

GM Papaya DNA Scan: ระบบการตรวจคัดกรองมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

สำหรับอุตสาหกรรมแปรรูปเพื่อการส่งออก

GM Papaya DNA Scan: A genetically modified papaya screening system for the processing industry for export

ปิยนุช ศรชัย¹, วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร¹, พิชชาพร วรรณนิธิกุล¹, ดวงรัตน์ จริยาจิรวัฒนา¹, อรุโณทัย ซาวว้า¹ และ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์¹
Piyanuch Sornchai¹, Weerasak Pitaksaringkarn¹, Pitchaporn Wannitikul¹, Duangrath Jariyajirawattana¹,
Aroonothai Sawwa¹ and Piyarat Thammakijawat¹

บทคัดย่อ

อุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้ส่งออกประสบปัญหาตรวจพบการปะปนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ทำให้เกิดการตีกลับสินค้าจากประเทศปลายทาง ส่งผลต่อเกษตรกร ผู้ส่งออก หรือ ผู้ประกอบการภาคอุตสาหกรรมของประเทศไทยจำเป็นต้องทำการตรวจคัดกรองมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมก่อนการส่งออก ทั้งนี้การตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งใช้ระยะเวลา 3-5 วัน ค่าใช้จ่ายเฉลี่ย 2,500 บาทต่อตัวอย่าง คณะผู้วิจัยได้วิเคราะห์กระบวนการผลิตผลไม้แปรรูปเพื่อหาขั้นตอนที่ต้องตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (GMOs) และพัฒนาชุดตรวจสอบ GMOs สำหรับตรวจวิเคราะห์ GMOs จากต้นมะละกอในแปลงปลูกผลสด และ ผลิตภัณฑ์แปรรูปก่อนการส่งออก โดยผลการศึกษา พบว่า กระบวนการที่โรงงานตรวจคัดแยกมะละกอ GMOs แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนได้แก่ ผลสดก่อนส่งเข้าโรงงาน และผลิตภัณฑ์ก่อนส่งออก โดยจุดที่มีความเสี่ยงอาจหลุดรอดของมะละกอ GMOs ได้แก่ การคัดแยกผลมะละกอเพื่อส่งตรวจ GMOs ก่อนการแปรรูป ซึ่งเป็นการรวมตัวแทนผลมะละกอที่เจาะด้วยหลาวขนาดใหญ่จากหลายแหล่ง ทั้งนี้เนื่องมาจากค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ GMOs สูง คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาอุปกรณ์เจาะเก็บเนื้อมะละกอรูปทรงหลาวขนาด 7 มม. วัสดุสแตนเลสเกรดอุตสาหกรรมอาหาร พัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์ GMOs เพื่อลดค่าใช้จ่ายการตรวจวิเคราะห์ของโรงงาน ประกอบด้วย ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืชอย่างง่ายและชุดตรวจวิเคราะห์การดัดแปลงพันธุกรรมมะละกอใช้เทคนิคเปเปอร์โครมาโทกราฟีฟิโตทาบอทไฮบริโดเซชัน (PACHA) ซึ่งมีราคาเฉลี่ย 24.76 และ 75 บาท ต่อตัวอย่างตามลำดับ ทั้งนี้สามารถอ่านผลวิเคราะห์ GMOs ด้วยตาเปล่า โดยหากมีการปะปนมะละกอ GMOs จะเกิดจุดสีม่วง และถ้าไม่มีการปะปนจะไม่พบจุดสี สำหรับอุปกรณ์เจาะเก็บเนื้อมะละกอ ชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย และชุดตรวจสอบ PACHA ได้รับการจดอนุสิทธิบัตรในปี 2566 จากกรมทรัพย์สินทางปัญญา โดยชุดตรวจสอบดังกล่าวช่วยลดค่าใช้จ่ายได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ GMOs ได้ 86 เปอร์เซ็นต์ ทำให้บริษัทลดการตีกลับสินค้าเกษตรได้ นอกจากนี้ยังสามารถขยายผลกับการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดอื่นๆ ได้

คำสำคัญ : มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม, เทคนิคเปเปอร์โครมาโทกราฟีฟิโตทาบอทไฮบริโดเซชัน, ชุดตรวจสอบ, ดีเอ็นเอ

¹กองวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

¹Biotechnology Research and Development Division, Department of Agriculture

ABSTRACT

The fruit processing industry for export has faced problems related to the detection of genetically modified (GM) papaya contamination, resulting in product rejection by importing countries. This situation has adversely affected Thai farmers, exporters, and industrial operators. Consequently, Thailand is required to implement screening for genetically modified papaya prior to export. Currently, the detection of genetically modified organisms (GMOs) using real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) requires 3–5 days per analysis, with an average cost of approximately 2,500 THB per sample. To address these limitations, the research team conducted an analysis of fruit-processing production chains to identify critical control points requiring GMO testing and subsequently developed a GMO detection system applicable to papaya plants in cultivation fields, fresh fruits, and processed products prior to export. The study revealed that GMO screening within processing facilities is generally conducted at two stages: (1) fresh fruits before entering the processing plant and (2) finished products prior to export. A critical risk point for GMO papaya contamination was identified during the sampling process for GMO testing before processing. At this stage, representative samples are collected from multiple sources using large coring probes, which may increase the likelihood of undetected GMO contamination. Furthermore, the high cost associated with conventional GMO analysis presents an additional challenge. To overcome these constraints, the research team developed a 7-mm stainless-steel papaya flesh sampling probe manufactured from food-grade industrial stainless steel. In addition, a cost-effective GMO detection platform was established, comprising a simplified plant DNA extraction kit and a genetically modified papaya detection kit based on Paper Chromatography Dot Blot Hybridization Assay (PACHA). The average costs of the DNA extraction kit and PACHA detection kit were 24.76 THB and 75 THB per sample, respectively. The PACHA assay enables direct visual interpretation without the need for specialized instrumentation. The presence of GM papaya contamination is indicated by the appearance of a purple-colored dot, whereas no colored dot is observed in non-GM samples. The papaya flesh sampling device, simplified DNA extraction kit, and PACHA detection kit were granted petty patents by the Department of Intellectual Property of Thailand in 2023. The developed technology reduced GMO testing costs by up to 80% and shortened analysis time by 86% compared with conventional methods. As a result, participating companies were able to significantly reduce the risk of export shipment rejection. Furthermore, the technology has the potential to be adapted and applied for the detection of genetic modification in other crop species.

Keywords: GM papaya, PACHA technique, Test kit, DNA

คำนำ

สืบเนื่องจากอุตสาหกรรมแปรรูปมะละกอของประเทศไทย ได้รับความเสียหายจากการตรวจพบการปนเปื้อนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์แปรรูปมะละกอที่ส่งออก อาทิ มะละกอแช่อิ่มอบแห้ง มะละกอในน้ำเชื่อมบรรจุกระป๋อง ทำให้สินค้าถูกปฏิเสธการนำเข้า ส่งผลกระทบต่อภาคเกษตรกรรม ภาคอุตสาหกรรม และการส่งออกเป็นอย่างมาก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้ออกประกาศให้มะละกอเป็นพืชควบคุมเฉพาะ ต้องผ่านการตรวจวิเคราะห์ก่อนการส่งออกไปสหภาพยุโรป นอร์เวย์ สมาพันธรัฐสวิส สาธารณรัฐไอซ์แลนด์ สาธารณรัฐประชาชนจีน และประเทศญี่ปุ่น จากปัญหาดังกล่าวส่งผลกระทบต่อผู้ประกอบการส่งออกมะละกอผลสด และผู้ประกอบการอุตสาหกรรมผลิตผลไม้แปรรูป ซึ่งทางห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม กองวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ได้รับการติดต่อจากทางบริษัท สามร้อยยอด จำกัด ซึ่งได้รับผลกระทบอย่างมาก เนื่องจากตลาดส่งออกที่สำคัญของผลไม้แปรรูปคือประเทศญี่ปุ่น ซึ่งผู้เชี่ยวชาญจากประเทศญี่ปุ่นได้เสนอแนวทางการควบคุมการปนเปื้อนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม โดยกำหนดให้บริษัทฯ ต้องตรวจมะละกอทุกต้นจากแปลงปลูกที่ผลิตส่งโรงงาน และก่อนการแปรรูปต้องสุ่มตรวจผลมะละกอดีดสุกที่นำมาใช้ในการผลิตก่อนการแปรรูป จากมาตรการดังกล่าวทำให้ผู้ประกอบการต้องมีต้นทุนเพิ่มขึ้นในการเก็บตัวอย่างจากแปลงผลิตรวบรวมส่งเข้าห้องปฏิบัติการภาคเอกชนตรวจวิเคราะห์ และต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR มีค่าใช้จ่ายสูง ๒,๕๐๐- ๓,๐๐๐ บาท/ตัวอย่าง ใช้เวลาอย่างน้อย ๕-๗ วัน ทำให้ต้องเก็บรวมตัวอย่างจำนวน ๓๐๐-๗๐๐ ใบต่อหนึ่งตัวอย่างหรือมากกว่า และการตรวจวิเคราะห์ผลมะละกอที่ส่งเข้าโรงงานเจ้าหน้าที่ของโรงงานต้องเจาะผลมะละกอที่ส่งเข้ากระบวนการเพื่อเก็บรวมตัวอย่าง ๓๐๐-๕๐๐ ผลหรือมากกว่า จากนั้นจึงสามารถเข้าสู่กระบวนการผลิตโดยต้องแช่เนื้อมะละกอในสารเคมีเพื่อรอผลวิเคราะห์ปลอด GM คัดแยกกลุ่มที่ตรวจไม่พบก่อนเข้าสู่กระบวนการนำไปแปรรูป ซึ่งการดำเนินการดังกล่าวนอกจากส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตแล้ว หลายครั้งเกิดความคลาดเคลื่อนของผลการทดสอบเนื่องจากการรวมตัวอย่างจำนวนมากมีผลต่อความไวและความถูกต้องของผลทดสอบ คณะผู้วิจัยได้ร่วมประชุมและสำรวจพื้นที่กับคณะทำงานของบริษัทสามร้อยยอด จำกัด และกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกมะละกอเพื่อประสานความร่วมมือและหาแนวทางในการแก้ไขปัญหาวิธีในการลดต้นทุนการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่มีต้นทุนต่ำ ประสิทธิภาพสูง และใช้งานได้ง่าย โดยเกษตรกรและเจ้าหน้าที่ของโรงงานสามารถทดสอบได้เอง จึงเป็นที่มาของการพัฒนากระบวนการตรวจคัดแยกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสำหรับอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้ไทย

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การพัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพการสุ่มตัวอย่าง

ตามที่ผู้ประกอบการได้ดำเนินการสุ่มตรวจมะละกอก่อนการส่งออกในทุกขั้นตอนการผลิตแต่อย่างไรก็ตามยังพบการแจ้งเตือนเรื่องการปนเปื้อนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในสินค้ามะละกอส่งออกในทุกๆ ปี ดังนั้นการวิเคราะห์กระบวนการผลิตผลไม้แปรรูปเพื่อการส่งออกจึงเป็นแนวทางเริ่มต้นที่ควรดำเนินการ เพื่อหาจุดเสี่ยงที่ส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยของการปนเปื้อนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

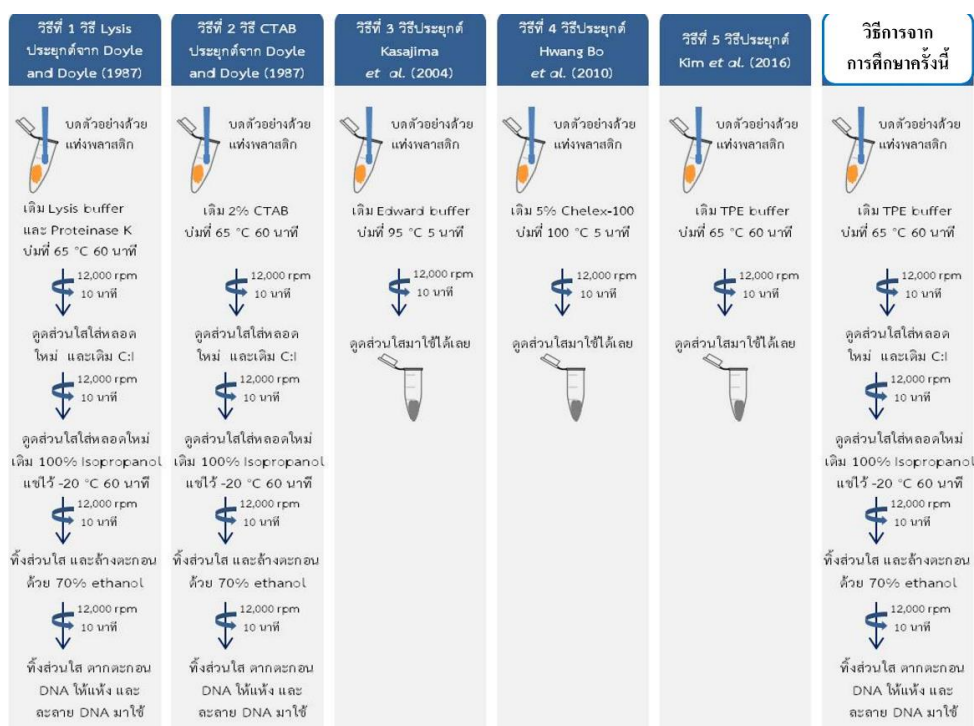
2.การพัฒนาชุดตรวจสอบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อตรวจสอบผลสดและผลิตภัณฑ์แปรรูป

2.1 การพัฒนาชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้ร่วมกับชุดตรวจสอบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

การทดสอบและพัฒนาชุดสกัดดีเอ็นเอจากการสกัดดีเอ็นเอ 6 วิธีคือ 1) วิธี Lysis ประยุกต์จากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) 2) วิธี CTAB ประยุกต์จากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) 3) วิธีประยุกต์ของ Kasajima และคณะ (2004) 4) วิธีประยุกต์ของ Hwang Bo และคณะ (2010) 5) วิธีการประยุกต์ Kim และคณะ (2016) และ 6) วิธีการประยุกต์จากการศึกษาครั้งนี้ (ภาพที่1) โดยนำดีเอ็นเอที่ได้ตรวจสอบด้วยยับยั้งปฏิกิริยา (Inhibitor) ที่จำเพาะต่อยีน papain gene ด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR คือในส่วนผสม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Sybergreen buffer 0.25 μ M forward และ reverse ไพรมเมอร์ ของทั้งสามยีน และ 0.25 pmol probe ของทั้งสามยีน แล้วเติมดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม นำส่วนผสมปฏิกิริยาไปใส่เครื่อง Real-time PCR รุ่น Lightcycler408 และกำหนดอุณหภูมิโดยใช้โปรแกรมดังนี้

initial PCR activation step ที่ 95°ซ นาน 10 นาที
2 step cycling จำนวน 40รอบ กำหนดอุณหภูมิดังนี้
denature ที่ 95°ซ นาน 15วินาที
annealing and extension ที่ 60°ซ นาน 60วินาที
cooling ที่ 40°ซ นาน 30 วินาที

นำค่า Ct ของแต่ละยีนมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนวิเคราะห์ผล สรุปผลการเกิดสารยับยั้งของวิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีต่างๆเทียบกับ 2 วิธีมาตรฐาน (CTAB และ Lysis)



ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงกระบวนการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชด้วยวิธีที่ 1 ถึงวิธีที่ 6

2.2 การพัฒนาชุดตรวจสอบภาคสนามมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Modified PACHA

การพัฒนาชุดตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคเปเปอร์โครมาโทกราฟีไดโอดไฮบริดเซชัน (Paper Chromatography Dot Bot Hybridization Assay หรือ พาช่า(PACHA) ซึ่งเป็นการรวมเทคนิคเปเปอร์โครมาโทกราฟี (Paper Chromatography) และ เทคนิค ดีเอ็นเอไฮบริดเซชัน DNA hybridization) เข้ามารวมกันซึ่งมีหลักการทำงานคือนำสารพันธุกรรมดีเอ็นเอจากพืชที่สกัดได้มาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose strip) ภายหลังที่ตรึงสารพันธุกรรมดีเอ็นเอแล้ว จากนั้นทำการแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสลงในสารละลายไฮบริไดซ์ (hybridize) ซึ่งประกอบไปด้วยตัวตรวจสอบ (probe) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรมซึ่งในขั้นตอนนี้จะเกิดปฏิกิริยาไฮบริด (hybridization) มีการเข้าคู่กันระหว่างสายสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของพืชที่มีลำดับเบสคู่สมกับตัวตรวจสอบ (probe) ที่ได้มีการออกแบบไว้ และหลังจากนั้นจะมีการเข้าคู่กันของตัวติดตามตัวตรวจสอบ (anti-dig) กับ ตัวตรวจสอบ (probe) ที่มีสารตรวจสอบ (dig-label) และตรวจสอบผลการไฮบริด (hybridization) ด้วยเทคนิคการตกตะกอนสี (color precipitation) โดยใช้สารเคมีเอ็นบีทีบีซีพี(NBT/BCIP) ซึ่งมีความสามารถในการเข้าคู่กับตัวติดตามตัวตรวจสอบ และถ้าเป็นพืชดัดแปลงพันธุกรรมจะปรากฏเป็นจุดม่วง แต่พืชที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรมจะไม่ปรากฏสี ทำให้สามารถคัดแยกพืชที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรมได้

2.2.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค PACHA

ดำเนินการ 1) ทดสอบความจำเพาะของ probe ที่ใช้ในการตรวจสอบยีน 35SCaMV promoter และ Nos terminator 2) ทดสอบขั้นตอนที่เหมาะสมของเทคนิค PACHA ได้แก่ อุณหภูมิ hybridize (อุณหภูมิห้อง, 45 และ 60 องศาเซลเซียส) เวลาที่เหมาะสมในขั้นตอน hybridize (15, 30 และ 60 นาที) อุณหภูมิสำหรับการล้างและ block หลังจาก hybridize (อุณหภูมิห้อง และ 60 องศาเซลเซียส) และเวลาสำหรับการล้างและ block หลังจาก hybridize (15 และ 30 นาที) รวบรวมผล วิเคราะห์ผลและสรุปผลการทดสอบ เพื่อเป็นต้นแบบของชุดตรวจสอบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมจากเทคนิค PACHA ต่อไป

2.2.2 การพัฒนาเทคนิคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ PACHA ในการคัดแยกมะละกอที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรมจากผล การแก้ไขปัญหาของชุดตรวจ PACHA ที่พัฒนาขึ้นซึ่งพบว่าการเกิดสัญญาณล่าช้าทำให้ระยะเวลาของชุดตรวจสอบนานขึ้นทั้งนี้เนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น ความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากผลมะละกอที่สกัดได้จากชุดสกัดดีเอ็นเอมีความเข้มข้นต่ำและมีสารยับยั้ง (inhibitor) ที่ขัดขวางการตรวจจับของ probe จึงทำให้การตรวจจับมีประสิทธิภาพลดลง ส่งผลต่อระยะเวลาในการแสดงผลของชุดตรวจสอบ ดังนั้นเพื่อเพิ่มความไวให้กับชุดตรวจสอบ PACHA และลดระยะเวลาในการตรวจสอบโดยยังคงหลักการคือ สามารถใช้ในภาคสนามและไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์หรือสารเคมีจำนวนมากหรือมีราคาแพง โดยเมื่อวิเคราะห์สาเหตุที่แท้จริงของปัญหาดังกล่าวพบว่ามี 2 ขั้นตอนที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ PACHA คือ 1) การเพิ่มประสิทธิภาพจากการเพิ่มปริมาณยีนให้มีปริมาณมากขึ้นด้วยเทคนิค PCR และ 2) การเพิ่มประสิทธิภาพจากการลดขั้นตอนหรือลดระยะเวลาในกระบวนการ PACHA ดั้งเดิม (ลดระยะเวลา/ลดจำนวนครั้ง)

2.2.3 การทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบ Mo. PACHA ในการคัดแยกมะละกอที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรมจากผล (Method Validation)

การพัฒนาชุดตรวจสอบ Mo.-PACHA ให้ได้มาตรฐานมีความจำเป็นต้องทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบดังกล่าวก่อนการนำไปใช้จริง โดยการศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบดังนี้ การตรวจสอบความจำเพาะ การตรวจสอบขีดจำกัดของการปนเปื้อนที่ต่ำที่สุด การตรวจสอบความแม่นยำ ความเที่ยงตรง และความสามารถในการทวนซ้ำได้และความแข็งแกร่งของชุดตรวจสอบ Mo. PACHA ด้วยการตรวจสอบทั้ง 4 ยีน ได้แก่ CaMV 35S promoter, Nos terminator, *np11* และ *papain*

2.2.4 การทดสอบชุดตรวจสอบ Mo. PACHA ในระดับภาคสนาม

การนำชุดตรวจสอบ Mo. PACHA มาขยายผลในระดับภาคสนาม โดยพื้นที่ศึกษาคือ บริษัทสามร้อยยอด จำกัด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เปรียบเทียบความถูกต้องของชุดตรวจสอบ Mo. PACHA ด้วยเทคนิค Tetraplex Real-time PCR (Somchai *et al.*, 2020) ที่ตรวจวิเคราะห์ยีน CaMV 35S promoter, Nos terminator และ *np11* ร่วมกับยีนอ้างอิงมะละกอ *papain* ในปฏิกิริยาเดียวกัน ทำการเก็บบันทึกข้อมูลของค่า Crossing threshold (Ct) ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง แล้วนำมาหาค่า False negative rate และ False positive rate ตามวิธีของ Broeder *et al.* (2014)

2.2.5 การพัฒนาชุดตรวจสอบ Mo. PACHA เชิงพาณิชย์

การพัฒนาปรับปรุงผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์โดยแบ่งเป็นชุด Mo. PACHA สำหรับตรวจได้ครั้งละ 20 ตัวอย่าง ต่อชุด ศึกษารายละเอียดดังต่อไปนี้ 1) การออกแบบผลิตภัณฑ์และบรรจุภัณฑ์ของชุดตรวจสอบที่มีหลากหลายส่วนประกอบที่สำคัญ วิธีการใช้งานให้เหมาะสมและง่ายต่อการใช้งาน 2) การศึกษาความคงสภาพและการกำหนดวันหมดอายุของผลิตภัณฑ์ และวิธีการเก็บรักษายังคงรักษาสภาพของน้ำยาและสารเคมีในการตรวจสอบได้ โดยทำการศึกษา 3 ปัจจัย ดังนี้ อุณหภูมิ ระยะเวลา และสถานะของสารละลายไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบให้เป็นสภาพของแข็ง เมื่อครบกำหนดเวลา ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน CaMV 35S promoter, Nos terminator, *np11* และ *papain* ด้วยชุดตรวจสอบ Mo. PACHA ตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบจากการเกิด False Positive และ False Negative ของสัญญาณ ดำเนินการคำนวณต้นทุนค่าใช้จ่าย และผลกำไร เพื่อกำหนดราคาขาย

2.3 การขอถืออนุสิทธิบัตร

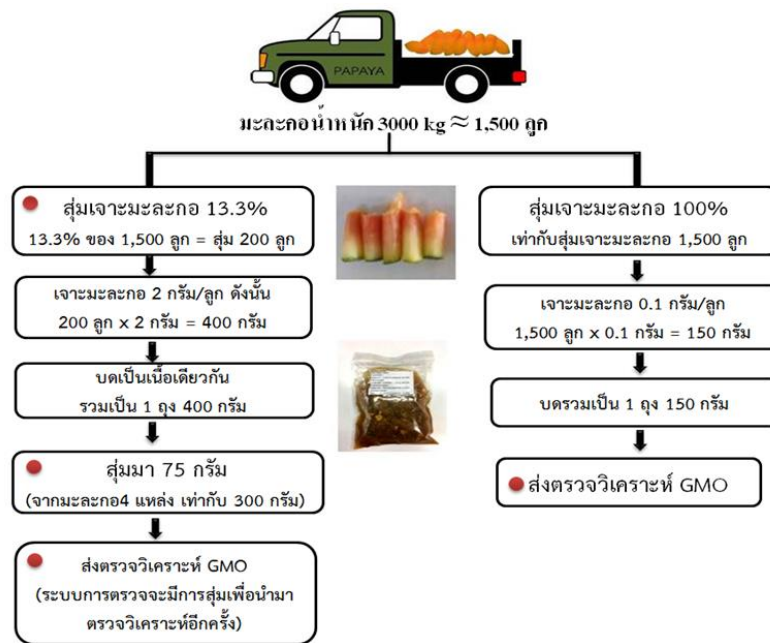
ดำเนินการยื่นขอรับความคุ้มครองทางด้านทรัพย์สินทางปัญญา โดยการจัดเตรียมเอกสารดังนี้ 1) องค์ความรู้เบื้องต้น 2) สารสำคัญในการประดิษฐ์ 3) ผลการทดสอบ 4) การสืบค้นงานวิจัยที่ซ้อนทับกัน ทั้งนี้ได้ดำเนินการยื่นขออนุสิทธิบัตร หลาวเจาะผลมะละกอ ชุดสกัดดีเอ็นเอ ชุดตรวจสอบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม Mo.PACHA

ผลการดำเนินงาน

1. การพัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพการสู่มะละกอย่าง

ผู้ประกอบการผลิตผลไม้แปรรูป บริษัท สามร้อยยอด จำกัด ใช้แนวทางควบคุมการปนเปื้อนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม โดยกำหนดให้มีการสุ่มตรวจมะละกอ 13.3% จากหนึ่งคันรถซึ่งมีประมาณ 1,500 ผล น้ำหนักโดยประมาณ 3,000 กิโลกรัม การสุ่ม 13.3% เท่ากับมะละกอ 200 ลูก ทำการเจาะด้วยหลาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร และตัดเนื้อมะละกออกเป็นชิ้นเล็กหนักประมาณ 2 กรัมต่อลูกรวมเป็น 400 กรัม ปั่นบดมะละกอรวมกันทั้งหมด และสุ่มมา 75 กรัม จากนั้นนำมะละกอที่บดไปรวมกับมะละกอที่เก็บด้วยกระบวนการเดียวกันจากผลผลิตของเกษตรกรอื่นอีก 4 แหล่งที่ทำการสุ่ม 13.3% ในลักษณะเดียวกัน จนได้เนื้อมะละกอรวม 300 กรัม และนำส่งตรวจวิเคราะห์การดัดแปลงพันธุกรรมที่ห้องปฏิบัติการภาคเอกชน (ภาพที่ 2) ทั้งนี้จากปัญหาดังกล่าว คณะผู้วิจัยพบว่ามีหลายขั้นตอนในการสุ่มตัวอย่างมะละกอ 13.3 % ที่ทำการตรวจพบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมเกิดขึ้นหลังจากส่งออกไปยังประเทศคู่ค้า ดังนี้ 1) ขั้นตอนสุ่มมะละกอ 13.3% ทำให้มะละกอที่เหลืออีก 86.7% มีโอกาสปนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม 2) ขั้นตอนการเจาะและปั่นบดมะละกอที่สุ่มมา 400 กรัม แล้วสุ่มมา 75 กรัม ส่วนที่เหลือจากการสุ่มมีโอกาสเป็นมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และ 3) จากขั้นตอนการสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ โดยส่วนที่เหลือมีโอกาสเป็นมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

เพื่อเป็นการแก้ปัญหาจากกระบวนการสุ่ม จึงทำการพัฒนาอุปกรณ์สำหรับเจาะเนื้อมะละกอเพื่อลดปริมาณตัวอย่างมะละกอจากทั้งคันรถของเกษตรกร โดยมีเป้าหมายในการเจาะเนื้อมะละกอเพื่อส่งวิเคราะห์การปนเปื้อนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมให้เหลือประมาณ 0.1 กรัมต่อตัวอย่าง ได้นำโมเดลต้นแบบตัวเจาะมาพัฒนาให้เหมาะสมกับงานด้านอุตสาหกรรมโดยใช้แท่งอะลูมิเนียมกลวงระดับ food grade ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ยาว 12 เซนติเมตร และมีตัวดันคล้ายกับ barrel ของเข็มฉีดยาเป็นแท่งอะลูมิเนียมตันที่มีขีดสำหรับบอกสเกลในการดันมะละกอออกเพื่อให้ได้ขนาดเท่าๆกันทุกชิ้น (ภาพที่ 3) ส่งให้ผู้ใช้งานจริง คือ พนักงานรับตัวอย่างของ บริษัท สามร้อยยอด จำกัด และผู้ช่วยวิจัยห้องเตรียมตัวอย่างของห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม กรมวิชาการเกษตร ทำการทดสอบการใช้ ซึ่งได้ข้อคิดเห็นดังต่อไปนี้ เจ้าหน้าที่บริษัทฯ เสนอข้อคิดเห็นว่า ตำแหน่งที่เหมาะสมของการเจาะผลมะละกาคือตรงกลางเนื่องจากทางบริษัทต้องนำไปวัดความหนาเนื้อและสีของผลมะละกอ และขอให้คงรูปแบบโมเดลไว้สำหรับการเจาะตัวอย่างที่เป็นใบมะละกอเพื่อตรวจวิเคราะห์ในระบบแปลงปลูก และขอร่วมพัฒนาโมเดลสำหรับอุปกรณ์การเจาะตัวอย่างที่เป็นผลมะละกอโดยใช้แท่งเจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ปรับเปลี่ยนด้ามจับให้กระชับเหมาะกับการทำงานที่มีตัวอย่างปริมาณมากดังภาพที่ 3 สำหรับห้องปฏิบัติการฯ กรมวิชาการเกษตร ได้เสนอข้อคิดเห็นว่า สามารถใช้โมเดลตัวเจาะมีความเหมาะสมสำหรับกระบวนการสุ่มตัวอย่างซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งในตัวอย่างผลและใบมะละกอ



ภาพที่ 2 การสุ่มตรวจการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม 13.3% และ 100% โดยที่จุดสีแดงคือจุดเสี่ยงต่อการสูญเสียมะละกอกที่ปนเปื้อนการดัดแปลงพันธุกรรม



ภาพที่ 3 อุปกรณ์เจาะเก็บตัวอย่างเนื้อมะละกอก แบบเดิม โมเดลตัวเจาะ และโมเดลต้นแบบใหม่อลูมิเนียม พร้อมแท่งอลูมิเนียมต้นสำหรับต้นตัวอย่างมะละกอก (บน) และหลาวเจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตรที่พัฒนาาร่วมกับบริษัทสามร้อยยอด จำกัด (ล่าง)

2.การพัฒนาชุดตรวจสอบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อตรวจสอบผลสดและผลิตภัณฑ์แปรรูป

2.1 การพัฒนาชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้ร่วมกับชุดตรวจสอบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

สำหรับการพัฒนาชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อใช้ร่วมกับชุดตรวจสอบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม โดยทำการทดสอบสารยับยั้งปฏิกิริยาหลังจากที่ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอผลมะละกอ ทั้ง 6 วิธี พบว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 6 วิธี สารยับยั้งปฏิกิริยาน้อยหรือไม่มีสารยับยั้งปฏิกิริยาที่ขัดขวางการเข้าจับของโพรบได้ สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 194 คู่เบสทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตาม จากภาพรวมทั้งหมดของผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ (Trt6) เป็นวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมนำไปใช้ในภาคสนาม เนื่องจากมีค่าความบริสุทธิ์ดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.8-2 มีความเข้มข้นดีเอ็นเอมากกว่า 1000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไม่พบการเกิดสารยับยั้งปฏิกิริยาพีอาร์ ใช้ขั้นตอนง่ายไม่ซับซ้อน ใช้ระยะเวลารวดเร็วเพียง 1 ชั่วโมง 30 นาทีต่อ 20 ตัวอย่าง มีราคาถูก และสารเคมีที่ใช้มีความปลอดภัย สามารถใช้สกัดทั้งใบและเนื้อมะละกอได้ จึงจำลองการสร้างชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย (Kit DNA extraction) สำหรับสกัดดีเอ็นเอจำนวน 20 ตัวอย่าง

ชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย (ภาพที่ 4) ประกอบด้วย ประกอบด้วยอุปกรณ์เจาะพืช จำนวน 1 ชิ้น ใบมีดตัดเนื้อเยื่อพืช จำนวน 1 ชิ้น แท่งบดพลาสติก จำนวน 20 แท่ง หลอดไมโครทิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 50 หลอด หลอดดูดสารละลายขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 50 หลอด สารละลายบัฟเฟอร์เอ (Buffer A) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทั้งหมดบรรจุภายในกล่องขนาด 10x11x11 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งได้ทดสอบการใช้งานกับพืชอื่นๆ พบว่า สามารถใช้สกัดดีเอ็นเอจากพืช เช่น มะละกอ มะเขือเทศ ฝ้าย มันฝรั่ง ข้าวโพด อ้อย ข้าว ถั่วลิสง โดยส่วนเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ได้แก่ ผล และใบ เป็นต้น

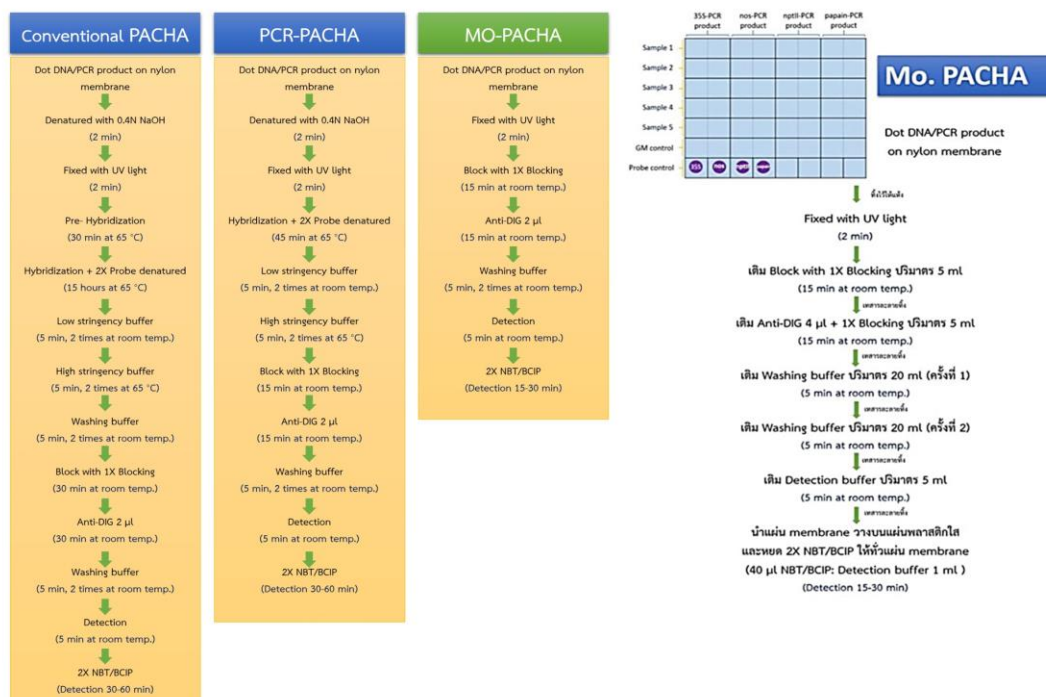
ผลิตภัณฑ์ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืชอย่างง่าย 1 กล่อง สามารถใช้สกัดดีเอ็นเอได้จำนวน 20 ตัวอย่างต่อกล่อง และสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้เป็นระยะเวลานาน 12 เดือน มีต้นทุนราคาประมาณ 495.18 บาท ต่อกล่อง (20 ตัวอย่าง) เฉลี่ยตัวอย่างละ 24.76 บาท



ภาพที่ 4 แบบจำลองชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย (Kit DNA Extraction) สำหรับสกัดดีเอ็นเอจำนวน 20 ตัวอย่าง

2.2 การพัฒนาชุดตรวจสอบภาคสนามมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Modified PACHA

ผลจากการพัฒนาขั้นตอนและระยะเวลาในกระบวนการตรวจคัดกรองมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Mo.PACHA (ภาพที่ 5) พบว่า หยดดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นเมมเบรน ที่ไว้ให้แห้งแล้วนำไปตรึงดีเอ็นเอกับแผ่นเมมเบรนด้วยแสง UV เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนวางลงบนกล่องสำหรับทำปฏิกิริยาที่มีสารละลาย Blocking ปริมาตร 5 มิลลิตร เขย่ากล่องทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที ใช้อุณหภูมิห้องตลอดระยะเวลาการทำปฏิกิริยา จากนั้นเทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย Blocking ใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิตร และ Anti-Digoxigenin ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เขย่ากล่องทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที ในขั้นตอนนี้ Anti-Digoxigenin จะเข้าจับคู่กับ Digoxigenin บนผลผลิตปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ถูกติดไว้ตั้งแต่ขั้นตอนทำพีซีอาร์ เมื่อครบเวลาเทสารละลายทิ้ง และทำการล้างแผ่นเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ Washing ปริมาตร 20 มิลลิตร หรือให้ท่วมแผ่นเมมเบรน เขย่ากล่องทำปฏิกิริยาเพื่อชะล้าง Anti-Digoxigenin ที่จับไม่แน่นหรือจับผิด เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งและทำการล้างเช่นเดิมอีก 1 ครั้ง จากนั้นเทสารละลายทิ้งและเติมบัฟเฟอร์ Detection ปริมาตร 5 มิลลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที เพื่อปรับสภาพในการตรวจผลด้วยสารละลาย NBT/BCIP นำแผ่นเมมเบรนวางบนแผ่นพลาสติกใส และหยดสารละลาย 2X NBT/BCIP (อัตราส่วน NBT/BCIP 40 ไมโครลิตร ต่อบัฟเฟอร์ Detection 1 มิลลิตร) ปริมาตร 1-2 มิลลิตร หรือหยดให้ท่วมแผ่น และใช้ทิชชูเกลี่ยสารละลายเบาๆให้ทั่วแผ่น แล้วรีดสารละลายส่วนเกินออก เก็บแผ่นเมมเบรนไว้ในที่มืด รอตรวจสอบผลการเกิดสัญญาณจุดสีน้ำเงินม่วง ทุกๆ 10 นาที สำหรับตัวควบคุมผลบวก (Probe control) ของกระบวนการ จะแสดงสัญญาณจุดสีน้ำเงินม่วงชัดเจนภายในเวลา 15 นาที จะแสดงให้เห็นว่าการทำงานของกระบวนการ Mo.PACHA ทั้งหมดถูกต้องและเชื่อถือได้ ส่วนการอ่านผลการตรวจวิเคราะห์มะละกอไม่ตัดแปลงพันธุกรรม และตัดแปลงพันธุกรรม เปรียบเทียบกับจุดสัญญาณของตัวควบคุมผลลบ (non-GM control) และตัวควบคุมผลบวก (GM control) ตามลำดับ



ภาพที่ 5 ภาพรวมกระบวนการพัฒนาของชุดตรวจสอบ Conventional PACHA, PCR-PACHA และ Mo.PACHA

การพัฒนาปรับปรุงผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์โดย ชุดตรวจวิเคราะห์พืชไม่ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Mo.PACHA สำหรับตรวจวิเคราะห์ 10 ตัวอย่างชุดตรวจวิเคราะห์บรรจุภายในกล่องขนาด 17x20x11 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ภาพที่ 6) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 เป็นชุดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ประกอบด้วยหลอดทำปฏิกิริยาขนาด 1.5 มิลลิลิตร และ 200 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ 2X Dream Taq PCR Master Mix ไพรเมอร์ Forward และ Reverse และส่วนที่ 2 เป็นชุดตรวจวิเคราะห์ Mo. PACHA ประกอบด้วยแผ่นไนลอนเมมเบรน สารเคมีทำปฏิกิริยา ได้แก่ Blocking reagent, Anti-Digoxigenin-AP, Washing buffer 1, Detection buffer, NBT/BCIP reagent ราคาต้นทุนประมาณ 743.16 บาท ต่อกล่อง ต่อการตรวจ 1 ยีน ต่อ 10 ตัวอย่าง คิดเฉลี่ยตัวอย่างละ 74.32 บาท ต่อ 1 ยีน ต่อ 1 ตัวอย่าง ทั้งนี้ราคาข้างต้นยังไม่ได้รวมค่าบรรจุภัณฑ์ต่างๆ ชุดตรวจวิเคราะห์สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 เดือน และมีข้อควรระวังคือ ควรเก็บแผ่นไนลอนเมมเบรนไว้ในที่แห้งสนิท หากมีความชื้นจะทำให้แผ่นเมมเบรนเสียสภาพ ไม่สามารถใช้งานได้



ภาพที่ 6 ชุดตรวจสอบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม Mo.PACHA

3 การขอถืออนุสิทธิบัตร

การขอจดอนุสิทธิบัตรชุดตรวจและเครื่องมือต่างจากการพัฒนาระบบการตรวจคัดกรองมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสำหรับอุตสาหกรรมแปรรูปเพื่อการส่งออก ได้ดำเนินการทั้งหมดจำนวน 3 รายการ ดังนี้

- 1) ชุดตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม. เลขที่อนุสิทธิบัตร 22430. วันที่ออกอนุสิทธิบัตร 11 กันยายน 2566.
- 2) ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช. เลขที่อนุสิทธิบัตร 22663. วันที่ออกอนุสิทธิบัตร 16 ตุลาคม 2566.
- 3) อุปกรณ์เจาะพืช. เลขที่อนุสิทธิบัตร 22429. วันที่ออกอนุสิทธิบัตร 11 กันยายน 2566.

สรุปผล

การพัฒนาชุดตรวจคัดแยกผลมะละกอที่ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมแปรรูป เป็นนวัตกรรมที่ใช้ได้ง่าย สะดวก ช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย และเวลาในการตรวจคัดกรองพืชไม่ดัดแปลงพันธุกรรมจำนวนมากในเวลารวดเร็ว มีความเหมาะสมสำหรับการทำงานในห้องปฏิบัติการที่ยังไม่มีความพร้อมทางเครื่องมือ อาทิ บริษัทผู้ผลิตอาหารแปรรูป และเกษตรกร สามารถพัฒนาเป็นต้นแบบการขยายผลสำหรับพื้นที่อื่น ๆ ในประเทศไทย เป็นแนวทางการศึกษาสำหรับการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดอื่นๆ เพื่อช่วยแก้ไขสถานการณ์การปนเปื้อนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมในสินค้าส่งออกของประเทศไทยที่กำลังเผชิญปัญหาอยู่ในปัจจุบันได้ มีขั้นตอนในการดำเนินงานดังนี้

1. พัฒนาอุปกรณ์เจาะเก็บเนื้อมะละกอรูปรูทรวงหลาวขนาด 7 มม. วัสดุสแตนเลสเกรดอุตสาหกรรมอาหาร สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืชอย่างง่าย ที่มีประสิทธิภาพได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณสำหรับทดสอบ
2. พัฒนาระบบชุดตรวจวิเคราะห์การดัดแปลงพันธุกรรมมะละกอใช้เทคนิคเปเปอร์โครมาโทกราฟีติดของไฮบริโดเซชัน (PACHA) โดยทดสอบดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างด้วยชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย ทดสอบบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยโพรบจำเพาะที่ติดฉลากสี สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่า โดยพืชดัดแปลงพันธุกรรมจะเกิดจุดสีม่วง และตัวอย่างที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรมจะไม่เกิดสี
3. พัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพชุดตรวจ PACHA (Modified PACHA) สามารถลดขั้นตอนและระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์จากเดิม 2 วัน เหลือเพียง 3 ชั่วโมง ต้นแบบผลิตภัณฑ์ชุดตรวจ Mo. PACHA สำหรับ 10 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ชุดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และชุดตรวจวิเคราะห์ Mo. PACHA ราคาประมาณ 743.16 บาท ต่อกล่อง หรือ 75 บาทต่อตัวอย่าง สามารถเก็บไว้ได้ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน มีความเหมาะสมสำหรับการทำงานในห้องปฏิบัติการที่ยังไม่มีความพร้อมทางเครื่องมือ

การนำไปใช้ประโยชน์

คณะผู้วิจัยขยายผลการวิจัยสู่ โรงงาน บริษัท สามร้อยยอด จำกัด โดยในขั้นต้นบริษัทสามร้อยยอด จำกัด และเกษตรกรที่สนใจเข้าร่วมโครงการกว่า 10 รายในเขตพื้นที่ จ.ชุมพร และ จ.ประจวบคีรีขันธ์ สามารถนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้คัดแยกมะละกอไม่ดัดแปลงพันธุกรรมจำนวนมากกว่า 50,000 ต้นและสามารถเป็นต้นแบบการขยายผลสำหรับพื้นที่อื่นๆ ในประเทศไทย ซึ่งช่วยลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ลงถึง 86 เปอร์เซ็นต์ ลดปัญหาการตรวจพบการปนเปื้อนพืชดัดแปลงพันธุกรรมในสินค้าส่งออกแล้วถูกตีกลับช่วยสร้างความมั่นใจในระบบการผลิตของผลไม้ส่งออกภาคอุตสาหกรรมที่มีมูลค่าหลายล้านบาท รวมถึงสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภค และได้ขยายผลงานวิจัยการชุดตรวจคัดแยกมะละกอปลอด GM เพื่ออุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร ให้กับ ผู้ประกอบการโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร และกลุ่มเกษตรกร ณ ห้องประชุมกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม กองวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (บางเขน) โดยสร้างแนวทางการศึกษาสำหรับการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดอื่นๆ เพื่อช่วยแก้ไขสถานการณ์การปนเปื้อนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมในสินค้าส่งออกของประเทศไทยที่กำลังเผชิญปัญหาอยู่ในปัจจุบัน นอกจากนี้ได้เผยแพร่ผลงานโดยการตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานผ่านการประชุมวิชาการระดับชาติ 8 เรื่อง และนานาชาติจำนวน 5 เรื่อง

คำขอบคุณ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดมะละกอพันธุ์แขกดำศรีสะเกษ จากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ กรมวิชาการเกษตร ได้รับความร่วมมือในการดำเนินงานจาก บริษัท สามร้อยยอด จำกัด และเกษตรกรผู้ปลูกมะละกอในเขตพื้นที่ จ.ประจวบคีรีขันธ์ จ.ชุมพร และขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยในโครงการ รวมทั้งบุคลากรทุกท่านในกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม ที่ช่วยอำนวยความสะดวกให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, วิจิตรา โชคบุญ, ณฐมน แก้วนุ้ย, กตัญญูจิตตา คำช่วย, ชนันต์ธร นัยสิริชัยชล และคณะ. (2558). ผลงานวิจัยดีเด่นกรมวิชาการเกษตรปี 2558 เรื่อง *การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม*. กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ พงศกร สรรค์วิทยากุล ปิยนุช ศรชัย และฐิติรัตน์ อัครมงคลศิริ. (2561). การพัฒนาเทคนิค Triplex Real-Time PCR เพื่อตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ตามมาตรฐาน ISO/IEC17025. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 36 ฉบับที่ 3. กันยายน -ธันวาคม 2561. pp 316-331
- วรินทร์ จันทร์ทองอิน. 2554. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* species ด้วยเทคนิค Paper Chromatography Dot Blot Hybridization. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิล ปราสาทศรี. (2552). *โรคจุดวงแหวนมะละกอ และการป้องกันกำจัด*. ขอนแก่น: ห้างหุ้นส่วนจำกัด ขอนแก่นการพิมพ์.
- วิล ปราสาทศรี. (2552). *โรคจุดวงแหวนมะละกอ และการป้องกันกำจัด*. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร ขอนแก่น สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ: หจก.ขอนแก่นการพิมพ์.
- HwangBo K., Su HS., Jong SL., Sung RM., Suk MK, Jang RL., et al. Rapid and Simple method for DNA extraction from plant and algal species suitable for PCR amplification using a chelating resin Chelex 100. Plant Biotechnol Rep. 2010; 4: 49-52.
- JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. Qualitative PCR method for detection of neomycin phosphotransferase II gene. [Online] 2010 [cited 2017 July 31]. Available from: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/QL-ELE-00-003.pdf>
- Kasajima, I., Y. Ide, N. Ohkama-Ohtsu, H. Hayashi, T. Yoneyama and T. Fujiwara. 2004. A Protocol for Rapid DNA Extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR Analysis. Plant Molecular Biology Reporter 22: 49-52

- Kim, S.R., J. Yang, G. An and K.K. Jena. 2016. A Simple DNA Preparation Method for High Quality Polymerase Chain Reaction in Rice. *Plant Breed Biotech* 4(1):99-106.
- Roger, S.O. and A.J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76.
- Sornchai, P., N. Buntongdee, T. Assawamongkolsiri, P. Songmuangsook, W. Pitaksaringkarn and P. Thammakijjawat. 2020. Development of Screening Method for CaMV 35S promoter, Nos terminator, NptII and Papaya Endogenous Gene in GM Papaya using Tetraplex Real-time PCR. The 17th KU-KPS National Conference Proceeding. 5553pp:85-96.
- Sornchai, P., N. Buntongdee, T. Assawamongkolsiri, P. Songmuangsook, W. Pitaksaringkarn and P. Thammakijjawat. 2020. Development of Screening Method for CaMV 35S promoter, Nos terminator, NptII and Papaya Endogenous Gene in GM Papaya using Tetraplex Real-time PCR. The 17th KU-KPS National Conference Proceeding. 5553pp: 85-96.
- Sornchai, P., N. Buntongdee, T. Assawamongkolsiri, P. Songmuangsook, W. Pitaksaringkarn and P. Thammakijjawat. 2021. Refinement of Polymerase Chain Reaction (PCR) Process for GM Papaya detection in Small Laboratory Thai Agricultural Research Journal. 39(3).
<https://doi.org/10.14456/thaidoa-agres.2021.20>