เอกสารประกอบ
การประชุมสัมมนาวิชาการ
ประจำปี 2567

"The Ignite Biotechnology :
ขับเคลื่อนเศรษฐกิจไทยด้วยนวัตกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ
และการอนุรักษ์พันธุกรรมเพื่ออนาคตยั่งยืน
(BIRDO-IBT 2024)"

วันที่ 24-25 กันยายน 2567

เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาวิชาการ
ประจำปี 2567

“The Ignite Biotechnology :
ขับเคลื่อนเศรษฐกิจไทยด้วยนวัตกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ
และการอนุรักษ์พันธุกรรมเพื่ออนาคตยั่งยืน
(BIRDO-IBT 2024)”

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
Biotechnology Research and Development Office

คำนำ

เอกสารฉบับนี้จัดทำขึ้นเนื่องในโอกาสประชุมสัมมนาวิชาการประจำปี 2567 เรื่อง “The Ignite Biotechnology : ขับเคลื่อนเศรษฐกิจไทยด้วยนวัตกรรมเทคโนโลยีชีวภาพและการอนุรักษ์พันธุกรรมเพื่ออนาคตยั่งยืน (BIRDO-IBT 2024)” โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรายงานความก้าวหน้าผลการดำเนินงานของแผนงานวิจัย/โครงการวิจัย ปี 2567 ที่ได้รับงบประมาณดำเนินการจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ อนุรักษ์พันธุกรรม และนวัตกรรมจากจุลินทรีย์ด้านการเกษตร เพื่อเป็นเวทีในการแลกเปลี่ยนความรู้ ความเข้าใจ ความคิดเห็น ประสบการณ์ ปัญหา และอุปสรรคของการดำเนินการวิจัยระหว่างผู้เข้าร่วมประชุม และทบทวนบทบาทงานวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพ งานวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ งานวิจัยและพัฒนาเห็ด งานวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม งานบริการของสำนักฯ อันเป็นปัจจัยนำไปสู่การขับเคลื่อนเศรษฐกิจของประเทศ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณนักวิจัยทุกท่านที่ได้ร่วมมือร่วมใจกันในการปฏิบัติงานวิจัยตลอดจนคณะผู้จัดทำเอกสารผลงานวิจัยฉบับนี้ ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กันยายน 2567

สารบัญ

สารบัญ

สารบัญ (ต่อ)

การผลิตฮอร์โมนพืชกรดอินโดลแอซีติกจากจุลินทรีย์

Production of the plant hormone indole acetic acid by microorganisms

Figure

Paranee Sawangsri[1*], Naiyanate Charoensanti-Tanaka[1] and Phummarin Wanichananan[1]

[1]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ปทุมธานี 12110

[1]Biotechnology Research and Development Office, Department of agriculture, Pathumthani, 12110

* Corresponding author: e-mail diew2003@yahoo.com

บทคัดย่อ

กรดอินโดลแอซีติก (Indole-3-acetic acid: IAA) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มออกซิน (Auxin) สามารถสังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งเก็บรวบรวมจากแหล่งต่างๆ ได้ทั้งสิ้น 42 ไอโซเลท นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบเชิงคุณภาพโดยวิธี Bioassay plate technique และตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลแอซีติกที่ผลิตได้ด้วยวิธี spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตร ตามวิธี Salkowski colorimetric technique สามารถคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้ดี จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท IAA-32, IAA-17, IAA-25, IAA-16 และ IAA-00 เมื่อจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล สามารถจำแนกได้เชื้อ *Bacillus megaterium, Bacillus* sp., *Lysinibacillus macrolides Enterobacter* sp. และ *Bacillus* sp. ตามลำดับ การศึกษาผลของกรดอินโดลแอซีติก ที่มีผลให้มะเขือเทศทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม (ทนเค็ม) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเติม 15mM NaCl พบว่า การแช่เมล็ดด้วยกรดอินโดลแอซีติกที่ความเข้มข้น 1 ug/ml มีผลให้ต้นมะเขือเทศมีความทนเค็มได้ดีที่สุด ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของกรดอินโดลแอซีติกในการกระตุ้นการเจริญเติบโตในต้นพริก พบว่า กรดอินโดลแอซีติกที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย ที่ความเข้มข้น 50 ug/ml ส่งผลให้ต้นพริก มีค่าเฉลี่ยการติดดอกสูงสุด 25.6 ดอก/ต้น และน้ำหนักผลผลิตสูงสุด 42.56 g/ต้น ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ฉีดพ่นกรด อินโดลแอซีติก

คำสำคัญ: กรดอินโดลแอซีติก, จุลินทรีย์, สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช,

ABSTRACT

Indole-3-acetic acid (IAA) is a plant growth regulator belonging to the auxin group. It can be synthesized by microorganisms. A total of 42 isolates were collected from various sources. These isolates were qualitatively analyzed using the Bioassay plate technique, and the amount of IAA produced was measured using a spectrophotometer at a wavelength of 530 nm, following the Salkowski colorimetric technique. Five isolates with high efficiency in IAA production were selected, including isolates IAA-32, IAA-17, IAA-25, IAA-16, and IAA-00. Molecular techniques identified these isolates as *Bacillus megaterium*, *Bacillus sp.*, *Lysinibacillus macroides*, *Enterobacter sp.*, and *Bacillus sp.*,

respectively. The study of the effect of IAA on enhancing salt tolerance in tomatoes under sterile conditions, by adding 15 mM NaCl. It was found that soaking tomato seeds with IAA at a concentration of 1 µg/ml resulted in the highest salt tolerance. In testing the efficiency of IAA in promoting growth in chili plants, IAA extracted from bacteria at a concentration of 50 µg/ml resulted in the highest average number of flowers (25.6 flowers/plant) and maximum fruit yield weight (42.56 g/plant). These results were statistically different at a 99% confidence level when compared to the control group, which was not sprayed with IAA.

Keywords: Indole-3-acetic acid, microorganism, plant growth regulator

บทนำ

กรดอินโดลแอซีติก Indole-3-acetic acid (IAA) เป็นสารกลุ่มออกซิน (Auxin) จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชประเภทกระตุ้นการเจริญเติบโตที่ให้พืชเกิดการแบ่งตัว และยืดตัวของเซลล์ในส่วนลำต้นของพืช และเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มแรกที่ถูกค้นพบโดยมนุษย์ สาร IAA (Indole-3-acetic acid) ในพืชอาจจะพบในรูปสารประกอบเดี่ยว (free compound) นอกจากนี้แล้ว ยังอาจจะเกิดในรูปรวมกับสารอื่นๆ (Conjugate) เช่น IAA-insital, IAA-glucose และIAA-aspartate แต่สาร IAA ในรูปที่รวมกับสารอื่นนี้อาจจะไม่มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Not biological active) นอกจาก IAA ยังมีสารออกซินสังเคราะห์ที่รู้จักกันดี เช่น IBA (4-Indole-3-yl butyric acid), NAA (Napthalene acetic acid), 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) และ 4-CPA (4-chloropenoxy acetic acid) สารออกซินจะสร้างขึ้นบริเวณที่ปลายยอด ใบอ่อน และเมล็ด ในบางพืชยังพบสารนี้ในส่วนของละอองเกสรเพศผู้ ยอดเกสรเพศเมีย และรังไข่ โดยสาร IAA มีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ทำให้เกิดการขยายตัวของเซลล์ (Cell enlargement) กระตุ้นให้เกิดรากจากการปักชำพืช กระตุ้นให้เกิดแคลลัส (Callus) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่การตอบสนองในระดับเซลล์ที่เกิดเสมอคือ การขยายตัวของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ กระตุ้นการเกิดราก การเจริญในส่วนต่างๆ ของพืช ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของดอก ตรงส่วนที่ทำหน้าที่สืบพันธุ์ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนเพศของดอกในพืชบางชนิด เช่น การใช้ NAA ฉีดพ่น ดอกตัวเมียขณะยังอ่อนอยู่ของพืชพวกเงาะจะทำให้เปลี่ยนไปเป็นดอกเพศผู้ หรือฉีดพ่นดอกอ่อนของ ฟักทอง แตงกวา จะทำให้เกิดดอกตัวเมียเพิ่มขึ้น ป้องกันไม่ให้ใบ ดอก และผลที่ยังเจริญยังไม่เต็มที่ (prematurely) หลุดร่วง เป็นต้น (Ma *et al*., 2018) การสังเคราะห์ออกซินนั้นมีกรดอะมิโน L-Tryptophan เป็นสารเริ่มต้น (Precursor) L-Tryptophan เป็นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างของ Indole อยู่ มีรายงานสิ่งมีชีวิตหลายชนิด สามารถสังเคราะห์ IAA ได้แก่ แบคทีเรีย รา และสาหร่าย จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Azoarcus, Arthrobacter, Azospirillum, Pseudomonas, Bacillus, Burkholderia, Flavobacterium, Acetobacter, Klebsiella, Gluconacetobacter, Enterobacter, Clostridium, Xanthomonas Serratia* และ *Azotobacter* (Hurek and Reinhold-Hurek, 2003, Tsavkelova *et al*., 2005; Ahmad *et al*., 2008) ไซยาโนแบคทีเรียในสกุล Nostoc, Calothrix, Anabeana เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยังพบการสร้าง IAA จากจุลินทรีย์จำพวกยูคาริโอตทั้งยีสต์และราหลายสกุล เช่น *Saccharomyces, Fusarium, Rhizopus, Aspergillus* และ *Trichoderma* เป็นต้น (Tsavkelova *et al*., 2006)

ดังนั้น การศึกษาจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตกรดอินโดลแอซีติก และการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลแอซีติกจึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการประยุกต์ใช้สารชีวภาพกลุ่มฮอร์โมนที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยสูง ในการเพิ่มคุณภาพผลผลิตเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะการณ์ปัจจุบันที่สภาพภูมิอากาศมีความแปรปรวนสูง ซึ่งส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตเกษตรอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตกรดอินโดลแอซีติก (indole acetic acid; IAA)

รวบรวมและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกจากแหล่งต่างๆ และเชื้อที่รวบรวมไว้ในห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์และเปรียบเทียบเชิงคุณภาพโดยวิธี Bioassay plate technique ปรับปรุงตามวิธีการของ Shrivastava and Kumar (2011) และ Bric *et al.* (1991) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient broth นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหยดลงบน paper disc (cellulose membrane ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) ที่วางบนอาหาร Nutrient agar ที่เติม 5 mM L-Tryptophan บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำแผ่น paper disc ไปวางบนเพลทแก้ว หยดสารละลาย Salkowski reagent 10 ul บ่มในที่มืด 2 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีบนแผ่น paper disc เป็นสีแดง-ชมพู

การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลแอซีติกจากเชื้อแบคทีเรีย นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้างต้นนำไปเลี้ยงทดสอบในอาหารเหลว LB broth ที่เติม 5 mM L-Tryptophan ใส่หัวเชื้อตั้งต้นปริมาตร 1% ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืดนาน 48-72 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลาย Salkowski reagent บันทึกผลดังนี้ -, +, ++, +++, ++++ จากสีเหลืองเป็นสีแดง และตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลแอซีติกด้วยวิธี spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตร ตามวิธี Salkowski colorimetric technique ของ Glickmann and Dessaux (1995) โดยเตรียมสารละลายตั้งต้นของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นที่เท่ากันทุกไอโซเลท นำมาปรับค่า O.D. $_{600}$ = 0.5 นำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวไปเลี้ยงทดสอบในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของ yeast extract 0.2 และ NH_4SO_4 1 กรัมต่อลิตร และ 5 mM L-Tryptophan ใส่หัวเชื้อสารละลายตั้งต้นปริมาตร 1% โดยปริมาตร ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณ โดยนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืดนาน 240 ชั่วโมง (10 วัน) วิเคราะห์ปริมาณ กรดอินโดลแอซีติกที่เชื้อผลิตได้ โดยเก็บตัวอย่างสารละลายเชื้อ 1 ml + Salkowski reagent 200 ul บ่มในที่มืดนาน 2 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น สีของสารละลาย Salkowski reagent เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดงวัดค่าปฏิกิริยาด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 530 nm เปรียบเทียบกับ standard curve ของสารละลายมาตรฐาน 3-Indoleacetic acid

จำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากวิธีข้างต้น โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) สังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของบริเวณ 16s rDNA ด้วยปฏิกริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ universal primer 27F และ 1492R (Lane, 1991) ทำปฏิกิริยา cycle sequencing วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

2. การศึกษาผลของกรดอินโดลแอซีติกต่อการเจริญเติบโตของพืช

2.1 ผลของกรดอินโดลแอซีติกต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของกรดอินโดลแอซีติก ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในสภาวะความเค็ม โดยศึกษาความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน กรดอินโดลแอซีติกที่ 1, 3, 5 และ 10 µg/ml ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Murashige and Skoog ; MS) ที่มีเกลือ 15 mM NaCl โดยทำการคัดเลือกเมล็ดมะเขือเทศที่มีความสมบูรณ์และมีขนาดเมล็ดใกล้เคียงกัน จากนั้นนำมาห่อด้วยผ้าขาวบาง ทำความสะอาดผิวเมล็ด จากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 2 นาที เขย่าเบาๆ นำไปแช่ในคลอรอกซ์ 20% นาน 10 นาที จากนั้นเขย่าในน้ำเปล่าฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับเมล็ดให้แห้งบนกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำเมล็ดมะเขือเทศที่แห้งแช่ของกรดอินโดลแอซีติก นาน 16 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1 3 5 10 µg/ml ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้ออีกครั้ง จากนั้นย้ายลงไปเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารสูตร MS + NaCl 15 mM เปรียบเทียบ สาร IAA ที่ความเข้มข้น 1 3 5 10 µg/ml เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (MS)

2.2 การศึกษาผลของกรดอินโดลแอซีติกที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตในพืชทดสอบ

ศึกษาผลของกรดอินโดลแอซีติกที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของต้นพริกอายุ 2 เดือนหลังย้ายกล้า ทำการพ่นกรดอินโดลแอซีติก ทุก 15 วัน วางแผนการทดลอง 4 กรรมวิธี เปรียบเทียบความเข้มข้นกรดอินโดลแอซีติกที่ 10, 30 และ 50 µg/ml และชุดควบคุม (น้ำกลั่น) จำนวน 3 ซ้ำ ทำการบันทึกผลผลผลิต และวิเคราะห์ค่า NDVI (Normalized Difference Vegetation Index)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตกรดอินโดลแอซีติก (indole acetic acid; IAA)

รวบรวมเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติก (indole acetic acid; IAA) จากแหล่งต่างๆ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติก พบว่า เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์และเปรียบเทียบการผลิตกรดอินโดลแอซีติก ในเชิงคุณภาพโดยวิธี Bioassay plate technique (Figure 1) สามารถคัดเลือกได้เชื้อแบคทีเรียทั้งสิ้น 42 ไอโซเลท เพื่อนำมาวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไป

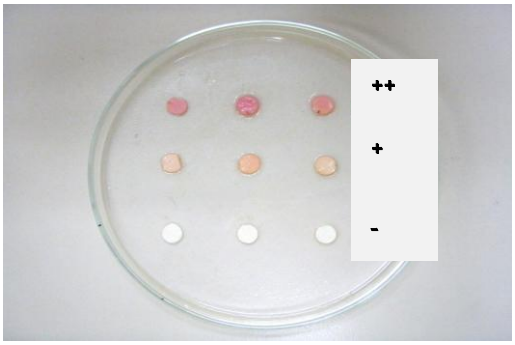


Figure 1 The selection of microorganisms tested for indole-3-acetic acid (IAA) synthesis using the Bioassay plate technique.

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินโดลแอซีติก โดยการนำเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 42 ตัวอย่าง ที่คัดเลือกได้จากข้างต้น โดยนำไปเลี้ยงทดสอบในอาหารเหลว LB broth ที่เติม 5 mM L-Tryptophan เมื่อ

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ในที่มืดนาน 48-72 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลาย Salkowski reagent จากสีเหลืองเป็นสีแดง-ชมพู สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียได้ 12 ไอโซเลท (Figure 2)

Figure 2 The comparison of the efficiency of indole-3-acetic acid (IAA) synthesis from bacterial isolates using Salkowski reagent after incubating the bacteria in the dark for 72 hours.

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดอินโดลแอซีติกด้วยสารละลาย Salkowski reagent เมื่อบ่มเชื้อแบคทีเรีย ในที่มืด 72 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท สามารถผลิตกรดอินโดลแอซีติก ได้ในปริมาณสูงกว่า 48 ชั่วโมง โดยสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการกรดอินโดลแอซีติกได้ดี ในระดับ +++ และ ++++ จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลท IAA-16, IAA-17, IAA-25, IAA-32 และ IAA-00 (Table 1) จากนั้นนำมาทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เมื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์ในส่วนของ ribosomal RNA gene นำลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ (Table 2)

ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบการผลิตกรดอินโดลแอซีติก พบว่า ของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้ดี โดยเมื่อบ่มเชื้อครบ 240 ชั่วโมง สามารถผลิตได้สูงที่สุด คือ ไอโซเลท IAA-32 มีค่าการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติก เท่ากับ 384 ug/ml รองลงมา คือ IAA-17, IAA-25, IAA-16 และ IAA-00 ค่าการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติก เท่ากับ 377, 351.1, 308.4 และ 275.9 ug/ml (Table 3)

Table 1 The results of testing the efficiency of indole-3-acetic acid (IAA) production from bacterial isolates.

Isolates	Efficiency of IAA production	
	48 hr.	72 hr.
IAA-00	+	+++
IAA-5	+	++
IAA-12	++	++
IAA-16	+++	++++
IAA-17	++	+++
IAA-19	+	++
IAA-21	+	+
IAA-25	++	+++
IAA-29	+	+
IAA-32	++	+++
IAA-36	+	++
IAA-43	+	++

Table 2 The results of microbial classification using molecular techniques.

Isolates	Species	Identity (%)	Accession Number
IAA-16	*Enterobacter* sp.	100	MK600539.1
IAA-17	*Bacillus* sp.	99	KT981881.1
IAA-25	*Lysinibacillus macroides*	100	MT071730.1
IAA-32	*Bacillus megaterium*	99	GU125638.1
IAA-00	*Bacillus* sp.	99	EU912460.1

Table 3 The production levels of indole-3-acetic acid (IAA) from five bacterial isolates.

Isolates	IAA (ug/ml)								
	48 hr.	72 hr.	96 hr.	120 hr.	144 hr.	168 hr.	192 hr.	216 hr.	240 hr.
IAA-16	29.75	89.88	193	226	260	260	250	277.2	308.4
IAA-17	10.73	50.28	140	210	220	290	300	356.7	377.0
IAA-25	8.604	43.72	103	188	250	290	300	329.0	351.1
IAA-32	35.42	150	255	292	290	290	320	347.2	384.0
IAA-00	15.099	22.57	67.87	97.66	114.7	153.94	186.28	229.2	275.9

2. การศึกษาผลของกรดอินโดลแอซีติกต่อการเจริญเติบโตของพืช

2.1 การศึกษาผลของกรดอินโดลแอซีติกต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

ทำการศึกษาผลของกรดอินโดลแอซีติกต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในสภาวะความเค็ม โดยศึกษากรดอินโดลแอซีติกที่ความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 10 µg/ml ในสภาพปลอดเชื้อ โดยมีอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog ; MS) และ MS + 15 mM NaCl เป็นชุดความคุม พบว่า กรดอินโดลแอซีติกที่ความเข้มข้น 1 ug/ml มีผลให้ต้นมะเขือเทศในสภาพปลอดเชื้อมีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยให้ค่าเฉลี่ยความสูงต่อต้นสูงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับกรดอินโดลแอซีติก ส่วนค่าเฉลี่ยความยาวรากของต้นมะเขือเทศ พบว่า กรดอินโดลแอซีติกที่ความเข้มข้น 1 3 5 10 ug/ml มีผลให้ค่าเฉลี่ยความยาวรากที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับกรดอินโดลแอซีติก (Figure 3, Table 4)

Table 4 The average plant height and root length of tomato plants treated with Indole-3-acetic acid after 15 days.

plant	Medium					
	MS	MS+NaCl	MS+NaCl IAA 1 µg/ml	MS+NaCl IAA 3 µg/ml	MS+NaCl IAA 5 µg/ml	MS+NaCl IAA 10 µg/ml
root length (cm.)	5.6	4.2	4.7	4.6	5.1	5.0
plant height (cm.)	10.0	5.3	6.5	5.9	6.2	6.1

Figure 3 The test of salt tolerance in tomato plants under sterile conditions treated with indole-3-acetic acid (IAA) at concentrations of 1, 3, 5, and 10 µg/ml after 14 days

2.2 การศึกษาผลของกรดอินโดลแอซีติกที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตในพืชทดสอบ

ผลของกรดอินโดลแอซีติกที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของต้นพริกอายุ 2 เดือนหลังย้ายกล้า ทำการพ่นกรดอินโดลแอซีติก ทุก15 วัน วางแผนการทดลอง 4 กรรมวิธี เปรียบเทียบความเข้มข้นกรดอินโดลแอซีติกที่ 10, 30 และ 50 µg/ml และชุดควบคุม (น้ำกลั่น) พบว่า การพ่นกรดอินโดลแอซีติกที่ความเข้มข้น 50 ug/ml มีผลให้ต้นพริกติดดอก และน้ำหนักผลผลิตสูงสุด 42.558 กรัม/ต้น (Figure 4, Table 5) และเมื่อวิเคราะห์ค่า NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกสุขภาพของต้นพริก พบว่า การพ่นกรดอินโดลแอซีติกที่ความเข้มข้น 50 ug/ml ให้ค่า NDVI สูงสุด บ่งบอกถึงความอุดมสมบูรณ์ของต้นมากกว่า กรรมวิธีที่ให้ค่าสุขภาพของต้นข้าวที่มีค่า NDVI ต่ำกว่า

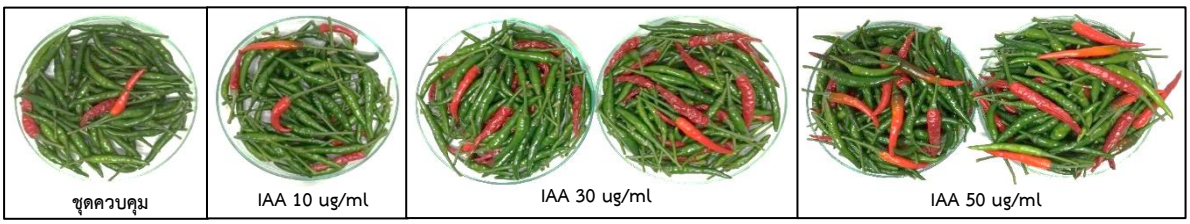


Figure 4 The yield of chili plants treated with Indole-3-acetic acid (IAA) at concentrations of 0, 10, 30, and 50 µg/ml

Table 5 The average number of flowers, fruit yield weight, and overall vigor of Chili (Jinda Red Chili) treated with Indole-3-acetic acid (IAA) at concentrations 0, 10, 30, 50 ug/ml

Treatment	Number of flower	Fruit yield weight per plant (g)	NDVI value
IAA 0 ug/ml (control)	8.7 b[1/]	12.33 c	0.6946±0.0015 b
IAA 10 ug/ml	11.5 b	15.34 c	0.7036±0.0023 ab
IAA 30 ug/ml	21.1 a	28.96 b	0.7063±0.0087 a
IAA 50 ug/ml	25.6 a	42.56 a	0.7104±0.0047 a
F-test	**	**	
% c.v.	37.7	37.3	

** : Statistically different at the 99 percent confidence level

1/ : Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

NDVI : Normalized Difference Vegetation Index

สรุป

การสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกจากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพจากแหล่งต่างๆ โดยวิเคราะห์ประสิทธิภาพการผลิตทั้งในเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ สามารถคัดเลือกได้แบคทีเรียไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้ในปริมาณสูงที่สุด 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท IAA-32, IAA-17, IAA-25 IAA-16, และ IAA-00 เมื่อนำมาจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล สามารถจำแนกได้เชื้อ *Bacillus megaterium Bacillus* sp., *Lysinibacillus macrolides Enterobacter* sp., และ *Bacillus* sp. ตามลำดับ การทดสอบผลของกรดอินโดลแอซีติกต่อการสร้างความทนทานของมะเขือเทศทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม (ทนเค็ม) โดยการแช่เมล็ดด้วยกรดอินโดลแอซีติกที่ความเข้มข้น 1 ug/ml มีผลให้ต้นมะเขือเทศมีความทนเค็มได้ดีที่สุด ส่วนประสิทธิภาพของกรดอินโดลแอซีติกในการกระตุ้นการเจริญเติบโตในต้นพริก กรดอินโดลแอซีติกที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 50 ug/ml ส่งผลให้ต้นพริกมีค่าเฉลี่ยการติดดอกและให้น้ำหนักผลผลิตสูงสุด เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ฉีดพ่นกรดอินโดลแอซีติก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

เอกสารอ้างอิง

Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research. 163: 173-181

Bric, J.M., Bostock, R.M. and S.E. Silverstone. 1991. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol*., 57, 535-538.

Glickmann, E. and Y. Dessaux. 1995. A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*. 61, 793-796.

Hurek T and B. Reinhold-Hurek. 2003. Azoarcus sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. Journal of Biotechnology. 106(2-3):169-78.

Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics. ed. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. pp. 115–175. Chichester: John Wiley & Sons.

Ma, Q., Grones and P., S. Robert. 2018. Auxin signaling: a big question to be addressed by small molecules. Journal of experimental botany, 69(2): 313–328.

Shrivastava U.P. and A. Kumar. 2011. A Simple and Rapid Plate Assay for the Screening of Indole-3-acetic Acid (IAA) Producing Microorganisms. *Int. j. appl. biol. pharm*. 2:120-123.

Tsavkelova, E. A., S. Yu. Klimova, T. A. Cherdyntseva and A. I. Netrusov. 2006. Microbial producers of plan growth stimulators and their practical use: A review. Applied Biochemistry and Microbiology. 42: 117–126

Tsavkelova, E., T. and A. Cherdyntseva. 2005. NetrusovAuxin production by bacteria associated with orchid roots. Mikrobiologiya. 74: 46-53

การตรวจสอบยีนความหอมในแปลงแม่พันธุ์มะพร้าวน้ำหอมจังหวัดราชบุรี

Detection of aromatic genes in aromatic coconuts mother plots in Ratchaburi Province

ประสาน สืบสุข[1*] กุหลาบ คงทอง[1] สุภาวดี ง้อเหรียญ[1] วิไลวรรณ ทวิชศรี[2] และ ปยุดา สลับศรี[3]

Prasarn Seubsuk[1], Kularb Kongthong[1], Suphawadee Ngorian[1],

Wilaiwan Twishsri[2] and Payuda Salabsri[3]

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ รังสิต ธัญบุรี ปทุมธานี 12110

[2] สถาบันวิจัยพืชสวน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพ 10900

[3] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรราชบุรี ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี 70120

[1] Biotechnology Research and Development Office, Thanyaburi, Pathum thani, 12110, Thailand

[2] Horticultural Research Institute, Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900, Thailand

[3] Ratchaburi Agricultural Research and Development Center, Khao Cha-Ngum, Photharam, Ratchaburi, 70120, Thailand

* Corresponding author: praseu@gmail.com

บทคัดย่อ

การจำหน่ายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมในจังหวัดราชบุรียังขาดการรับรองการผลิต ส่งผลต่อความเชื่อมั่นของผู้ซื้อและผู้ขาย เพื่อแก้ไขปัญหานี้ จึงได้ใช้วิธีการตรวจดีเอ็นเอของยีน *CnuAMADH2* เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมของเกษตรกรในต้นแม่พันธุ์ จำนวน 3 แปลง และต้นกล้า จำนวน 2 แปลง โดยใช้เทคนิค Real-time PCR ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ rhAmp SNP Genotyping System ผลการวิจัยพบว่าแปลงแม่พันธุ์ตรวจพบยีนความหอมตั้งแต่ร้อยละ 90.81-100 ส่วนในต้นกล้าตรวจพบยีนความหอมตั้งแต่ร้อยละ 91.84-100 ข้อมูลดังกล่าวสามารถช่วยในการจัดการแปลงมะพร้าวน้ำหอมโดยการกำจัดต้นมะพร้าวที่ไม่มียีนความหอมออกจากแปลง ทำให้เกิดความมั่นใจแก่ผู้ซื้อ และผู้ขายมั่นใจในคุณภาพต้นกล้ามะพร้าวน้ำหอมที่ตรงกับพันธุ์ที่ต้องการ ส่งผลให้สามารถผลิตพันธุ์และจำหน่ายต้นกล้าที่มีคุณภาพตรงตามพันธุ์ได้อย่างยั่งยืน

คำสำคัญ : มะพร้าว, ยีนความหอม, เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ABSTRACT

The production and sale of aromatic coconut varieties in Ratchaburi Province still lacks production certification, leading to sellers and buyers concerns. To address this issue, the DNA test of the *CnuAMADH2* gene was used to verify of the authenticity the aromatic coconut varieties in three mother and two seedling plots. This was accomplished using the Real-time PCR technique, rhAmp SNP Genotyping System analysis method. The aromatic genes were detected in the mother plots at 90.81-100% of the samples, while the seedling plots were detected at 91.84-100%. This information can help in managing aromatic coconut plantations by removing non-aromatic trees,

which increases confidence among both buyers and sellers in the quality of the seedlings. Consequently, this allows for sustainable production and sale of high-quality seedlings that meet the desired variety standards.

Keywords: Aromatic coconut, Aromatic gene, DNA marker

บทนำ

ปัจจุบันความต้องการมะพร้าวน้ำหอมมีเป็นจำนวนมาก ในจังหวัดราชบุรี มีโรงคัดบรรจุมะพร้าว ประมาณ 150 โรง เป็นนักธุรกิจจีนประมาณ 10 โรง และบางส่วนเป็นคนจีนที่ร่วมลงทุนกับคนไทย จึงเป็นพืชที่ทำให้เศรษฐกิจเจริญเติบโตและสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร มีลักษณะเด่น คือรสชาติมีความหวานและหอมกรุ่นคล้ายใบเตย ด้วยการขยายตัวของอุตสาหกรรมการแปรรูปอาหารและเครื่องดื่มที่ทำจากมะพร้าวน้ำหอมรวมถึงการส่งออกมะพร้าวน้ำหอมไปขายยังต่างประเทศ ทำให้ภาคการเกษตรต้องมีการปรับตัวเพื่อเพิ่มผลผลิตมะพร้าวน้ำหอมให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด

มะพร้าวน้ำหอมมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ เกิดจากการรวมตัวของสารหอมระเหยหลายชนิด โดยสารหลักที่ให้ความหอมคือ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งพบในมะพร้าวน้ำหอม และไม่พบสารนี้ในมะพร้าวที่ไม่หอม ในการผลิตมะพร้าวน้ำหอมมักพบปัญหาความหอมลดลงหรือไม่หอม อาจเกิดจากอิทธิพลของละอองเกสรจากมะพร้าวพันธุ์อื่นที่ส่งผลต่อความหอม อลิษา และคณะ (2562) ได้ศึกษาอิทธิพลของละอองเกสรต่อความหอมของมะพร้าวน้ำหอมโดยควบคุมการผสมเกสร และตรวจสอบสารให้ความหอม 2AP ด้วยเทคนิค Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) ในน้ำและเนื้อมะพร้าว ตรวจสอบอัลลีลยีน *CnuAMADH2* ของผลผลิตจากทุกคู่ผสมด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากเนื้อมะพร้าว พบว่า ผลมะพร้าวน้ำหอมที่ถูกผสมด้วยละอองเกสรต่างพันธุ์ มีปริมาณ 2AP น้อยถึงน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับผลมะพร้าวน้ำหอมที่ได้รับการผสมด้วยละอองเกสรมะพร้าวน้ำหอมต่างต้นและภายในต้นเดียวกัน ส่วนผลมะพร้าวต้นสูงที่ได้รับการผสมด้วยละอองเกสรจากมะพร้าวน้ำหอม ไม่พบสาร 2AP สรุปได้ว่าความหอมที่เปลี่ยนแปลงไปในมะพร้าวน้ำหอมเกิดจากอิทธิพลของละอองเกสรมะพร้าวต่างพันธุ์

ยุทธศาสตร์มะพร้าวน้ำหอมปี 2554-2559 กำหนดแนวทางส่งเสริมการปลูกทดแทนและปลูกแซม เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตมะพร้าวน้ำหอมที่มีคุณภาพสูงให้สมดุลกับความต้องการของตลาด พบว่าการจำหน่ายพันธุ์มะพร้าวของจังหวัดราชบุรีมีการกระจายไปจังหวัดอื่น ๆ เป็นจำนวนมาก แต่การผลิตพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมเพื่อจำหน่ายยังไม่มีการตรวจรับรองเพื่อสร้างความเชื่อมั่นให้ทั้งผู้ซื้อและผู้ขาย แม้ว่าเกษตรกรจะมั่นใจในต้นแม่พันธุ์ของตนและมีวิธีการคัดต้นพันธุ์ตามภูมิปัญญา เช่น การขยี้ปลายรากเพื่อดมกลิ่นและซื้อพันธุ์จากชาวสวนด้วยกัน ซึ่งผลกระทบที่อาจเกิดขึ้น คือ ปริมาณผลผลิตไม่คงที่ คุณภาพความหอมไม่มี ด้วยมะพร้าวน้ำหอมที่ปลูกใกล้กับมะพร้าวแกงมีโอกาสผสมข้าม การนำมะพร้าวผลแก่ของพันธุ์น้ำหอมที่เกิดจากการผสมเกสรของพันธุ์อื่นไปเพาะเป็นต้นกล้าจำหน่าย จึงมีความเสี่ยงต่อผู้ที่นำไปปลูก เนื่องจากกว่าจะรู้ว่าต้นกล้าที่ซื้อไปปลูกนั้นไม่ใช่พันธุ์มะพร้าวน้ำหอมแท้ก็ผ่านไป 3-4 ปี ดังนั้น การที่เกษตรกรและผู้ประกอบการต้องการพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมเพื่อขยายพื้นที่ปลูกหรือปลูกทดแทนต้นที่อายุมาก จึงควรป้องกันความเสี่ยงและสร้างความเชื่อมั่นในการผลิตต้นกล้า ด้วยการตรวจรับรองแปลงมะพร้าวที่จะใช้ผลิตต้นกล้าให้มีความตรงตามพันธุ์ โดยการตรวจสอบยืนความหอมด้วยวิธีการตรวจดีเอ็นเอ รวมถึงสุ่มตรวจพันธุกรรมของ

ต้นกล้า เพื่อสร้างความมั่นใจแก่ผู้นำพันธุ์ไปปลูก งานวิจัยนี้จึงได้ตรวจยีนความหอมของมะพร้าวน้ำหอมด้วยวิธีการตรวจดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Real-time PCR ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ rhAmp SNP Genotyping System

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เก็บตัวอย่างใบมะพร้าวจากต้นแม่พันธุ์มะพร้าวน้ำหอม และต้นกล้าบรรจุในถุงพลาสติก ระบุหมายเลขประจำต้น และจัดส่งใบมะพร้าวจากแปลงในจังหวัดราชบุรี ไปยังห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ตำบลรังสิต อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี การเก็บตัวอย่างดำเนินการโดยคณะนักวิจัยประจำศูนย์วิจัยพัฒนาการเกษตรราชบุรี โดยตัวอย่างใบมะพร้าวจัดเก็บจากต้นแม่พันธุ์ และต้นกล้าที่เพาะจากต้นแม่พันธุ์ จากแปลงเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการ จำนวน 3 แปลง ได้แก่ แปลงที่ 1 นายประยูร วิสุทธิไพศาล ต้นแม่พันธุ์ จำนวน 190 ต้น ต้นกล้า 368 ต้น แปลงที่ 2 นางปุญณสา ประชุมศรี ต้นแม่พันธุ์ จำนวน 185 ต้น และแปลงที่ 3 นายสมเกียรติ ประพฤติกิจ ต้นแม่พันธุ์ จำนวน 229 ต้น และต้นกล้า จำนวน 593 ต้น

2. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับพืช Plant Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ตามรายละเอียดของวิธีการในชุดสกัด เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer คำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กลับเป็นค่าปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการทำอิเลคโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลล์ ในสารละลาย TBE ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบและบันทึกภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต จากนั้นละลายดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปตรวจยีนความหอมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปที่จำเพาะกับยีนความหอม ต่อไป

3. การตรวจยีนความหอมของมะพร้าวน้ำหอม ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคโนโลยีเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป (SNP) โดยใช้เทคนิค Real-time PCR ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ rhAmp SNP Genotyping System (Integrated DNA Technologies, USA) ที่ออกแบบไพรเมอร์จากตำแหน่งสนิปที่สัมพันธ์กับยีนความหอมของมะพร้าว โดยอ้างอิงจากลำดับเบสของยีนความหอมในมะพร้าว CnAMADH2 (amino aldehyde dehydrogenase 2) ที่รายงานโดย Saensuk *et al*., 2016 และ Vongvanrungruang *et al*., 2016 นำมาพัฒนาไพรเมอร์ ให้มีความจำเพาะกับลำดับเบสในตำแหน่งสนิปที่สัมพันธ์กับลักษณะความหอมของมะพร้าว โดยในระบบการวิเคราะห์จีโนไทป์แบบ rhAmp SNP Genotyping System กำหนดให้มีไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งสนิปที่ต้องการตรวจสอบ และติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกันด้วยสีที่ทำให้สามารถจำแนกแยกสนิปที่มีความจำเพาะกับยีนความหอมของมะพร้าวน้ำหอม (C/C) และมะพร้าวไม่น้ำหอม (G/G) เมื่อนำไพรเมอร์ไปตรวจสอบกับดีเอ็นเอของมะพร้าวน้ำหอมด้วยเครื่อง Real-time PCR จะมีการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณของแสงฟลูออเรสเซนต์ตามชนิดของสีที่อยู่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำให้สามารถจำแนกรูปแบบของสนิปที่เกิดขึ้นบนดีเอ็นเอ ตรวจสอบด้วยเครื่อง Quant Studio 5 Real-Time PCR ค่าการเกิดสีของฟลูออเรสเซนต์จะถูกบันทึกไว้ การวิเคราะห์ตำแหน่งสนิป จะสร้าง allelic discrimination plot ของแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม QuantStudio Design & Analysis Software โดย allele ของมะพร้าวน้ำหอมจะอยู่ที่แกน Y สีน้ำเงิน มีสนิปจีโนไทป์เป็นแบบ C/C และมะพร้าวไม่หอมจะอยู่ที่แกน X สีแดง มีสนิปจีโนไทป์เป็นแบบ G/G ส่วนมะพร้าวที่มีดีเอ็นเอแบบลูกผสมหรือพันธุ์ทาง (Heterozygous) ไม่หอมจะอยู่กึ่งกลางระหว่างแกนทั้งสอง สีเขียว (C/G)

4. บันทึกผลการตรวจดีเอ็นเอยีนความหอมของมะพร้าวแต่ละต้นที่ได้จากแปลงแม่พันธุ์ และต้นกล้า คำนวณเปอร์เซ็นต์การตรวจพบต้นที่มียีนหอมและไม่หอมในแต่ละแปลง

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจยีนความหอมของต้นแม่พันธุ์มะพร้าวน้ำหอม ของเกษตรที่เข้าร่วมโครงการ จำนวน 3 แปลง ได้แก่ แปลงที่ 1 นายประยูร วิสุทธิไพศาล จากการตรวจวิเคราะห์ จำนวน 190 ต้น พบต้นที่มียีนความหอมแท้ ที่มีจีโนไทป์แบบ C/C จำนวน 190 ต้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แปลงที่ 2 นางปุญณสา ประชุมศรี จากการตรวจวิเคราะห์ จำนวน 185 ต้น พบต้นที่มียีนความหอมแท้ ที่มีจีโนไทป์แบบ C/C จำนวน 168 ต้น คิดเป็น 90.81 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่ไม่หอม จำนวน 17 ต้น คิดเป็น 9.19 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นต้นไม่หอมที่มีจีโนไทป์แบบ C/G (Heterozygous หรือพันธุ์ทาง) จำนวน 14 ต้น คิดเป็น 7.57 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่มียีนไม่หอมแท้ที่มีจีโนไทป์แบบ G/G จำนวน 3 ต้น คิดเป็น 1.62 เปอร์เซ็นต์ และแปลงที่ 3 นายสมเกียรติ ประพฤติกิจ จากการตรวจวิเคราะห์ จำนวน 229 ต้น พบต้นมะพร้าวน้ำหอมที่มีความหอมแท้ที่มีจีโนไทป์แบบ C/C จำนวน 217 ต้น คิดเป็น 94.76 เปอร์เซ็นต์ และเป็นต้นไม่หอม จำนวน 12 ต้น คิดเป็น 5.24 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นต้นไม่หอมที่มีจีโนไทป์แบบ C/G (Heterozygous หรือพันธุ์ทาง) จำนวน 10 ต้น คิดเป็น 4.37 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่มียีนแบบไม่หอมแท้ที่มีจีโนไทป์แบบ G/G จำนวน 2 ต้น คิดเป็น 0.87 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

การตรวจยีนความหอมของต้นกล้ามะพร้าวน้ำหอมที่เพาะผลพันธุ์จากต้นแม่พันธุ์ ของเกษตร กรที่เข้าร่วมโครงการ จำนวน 2 แปลง ได้แก่ แปลงที่ 1 นายประยูร วิสุทธิไพศาล จากการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอยีนความหอมของต้นกล้า จำนวน 368 ต้น ที่ได้จากต้นแม่พันธุ์จำนวน 190 ต้น พบว่าต้นกล้าทั้ง 368 ต้น ให้ผลตรวจดีเอ็นเอเป็นยีนหอมแท้ทุกต้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนต้นกล้าที่เพาะจากผลของต้นแม่พันธุ์ในแปลงที่ 3 นายสมเกียรติ ประพฤติกิจ จำนวน 539 ต้น ที่ได้จากต้นแม่พันธุ์ จำนวน 227 ต้น ผลตรวจยีนความหอมพบว่าต้นกล้ามียีนหอมแท้ จำนวน 495 ต้น คิดเป็น 91.84 เปอร์เซ็นต์ และต้นกล้าไม่หอม จำนวน 44 ต้น คิดเป็น 8.16 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นต้นกล้าไม่หอมที่มีจีโนไทป์แบบ C/G (Heterozygous หรือพันธุ์ทาง) จำนวน 29 ต้น คิดเป็น 5.38 เปอร์เซ็นต์ และต้นกล้าที่มียีนแบบไม่หอมแท้ที่มีจีโนไทป์แบบ G/G จำนวน 15 ต้น คิดเป็น 2.78 เปอร์เซ็นต์ (Table 2)

การตรวจยีนความหอมของต้นแม่พันธุ์มะพร้าวน้ำหอม ของเกษตรที่เข้าร่วมโครงการ จำนวน 3 แปลง แต่ละแปลงให้ผลการตรวจพบต้นที่มียีนความหอมและไม่หอมในเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกัน โดยแปลงที่ 1 นายประยูร วิสุทธิไพศาล สามารถตรวจพบยีนความหอมปรากฏอยู่ในต้นแม่พันธุ์ทุกต้น จากผลการตรวจดีเอ็นเอจำนวน 190 ต้น คิดเป็นมียีนหอม 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามะพร้าวน้ำหอมแปลงนี้ได้มีการจัดการแปลงมาเป็นอย่างดี เนื่องจากมีการคัดเลือกต้นพันธุ์ก่อนปลูกจากแหล่งที่มีความน่าเชื่อถือสูง หรืออาจจะมีการจัดการแปลงแม่พันธุ์โดยการตัดต้นที่คาดว่ามีไม่มียีนความหอมทิ้งไปก่อนหน้าที่โครงการวิจัยเข้าไปดำเนินการตรวจดีเอ็นเอ และคณะผู้วิจัยได้มีการเก็บผลพันธุ์จากต้นแม่พันธุ์ทุกต้นมาเพาะเป็นต้นกล้า แล้วนำต้นกล้าจำนวน 368 ต้น ไปตรวจดีเอ็นเอหายีนความหอม พบว่าต้นกล้าทุกต้นที่ตรวจดีเอ็นเอมียีนความหอมทุกต้น หรือมียีนหอม 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับต้นแม่พันธุ์ จากผลการตรวจดีเอ็นเอยีนความหอมของต้นกล้าที่มียีนความหอม 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าแปลงแม่พันธุ์มะพร้าวน้ำหอมที่มีการจัดการแปลงที่ดี ไม่มีมะพร้าวต้นแม่พันธุ์ที่ไม่มียีนหอมปะปนอยู่ในแปลง ส่งผลให้ได้ต้นกล้ามะพร้าวที่มียีนหอม 100 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามต้นกล้าที่เพาะจากผลพันธุ์มะพร้าวที่มียีนความหอม 100 เปอร์เซ็นต์ อาจจะมีโอกาสพบต้นกล้าที่ไม่หอมแบบพันธุ์ทาง (Heterozygous) ได้บ้าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีแมลง ผึ้ง ลม นำพาละอองเกสรเพศผู้มาจากต้นมะพร้าวที่ไม่หอมมาผสม

สำหรับการตรวจยีนความหอมของแม่พันธุ์มะพร้าวในแปลงที่ 2 นางปุญณสา ประชุมศรี และแปลงที่ 3 นายสมเกียรติ ประพฤติกิจ จากผลการตรวจยีนความหอมทั้งสองแปลงได้ตรวจพบดีเอ็นเอแบบหอมแท้ (C/C) แบบพันธุ์ทาง (C/G) และแบบไม่หอมแท้ (G/G) ที่ปนปะกันอยู่ในบริเวณเดียวกัน เมื่อถึงช่วงระยะเวลาการผสมเกสรของดอกมะพร้าว จะมี แมลง ผึ้ง ลม เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการผสมเกสรข้ามระหว่างต้นที่มียีนหอม และหรือ ต้นที่ไม่มียีนหอม ส่งผลให้ผลพันธุ์มะพร้าวที่นำมาเพาะเป็นต้นกล้า และนำใบไปตรวจยีนความหอม ทำให้ตรวจพบต้นกล้ามะพร้าวที่ไม่มียีนหอมทั้งแบบพันธุ์ทาง และไม่หอมแท้ได้ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลผลจากการวิจัยนี้ที่ได้ตรวจพบต้นกล้าไม่มียีนหอมแบบพันธุ์ทางซึ่งเป็นผลพันธุ์ที่เพาะจากนั้นแม่พันธุ์ที่มียีนหอมแท้ (ต้นแม่พันธุ์ SKNH-173 และ SKNH-226 ตรวจพบต้นกล้ามียีนไม่หอมแบบพันธุ์ทางอย่างละ 1 ต้น)

สรุป

การตรวจยีนความหอมของต้นแม่พันธุ์และต้นกล้ามะพร้าวน้ำหอมของเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการ พบว่าแต่ละแปลงให้ผลการตรวจพบต้นที่มียีนความหอมและไม่หอมในเปอร์เซ็นต์ที่ต่างกัน แปลงที่ให้ผลการตรวจดีเอ็นเอแล้วพบว่ามียีนยอม 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งแปลงแม่พันธุ์และต้นกล้า คือแปลงที่ 1 นายประยูร วิสุทธิไพศาล สามารถตรวจพบยีนความหอมปรากฏอยู่ในต้นแม่พันธุ์ทุกต้น ส่วนแปลงที่ 2 นางปุญณสา ประชุมศรี ผลการตรวจดีเอ็นเอแล้วพบว่ามียีนหอมแท้ 90.81 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่ไม่หอม 9.19 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นต้นไม่หอมแบบพันธุ์ทาง 7.57 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่มียีนไม่หอมแท้ 1.62 เปอร์เซ็นต์ และแปลงที่ 3 นายสมเกียรติ ประพฤติกิจ ผลการตรวจดีเอ็นเอในแปลงต้นแม่พันธุ์พบว่ามียีนหอมแท้ 94.76 เปอร์เซ็นต์ ต้นไม่มียีนหอม 5.24 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นต้นไม่หอมที่มียีนหอมแบบพันธุ์ทาง 4.37 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่มียีนแบบไม่หอมแท้ 0.87 เปอร์เซ็นต์ และมีผลตรวจดีเอ็นเอของต้นกล้าพบว่ามียีนหอมแท้ 91.84 เปอร์เซ็นต์ และต้นกล้าไม่หอม 8.16 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นต้นกล้าไม่หอมแบบพันธุ์ทาง 5.38 เปอร์เซ็นต์ และต้นกล้าที่มียีนแบบไม่หอมแท้ 2.78 เปอร์เซ็นต์ จากข้อมูลการตรวจยีนความหอมของมะพร้าวที่ได้จากโครงการวิจัยนี้สามารถนำไปบริหารจัดการแปลงแม่พันธุ์มะพร้าวน้ำหอมได้โดยจำเป็นต้องตัดต้นแม่พันธุ์ที่มียีนไม่หอมแบบพันธุ์ทาง และไม่มียีนหอมแท้ ออกจากแปลงแม่พันธุ์ เพื่อป้องกันการผสมเกสรไปยังพันธุ์ที่มียีนหอมแท้ ทำให้ได้ผลพันธุ์หรือต้นกล้าที่ไม่หอม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (สกว.) (องค์การมหาชน) ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบคุณสวนมะพร้าว นายประยูร วิสุทธิไพศาล นางปุญณสา ประชุมศรี และ นายสมเกียรติ ประพฤติกิจ จังหวัดราชบุรี ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างมะพร้าวสำหรับงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

อลิษา ภู่ประเสริฐ วชิรญา อิ่มสบาย ศิวเรศ อารีกิจ และ ราตรี บุญเรืองรอด. 2562. อิทธิพลของละอองเกสรที่มีผลต่อความหอมของมะพร้าวน้ำหอม. ว. พืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 6 (4): 25-31.

Saensuk, C., Wanchana, S., Choowongkomon, K., Wongpornchai, S., Kraithong, T., Imsabai, W., Chaichoompu, E., Ruanjaichon, V., Toojinda, T., Vanavichit, A. and Arikit, S. 2016. De novo transcriptome assembly and identification of the gene conferring a “pandan-like”aroma in coconut (Cocos nucifera L.). Plant Science 252, 324-334.

Vongvanrungruang, A., Mongkolsiriwatana, C., Boonkaew, T., Sawatdichaikul, O., Srikulnath, K. and Peyachoknagul. S. 2016. Single base substitution causing the fragrant phenotype and development of a type-specific marker in aromatic coconut (Cocos nucifera). Genetics and Molecular Research 15 (3): gmr.15038748. 1-14.

Table 1 Results of the aromatic gene test for coconut mother plants in farmer plots in Ratchaburi Province

Farmer plot	Tested plants	Aromatic gene (Genotype)		
		Aromatic (C/C)	Non-Aromatic (G/G)	Heterozygous (C/G)
Plot 1	No.	190	0	0
	%	100	0	0
Plot 2	No.	168	3	14
	%	90.81	1.62	7.57
Plot 3	No.	217	2	10
	%	94.76	0.87	4.37

Table 2 Results of the aromatic gene test for coconut seedlings in farmer plots in Ratchaburi Province

Farmer plot	Tested plants	Aromatic gene (Genotype)		
		Aromatic (C/C)	Non-Aromatic (G/G)	Heterozygous (C/G)
Plot 1	No.	368	0	0
	%	100	0	0
Plot 3	No.	495	15	29
	%	91.84	2.78	5.38

การผลิตเอนไซม์เพคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* โดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย

The pectinase enzyme production from *Trichoderma asperellum* by the spray drying method

พยุงศักดิ์ รวยอารี [1*] และ ทัศนาพร ทัศคร [2]

Payungsak Rauyaree[1*] and Tadsanaporn Tassakorn[2]

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี 12110

[2] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[1] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Thanyaburi, Pathumthani 12110, Thailand

[2] Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

[*] Corresponding author: payungsak_r@yahoo.com

บทคัดย่อ

การศึกษากระบวนการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนสจากรา *Trichoderma asperellum* ไอโซเลท T-1 เพื่อให้ได้เอนไซม์ปริมาณมากในรูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดผงพร้อมใช้นำไปควบคุมโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมี โดยประยุกต์ใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ชุดทดสอบ QuantiChromTM Pectinase Assay Kit (DPEC-100) ผลการศึกษาพบว่า การผลิตเอนไซม์ผงในระดับถังกวนปริมาตร 2 ลิตร ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผงเอนไซม์เพคติเนสเท่ากับ 25-30 กรัมต่อรอบการผลิต และให้ค่าการผลิตเท่ากับ 1.25-2.0% ของผลผลิต ให้ผลกิจกรรมของเชิงปริมาณของเอนไซม์เพคติเนสเฉลี่ย 9.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ในระดับ pH 6 6.5 7 และ 7.5 ที่อุณหภูมิ 35 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าในเวลา 18 ชั่วโมง ที่ pH 7 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของของเอนไซม์สูงสุด 0.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 66 ชั่วโมง ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าสูงขึ้นเท่ากับ 2.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส ในเวลา 66 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่า pH 6.5 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด เนื่องจากงานวิจัยนี้ เป็นการผลิตเอนไซม์ผงในระดับกึ่งอุตสาหกรรม สามารถพัฒนาต่อยอดงานวิจัยไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการค้าต่อไปได้ โดยจำเป็นต้องมีการพัฒนาศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับอัตราการใช้ของสารตั้งต้น สภาวะที่เหมาะสมในช่วงค่า pH ระยะเวลาในการบ่ม อุณหภูมิในการบ่ม และควรพัฒนารูปแบบของเอนไซม์ผงในการนำไปใช้ควบคุมโรคให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: เชื้อราไตรโคเดอร์มา วิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย เพคติเนส ผงเอนไซม์

ABSTRACT

This study aims to produce the large amount of pectinase enzyme powder from *Trichoderma asperellum* T-1 isolate used to control the detrimental plant diseases compensate for toxic chemicals use. Using the spray drying technique and enzymatic activity study using QuantiChromTM Pectinase Assay Kit (DPEC-100), the results showed that the enzyme production using the spray drying technique at 2 Litre of spinner flask volumn resulted in the pectinase enzyme powder at 25-30 gram per a production round and the %yield was 1.25-2.0. An average quantitative

enzyme activity was 9.75 U/ml. For an enzyme activity study, at pH 6 6.5 7 and 7.5 after incubation at 35 degrees and at 37 degrees, the result revealed that after incubation at 35 degrees at 18 hours and pH 7, the pectinase enzyme activity was 0.85 U/ml. However, the pectinase enzyme activity was 2.2 U/ml after incubation at 37 degrees at pH 6.5 for 66 hours. This study may lead to the guidline for innovative bioproduct production for important orchid black rot disease control and for further industrial applications in the future. The study can further be developed by adjusting the starting material volumn ratios, optimal conditions for enzyme production such as pH, incubation time, temperature and enzyme stabilities at various time points.

Keywords: *Trichoderma* spp., spray drying method, pectinase, enzymatic powder

บทนำ

เอนไซม์เพคติเนส (EC 3.2.1.15) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ประเภทเอนไซม์ย่อยสลาย (hydrolytic enzyme) มีคุณสมบัติเร่งการย่อยเพคติน (pectin) ที่ประกอบอยู่ในผนังเซลล์พืช ก่อให้เกิดสารอาหารแก่พืชและเป็นหนึ่งชนิดเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ (cell-wall degrading enzymes) ของจุลินทรีย์รวมทั้งเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ เช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp. และเอนไซม์ในกลุ่มนี้ถูกใช้เป็นอีกหนึ่งในกลไกการยับยั้งโรคพืชที่สำคัญ (Dong *et al*., 2024; Rauyaree and Tassakorn, 2023)

การนำเอนไซม์เพคติเนสมาใช้ในทางการเกษตร โดยการทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying technique) ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ใช้ในการทำแห้งผลิตภัณฑ์ผงจากของเหลวด้วยหลักการการทำแห้ง (dehydration) สำหรับของเหลวอย่างรวดเร็วโดยให้อากาศร้อน ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (อาทิตยา และอมรชัย, 2557; Mukherjee *et al*., 2013) อุตสาหกรรมทางยา (Ahmed *et al*., 2010; Mukherjee *et al*., 2013) และอุตสาหกรรมทางการเกษตร (อนุสรา, 2552; อุษา, 2549; ธัญนิชา, 2552; ดวงพร และสุเทพ, 2543; วสันต์, 2546; Mukherjee *et al.,* 2013) รวมทั้งการใช้เทคนิค Spray Drying เพื่อใช้ในการควบคุมหรือยับยั้งโรคพืช เช่น แบคทีเรีย *Erwinia amylovora* ก่อโรค Fire blight (Ibrahim *et al.,* 2024); แบคทีเรีย *Bacillus velezensis* NKMV-3 เพื่อใช้ในการควบคุมโรค early blight ของมะเขือเทศ (Vignesh *et al.,* 2022)

กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสคือ ปริมาณของสับสเตรท (ไมโครโมลหรือไมโครกรัม) ที่เปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาเฉพาะของเอนไซม์จำนวนหนึ่งภายในหนึ่งหน่วยเวลา (นาทีหรือวินาที) โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนส 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณที่ย่อยเพคตินที่ผนังเซลล์พืชหรือเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบเพคตินให้มีขนาดโมเลกุลสั้นลง (สมฤดี, 2555) รวมทั้งเอนไซม์เพคติเนสมีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการสกัดน้ำจากผลไม้ได้อีกด้วย (ชิดชัย และคณะ, 2547)

คุณสมบัติของเอนไซม์เพคติเนส จัดเป็นกลุ่มของโปรตีนเกือบทั้งหมดหรือสารอินทรีย์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกริยาทางเคมีที่จำเพาะที่สูงมากต่อชนิดของปฏิกิริยาหรือเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิต เรียกว่า Biocatalyst ที่ทำลายเพคติน อีกทั้ง โครงสร้างปฐมภูมิ ทุติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิ มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไป เอนไซม์หลายชนิดสามารถทำงานได้ด้วยตัวมันเอง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานโดยทั่วไปอยู่ประมาณ 25-40 องศาเซลเซียส และสารบางชนิดมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือลดลง เรียกว่า ตัวยับยั้ง จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ได้ ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น เซลลูเลส เพคติเนส อะไมเลส โปรตีเอส และ ไลเปส ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการด้านการย่อยสลายทางชีวภาพ (lytic enzymes) และถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย ก่อให้เกิดประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม ในทางการเกษตร ในด้านสภาพแวดล้อม และในทางการแพทย์ (Mukhejee *et al.,* 2013)

ในปัจจุบัน ทั่วโลกต่างให้ความสนใจมากขึ้นเกี่ยวกับการคัดเลือกและนำจุลินทรีย์มาใช้ในการผลิตเอนไซม์พื้นฐานให้เหมาะกับงานในระดับอุตสาหกรรม (Panilla *et al*., 2025; Burhan *et al.,* 2003; Gubta *et al.,* 2003) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการเอนไซม์เพคติเนสและเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ ตัวอย่างเช่น จากรายงานการศึกษาเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและวัสดุเพาะเห็ด จำนวน 29 ไอโซเลท (ทัศนาพร และคณะ, 2550) เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และอะไมเลส ในระดับจานทดลองเมื่อพิจารณาจากค่า HC พบว่า *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T-1, T-14 และ T-22 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพคติเนส เซลลูเลส และอะไมเลสได้สูงสุด ตามลำดับ (พยุงศักดิ์ และทัศนาพร, 2567) และผลที่ได้จากการทดสอบการใช้เอนไซม์ผงเพคติเนสในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเน่าดำ *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler ในห้องปฏิบัติการ ด้วยการใช้เอนไซม์ผงเพคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ไอโซเลท T-1 ที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร 20 กรัมต่อลิตร 30 กรัมต่อลิตร 40 กรัมต่อลิตร และ 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในจานอาหารเพาะเชื้อวุ้น PDA ที่ประกอบด้วย mycelial disc ของเชื้อรา *Phytopthora palmivora* และ *Trichoderma asperellum* บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าที่ระยะเวลา 5 วัน หลังการวางชิ้นวุ้นของเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler

งานวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์เพคติเนสในรูปแบบผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying method) จากเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ไอโซเลท T-1 ในระดับกึ่งอุตสาหกรรม ทั้งนี้ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำข้อมูลวิจัยที่ได้ไปต่อยอดการผลิตเอนไซม์เพคติเนสผงของรา *Trichoderma asperellum* ไอโซเลท T-1 ในระดับอุตสาหกรรม รวมทั้งเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ทดสอบการควบคุมโรคเน่าดำกล้วยไม้ พืชเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดของประเทศไทย (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2565)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

บ่มเพาะเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ไอโซเลท T-1 บนจานอาหารเพาะเชื้อวุ้น PDA (Himedia, USA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน เจาะชิ้นวุ้นเชื้อราที่ประกอบด้วย mycelial disc ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ใส่ชิ้นวุ้นเชื้อราลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Czapek-Dox medium (Himedia, USA) ที่ประกอบด้วย 1% เพคติน ใน FLASK SPINNER (Bellco Glass, INC.) ปริมาตร 5 ลิตร ปั่นกวนและบ่มเพาะบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน กรองอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสไนเตรทปลอดเชื้อขนาด 0.45 ไมครอน (Whatman, England) ก่อนนำไปผลิตเอนไซม์ผงผ่านเครื่อง Spray Dryer (Büchi Mini Spray Dryer B-290, Thailand)

การผลิตเอนไซม์เพคติเนสแบบผงโดยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยและสภาวะการเก็บรักษา

การผลิตเอนไซม์ผงเพคติเนสด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยระดับห้องปฏิบัติการ (spray drying) ด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Büchi Mini Spray Dryer B-290) (BÜCHI model B290-, Switzerland) โดยกำหนดภาวะเครื่องที่เลือกใช้ (optimization parameters) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ดังนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวต่อมอลโตเด็กซ์ตริน (D.E.20) ซึ่งใช้เป็น adjuvant หรือ สารช่วยอบแห้งในปริมาตรร้อยละ 1.5-2.0 น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อเพิ่มความเสถียรภาพของผลิตผล และป้องกันการจับตัวเป็นก้อนหรือเสื่อมสภาพ ในปริมาตรรวมของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ลิตร ที่ภาวะเครื่องอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าที่ 140 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิลมร้อนขาออก 65 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของอากาศ 100% อัตราการป้อน 28% ความดันอากาศ 26 บาร์

การวิเคราะห์กิจกรรมของและสมบัติของเอนไซม์เพคติเนส

วิเคราะห์กิจกรรมของของเอนไซม์ โดยใช้ชุดทดสอบกิจกรรมเพคติเนสเชิงปริมาณ QuantiChrom™ Pectinase Assay Kit (DPEC-100) (Biosystems, Fisher Scientific, Thailand) โดยนำเอนไซม์เพคติเนสผงออกจากตู้ -20 องศาเซลเซียส ละลายผงเอนไซม์ 1 กรัม ต่อน้ำ 2 มิลลิลิตร ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต และศึกษาสมบัติของเอนไซม์เพคติเนส โดยกำหนดค่า pH 6 6.5 7 และ 7.5 ที่อุณหภูมิที่ 35 และ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0 18 24 42 48 และ 66 ชั่วโมง กำหนดค่า pH และอุณหภูมิ ประยุกต์ตามวิธีการของ (ชวนิฏฐ์ และคณะ, 2546)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาการผลิตเอนไซม์เพคติเนสผงด้วยการเพาะเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ไอโซเลท T-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Czapek-medium ในระดับถังกวนปริมาตร 5 ลิตร โดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย ให้ค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์เพคติเนสผงเท่ากับ 200-210 กรัมต่อครั้ง ให้ค่าร้อยละการผลิต (the %yield) เท่ากับ 1.25-2.0 ที่อุณหภูมิลมร้อนขาเข้าที่ 140 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับรายงานของ โพธิ์ทอง (2563) ทีมีสภาวะอบแห้งที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 130 องศาเซลเซียส ถึง 150 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสเชิงปริมาณที่ได้ พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสเฉลี่ยอยู่ที่ 9.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ค่า pH 6 6.5 7 และ 7.5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ผงเพคติเนสสูงสุดเท่ากับ 0.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ค่า pH 6.5 ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Figure 1a) และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสสูงสุดเท่ากับ 2.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ pH 7.0 ในสภาวะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 66 ชั่วโมง (Figure 1b) ผลที่ได้จากการศึกษา พบว่าเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ไอโซเลท T-1 สามารถผลิตหรือสกัดออกได้เป็นเพคติน สอดคล้องกับรายงานของ Sharma *et al.,* 2023.

การผลิตเอนไซม์ผงเพคติเนส ใช้ต้นทุนเท่ากับ 100 บาท ต่อปริมาตร 2 ลิตร หากขยายการผลิตเป็นแบบ Large-scale ปริมาตร 1,000 ลิตร จะมีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 100,000 บาท ให้ผลการผลิต 100 กิโลกรัม หรือ 100,000 กรัม คิดเป็นต้นทุน 1 บาท ต่อกรัม ของการผลิตเอนไซม์ผงเพคติเนสโดยเฉลี่ย สัดส่วนปริมาตรของสารตั้งต้น สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ผง เช่น ค่า pH ระยะเวลาในการบ่ม อุณหภูมิในการบ่ม รวมทั้งความเสถียรต่อที่ช่วงอุณหภูมิที่ช่วง pH ต่างๆ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (ชิดชัย และคณะ, 2547; วิภาดา และปราณี, 2537) เอนไซม์ผงปริมาณ 1 กรัมงานวิจัยนี้สามารถต่อยอดไปสู่งานวิจัยหรือประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ผงได้ (large-scale industrial application) เช่น การเพิ่มปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 10 ลิตร เป็น 20 ลิตร หรือมากกว่านั้น เอนไซม์ผงสามารถรักษาคุณภาพได้ในสภาพไม่โดนแสงอากาศไม่เข้า (Figure 3) แม้ในอุณหภูมิปกติ สามารถเก็บได้หลายปี ถึงแม้ว่าอุณหภูมิขาเข้าที่สูงขึ้นจะส่งผลดีในด้านการได้มาซึ่งปริมาณผงเอนไซม์ที่มากขึ้น อย่างไรก็ตาม ค่าอุณหภูมิที่ต่ำลง จะช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพหรือสูญเสียการออกฤทธิ์และรักษาคุณภาพของเอนไซม์ผงได้ รวมทั้งระยะเวลาที่สารตั้งต้นที่อยู่ภายในเครื่อง ที่ลดการเสื่อมสภาพจากความร้อน โดยระยะเวลาของสารตั้งต้นที่ถูกป้อน (อัตราการไหลป้อนสาร) สำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ 0.2-0.35 วินาที

ต้นทุนการผลิตเฉลี่ยคิดเป็นต้นทุน 4.34 บาท/ต่อกรัม เทียบกับราคาเอนไซม์เพคติเนสเชิงพาณิชย์ ซึ่งมีราคาตั้งแต่ 4 บาท/กรัม ถึง 5 บาท/กรัม การทำแห้งแบบพ่นฝอยมีต้นทุนใกล้เคียงกับการสั่งซื้อจากท้องตลาด แต่คุณภาพเอนไซม์เพคติเนสที่ผลิตได้ มีคุณภาพที่ดี ระยะเวลาในการได้มาซึ่งเอนไซม์ใช้เวลาสั้นเพียง 3 ถึง 4 วัน สามารถนำไปใช้งานได้ทันที ทั้งในห้องปฏิบัติการ ในโรงเรือนทดลอง หรือการเก็บรักษาเพื่อการใช้งานในอนาคต ไม่จำเป็นต้องจัดส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ สะดวกต่อการเก็บรักษาคุณภาพเอนไซม์ผงเพคติเนส โดยบรรจุลงในขวดแก้วปิดฝาเกลียวแน่น ห่อหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ หรือซองบรรจุฟอยล์เก็บรักษาในที่ไม่โดนแสง อากาศไม่เข้า ในตู้แช่อุณหภูมิ -20 ถึง -80 องศาเซลเซียส

อีกทั้ง ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ผงนั้น ได้แก่ อุณหภูมิลมร้อนขาเข้าที่สูงขึ้นจะส่งผลดีต่อปริมาณเอนไซม์ผงหรือวัตถุดิบที่เพิ่มขึ้น และค่าอุณหภูมิที่ต่ำหรือลดลง จะช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพหรือสูญเสียการออกฤทธิ์ และรักษาคุณภาพของเอนไซม์ผงได้ นอกจากนี้ ระยะเวลาของสารตั้งต้นที่อยู่ภายในเครื่องช่วยลดการเสื่อมสภาพจากความร้อน ระยะเวลาของสารตั้งต้นที่ถูกป้อน (อัตราการไหลป้อนสาร) สำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ 0.2-0.35 วินาที

การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่ผ่านกระบวนการ Spray drying หากเก็บรักษาในสภาพไม่โดนแสง อากาศไม่เข้า ภาวะอุณหภูมิปกติ สามารถเก็บเอนไซม์ผงได้นานหลายปี ถึงแม้ว่าอุณหภูมิขาเข้าที่สูงขึ้นจะส่งผลดีในด้านการได้มาซึ่งปริมาณผงเอนไซม์ที่มากขึ้น อย่างไรก็ตาม ค่าอุณหภูมิที่ต่ำลง จะช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพหรือสูญเสียการออกฤทธิ์และคงรักษาไว้ซึ่งคุณภาพของเอนไซม์ผงได้ รวมทั้งระยะเวลาที่สารตั้งต้นที่อยู่ภายในเครื่อง ที่ลดการเสื่อมสภาพจากความร้อน โดยระยะเวลาของสารตั้งต้นที่ถูกป้อน (อัตราการไหลป้อนสาร) สำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ 0.2-0.35 วินาที

การศึกษาประสิทธิภาพความคงทนของเอนไซม์ พบว่าการนำเอนไซม์เพคติเนสผงที่ผ่านการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าในแปลงเรียนรู้การผลิตกล้วยไม้ของเกษตรกร อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม จำนวน 4 ครั้ง ผลการทดลองพบว่าจากการผลิตเอนไซม์ผงครั้งแรกเมื่อเดือนพฤศจิกายน ถึง ธันวาคม ปี 2566 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อนำไปใช้ในการพ่นในแปลงทดลอง สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ในช่วงฤดูฝนถึงช่วงฤดูหนาวในปี 2567 โดยได้ทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ 5 วันหลังการพ่นครั้งครั้งที่ 4

ความใกล้เคียงของผลผลิตเอนไซม์เพคติเนสผงแต่ละครั้ง เนื่องจากปริมาตรของอาหารเหลวที่ใช้ และภาวะกำหนดการทำงานของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณผงเอนไซม์ที่ได้ต่อครั้งโดยจากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เชิงปริมาณในแต่ละครั้ง พบว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกันต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 2 ลิตร โดยเมื่อผ่านเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย กิจกรรมของของเอนไซม์เพคติเนสเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับ 9.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนการวิเคราะห์ครั้งต่อมาให้ค่ากิจกรรมของของเอนไซม์เท่ากับ 9.27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเท่ากับ 7.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าปริมาณการผลิตเอนไซม์ผงเพคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ไอโซเลท T-1 ในแต่ละครั้งมีความแตกต่างกัน แต่ก็ให้ปริมาณเอนไซม์ผงต่อครั้งที่ใกล้เคียงกัน โดยอยู่ในช่วงระหว่าง 25-30 กรัมต่อปริมาตร 2 ลิตร ต่อการผลิตหนึ่งครั้ง

เอนไซม์แต่ละชนิดล้วนมีหน้าที่การทำงานที่แตกต่างกัน ในการศึกษานี้จึงคัดแยกและศึกษาเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายได้ โดยเพคติเนสเป็นอีกหนึ่งชนิดเอนไซม์ย่อยสลายที่เชื้อราสามารถสร้างหรือผลิตขึ้นมาได้ เพื่อใช้ในการยับยั้งหรือป้องกันการบุกรุกเข้าสู่พืชเจ้าบ้านจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายชนิดอื่นๆ ที่มีศักยภาพในการผลิตเป็นเอนไซม์ผง เพื่อนำมาใช้ต่อยอดหรือใช้เป็นประโยชน์ในการควบคุมโรคพืช เพื่อประโยชน์ทางการเกษตรได้ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ผงเพคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ไอโซเลท T-1 โดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย สามารถสรุปได้ดังนี้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 2 ลิตร ให้ค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์เพคติเนสแบบผงเท่ากับ 25-30 กรัมต่อครั้ง ให้ค่าร้อยละการผลิต (the %yield) เท่ากับ 1.25-2.0 เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสที่ได้ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เชิงปริมาณเฉลี่ยที่วิเคราะห์ได้ มีค่าเท่ากับ 9.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ ค่ากิจกรรมเอนไซม์เชิงปริมาณมีค่าแตกต่างกันในแต่ละครั้ง รวมทั้งเมื่อทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ที่พีเอช 6 6.5 7 และ 7.5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0 18 24 42 48 66 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH 7 บ่มที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด

เท่ากับ 0.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH 6.5 บ่มที่ระยะเวลา 66 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสสูงสุดเท่ากับ 2.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนวิจัย สกสว. ที่สนับสนุนงบการวิจัย ขอขอบคุณ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษางานวิจัยนี้ และ ขอขอบคุณ นายอนุชา สุขสังวาลย์ และนางสาวทิวาราตรี ภูริเทเวศร์ ที่ช่วยปฏิบัติงานวิจัยและเก็บบันทึกข้อมูลในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

ชวนิฏฐ์ สิทธิดิลกรัตน์ พิลาณี ไวถนอมสัตย์ ณัฐกานต์ แซ่โค้ว วราภรณ์ อภิวัฒนาภิวัต สุรางค์ สุธิราวุธ และ ปริศนา สิริอาชา. 2546. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เพคติเนสและทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการแยกเยื่อจากเปลือกปอสา. การประชุมวิชาการประจำปี 2546 ครั้งที่ 1 สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร. การประชุมวิชาการประจำปี 2546 ครั้งที่ 1 สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร. (หน้า 49-63). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร.

ชิดชัย ปัญญาสวรรค์ วิชัย หฤทัยธนาสันติ์ เพ็ญขวัญ ชมปรีดา ปริศนา สิริอาชา และ ธีรารัตน์ สังขวาสี. 2547. การพัฒนาไซรัปเข้มข้นจากกล้วยหอมทองโดยการใช้เอนไซม์. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาประมง สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. (หน้า 434-441). สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย.

ดวงพร ตั้งบำรุงพงษ์ และสุเทพ อภินันท์จารุพงศ์. 2543. กระบวนการผลิตน้ำผักผลไม้รวมผงโดยใช้เครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจายและไมโครเวฟสุญญากาศ. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ดวงพร สิริอาชา. 2545. โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ผลิตผลทางการเกษตรและป่าไม้ในประเทศไทย: เล่มที่ 2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เพคติเนสและทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการแยกเยื่อจากเปลือกปอสา (น. หน้า 505-524). องค์การความร่วมมือระหว่างประเทศของญี่ปุ่น.

ทัศนาพร ทัศคร อภิรัช สมฤทธิ์ และธารทิพย ภาสบุตร. 2550. ศึกษาผลการใช้วัสดุเพาะเห็ดร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp.ในการป้องกันกำจัดโรคลำต้นไหม้หน่อไม้ฝรั่ง. หน้า 366-378. ใน: รายงานผลวิจัยประจำปี 2550 เล่มที่ 1. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

ธัญนิชา ไร่นากิจ. 2552. ซอร์ปชันไอโซเทอม คุณภาพทางเคมี กายภาพและอุณหภูมิ กลาสทรานซิชันของน้ำลำฝยผง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พยุงศักดิ์ รวยอารี และทัศนาพร ทัศคร. 2567. การผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินและวัสดุเพาะเห็ด. วารสารวิชาการเกษตร. 42(1): 62-70.

โพธิ์ทอง ปราณีตพลกรัง. 2563. เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอยสำหรับอบแห้งผลผลิตทางการเกษตร. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 12(2): 347-361.

วสันต์ ด้วงคำจันทร์. 2546. ปัจจัยในการทำงานที่สำคัญสำหรับการออกแบบเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย: กรณีศึกษากระเจี๊ยบผง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วิภาดา ศุภจรรยา และปราณี อ่านเปรื่อง. 2537. การสกัดหัวน้ำเชื้อทุเรียนโดยการใช้เอนไซม์ เพคติเนส เซลลูเลส และอะมัยเลส ภายใต้ภาวะปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องและแบบตามลำดับ. อาหาร. 24: 173-180.

สมฤดี ไทพาณิชย์. 2555. กระบวนการแปรรูปด้วยเอนไซม์และการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยของไซรัปขนุนชนิดผง. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม. 7(1): 31-39.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2565. กล้วยไม้: ร้อยละและปริมาณผลผลิตจากการเก็บเกี่ยวรายเดือน ระดับประเทศ ภาค และจังหวัด ปี 2565. แหล่งข้อมูล: https://www.oae.go.th. สืบค้น: 29 สิงหาคม 2567.

อนุสรา เมืองมา. 2552. การลดการเกาะติดของน้ำผึ้งผงระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอย. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อาทิตยา พัฒนิบูลย์. และอมรชัย อาภรณ์วิชานพ. 2557. เทคโนโลยีการอบแห้ง. Technology Promotion. 41(234): 64-67.

อุษา สิทธารถ. 2549. การพัฒนาการแปรรูปน้ำผึ้งผงและการประเมินอายุการเก็บรักษา. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 0141-8130.

Ahmed, M., Sorifa, A.M., Lee, J.C., and Eun, B.J. 2010. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. Food Science and Technology. 43: 1307-1312.

Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., and Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. isolate ANT-6. Process Biochemistry. 38(10): 1397-1403.

Dong, Yuhe., Jiang, Tao.,Wu, Tong., Wang., Wenrui., Xie, Zesen., and Yu, Xi., Peng, Ye., Wang, Ling., Xiao, Ying., and Zhong, T. 2024. Enzyme-responsive controlled-release materials for food preservation and crop protection-A Review. International Journal of Biological Macromolecules. 254:

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., and Chauhan, B. 2003. Microbial α-amylases: biotechnological perspective, Process Biochemistry, 38(11): 1599-1616.

Ibrahim., N., Nesbitt, D., Guo, Q., Lin, J., Svircev, A., Wang, Q., Weadge, J.T., and Anany, H. 2024. Improved viability of spray-dried Pantoea agglomerans for Phage-Carrier mediated control of fire blight. Viruses. 16: 257.

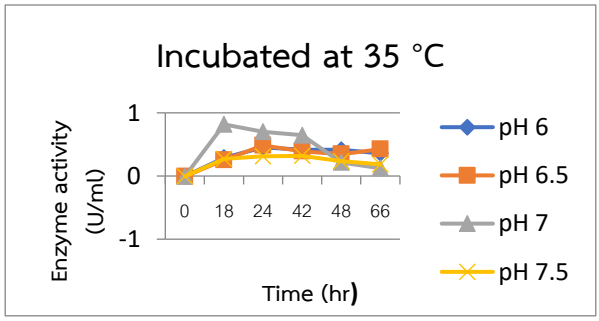
Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Singh, U.S., Mala Mukherjee Mala Mukherjee, and Schmoll, M. 2013. Trichoderma in agriculture, industry and medicine: an overview. Trichoderma: Biology and Applications. pp 1-9.

Pinilla, C.M.B., Escudero, F.G., Spadoti, L.M, Brandelli A., and E Alves A., T.S. 2025. Genetic and enzymatic profiling reveals aminopeptidase potential of Lactobacillus acidophilus ItalPN270. FEMS Microbiol Lett. 2025 Mar 3:fnaf028. doi: 10.1093/femsle/fnaf028. Epub ahead of print. PMID: 40037606.

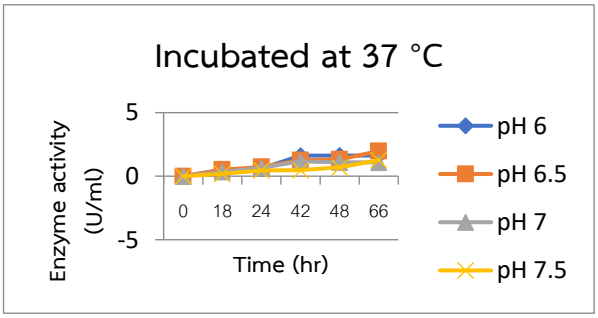
Rauyaree, P., and Tassakorn, T. 2023. Trichoderma: Biology, ecology and Trichoderma-plant and Trichoderma-pathogen interactions. Journal of Science and Agricultural Technology. 4(2): 1-4.

Sharma, A., Kumar, H., and Amir, A. 2023. Production of pectinase by Trichoderma spp. under solid state fermentation conditions by using pine apple peel. IJRPR. 4(6): 3946-3949.

Vignesh, M., Madhan Shanker, S., Subramani, N., Narayanan, B., VedhaHari, B.N., and Ramyadevi, V.D. 2022. Stydy on spray-drying of Bacillus-drying Bacillus velezensis NKMV-3 strain, its formulatiojn and bioefficacy against early blight of tomato. 45: 102483.



(a)



(b)

Figure 1 Enzymatic pectinase study of *Trichoderma asperellum* T-1 isolate at the different pH value. The pectinase enzyme activities incubated at 35 °C (a). The pectinase enzyme activity incubated at 37 °C (b).

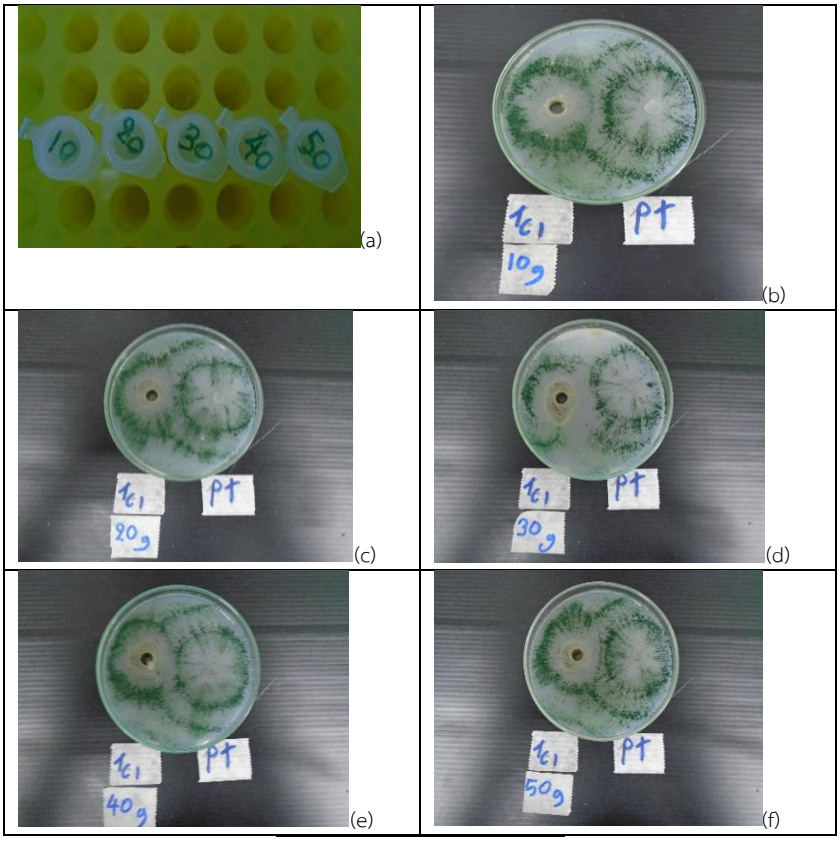


Figure 2 Efficacy of pectinase enzyme solutions (a) at 10 gram/L (b), 20 gram/Litre (c), 30 gram/Litre (d), 40 gram/Litre (e) and 50 gram/Litre (f) at 200 microlitre for inhibition of *P. palmivora* on CA medium after 5 days of incubation.

ผลของ N6-benzyladenine ต่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในกัญชาในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of N6-benzyladenine on *In vitro* Shoot Multiplication of *Cannabis*

ประกาย อ่อนวิมล[1,2*] ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์[1] สญชัย ขวัญเกื้อ[2] ทรงเมท สังข์น้อย[2] และ สมคิด ดำน้อย[2]

Prakay Onwimol[1,2*], Phummarin Wanichananan[1], Sonchai Kwankuae[2], Songmat sungnoi[1] and Somkid Damnoi[2]

[1]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร เลขที่ 85 หมู่ 1 ถ.รังสิต-นครนายก ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[2]กองวิจัยพัฒนาพืชเศรษฐกิจใหม่และการจัดการก๊าซเรือนกระจกสำหรับภาคเกษตร ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

[1]Biotechnology Research and Development Office 85 Moo 1 Rangsit – Nakhon Nayok Rd., Rangsit, Thanyaburi, Pathum Thani 12110

[2]Crop for the Future and Greenhouse Gas Management in Agricultural Sector Research & Development Division, Chatuchak, Bangkok 10900

[*]Corresponding author: guy5490@gmail.com

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์กัญชาพันธุ์ดีเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ จำเป็นต้องใช้ต้นเพศเมีย เนื่องจากมีปริมาณสารสำคัญสูงกว่าต้นเพศผู้ งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับชักนำข้อและยอดกัญชาพันธุ์ดีให้เกิดยอดจำนวนมากด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเริ่มจากฟอกกำจัดเชื้อจากชิ้นส่วนข้อและยอดกัญชาโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (ไฮเตอร์®) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ การนำเนื้อเยื่อส่วนข้อและยอดไปชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/l ให้จำนวนการเกิดยอดใหม่เฉลี่ย 4 ยอดต่อข้อ

คำสำคัญ: กัญชา, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, การขยายพันธุ์พืช, N6-*เบน*ซิล*อะลาดีนีน*,

ABSTRACT

High-quality female cannabis plants are necessary for cultivation for medicinal purposes due to their higher concentration of secondary metabolites compared to male plants. This study identified the best formula for inducing numerous shoots from shoot tip and node segments in the elite lines of cannabis using tissue culture techniques. Shoot and nodal segments were disinfected using 6% sodium hypochlorite (Haiter®) for 15 minutes and then placed into a solid MS medium. After two weeks of cultivation, the survival rate was 100%. Nodal segments and shoot tips were cultivated on solid MS medium with varying concentrations of BA (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5 mg/l) for 4 weeks. Both segments were grown on solid MS medium with BA 0.5 mg/l yielded an average of 4 shoots.

Keywords: Cannabis, Plant Tissue culture, Pant propagation, N6-Benzyladenine

บทนำ

กัญชา (*Cannabis, sp.*) เป็นไม้ล้มลุกที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชีย จัดอยู่ในตระกูล Cannabaceae สามารถแบ่งกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* และ *Cannabis ruderalis* การใช้ประโยชน์จากกัญชามีหลากหลายประเภท เช่น ยา เส้นใย และอาหารเพื่อสุขภาพ ปัจจุบันมีการนำมาใช้รักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคเบาหวาน และโรคมะเร็งเป็นต้น ในกัญชามีสาร cannabinoids ที่มีองค์ประกอบหลักคือ delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) และ Cannabidiol (CBD) ซึ่งสาร THC ทำให้รู้สึกผ่อนคลายทางการแพทย์ใช้ในการรักษาโรคหัวใจและโรคอื่น ๆ ส่วนสาร CBD มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งได้ จึงทำให้กัญชาได้รับความสนใจจากเกษตรกรและผู้ที่นำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคจำนวนมาก แต่ในประเทศไทยยังขาดองค์ความรู้ในการผลิตกัญชาที่ถูกต้องและเหมาะสม ตั้งแต่การศึกษาและพัฒนาพันธุ์พืชกัญชา ที่ควรส่งเสริมสนับสนุนการศึกษาและพัฒนาพันธุ์ โดยเฉพาะสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย ให้มีความคงตัวทางพันธุกรรม และให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ต้องการในระดับสูง อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะได้พันธุ์ที่ดีมีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ต้องการในระดับสูง แต่การขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นยังเป็นปัญหา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วย เนื่องจากการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดมีความแปรปรวนสูงในบางครั้งอาจไม่ได้ต้นพันธุ์ที่ตรงตามคุณสมบัติที่ต้องการและทำให้เสียเวลาในการคัดเลือก รวมทั้งการขยายพันธุ์แบบดั้งเดิมต้องใช้ต้นตอจำนวนมากทำให้ต้องใช้เวลานานในการขยายพันธุ์ แต่เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำเนื้อเยื่อทุกส่วนของต้นพันธุ์ที่ดีมาเพาะเลี้ยงแล้วชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ที่มีลักษณะตรงตามพันธุกรรม และสามารถขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดไซโตไคนินซึ่งมีหลายรายงานที่ประสบความสำเร็จในกัญชา เช่น Lata และคณะ (2009) รายงานว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 μM ให้จำนวนยอดกัญชาเฉลี่ย 6.3 ยอด หรือในพืชอื่น ๆ ดังรายงานของสาวิตาและคณะ (2564) ใช้สาร BA ในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ในกุหลาบหนู พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 3 มิลลิกรัม ต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ที่มีความสมบูรณ์มากที่สุดเฉลี่ย 16.9 ยอดต่อชิ้นส่วน และให้ค่าเฉลี่ยความสูงยอดมากที่สุด 4.03 เซนติเมตร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ BA ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยอดที่เกิดจากข้อและยอดกัญชาในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านการวิจัยและขยายพันธุ์กัญชาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอนาคตต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ฟอกฆ่าเชื้อข้อและยอดกัญชา

นำต้นกัญชาพันธุ์ดีอายุ 2 เดือนมาตัดเฉพาะส่วนยอดพร้อมกับตัดใบส่วนเกินออก ล้างทำความสะอาดด้วยผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด Teepol® 1 ครั้ง ผึ่งให้สะเด็ดน้ำแล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (ไฮเตอร์®) ที่ระดับความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที พอครบตามเวลานำมาล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ซับน้ำส่วนเกินออกด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนข้อและยอดที่มีชีวิตและปราศจากเชื้อ

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

นำข้อและยอดกัญชาจากต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในช่วงเวลาดังกล่าวมีการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยตรวจนับจำนวนยอดที่สมบูรณ์ และบันทึกภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การฟอกฆ่าเชื้อข้อและยอดกัญชา

จากการฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วนข้อกัญชาพันธุ์ดีจำนวน 3 พันธุ์ ด้วยสารโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (ไฮเตอร์®) ที่ระดับความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที พบว่าหลังจากผ่านไป 2 สัปดาห์ชิ้นส่วนข้อและยอดกัญชาพันธุ์ดีมีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จากชิ้นส่วนเริ่มต้นจำนวน 30 ชิ้น ลักษณะข้อและยอดของทั้ง 3 พันธุ์ที่รอดชีวิตมีสีเขียว บางข้อเริ่มมียอดอ่อนเกิดขึ้น สำหรับชิ้นส่วนยอดกัญชาของทั้ง 3 สายพันธุ์ ลักษณะยอดที่รอดชีวิตมีลักษณะที่สมบูรณ์สีเขียว และเริ่มมีใบอ่อนเกิดขึ้นจำนวน 2-3 ใบ (Figure 1) หลังจากนี้จะนำข้อและยอดที่ปลอดเชื้อไปเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในกัญชา

หลังจากนำยอดกัญชาสายพันธุ์ดีพันธุ์ที่ 2 ไปเพาะเลี้ยงให้เกิดยอดจำนวนมากบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ายอดกัญชาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทั้ง 6 สูตร เริ่มเกิดยอดใหม่ขนาดเล็กและเริ่มเจริญเติบโตเต็มที่และยอดพัฒนาจนเห็นได้ชัดเจนใน 4 สัปดาห์ โดยยอดกัญชาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 mg/l ยอดใหม่เริ่มมีการเจริญเติบโตมากขึ้น และให้จำนวนการเกิดยอดใหม่ 4 ยอดหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ (Figure 2A) สำหรับยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 mg/l หลังจากเพาะเลี้ยงไป 8 สัปดาห์ พบว่าเริ่มมียอดใหม่เกิดขึ้นแต่จำนวนยอดน้อยโดยมีจำนวนยอดมากที่สุด 3 ยอด (Figure 2B) ส่วนยอดกัญชาพันธุ์ดีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0 mg/l หรือไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีการพัฒนาของยอดจำนวน 1 ยอด (Figure 2C) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Lata และคณะ (2009) รายงานว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 μM ให้จำนวนยอดกัญชาเฉลี่ย 6.3 ยอด นอกจากนี้ยังมีอีกหลายรายงานที่ประสบผลสำเร็จในการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA สำหรับเพิ่มปริมาณยอดให้ได้จำนวนมากโดยจะใช้ปริมาณความเข้มข้นที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์ของพืชนั้น ๆ (Cheng *et al*., 2006; Lata *et al*., 2010; Movahedi *et al*., 2015) แม้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เป็นฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินที่มีคุณสมบัติเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นการแบงเซลล์ การขยายขนาดของเซลล์ การเจริญของกิ่งและลำต้น รวมทั้งเร่งการแตกตาข้าง (อนุพันธ และพันธิตรา, 2549) แต่การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกับพืชแต่ละชนิดจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมเพราะถ้าใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปส่งผลให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของปลายยอด โดยทำให้อวัยวะของพืชมีการเติบโตที่ไม่สัมพันธ์กัน เช่น แบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นแต่เซลล์ไม่ขยายขนาด ไม่ยืดยาว

ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นจากตาข้างจะมีลักษณะยอดสั้น อวัยวะบิดเบี้ยวเสียรูปทรง การเจริญของพืชลดลงและหยุดไปในที่สุด (ประกาย และคณะ, 2565)

สรุป

การฟอกฆ่าเชื้อข้อและยอดกัญชาด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (ไฮเตอร์®) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที มีอัตราการรอดชีวิตที่ปราศจากเชื้อคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ สูตรอาหาที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชาให้ได้ยอดจำนวนมากคือสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 mg/l โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 4.5 ยอด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) ทะเบียนวิจัยกรมวิชาการเกษตร FF65-01-01-65-04-02-65

เอกสารอ้างอิง

ประกาย อ่อนวิมล, ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์, ไพฑูรย์ บุปผาดา, วรารัตน์ ศรีประพัฒน์ และ สุพินญา บุญมานพ. 2565. การขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวมในจิงจูฉ่ายด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ. 5 (1) : 5-12.

สวิตา วันหวัง, มณฑารพ สุธาธรรม, ชเนศ วรรณะ, ธราธร ทีรฆฐิติ และ ศิริรัตน์ พักปากน้ำ. 2564. ผลของ BA ต่อการเจริญและพัฒนาของตาข้างกุหลาบหนู (*Rosa chinensis* Jacq. var. minima Voss) ในหลอดทดลอง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี. 9 (1): 2287-0083

อนุพันธ กงบังเกิด และพันธิตรา กมล. 2549. ผลของไซโตไคนินและออกซินตอการพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกระเจียวขาว. NU Science Journal 2006; 2(2) : 183-201.

Cheng C, Zang G, Zhao L, Gao C, Tang Q, Chen J, *et al.* 2016. A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa* L.). Ind Crops Prod. 2016 ; 83:61–5.

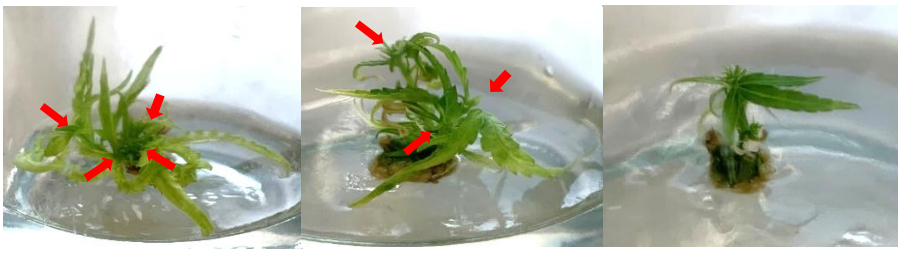
Lata H, Chandra S, Khan I, ElSohly MA. 2009. Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 45:12–9.

Lata H, Chandra S, Khan I, ElSohly MA. 2010. High frequency plant regeneration from leaf derived callus of high Δ9-tetrahydrocannabinol yielding *Cannabis sativa* L. Planta Med. 76:1629-33.

Movahedi M, Ghasemi-Omran VO, TorabiS. 2015. The effect of different concentrations of TDZ and BA on in vitro regeneration of Iranian cannabis (*Cannabis sativa*) using cotyledon and epicotyl explants. J Plant Mol Breeding. 2015;3: 20-7.

A B C

Figure 1 The cannabis nodal segment was surface sterilized, Elite line 1(A), Elite line 2(B) and Elite line 3(C) after being cultured for 2 weeks on solid MS medium under 55 μmol/m^2/s of light intensity for 16 hours/day at 25±2°C



A B C

Figure 2 Morphology of new shoots derived from *Cannabis* Elite line 2, after being cultured for 8 weeks on solid MS medium supplemented with 0.5 mg/l (A) , 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/l (B) and 0 mg/l (C) BA under 55 μmol/m^2/s of light intensity for 16 hours/day at 25±2°C

ความหลากหลายของพืชสกุลปุดในประเทศไทย

Diversity of Genus *Etlingera* in Thailand

ชลลดา สามพันพวง* ธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์ และ อภิญญา วงศ์เปี้ย

Chollada Samphunphuang*, Theerapat Luangsuphabool and Aphinya Wongpia

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Rangsit, Thanyaburi, Pathum Thani 12110

* Corresponding author: annsamphun@gmail.com

บทคัดย่อ

พืชสกุลปุด (Genus *Etlingera*) จัดอยู่ในพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) มีความหลากหลายของชนิดพืชในสกุลประมาณ 150 – 200 ชนิด เอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นเขตภูมิภาคหนึ่งที่พบการกระจายพันธุ์ของพืชสกุลปุดหลายชนิด และพืชสกุลปุดเหล่านี้มีหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นพืชอาหาร พืชสมุนไพร และไม้ดอกไม้ประดับ ในประเทศไทยมีรายงานการสำรวจพบพืชสกุลปุดประมาณ 17 ชนิด แต่มีคนที่รู้จักและใช้ประโยชน์จากพืชสกุลปุดยังไม่แพร่หลาย ดังนั้นการวิจัยนี้จะเป็นการศึกษาความหลากหลายของพืชสกุลปุดในประเทศไทย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บรวบรวมอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรม จัดจำแนกชนิด และระบุชื่อที่ถูกต้องของพืชสกุลปุด สำหรับใช้เป็นองค์ความรู้ในการพัฒนาต่อยอดและใช้ประโยชน์จากคุณค่าความหลากหลายของพืชสกุลปุดในประเทศไทย การสำรวจและเก็บรวบรวมพืชสกุลปุดนี้ ใช้วิธีการเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (purposive sampling) ตามการแบ่งเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2564 ถึงปี พ.ศ. 2566 พบพืชสกุลปุด จำนวน 11 ชนิด แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ช่อดอกอยู่ติดพื้นดิน (*Achasmas* group) จำนวน 7 ชนิด และกลุ่มช่อดอกโผล่พ้นเหนือดิน (*Phaeomeria* group) จำนวน 4 ชนิด และเก็บอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ไว้ที่ธนาคารเชื้อพันธ์พืชกรมวิชาการเกษตร จำนวน 8 ชนิด 15 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบว่าเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคใต้ มีความหลากชนิดของพืชสกุลปุดสูงที่สุด ส่วนชนิดของพืชสกุลปุดที่มีการแพร่กระจายพันธุ์มากที่สุดในประเทศไทย คือ ปุดช้าง (***E. littoralis***)

คำสำคัญ: พืชสกุลปุด, ความหลากหลายของชนิดพันธุ์, เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณของไทย

ABSTRACT

The genus *Etlingera* is a member of the Zingiberaceae family. There are various plant species in the genus, approximately 150 – 200 species. Southeast Asia is one of the regions where many species of this genus are found to be used as food, medicinal and ornamental plants. In Thailand, there are reports of surveys of about 17 species of the genus *Etlingera*, but few people know and use the plants in this genus. Therefore, this research aimed to study the diversity of the genus *Etlingera* in Thailand. The objectives are to collect and conserve the genetic material of the genus *Etlingera*, to classify the species, and to identify the correct name of the genus *Etlingera* for use as knowledge to further develop and utilization of the diversity value of the genus *Etlingera* in

Thailand. The exploration and collection of this plant species by purposive sampling according to the plant floristic regions of Thailand during 2021 – 2023. There were 11 species of plants in the genus *Etlingera*, divided into two groups: the group with inflorescences attached to the ground (*Achasmas* group) with 7 species and the group with inflorescences emerging from the ground (*Phaeomeria* group) with 4 species. A total of 8 species and 15 germplasm accessions were collected and conserved in Genebank, Department of Agriculture. The Peninsular floristic regions in Thailand have the highest species diversity of the genus *Etlingera* and the most widely distributed species is *E. littoralis* (Put Chang).

Keywords: Genus *Etlingera*, Species diversity, Thailand Floristic Regions

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากที่สุดแห่งหนึ่งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่การขยายตัวทางด้านเศรษฐกิจและการพัฒนาด้านเทคโนโลยีต่าง ๆ ของประเทศ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อม เป็นเหตุทำให้จำนวนความหลากหลายทางชีวภาพของพืชบางชนิดลดลง การเก็บรวบรวมอนุรักษ์ความหลากหลายของทรัพยากรพันธุกรรมพืชของประเทศจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในแง่ของการบริหารจัดการความหลากหลายทางชีวภาพของทรัพยากรธรรมชาติของประเทศ

พืชสกุลปุด (Genus *Etlingera*) จัดเป็นพืชสกุลใหญ่สกุลหนึ่งในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ที่มีความหลากหลายของชนิดพืชในสกุลมาก โดยมีประมาณ 150 - 200 ชนิด (Poulsen, 2012) เป็นพืชที่พบการกระจายพันธุ์ได้มากในป่าดิบชื้นบริเวณเส้นศูนย์สูตร สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ราบลุ่มไปจนถึงพื้นที่ที่มีระดับความสูงจากน้ำทะเล 2,700 เมตร พบการกระจายพันธุ์ได้ทั่วไปตั้งแต่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย ไปจนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จนถึงหมู่เกาะแปซิฟิกตะวันตก (Poulsen, 2012; Yeats, 2013) พืชสกุลปุดหลายชนิดถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นพืชอาหาร พืชสมุนไพร และไม้ดอกไม้ประดับแบบดั้งเดิมและเชิงพาณิชย์ ในสภาพธรรมชาติพืชสกุลปุดที่อยู่ในชั้นใต้ชั้นดินถือได้ว่าเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของสัตว์อีกด้วย (Lamb et al., 2013; Lim, 2014)

ในประเทศไทยมีรายงานการสำรวจพบพืชสกุลปุดมากถึง 17 ชนิด แต่มีเพียงบางชนิดที่คนทั่วไปรู้จักและถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ได้แก่ ดาหลา (***E.*** *elatior*) ใช้เป็นไม้ดอกไม้ประดับ และ เร่วหอม (***E.*** *pavieana*) ใช้เป็นพืชอาหารที่เป็นยา จึงมีพืชสกุลปุดอีกหลายชนิดที่ยังขาดการศึกษาวิจัย ประกอบกับลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชสกุลปุดส่วนใหญ่นั้นมีความคล้ายคลึงกันมาก จนยากที่จะจัดจำแนกชนิดได้ ทำให้คนส่วนใหญ่มองว่าเป็นปุดชนิดเดียวกันหมด ส่งผลทำให้พืชสกุลปุดในประเทศไทยมีความเสี่ยงต่อการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาความหลากหลายของพืชสกุลปุดในประเทศไทย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ เก็บรวบรวมอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชสกุลปุด จัดจำแนกชนิด และระบุชื่อที่ถูกต้องของพืชสกุลปุด สำหรับใช้เป็นองค์ความรู้ในการพัฒนาต่อยอดและใช้ประโยชน์จากคุณค่าความหลากหลายของพืชสกุลปุดในประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาความหลากหลายและเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลปุด

ทำการศึกษาค้นคว้ารวบรวมข้อมูลเบื้องต้นที่เกี่ยวกับพืชสกุลปุด จากเอกสาร ตำรา สิ่งพิมพ์ และจากข้อมูลตัวอย่างพรรณไม้แห้งในพิพิธภัณฑ์พืชต่าง ๆ เพื่อให้ทราบถึงข้อมูลด้านนิเวศวิทยา แหล่งการกระจายพันธุ์ และลักษณะของพืชสกุลนี้ในแต่ละชนิด หลังจากนั้นทำการสำรวจเก็บตัวอย่างพืชสกุลปุดทั่วทุกภาคของประเทศ โดยอาศัยข้อมูลด้านนิเวศวิทยา และแหล่งการกระจายพันธุ์ตามเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณ (floristic regions) ของไทย ซึ่งแบ่งเป็น 7 เขต (ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, 2544) เก็บรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลปุดจากกลุ่มเกษตรกรที่ปลูกเพื่อการค้า แหล่งจำหน่ายทางช่องทางออนไลน์ หรือแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บันทึกข้อมูลต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับพืชสกุลปุดที่รวบรวมได้ในพื้นที่ศึกษาให้ละเอียดมากที่สุด พร้อมทั้งถ่ายภาพ ตัวอย่างรายละเอียดในการบันทึกข้อมูล ได้แก่ ชื่อพื้นเมือง ชื่อพันธุ์ ลักษณะพืช ลักษณะวิสัยของพืช ฯลฯ

การตรวจสอบเอกลักษณ์ ลักษณะ และวินิจฉัยชื่อพืชสกุลปุด

นำข้อมูลและตัวอย่างพืชสกุลปุดที่เก็บรวบรวมมาตรวจวิเคราะห์หาชนิดของพืชสกุลปุด เพื่อระบุชื่อที่ถูกต้อง โดยใช้รูปวิธานการจัดจำแนกพรรณไม้ ตัวอย่างของพืชสกุลปุดที่ได้จากการศึกษา ต้นพันธุ์ที่สามารถปลูกเลี้ยงนอกพื้นที่ศึกษาได้ ให้ปลูกรวบรวมอนุรักษ์ไว้ที่ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร และชิ้นส่วนอื่น ๆ ของพืชจัดทำเป็นตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง เพื่อให้ผู้ที่สนใจนำไปต่อยอดเพื่อการใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาและเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลปุดในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2564 ถึงปี พ.ศ. 2566 ในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศ ตามการแบ่งเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณของประเทศไทย สามารถจัดจำแนกชนิดของพืชสกุลปุดได้ทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ 1) ปุดดอย (***Etlingera araneosa*** **(Bak.) R.M. Sm.) 2)** ปุดใหญ่ (*E.* coccinea (Blume) S.Sakai & Nagam.) 3) ปุดลิ้น (***E. linguiformis*** **(Roxb.) R.M.Sm.) 4)** ปุดช้าง (***E. littoralis*** **(J.Koenig) Giesecke) 5)** ปุดซ้อนทอง (*E. pauciflora* (Ridl.) R.M.Sm.) 6) เร่วหอม (***E.*** *pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Smith) 7) ปุดยูนาน (***E. yunnanensis*** (T.L.Wu & S.J.Chen) R.M.Sm.) 8) ดาหลากุหลาบ (***E. corneri*** **Mood & Ibrahim)** 9) ดาหลา (***E.*** *elatior* (Jack) R.M. Smith) 10) ดาหลาไฟ (***E. fulgens*** (Ridl.) C.K.Lim) และ 11) ดาหลาตายน (***E. maingayi*** **(Baker) R.M.Sm.) (Figure 1)** โดยภาคใต้ พบความหลากหลายของชนิดพืชสกุลปุดสูงที่สุด เนื่องจากมีลักษณะเป็นป่าดิบชื้นหรือป่าฝนเขตร้อนจัดเป็นป่าประเภทไม่ผลัดใบ เป็นป่าที่มีสีเขียวตลอดทั้งปี ต้นไม้จะไม่ผลัดใบในช่วงฤดูแล้ง เนื่องจากมีปริมาณน้ำฝนค่อนข้างมาก และปุดช้าง (***E. littoralis***) เป็นพืชสกุลปุดที่มีเขตการแพร่กระจายพันธุ์ได้กว้างกว่าปุดชนิดอื่น (Table 1)

ในการศึกษาวิจัยนี้สามารถแบ่งพืชสกุลปุดทั้ง 11 ชนิด ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยใช้ลักษณะของช่อดอก คือ กลุ่มที่ช่อดอกเกิดจากเหง้าฝังใต้ดิน ก้านช่อดอกยาวน้อยกว่า 20 เซนติเมตร และกลุ่มที่ช่อดอกเกิดจากเหง้าตั้งตรง ก้านช่อยาวมากกว่า 20 เซนติเมตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Khaw (2001) ที่ทำการศึกษาพืชสกุลปุดทางใต้ของมาเลเซีย พบว่า พืชสกุลปุดในแถบนี้สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม เมื่อดูจากลักษณะของช่อดอก คือ กลุ่มที่มีก้านช่อดอกสั้น ช่อดอกอยู่ติดกับพื้นดิน เรียกว่า “*Achasmas* group” และกลุ่มที่มีก้านดอกยาว ช่อดอกโผล่พ้นเหนือพื้นดิน เรียกว่า “*Phaeomeria* group” **(Figure 1 and** Table 1) ทั้งได้มีการเก็บรวบรวมอนุรักษ์พืชสกุลปุดจากพื้นที่ต่าง

ๆ ไว้ที่ธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตร จำนวน 8 ชนิด 15 ตัวอย่าง โดยเลือกเก็บรวบรวมอนุรักษ์เฉพาะชนิดที่สามารถหาต้นพันธุ์ได้ และเป็นชนิดที่ยังมีการศึกษาวิจัยน้อย รวมทั้งไม่เก็บชนิดที่อยู่ในพื้นที่ห้ามเก็บ เช่น เขตอุทยานแห่งชาติ

สรุป

จากการศึกษาความหลากหลายของพืชสกุลปุดในประเทศไทย สามารถจัดจำแนกชนิดของพืชสกุลปุดได้ทั้งหมด 11 ชนิด แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ช่อดอกอยู่ติดพื้นดิน (*Achasmas* group) จำนวน 7 ชนิด และกลุ่มช่อดอกโผล่พ้นเหนือดิน (*Phaeomeria* group) จำนวน 4 ชนิด และเก็บอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ไว้ที่ธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตร จำนวน 8 ชนิด 15 ตัวอย่าง เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคใต้ (PEN) พบความหลากชนิดของพืชสกุลปุดสูงที่สุด ส่วนชนิดของพืชสกุลปุดที่มีการแพร่กระจายพันธุ์ได้กว้างหรือพบได้มากที่สุดของประเทศไทย คือ ปุดช้าง (***E. littoralis***)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่สนับสนุนจัดสรรทุนวิจัยให้สำหรับการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ เจ้าหน้าที่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร และเจ้าหน้าที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันทน์ (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544). บริษัท ประชาชน จำกัด, กรุงเทพฯ. 810 หน้า.

Khaw, S.H. 2001. The Genus *Etlingera* (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia a New Species. Gard. Bull. Sing. 53: 191–239.

Lamb, A., J. Gobilik, M. Ardiyani and A.D. Poulsen. 2013. A Guide to Gingers of Borneo. Natural History Publications (Borneo) Sdn. Bhd. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.

Lim, T.K. 2014. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants Vol. 7, Flowers. Springer, The Netherlands.

Poulsen, A.D. 2012. *Etlingera* of Sulawesi. Natural History Publications (Borneo) Sdn. Bhd., Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.

Yeats, H. 2013. The history and cultivation of *Etlingera* –The torch gingers– at the Royal Botanic Garden Edinburgh. Sibbaldia J. Bot. Gard. Hort. 2: 71–86.

Figure 1 Inflorescence of Genus *Etlingera*: *Achasmas* group (A–J); A) *Etlingera araneosa*, B) *E. coccinea*, C) *E. linguiformis*, D) *E. panciflora*, E) *E. pavieana*, F) *E. yunnanensis*, G–J) *E. littoralis*. *Phaeomeria* group (K–N); K) *E. corneri*, L) *E. elatior*, M) *E. fulgens* and N) *E. maingayi*.

Table 1 Species of *Etlingera* samples collected from Thailand

Species name	Vernacular name	Sample code	Location (District, Province)	Distribution *
***Achasmas* group**				
E. araneosa	Put Doi	ETL37	Mae Taeng, Chiang Mai	N, NE
		ETL38	Fang, Chiang Mai	
		ETL32	Khao Kho, Phetchabun	
E. coccinea	Put Yai	ETL79	Betong, Yala	PEN
E. linguiformis	Put Lin	ETL95	Mueang Mae Hong Son, Mae Hong Son	N
E. littoralis	Put Chang	ETL19, 21	Soi Dao, Chantaburi	N, NE, SW, SE, PEN
		ETL3	TaKua Pa, Phangnga	
		ETL42	Hat Yai, Songkhla	
		ETL48	Yan Ta Khao, Trang	
E. panciflora	Put Chon Thong	ETL45	Khuan Don, Satun	PEN
E. pavieana	Reo Hom	–	Chanthaburi and Rayong	SE
E. yunnanensis	Put Yunnan	–	Nam Nao, Phetchabun	NE
***Phaeomeria* group**				
E. corneri	Dala Kulab	ETL58	Srinagarindra, Phatthalung	PEN
E. elatior	Dala	–	General in Thailand	Commonly to found
E. fulgens	Dala Fai	ETL57	Srinagarindra, Phatthalung	PEN
E. maingayi	Dala Ta Yon	ETL4	Srinagarindra, Phatthalung	PEN

หมายเหตุ * Thailand Floristic Regions; N = Northern, NE = North Eastern, E = Eastern, SW = South Western, C = Central,
SE = South Eastern, PEN = Peninsular

การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์มะเขือพวงในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

Seed Conservation of Turkey berry in DOA Genebank

นิภาพร บัวอิ่น กัญญาภรณ์ พิพิธแสงจันทร์ อัสนี ส่งเสริม และ พัลลภ สังวรศิลป์

Nipaporn Boain, Kunyaporn Pipithsangchan, Assanee Songserm and Phanlop Sangworasil

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี 12110

Biotechnology Research and Development Office, Pathumthani Province, 12110

* Corresponding author: Ni.ku@hotmail.com

บทคัดย่อ

การอนุรักษ์เมล็ดเชื้อพันธุ์มะเขือพวงให้มีอายุการเก็บรักษาได้ยาวนานในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ทำการศึกษาเมล็ดมะเขือพวงพันธุ์มีหนามและพันธุ์ไร้หนาม โดยบรรจุเมล็ดในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์และปิดผนึกให้อยู่ในสภาพสุญญากาศ ทำการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในห้องอนุรักษ์ระยะปานกลาง (5 องศาเซลเซียส) ระยะยาว (-10 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้องทั่วไป (25 องศาเซลเซียส) แล้วนำออกมาทดสอบความมีชีวิตและความแข็งแรงในทุก 3 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน และการศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์มะเขือพวงในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation, -196 องศาเซลเซียส) โดยนำออกมาทดสอบความมีชีวิตและความแข็งแรง ที่ระยะการเก็บรักษา 0, 1, 7 วัน 1 เดือน และ 1 ปี พบว่า การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์มะเขือพวงในห้องอนุรักษ์ระยะปานกลาง ห้องอนุรักษ์ระยะยาว และอุณหภูมิห้องทั่วไป เป็นระยะเวลา 15 เดือน ยังคงความมีชีวิตและความแข็งแรงสูง ส่วนการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในสภาพเยือกแข็งความมีชีวิตและความแข็งแรงสูงที่ระยะการเก็บรักษา 1 เดือน และลดลงอย่างแตกต่างกันทางสถิติกับระยะการเก็บรักษา 1 ปี แสดงว่า เมล็ดมะเขือพวงเมื่อทำการเก็บรักษาไว้ในสภาพเยือกแข็งนาน 1 ปี มีความมีชีวิตและความแข็งแรงต่ำ

คำสำคัญ: มะเขือพวง เมล็ด การอนุรักษ์ สภาพเยือกแข็ง ความงอก ความแข็งแรงเมล็ด

ABSTRACT

Seed conservation of Turkey berry for long shelf life in DOA genebank at the Biotechnology Research and Development Office, Pathumthani Province. The seeds were packed in aluminum foil bags and vacuum-sealed. The experiments according to storage condition; room temperature in a medium-term (5 °C) and long-term (-10 °C), and control room (25 °C). The seeds were tested for viability and vigor every 3 months for 15 months. And storage condition cryopreservation (-196 °C) tested for viability and vigor at storage times of 0, 1, 7 days, 1 month and 1 year. The result showed that the storage of Turkey berry seeds in the medium-term storage room, the long-term storage room, and general room temperature for 15 months maintained high viability and vigor. As for the

storage of seeds in frozen condition, the viability and vigor were high at the storage period of 1 month and decreased statistically differently with the storage period of 1 year. This indicates that Turkey berry seeds when stored in cryopreservation storage for 1 year had low viability and vigor.

Keywords: Turkey berry, seed, conservation, cryopreservation, viability, seed vigor

บทนำ

มะเขือพวง (*Solanum torvum* Swartz; Turkey berry) จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae เป็นไม้พุ่ม ขนาดเล็ก สูงประมาณ 1-3 เมตร ลำต้นมีหนามอ้วนสั้นสีแดงอมเหลือง โคนต้นมีขนแข็งคล้ายหนาม กิ่งมีหนามสลับขนสั้น หนานุ่ม ใบเป็นรูปไข่เว้าเล็กน้อย ปลายมน ด้านบนมีขน ออกดอกตามซอกกิ่ง ดอกเดี่ยวแยกเพศในต้นเดียวกัน ลักษณะช่อสั้นเป็นกระจุก กลีบดอกสีขาว มีกลีบเลี้ยงติดอยู่ที่ผล พบได้ตั้งแต่เขตร้อนและกึ่งเขตร้อนของอเมริกากลางและอเมริกาใต้ แถบประเทศในเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย มีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นพืชผักและสมุนไพร (ปิยานี, 2562) โดยใช้ผลอ่อนได้ทั้งสดและปรุงเป็นอาหาร เช่น ผลสดโขลกรวมกับน้ำพริก นำมาลวกหรือต้มจิ้มกับน้ำพริก ใส่ในแกงเขียวหวาน และแกงเผ็ด เป็นต้น

การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช สามารถเก็บได้ 3 ระยะ คือระยะสั้น ความชื้นเมล็ด 11-12 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ เก็บได้นาน 3-5 ปี ระยะปานกลาง ความชื้นเมล็ด 8 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ เก็บได้นาน 20 ปี ระยะยาว ความชื้นเมล็ด 8% อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้นาน 50 ปี หรือในสภาพเยือกแข็ง (-196 องศาเซลเซียส) (Hong and Ellis., 1996) ในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์พืชนั้น ความชื้นของเมล็ด ภาชนะบรรจุ และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา จะมีผลต่อความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ในระหว่างการเก็บรักษา เมล็ดพันธุ์ที่มีความชื้นสูงมักทำให้เมล็ดมีอัตราการหายใจสูง ส่งผลทำให้เมล็ดเสื่อมสภาพเร็วขึ้น ภาชนะที่ใช้บรรจุเมล็ดจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแลกเปลี่ยนอากาศและความชื้นของบรรยากาศภายในและภายนอกภาชนะขณะที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษามีผลต่อกระบวนการชีวเคมีภายในเมล็ด การเก็บเมล็ดในสภาพอุณหภูมิต่ำช่วยลดกิจกรรมทางชีวเคมีต่างๆ ภายในเมล็ดทำให้เมล็ดเสื่อมสภาพช้าลงได้ (Harrington and Douglas., 1970) เมล็ดมะเขือพวงเป็นเมล็ดกลุ่มออร์โธดอกซ์ (Orthodox seed) ซึ่งสามารถลดความชื้นในเมล็ดให้อยู่ในระดับต่ำได้ สามารถลดความชื้นได้ต่ำกว่า 10 % โดย Baskin and Baskin, 2004; Kaewsorn *et al*. (2018) รายงานว่าเมล็ดมะเขือพวงมีการพักตัวเนื่องจากมีสารยับยั้งการงอกที่เปลือกเมล็ดรวมถึงการพักตัวจากเอ็มบริโอแต่ไม่ซับซ้อน Copeland and McDonald (1995) ได้ทำการศึกษา seed priming โดยนำเมล็ดแช่ในน้ำทำให้เมล็ดแห้งลงเพื่อหยุดการงอกนั้น เมื่อเมล็ดที่ผ่านการเตรียมพร้อมเมล็ดพันธุ์แล้วได้รับปัจจัยที่เหมาะสมต่อการงอก เมล็ดสามารถงอกได้อย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเมล็ดพันธุ์และการเก็บรักษาเมล็ดพันธ์

นำเมล็ดพันธุ์มะเขือพวง 2 พันธุ์คือ พันธุ์มีหนามและพันธุ์ไร้หนามที่ผ่านการลดระดับความชื้นอยู่ที่ 4 เปอร์เซ็นต์ บรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์และปิดผนึกให้อยู่ในสภาพสุญญากาศ และนำไปเก็บรักษาในห้องอนุรักษ์

ระยะปานกลาง (5 องศาเซลเซียส) ห้องอนุรักษ์ระยะยาว (-10 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้องทั่วไป (25 องศาเซลเซียส) และในสภาพเยือกแข็ง (-196 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 15 เดือน แล้วนำออกมาทดสอบความมีชีวิตและความแข็งแรง ในทุก 3 เดือน ในห้อง 5 องศาเซลเซียส ห้อง -10 องศาเซลเซียส และห้อง 25 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งนำออกมาทดสอบความมีชีวิตในในระยะเก็บรักษาที่ 0, 1, 7 วัน 1 เดือน และ 1 ปี

การทดสอบความมีชีวิตและความแข็งแรง

การทดสอบความมีชีวิตโดยวิธีเพาะทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความงอก (germination test) ตามวิธีการของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (ISTA, 2014) และการตรวจสอบความแข็งแรงโดยเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ (accelerated aging test) จัดให้เมล็ดได้รับสภาพความเครียด (stress condition) หรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมช่วงสั้น จากนั้นนำไปเพาะทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความงอก ทดสอบการงอกของเมล็ดโดยวิธีเพาะบนกระดาษเพาะ (Top of paper) ตามวิธีการของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ และประเมินผลโดยตรวจสอบความงอกครั้งแรก (first count) เมื่อต้นกล้าอายุ 14 วัน และตรวจสอบครั้งสุดท้าย (final count) เมื่อต้นอ่อนอายุ 28 วัน การประเมินผลจะเริ่มทำในการนับครั้งแรก บันทึกและนับออกของต้นอ่อนปกติ และเมล็ดที่ตาย ส่วนที่เหลือจะนับไม่เกินวันนับครั้งสุดท้าย หลังจากนั้นนำข้อมูลมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความงอกจากสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความงอก (\%)} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอกปกติ} \times 100}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะ}}$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในห้องอนุรักษ์ระยะปานกลาง ห้องอนุรักษ์ระยะยาว และห้องอุณภูมิทั่วไป

พบว่า เมล็ดมะเขือพวงพันธ์มีหนามมีความมีชีวิตและความแข็งแรงที่อายุการเก็บรักษา 15 เดือน สูงที่สุดเมื่อเก็บในห้องอนุรักษ์ระยะยาวเท่ากับ 76 เปอร์เซ็นต์ ห้องอนุรักษ์ระยะปานกลาง มีความมีชีวิตเท่ากับ 68 เปอร์เซ็นต์ มีความแข็งแรงเท่ากับ 71 เปอร์เซ็นต์ และในห้องอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีความมีชีวิตเท่ากับ 67 เปอร์เซ็นต์ มีความแข็งแรง เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าความมีชีวิตและความแข็งแรงไม่แตกต่างกันแสดงว่าเมล็ดมีความแข็งแรงสูง เมล็ดมะเขือพวงพันธุ์ไร้หนามที่ระยะการเก็บรักษา 12 เดือน มีความมีชีวิตและความแข็งแรงสูงที่สุดเมื่อเก็บในห้องอนุรักษ์ระยะยาวเท่ากับ 74 เปอร์เซ็นต์ และที่ระยะการเก็บรักษา 15 เดือน ความมีชีวิตและความแข็งแรงเท่ากับ 71 เปอร์เซ็นต์ และห้องอนุรักษ์ระยะปานกลาง มีความมีชีวิตเท่ากับ 68 เปอร์เซ็นต์ มีความแข็งแรง เท่ากับ 71 เปอร์เซ็นต์ การเก็บในสภาพห้องอุณหภูมิมีความมีชีวิตเท่ากับ 66 เปอร์เซ็นต์ มีความแข็งแรง เท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าพันธุ์มีหนามและไร้หนามยังมีความมีชีวิตและความแข็งแรงไม่แตกต่างกันแสดงว่าเมล็ดมีความแข็งแรงสูง และมีแนวโน้มลดลงในระการเก็บรักษาที่ 15 เดือน (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ที่พัฒนาโดย Delouche and Baskin (1971) การนำเมล็ดพันธุ์ไปผ่านความเครียด คือ ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 40 - 50 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานานแตกต่างกันไปตามชนิดพืชส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 3 – 5 วัน หลังจากนั้นนำมาเล็ดมาทดสอบความงอก หากเมล็ดยังมีความงอกสูง แสดงว่าเมล็ดมีความแข็งแรงสูง สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน

การเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง กับการเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องทั่วไป

พบว่า เมล็ดมะเขือพวงพันธุ์มีหนามเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (-196 °C) ระยะเก็บรักษา 1 เดือน มีความมีชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ และมีความแข็งแรงเท่ากับ 76 เปอร์เซ็นต์ ระยะเก็บรักษา 1 ปี มีความมีชีวิต

เท่ากับ 63 เปอร์เซ็นต์ และมีความแข็งแรงเท่ากับ 46 เปอร์เซ็นต์ และการเก็บรักษาในห้องอุณหภูมิห้องทั่วไป ที่ระยะเก็บรักษา 1 ปี มีความมีชีวิตเท่ากับ 59 เปอร์เซ็นต์ มีความแข็งแรงเท่ากับ 57 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่า ความมีชีวิตและความแข็งแร็งสูงขึ้นจากระยะการเก็บรักษา 1 เดือน แสดงว่า เมล็ดมีความแข็งแรง ส่วนเมล็ดมะเขือพวงพันธุ์ไร้หนามเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง ที่ระยะ 1 เดือน ความมีชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์ มีความแข็งแรงเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และลดลงที่ระยะเก็บรักษา 1 ปี ความมีชีวิตเท่ากับ 52 เปอร์เซ็นต์ และมีความแข็งแรงเท่ากับ 42 เปอร์เซ็นต์ การเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องทั่วไป ความมีชีวิตเท่ากับ 69 เปอร์เซ็นต์ มีความแข็งแรง เท่ากับ 59 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2) ผลการทดลองบ่งบอกว่าเมล็ดมะเขือพวง เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ในสภาพเยือกแข็งนาน 1 ปี มีความมีชีวิตและความแข็งแรงลดลง โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงแตกต่างกันทางสถิติกับการเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องทั่วไป และเมื่อนำเมล็ดมะเขือพวงที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง อายุการเก็บรักษา 1 ปี ไปเร่งอายุพบความแข็งแรงลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ Delouche and Baskin (1973) เมล็ดที่สามารถงอกได้ดีหลังผ่านการเร่งอายุแสดงว่าเป็นเมล็ดพันธุ์ที่แข็งแรงดี สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน ส่วนเมล็ดที่ผ่านการเร่งอายุแล้วมีความงอกต่ำแสดงว่าเมล็ดพันธุ์นั้นมีความแข็งแรงต่ำไม่สามารถเก็บรักษาได้นาน

สรุป

การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์มะเขือพวงพันธุ์มีหนามและพันธุ์ไร้หนาม ในห้องอนุรักษ์ระยะปานกลาง ห้องอนุรักษ์ระยะยาว และห้องอุณภูมิทั่วไป ระยะการเก็บรักษา 15 เดือน ความมีชีวิตและความแข็งแรงลงลงจากระยะการเก็บรักษา 12 เดือน แสดงว่าการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์มะเขือพวงในห้องอนุรักษ์ระยะปานกลาง ห้องอนุรักษ์ระยะยาว และห้องอุณภูมิทั่วไป ยังคงความมีชีวิตและความแข็งแรงสูง ที่ระยะการเก็บรักษา 15 เดือน ส่วนการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งความมีชีวิตและความแข็งแรงลดลงอย่างเห็นได้ชัด ที่ระยะการเก็บรักษา 1 ปี สรุปได้ว่า เมล็ดมะเขือพวงที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง ที่ระยะการเก็บรักษา 1 ปี มีความมีชีวิตและความแข็งแรงต่ำ

กิตติกรรมประกาศ

การทดลองการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์มะเขือพวงในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ขอขอบพระคุณแหล่งทุน สกสว. และผู้ร่วมวิจัย คณะทำงาน และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของกลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และท่านรักษาการผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษ์พันธุกรรม นางกัญญาภรณ์ พิพิธแสงจันทร์ ที่มีส่วนสนับสนุนงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

ปิยานี รัตนชำนอง. 2562. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของมะเขือพวง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 21(2): หน้า 124-27.

Baskin, J.M. and Baskin, C.C., 2004. A classification system for seed dormancy, Seed Science Research, 14: 1-16.

Copeland, L.O. and McDonald, M.B. 1995. Principles of seed science and technology, Chapman & Hill, New York, 409 p.

Delouche, J.C. and Baskin, C.C. 1971. Effect of mechanical shelling on storability of peanut (Arachis hypogaea L.) Seed. *Proc. Assoc.* off Seed Anal. 61: 70-84.

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

Harrington J.F. and J.E. Douglas. 1970. Seed Storage and packing, 221 p.

Hong, T.D. and R.H. Ellis. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Technical Bulletin No. 1. (J.M.M. Engels and J. Toll, vol. eds.) International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 62 p.

ISTA. 2014. International Rules for Seed Testing. The International Seed Testing Association, Bassersdolf. Switzerland. 260 p.

Kaewsorn, P, Kerdkla, C.and Chulaka, P. 2018. Effect of Hydropriming on Quality of Pea Eggplant (Solanum torvum Sw.) Seed. *Agricultural Sci.* J. 49(2): 329-332.

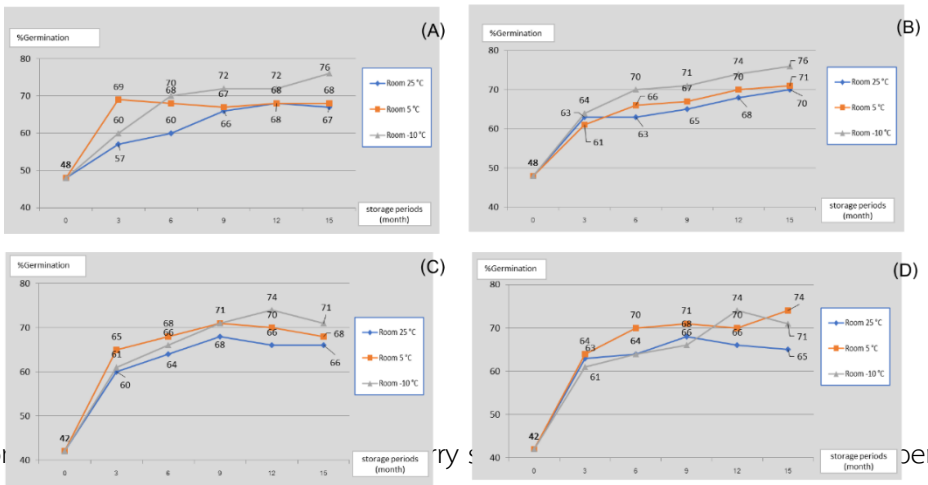


Figure 1 Co ry s peratures and storage periods.

(A) Germination of Turkey berry seeds (prickles) after storage at different temperatures (25°C, 5°C, -10°C) and storage periods at 0, 3, 6, 9, 12 and 15 months.

(B) Germination after AA Test of Turkey berry seeds (prickles) after storage at different temperatures (25°C, 5°C, -10°C) and storage periods at 0, 3, 6, 9, 12 and 15 months.

(C) Germination of Turkey berry seeds (no prickles) after storage at different temperatures (25°C, 5°C, -10°C) and storage periods at 0, 3, 6, 9, 12 and 15 months.

(D) Gemination after AA Test of Turkey berry seeds (no prickles) after storage at different temperatures (25°C, 5°C, -10°C) and storage periods at 0, 3, 6, 9, 12 and 15 months.

การพัฒนามะละกอต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอด้วยเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม

Development of papaya ring spot virus resistance papaya using genome editing technology

ปิยนุช ศรชัย, พิชชาพร วรรณนิธิกุล, พิมพ์ประไพ บุษยวรพัฒน์, ดวงรัตน์ จริยาจิรวัฒนา,
วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร, สุกัลยา ศิริฟองนุกูล, อรุโณทัย ซาววา และ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์

Piyanuch Sornchai, Pitchaporn Wannitikul, Pimprapai Butsayawarapat, Duangrath Jariyajirawattana, Weerasak Pitaksaringkarn, Sukunlaya Sirifongnukul, Aroonothai Sawwa and Piyarat Thammakijjawat

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

[1] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture

*Corresponding author: butakurogo@hotmail.com, piyanuchsorn@hotmail.com

บทคัดย่อ

จากปัญหาโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอที่แพร่ระบาดอย่างรุนแรงในประเทศไทย ทำให้นักวิจัยได้พัฒนาพันธุ์มะละกอให้มีความต้านทานต่อโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวน โดยปัจจุบันเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิค CRISPR-Cas9 ถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชมากที่สุด เนื่องจากมีความแม่นยำ ปลอดภัย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สำหรับการดำเนินงานการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยเทคโนโลยีปรับแต่งจีโนมประกอบด้วย กระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเพาะเลี้ยงเมล็ดมะละกอพันธุ์แขกดำศรีสะเกษงอกได้ดีที่สุดด้วยการแช่น้ำอุ่นและเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมจิบเบอเรลลิน ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแผ่นใบมะละกอโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA และ BA เพียงอย่างเดียว ช่วยให้เกิดการขยายเซลล์ของแผ่นใบมะละกอ นอกจากนี้ยังพบว่า ผลของแสงแอลอีดีสีแดงร่วมกับสีน้ำเงินรวมกันช่วยให้การพัฒนายอดมะละกอแขกดำศรีสะเกษเจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งสามารถนำไปกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นยอดได้ หลังจากรับการคัดเลือกในขั้นตอนการถ่ายยีน และสำหรับขั้นตอนการถ่ายยีน พบว่า สามารถสร้าง sgRNA ที่จำเพาะต่อยีน *eIF4E* ได้ 10 ตัว ทำการถ่ายโอนเข้าเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 แล้วถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อมะละกอ ใช้เนื้อเยื่อส่วนตาข้าง ทั้งนี้มีเพียง sgRNA 4 ที่มีเนื้อเยื่อรอดชีวิตและสามารถนำไปเลี้ยงต่อได้

คำสำคัญ: พืชปรับแต่งจีโนม, เทคนิค CRISPR-Cas9, มะละกอ, โรคไวรัสจุดวงแหวน

ABSTRACT

Due to a severe outbreak of papaya ringspot virus in Thailand, researchers have developed papaya varieties resistant to the virus. Currently, genome editing technology using the CRISPR-Cas9 technique is considered one of the most widely used alternatives for plant breeding because it is precise, safe, and environmentally friendly. The process of plant breeding through genome editing involves tissue culture, where optimal germination of seeds from the Kakdum Srisaket variety was achieved by soaking them in warm water and cultivating them on solid MS medium supplemented

with 0.5 milligrams per liter of gibberellin. It was found that culturing papaya leaf tissues on a medium supplemented with only NAA and BA promoted cell expansion. Additionally, the combined effects of red and blue LED lighting enhanced papaya development, promoting tissue growth into shoots after the gene transfer step. In the gene transfer step, 10 sgRNAs specific to the *eIF4E* gene were successfully created and transferred into the germ using *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105 on lateral bud tissue. Among these, only sgRNA 4 survived and could be further cultured.

Keywords: Genome Editing Plant, CRISPR-Cas9 technique, Papaya, Papaya ring spot virus disease

บทนำ

สำหรับมะละกอพบว่าปัญหาที่สำคัญของการปลูกมะละกอคือ โรคไวรัสจุดวงแหวนของมะละกอที่มีการแพร่ระบาดไปทั่วโลก มีสาเหตุเกิดจากเชื้อ Papaya Ringspot Virus (PRSV) (Gonsalves et al., 2010) PRSV สามารถเข้าทำลายมะละกอได้ทุกระยะของการของเจริญเติบโต ความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับสภาพและอายุของพืช ถ้าเชื้อเข้าทำลายในระยะต้นกล้าจะเกิดอาการรุนแรงที่สุด (วิไล, 2552; สิริกุล, 2557) จากการระบาดของไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ ทำให้พื้นที่การปลูกมะละกอลดลงและมีการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ปลูกอยู่ตลอดเวลา จากข้อมูลขององค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) พบว่าแนวโน้มพื้นที่การปลูกมะละกอลดลงซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการผลิตในประเทศ จากปัญหาโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอที่แพร่ระบาดอย่างรุนแรงในประเทศไทย ทำให้นักวิจัยจากหลายหน่วยงานได้พัฒนาพันธุ์มะละกอให้มีความต้านทานต่อโรคไวรัสจุดวงแหวน โดยหนึ่งในวิธีการที่สามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้คือ การพัฒนาพันธุ์มะละกอต้านทานต่อโรคโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนโดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม (ชาลินี, 2553) อาทิเช่น ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (นุชนาถ และคณะ, 2546) สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา (Ruanjan et al., 2007) และกรมวิชาการเกษตร (นงลักษณ์ และคณะ, 2540) แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การดัดแปลงพันธุกรรมพืชด้วยเทคนิคดั้งเดิมส่งผลให้ผู้บริโภคมีความกังวลในหลายๆ ด้าน เช่น การดัดแปลงพันธุกรรมดังกล่าวมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะอยู่ เช่น ยีน *hpt*II (*hygromycin phosphotranferase* resistance gene) *npt*II (*neomycin phosphotranferase* resistance gene)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม (genome editing technology) การปรับเปลี่ยนแก้ไขรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่มีความจำเพาะและแม่นยำ เช่น การใช้เทคนิค Clustered Regularly Interspaced Shot Palindromic Repeats (CRISPR) สำหรับเทคนิค CRISPR-Cas9 ที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย ได้แก่ Site Direct Nucleases: SDN1 (deletion) เป็นการตัดสายดีเอ็นคู่ให้ขาดไปในตำแหน่งที่ต้องการโดยไม่มีการใส่นิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าไป เมื่อดีเอ็นเอสายคู่ทำการซ่อมแซมตัวเองจะได้ลักษณะการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นๆ ซึ่งการกลายพันธุ์ด้วยรูปแบบนี้สามารถระบุให้กลายพันธุ์ได้เฉพาะตรงตำแหน่งที่ต้องการ ไม่มีความเสี่ยงในการกลายพันธุ์ของพืชในจุดที่ไม่ต้องการ เหมือนการกระตุ้นให้กลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยวิธีการทางเคมีหรือรังสี สำหรับการใช้เทคนิค CRISPR-Cas9 เพื่อสร้างความต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ ได้มีการศึกษาในยีนกลุ่มปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรม (translation initiation factors) คือยีน *eIF4E* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิสัมพันธ์โปรตีน (protein interaction) กับโปรตีนของไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ ทำให้มะละกอเกิดโรค เมื่อมีการกลายของยีน *eIF4E* มะละกอจะ

สามารถต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอได้ จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ที่ได้นำเทคนิค CRISPR-Cas9 มาใช้ในการพัฒนามะละกอให้มีความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวน ร่วมกับการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์มะละกอให้มีความสามารถในการต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนคงที่ และขยายพันธุ์ได้จำนวนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าการพัฒนามะละกอต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนด้วยเทคนิค CRISPR-Cas9 ที่เป็นการกลายพันธุ์แบบแม่นยำมีความเสี่ยงน้อยกว่าการกลายพันธุ์แบบดั้งเดิม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **ศึกษาปัจจัยด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับเมล็ดมะละกอแขกดำศรีสะเกษในสภาพปลอดเชื้อ**

นำเมล็ดมะละกอแขกดำศรีสะเกษมาศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะละกอในสภาพปลอดเชื้อ โดยวัตถุประสงค์ของกระบวนการนี้ให้สามารถขยายพันธุ์เมล็ดมะละกอแขกดำศรีสะเกษในสภาพปลอดเชื้อสำหรับการถ่ายยีนและการขยายพันธุ์มะละกอให้ได้จำนวนมาก ทำการดำเนินการศึกษาดังต่อไปนี้ 1) ศึกษาผลของระยะเวลาในการแช่เมล็ดกับสูตรอาหารเพาะเลี้ยง 2) ศึกษาผลของการสูตรอาหารต่อการงอกของเมล็ดมะละกอในสภาพปลอดเชื้อ 3) ศึกษาผลของคลื่นแสงแอลอีดีที่ต่างกันและสูตรอาหารต่อการงอกของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ 4) ศึกษาผลของ NAA และ BA ต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อแผ่นใบมะละกอแขกดำศรีสะเกษในสภาพปลอดเชื้อ และ 5) ศึกษาผลของแสงแอลอีดีต่อการพัฒนายอดมะละกอแขกดำศรีสะเกษ

2. ศึกษาปัจจัยด้านการถ่าย sgRNA เข้าสู่เนื้อเยื่อมะละกอแขกดำศรีสะเกษเพื่อให้มะละกอต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนด้วยเทคนิค CRISPR-Cas9

2.1 การสร้าง sgRNA

ดำเนินการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่าย sgRNA เข้าสู่เนื้อเยื่อมะละกอแขกดำศรีสะเกษเพื่อให้มะละกอต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนด้วยเทคนิค CRISPR-Cas9 โดยมีรายละเอียดดังนี้ 1) การเตรียม competent cell ของเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α 2) การเตรียม competent cell ของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 3) การสร้าง vector library สำหรับการกลายแบบสุ่มด้วยระบบคริสเปอร์แคสใน *E. coli* ด้วยวิธี Gateway cloning โดยใช้เวกเตอร์ pDE-ttLbCas12a และ pDE-SaCas9 ที่ตำแหน่งแลกเปลี่ยนของฟาจ (attL และ attR) ด้วยเอนไซม์ LR clonase จากนั้นนำปฏิกิริยาไปถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ด้วยวิธี heat shock หรือ electroporation

การสร้าง vector library สำหรับแก้ไขยีน *eIF4E* ด้วยระบบคริสเปอร์แคสใน *E. coli* ด้วยวิธี Gateway cloning โดยการออกแบบ sgRNA ที่จำเพาะต่อการแก้ไขยีน *eIF4E* โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล ซึ่งในการออกแบบ sgRNA ดำเนินการด้วยโปรแกรม ApE เพื่อหาลำดับ sgRNA ซึ่งเลือกจาก sgRNA ที่ขึ้นต้นด้วยเบส A (ตารางที่ 1) ซึ่งมีตำแหน่ง PAM คือ 5’-NGG-3’จากนั้นนำ Forward primer และ Reverse primer ที่สังเคราะห์จากบริษัทมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pRGEB32 (ภาพที่ 1) โดยขั้นแรกนำไพรเมอร์ทั้งสองเส้นมาผสมกันในอัตราที่เท่ากันแล้วผสมให้เข้ากันเพื่อให้ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นจับกัน จากนั้นนำมาเจือจาง 200 เท่า เพื่อใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อระหว่าง sgRNA และเวคเตอร์ ซึ่งประกอบด้วยดังตารางที่ 2 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ด้วยวิธี heat shock ตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค PCR

2.2 การฝากถ่ายเวคเตอร์เข้าสู่เนื้อเยื่อมะละกอ

ดำเนินการการฝากถ่ายเวคเตอร์เข้า *Agrobacterium tumefaciens* โดยเตรียม electrocompetent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ดัดแปลงตามวิธีของ Abdallah และคณะ (2004) แล้วนำเวคเตอร์ CRISPR-Cas9 ที่ออกแบบไว้ถ่ายยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมด้วยวิธีอิเลคโตรโพเรชั่น (electroporation) หลังจากนั้นฝากถ่ายเวคเตอร์เข้าสู่เนื้อเยื่อมะละกอดัดแปลงตามวิธีของ Chandrasekaran และคณะ (2016) โดยนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมะละกอในส่วนของ cotyledon มาทำให้เกิดบาดแผล

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาปัจจัยด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับเมล็ดมะละกอแขกดำศรีสะเกษในสภาพปลอดเชื้อ

จากการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะละกอในสภาพปลอดเชื้อ โดยวัตถุประสงค์ของกระบวนการนี้ให้สามารถขยายพันธุ์เมล็ดมะละกอแขกดำศรีสะเกษในสภาพปลอดเชื้อสำหรับการถ่ายยีนและการขยายพันธุ์มะละกอให้ได้จำนวนมาก ผลการศึกษาปัจจัยต่างๆ พบว่า การแช่เมล็ดด้วยน้ำอุ่นประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส สามารถกระตุ้นการงอกได้ดีกว่าการไม่แช่เมล็ด ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร ½ MS มีการงอกที่สูงกว่าอาหารแข็งสูตร MS โดยวางเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS และ MS ภายใต้สภาพที่มืดและแสงแอลอีดีสีขาว ที่ความเข้มข้นแสง 50 ไมโคลโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน อาหารแข็งสูตร MS ที่เติมจิบเบอเรลลิน ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการงอกมากที่สุด

ผลการศึกษาผลของ NAA และ BA ต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อแผ่นใบมะละกอแขกดำศรีสะเกษในสภาพปลอดเชื้อเนื้อเยื่อแผ่นใบมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA และ BA เพียงอย่างเดียว มีลักษณะแผ่นใบโค้งงอขึ้นเข้าหากัน แต่ในทางตรงกันข้ามแผ่นใบมะละกอที่วางเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติม NAA และ BA ร่วมกันในความเข้มข้นต่างกัน มีลักษณะบวมงอ และเกิดการขยายเซลล์ของแผ่นใบมะละกอ และผลศึกษาผลของแสงแอลอีดีต่อการพัฒนายอดมะละกอแขกดำศรีสะเกษ พบว่า แสงแอลอีดีไม่ส่งผลต่อจำนวนยอด และจำนวนใบ แต่ส่งต่อความยาวยอด โดยภาพรวมแสงสีแดงร่วมกับน้ำเงินมีลักษณะการเจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งสามารถนำไปกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นยอดได้หลักจากรับการคัดเลือกในขั้นตอนการถ่ายยีน

2. ผลการศึกษาปัจจัยด้านการถ่าย sgRNA เข้าสู่เนื้อเยื่อมะละกอแขกดำศรีสะเกษเพื่อให้มะละกอต้านทานโรคไวรัส จุดวงแหวนด้วยเทคนิค CRISPR Cas9

การสร้างไบนารีเวคเตอร์ที่มี sgRNA ที่จำเพาะต่อยีน *eIF4E* โดยมีการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่แก้ไข แล้วถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* ด้วยวิธีการ heat shock พบโคโลนีขึ้นทุก sgRNA ที่ถ่ายโอนเข้าไป และตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค PCR พบว่าแถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่ขนาด 200 bp (ภาพที่ 1)

จากนั้นสกัดพลาสมิดแล้วถ่ายโอนเข้าเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 แล้วถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อมะละกอ โดยเริ่มแรกใช้เนื้อเยื่อส่วนตาข้างและยอดมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS นาน 7 วัน แล้วนำเนื้อเยื่อทั้งสองส่วนไปสร้างบาดแผลและนำไปเลี้ยงร่วมกับเชื้อแขวนลอยในที่มืด นาน 30 นาที แล้วนำเนื้อเยื่อมาวางเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 100 μM acetosyringone บ่มในที่มืด นาน 2 วัน จากนั้นนำมาวางเลี้ยงบนอาหารที่เติม cefotaxime นาน 7 วัน และย้ายมาวางบนอาหารคัดเลือก นาน 6 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่า หลังจากคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์พบว่า มีเนื้อเยื่อที่ได้รับ sgRNA 4 รอดชีวิตและสามารถนำไปเลี้ยงต่อได้ (ภาพที่ 2)

สรุป

สำหรับการดำเนินงานการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยเทคโนโลยีปรับแต่งจีโนมประกอบด้วย กระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเพาะเลี้ยงเมล็ดมะละกอพันธุ์แขกดำศรีสะเกษงอกได้ดีที่สุดด้วยการแช่น้ำอุ่นและเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมจิบเบอเรลลิน ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแผ่นใบมะละกอโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA และ BA เพียงอย่างเดียว ช่วยให้เกิดการขยายเซลล์ของแผ่นใบมะละกอ นอกจากนี้ยังพบว่า ผลของแสงแอลอีดีสีแดงร่วมกับน้ำเงินรวมกันช่วยให้การพัฒนายอดมะละกอแขกดำศรีสะเกษเจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งสามารถนำไปกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นยอดได้หลักจากรับการคัดเลือกในขั้นตอนการถ่ายยีน และสำหรับขั้นตอนการถ่ายยีน พบว่า สามารถสร้าง sgRNA ที่จำเพาะต่อยีน *eIF4E* ได้ 10 ตัว ทำการถ่ายโอนเข้าเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 แล้วถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อมะละกอ ใช้เนื้อเยื่อส่วนตาข้าง ทั้งนี้มีเพียง sgRNA 4 ที่มีเนื้อเยื่อรอดชีวิตและสามารถนำไปเลี้ยงต่อได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณแหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม สำหรับงบประมาณศึกษาวิจัย และขอบพระคุณผู้ร่วมงานทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

ชาลินี คงสวัสดิ์. (2553). การศึกษาโปรตีนใหม่และโปรติโอมิกส์ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน [วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร]. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงลักษณ์ ศรินทุ, วิไล ปราสาทศรี, ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, Tennant P., Gonsalves D. (2540). การสร้างมะละกอต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนโดยวิธีพันธุวิศวกรรม. การประชุมสัมนาวิชาการเรื่องมะละกอ. 2-4 กรกฎาคม 2540; โรงแรมเจริญธานีปริ๊นเซส จ.ขอนแก่น. ขอนแก่น; 2540. หน้า 5.

นุชนาถ วารินทร์, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, อัญจนา บุญชด, กนกวรรณ รมยานนท์, ราตรี รอดอารีย์, วิชัย โฆษิตรัตน, สุพัฒน์ อรรถธรรม. (2546). *มะละกอพันธุ์ใหม่ต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนมะละกอ*. รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 14. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2546. หน้า 539-546.

วิไล ปราสาทศรี. (2552). *โรคจุดวงแหวนมะละกอ และการป้องกันกำจัด.* ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ: หจก.ขอนแก่นการพิมพ์.

Gonsalves D. Tripathi S. Carr JB, Suzuki JY. Papaya Ringspot virus. The Plant Health Instructor. 2010. DOI: 10.1094/PHI-I-2010-1004-01

Ruanjan P., Kertbundit S., Juricek M. Post-transcriptional gene silencing is involved in resistance of transgenic papayas to papaya ringspot virus. Biologia Plantarum 2007; 51: 517-520.

(A)

(B)

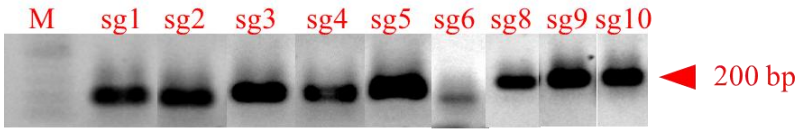


Figure 1 (A) CRISPR-Cas9 construct containing the sgRNA and (B) the sgRNA existence investigation using colony PCR technique with specific sgRNA forward primers and rgeb32-R 5'-GCCTTGACCCGAATTTGTGG-3

(A) (B)

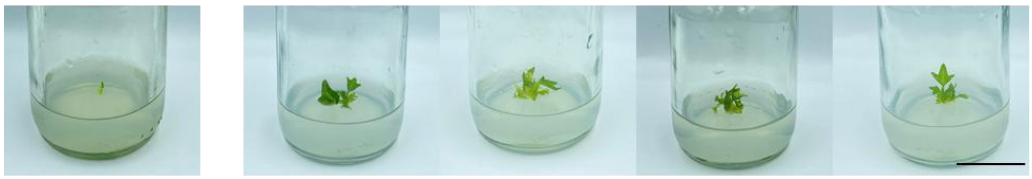


Figure 2 (A) Lateral meristem and (B) apical tissue have been sgRNA gene transformed using *Agrobacterium tumefaciens*

การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดในส้มโอ

DNA Barcoding in *Citrus maxima*

อรุโณทัย ซาววา[1,*] วรารัตน์ ศรีประพัฒน์[1] และ อุทัยวรรณ ทรัพย์แก้ว[2]
Aroonothai Sawwa[1] Wararat Sriprapat[1] and Uthaiwan Sapkaew[2]

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ตำบลรังสิต อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110
[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุโขทัย อำเภอศรีสำโรง จังหวัดสุโขทัย 64120
[1] Biotechnology Research and Development Office, Rangsit, Thanyaburi, Pathumthani 12110.
[2] Sukhothai Agricultural Research and Development Center, Srisumrong District, Sukhothai 64120.
* Corresponding author: aroonothais@yahoo.com

บทคัดย่อ

ส้มโอ (*Citrus maxima* (Burm.f.) Merr.) อยู่ในวงศ์ Rutaceae เป็นผลไม้ที่มีศักยภาพในการส่งออกสูง กรมวิชาการเกษตรได้รวบรวมพันธุ์ส้มโอแต่ยังขาดข้อมูลทางพันธุกรรม การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและทดสอบไพรเมอร์มาตรฐานที่เหมาะสมในการจำแนกส้มโอและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด ผลการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐาน จำนวน 3 ยีน ได้แก่ *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS), ribulose 1,5-biphosphate carboxylase (rbcL)* และ *RNA polymerase C1 (rpoC1)* พบ ยีน *ITS* ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างส้มโอมากที่สุด รองลงมาคือ *rpoC1* และ *rbcL* ตามลำดับ เมื่อนำมาจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของส้มโอที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS* ให้ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ของส้มโอมากที่สุดคือ ส้มโอพันธุ์ขาวพวง รองลงมา คือ หอมใบเตยแพร่ หอมหาดใหญ่ และปูโก ที่ค่าดัชนี 0.013 0.008 0.004 และ 0.003 ตามลำดับ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกพันธุ์ส้มโอได้ต่อไป

คำสำคัญ: ส้มโอ, ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Abstract

The pomelo (*Citrus maxima* (Burm.f.) Merr.), a member of the Rutaceae family, is a fruit with high potential to export. While the Department of Agriculture has collected a range of pomelo cultivars, comprehensive genetic data remains limited. This study aims to study and testing standard primers for the identification of pomelo cultivars and the development of DNA barcodes. Three genes were analyzed for this purpose: *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer* (*ITS*), *ribulose 1,5-biphosphate carboxylase* (*rbcL*), and *RNA polymerase C1* (*rpoC1*). Results, the *ITS* gene exhibited the greatest genetic variation across the pomelo samples, followed by *rpoC1* and *rbcL*. When generating DNA barcodes for the pomelo cultivars collected by the Department of Agriculture, the nucleotide sequence of the ITS gene showed the highest genetic distance index between cultivars. The cultivar 'Khao Puang' had the greatest genetic distance, followed by 'Hom Bai Toey Phrae,' 'Hom Hat Yai,' and 'Puko,' with respective index values of 0.013, 0.008, 0.004, and 0.003. These findings provide a valuable foundation for further studies on genetic diversity and the classification of pomelo cultivars.

Key words: Pomelo, DNA barcoding, Genetic diversity

คำนำ

ส้มโอเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพและมีโอกาสในการส่งออกสูง เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่เอื้ออำนวย ต้นทุนด้านการผลิตต่ำ เกษตรกรและผู้ปลูกเลี้ยงมีความมุ่งมั่นในการพัฒนาสายพันธุ์อยู่ตลอดเวลา กรม

วิชาการเกษตรเป็นแหล่งรวบรวมพันธุ์ส้มโอของประเทศไทย แต่ยังขาดข้อมูลทางพันธุกรรม การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) เป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิต ซึ่งเดิมใช้การจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการจำแนกด้วยลักษณะรูปร่างมีข้อจำกัดในเรื่องของรูปร่างที่ใกล้เคียงกันมากแต่เป็นคนละชนิด ทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจึงเริ่มพัฒนาขึ้นจากการจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นบริเวณที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดสูงกว่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดเดียวกัน สามารถนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่ายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ในพืชนิยมใช้ยีนบนคลอโรพลาสจีโนม ได้แก่ *maturase K* (*matK*), *RNA polymerase C1* (*rpoC1*) และ *rubisco L* (*rbcL*) เป็นต้น ดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้รับความสนใจมาก เพราะมีประสิทธิภาพ และความแม่นยำ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ในระยะเวลาอันสั้น ช่วยยืนยันการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาให้เป็นไปอย่างถูกต้อง รวดเร็ว รวมทั้งเป็นประโยชน์สำหรับการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการความหลากหลายทางชีวภาพ รวมถึงการอนุรักษ์พันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอีกด้วย ดังนั้น การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและทดสอบไพรเมอร์มาตรฐานที่เหมาะสมในการจำแนกส้มโอและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับส้มโอในแหล่งรวมรวมพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืชและไพรเมอร์ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐาน โดยเก็บตัวอย่างใบส้มโอเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ จำนวน 18 ตัวอย่าง ดังนี้ พันธุ์ขาวแตงกวา (CmWKT) พันธุ์ขาวใหญ่ (CmWKY) และพันธุ์แดงนครชัยศรี (CmRNS) และเตรียมไพรเมอร์มาตรฐาน จำนวน 3 ยีน ได้แก่ *ITS, rbcL* และ *rpoC1* ดังตารางที่ 1 จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมนำมาจัดทำดีเอ็นบาร์โค้ดของส้มจากแหล่งรวบรวมพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตรจำนวน 22 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2) โดยมีส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata*) ตัวเปรียบเทียบเป็นกลุ่มนอก (out group)
2. การสกัดดีเอ็นเอ โดยนำใบส้มโอมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุโณทัยและคณะ (2552)
3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้น้ำยา Green Gotaq® Flexi (Promega, USA)
4. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส (gel electropholesis)
5. การทำชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ (PCR purification) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® PCR Purification Kit ยี่ห้อ Invitrogen
6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5’ และ 3’ ทำการตรวจสอบและคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีภาพโครมาโตแกรมที่สมบูรณ์มาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) เพื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เหมาะสม และได้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความยาวเท่ากัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA11 ตามรายงานของ Tamura *et.al*., 2021 โดยสร้างแผนผังพันธุกรรมด้วยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

การทดสอบดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานที่เหมาะสมกับส้มโอ จำนวน 3 ยีน ได้แก่ *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS), ribulose 1,5-biphosphate carboxylase (rbcL)* และ *RNA polymerase C1 (rpoC1)* กับตัวอย่างส้มโอ จำนวน 18 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ 1 แถบ เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ไปทำบริสุทธิ์แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการวิเคราะห์ได้ภาพ Chromatogram ที่มีความสมบูรณ์ (ภาพที่ 1) เมื่อนำไปจัดทำแผนผังพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม MEGA11 ด้วยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ พบ ยีน *ITS* ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของมากที่สุด รองลงมาคือ *rpoC1* และ *rbcL* ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ดังนั้น ชิ้นส่วนยีน *ITS* จึงถูกนำไปใช้ในการศึกษาและจัดทำดี

เอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ของส้มโอที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นการสร้างรหัสประจำตัวของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (species) โดยอาศัยหลักการจัดเรียงตัวของเบส 4 ตัว คือ A (Adenine) T (Thymine) C (Cytosine) และ G (Guanine) โดยต้องทำการศึกษาดีเอ็นเอมาตรฐาน (standardized DNA) ที่ได้รับการคัดเลือกและผ่านประเมินแล้วว่าเหมาะสมที่จะนำมาจัดทำเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด มีคุณสมบัติ คือ 1) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนปลายมีลักษณะอนุรักษ์สูง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ครอบคลุมทุกพืช (Frezal and Leblois, 2008) 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในมีการแปรผันที่ให้ความแตกต่างระหว่างชนิด (species) 3) มาจากส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่สามารถแปลรหัส (coding region) หรือ ไม่สามารถแปลรหัส (non-coding region) ก็ได้ 4) มีจำนวนซ้ำในจีโนม 1 ซ้ำ 5) เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้าน (5’ และ 3’) ผลที่ได้จะต้องเหมือนกัน และ 6) ง่ายต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง (direct sequencing) ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการโคลน (clone) เข้าสู่เวคเตอร์ก่อน (Valentini *et al*., 2009) ซึ่งการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของส้มโอที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS* ให้ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ของส้มโอมากที่สุดคือ ส้มโอพันธุ์ขาวพวง รองลงมา คือ หอมใบเตยแพร่ หอมหาดใหญ่ และปูโก ที่ค่าดัชนี 0.013 0.008 0.004 และ 0.003 ตามลำดับ (ภาพที่ 3)

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐาน จำนวน 3 ยีน ได้แก่ *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS), ribulose 1,5-biphosphate carboxylase (rbcL)* และ *RNA polymerase C1 (rpoC1)* กับตัวอย่างส้มโอ จำนวน 18 ตัวอย่าง พบ ยีน ITS ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างส้มโอมากที่สุด รองลงมาคือ *rpoC1* และ *rbcL* ตามลำดับ เมื่อนำมาจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของส้มโอที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS* ให้ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ของส้มโอมากที่สุดคือ ส้มโอพันธุ์ขาวพวง รองลงมา คือ หอมใบเตยแพร่ หอมหาดใหญ่ และปูโก ที่ค่าดัชนี 0.013 0.008 0.004 และ 0.003 ตามลำดับ สามารถนำไปปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ลักษณะใหม่ๆ ได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของการทดลองนี้ ขอบคุณคุณฉลาด ไหวติง และคุณศุภรัสมิ์ พูลพัฒนสุวรรณ ที่ทำให้การปฏิบัติงานวิจัยในห้องปฏิบัติการสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

อรุโณทัย ซาววา, สุภาวดี ง้อเหรียญ, อัญชลี ศรีสุวรรณ, ประพิศ วองเทียม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-118.

Tamura K, G. Stecher, and S. Kumar. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. Molecular Biology and Evolution 38:3022-3027

Frézal, L. and Leblois, R. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. Infection, Genetics and Evolution, 8 (5), 727–736.

Valentini, A., F. Pompanon and P. Taberlet. 2009. DNA Barcoding for Ecologists. Trends in Ecology & Evolution. 24(2): 110-117.

Table 1. The standard DNA barcode primers used in the experiment.

Gene	Primer Name	Nucleotide Sequence (5'-3')	Reference
Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS)	ITSu1	GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG	Cheng *et al.*, 2016
	ITSu4	RGTTTCTTTTCCTCCGCTTA	Cheng *et al.*, 2016
ribulose 1,5-biphosphate carboxylase (rbcL)	rbcL_F	ATGTCACCACAAACAGAAACTAAAGC	Paween *et al.*, 2011
	rbcL_R	CTTCGGCACAAAATAAGAAACGATCTC	Paween *et al.*, 2011
RNA polymerase C1 (rpoC1)	rpoC1F	GGCAAAGAAGGAAGATTTCG	Paween *et al.*, 2011
	rpoC1R	TGAGAAAACATAAGTAAACGAGC	Paween *et al.*, 2011

Table 2. List of pomelo varieties from germplasm of the Department of Agriculture.

No.	Sample name	Name of variety	No.	Sample name	Name of variety
1	CmDOA01	Khawyai	12	CmDOA12	Ploy Chompu
2	CmDOA02	Khawtangkoa	13	CmDOA13	Hom Baitaoy Phrae
3	CmDOA03	Pattalung	14	CmDOA14	Tabtim Siam
4	CmDOA04	Tafaj	15	CmDOA15	Whaingkan
5	CmDOA05	Hom Hadyai	16	CmDOA16	Thachai 23
6	CmDOA06	Khaw Namphaung	17	CmDOA17	Manee Isan
7	CmDOA07	Puko	18	CmDOA18	Khawpoung
8	CmDOA08	Chompu Nongkhai	19	CmDOA19	Hom Baitaoy Phangnga
9	CmDOA09	Pattawia	20	CmDOA20	Deng Thachai
10	CmDOA10	Thongdee	21	CmDOA21	Deng Vietnam
11	CmDOA11	Chompu Sriracha	22	CmDOA22	Hom Nakhornchaisri

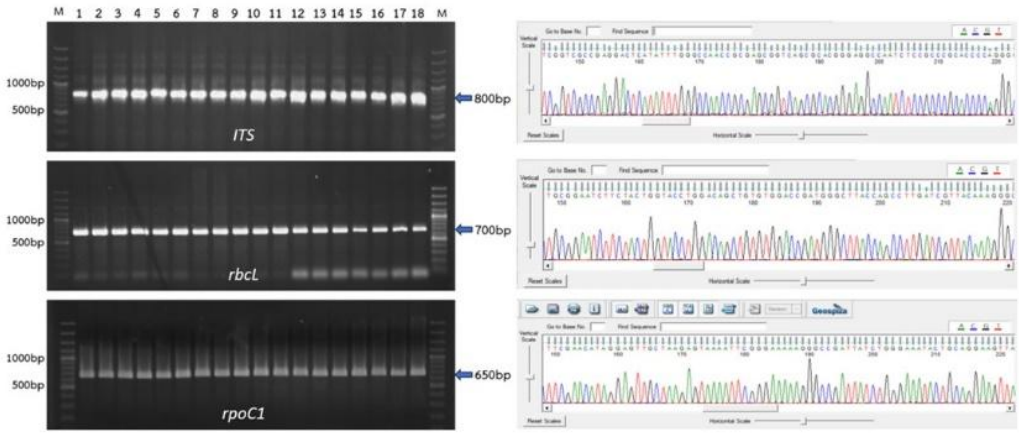
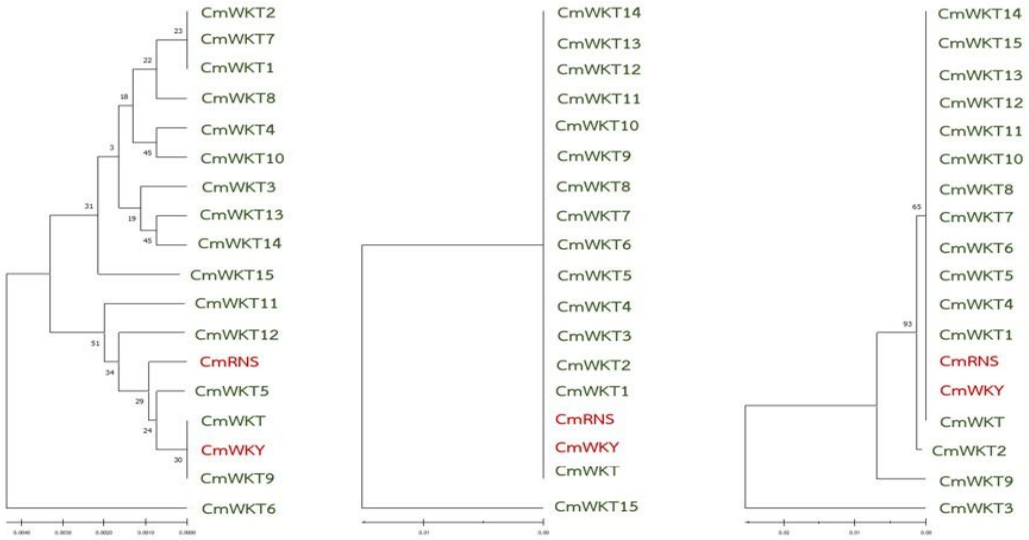
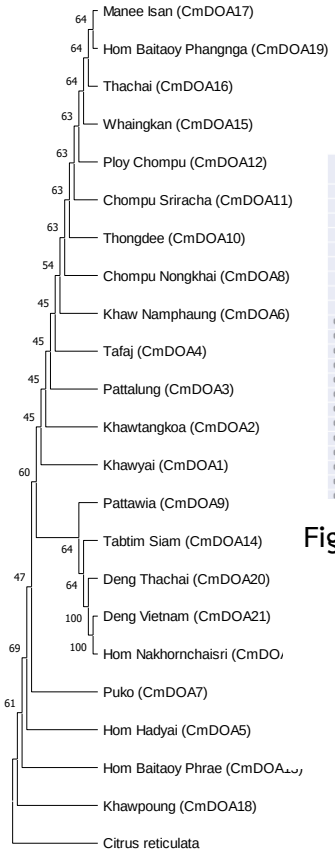


Figure 1. PCR products and chromatogram analysis of nucleotide sequences from *ITS*, *rbcL* and *rpoC1* genes in 18 samples of pomelo.



A. *ITS* B. *rbcL* C. *rpoC1*

Figure 2. Dendrogram of 18 samples of pomelo from 3 genes: A.) *ITS* B.) *rbcL* and C.) *rpoC1* analyzed by MEGA11 using the Maximum Likelihood method with a boot strap value of 1,000 replicates.



	CmDOA1	CmDOA2	CmDOA3	CmDOA4	CmDOA5	CmDOA6	CmDOA7	CmDOA8	CmDOA9	CmDOA10	CmDOA11	CmDOA12	CmDOA13	CmDOA14	CmDOA15	CmDOA16	CmDOA17	CmDOA18	CmDOA19	CmDOA20	CmDOA21	CmDOA22	Citrus reticulata
CmDOA1	0.000																						
CmDOA2	0.002	0.000																					
CmDOA3	0.000	0.002	0.000																				
CmDOA4	0.000	0.002	0.000	0.000																			
CmDOA5	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000																		
CmDOA6	0.000	0.002	0.000	0.000	0.004	0.000																	
CmDOA7	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.000																
CmDOA8	0.000	0.002	0.000	0.000	0.004	0.000	0.003	0.000															
CmDOA9	0.001	0.002	0.001	0.001	0.004	0.001	0.003	0.001	0.000														
CmDOA10	0.000	0.002	0.000	0.000	0.004	0.000	0.003	0.000	0.001	0.000													
CmDOA11	0.000	0.002	0.000	0.000	0.004	0.000	0.003	0.000	0.001	0.000	0.000												
CmDOA12	0.000	0.002	0.000	0.000	0.004	0.000	0.003	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000											
CmDOA13	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.000										
CmDOA14	0.001	0.002	0.001	0.001	0.004	0.001	0.003	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.008	0.000									
CmDOA15	0.000	0.002	0.000	0.000	0.004	0.000	0.003	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.008	0.001	0.000								
CmDOA16	0.000	0.002	0.000	0.000	0.004	0.000	0.003	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.008	0.001	0.000	0.000							
CmDOA17	0.000	0.002	0.000	0.000	0.004	0.000	0.003	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.008	0.001	0.000	0.000	0.000						
CmDOA18	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.000					
CmDOA19	0.000	0.002	0.000	0.000	0.004	0.000	0.003	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.008	0.001	0.000	0.000	0.000	0.013	0.000				
CmDOA20	0.001	0.002	0.001	0.001	0.004	0.001	0.003	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.008	0.000	0.001	0.001	0.001	0.013	0.001	0.000			
CmDOA21	0.001	0.002	0.001	0.001	0.004	0.001	0.003	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.008	0.000	0.001	0.001	0.001	0.013	0.001	0.000	0.000		
CmDOA22	0.001	0.002	0.001	0.001	0.004	0.001	0.003	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.008	0.000	0.001	0.001	0.001	0.013	0.001	0.000	0.000	0.000	

Figure 3. Dendrogram and genetic distance index of pomelo, 22 samples collected by the Department of Agriculture from the ITS gene, analyzed by the MEGA11 program using the Maximum Likelihood method with a boot strap value of 1,000 replicates.

การพัฒนาต้นแบบชุดตรวจสอบการกลายของยีนโดยเทคนิค SHERLOCK
The Prototype Development of Detection Kit for Gene Mutations using SHERLOCK Technique

พงศกร สรรค์วิทยากุล[1,*] พิชชาพร วรรณนิธิกุล[1] ปิยนุช ศรชัย[1] วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร[1]
ศุภรัตน์ ศรีทะวงษ์[1] ศุภชัย วุฒิพงศ์ชัยกิจ[2] และ อรุโณทัย ซาววา[1]
Pongsakorn Sunvittayakul[1], Pitchaporn Wannitikul[1], Piyanuch Sornchai[1], Weerasak Pitaksaringkarn[1], Suparat Srithawong[1], Supachai Vuttipongchaikij[2], and Aroonothai Sawwa[1]

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ตำบลรังสิต อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110
[2] ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900
[1] Biotechnology Research and Development Office, Rangsit, Thanyaburi, Pathumthani 12110.
[2] Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900.
* Corresponding author: kirogost@hotmail.com, pongsakorn.s@doa.in.th

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมและการดัดแปรพันธุกรรมพืช มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยมีวิธีการใหม่ๆ ที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีดั้งเดิม งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาต้นแบบชุดตรวจวิเคราะห์ DNA ที่มีความจำเพาะเจาะจงโดยปรับจากเทคนิค SHERLOCK และใช้เอนไซม์ Cas12a (CPF1) ซึ่งสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์หรือสายรหัสพันธุกรรมแปลกปลอมได้หลายรูปแบบ ใช้เวลา 15 – 60 นาทีในระดับ In vitro โดยใช้เอนไซม์ Cas12a ความเข้มข้น 3 µM crRNA 300 nM และ Reporter ความเข้มข้น 1-2 µM ชุดตรวจต้นแบบนี้มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ตรวจโรคพืช พันธุ์พืช และสายรหัส DNA ที่ต้องการความจำเพาะเจาะจงทุกชนิด โดยสามารถพัฒนาให้รวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้นได้อีกในอนาคต

คำสำคัญ: ชุดตรวจวิเคราะห์ DNA แบบจำเพาะเจาะจง, เอนไซม์แคส 12 เอ, เทคนิคเชอรล็อค

Abstract

Genome editing and plant genetic modification technologies are continuously evolving, with new methods that cannot be detected by traditional means. This research has developed a highly specific DNA detection prototype kit by adapting the SHERLOCK technique and using the Cas12a (CPF1) enzyme. This prototype can detect various forms of mutations or foreign genetic codes, taking 15-60 minutes at the in vitro level. It uses Cas12a enzyme at a concentration of 3 µM, crRNA at 300 nM, and reporter at 1-2 µM concentration. This prototype detection kit has high potential for diagnosing plant diseases, identifying plant varieties, and detecting any specific DNA sequences. It can be further developed to increase speed and accuracy in the future.

Keywords: Specific DNA test kit, Cas12a (CPF1), SHERLOCK

บทนำ

เทคโนโลยีการดัดแปรพันธุกรรมพืชยังคงมีการพัฒนาและมีการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมอยู่อย่างเสมอ และการปรับแต่งจีโนมได้เข้ามามีบทบาทในการพัฒนาสายพันธุ์พืชอย่างแพร่หลาย (Chen *et al.*, 2019; ISAAA, 2022) ซึ่ง ปัจจุบัน สหรัฐอเมริกา อุรุกวัย ยูเครน อังกฤษ รัสเซีย ปารากวัย นิวซีแลนด์ เม็กซิโก ญี่ปุ่น อิสราเอล อินเดีย สหภาพยุโรป จีน ชิลี อเมริกากลาง (ฮอนดูรัส กัวเตมาลา และเอลซัลวาดอร์) แคนาดา บราซิล ออสเตรเลีย และอาร์เจนตินา และไทย (ISAAA, 2022) ปัจจุบันมีพืชที่วิจัยพัฒนาใช้เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม อาทิ ข้าว ข้าวโพด ถั่วเหลือง ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง มันฝรั่ง เห็ด พริกหยวก แตงกวา คาโนล่า คามีไลน่า อัลฟาฟ่า มะเขือเทศ องุ่น แอปเปิ้ล กล้วย บีทรูท พิทูเนีย ป๊อปลาร์ และไม้ดอกที่ต้องการสีสัน เห็ดชอมพินจยอง (Agaricus bisporus) เป็นต้น (FAO, 2024; Zsögön *et al.*, 2018) โดยมีลักษณะการปรับแต่งจีโนม อาทิเช่น ลักษณะความต้านทานและทนทาน ทนแล้ง ทนเค็ม ต้านทานฝน ต้านทานสารกำจัดวัชพืช และต้านทานเชื้อสาเหตุโรคพืช (แบคทีเรีย รา ไวรัส) เป็นต้น (Zaidi *et al.*, 2019) ลักษณะเพิ่มคุณค่าทาง โภชนาการ ได้แก่ กรดโอลิอิกสูง ใยอาหารสูง ปราศจากกลูเตน ลดไขมันอิ่มตัว ต้านสารอนุมูลอิสระ และเพิ่มโอเมก้า3 เป็นต้น Calyxt, Inc. (2023) ลักษณะทางกายFigureต้องการ เช่น ลดการเกิดสีน้ำตาล แป้งเหนียว เปลือกผลสีขาว และสีสันแปลกตาของไม้ดอก เป็นต้น (Zhang *et al.*, 2018; Zsögön *et al.*, 2018)

กรมวิชาการเกษตรเป็นหน่วยงานหลักทางด้านพืช มีภารกิจด้านการกำกับดูแลการนำเข้า/ส่งออกพืชปกติ และพืชที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมหรือพืชที่ได้รับการปรับแต่งจีโนม ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม รวมถึงพืชที่ผ่านการปรับแต่งจีโนม กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จึงมีหน้าที่ศึกษา ค้นคว้า วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจสอบจำแนกและพิสูจน์พืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม รวมถึง Insert DNA และรูปแบบการถ่ายยีนแบบชุดยีน ซึ่งไม่อยู่ในฐานข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ระดับนานาชาติ และพืชปรับแต่งจีโนมซึ่งมีลักษณะของการกลายพันธ์ที่จำเพาะเจาะจงไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธีการดั้งเดิมได้ (Chen *et al.*, 2019; Mao *et al.*, 2019) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์พืชปรับแต่งจีโนมรูปแบบและรหัสพันธุกรรมที่มีรูปแบบจำเพาะเจาะจง รวมถึงการตรวจพืชวิเคราะห์ดัดแปลงพันธุกรรมจากระดับ DNA แบบรวดเร็วที่สามารถดำเนินการได้จากแปลง เพื่อการควบคุมกำกับดูแลพืชปรับแต่งจีโนมตามภาระกิจของกรมวิชาการเกษตรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การออกแบบ Primer สำหรับ เพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย, Reporter และ crRNA การเพิ่มปริมาณ DNA ออกแบบไพรเมอร์ (Forward และ Reverse) สำหรับเพิ่มปริมาณ Promoter 35S และ NOS และยีน Papain ความยาวของไพรเมอร์ที่ดีที่สุดควรอยู่ที่ 25–35 nt และขนาดของ Amplicon ควรเป็น 80–140 bp ไพรเมอร์ควรมี Tm ระหว่าง 54 และ 67°C ออกแบบ reporter ดังนี้ FQ-reporter (5’-6-FitC -ttatt-Quencher-3’) ซึ่งเป็น ssDNA reporter สำหรับ fluorescence detection และ FB-reporter (5’-6-FitC -ttattttattttatt-Biotin-3’) เป็น ssDNA reporter สำหรับ lateral flow assay

2. ออกแบบและสังเคราะห์ crRNA สำหรับการตรวจจับโดย Cas12a ลำดับ crRNA เป็นสายรหัสแบบย้อนกลับของชิ้นยีนเป้าหมายใน RNA ที่ถอดแบบ ลำดับ spacer แล้ว (20-24 nt ในกรณีของ Cas12a) ทั้งนี้สามารถระบุตำแหน่งตามที่ต้องการใน DNA เป้าหมาย สามารถสร้าง crRNA จาก DNA เทมเพลต โดยใช้ PAM TTTV

3. ตรวจวิเคราะห์ยีนเป้าหมาย ด้วยการทดสอบ Nuclease activity, Fluorescence detection และ Lateral flow assay ปรับใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ SHERLOCK (Gootenberg *et al.*, 2018; Kellner *et al.*, 2019) สามารถออกแบบการทดลองเพื่อการตรวจวิเคราะห์ได้ทั้ง Fluorescence detection และ Lateral flow assay detection โดยใช้ Enzyme Cas12a ใน 2 กระบวนการ (Zhang *et al.*, 2020)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การออกแบบ crRNA เพื่อใช้เป็นสายรหัส RNA นำวิถีสำหรับเข้าจับและตัดตำแหน่ง DNA เป้าหมายโดย CRISPR-Cas12a (Cpf1) crRNA คือ RNA นำทางสายเดี่ยวขนาด 40-44 เบส ประกอบด้วยส่วนคงที่ขนาด 20 เบส (loop domain) และส่วนจำเพาะต่อเป้าหมายขนาด 20-24 เบส (protospacer domain) ดำเนินการออกแบบโดเมนโปรโตสเปเซอร์ ขนาด 20 – 21 bp เพื่อประสิทธิภาพสูงสุด crRNA ทั้งหมดสังเคราะห์ด้วยการดัดแปลงทางเคมีแบบเฉพาะ ซึ่งช่วยป้องกัน crRNA จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ RNase ในเซลล์ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแก้ไขเป้าหมายให้ดียิ่งขึ้น สำหรับ crRNA ที่ใช้กับ Cas12a ออกแบบโดยระบุตำแหน่งในบริเวณเป้าหมายที่มีลำดับ PAM (protospacer adjacent motif) คือ TTTV โดย V คือ A, C หรือ G (Figure 3, 4) Enzyme Cas12a และ crRNA จะจับกับสายดีเอ็นเอที่อยู่ตรงข้ามกับลำดับ PAM ทั้งนี้ต้องไม่รวมลำดับ PAM ในการออกแบบ crRNA ไว้ในสาย crRNA ด้วย (Figure 5)

การทดสอบ Nuclease activity การตัดของเอนไซม์ Cas12a ที่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นต่างๆ การทดสอบ Nuclease activity โดยการบ่มสารต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง กับ plasmid pCXSN50 150 ng ซึ่งมีตำแหน่ง Promoter 35S อยู่ พบว่า ความเข้มข้นของ Cas12a ที่แตกต่างกันทำให้เกิดผลของ Nuclease activity ที่แตกต่างกัน และ ความเข้มข้นของ เอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 3 μM ขึ้นไปจึงจะทำให้การตัดตำแหน่ง DNA เป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าเอนไซม์ Cas12a สามารถตัด ณ ตำแหน่งรหัสพันธุกรรม 35S2 บน pCXSN50 ซึ่งเป็น DNA เกลียวคู่ ขนาดประมาณ 10 kb ที่ออกแบบได้อย่างจำเพาะเจาะจงและแม่นยำ จากผล Gel electrophoresis แสดงให้เห็น Band plasmid ที่ถูกตัดออกเป็น DNA สายเดี่ยว (Figure 6 แถวที่ 7 – 10) เมื่อเทียบกับ Neg (Figure 6 แถวที่ 1 – 2) อนึ่งที่ความเข้มข้นเอนไซม์สูง (>10 μM) ปฏิกิริยา Nuclease activity อาจทำงานมากเกินไปทำให้เกิดการย่อยสลาย Plasmid ทั้งหมด (Figure 6 แถวที่ 4 – 6)

สำหรับการทดสอบ Fluorescence detection ดำเนินการโดยผสม เอนไซม์ Cas12a, crRNA 35S2 และ FQ-reporter (5’-6-FitC -ttatt-Quencher-3’) เข้าด้วยกันและบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 5 – 60 นาที จากนั้นนำไปส่องภายใต้ Black light พบว่าปฏิกิริยา Fluorescence สามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วหากมี สาย DNA เป้าหมายในตัวอย่าง ตั้งแต่ 5 นาที แรกและชัดเจนที่สุดที่ 30 นาที โดยเมื่อเพิ่มปริมาณ Reporter การเปล่งแสงก็จะยิ่งชัดเจนและมีความเข้มมากขึ้น (Figure 7)

ในการทดสอบ Lateral flow assay ดำเนินการเช่นเดียวกันกับ การทดสอบ Fluorescence โดยเติมส่วนผสมทั้งหมดร่วมกับ FB-reporter (5’-6-FitC -ttattttattttatt-Biotin-3’) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5 - 60 นาที จากผลการทดลองพบว่า ชุดตรวจ Lateral flow assay ที่ออกแบบ สำหรับการตรวจ Biotin และ FitC สามารถตรวจจับการตัดของสาย Reporter หากที่ DNA เป้าหมาย อยู่ในตัวอย่างได้อย่างแม่นยำที่สุดที่ ความเข้มข้น Reporter ที่ 1-2 μM และใช้เวลาบ่ม เพียง 15 นาที จากนั้นจุ่ม Strip ก็จะได้ผลการทดลองที่ชัดเจน (Figure 8)

สรุป

เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมและการดัดแปรพันธุกรรมพืช มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยมีวิธีการใหม่ๆ ที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีดั้งเดิม งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาต้นแบบชุดตรวจวิเคราะห์ DNA ที่มีความจำเพาะเจาะจงโดยปรับจากเทคนิค SHERLOCK และใช้เอนไซม์ Cas12a (CPF1) ซึ่งสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์หรือสายรหัสพันธุกรรมแปลกปลอมได้หลายรูปแบบ ใช้เวลา 15 – 60 นาทีในระดับ In vitro โดยใช้เอนไซม์ Cas12a ความเข้มข้น 3 μM crRNA 300 nM และ Reporter ความเข้มข้น 1-2 μM ชุดตรวจต้นแบบนี้มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ตรวจโรคพืช พันธุ์พืช และสายรหัส DNA ที่ต้องการความจำเพาะเจาะจงทุกชนิด โดยสามารถพัฒนาให้รวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้นได้อีกในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและมหาวิทยาเกษตรศาสตร์ (บางเขน) ที่สนับสนุน เครื่องมือ ห้องปฏิบัติการและสถานที่ทำการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Chen, K., Y. Wang, R. Zhang, H. Zhang and C. Gao. 2019. Crispr/cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. Annual Review of Plant Biology. 70: 667-697.

FAO. 2024. Agricultural biotechnology – meeting the challenges of climate change.

Gootenberg, J.S., O.O. Abudayyeh, M.J. Kellner, J. Joung, J.J. Collins and F. Zhang. 2018. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with cas13, cas12a, and csm6. Science. 360: 439-444.

ISAAA. 2022. Global status of commercialized biotech/gm crops in 2022.

Kellner, M.J., J.G. Koob, J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh and F. Zhang. 2019. Sherlock: Nucleic acid detection with crispr nucleases. Nature Protocols. 14: 2986-3012.

Mao, Y., J.R. Botella, Y. Liu and J.-K. Zhu. 2019. Gene editing in plants: Progress and challenges. National Science Review. 6: 421-437.

Zaidi, S.S.-e.-A., H. Vanderschuren, M. Qaim, M.M. Mahfouz, A. Kohli, S. Mansoor and M. Tester. 2019. New plant breeding technologies for food security. Science. 363: 1390-1391.

Zhang, Y.-m., Y. Zhang and K. Xie. 2020. Evaluation of crispr/cas12a-based DNA detection for fast pathogen diagnosis and gmo test in rice. Molecular Breeding. 40: 11.

Zhang, Y., K. Massel, I.D. Godwin and C. Gao. 2018. Applications and potential of genome editing in crop improvement. Genome Biology. 19: 210.

Zsögön, A., T. Čermák, E.R. Naves, M.M. Notini, K.H. Edel, S. Weinl, L. Freschi, D.F. Voytas, J. Kudla and L.E.P. Peres. 2018. De novo domestication of wild tomato using genome editing. Nature Biotechnology. 36: 1211-1216.

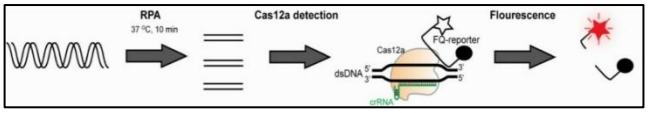


Figure 1 Fluorescence detection

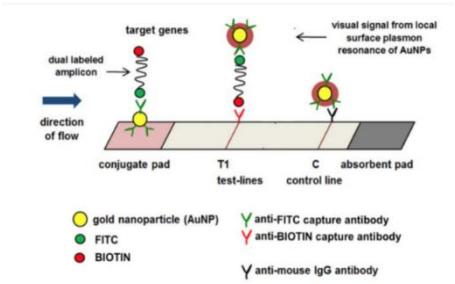


Figure 2. Lateral flow assay detection

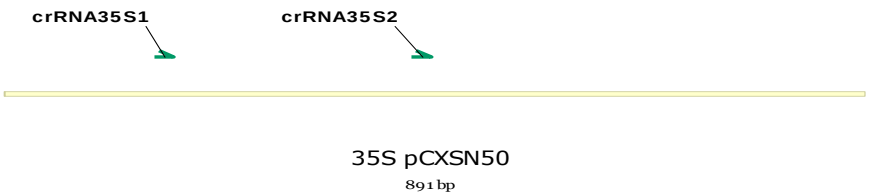


Figure 3. The crRNA position that serves as the cleavage site for the Cas12a (CPF1) enzyme

```
  1  CCTGCAGGTC AACATGGTGG AGCACGACAC ACTTGTCTAC TCCAAAAATA TCAAAGATAC AGTCTCAGAA GACCAAAGGG CAATTGAGAC TTTTCAACAA
     GGACGTCCAG TTGTACCACC TCGTGCTGTG TGAACAGATG AGGTTTTTAT AGTTTCTATG TCAGAGTCTT CTGGTTTCCC GTTAACTCTG AAAAGTTGTT
101  AGGGTAATAT CCGGAAACCT CCTCGGATTC CATTGCCCAG CTATCTGTCA CTTTATTGTG AAGATAGTGG AAAAGGAAGG TGGCTCCTAC AAATGCCATC
     TCCCATTATA GGCCTTTGGA GGAGCCTAAG GTAACGGGTC GATAGACAGT GAAATAACAC TTCTATCACC TTTTCCTTCC ACCGAGGATG TTTACGGTAG
201  ATTGCGATAA AGGAAAGGCC ATCGTTGAAG ATGCCTCTGC CGACAGTGGT CCCAAAGATG GACCCCCACC CACGAGGAGC ATCGTGGAAA AAGAAGACGT
     TAACGCTATT TCCTTTCCGG TAGCAACTTC TACGGAGACG GCTGTCACCA GGGTTTCTAC CTGGGGGTGG GTGCTCCTCG TAGCACCTTT TTCTTCTGCA
301  TCCAACCACG TCTTCAAAGC AAGTGGATTG ATGTGATAAC ATGGTGGAGC ACGACACACT TGTCTACTCC AAAAATATCA AAGATACAGT CTCAGAAGAC
     AGGTTGGTGC AGAAGTTTCG TTCACCTAAC TACACTATTG TACCACCTCG TGCTGTGTGA ACAGATGAGG TTTTTATAGT TTCTATGTCA GAGTCTTCTG
401  CAAAGGGCAA TTGAGACTTT TCAACAAAGG GTAATATCCG GAAACCTCCT CGGATTCCAT TGCCCAGCTA TCTGTCACTT TATTGTGAAG ATAGTGGAAA
     GTTTCCCGTT AACTCTGAAA AGTTGTTTCC CATTATAGGC CTTTGGAGGA GCCTAAGGTA ACGGGTCGAT AGACAGTGAA ATAACACTTC TATCACCTTT
```

Figure 4 Details of the genetic code of crRNA and the PAM position

ID	Oligo Name	Oligo Sequence (5' to 3')	Length(nt)
1	crRNA-Pap1	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUAUUUCAAAGUUGCUUUUCGU	41
2	crRNA-Pap2	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCAGCUGUUGCAACUAUAGAG	41
3	crRNA-35S1	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUUUGUGAAGAUAGUGGAAAAG	41
4	crRNA-35S2	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUAACAAAGGGUAAUAUCCGGA	41
5	crRNA-NOS1	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUUGUUGAAUUACGUUAAGCAU	41
6	crRNA-NOS2	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUAUACGCGAUAGAAAACAAAA	41

Loop Protospacer

Figure 5 Result of the designed and synthesized crRNA code sequence, where the 5' end position is the Loop domain location for the Cas12a enzyme

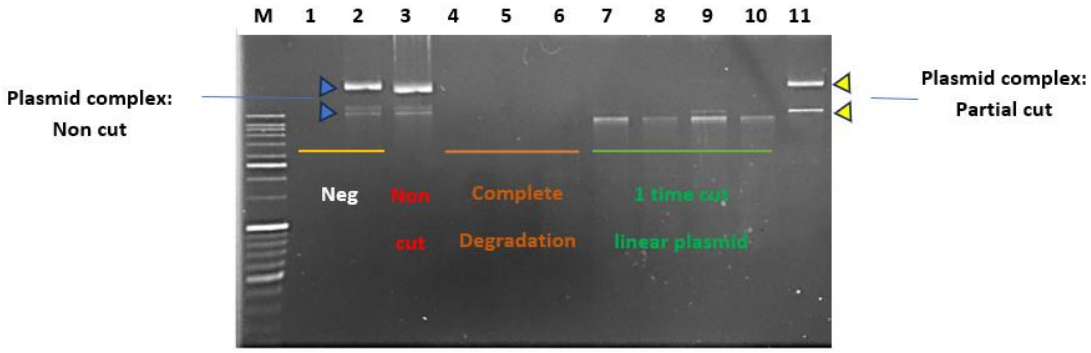


Figure 6 Results of the Nuclease activity test of Cas12a enzyme and crRNA 35S2 at various concentrations

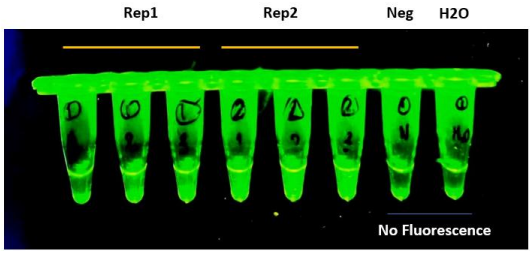


Figure 7 Results of the Fluorescence detection test of Cas12a enzyme and crRNA 35S2

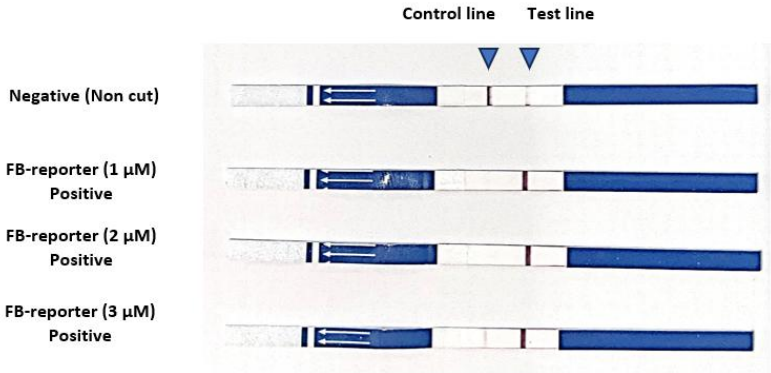


Figure 8 Results of the Lateral flow assay test at FB-reporter concentrations of 1 – 3 µM

การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อเพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์

The Selection of Abalone Mushroom Strains for Utilization in Breeding Program

รัชฎาภรณ์ ทองเหม[1] จิตรา กิตติโมรากุล[1] และ วิภาวี ชั้นโรจน์[1]

Ratchadaporn Thonghem Jittra kittimorakul and Vipavee Chanroj

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Thanyaburi, Patum Thani 12110

***Corresponding author: annethong80@gmail.com**

บทคัดย่อ

เห็ดเป๋าฮื้อเป็นเห็ดเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย แต่การผลิตเพื่อการค้ายังคงมีปัญหาเรื่องสายพันธุ์ การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์จึงจำเป็นต้องดำเนินการเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมสายพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การให้ผลผลิตและคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดที่มีศักยภาพเพื่อนำไปใช้ประโยชน์เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ ผลการรวบรวมสายพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อจากแหล่งต่างๆ จำนวน 25 สายพันธุ์เพาะทดสอบการออกดอก ณ โรงเรือนเพาะเห็ด กรมวิชาการเกษตร ในช่วงเดือนมกราคม – สิงหาคม 2565 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลผลิตของเห็ดเป๋าฮื้อทั้ง 25 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับ PC3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้บริการของกรมวิชาการเกษตร คัดเลือกเห็ดสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีโดยใช้เกณฑ์ 1) ความสามารถในการให้ผลผลิต 2) การออกดอกเร็วและออกดอกพร้อมกัน 3) ระยะเวลาการบ่มเส้นใยในถุงอาหารเพาะ และ 4) ดอกมีขนาดและสีตรงตามความต้องการของตลาด พบว่าสายพันธุ์ PC1 มีคุณลักษณะดีกว่าสายพันธุ์ PC3 ทุกเกณฑ์ ยกเว้นดอกเห็ดมีสีเทาเข้มไม่ตรงตามความต้องการของตลาด ในขณะที่สายพันธุ์เห็ดอีก 12 สายพันธุ์ มีระยะเวลาการบ่มเส้นใยในถุงอาหารเพาะ การออกดอกและให้ผลผลิตที่ไม่แตกต่างจาก PC3 แต่สายพันธุ์ PC4 PC10 PC11 ดอกเห็ดมีสีเทาเข้มถึงดำ ส่วนสายพันธุ์เห็ด PC14 PC15 PC16 PC20 PC21 PC23 PC24 PC25 และ PC26 ดอกเห็ดมีสีครีม

คำสำคัญ: เห็ดเป๋าฮื้อ การคัดเลือกพันธุ์เห็ด การปรับปรุงพันธุ์เห็ด ฐานพันธุกรรม

ABSTRACT

Abalone mushrooms are one of the economic mushrooms in Thailand, but the commercial cultivations still lack performance strains. The selection and breeding methods are necessary to solve this problem. The study focused on collecting abalone mushrooms, morphological characterization, and production and selecting high-performance strains as genetic stock for breeding. Twenty-five abalone mushroom samples were collected from various locations and cultivated under mushroom greenhouse conditions at the Department of Agriculture from January to August 2022. The morphological characteristics and production of collected abalone mushrooms were investigated and compared with strain PC3 conserved by the Department of Agriculture. The criteria for selection were 1) the performance of

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[2] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Thanyaburi, Patum Thani 12110

production 2) the period for the primordial formation and simultaneous fruiting bodies 3) the duration for mycelium colonization in the cultivation bag and 4) size and color according to market demand. The results showed that every characteristic of strain PC1 was better than PC3 except the dark gray color did not meet market demand.For 12 abalone mushrooms, the duration of mycelium colonization in the cultivation bag, the period for the primordial formation and performance of production were not different from PC3, excluding the dark gray to black color of fruiting bodies of PC4, PC10, and PC11 strain. The strain PC14, PC15, PC16, PC20, PC21, PC23, PC24, PC25, and PC26 fruiting bodies were cream in color.

Keywords: Abalone mushroom, Selection, Strain improvement, Genetic resources

บทนำ

เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) เป็นเห็ดเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีราคาแพงกว่าเห็ดสกุลนางรมอื่น ๆ ราคาขายอยู่ที่ 80-120 บาท รสชาติอร่อย มีคุณค่าทางโภชนาการและสรรพคุณทางยาสูง เช่น สารโพลีแซคคาไรด์ (Beta-glucan) ที่ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้ร่างกาย และโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาในการยับยั้ง Angiotensin I-converting enzyme (ACE) ในระดับสูงช่วยลดความดันโลหิตสูง ดอกเห็ดสดเก็บในตู้เย็นได้นานกว่าเห็ดหลายชนิด สามารถแปรรูปผลิตภัณฑ์เป็นเห็ดกระป๋องได้ (ดำเกิง, 2547) ประเทศไทยมีการเพาะเห็ดเป๋าฮื้อทั่วทุกภาคของประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2563-2566 ศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตรให้บริการเชื้อพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อรวมทั้งสิ้น จำนวน 537 ขวด ในระยะแรกสายพันธุ์เห็ดชนิดนี้ที่เกษตรกรเพาะเป็นการนำเข้าเชื้อพันธุ์จากต่างประเทศ ผ่านการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ปรับตัวและเพาะได้ดีในประเทศไทย แต่สภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงไปและเห็ดมีอัตราการเจริญ การกลายพันธุ์และผันแปรทางพันธุกรรมได้ง่ายเมื่อเพาะขยายเชื้อเป็นเวลานานส่งผลให้การเจริญของเส้นใยช้าลง ผลผลิตเห็ดลดลง ลักษณะดอกไม่ตรงตามความต้องการของตลาด เช่น ดอกเป๋าฮื้อที่มีดอกสีครีมปนดำหรือขอบดอกม้วนงอ ลักษณะดังกล่าวส่งผลให้เกษตรกรได้รับผลตอบแทนน้อย เกษตรกรจึงต้องการเห็ดสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูง เพาะเลี้ยงง่ายในสภาพอากาศปัจจุบันและมีลักษณะดอกหลากหลายเพื่อเพิ่มช่องทางในการตลาด

จากปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นต้องมีการคัดเลือก ปรับปรุงพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อให้ได้สายพันธุ์ที่ดี มีผลผลิตสูงเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศ เพื่อเป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรเพาะสร้างรายได้ แต่การปรับปรุงพันธุ์ให้ประสบผลสำเร็จนั้นต้องมีการรวบรวม คัดเลือกสายพันธุ์เห็ด และมีฐานพันธุกรรมที่กว้างเพื่อที่จะได้มีลักษณะให้เลือกได้มากพอสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมสายพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การให้ผลผลิตและคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อที่มีศักยภาพเพื่อนำไปใช้ประโยชน์เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. รวบรวมสายพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อ ทั้งในรูปแบบของเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยบนวัสดุเพาะ และดอกเห็ด จากแหล่งต่างๆ เช่น แหล่งจำหน่ายเชื้อเห็ด ฟาร์มเกษตรกรผู้เพาะเห็ด และศูนย์รวบรวมพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย เป็นต้น บันทึกสถานที่เก็บ แหล่งที่มาของเชื้อ

2. ศึกษาการให้ผลผลิตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด จากการเพาะให้ออกดอกในอาหารเพาะขี้เลื่อย โดยอาหารเพาะดัดแปลงจาก พิมพ์กานต์ (2544) ประกอบด้วยขี้เลื่อย 100 กก. : รำละเอียด 10 กก. : ปูนขาว 1 กก. : ดีเกลือ 200 ก. วางแผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design ทำ 4 ซ้ำ (ซ้ำละ 15 ถุงอาหารเพาะขี้เลื่อย) โดยใช้เห็ดเป๋าฮื้อ 3 (PC3) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้บริการของกรมวิชาการเกษตรเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ เก็บผลผลิตเป็นระยะเวลา 3 เดือน บันทึกข้อมูล ระยะที่เส้นใยเจริญเต็มวัสดุเพาะ (วัน) ผลผลิตเป็นแบบน้ำหนักสด (กรัม/ถุง) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดที่เพาะได้แก่ สี รูปร่างของดอก/ก้านดอก ขนาดหมวกดอก/ก้านดอก

คัดเลือกสายพันธุ์เห็ดที่ให้ผลผลิตสูงหรือมีลักษณะเด่นทางสัณฐานวิทยาไปใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อต่อไป

ผลการทดลองและวิจารณ์

รวบรวมสายพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อ

รวบรวมสายพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ แหล่งจำหน่ายเชื้อเห็ด ฟาร์มเกษตรกรผู้เพาะเห็ด และศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย ได้จำนวนทั้งสิ้น 25 สายพันธุ์ โดยเชื้อเห็ดเป๋าฮื้อที่รวบรวมได้นั้น มีทั้งในรูปแบบเส้นใยเห็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยเห็ดในวัสดุเพาะและดอกเห็ด (Table 1)

ศึกษาการให้ผลผลิตจากการเพาะให้ออกดอก

จากการนำเห็ดเป๋าฮื้อทั้ง 25 สายพันธุ์ มาเพาะในอาหารเพาะขี้เลื่อย ขนาด 800 กรัม ตั้งแต่เดือนมกราคม - สิงหาคม 2565 อุณหภูมิเฉลี่ยในโรงเรือนบ่มเส้นใย ประมาณ 27.38 - 30.20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 54.25-58.88 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเห็ดทุกสายพันธุ์เจริญเต็มถุงอาหารเพาะภายใน 51.31 – 61.90 วัน (Table 2) ซึ่งใช้เวลาในการเจริญไม่แตกต่างทางสถิติจากสายพันธุ์เปรียบเทียบ PC3 (ใช้เวลาเฉลี่ย 55.41 วัน) ยกเว้นสายพันธุ์ PC5 ที่ใช้เวลาเฉลี่ยในการเจริญ 61.90 วัน และเมื่อนำเห็ดเป๋าฮื้อทั้ง 25 สายพันธุ์มาเปิดดอก ในโรงเรือนซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ย 31.37- 35.04 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 58.26 - 68.48 เปอร์เซ็นต์ เห็ดแต่ละสายพันธุ์ใช้เวลาในการออกดอกหลังการเปิดดอกแตกต่างกัน โดยพบว่าเห็ดเป๋าฮื้อ 15 สายพันธุ์ ได้แก่ PC1 PC4 PC5 PC6 PC10 PC11 PC14 PC15 PC16 PC20 PC21 PC23 PC24 PC25 และPC26 ใช้เวลาในการอกดอกเฉลี่ย 15.13 – 29.46 วัน ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับสายพันธุ์ PC3 ที่ใช้เวลาในการออกดอกเฉลี่ย 18.89 วัน (Table 2) ผลการเปรียบเทียบการให้ผลผลิตในระยะเวลาเปิดดอก 5 เดือน ระยะเปิดดอกตั้งแต่เดือนมีนาคม – สิงหาคม 2565 คิดเป็นน้ำหนักเห็ดสดเฉลี่ยต่อถุงอาหารเพาะ พบว่าเห็ดเป๋าฮื้อสายพันธุ์ PC1 ให้ผลผลิตเฉลี่ย 210.24 กรัม/ถุง ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่า PC3 ที่ให้ผลผลิต 149.20 กรัม/ถุง คิดเป็น 40.91 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สายพันธุ์ PC4 PC5 PC10 PC11 PC14 PC15 PC16 PC20 PC21 PC23 PC24 PC25 และPC26 ให้ผลผลิต 128.55 - 175.26 กรัม/ถุง ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับสายพันธุ์เปรียบเทียบ (Table 2) ผลการทดลองสอดคล้องกับอนุสรณ์และคณะ (2561) ที่รวบรวมสายพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อ เพาะคัดเลือกและประเมินสายพันธุ์ จำนวน 17 สายพันธุ์ พบว่ามีเห็ดเป๋าฮื้อที่ให้ผลผลิตสูง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ No.1 No.10 และ No.4 ซึ่งให้ผลผลิตสูงที่สุด 186.04, 167.85 และ 148.87 กรัม/ถุง ตามลำดับ โดยให้ผลผลิตสูงกว่าเห็ดเป๋าฮื้อ-3 สายพันธุ์เปรียบเทียบที่ให้ผลผลิต 126.72 กรัม/ถุง

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด

เห็ดเป๋าฮื้อทั้ง 25 สายพันธุ์ เมื่อเพาะให้ออกดอกพบว่าดอกเห็ดมีรูปร่างคล้ายพัด สีครีม น้ำตาลอ่อน น้ำตาลเทา จนถึงเทาดำ เนื้อหนา (Figure 1) ตรงกลางหมวกดอกเว้าตื้น มีขนรวมกันคล้ายเกล็ดเล็ก ๆ ขอบหมวกเรียบถึงไม่เรียบ หมวกดอกขนาดกว้าง 4.74-12.67 เซนติเมตร เนื้อเห็ดสดสีขาว เปราะ เมื่อเห็ดแก่จะเหนียว ครีบดอกสีขาวนวล ครีบยาวเรียงไปตามก้านดอก ก้านมีขนาดกว้าง 0.95-2.47 เซนติเมตร ยาว 2.43-7.01 เซนติเมตร สีน้ำตาลถึงเทาดำ ติดด้านข้างหมวก โคนก้านสอบเล็ก มีขนละเอียด สีเทาอมน้ำตาล คล้ายกำมะหยี่บาง ๆ

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลผลิตของเห็ดเป๋าฮื้อทั้ง 25 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับPC3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้บริการของกรมวิชาการเกษตร คัดเลือกเห็ดสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีโดยใช้เกณฑ์ 1) ความสามารถในการให้ผลผลิต 2) การออกดอกเร็วและออกดอกพร้อมกัน 3) ระยะเวลาการบ่มเส้นใยในถุงอาหารเพาะ และ 4) ดอกมีขนาดและสีตรงตามความต้องการของตลาด (สัญชัย, 2521) พบว่าสายพันธุ์ PC1 มีคุณลักษณะเป็นเห็ดสายพันธุ์ดี เนื่องจากระยะเวลาการบ่มเส้นใยในถุงอาหารเพาะสั้น การออกดอกเร็วและออกดอกพร้อมกันและให้ผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบ แต่สีของดอกเห็ดมีสีเทาเข้มถึงดำซึ่งยังไม่เป็นไปตามความต้องการของตลาดที่นิยมเห็ดเป๋าฮื้อสีครีมหรือสีเทาอ่อน ดังนั้นหากพัฒนาสายพันธุ์นี้ให้มีสีครีมหรือเทาอ่อนสามารถเป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรได้ ในขณะที่สายพันธุ์ PC4 PC10 PC11 PC14 PC15 PC16 PC20 PC21 PC23 PC24 PC25 และ PC26 มีระยะเวลาการบ่มเส้นใยในถุงอาหารเพาะ การออกดอกและให้ผลผลิตที่ไม่แตกต่างจาก PC3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ แต่สายพันธุ์ PC4 PC10 PC11 ดอกเห็ดมีสีเทาเข้มถึงดำ ดังนั้นหากพัฒนาสายพันธุ์นี้ให้มีสีครีมหรือเทาอ่อนเพื่อเป็นการเพิ่มความหลากหลายของ สายพันธุ์มากขึ้น ส่วนสายพันธุ์เห็ด PC14 PC15 PC16 PC20 PC21 PC23 PC24 PC25 และ PC26 เป็นเห็ดที่มีลักษณะดอกและสีเป็นไปตามความต้องการของตลาด หากปรับปรุงพันธุ์ให้มีผลผลิตที่สูงขึ้นสามารถเป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรได้เช่นกัน ดังนั้นจึงคัดเลือกเห็ดเป๋าฮื้อทั้ง 13 สายพันธุ์ ไปใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อต่อไป

สรุป

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลผลิตของเห็ดเป๋าฮื้อทั้ง 25 สายพันธุ์ที่รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆ เปรียบเทียบกับPC3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้บริการของกรมวิชาการเกษตร คัดเลือกเห็ดสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีโดยใช้เกณฑ์ 1) ความสามารถในการให้ผลผลิต 2) การออกดอกเร็วและออกดอกพร้อมกัน 3) ระยะเวลาการบ่มเส้นใย ในถุงอาหารเพาะ และ 4) ดอกมีขนาดและสีตรงตามความต้องการของตลาด พบว่ามีเห็ดเป๋าฮื้อ 13 สายพันธุ์ที่มีลักษณะดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ PC1 PC4 PC10 PC11 PC14 PC15 PC16 PC20 PC21 PC23 PC24 PC25 และ PC26 แต่ยังขาดคุณลักษณะบางประการ เช่น ดอกเห็ดมีสีเทาเข้มหรือสีดำซึ่งยังไม่ตรงความต้องการของตลาดที่นิยมดอกเห็ดเป๋าฮื้อครีมหรือสายพันธุ์ดอกเห็ดมีสีครีมแต่ผลผลิตยังไม่สูง ดังนั้นหากพัฒนาสายพันธุ์เหล่านี้ให้มีสีครีมสีเทาอ่อนและ ให้ผลผลิตสูงขึ้นช่วยเพิ่มความหลากหลายของสายพันธุ์มากขึ้น ทั้งนี้อาจใช้วิธีการ Di-mon mating ซึ่งเป็นการปรับปรุงพันธุ์เห็ดโดยการผสมข้ามและมีรายงานการใช้วิธีดังกล่าวประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดสกุลนางรมชนิดอื่น ๆ เช่น เห็ดภูฏาน และเห็ดนางรมเทา จึงได้คัดเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) เพื่อสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund: FF) ผ่านการจัดสรรงบประมาณจากกรมวิชาการเกษตร ขอขอบคุณคุณอนุสรณ์ วัฒนกุล ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อเห็ดเป๋าฮื้อ รหัสการทดลอง PC 15 และขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่อำนวยความสะดวกด้านวัสดุอุปกรณ์ บุคลากรและสถานที่ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ดำเกิง ป้องพาล. 2547. การผลิตเห็ด. เอกสารประกอบการสอน วิชา พส 413. ภาควิชาพืชสวน.
คณะผลิตกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่.

พิมพ์กานต์. 2544. การเพาะเห็ดสกุลนางรม เห็ดหูหนู เห็ดตีนแรด และเห็ดยานาง. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 13-18. ใน: การเพาะเห็ดเศรษฐกิจ. ศุภนิตย์ หิรัญประดิษฐ์ และอภิญญา สุราวุธ ผู้จัดทำ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. กรุงเทพฯ.

สัญชัย ตันตยาภรณ์ .2521. แนวทางการปรับปรุงพันธุ์เห็ด. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย .หน้า 31-39. *ใน:ที่ระลึกในพิธีเปิดป้ายสมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย.* สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย.

อนุสรณ์ วัฒนกุล กรกช จันทร และวราพร ไชยมา. 2561. การคัดเลือกและประเมินสายพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อเพื่อการใช้ประโยชน์. ใน: รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด โครงการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเห็ด. กรมวิชาการเกษตร.

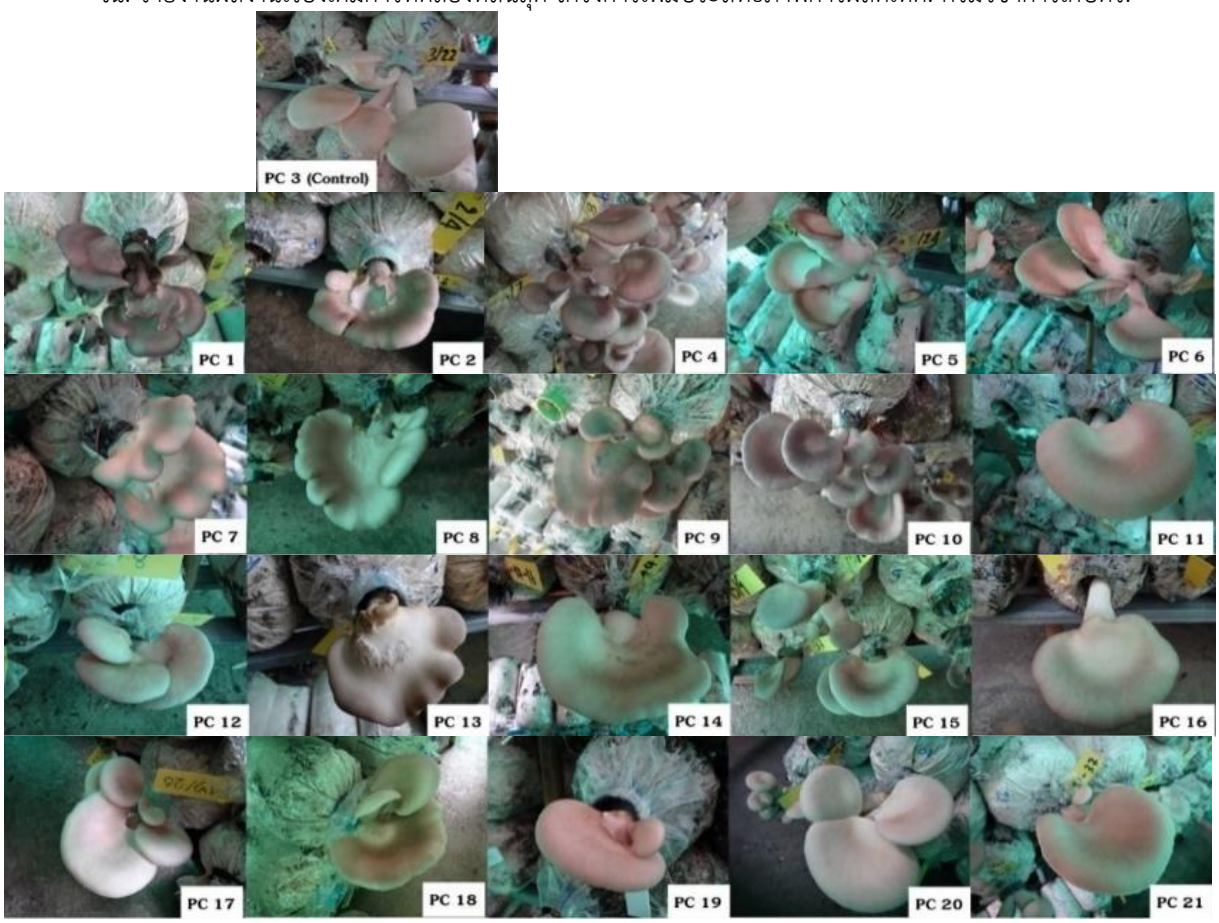


Figure 1 Morphological characteristics of 25 Abalone mushroom strains compared with PC3; cultivation period from March to August 2023.

Table 1 Twenty-five of Abalone Mushroom (*Pleurotus cystidiosus*) from various location

No.	Sample Code	Source of samples	Type of Sample
1	PC1	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
2	PC2	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
3	PC4	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
4	PC5	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
5	PC6	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
6	PC7	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
7	PC8	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
8	PC9	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
9	PC10	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
10	PC11	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
11	PC12	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
12	PC13	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
13	PC14	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
14	PC15	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
15	PC16	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
16	PC17	Thailand Mushroom Culture Collection	Mother mycelium
17	PC18	Sakon Nakhon Province	Fruiting body
18	PC19	Bangkok	Mother mycelium
19	PC20	Nonthaburi Province	Mother mycelium
20	PC21	Ang Thong Province	Mother mycelium
21	PC22	Phitsanulok Province	Fruiting body
22	PC23	Saraburi Province	Mother spawn
23	PC24	Sakon Nakhon Province	Mother spawn
24	PC25	Ratchaburi Province	Fruiting body
25	PC25	Sisaket Province	Mother mycelium

Table 2 The mycelial colonization time, day of primordia formation and fresh weight yield of 25 Abalone mushroom compared with PC3; cultivation period from January to August 2022

Strains	Spawn run (day)	Fruit bodies primordia formation after bag opening (day)	Average fresh weight yield (g/bag)
PC3 (Control)	55.41 a-d	18.89 ab	149.20 bc
PC1	55.99 a-e[1/]	15.13 a	210.42 a
PC2	52.81 ab	39.80 efg	71.48 d
PC4	57.26 a-e	18.41 ab	134.41 bc
PC5	61.90 e	19.76 ab	151.12 bc
PC6	56.05 a-e	29.46 b-e	50.64 d
PC7	54.98 a-d	38.73 efg	70.92 d
PC8	52.80 ab	37.95 efg	85.47 d
PC9	53.11 abc	41.60 fg	71.83 d
PC10	56.97 a-e	16.64 a	167.67 bc
PC11	58.10 b-e	23.51 abc	128.55 c
PC12	59.22 cde	45.77 g	75.79 d
PC13	57.24 a-e	32.99 c-f	87.92 d
PC14	53.73 abc	23.33 abc	166.50 bc
PC15	51.75 a	15.23 a	135.09 bc
PC16	55.12 a-d	26.46 a-d	150.24 bc
PC17	55.03 a-d	33.15 c-f	68.74 d
PC18	54.40 abc	36.82 d-g	67.97 d
PC19	54.30 abc	35.93.d-g	76.98 d
PC20	53.99 abc	16.77 a	132.63 bc
PC21	55.49 a-d	17.67 a	175.26 ab
PC22	54.65 a-d	38.35 efg	62.77 d
PC23	60.71 de	19.33 ab	150.31 bc
PC24	60.76 de	23.18 abc	153.54 bc
PC25	51.31 a	19.56 ab	144.73 bc
PC26	58.71 b-e	18.79 ab	172.08 b
CV	6.40 %	25.40 %	21.40 %

[1/] Means in the same column, followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

การรวบรวมและประเมินลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อพันธุ์มะระขี้นก

Collection and Morphological Characterization of Bitter Gourd Germplasm

พัฒน์นรี รักษ์คิด* พัชร ปิริยะวินิตร และ พิทยา วงษ์ช้าง

Padnaree Rukkid*, Phatchara Piriyavinit and Pitthaya Wongchang

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, ปทุมธานี 12110

Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathum Thani, 12110

* Corresponding author: padnaree.r@gmail.com

บทคัดย่อ

มะระขี้นกเป็นพืชผักสมุนไพรที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในแถบประเทศเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทย ซึ่งพืชชนิดนี้มีความหลากหลายของเชื้อพันธุ์ค่อนข้างสูง แต่การบริโภคในปัจจุบันนิยมใช้เพียงพันธุ์การค้าส่งผลให้ความหลากหลายลดลงและอาจทำให้เชื้อพันธุ์ดั้งเดิมสูญหายได้ในอนาคต งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมและประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยามะระขี้นกจำนวน 15 ตัวอย่าง สำหรับการใช้ประโยชน์เชื้อพันธุ์ในอนาคต วางแผนการทดลองแบบ Randomized completely block design (RCBD) จำนวน 2 ซ้ำ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน บันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยา 5 ระยะ ได้แก่ ระยะต้นกล้า ระยะเจริญเติบโตทางลำต้น ระยะออกดอก ระยะติดผล และระยะเมล็ดพันธุ์ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มผลมะระขี้นกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ขนาดเล็ก (ความยาว 30-60 มม.) จำนวน 7 ตัวอย่าง ขนาดกลาง (ความยาว 61-120 มม.) จำนวน 7 ตัวอย่าง และขนาดใหญ่ (ความยาวมากกว่า 121 มม.) จำนวน 1 ตัวอย่าง

คำสำคัญ: มะระขี้นก ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ABSTRACT

Bitter gourd is a widely used vegetable and herb for utilization in tropical countries including Thailand. This plant has a relatively high diversity. Currently, consumption of this plant is mostly used only in commercial varieties. Therefore, the native plant germplasm may be lost in the future. This causes the diversity of this plant to decrease. This research objective is to collect and evaluate the morphological characteristics of 15 samples for future use. The bitter gourds were planted and evaluated for morphological characteristics at the Tropical Vegetable Research Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus. The experiment was designed as RCBD with two replicates. The morphological characteristics were recorded for 5 stages including seedling, vegetative, flowering, fruiting and seed characters at postharvest stage. It was found that bitter gourd fruit could be divided into 3 groups including small fruits (length 30-60 mm.) 7 samples, medium fruits (length 61-120 mm.) 7 samples and large fruits (length >121mm.) 1 sample.

Keywords: bitter gourd, genetic diversity

บทนำ

มะระขี้นก (*Momordica charantia* L. var. minima; Bitter gourd) มีถิ่นกำเนิดในอินเดียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นพืชปีเดียวสามารถปลูกได้ทุกฤดูกาล ลำต้นเป็นเถาเลื้อย มีมือเกาะตามข้อช่วยยึดเกาะพยุงลำต้น ใบเป็นใบเดี่ยว ขอบใบจักลึก ดอกเป็นดอกเดี่ยวสีเหลือง กลีบดอก 5 กลีบ ดอกแยกเพศอยู่ในต้นเดียวกัน (monoecious) มีผลเล็กสั้นป้อม หัวและท้ายแหลม เส้นผ่านศูนย์กลางผลน้อยกว่า 5 ซม. ผิวผลขรุขระ สีเขียว รสขมกว่ามะระจีน ผลสุกสีเหลืองส้ม (เอื้องฟ้า, 2542; Bharathi and John, 2013) ประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์จากมะระขี้นกในด้านโภชนาการและสรรพคุณทางยามาอย่างยาวนานแต่ด้วยอิทธิพลทางการค้าปัจจุบันมะระขี้นกที่ใช้ส่วนใหญ่จึงเป็นพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ จึงได้ทำการรวบรวมและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อพันธุกรรมมะระขี้นกนี้ เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างเชื้อพันธุ์มะระขี้นกที่ได้จากการรวบรวม

รวบรวมเชื้อพันธุ์มะระขี้นกจากแหล่งต่างๆ และปลูกขยายด้วยวิธีผสมตัวเองจำนวน 3 รุ่น เพื่อสร้างความสม่ำเสมอของเชื้อพันธุ์ก่อนปลูกประเมินลักษณะสัณฐานวิทยา

การประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อพันธุ์มะระขี้นก

ประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำนวน 15 ตัวอย่าง โดยปลูกในสภาพแปลง ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำนวน 6 ต้นต่อแถว ปลูก 2 แถวต่อแปลง ตัวอย่างละ 12 ต้นต่อแปลง วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) 2 ซ้ำ บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยา 5 ระยะ ได้แก่ ระยะต้นกล้า ระยะเจริญเติบโตทางลำต้น ระยะออกดอก ระยะติดผล และระยะเมล็ดพันธุ์ ดัดแปลงจาก-Descriptors for Wild Dioecious Momordica Species (Joseph and Antony, 2011) และแบบบันทึกลักษณะการตรวจสอบพันธุ์มะระที่ขอจดทะเบียนเป็นพันธุ์พืชใหม่ (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร, 2548) วิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การรวบรวมและประเมินลักษณะสัณฐานวิทยามะระขี้นก 15 ตัวอย่าง (Table 1) ดำเนินงานระหว่างกุมภาพันธ์ถึง กันยายน 2561 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (TVRC) พบว่าในระยะต้นกล้าและระยะเจริญเติบโตทางลำต้น มะระขี้นกทั้ง 15 ตัวอย่างมีใบเลี้ยงสีเขียว (Green Group 137B – 139B) อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างใบเลี้ยงสามารถแบ่งกลุ่มของขนาดใบเลี้ยงได้ 2 กลุ่ม คือขนาดปานกลางและใหญ่ ซึ่ง M46 มีขนาดใหญ่ที่สุด ความยาวของเถาหลักมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญสอดคล้องกันกับลักษณะของเถา M23 มีความยาวเถาหลักมากที่สุดคือ 195 ซม. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเถาหลักมีขนาดใหญ่และปล้องเถาหลักมีความยาว คือ 4.76 และ 33.01 มม. ตามลำดับ ในขณะที่ M57 มีความยาวเถาหลักและปล้องเถาหลักขนาดสั้นที่สุดคือ คือ 139 ซม. และ 23.51 มม. ตามลำดับ ลักษณะปลายใบจริงใบแรกเป็นติ่งแหลมติ่งเดียว (cuspidate) หรือ

สามติ่ง (tricuspidate) และขอบใบจริงใบแรกหยักซี่ฟันถี่ (denticulate) แผ่นใบสีเขียว (Green Group 137B – C) รูปร่างแผ่นใบเป็นรูปหัวใจ (cordate) หรือทรงกลม (round) มีร่อง 5-7 ร่องต่อแผ่นใบ ลำต้นเริ่มเลื้อยเมื่อมีอายุ 22-33 วันหลังย้ายกล้า ส่วนระยะออกดอกพบวันที่ดอกเพศผู้บาน 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 35 – 45 วันหลังย้ายปลูก และดอกเพศเมียบาน 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 44 – 51 วันหลังย้ายปลูก ดอกเพศเมียรังไข่มีสีเขียว (Green Group 137A – D) ทรงกลม มีการผสมเกสรในช่วงเช้า ความยาวและความกว้างรังไข่มีความสัมพันธ์กันโดย M61 มีความยาวและกว้างมากที่สุดคือ 18.69 และ 5 มม. ตามลำดับ ในขณะที่ M17 มีรังไข่เล็กที่สุดคือยาว 8.65 มม. กว้าง 3.2 มม. ส่วนระยะติดผล (Table 2; Figure 1) พบจำนวนวันเก็บเกี่ยวผลผลิตเชิงพาณิชย์ 52 – 59 วัน สีของผลผลิตเชิงพาณิชย์มีสีเหลืองเขียวถึงสีเขียว และขนาดผล น้ำหนัก ความยาวและความกว้างผลที่ระยะเก็บเกี่ยวเชิงพาณิชย์มีความสัมพันธ์กันสามารถจัดกลุ่มได้ดังนี้ (วัชราภรณ์, 2544; Dhillon *et al.*, 2016)

กลุ่มที่ 1 ผลขนาดเล็ก รูปร่างของผลที่ระยะเก็บเกี่ยวเชิงพาณิชย์เป็นรูปทรงกระสวย (spindle) ความยาวผลอยู่ในช่วง 30 – 60 มม. น้ำหนักผล 3 – 15 กรัม ความหนาของเนื้อผล 2 – 4.5 มม. พบเชื้อพันธุ์มะระขี้นกจำนวน 7ตัวอย่าง ได้แก่ M15, M17, M30, M41, M44, M46 และ M50

กลุ่มที่ 2 ผลขนาดกลาง รูปร่างของผลที่ระยะเก็บเกี่ยวเชิงพาณิชย์เป็นรูปทรงผลแบบรี (elliptic) ความยาวผลอยู่ในช่วง 61 – 120 มม. น้ำหนักผล 15 – 40 กรัม ความหนาของเนื้อผล 4.5 – 10 มม. พบเชื้อพันธุ์มะระขี้นกจำนวน 7ตัวอย่าง ได้แก่ M8, M9, M10, M11, M57, M 61 และ M63

กลุ่มที่ 3 ผลขนาดใหญ่ รูปร่างของผลที่ระยะเก็บเกี่ยวเชิงพาณิชย์เป็นรูปทรงผลแบบขอบขนาน (oblong) ความยาวผลมากกว่า 120 มม. น้ำหนักผลมากกว่า 50 กรัม ความหนาของเนื้อผลมากกว่า 10 มม. พบเชื้อพันธุ์มะระขี้นกจำนวน 1 ตัวอย่าง ได้แก่ M23

การประเมินลักษณะในระยะเมล็ดพันธุ์ พบว่าเมล็ดมีสีแตกต่างกันตั้งแต่สีเหลืองอ่อน น้ำตาลอ่อนและดำ โดยรูปร่าง ขนาด และน้ำหนัก 100 เมล็ด มีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ เมล็ดมะระขี้นกของผลที่มีขนาดเล็กส่วนใหญ่ไม่มีรอยหยักที่เปลือกเมล็ดและมีรูปทรงรี (elliptical) ความยาว 8 – 12 มม. กว้าง 4 – 6 มม. หนา 2 – 3 มม. และ 100 เมล็ดมีน้ำหนัก 4 – 10 กรัม ในขณะที่เมล็ดของผลที่มีขนาดกลางและใหญ่มีรูปทรงไข่ (ovate) เปลือกเมล็ดมีรอยหยัก ความยาว 12 – 15 มม. กว้าง 6 – 10 มม. หนา 3 – 5 มม. และน้ำหนัก 100 เมล็ดหนัก 10 – 20 กรัม ซึ่งเมล็ดของผลที่มีขนาดกลางและใหญ่มีความงอกและความแข็งแรงมากกว่าเมล็ดของผลที่มีขนาดเล็ก

สรุป

จากการรวบรวมและประเมินลักษณะสัณฐานวิทยามะระขี้นกจำนวน 15 ตัวอย่าง สามารถแบ่งกลุ่มของผลมะระขี้นกได้เป็น 3 ขนาด คือ ขนาดเล็ก กลาง และใหญ่ ซึ่งลักษณะของผลมีความสอดคล้องกับลักษณะของเมล็ด รวมถึงความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารสำคัญ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างพันธุ์เพื่อการคัดเลือกเชื้อพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับผลิตพันธุ์ที่มีคุณภาพเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรมที่สนับสนุนงบวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

เอื้องฟ้า บรรเทาวงษ์. 2542. การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะระขี้นกพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วัชราภรณ์ จันทบุตร. 2544. การศึกษาลักษณะประจำพันธุ์และขยายเมล็ดพันธุ์ของเชื้อพันธุกรรมมะระ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร. 2548. ระเบียบกรมวิชาการเกษตร ว่าด้วยการตรวจสอบลักษณะของพันธุ์พืชที่ขอจดทะเบียนเป็นพันธุ์พืชใหม่ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2547. แหล่งที่มา: https://www.doa.go.th/pvp/?page_id=441, 15 กุมภาพันธ์ 2562.

Bharathi, L.K. and K.J. John. 2013. *Momordica* Genus in Asia: An Overview. Springer, New Delhi, India. 147 pp.

Dhillon, N.P.S., S. Sanguansil, R. Schafleitner, Y.W. Wang and J.D. McCreight. 2016. Diversity Among a Wide Asian Collection of Bitter Gourd Landraces and their Genetic Relationships with Commercial Hybrid Cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 141(5): 475–484.

Joseph, J.K. and V.T. Antony. 2011. Developing Descriptors for Dioecious *Momordica* Species for Germplasm Characterization and Evaluation. *Indian J. Plant Genet. Resour*. 24(1): 31–39.

Table 1 List of Bitter Gourd Seeds (*Momordica charantia* L.) Collected from Thailand

Code	Local name	Type of Sample	Source	Province
M8	Mara Khi Nok	Farmer varieties	On farm	Phichit
M9	Mara Khi Nok	Commercial varieties	Market	Kamphaeng Phet
M10	Mara Khi Nok	Commercial varieties	Market	Tak
M11	Mara Khi Nok	Commercial varieties	Market	Tak
M15	Mara Khi Nok, Ma Hoi	Landraces	Market	Nan
M17	Mara Khi Nok	Landraces	Local	Nakhon Phanom
M23	Mara Khi Nok	Farmer varieties	Local	Bangkok
M30	Mara Khi Nok	Landraces	Market	Prachuap Khiri Khan
M41	Mara Khi Nok	Landraces	On farm	Phrae
M44	Mara Khi Nok, Ma Hoi	Landraces	Local	Nan
M46	Mara Khi Nok	Landraces	On farm	Uttaradit
M50	Mara Khi Nok	Landraces	Local	Phichit
M57	Mara Khi Nok	Commercial varieties	Market	Ayutthaya
M61	Mara Khi Nok	Farmer varieties	On farm	Sakon Nakhon
M63	Mara Khi Nok	Farmer varieties	On farm	Si Sa Ket

Table 2 Morphological characters of 15 bitter gourd (*Momordica charantia* L.) accessions at fruit stage since February to September 2018 at TVRC

Code	Fruit length (mm)	Fruit width (mm)	Fruit weight (g)	Fruit wall thickness (mm)	Fruit set	Fruit size	Fruit shape	Fruit surface	Warty pattern on fruit	Fruit color	
M8	82.59 d	38.90 d	20.3 c	6.07 bc	Good	Medium	Elliptic	Acute warty	Warty	Green	Yellow-Green Group 144B
M9	99.18 b	44.43 b	19.6 c	6.32 b	Good	Medium	Elliptic	Acute warty	Warty	Green	Yellow-Green Group 145D
M10	81.66 d	35.72 f	22.7 c	4.69 efg	Good	Medium	Elliptic	Warty	Weak	Green	Yellow-Green Group 145D
M11	95.76 bc	37.77 de	21.5 c	5.44 cde	Medium	Medium	Elliptic	Warty	Warty	Green	Yellow-Green Group 145D
M15	51.17 e	22.82 ij	4.3 d	4.26 fgh	Good	Small	Spindle	Acute warty	Warty	Yellow white	Yellow Group 2D
M17	49.02 e	18.66 k	5.5 d	2.13 j	Medium	Small	Spindle	Acute warty	Warty	Yellow white	Yellow Group 2D
M23	132.61 a	55.82 a	54.3 a	11.03 a	Poor	big	oblong	Warty	Weak	Green	Yellow-Green Group 144B
M30	53.16 e	25.12 h	5.5 d	3.97 gh	Medium	Small	Spindle	Acute warty	Warty	Green	Yellow-Green Group 145C
M41	52.10 e	24.49 hi	4.8 d	3.54 hi	Poor	Small	Spindle	Acute warty	Warty	Green	Yellow-Green Group 145C
M44	49.86 e	21.36 j	5.4 d	2.89 i	Poor	Small	Spindle	Acute warty	Warty	Green	Yellow-Green Group 145A
M46	49.12 e	22.37 j	8.3 d	3.73 h	Poor	Small	Spindle	Acute warty	Medium	Yellow white	Yellow Group 2D
M50	51.32 e	21.86 j	6.8 d	2.83 ij	Medium	Small	Spindle	Acute warty	Warty	Green	Yellow-Green Group 145A
M57	91.55 c	32.62 g	18.9 c	4.98 ef	Good	Medium	Elliptic	Acute warty	Warty	Green	Yellow-Green Group 145D
M61	92.33 c	41.69 c	38.0 b	5.92 bcd	Good	Medium	Elliptic	Warty	Medium	Green	Yellow-Green Group 145D
M63	77.44 d	36.20 ef	19.7 c	5.21 de	Good	Medium	Elliptic	Acute warty	Warty	Green	Yellow-Green Group 145D
Mean	76.52	31.99	17.00	4.87							
F-test	**	**	**	**							
CV (%)	3.6	2.7	11.3	6.8							

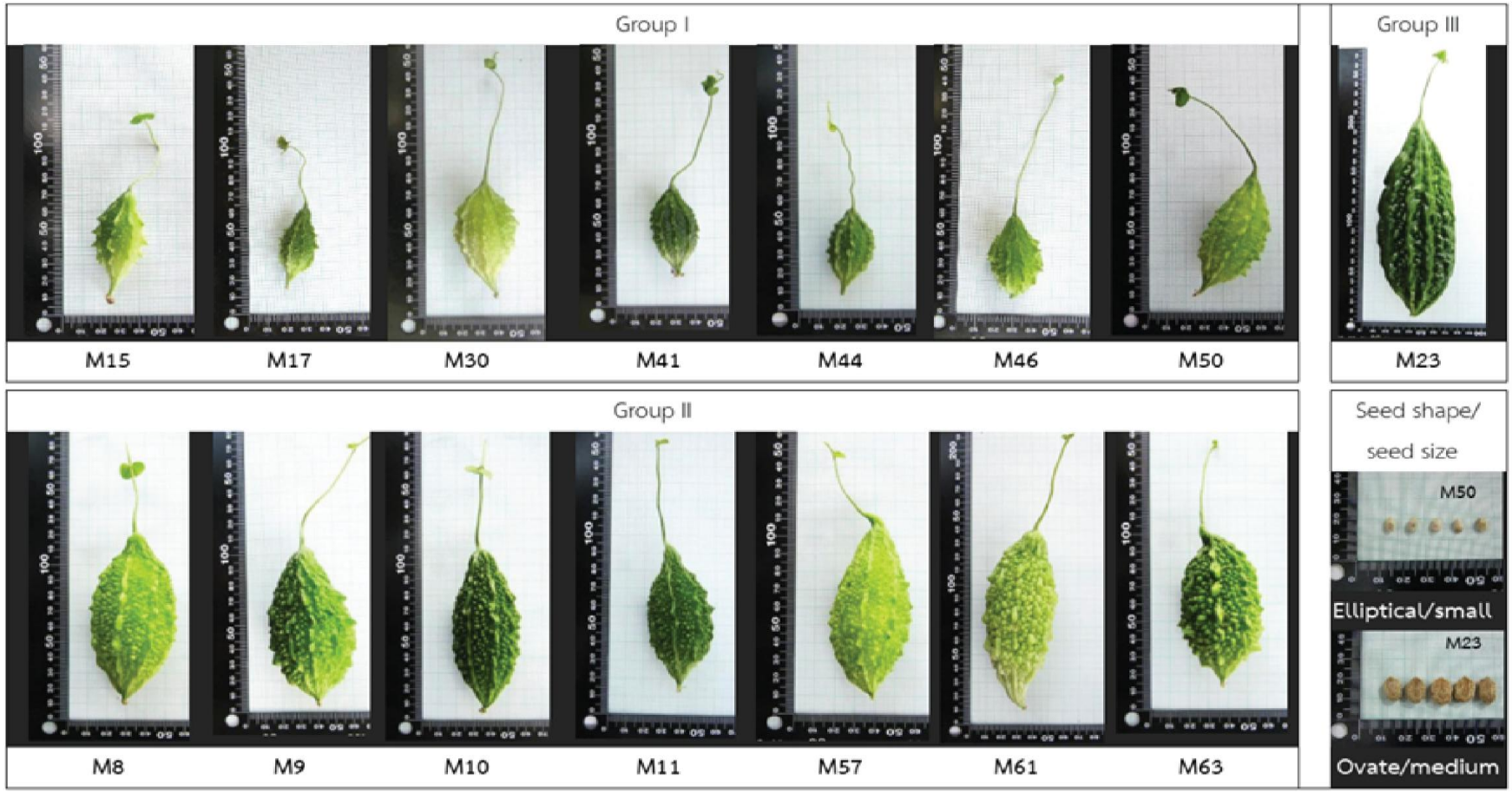


Figure 1 Fruit characters was divided into three morphological groups follows:

Group I : Spindle shaped fruit (length 30 – 60 mm.). Seed shape was elliptical and small size (7 samples)

Group II : Ellipsoid shaped fruit. (length 61 – 120 mm.). Seed shape was ovate and medium size (7 samples)

Group III : Oblong shaped fruit. (length more than 120 mm.). Seed shape was ovate and large size (1 sample)

“นวัตกรรมเทคโนโลยีสีเขียว
เพื่อจุดประกายมิติใหม่ภาคการเกษตร
(Innovative Green Technology to Ignite a New Dimension in Agriculture)”

ผลิตภัณฑ์จาก
เชื้อพันธุกรรมพืช

ทองม้วนสมุนไพรหน่อปุด

ต้นแบบผลิตภัณฑ์

รีรภัทร เหลืองศุภบูลย์

นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

สุพินญา บุญมานพ	สทช.
อภิญญา วงศ์เปี้ย	สทช.
ปาริฉัตร สังข์สะอาด	สทช.
สิ่วกัญญา จารุพินทุโสภณ	มรภ.พระนคร
อังคณา จารุพินทุโสภณ	มรภ.พระนคร

ความเป็นมา

พืชสกุลปุด (Etlingera) เป็นพืชท้องถิ่นภาคใต้ซึ่งเป็นที่รู้จักอยู่ในวงจำกัดและถูกนำมาใช้ประโยชน์ได้น้อย เพื่อหาแนวทางการใช้ประโยชน์จากชนิดพันธุ์พืชสกุลปุดที่มีศักยภาพ ด้วยการพัฒนาต้นแบบผลิตภัณฑ์โดยจากการวิจัยได้คัดเลือกปุดช้าง (Etlingera littoralis (J.Koenig) Giesecke) ซึ่งเป็นชนิดพันธุ์ปุดที่อุดมไปด้วยสารพฤษเคมีและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่มีศักยภาพทางเภสัชวิทยาที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง เหมาะสมกับการนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์เชิงโภชนเภสัชเพื่อส่งเสริมสุขภาพ นำมาสู่การพัฒนาทองม้วนสมุนไพรหน่อปุดที่มีกลิ่นและรสชาติแปลกใหม่เป็นแนวทางการนำพืชสกุลปุดมาใช้ประโยชน์ เป็นพืชทางเลือกเสริมรายได้และต่อยอดพัฒนาต้นแบบผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบและสร้างรายได้แก่ชุมชน กระตุ้นจิตสำนึกการอนุรักษ์พันธุ์พืชสกุลปุดในท้องถิ่นและตระหนักถึงความสำคัญของทรัพยากรพันธุกรรมพืชสกุลปุดในชุมชนให้สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืน

จุดเด่นของผลงาน

ทองม้วนสมุนไพรหน่อปุดมีส่วนผสมของปุดช้าง ซึ่งมีความโดดเด่นของสารทุติยภูมิในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกฟลาโวนอยด์และน้ำมันหอมระเหยกลุ่มโมโนเทอร์พีนเป็นองค์ประกอบสูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง มีฤทธิ์ยังยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสสูง

ประโยชน์ของผลงาน

ทองม้วนสมุนไพรหน่อปุดเป็นผลิตภัณฑ์โภชนเภสัชที่มีส่วนผสมของวัตถุดิบสมุนไพรพืชสกุลปุดที่อุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มีส่วนช่วยในการส่งเสริมสุขภาพแก่ผู้บริโภคและยังมีกลิ่นและรสชาติแปลกใหม่ สามารถรับประทานได้ง่ายทุกเพศทุกวัย

แนวทางการพัฒนาต่อยอด

ต้นแบบผลิตภัณฑ์ทองม้วนสมุนไพรหน่อปุด สามารถนำไปถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบให้กับชุมชน เกษตรกร และบริษัทนำไปต่อยอดผลิตภัณฑ์เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม

ช่องทางติดต่อ

02 9046885 ต่อ 129

Theerapat.L@hotmail.com

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

ทองม้วนสมุนไพรหน่อปุด

ต้นแบบผลิตภัณฑ์

ทองม้วนสมุนไพรหน่อปุด (ETLIN CRISPY ROLLS)

ข้อมูลโภชนาการ

กินได้ 1 ครั้ง ต่อกล่อง

คุณค่าทางโภชนาการต่อการกินหนึ่งครั้ง : 30 ชิ้น (30 กรัม)

พลังงาน 120 กิโลแคลอรี

	ร้อยละของค่าอ้างอิงต่อวัน*
ไขมันทั้งหมด 2 ก.	3 %
ไขมันอิ่มตัว 3 ก.	15 %
คอเลสเตอรอล 9 มก.	3 %
โปรตีน 3 ก.	
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 24 ก.	8 %
น้ำตาลทั้งหมด 9 ก.	
โซเดียม 80 มก.	4 %
โพแทสเซียม 60 มก.	2 %

แสดงชนิดและปริมาณวิตามินและแร่ธาตุ
เป็นร้อยละของ Thai RDI ตามเงื่อนไขในข้อ 2.3

*ร้อยละของค่าอ้างอิงสารอาหารต่อวันสำหรับคนไทย จากความต้องการพลังงานวันละ 2,000 กิโลแคลอรี

ความต้องการพลังงานของแต่ละบุคคลแตกต่างกันผู้ที่ต้องการพลังงานวันละ 2,000 กิโลแคลอรี ควรได้รับสารอาหารต่างๆ ดังนี้

ไขมันทั้งหมด	น้อยกว่า 65 ก.
ไขมันอิ่มตัว	น้อยกว่า 20 ก.
คอเลสเตอรอล	น้อยกว่า 300 มก.
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	300 ก.
โซเดียม	น้อยกว่า 2,000 มก.

พลังงาน (กิโลแคลอรี) ต่อกรัม : ไขมัน = 9 ; โปรตีน = 4 ; คาร์โบไฮเดรต = 4

กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

ต้นแบบผลิตภัณฑ์จากมะเขือพวง

- เบเกอรี่วาฟเฟิลสุขภาพมะเขือพวง
- มะเขือพวงอบกรอบปรุงรส

ความเป็นมา

มะเขือพวง (Solanum torvum Sw.) หรือ turkey berry เป็นหนึ่งในพืชผักที่มีประโยชน์เรื่องคุณค่าอาหารที่รับประทานในครัวเรือนไทยมาช้านานผลมะเขือพวงมีคุณสมบัติในการเสริมภูมิต้านทานโรค การนำมะเขือพวงที่มีรสชาติไม่อร่อยแต่มีประโยชน์ โดยคัดเลือกเชื้อพันธุ์พืชมะเขือพวงที่เด่นในเรื่องของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารสำคัญต่าง ๆ มาเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์และนวัตกรรมการใช้ประโยชน์จากมะเขือพวง: ต้นแบบผลิตภัณฑ์เบเกอรี่วาฟเฟิลสุขภาพมะเขือพวงและมะเขือพวงอบกรอบปรุงรส

จุดเด่น: เบเกอรี่วาฟเฟิลสุขภาพมะเขือพวง

- เป็นวาฟเฟิลสำหรับทานระหว่างมื้อ หรือทานเป็นมื้อเช้า
- Vegan มังสวิรัติ ปราศจากไข่ และวัตถุดิบจากสัตว์
- Low calories ให้พลังงานต่ำ แต่อิ่มนาน
- อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน
- High fiber มีใยอาหารสูง
- High protein มีปริมาณโปรตีนสูง

จุดเด่น: มะเขือพวงอบกรอบปรุงรส

- เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ยังไม่มีจำหน่ายในท้องตลาด
- เป็นอาหารทานเล่นหรือทานคู่กับอาหารได้สะดวก
- ส่งเสริมการบริโภคผัก และการมีสุขภาพดี
- มีคุณประโยชน์จากมะเขือพวง ได้แก่ เป็นแหล่งใยอาหาร ธาตุเหล็ก
- และวิตามิน มีไขมันและคาร์โบไฮเดรตต่ำ เสริมสร้างระบบขับถ่าย
- และภูมิคุ้มกัน ลดการอักเสบ ลดความดันโลหิต

ประโยชน์ของผลงาน

คุณประโยชน์จากมะเขือพวงผลิตภัณฑ์เบเกอรี่วาฟเฟิลสุขภาพมะเขือพวงและมะเขือพวงอบกรอบปรุงรส ได้แก่ เป็นแหล่งใยอาหาร ธาตุเหล็ก วิตามิน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตต่ำ เสริมสร้างระบบขับถ่าย และภูมิคุ้มกัน ลดการอักเสบ ลดความดันโลหิต

แนวทางการพัฒนาต่อยอด

การนำผลงานผลิตภัณฑ์เบเกอรี่วาฟเฟิลสุขภาพและมะเขือพวงอบกรอบนำไปถ่ายทอดเทคโนโลยีจากผลิตภัณฑ์ต้นแบบให้บริษัทนำไปต่อยอดผลิตภัณฑ์ เป็นการสร้างมูลค่าเพิ่ม

กัญญาภรณ์ พิพิธแสงจันทร์

รักษาการผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษ์พันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย
นิภาพร บัวอิ่น สทช.
วัสนี ส่งเสริม สทช.
อภิญญา วงศ์เปี้ย สทช.
ธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์ สทช.
พัลลภ สังวรศิลป์ สทช.
วิชชา ตรีสุวรรณ มก.

ช่องทางติดต่อ

02 9046885 ต่อ 123

kunyapithsan@gmail.com

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร
85 หมู่ 1 ต.รังสิต
อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี
12110

ต้นแบบผลิตภัณฑ์จากมะเขือพวง

- เบเกอรี่วาฟเฟิลสุขภาพมะเขือพวง
- มะเขือพวงอบกรอบปรุงรส

• เบเกอรี่วาฟเฟิลสุขภาพมะเขือพวง

ต้นแบบผลิตภัณฑ์เบเกอรี่วาฟเฟิลสุขภาพมะเขือพวงและมะเขือพวงอบกรอบปรุงรส

• มะเขือพวงอบกรอบปรุงรส

กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้า DOA FACIAL ROSELLE ESSENSE และเครื่องดื่ม ROSELLE INSTANT DRINK MIX

(ผลิตภัณฑ์จากกระเจี๊ยบแดงในโครงการ JTEPA)

กัญญาภรณ์ พิพิธแสงจันทร์

รักษาการผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษ์พันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย
พิทยา วงษ์ช้าง
อัญชลี แก้วดวง
อัสนี ส่งเสริม
เสาวณี เดชะคำภู
สุภาวดี สมภาค
อรุณี ใจเถิง
อำนวย อรรถลังรอง
ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ จริญทรัพย์
วิชชา ตรีสุวรรณ
เขมพัษ ตรีสุวรรณ
อมรรัตน์ ถนนแก้ว

ความเป็นมา

มนุษยชาติในปัจจุบันนี้ได้เผชิญกับโรคอุบัติใหม่เกิดจากความไม่สมดุลของธรรมชาติ พืชสมุนไพรที่ใช้อยู่ในประเทศที่มีสารสำคัญสูงมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ การนำเชื้อพันธุ์พืชที่มีอยู่มาใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพและเพิ่มมูลค่า ความมั่นคงทางอาหารสู่การใช้ประโยชน์เชิงสุขภาพจากความหลากหลายทางชีวภาพของพืชที่ประเทศไทยมีดึงมาใช้ประโยชน์ สำหรับกระเจี๊ยบแดงมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของกระเจี๊ยบแดงทำหน้าที่เป็น antioxidant ในการผลิตผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เหมาะสำหรับน้ำมันและกรดไขมันต่าง ๆ ป้องกันกลิ่นหืนในเครื่องสำอาง สามารถนำเชื้อพันธุ์พืชมาเพิ่มมูลค่าโดยทำผลิตภัณฑ์ต้นแบบได้ ในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้า DOA Facial Roselle Essenseและเครื่องดื่ม Roselle Instant Drink Mix

จุดเด่นของผลงาน

DOA Facial Roselle Essense (น้ำตบ) ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้าจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ บำรุงผิวหน้าให้ใสกระจ่างใสรูขุมขนกระชับจุดด่างดำและริ้วรอยลดลงดูอ่อนเยาว์อย่างเป็นธรรมชาติได้

Roselle Powder หรือ Roselle Instant Drink Mix สูตรเกี่ยวกับความงามผิวพรรณและขับถ่าย (ทานแล้วผิวพรรณดีและขับถ่ายดี)

ประโยชน์ของผลงาน

เกษตรกรสามารถนำพันธุ์ที่มีสารสำคัญสูงนำมาขยายและสร้างรายได้เพิ่มแก่ชุมชน เกษตรกรเองมีแนวทางในการนำผลผลิตไปแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่า

ช่องทางติดต่อ

02 9046885 ต่อ 123

kunyapithsan@gmail.com

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร
85 หมู่ 1 ต.รังสิต
อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี
12110

แนวทางการพัฒนาต่อยอด

ผู้ประกอบการด้านธุรกิจอาหารสุขภาพผู้ประกอบการด้านธุรกิจความงามสามารถนำต้นแบบผลิตภัณฑ์ไปพัฒนาต่อยอดเชิงพาณิชย์

ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้า DOA Facial Roselle Essense และเครื่องดื่ม Roselle Instant Drink Mix

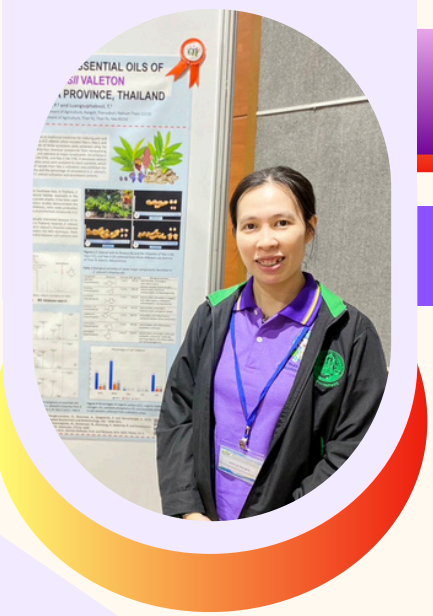
(ผลิตภัณฑ์จากกระเจี๊ยบแดงในโครงการ JTEPA)

ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้า DOA Facial Roselle Essence

ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้า DOA FACIAL ROSELLE ESSENCE และเครื่องดื่ม ROSELLE INSTANT DRINK MIX

เครื่องดื่ม Roselle Instant Drink Mix

กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110



ลูกประคบสมุนไพรไพลดำ

ลังกาสุกะ

อภิญญา วงศ์เปี้ย

นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย
พรพยุง คงสุวรรณ ศวส.ยะลา
พรเทพ ธีระวัฒนพงศ์ ศวส.ยะลา
อรวรรณ แก้วรักษา ศวส.ยะลา
ธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์ สทช.
อัญชลี แก้วดวง สทช.
ปาริฉัตร สังข์สะอาด สทช.

ความเป็นมา

ไพลดำ (*Zingiber ottensii* Valeton) เป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่พบมากทางภาคใต้ของประเทศชุมชนท้องถิ่นใช้ไพลดำเป็นยาสมุนไพรหรือเป็นส่วนผสมในตำรับยาเพื่อใช้รักษาโรค ผลิตภัณฑ์จากไพลดำได้รับความสนใจจากบริษัทต่างชาติ ที่ต้องการจำหน่ายในครื่องหมายการค้าของตนเอง ขณะที่ประเทศไทยมีความรู้และสนใจไพลดำในวงจำกัด

ลูกประคบสมุนไพรไพลดำ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโครงการวิจัยพัฒนาต้นแบบผลิตภัณฑ์จากความหลากหลายทางชีวภาพของไพลดำในประเทศไทยเพื่อสร้างมูลค่าเชิงพาณิชย์ ภายใต้ชื่อของ "ลังกาสุกะ" อันหมายถึงอาณาจักรโบราณทางภาคใต้ตอนล่างที่มีความรุ่งเรืองและสืบทอดภูมิปัญญาพืชสมุนไพรใน 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ถึงปัจจุบัน

งานวิจัยไพลดำและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโครงการ จะช่วยส่งเสริมความเป็นเจ้าของในภูมิปัญญาท้องถิ่นด้วยองค์ความรู้และเทคโนโลยีเพื่อสร้างความภาคภูมิใจในสมุนไพรไพลดำอันเป็นอัตลักษณ์ของชุมชน

จุดเด่นของผลงาน

ลูกประคบสมุนไพร ประกอบด้วยเหง้าไพลดำมากกว่าร้อยละ 80 โดยน้ำหนักซึ่งคัดสรรไพลดำที่ปลูกในจ.ยะลามาเป็นวัตถุดิบจึงโดดเด่นด้วยสรรพคุณของน้ำมันหอมระเหยและสารต้านอนุมูลอิสระ ร่วมกับการเพิ่มมะกรูด ตะไคร้ ส้มป่อย และพิมเสน ตามตำรับของชุมชนท้องถิ่นเพื่อมาเป็นลูกประคบไพลดำที่มีสรรพคุณบรรเทาปวดเมื่อยและผ่อนคลาย

ประโยชน์ของผลงาน

ใช้สำหรับประคบตามจุดต่างๆของร่างกายเพื่อบรรเทาอาการปวดเมื่อย ช่วยให้รู้สึกสดชื่นและผ่อนคลายจากกลิ่นน้ำมันหอมระเหยของไพลดำที่เป็นวัตถุดิบหลัก ลูกประคบไพลดำเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่ส่งเสริมการเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรพื้นบ้าน เผยแพร่คุณค่าและการใช้ประโยชน์ของไพลดำให้เป็นที่รู้จักในวงกว้าง

แนวทางการพัฒนาต่อยอด

ลูกประคบสมุนไพรไพลดำ เป็นการแปรรูปผลิตภัณฑ์ด้วยภูมิปัญญาท้องถิ่นผสานกับองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัย ซึ่งจะใช้เป็นแนวทางของการพัฒนาต้นแบบผลิตภัณฑ์เชิงเภสัชบำบัดจากไพลดำ ได้แก่ ครีมนวด แผ่นเจล และเฝือกอ่อน สำหรับใช้ในชุมชนและสถานพยาบาลเพื่อรักษาผู้ป่วยในเบื้องต้น

ช่องทางติดต่อ

02 9046885 ต่อ 129

Aphinya.wongpia@gmail.com

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

Herbal hot compress ball

Langasuka

สารสำคัญในเหง้าไพลดำ 100 กรัม ประกอบด้วย

- น้ำมันหอมระเหย 0.25-0.65 มล.
- ซีรัมโบน (zerumbone) 31-53% ของสารสำคัญทั้งหมดที่พบในน้ำมันหอมระเหย มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ บรรเทาอาการปวด และป้องกันการสูญเสียมวลกระดูก
- ฟีนอลิกรวม 6.06-32.34 มก. และฟลาโวนอยด์รวม 0.52-5.24 มก. ซึ่งสารสำคัญ 2 กลุ่มนี้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลิตโดย
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ศูนย์วิจัยพืชสวนยะลา

กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

นวัตกรรมชุดตรวจ

ชุดตรวจสอบใบด่างมันสำปะหลัง RPA LFICS

ปิยนุช ศรชัย

นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย
อรุโณทัย ซาววา สทช.
ภูวนารถ มณีโชติ สอพ.
วันวิสา ศิริวรรณ์ มก.

ความเป็นมา

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย แต่มักประสบปัญหาโรคระบาดที่สำคัญคือโรคใบด่างมันสำปะหลัง ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส SLCMV สร้างความเสียหายอย่างมากให้กับเกษตรกร รวมถึงยังมีผลต่อเศรษฐกิจของประเทศ ในปัจจุบันกรมวิชาการเกษตรใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบโรคใบด่างมันสำปะหลังโดยใช้เวลารวมถึงการขนส่งจากพื้นที่เข้ามาเพื่อตรวจสอบอย่างน้อย 2 สัปดาห์ จึงเป็นที่มาของการวิจัยพัฒนาเทคนิคนี้ขึ้นเพื่อการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ ไม่ยุ่งยาก รวดเร็ว และแม่นยำสำหรับใช้ตรวจสอบเฝ้าระวังโรคดังกล่าวในพื้นที่ภาคสนามหรือห้องปฏิบัติการขนาดเล็กซึ่งการตรวจสอบต้นหรือท่อนพันธุ์ให้ปลอดโรคก่อนทำการเพาะปลูก โดยเทคนิค Recombinase Polymerase Amplification (RPA) และ PCR-Lateral flow เป็นเทคนิค PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ความจำเพาะต่อไวรัสและสามารถประยุกต์ใช้กับอุปกรณ์เครื่องมือที่มีราคาถูกระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณสั้นลง เจ้าหน้าที่ที่ตรวจสอบไม่ต้องมีความชำนาญและสามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่า

จุดเด่นของผลงาน

ชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างมันสำปะหลังโดยใช้เทคนิค RPA-LFICS เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการของการเพิ่มขยายจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าการทำด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจผลบนแผ่น Strip อีกทั้งสามารถตรวจสอบใบด่างมันสำปะหลังจำนวนมากได้ในเวลาที่รวดเร็วและในทุกส่วนที่มีดีเอ็นเอ เช่น ท่อนพันธุ์ และใบ

ประโยชน์ของผลงาน

สามารถใช้ในการป้องกันการแพร่กระจายของโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลังซึ่งช่วยร่นระยะเวลาจากการตรวจวิเคราะห์ใช้งานง่ายและสะดวก มีประสิทธิภาพ อีกทั้งสามารถตรวจสอบใบด่างมันสำปะหลังจำนวนมากได้ในเวลาที่รวดเร็วมีความเหมาะสมสำหรับการทำงานในห้องปฏิบัติการที่ยังไม่มีความพร้อมทางด้านเครื่องมือ อาทิ บริษัทผู้ผลิตอาหารแปรรูป และเกษตรกร

แนวทางการพัฒนาต่อยอด

ผลงานดังกล่าวเป็นต้นแบบสำหรับการผลิตเชิงการค้าต่อไปและสามารถนำมาเป็นพื้นฐานในการผลิตชุดตรวจสอบไวรัสอื่น ๆ ด้านการเกษตรได้ อาทิเช่น โรคกรีนนิ่งในตระกูลส้ม โรคไวรัสในมะละกอ เป็นต้น

ช่องทางติดต่อ

02 5791534-5

butakurogo
@hotmail.com

สำนักวิจัยพัฒนา
เทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร
50 ถ.พหลโยธิน
แขวงลาดยาว
เขตจตุจักร กรุงเทพฯ
10900

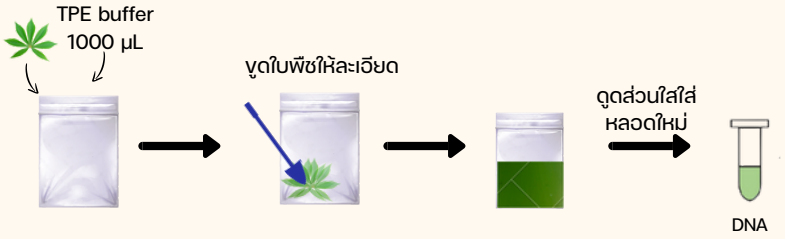
ชุดตรวจสอบใบด่างมันสำปะหลัง RPA LFICS

ชุดตรวจสอบใบด่างมันสำปะหลัง RPA LFICS

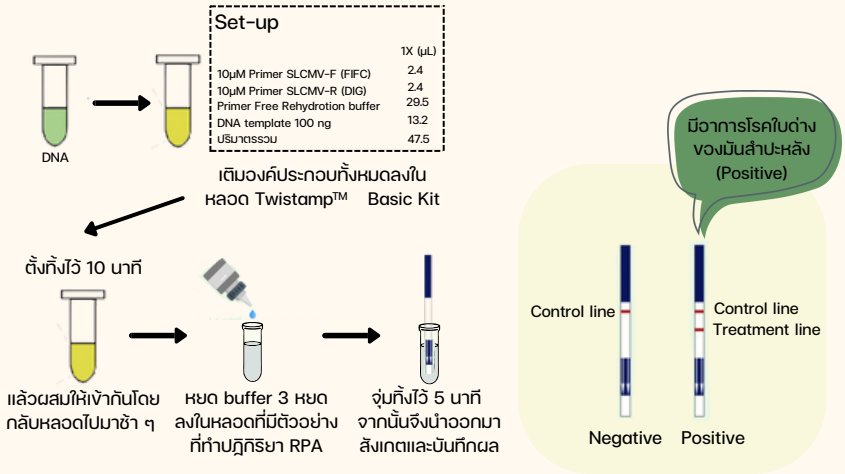
กรมวิชาการเกษตร

สกสว

ขั้นตอนการตรวจสอบ



การนำปฏิกิริยา RPA แบบ Simplex เพื่อใช้ในการตรวจสอบโรคใบด่างมันสำปะหลัง



กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
50 ถ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

ชุดตรวจสอบถั่วเหลืองโอลิอิคสูงปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิค LFICS

วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร

นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย
อรทัย ทาก้อม
ปิยนุช ศรชัย
พงศกร สรรค์วิทยากุล
อรุโณทัย ซาววา
ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์

ความเป็นมา

ปัจจุบันมีการพัฒนาและการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีปรับแต่งจีโนม (Genome editing) ทางการเกษตรในพืชหลากหลายชนิด สำหรับประเทศไทยยังไม่มีมาตรการในการควบคุมกำกับดูแลที่ชัดเจน การตรวจสอบพืชที่ได้รับการปรับแต่งยีนเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างพืชปกติและพืชที่ได้รับการปรับแต่งจีโนมจึงมีความสำคัญถั่วเหลืองเป็นพืชอุตสาหกรรมหลักชนิดหนึ่งที่ถูกนำเข้ามาในประเทศจำนวนมาก และใช้เป็นวัตถุดิบสำคัญในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ หลายชนิด เช่น น้ำมัน นมถั่วเหลือง เต้าหู้ ซอสถั่วเหลือง เป็นต้น โดยในปัจจุบันได้มีการพัฒนาปรับแต่งยีนถั่วเหลืองให้มีคุณสมบัติสามารถผลิตกรดโอลิอิกได้สูง เนื่องจากกรดโอลิอิคเป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่มีประโยชน์ต่อร่างกายช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและ มีแนวโน้มที่จะช่วยลดไขมันในเส้นเลือดด้วย แต่ทั้งนี้การตรวจสอบถั่วเหลืองที่ได้รับการปรับแต่งยีนยังคงมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลานานจึงมีการพัฒนาชุดตรวจนี้ขึ้นเพื่อลดระยะเวลาและขั้นตอนการตรวจ

จุดเด่นของผลงาน

เราได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบถั่วเหลืองที่ได้รับการปรับแต่งยีนให้ง่ายและรวดเร็วมากขึ้น โดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) และ LFICS (Lateral flow immuno-chromatographic strip) ซึ่งทำงานโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะกับยีน FAD2-1B ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดโอลิอิคร่วมกับการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนหรือระหว่างกรดนิวคลีอิก

ประโยชน์ของผลงาน

ชุดตรวจสอบถั่วเหลืองโอลิอิคสูงปรับแต่งจีโนมนี้มีข้อดีหลายประการ เช่น ค่าใช้จ่ายต่ำ ใช้ง่ายโดยไม่ต้องอาศัยความชำนาญ ลดเวลาในการตรวจสอบและสามารถทราบผลได้รวดเร็ว นอกจากนี้ยังสามารถใช้ชุดตรวจสอบนี้รองรับมาตรการในการควบคุมกำกับดูแลพืชปรับแต่งจีโนมของประเทศไทยในอนาคตได้อีกด้วย

แนวทางการพัฒนาต่อยอด

ผลงานนี้ เป็นต้นแบบสำหรับการผลิตเชิงการค้า โดยการพัฒนาชุดตรวจสอบถั่วเหลืองโอลิอิคสูงปรับแต่งจีโนมในขั้นตอนต่อไปจะพัฒนาให้ชุดตรวจสอบสามารถลดความยุ่งยากในขั้นตอน PCR และพัฒนาให้สามารถใช้ในภาคสนามที่มีตัวแปรทางด้านอุณหภูมิได้ เป็นต้น

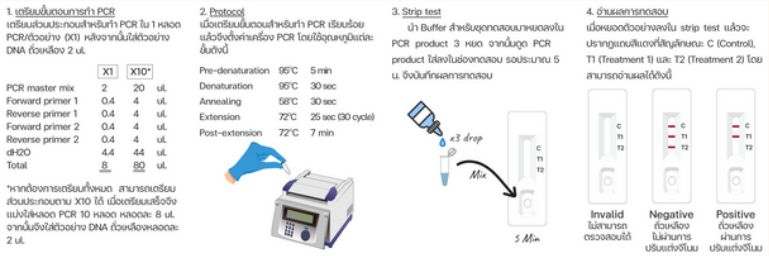
ช่องทางติดต่อ

02 5791534-5

weraouddy@hotmail.com

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร
50 ถ.พหลโยธิน
แขวงลาดยาว
เขตจตุจักร กรุงเทพฯ
10900

ชุดตรวจสอบถั่วเหลืองโอลีอิคสูงปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิค LFICS



1. เตรียมขั้นตอนการทำ PCR
เตรียมส่วนประกอบสำหรับทำ PCR ใน 1 หลอด PCR/ตัวอย่าง (X1) หลังจากนั้นใส่ตัวอย่าง DNA ตัวละลอง 2 uL

	X1	X10*	
PCR master mix	2	20	uL
Forward primer 1	0.4	4	uL
Reverse primer 1	0.4	4	uL
Forward primer 2	0.4	4	uL
Reverse primer 2	0.4	4	uL
dH2O	4.4	44	uL
Total	8	80	uL

*หากต้องการเตรียมทั้งหมด สามารถเตรียมส่วนประกอบตาม X10 ได้ เมื่อเตรียมเสร็จจึงแบ่งใส่หลอด PCR 10 หลอด หลอดละ 8 uL จากนั้นจึงใส่ตัวอย่าง DNA ตัวละลองหลอดละ 2 uL

2. Protocol
เมื่อเตรียมขั้นตอนสำหรับทำ PCR เรียบร้อยแล้วจึงตั้งค่าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิและขั้นตอนดังนี้

Pre-denaturation	95°C	5 min
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	58°C	30 sec
Extension	72°C	25 sec (30 cycle)
Post-extension	72°C	7 min

3. Strip test
นำ Buffer สำหรับชุดทดสอบมาหยดลงใน PCR product 3 หยด จากนั้นดูด PCR product ใส่ลงในช่องทดสอบ รอประมาณ 5 น. จึงบันทึกผลการทดสอบ

x3 drop
Mix
C
T1
T2
5 Min

4. อ่านผลการทดสอบ
เมื่อหยดตัวอย่างลงใน strip test แล้วจะปรากฏแถบสีแดงที่สัญลักษณะ C (Control), T1 (Treatment 1) และ T2 (Treatment 2) โดยสามารถอ่านผลได้ดังนี้

Invalid ไม่สามารถตรวจสอบได้
Negative ถั่วเหลืองไม่ผ่านการปรับแต่งจีโนม
Positive ถั่วเหลืองผ่านการปรับแต่งจีโนม

ชุดตรวจสอบถั่วเหลืองโอลีอิคสูงปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิค LFICS

สนับสนุนทุนวิจัย

กรมวิชาการเกษตร
สกสว

กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
50 ถ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

ชุดตรวจโลหะหนักในขมิ้นชันและไพล อย่างง่าย

อัจฉราพรรณ ใจเจริญ

นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย
ณัฏฐิรา แกล้วกล้าหาญ สวพ 3
ปราณี วรเนตรสุดาทิพย์ สวพ 3

ความเป็นมา

ขมิ้นชันมีสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านจุลินทรีย์ ต้านมะเร็ง เป็นต้น การที่พืชสมุนไพรจะมีฤทธิ์ในการรักษาที่ดีได้นั้นจะต้องเป็นสมุนไพรที่มีคุณภาพดีและปลอดภัยต่อการบริโภค โดยจากรายงานของสถาบันอาหารได้ทำการสุ่มตัวอย่างขมิ้นชันจากย่านการค้าในเขตกรุงเทพฯ พบมีการปนเปื้อนของโลหะหนัก 4 ชนิด ได้แก่ สารหนู แคดเมียม ตะกั่ว และปรอท การตรวจสอบสารตกค้างของสมุนไพรก่อนถึงมือผู้บริโภคจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของขมิ้นในอนาคต การตรวจสอบโลหะหนักในผลผลิตเป็นขั้นตอนที่จำเป็นของกระบวนการผลิตพืชปลอดภัย แต่เนื่องจากการตรวจด้วยวิธีละเอียด จะต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพงเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตพืชสมุนไพรของเกษตรกร

จุดเด่นของผลงาน

ชุดตรวจสอบโลหะหนัก(ตะกั่ว)ในขมิ้นชันและไพลอย่างง่าย สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง มีขั้นตอนการตรวจสอบและใช้สารเคมีน้อยลง ลดระยะเวลาการตรวจสอบเกษตรกรและเจ้าหน้าที่ภาคสนามยังสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยตัวเองและทราบผลในเวลาอันรวดเร็ว

ประโยชน์ของผลงาน

การใช้ชุดตรวจสอบโลหะหนัก(ตะกั่ว)ในขมิ้นชันและไพลอย่างง่ายนี้ ทำให้ลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการตรวจวิเคราะห์ เกษตรกรจึงมีต้นทุนการผลิตลดลง และยังทำให้พืชสมุนไพรมีความปลอดภัยตามมาตรฐานสากลประชากรสามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัยและมีคุณภาพ สามารถแข่งขันได้ในตลาดโลก

แนวทางการพัฒนาต่อยอด

การพัฒนาชุดตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป จะพัฒนาให้ชุดตรวจสอบตรวจสอบโลหะหนักได้หลากหลายชนิดในคราวเดียวกัน และพัฒนาชุดตรวจสอบให้ใช้กับเครื่องมือที่มีขนาดเล็กสามารถเชื่อมต่อกับสมาร์ทโฟนได้ เป็นต้น

ช่องทางติดต่อ

02 9046885 ต่อ 305

adcharapun1826@gmail.com

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

ชุดตรวจโลหะหนักในขมิ้นชันและไพล

อย่างง่าย

ชุดตรวจสอบตะกั่วในขมิ้นชันและไพลด้วยเทคนิค ELECTROCHEMICAL

กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์

ฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์

กรดอินโดลแอซีติก

นัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ

นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย
ภรณี สว่างศรี สทช.
รัติกาล ยุทธศิลป์ สวพ.3

ความเป็นมา

กรดอินโดลแอซีติก (Indole-3-acetic acid) เป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มสารออกซิน (Auxin) ทำหน้าที่กระตุ้นให้พืชเกิดการแบ่งตัวและยืดตัวของเซลล์ กระตุ้นการเกิดราก รวมทั้งส่งเสริมการเจริญเติบโต นอกจากตัวพืชเองแล้ว จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียบางชนิดในธรรมชาติก็สามารถสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกได้เช่นกัน

ผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์กรดอินโดลแอซีติกเป็นผลงานจากโครงการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งมีเป้าหมายพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติ และศึกษา การใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชเพื่อลดความเสียหายของผลผลิตจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่นภัยแล้งที่เกิดขึ้นบ่อยครั้งจากสภาวะภูมิอากาศแปรปรวนในปัจจุบัน

จุดเด่นของผลงาน

ผลิตภัณฑ์กรดอินโดลแอซีติกสารชีวภาพผลิตจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติซึ่งมีศักยภาพสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกนำมากระตุ้นการผลิตด้วยกรรมวิธีการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้ในปริมาณมากและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปผงแห้งที่เหมาะสมกับการเก็บรักษาและการนำไปใช้งาน

ประโยชน์ของผลงาน

ผลิตภัณฑ์กรดอินโดลแอซีติกสามารถละลายน้ำและใช้ฉีดพ่นเพื่อเร่งการเจริญเติบโตช่วยการติดดอกลดการหลุดร่วงของผล เมื่อพืชอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

สำหรับพริกและพืชตระกูลแตงใช้ฉีดพ่นในระยะเริ่มเป็นตุ่มดอกโดยทิ้งระยะห่างการพ่นทุก 10 -14 วัน สามารถใช้ร่วมกับปุ๋ยได้

แนวทางการพัฒนาต่อยอด

ผลิตภัณฑ์กรดอินโดลแอซีติกในรูปผงแห้งเป็นต้นแบบระดับภาคสนาม เทคโนโลยีการผลิตสามารถนำไปต่อยอดเพิ่มปริมาณการผลิตในระดับถังหมักขนาดใหญ่เพื่อขยายการใช้ประโยชน์ของกรดอินโดลแอซีติกในภาคการเกษตรไทยต่อไป

ช่องทางติดต่อ

02 9046886 ต่อ 412

lawa_w
@hotmail.com

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร
85 หมู่ 1 ต.รังสิต
อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี
12110

ฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์

กรดอินโดลแอซีติก

สารชีวภาพผลิตจากจุลินทรีย์
ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ
เพิ่มผลผลิต
เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

กรดอินโดลแอซีติก

ฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์

ประโยชน์
ช่วยเร่งการเจริญเติบโตพืช
ช่วยการติดดอก
ลดการหลุดร่วงของผล
ในสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม

เพิ่มขนาดผลพริก

ชุดควบคุม

กรดอินโดลแอซีติก 50 ug/ml

กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

สารชีวภาพควบคุมแอนแทรคโนส จากเทคโนโลยี RNAi

วรารัตน์ ศรีประพัฒน์

นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย
ภรณี สว่างศรี สทช.
ปิยนุช ศรชัย สทช.
วรากรณ์ เรือนแก้ว สวพ 5

ความเป็นมา

ปัญหาสำคัญของการปลูกพริกของไทยคือโรคแอนแทรคโนส ซึ่งทำให้ผลผลิตพริกต่อพื้นที่ลดลง ผลผลิตเกิดการเน่าเสียหาย ทำให้เกษตรกรขายผลผลิตได้ในราคาต่ำ จึงเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการส่งผลผลิตไปจำหน่ายทั้งตลาดภายในและต่างประเทศ

ผลิตภัณฑ์สารชีวภาพเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกจากเทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟียเรนซ์(RNAi) เป็นผลิตภัณฑ์อาร์เอ็นเอสายคู่(dsRNA) ที่สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์สามารถใช้เพื่อการควบคุมการเจริญของราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก โดย dsRNA จะไปรบกวนการทำงานที่ RNA ของราสาเหตุโรคพืช ทำให้เกิดการยับยั้งการถอดรหัส การแปรรหัส และการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม ส่งผลทำให้สามารถกำจัดราก่อโรคเป้าหมายได้ซึ่งเป็นทางเลือกในการปลูกพืชที่มีประสิทธิภาพปราศจากโรคและการปนเปื้อนของสารเคมีจากการควบคุมโรค

จุดเด่นของผลงาน

ผลิตภัณฑ์สารชีวภาพเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกจากเทคโนโลยี RNAi เป็นการป้องกันกำจัดโรคพืชแบบแม่นยำ (precision prevention) ซึ่งงานวิจัยได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีความคงทนเพื่อการใช้ในสภาพแวดล้อมจริง โดยตรึง dsRNA กับวัสดุอินทรีย์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีความคงทนมากขึ้นและมีระยะเวลาเพื่อควบคุมโรคยาวนานขึ้นเมื่อเทียบกับสารชีวภาพชนิดอื่นๆ

ประโยชน์ของผลงาน

ผลิตภัณฑ์สารชีวภาพเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกจากเทคโนโลยี RNAi ส่งเสริมการใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพทดแทนการใช้สารเคมีการเกษตร ผลผลิตที่ได้มีความปลอดภัยและมีคุณภาพสามารถแข่งขันได้ในตลาดโลก

แนวทางการพัฒนาต่อยอด

ต้นแบบสารชีวภาพเพื่อควบคุมโรคพืชจากเทคโนโลยี RNAi เมื่อผ่านการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพจะสามารถขยายผลโดยพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อใช้กำจัดโรคแอนแทรคโนสในพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ จึงเป็นแนวทางในการทดแทนหรือลดการใช้สารเคมีเกษตร

ช่องทางติดต่อ

02 9046885 ต่อ 230

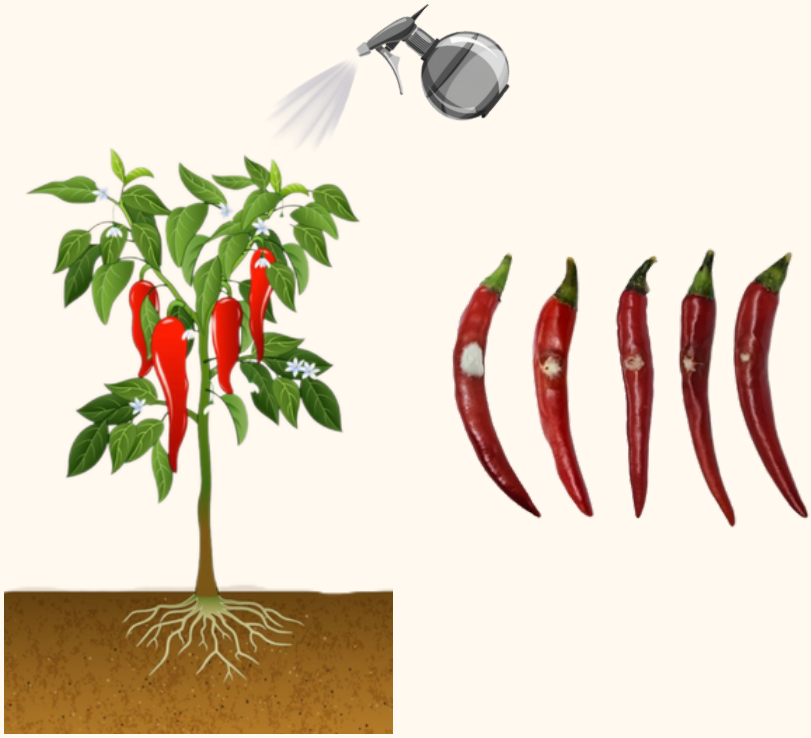
jankmutt@gmail.com

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร
85 หมู่ 1 ต.รังสิต
อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี
12110

สารชีวภาพควบคุมแอนแทรคโนส จากเทคโนโลยี RNAi

ต้นแบบผลิตภัณฑ์ dsRNA

สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์ สามารถใช้เพื่อควบคุมราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก



กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

เห็ดพันธุ์แนะนำ
กรมวิชาการเกษตร

เห็ดถั่วฝรั่งพันธุ์ กวก. สทช. 1

วราพร ไชยมา

นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมวิจัย
นายอนุสรณ์ วัฒนกุล สทช.
นางสาวภรณี สว่างศรี สทช.
นางสาวมนัสพร หนองดี สทช.
นางสาวอรพินท์ สุรกิจ สทช.
นางสาวสายพอง เจริญคุณ สทช.
นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ สทช.
นายกรกช จันทร ศวพ. ชม.

ความเป็นมา

เห็ดถั่วฝรั่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Coprinus comatus (O.F.Müll.:Fr.) Pers. ชื่อสามัญเรียกกันตามลักษณะที่ปรากฏของดอกเห็ด เช่น Shaggy mane หรือ chicken drumstick mushroom หรือ lawyer's wig เป็นต้น มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ และออสเตรเลีย จัดอยู่ในกลุ่มเห็ดเมืองหนาว (Temperate Mushrooms) ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (18 - 23 องศาเซลเซียส) จัดเป็นเห็ดที่ให้ผลผลิตสูง เป็นสายพันธุ์เห็ดแนะนำแก่เกษตรกรผู้เพาะเห็ดเมืองหนาวเป็นการค้า และเป็นการเพิ่มชนิดเห็ดใหม่ ให้แก่ตลาดสินค้าเกษตรและผู้บริโภค

จุดเด่นของผลงาน

1. ให้ผลผลิตสูงเฉลี่ย 2,557.10 กรัมต่อตะกร้า
2. ให้ผลผลิตสูงเฉลี่ย 3,040 กรัมต่อตารางเมตร เมื่อเพาะในระบบเปิดแบบเพาะชั้น ช่วงอุณหภูมิ 18 - 23 องศาเซลเซียส
3. ดอกมีขนาดใหญ่ น้ำหนักเฉลี่ย 35.0 - 55.0 กรัมต่อดอก

ประโยชน์ของผลงาน

สามารถให้บริการจำหน่ายเชื้อพันธุ์เห็ดถั่วฝรั่งสายพันธุ์ Comatus3 ในรูปแบบแม่เชื้อบริสุทธิ์ได้ปีละ 500 ขวด (ตัวอย่างพันธุ์) สามารถขอรับบริการเชื้อพันธุ์ได้ที่กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร โทรศัพท์ 02-579-0147

ช่องทางติดต่อ

02 5614576

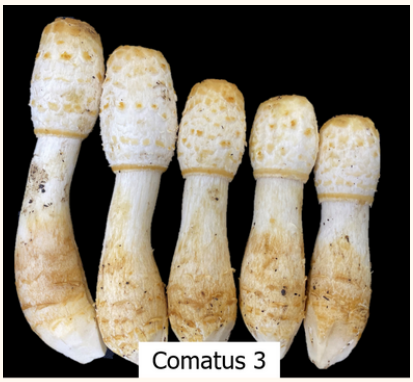
varapornc18@gmail

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

แนวทางการพัฒนาต่อยอด

ขยายผลการใช้ประโยชน์จากสายพันธุ์เห็ดถั่วฝรั่ง กวก. สทช. 1 ในแปลงเกษตรกรต้นแบบ 3 กลุ่ม คือ เกษตรผู้เพาะเห็ดแชมปิญอง อำเภอเวียงป่าเป้า เห็ดหอม อำเภอแม่สาย และเห็ดโคนน้อย เห็ดฟาง อำเภอเทิง จังหวัดเชียงราย ให้สามารถผลิตเห็ดถั่วฝรั่งควบคู่ไปกับ เห็ดเดิมที่มีการผลิตอยู่แล้วเพื่อเป็นการเพิ่มรายได้และเพิ่มความหลากหลายของเห็ดในท้องตลาด

เห็ดถั่วฝรั่งพันธุ์ กวก. สทช. 1



เห็ดถั่วฝรั่ง
กวก. สทช. 1

กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
50 พหลโยธิน เขตจตุจักร แขวงลาดยาว กรุงเทพมหานคร
10900

เห็ดภูฏานลูกผสมพันธุ์ กวก. สทช. 1

ความเป็นมา

"เห็ดภูฏานลูกผสมพันธุ์กวก.สทช.1" เกิดจากจากการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการ Di-mon mating โดยทำการผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยนิวเคลียสคู่ (Dikaryon) ของเห็ดภูฏาน 3 (P3) สายพันธุ์แม่ซึ่งเป็นสายพันธุ์ให้บริการของกรมวิชาการเกษตรกับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryon) ของเห็ดภูฏานสายพันธุ์พ่อ รหัส 40-085 จากศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย (รหัสการทดลอง A16-SB24) โดยสายพันธุ์แม่ที่มีลักษณะเด่นคือ ดอกเห็ดมีสีเทา ดอกใหญ่ สายพันธุ์พ่อมีลักษณะเด่นคือดอกสีครีมเส้นใยเจริญเร็วออกดอกถี่ทั้งนี้ได้ทำการเพาะทดสอบเห็ดภูฏานลูกผสมสายพันธุ์P3XSB24เปรียบเทียบกับเห็ดภูฏาน-3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิมและเห็ดภูฏานลูกผสม อีก 17 สายพันธุ์ ในพื้นที่กรุงเทพฯและคัดเลือกเห็ดภูฏานลูกผสม P3XSB24 ไปเพาะเลี้ยงที่ศูนย์ศึกษาและศูนย์เครือข่ายโครงการอันเนื่อง มาจากพระราชดำริ 3 แห่ง และขยายผลการใช้สายพันธุ์เห็ดภูฏานลูกผสม P3XSB24 ให้แก่เกษตรกรต้นแบบในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่อง มาจากพระราชดำริจังหวัดสกลนครจำนวน4รายประเมินความพึงพอใจของเกษตรกรจนสามารถออกพันธุ์เห็ดแนะนำของกรมวิชาการเกษตร คือ "เห็ดภูฏานลูกผสมพันธุ์ กวก. สทช. 1 "

รัชฎาภรณ์ ทองเหม

นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

น.ส.ภรณี สว่างศรี	สทช.
น.ส.มนัสพร หนองดี	สทช.
นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	สทช.
น.ส.ธาริณี สุโกมล	สทช.
นายศรีรัตน์ บุพโต	ศวพ.สุรินทร์
นายพัทยา เทพเดช	ศวพ.บุรีรัมย์
น.ส.รันย์ชนก นาไต้	ศูนย์บริการการพัฒนาปลวกแดงตามพระราชดำริฯ
นางสุวลักษณ์ ชัยชูโชติ	ข้าราชการบำนาญ
นายดนัย นาคประเสริฐ	ข้าราชการบำนาญ
นายอานันท์ เลิศรัตน์	ข้าราชการบำนาญ
นายอุปถัมภ์ อุ่นใจ	ข้าราชการบำนาญ

จุดเด่นของผลงาน

1. ให้น้ำหนักผลผลิตเฉลี่ย 152.68 กรัม/ถุงอาหารเพาะ (800 กรัม)/รอบการผลิต 2 เดือน สูงกว่าเห็ดภูฏาน-3 สายพันธุ์เดิม ซึ่งให้น้ำหนักผลผลิตเฉลี่ย 127.88 กรัม/ถุงอาหารเพาะ คิดเป็น 19.39 เปอร์เซ็นต์
2. ดอกเห็ดมีสีเทา ออกดอกเป็นกลุ่ม 2-13 ดอก/ช่อ มีขนาดตรงตามเกณฑ์มาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง เห็ดสกุลนางรม (มกษ.1514 - 2555) โดยมีขนาดดอกเห็ดอยู่ในรหัสขนาด 1 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่า 7 ซม. และรหัสขนาด 2 เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.60 - 7.00 ซม.

ประโยชน์ของผลงาน

กรมวิชาการเกษตร มีแผนการผลิตและจำหน่ายเชื้อพันธุ์เห็ดภูฏานลูกผสมพันธุ์ กวก. สทช. 1 ในรูปแบบแม่เชื้อบริสุทธิ์ได้ปีละ 500 ขวด (ตัวอย่างพันธุ์) โดยขอรับบริการเชื้อพันธุ์เห็ดได้ที่กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร โทรศัพท์ 02- 5790147

แนวทางการพัฒนาต่อยอด

1. กรมวิชาการเกษตร หน่วยงานวิจัยอื่น ๆ และสถาบันการศึกษา สามารถนำพันธุ์เห็ดภูฏานลูกผสมพันธุ์ กวก. สทช. 1 ไปต่อยอดเพื่อสร้างนวัตกรรมด้านต่าง ๆ อันจะเป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจในอนาคต
2. นักปรับปรุงพันธุ์เห็ดสามารถนำวิธีการ Di-Mon mating ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดชนิดอื่น ๆ ได้

ช่องทางติดต่อ

02 5790147

annethong80@gmail.com

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 50 ถ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

เห็ดภูฏานลูกผสมพันธุ์ กวก. สทช. 1

เห็ดภูฏานลูกผสม พันธุ์ กวก. สทช. 1

กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
50 ถ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพ 10900

คณะผู้จัดทำ

1. นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ	ประธานคณะทำงาน
2. นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ	คณะทำงาน
3. นายพยุงศักดิ์ รวยอารี	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ	คณะทำงาน
4. นางสาวจีราพร แก่นทรัพย์	นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ	คณะทำงาน
5. นางสาวปาริฉัตร สังข์สะอาด	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	คณะทำงาน
6. นางสาวชลลดา สามพันพวง	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	คณะทำงาน
7. นางสาวปิยนุช ศรชัย	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	คณะทำงาน
8. นางสาวรัชฎาภรณ์ ทองเหม	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	คณะทำงาน
9. นางประกาย อ่อนวิมล	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	คณะทำงาน
10. นางสาวอภิญญา วงศ์เปี้ย	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	คณะทำงาน
11. นางสาวรังสิมันตุ์ ธีระวงศ์ภิญโญ	นักวิชาการโรคพืชปฏิบัติการ	คณะทำงาน
12. นางสาวดวงรัตน์ จริยาจิรวัฒนา	นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ	คณะทำงาน
13. นางสาวพิมพ์ประไพ บุษยวรพัฒน์	นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ	คณะทำงาน
14. นางสาววรารัตน์ ศรีประพัฒน์	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	คณะทำงานและเลขานุการ
15. นางสาววัชรินทร์ ศรีประยูร	เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป	คณะทำงาน

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
Biotechnology Research and Development Office,
Department of Agriculture.