G) ความงอกภายหลังการเร่งอายุ (AA) การแทงราก (RE) ความงอกในสภาพไร่ (FE) ค่าการนำไฟฟ้า (EC) และปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ (SS) ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน 3 พันธุ์ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 เดือน

Varieties	Storage time (Month)	MC (%)	G (%)	AA (%)	RE (%)	FE (%)	EC (us/cm g)	SS (µg glucose/g)
SK	0	10.0a	97a	95a	79a	91a	13.66f	129.32cd
	1	10.1a	96a	86b	80a	90a	11.40ef	156.82e
	2	10.3a	95a	88b	57b	89a	11.33ef	123.29d
	3	10.6a	96a	87b	55b	92a	12.94e	149.18cd
	4	10.6a	93a	70c	35c	88a	15.02d	167.74bcd
	5	10.6a	92a	59d	29c	88a	15.46d	164.91bcd
	6	10.2a	86b	62d	29c	73b	17.95c	149.63cd
	7	10.0a	65c	22e	3d	68b	18.33c	197.95abc
	8	10.0a	60d	21e	7d	53c	21.16b	220.07ab
	9	9.5b	36e	5f	0d	38d	18.69c	247.18a
	10	9.6b	20f	1f	0d	10e	25.73a	247.50a
F-test		**	**	**	**	**	**	**
C.V.		0.712	4.284	8.803	14.142	6.851	7.013	24.022
PF	0	10.2ab	98a	96a	89a	95ab	12.19cd	105.82abc
	1	10.3ab	96a	90ab	89a	94ab	12.28cd	118.64d
	2	10.7a	95a	91ab	83a	94bcd	11.54d	108.09abc
	3	10.7a	96a	92ab	71b	97a	13.49cd	133.57ab
	4	10.9a	95a	86bc	41c	90abc	12.54cd	132.55ab
	5	10.8a	85b	83c	39c	81cd	13.45cd	109.43abc
	6	10.5ab	83b	80c	16d	86bcd	12.02cd	102.66abc
	7	10.2ab	74c	55d	14d	66e	12.89cd	93.20c
	8	10.0ab	49d	59d	1e	76d	15.50ab	100.38bc
	9	10.1ab	39e	29e	0e	46f	14.09bc	137.98a
	10	9.5b	23f	10f	0e	39f	16.45a	102.27abc
F-test		**	**	**	**	**	**	**
C.V.		0.756	4.611	6.604	12.888	8.669	9.557	21.099
SW	0	12.7a	94a	85a	93a	92a	10.73d	153.70e
	1	10.7b	89ab	70bc	84b	86ab	13.90d	155.57f
	2	12.4a	85bc	73b	62c	79bc	16.56cd	167.50bcd
	3	12.2a	80c	67c	13d	89ab	18.71c	130.70de
	4	12.1a	63d	47d	13d	71c	18.32c	136.71cde
	5	11.7ab	38e	29e	0e	25d	17.96c	136.97cde

	6	11.3ab	30f	11f	0e	26d	17.99c	131.23de
	7	10.8b	12g	4g	0e	32d	19.22c	169.02bc
	8	10.0bc	7g	0g	0e	7e	26.70b	199.60b
	9	10.0bc	2h	0g	0e	4e	19.33c	187.34b
	10	9.2c	1h	0g	0e	0e	30.48a	290.13a
F-test		**	**	**	**	**	**	**
C.V.		0.833	8.801	8.999	12.469	16.415	11.241	15.304

หมายเหตุ; ในแนวเดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 5 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficients, *r*) ระหว่างความงอก (G) ความงอกภายหลังการเร่งอายุ (GAA) การแทงราก (RE) ความงอกในสภาพไร่ (FE) ค่าการนำไฟฟ้า (EC) และปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ (SS) ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน 3 พันธุ์ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 เดือน

Varieties	Parameters	Correlation coefficients (*r*)					
		G	GAA	RE	FE	EC	SS
SK	G	1.0000	0.9255**	0.7953**	0.9679**	-0.8657**	-0.6526**
	GAA		1.0000	0.9195**	0.8870**	-0.8902**	-0.6526**
	RE			1.0000	0.7529**	-0.8732**	-0.7329**
	FE				1.0000	-0.8751**	-0.6139**
	EC					1.0000	0.6625**
	SS						1.0000
PF	G	1.0000	0.9512**	0.8119**	0.8741**	-0.6883**	-0.1668
	GAA		1.0000	0.7929**	0.9189**	-0.6175**	-0.1569
	RE			1.0000	0.7378**	-0.5336**	-0.2864
	FE				1.0000	-0.5456**	-0.2148
	EC					1.0000	0.1416
	SS						1.0000
SW	G	1.0000	0.9828**	0.8115**	0.9489**	-0.6922**	-0.6508**
	GAA		1.0000	0.8324**	0.9372**	-0.6613**	-0.5791**
	RE			1.0000	0.7513**	-0.5915**	-0.5529**
	FE				1.0000	-0.6613**	-0.6500**
	EC					1.0000	0.7365**
	SS						1.0000

หมายเหตุ; **, * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% และ 95% ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การเร่งอายุที่สภาวะอุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 96 ชั่วโมง มีความเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบความแข็งแรงและประเมินอายุเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานในระหว่างการเก็บรักษา และพบว่าวิธีการตรวจสอบความแข็งแรงที่เหมาะสมสำหรับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน ได้แก่ การเร่งอายุ ความงอกในสภาพไร่ และการแทงราก โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ค่อนข้างสูงในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานทั้งสามพันธุ์

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

- จากผลการวิจัยพบว่าอายุการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานพันธุ์ SK และ PF มีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเท่ากับ 7 เดือน และ 4 เดือนสำหรับพันธุ์ SW และการเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ประเมินอายุการเก็บรักษาของพันธุ์ SK และ PF ได้ 6 เดือน และ 3 เดือนสำหรับพันธุ์ SW ซึ่งใกล้เคียงกับอายุการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ทั้งสามพันธุ์ ดังนั้นควรศึกษาวิจัยสภาวะการเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานที่ระดับความชื้นต่างๆ เพิ่มเติมเพื่อให้ได้สภาวะการประเมินอายุการเก็บรักษาที่แม่นยำมากยิ่งขึ้น
- ควรมีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบการแทงรากของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานโดยเฉพาะเพื่อให้มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น เนื่องจากยังในกฎการทดสอบของสมาคมเมล็ดพันธุ์นานาชาติมีเพียงการตรวจสอบการแทงรากสำหรับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ เมื่อสิ้นสุดโครงการ ทำให้ได้วิธีตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์เพื่อประเมินความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง และข้าวโพดหวาน ได้วิธีทดสอบความงอกเมล็ดพันธุ์กาแฟในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ รวมถึงได้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์และการตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ในเมล็ดพันธุ์พืชเพื่อการนำเข้า-ส่งออกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล เป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วและมีความถูกต้องสูง เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชสำหรับการนำเข้า-ส่งออก

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพได้ผลที่รวดเร็วและประหยัดต้นทุน ทันต่อความต้องการเมล็ดพันธุ์ของตลาดโลก การนำเข้า-ส่งออกสามารถออกใบรับรองผลวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศได้ง่ายขึ้นซึ่งเป็นไปตามวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ตามมาตรฐานระดับสากลของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (ISTA) มีความจำเป็นอย่างยิ่ง

ในการพัฒนาระบบการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์อย่างต่อเนื่องให้ครอบคลุมหลากหลายชนิดพืช เพื่อสร้างความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับระดับนานาชาติ ลดข้อกีดกันทางการค้าและส่งเสริมอุตสาหกรรมการส่งออกเมล็ดพันธุ์

บรรณานุกรม

การทดลองที่ 1 การพัฒนาวิธีการประเมินคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเขียวโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. *การตรวจสอบและวิเคราะห์เมล็ดพันธุ์*. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ. 194 หน้า

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2537. สรีรวิทยาเมล็ดพันธุ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ.

ศานิต สวัสดิกาญจน. 2552. ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์และวิธีประเมินความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์. วารสารวิทยาศาสตร์ประยุกต์ 8:107-118.

AOSA. 1983. Seed Vigor Testing Handbook. Contribution No 32 to the Handbook of Seed Testing. Association of Official Seed Analysts. NE, USA.

De Carvalho, L. F., C. S. Sediyama, M. S. Reis, D. C. F. S. Dias and M. A. Moreira. 2009. Influence of soaking temperature of soybean seeds in the eletric conductivity test to evaluate physiological quality. Rev. Bras. de Sementes. 31: 9-17.

Delouche, J. C. and C. C. Baskin. 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed Lot. Seed Sci. and Technol.1: 427-452.

Hampton, J.G. and D. M. TeKrony. 1995. Handbook of vigour test methods, 3rd Edition, The International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland.

ISTA. 2014. International rules for seed testing. International Seed Testing Association, Bassesdorf, Switzerland.

Kolasinska, K., J. Szyrmer and S. Dul. 2000. Relationship between laboratory seed quality tests and field emergence of common bean seed. Crop Sci. 40: 470-475.

Lovata, A., E. Noli, A. F. S. Lovata, E. Beltrami and E. Grassi. 2001. Comparison between three cold tests low temperatures, accelerated ageing test and field emergence of maize seed. Seed symposium, ISTA congress, Angers, France.

Matthews, S. and A. A. Powell. 1981. Electrical conductivity test. *p.* 37-42. *In*: D. A. Perry. Handbook of Vigour Test Methods. Internaitonal Seed Testing Association. Zürich, Switzerland.

Milosevic, M., M. Vujakovic and D. Karagic. 2010. Vigor tests as indicators of seed viability. Genetika. 42:103-118.

Robert, E. H. 1973. Loss of seed viability: ultrastructure and physiological aspects. Seed Sci. and Technol. 1: 529-545.

Szemruch, C., O. Del Longo, L. Ferrari, S. Renteria, M. Murcia, M. Cantamutto and D. Rondanini. 2015. Ranges of vigor based on the electrical conductivity test in dehulled sunflower seeds. Res. J. Seed Sci. 8: 12-21.

Vieira, R. D., A. S. Neto, S. R. M. Bittencourt and M. Panobianco. 2004. Electrical conductivity of the seed soaking solution and soybean seedling emergence. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.). 61: 164-168.

การทดลองที่ 2 การศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายเตตราโซเลียมสำหรับประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง

จุฑามาศ ร่มแก้ว. 2539. อิทธิพลของคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ และอัตราปลูกที่มีต่อความ งอกในไร่ การเจริญเติบโต ผลผลิต และความสามารถในการเก็บรักษาของถั่วลิสงเมล็ดโต. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วสุ อมฤตสุทธิ์. 2547. การพัฒนาวิธีการประเมินความมีชีวิตและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองด้วยวิธี เตตราโซเลียม. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 157 หน้า.

ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์ ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์ สมจิตต์ กิจรุ่งเรือง และ ชลิต พงศ์ศุภสมิทธิ์. 2553. การทำลายการพักตัวของเมล็ดถั่วลิสงพันธุ์ใหม่ 3 พันธุ์. รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 36 หน้า.

สมจินตนา ทุมแสน ทักษิณา ศันสยะวิชัย ศรีสุดา ทิพยรักษ์ อิสระ พุทธสิมมา เพียงเพ็ญ ศรวัต และ เทวาเมลา นนท์. 2554. ถั่วลิสงพันธุ์ ขอนแก่น 84-7. แก่นเกษตร 39 ฉบับพิเศษ 3 : 66-77 (2554).

อุดม พฤกษานุศักดิ์. 2530. อิทธิพลของความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของถั่วลิสง. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 91 หน้า.

Bittencourt, S. R. M. Vieira, R. D. Rodrigues, T. J. D. 1997. Criteria for peanut seed pre conditioning for the tetrazolium test. Seed science and technology. 25: 337-342.

Bittencourt, S. R. M. and Vieira, R. D. 1997. Use of reduced concentrations of tetrazolium solutions for the evaluation of the viability of peanut seed lots. Seed science and technology. 25 : 75-82.

ISTA. 2015. International rules for seed testing. International Seed Testing Association, Bassesdorf, Switzerland.

Santos, J. F. Sanches, M. F. G. Barbosa, R. M. Leao, E. F. Vieira, R. D..2012. Optimising tetrazolium test procedures to evaluate the physiological potential of peanut seeds. Seed Science and Technology. 40: 215-228.

การทดลองที่ 3 การศึกษาวิธีการใช้ความร้อนทำลายการพักตัวของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง

จวงจันทร์ ดวงพัตรา และ โชคชัย กิตติธเนศวร. 2531. การศึกษาเบื้องต้นเรื่องการพักตัวและการแก้การพักตัวของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงเมล็ดโต. หน้า 457 – 461. ใน: รายงานการสัมมนาถั่วลิสงครั้งที่ 7 วันที่ 16 – 18 มีนาคม 2531 พัทยา.

ISTA. 2014. International rules for seed testing. International Seed Testing Association, Bassesdorf, Switzerland.

ISTA. 2019. International rules for seed testing. International Seed Testing Association, Bassesdorf, Switzerland.

การทดลองที่ 4 การศึกษาวิธีการตรวจสอบความแข็งแรงในห้องปฏิบัติการกับความสามารถในการงอกได้ในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. การตรวจสอบและการวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดพันธุ์. กรุงเทพฯ กลุ่มหนังสือเกษตร. 194 หน้า

นงลักษณ์ วิรัชชัย. 2537. สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสุขภาพ. ภาควิชาวิจัยการศึกษา คณะครุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 379 หน้า

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2542. เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืชไร่. กรุงเทพ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัลลภ สันติประชา. 2542. หลักการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์. วารสารสงขลานครินทร์8: 225-234.

ศานิต สวัสดิกาญจน.2552. ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์และวิธีประเมินความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์. วารสารวิทยาศาสตร์ประยุกต์ ปีที่ 8 ฉบับที่ 1 มิถุนายน 2552. 12 หน้า

AOSA. 1981. Rule for testing seed. J. Seed Technol., Vol 6, pp. 1-126.

AOSA. 1983. Seed Vigor Testing Handbook Contribution No.32 to the Handbook on Seed Testing. Association of Official Seed Analysts. 93 p.

Hinkle, D.E. 1998. Applied Statistics for the Behavioral Sciences. Boston: Houghton Mifflin. 118 p.

ISTA. 1996. International Rules for Seed Testing. Seed Science and Technology 24, Supplement. 335 p.

การทดลองที่ 5 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายเตตราโซเลียมในการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

วสุ อมฤตสุทธิ์. 2547. การพัฒนาวิธีการประเมินความมีชีวิตและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุถั่วเหลืองด้วยวิธีเตตราโซเลียม. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา. 157 หน้า.

AOSA. 1983. Seed vigor testing handbook. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. Cont. No.32.

Delouche, J.C., Still, T.W., Raspet, M. and Lienhard, M. 1962. The tetrazolium test for seed viability. Agricultural Experiment Station, Mississippi State University. 64 p.

ISTA. 1995. Handbook of Vigour Test Methods 3rd Edition. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland. 117 p.

การทดลองที่ 6 การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium sporotrichiodes*, *Fusarium moniliforme* และ *Cephalosporium acremonium* ที่ปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดส่งออก

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎี &การประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology. โรงพิมพ์เรือนแก้ว กรุงเทพฯ. 208 หน้า.

Frampton, E.W. and L. Restaino. 1993. Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. J. Appl. Bacteriol. 74:223–233.

Mathur S.B. and O. Kongsdal. 2003. Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi, 1st Edition. Bassersdorf, Switzerland : International Seed Testing Association, 425 p.

Markoulatos, P., N. Siafakas and M. Moncany. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. J. Clinical Laboratory Anal. 16:47-51.

MöllerJerzy E. M., J. Chełkowski. and H. Geiger. 1999. Species-specific PCR Assays for the Fungal Pathogens *Fusarium moniliforme* and *Fusarium subglutinans* and their Application to Diagnose Maize Ear Rot Disease. J. Phytopatho. 147(9):497-508.

การทดลองที่ 7 การตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ในเมล็ดพันธุ์พืชเพื่อการนำเข้า-ส่งออกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

De Battisti, C., A. Salomoni, S. Ormelli, I. Monne, I. Capua and G. Cattoli. 2013. Rapid pathotyping of Newcastle disease virus by pyrosequencing *J. Virol Methods*. 188:13-20.

Gharizadeh, B., M. Oggionni, B. Zheng, E. Akom, N. Pourmand, A. Ahmadian, K.L. Wallin and P. Nyrén. 2005. Type-specific multiple sequencing primers: a novel strategy for reliable and rapid genotyping of human papillomaviruses by pyrosequencing technology. *J. Mol. Diagn*. 7:198-205.

Gruber, J.D., P.B. Colligan, and J.K. Wolford. 2002. Estimation of single nucleotide polymorphism allele frequency in DNA pools by using Pyrosequencing. *Hum. Genet*. 110:395-401.

Nordstrom, T., M. Ronaghi, and L. Forsberg. 2000. Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing. *Biotechnol Appl Biochem*. 31:107-112.

การทดลองที่ 8 การศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์กาแฟในห้องปฏิบัติการ

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. *การตรวจสอบและวิเคราะห์เมล็ดพันธุ์*. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ. 194 หน้า.

ISTA. 2016. International rules for seed testing. International Seed Testing Association,Bassesdorf, Switzerland.

Mirian T. S. Eira., E. A. Amaral da Silva, Renato D. de Castro, Stéphane Dussert, Christina Walters, J. Derek Bewley6 and Henk W. M. Hilhorst. 2006. Coffee seed physiology. Braz. J. Plant Physiol., 18(1):149-163, 2006.

การทดลองที่ 9 การศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพที่มีประสิทธิภาพในการประเมินอายุการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. การตรวจสอบและวิเคราะห์เมล็ดพันธุ์. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญมี ศิริ และ วิทวัส ธีรธิติ. 2551. การประเมินความสามารถในการเก็บรักษาเมล็ดข้าวโพดหวานพิเศษลูกผสม 3 พันธุ์ โดยการเร่งอายุ. ว. วิทย์. กษ. 39(3) (พิเศษ) : 246-249.

วราภรณ์ และ สุนันทา. 2547. การศึกษาวิธีวัดความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์เพื่อการประเมินความงอกในสภาพไร่สำหรับข้าวโพดหวาน. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร, 3-6 กุมภาพันธ์ 2547 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น. 291-299.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2558. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุม ประจำปี 2558.แหล่งข้อมูล: http://www.thasta.com/statistics.asp. ค้นเมื่อ 24 พฤษภาคม 2559.

สุจิตรา พรหมเชื้อ. 2544. ผลของการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานต่อการเจริญเติบโตและผลผลิต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

AOSA. 1983. Seed Vigor Testing Handbook. Contribution No 32 to the Handbook of Seed Testing. Association of Official Seed Analysts. NE, USA.

Hampton, J.G. 1992. Vigour testing within laboratories of the Internacional Seed Testing Association: A survey. Seed Sci. and Tehnol. 20: 199-203.

Hampton, J.G., K.A. Johnstone and V. Eua – Umpon. 1992. Ageing vigour tests for mungbean and French bean seed lots. Seed Sci. and Technol. 20: 643-653.

Hampton, J.G. and D.M. TeKrony. 1995. Handbook of vigour test methods, 3rd Edition, The International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland.

ISTA. 2016. International rules for seed testing. International Seed Testing Association. Bassesdorf, Switzerland.

Szemruch, C., O. Del Longo, L. Ferrari, S. Renteria, M. Murcia, M. Cantamutto and D. Rondanini. 2015. Ranges of vigor based on the electrical conductivity test in dehulled sunflower seeds. Res. J. Seed Sci. 8: 12-21.