วารสารเกษตร
JOURNAL OF AGRICULTURE
วารสารวิชาการของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปีที่ 33 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2560

ISSN 0857-0841
TCI กลุ่มที่ 1

คำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ

เรื่องที่ตีพิมพ์

บทความวิจัย บทความปริทัศน์ หรือบทความวิชาการ ทางด้านเกษตรศาสตร์และสาขาที่เกี่ยวข้อง

การเตรียมต้นฉบับ

1. **ภาษา** เป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ

2. **การพิมพ์** พิมพ์หน้าเดียวบนกระดาษขนาด A4 ด้วย ไมโครคอมพิวเตอร์โปรแกรมไมโครซอฟ เวิร์ด ตัวอักษร Cordia new ขนาด 14 ตัวอักษรต่อนิ้ว ความยาวไม่ควรเกิน 10 หน้า (รวมบทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ)

3. **การเรียงลำดับเนื้อหา**

3.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรสั้น ชัดเจน และต้องสื่อเป้าหมายหลักของการศึกษาวิจัย ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

3.2 ชื่อผู้เขียน เป็นภาษาไทยและภาษาอังกฤษ สำหรับที่อยู่ (ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ) ให้พิมพ์เป็นเชิงอรรถ (Footnote) ในหน้าแรกของบทความ

3.3 บทคัดย่อ (Abstract) ควรเป็นเนื้อหาที่สั้น ชัดเจนและเข้าใจง่าย โดยรวมเหตุผลในการศึกษาวิจัย อุปกรณ์ วิธีการ ตลอดจนผลการศึกษาและสรุปด้วย ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ควรเกิน 300-350 คำ และให้ระบุคำสำคัญ (keywords) ไว้ท้ายบทคัดย่อแต่ละภาษาด้วย (บทความปริทัศน์อาจไม่ต้องมีบทคัดย่อ)

3.4 คำนำ (Introduction) แสดงความเป็นมาและเหตุผลที่นำไปสู่การศึกษาวิจัย อาจรวมการตรวจเอกสาร (Review of Literature) และวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยไว้ด้วย

3.5 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ให้บอกรายละเอียดวัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ ตลอดจนวิธีและแบบจำลองการศึกษาวิจัยที่ชัดเจน และสมบูรณ์

3.6 ผลการศึกษาหรือผลการทดลอง (Results) ให้บรรยายผลการศึกษาวิจัย พร้อมเสนอข้อมูลในรูปแบบ ตารางหรือภาพประกอบได้ โดยตารางหรือภาพ ให้จัดทำเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด

3.7 วิจารณ์ (Discussion) ควรเชื่อมโยงกับผลการศึกษาว่าสอดคล้องกับสมมุติฐานหรือแตกต่างไปจากผลงานวิจัยที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหรือไม่อย่างไรและด้วยเหตุใด โดยมีพื้นฐานการอ้างอิงที่เชื่อถือได้ วิจารณ์อาจนำไปรวมกับผลการศึกษาเป็นผลการศึกษาและวิจารณ์ (Results and Discussion)

3.8 สรุป (Conclusion) ควรสรุปผลที่ได้รับจากการศึกษาวิจัยว่าเป็นไปตามวัตถุประสงค์หรือไม่ พร้อมให้ข้อเสนอแนะ หรือระบุอุปสรรคและแผนงานวิจัยที่จะดำเนินการต่อไป

4. **กิตติกรรมประกาศ หรือ คำขอบคุณ (Acknowledgement)**

อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ที่ช่วยเหลือในงานวิจัย แต่ไม่ได้เป็นผู้ร่วมงานวิจัย

5. **เอกสารอ้างอิง (References)**

5.1 ในเนื้อเรื่อง ไม่ควรอ้างอิงถึงเรื่องที่ไม่เกี่ยวข้องหรือห่างไกล ระบบที่ใช้อ้างอิงคือ ระบบชื่อ และปี (Name-and-year System) ในเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อตัวและปี พ.ศ. เช่น สมชาย (2545) รายงานว่า…หรือ…(สมชาย, 2545) หากมีผู้เขียน 2 คน ให้ใช้เป็น สมชาย และสมหญิง (2547) รายงานว่า…หรือ…(สมชาย และสมหญิง, 2547) และถ้ามีผู้เขียนตั้งแต่ 3 คนขึ้นไป ให้ใช้ชื่อคนแรกแล้วตามด้วยคำว่า และคณะ เช่น สมชาย และคณะ (2546) รายงานว่า…หรือ…(สมชาย และคณะ, 2546) ในกรณีเอกสารเป็นภาษาอังกฤษ ให้ใช้ชื่อสกุลและปี *ค.ศ.* เช่น Johny (2003)…หรือ…(Johny, 2003) ถ้าผู้เขียนมี 2 คน ให้ใช้เป็น Johny and Walker (2004) …หรือ…(Johny and Walker, 2004) หากมีมากกว่า 3 คน ให้ใช้เป็น Johny *et al.* (2005)…หรือ…(Johny *et al.*, 2005) สำหรับในบัญชีเอกสารอ้างอิง ให้ใส่ชื่อผู้เขียนทุกคน ห้ามใช้คำว่า และคณะ หรือ *et al.*

5.2 ในบัญชีเอกสารอ้างอิง ให้เรียงลำดับเอกสารภาษาไทยก่อนภาษาอังกฤษ โดยเรียงตามลำดับอักษรในแต่ละภาษา ตามรูปแบบการเขียนมีดังนี้

1) วารสาร (Journals)

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. ชื่อวารสาร (เขียนเต็ม) ปีที่(ฉบับที่): เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าที่สิ้นสุด.

วันทนา มุทิตา และ ณัฐา ควรประเสริฐ. 2547. เซลล์พันธุศาสตร์และการถ่ายทอดสีดอกของฟิวเชีย. วารสารเกษตร 20(1): 10-18.

Barcenas, N. M., T. R. Unruh and L. G. Neven. 2005. DNA diagnostics to identify internal feeders (Lepidoptera: Tortricidae) of pome fruits of quarantine importance. Journal of Economic Entomology 98(2): 299-306.

2) หนังสือ และตำรา (Books & Textbooks)

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อหนังสือ. สำนักพิมพ์, เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

จริยา วิสิทธิ์พานิช ชาตรี สิทธิกุล และ เยาวลักษณ์ จันทร์บาง. 2545. โรคและแมลงศัตรูลำไยลิ้นจี่ และมะม่วง. ธนบรรณการพิมพ์, เชียงใหม่. 308 หน้า.

Gullan, P. J. and P. S. Cranston. 2005. The Insects: An Outline of Entomology. 3rd ed. Blackwell Publishing, Malden. 505 p.

3) เรื่องย่อยในตำราหรือหนังสือที่มีผู้เขียนแยกเรื่องกันเขียน และมีบรรณาธิการ

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่องย่อย. หน้า เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าที่สิ้นสุด. *ใน*: ชื่อบรรณาธิการ, (บก.) ชื่อหนังสือ. สำนักพิมพ์, เมืองที่พิมพ์.

ดำรง เวชกิจ และ สมบูรณ์ ทองสกุล. 2535. เทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัด ศัตรูพืช. หน้า 22-42. *ใน*: สุวัฒน์ รวยอารีย์ (บก.). แมลงและสัตว์ศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจและการบริหาร. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ไอเดีย สแควร์, กรุงเทพฯ.

Kubo, T. 2003. Molecular analysis of the honeybee sociality. pp. 3-20. *In*: T. Kikuchi, N. Azuma and S. Higashi (eds.). Gene, Behaviors and Evolution of Social Insects. Hokkaido University Press, Sapporo.

4) วิทยานิพนธ์

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. ระดับวิทยานิพนธ์. สถาบันการศึกษา. เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

อภินันท์ มณีพงษ์. 2547. ผลของการใช้โอโซนต่อคุณภาพและสารพิษตกค้างหลังการเก็บเกี่ยวส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 100 หน้า.

5) เอกสารวิชาการอื่น ๆ

ชื่อผู้เขียน หรือหน่วยงาน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่องหรือชื่อหนังสือ. ประเภทของเอกสาร. สถาบันหรือหน่วยงานที่จัดพิมพ์, เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

ทวีศักดิ์ ชโยภาส. 2544. แมลงศัตรูปาล์มน้ำมันในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 126 หน้า.

6) สื่ออิเล็คทรอนิคส์

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: ชื่อ Website (วันเดือนปีที่สืบค้นข้อมูล).

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2548. การปลูกผักแบบไม่ใช้ดิน (ไฮโดรโปนิกส์). (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.doae.go.th/proster/nondin/htm (21 เมษายน 2548).

Linardakis, D. K. and B. I. Manois. 2005. Hydroponic culture of strawberries in perlite. (Online). Available: http://www.schundler.com/strawberries.htm (April 21, 2005).

ดูคำแนะนำรูปแบบในการใช้ภาษาอังกฤษในเนื้อเรื่องภาษาไทย และการส่งเรื่องเพื่อตีพิมพ์ ได้ในปกหลัง

วารสารเกษตร
JOURNAL OF AGRICULTURE

ผู้จัดพิมพ์	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Publisher	Faculty of Agriculture, Chiang Mai University
กำหนดการพิมพ์	วารสารราย 4 เดือน (3 ฉบับ/ปี) คือ ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน ฉบับที่ 2 พฤษภาคม-สิงหาคม ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม	Publication	Tri-annually Issue 1 January-April Issue 2 May-August Issue 3 September-December
วัตถุประสงค์	เพื่อเผยแพร่วิทยาการด้านการเกษตร และสาขาที่เกี่ยวข้อง	Objective	To disseminate academic knowledge in agriculture and related fields
ที่ปรึกษา	คณบดีคณะเกษตรศาสตร์ รองคณบดีฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ	Consultants	Dean, Faculty of Agriculture; Associate Dean for Research and Academic Services
บรรณาธิการ	ศ.ดร. สัญชัย จตุรสิทธา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Editor	Sanchai Jaturasitha, Dr.sc.agr., Prof. Chiang Mai University
รองบรรณาธิการ	รศ.ดร. ไสว บูรณพานิชพันธุ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Vice Editor	Sawai Buranapanichpan, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University
กองบรรณาธิการ ฝ่ายวิชาการ	ศ.ดร. ดนัย บุณยเกียรติ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Editorial Board (Academic)	Danai Boonyakiat, Ph.D., Prof. Chiang Mai University
	รศ.ดร. เกวลิน คุณาศักดากุล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Kaewalin Kunasakdakul, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University
	รศ.ดร. สุนทร คำยอง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Soontorn Khamyong, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University
	รศ.ดร. รุจ ศิริสัญลักษณ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Ruth Sirisunyaluck, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University
	รศ.ดร. ชนากานต์ เทโบลต์ พรมอุทัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Chanakan Prom-u-thai, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University
	ผศ.ดร. สุรินทร์ นิลสำราญจิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Surin Nilsamranchit, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University
	ผศ.ดร. เยาวลักษณ์จันทร์บาง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Yaowaluk Chanbang, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University
	ผศ.ดร. ฉันทลักษณ์ติยายน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Chantalak Tiyayon, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University
	ผศ.ดร. จิรวรรณ กิจชัยเจริญ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Jirawan Kitchaicharoen, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University
	ผศ.ดร. เสาวลักษณ์แย้มหมื่นอาจ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Saowaluck Yammuen-art, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University
	อ.ดร. ชูชาติ สันธทรัพย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Choochad Santasup, Ph.D. Chiang Mai University

พิมพ์ที่โรงพิมพ์: สมศักดิ์การพิมพ์ 47/3 ถนนแก้วนวรัฐ ต.วัดเกต อ.เมือง จ.เชียงใหม่ โทร. 053-242164, 089-4333989

บทบรรณาธิการ

สวัสดีครับท่านผู้อ่านทุกท่าน

วารสารเกษตร ปี นี้ฉบับปฐมฤกษ์ในการก้าวเข้าสู่ปี ที่ 33 นับว่าเป็นวารสารที่มีความต่อเนื่องสูง และยังคงไว้ซึ่งคุณภาพที่ต้องพัฒนามากกว่าเดิม เนื่องจากมีผู้เขียนส่งบทความมาเป็นจำนวนมากทำให้กอบรรณาธิการต้องคัดสรรบทความตามมาตรฐานเช่นเดิม ทำให้ปี ที่ผ่านมามีอัตราการปฏิเสธบทความสูงถึง 20% ดังนั้นผู้เขียนต้องนำเสนอบทความที่มีความใหม่ และเกิดผลลัพธ์และผลกระทบต่องานวิชาการอย่างไร ที่เป็นข้อกำหนดที่สำคัญของวารสาร ตลอดจนการจัดรูปแบบเป็นไปตามข้อกำหนดวารสารด้วย

สำหรับบทความในวารสารเกษตร ปีที่ 33 ฉบับที่ 1 ประจำเดือนมกราคม-เมษายน 2560 มีบทความทั้งหมด 15 เรื่อง สาขาพืชสวน 5 เรื่อง โรคพืช 1 เรื่อง กีฏวิทยา 2 เรื่อง ปฐพีศาสตร์ 1 เรื่อง สัตวศาสตร์ 2 เรื่อง ประมง 2 เรื่อง และอุตสาหกรรมเกษตร 2 เรื่อง ซึ่งล้วนแต่เป็นบทความวิจัยที่น่าสนใจ กองบรรณาธิการต้องขอขอบคุณคณะผู้เขียนทุกท่านที่ได้กรุณาแบ่งปันงานวิจัยดี ๆ มาเป็นอาหารสมองชั้นดีให้กับผู้อ่านครับ

พบกันใหม่ฉบับหน้าครับ

ศ.ดร.สัญชัย จตุรสิทธา

บรรราธิการวารสารเกษตร

Behavioral Interactions Between Coffee Berry Borers and Ants in Chiang Mai, Thailand

ปฏิสัมพันธ์เชิงพฤติกรรมของมอดเจาะผลกาแฟและมดในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

Yuka Onishi[1/, 3/], Piyawan Suttiprapan[1/*], Jiraporn Kulsarin[1/], Weeyawat Jaitrong[2/] and Fuminori Ito[3/]
Yuka Onishi[1/, 3/] **ปิยะวรรณ สุทธิประพันธ์**[1/*] **จิราพร กุลสาริน**[1/] **วียะวัฒน์ ใจตรง**[2/] **และ** Fuminori Ito[3/]

[1/]*Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

[1/]*ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200*

[2/]*Thailand Natural History Museum, National Science Museum, Technopolis, Khlong 5, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand*

[2/]*องค์การพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ เทคโนธานี ต. คลองห้า อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120*

[3/]*Faculty of Agriculture, Kagawa University, Ikenobe, Miki, 761-0795 Japan*

**Corresponding author: Email: piyawanss43@gmail.com*

(Received: 1 June 2016; Accepted: 26 August 2016)

บทคัดย่อ: การศึกษาเกี่ยวกับพฤติกรรมของมดที่ตอบสนองต่อตัวเต็มวัยมอดเจาะผลกาแฟ ได้ดำเนินการในสภาพห้องปฏิบัติการ มดที่ใช้ศึกษาจำนวน 7 ชนิดเป็นมดชนิดเด่นที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกกาแฟในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งได้แก่ *Anoplolepis gracilipes*, *Camponotus nicobarensis*, *Crematogaster* sp. PM2, *Dolichoderus* sp. PM1, *Tapinoma* sp. PM1, *Technomyrmex modiglianii* และ *Technomyrmex yamanei* ในสภาพห้องปฏิบัติการ ทำการบันทึกลักษณะพฤติกรรมของมดที่มีต่อมอดเจาะผลกาแฟ ดังนี้ 1) การใช้หนวดสัมผัส 2) การจู่โจม และ 3) การขนย้าย พบว่ามดทั้งเจ็ดชนิดมีพฤติกรรมการเข้าจู่โจมมอดเจาะผลกาแฟ และบางชนิดทำการคาบขนย้าย ไม่พบมดกัดกินมอดเจาะผลกาแฟ แต่พบความเสียหายของมอดเจาะผลกาแฟหากมดเข้าจู่โจมอย่างรุนแรงและมีการคาบขนย้าย มด *Dolichoderus* sp. PM1 และ *Tapinoma* sp. PM1 พบว่ามีศักยภาพเป็นแมลงตัวห้ำของมอดเจาะผลกาแฟ สำหรับมด *A. gracilipes* และ *C. nicobarensis* มีการจู่โจมมอดเจาะผลกาแฟน้อย

คำสำคัญ: มด มอดเจาะผลกาแฟ *Hypothenemus hampei* กาแฟอะราบิกา การควบคุมโดยชีววิธี

Abstract: The behavioral response of ants to the adult of coffee berry borer (CBB) was studied in laboratory condition. The observed ants were seven dominant ant species collected from coffee plantations in northern Thailand i.e. *Anoplolepis gracilipes*, *Camponotus nicobarensis*, *Crematogaster* sp. PM2, *Dolichoderus* sp. PM1, *Tapinoma* sp. PM1, *Technomyrmex modiglianii* and *Technomyrmex yamanei*. The following ant behaviors against CBB were recorded in the laboratory: 1) Antennal contacting, 2) Attacking, and 3) Carrying. All species attacked CBB and some the species also carried the CBB. However, no ant species fed on the CBB. The CBB got damaged if ants intensively attacked or if they were grasped for carrying. *A. gracilipes* and *C. nicobarensis* were less aggressive against CBB, while *Dolichoderus* sp. PM1 and *Tapinoma* sp. PM1 seemed to be the more effective biological control agents for CBB.

Keywords: Ants, coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, arabica coffee, biological control

Introduction

Arabica coffee is the main cash crop for the hill tribes in the mountainous regions in northern Thailand after it was promoted by the government approximately 30 years ago (Riwthong *et al*., 2015). However, a major pest problem has been caused in some regions by the coffee berry borer (CBB, *Hypothenemus hampei*). Although the origin of CBB is not known, it is now found in all coffee producing areas worldwide, including Thailand (Vega *et al*., 2009; Jaramillo *et al*., 2011; Suttiprapan and Chanbang, 2014; Buranapanichpan and Chanbang, 2014; Thayaping and Suttiprapan, 2015). The fecundity of CBB is high, sometimes producing seven generations during one year (Le Pelley, 1968). Although insecticides have been widely used to control this pest, it is not always effective because the CBB spends most of its life inside the coffee fruit. In addition, CBB has developed a resistance to insecticides (Gonthier *et al*., 2013). Therefore, in recent years, the Thai government and institutions have recommended growers to apply female attractant traps using ethanol and methanol, the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, as well as cultural control. Moreover, in other coffee growing countries, the parasitic wasp *Cephalonomia stephanoderis* and predators such as birds, thrips and ants have been used for the biological control of CBB (Vega *et al*., 2009). In South American countries such as Mexico and Colombia, there are several reports on the effects of ants on the CBB. For example, *Pheidole synanthropica* was confirmed to carry the CBB to their nests, and *Azteca instabilis* that have a symbiotic relationship with scale insects on coffee trees expels the CBB (Jiménez-Soto *et al*., 2013). Besides these two ant species, the usefulness for the CBB control is expected for the following species; *Brachymyrmex* sp., *Camponotus* sp., *Crematogaster* sp., *Dorymyrmex* spp., *Gnamptogenys sulcate*, *Pseudomyrmex* sp., *Solenopsis* spp. and *Tetramorium* sp. (Jiménez-Soto *et al*., 2013; Philpott and Armbrecht, 2006). In Thailand, however, ants have not yet been considered as a biological control agent for the CBB. In this study, the ant behavior toward adult CBB was observed in order to know the potential of ants as biological control of the CBB.

Materials and Methods

The behavioral response of ants to adult CBB was observed in the laboratory. Colonies of ants were collected at the coffee plantation of Pa Miang village, Doi Saket district, Chiang Mai province (910m alt., 18°59'N, 99°20'E) on 17 June, 2015. Each ant colony that nested in rotten coffee branches on the ground were put into a plastic bag and brought back to the laboratory. Then, each branch was opened and all ant individuals were collected by an aspirator and moved to a plastic breeding case (20 x 15 x 7 cm). A small plastic case (8– x 5 x 1.5 cm or 6 x 3 x 1 cm) lined with plaster was put inside the breeding case as a nest chamber. Colonies containing only workers without brood were not used because they may not perform normal foraging behavior. Queenless colonies were used for this experiment. Colonies of the following ant species were collected in the coffee plantation; *Camponotus nicobarensis*, *Crematogaster* sp. PM2, *Dolichoderus* sp. PM1, *Tapinoma* sp. PM1, *Technomyrmex modiglianii* and *Technomyrmex yamanei*. All studied ant species are common in this plantation (Onishi *et al*., 2016). In addition, a colony of *Anoplolepis gracilipes* was collected from a coffee plantation of Teentok Royal Project Development Center (18°87'N, 99°32'E). This species was most dominant in that coffee region. The thorax length (mm) and head width (mm) of the ants used in this study were measured for comparing the body size of the CBB. The coffee berries containing adult CBB were collected and kept through the experiment.

After a CBB was introduced in the foraging arena of the breeding case, the behavioral response of the ants was recorded. Figure 1 shows the behavioral process of ants against the CBB. The following ant behaviors, adapted from De la Mora *et al.* (2008) were recorded: (1) antennal contacting: the ant contacted the CBB with its antennae before attacking it, (2) attacking: the ant attacked the CBB with its mandibles or abdominal tip, (3) carrying: the ant grasped the CBB with its mandibles and carried it. Furthermore, 'attacking' was divided into the following two types: (2a) short attacking: the ant attacked the CBB for less than one second, (2b) intensive attacking: the ant continuously attacked for more than one second. Once a worker touched a CBB, we observed its subsequent behaviors. The observation was repeated 20 times for each ant

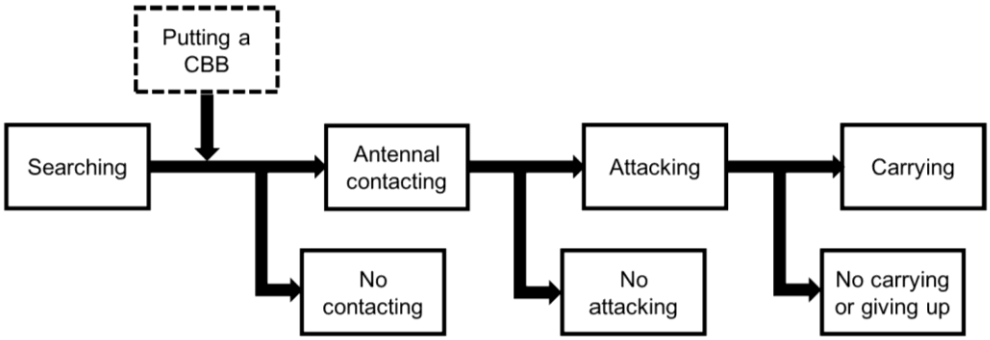

Figure 1. The behavioral process of ants against the CBB. Searching: the ant walked randomly at a moderate speed outside the nest case; Antennal contacting: the ant did contact the CBB with its antennae before the attack; No contacting: the ant did not show any interest for the CBB and did not contact it; Attacking: the ant grasped the CBB with its mandibles or attacked it with the abdominal tip; Carrying: the ant carried the CBB; Giving up: the ant could not lift the CBB and walked away

species. If ants did not recognize a CBB for 10 min, the observation was stopped. For 'attacking' and 'carrying', the duration of these behaviors was also recorded. The differences of behavioral response among species (the ratio of workers performing a given behavior) was examined by pair wise comparison using Fisher test. Multiple comparison of the average duration of the 'Attacking' and 'Carrying' behaviors among ant species was analyzed by Ryan-test using the statistical software R (R Core Team, 2013).

Results

The thorax length (mm) and head width (mm) of the ants used in this study were shown with body size (head width and total body length) of CBB (Figure 2). Among seven ant species, *Camponotus nicobarensis* was the largest species while *Tapinoma* sp. PM1 was the smallest ant.

Most foraging workers touched the CBB with their antennae when they encountered them in the foraging arena. The only exceptions were five workers of *C. nicobarensis* and one worker of *Anoplolepis gracilipes* that ignored the CBB for ten minutes until the observation finished. Figure 3 showed the frequency of each behavior after the ant contacted the CBB. Two to six workers of each species walked away without showing any aggressive behavior toward the CBB. The ratio of such indifferent workers was not different among species (pairwise comparisons using Fisher test). The remaining workers showed short time aggression or intensive aggression. The comparison among the seven ant species indicated that a significant difference in the ratio of workers showing intensive aggression was only found between *Dolichoderus* sp. PM1 and *T. yamanei* (P = 0.023). Figure 4 showed average duration of intensive attacking and carrying performed by each ant species. The duration of intensive attack varied from a few to 150 seconds, however, no significant difference in average duration was detected among ant species (Ryan-test). When *Tapinoma* sp. PM1 workers showed intensive attack, this was usually performed by multiple workers (Figure 5), while in the other species, attacking was always done by single workers.

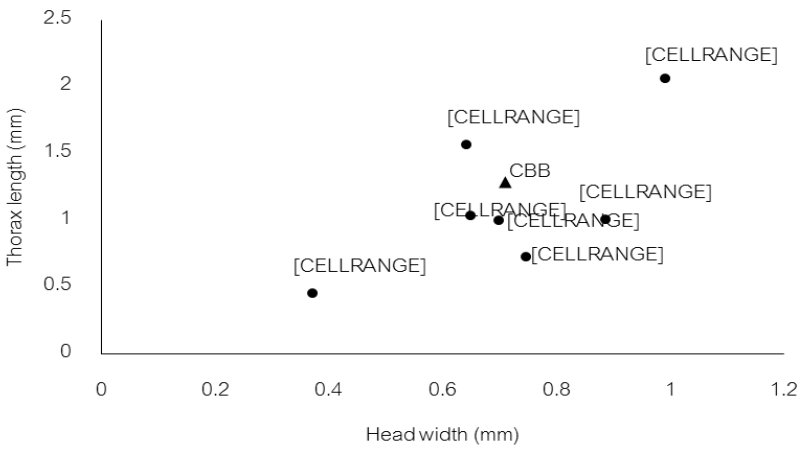

Figure 2. The thorax length and head width (mm) of each ant species. Ta: *Tapinoma* sp. PM1; Tem: *Technomyrmex modiglianii*; Do: *Dolichoderus* sp. PM1; Tey: *Technomyrmex yamanei*; Cr: *Crematogaster* sp. PM2; Ag: *Anoplolepis gracilipes*; Cn: *Camponotus nicobarensis.* The body size of CBB were shown by head width (mm) and body length (mm)

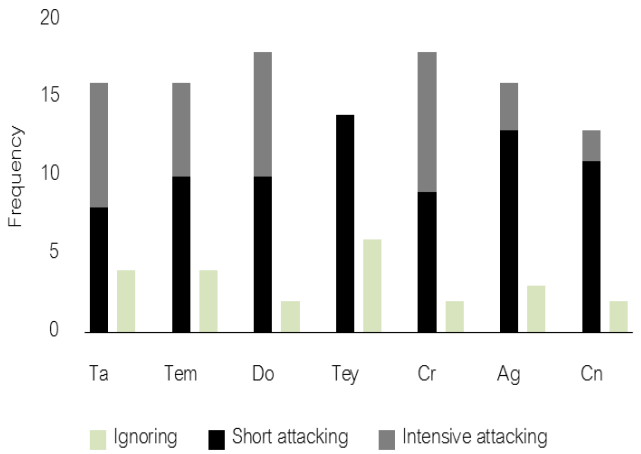

Figure 3. Frequency of each attacking behavior displayed by the seven ant species. Ta: *Tapinoma* sp. PM1; Tem: *Technomyrmex modiglianii*; Do: *Dolichoderus* sp. PM1; Tey: *Technomyrmex yamanei*; Cr: *Crematogaster* sp. PM2; Ag: *Anoplolepis gracilipes*; Cn: *Camponotus nicobarensis*

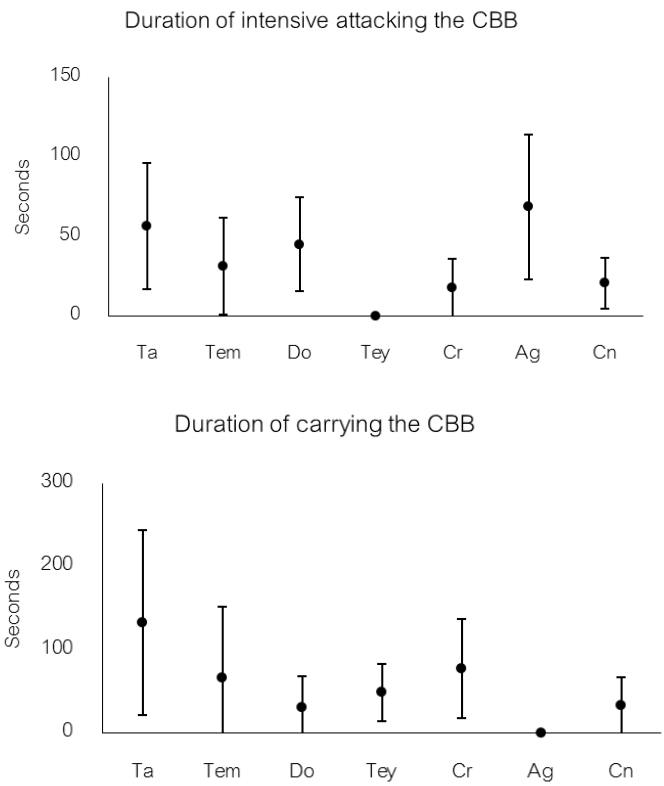

Figure 4. Average duration of each behavior performed by each ant species. Ta: *Tapinoma* sp. PM1; Tem: *Technomyrmex modiglianii*; Do: *Dolichoderus* sp. PM1; Tey: *Technomyrmex yamanei*; Cr: *Crematogaster* sp. PM2; Ag: *Anoplolepis gracilipes*; Cn: *Camponotus nicobarensis*

Figure 5. The workers of *Tapinoma* sp. PM1 gathered around a CBB

After the short or intensive attacks, all workers of *A. gracilipes* (n = 17) walked away but some workers of the other ant species picked up the CBB with their mandibles and carried it to other places in the foraging arena. The ratio of workers that carried the CBB after attacking in *A. gracilipes* was significantly lower than that of *Dolichoderus* sp. PM1 ($P = 0.023$) and *T. yamanei* ($P = 0.023$). The duration of carrying was not significantly different among species, however, the efficiency of carrying CBB seemed to be different among species. Workers of *C. nicobarensis* and *Dolichoderus* sp. PM1 readily picked up the CBB and carried it, while workers of the other species often failed to manipulate the CBB. No workers of any species carried the CBB to their nest chambers, and they never fed on the CBB.

If "intensive attacking" and "carrying" were regarded as "strong interference behavior", the ratio showing the strong interference behavior in *A. gracilipes* was significantly smaller than that of *Dolichoderus* sp. PM1 ($P<0.001$).

Discussion

All ant species studied in this research never fed on the adult CBB, however, they showed attacking and carrying behavior against the CBB. These behaviors may result in expelling the CBB from coffee trees and thus reducing the infestation of coffee berries (Jiménez-Soto *et al*., 2013). The behavioral response against the CBB varied among the seven ant species, although a statistically significant difference was not found in the most species. A possible reason for the absence of statistical differences may be the small sample size. However, our results may give an important insight into the usefulness of ants for biological control of CBB in Thailand. Two relatively large sized ants, *A. gracilipes* and *C. nicobarensis* (see Figure 2), seem to be less effective among the seven ant species we tested. *A. gracilipes* workers never showed carrying behavior, and intensive attacks were observed only three times. *C. nicobarensis* workers often ignored the CBB, and also intensive attacks were rare. In ants, worker body size affects prey size selection as shown in some seed harvesting ants (Kaspari, 1996). For larger sized ants, the adults of CBB may be too small to be hunted as prey. Among the five other ant

species, *Dolichoderus* sp. PM1 seems to be the most effective biological control agent, because of the frequent interference behavior against the CBB. Furthermore, the workers can manipulate the adult CBB very well. Although the frequency is rather low, approx. 50% of encounters resulted in strong interference behavior in the other four species. Especially in *Tapinoma* sp. PM1, the duration of both intensive attacks and carrying was relatively long, although there was no statistical difference when compared to the other ants. The most dominant ant species in the coffee plantation in Pa Miang (Onishi *et al*., 2016), *T. yamanei*, showed a unique behavioral response: they rarely performed intensive attacks, however, they frequently carried the CBB. Thus, *T. yamanei* may have a negative effect on the CBB.

As in former studies in Central and South America (Gonthier *et al*., 2013), relatively smaller ants seem to be effective for controlling the adult CBB in Thailand. Because they can enter the galleries made by the CBB (Gonthier *et al.,* 2013), they can also attack immatures of the CBB inside the berries. The effects of such small ants on the survival of CBB immatures should be investigated for evaluating the usefulness of ants for biological control of the CBB in Thailand.

Acknowledgement

We would like to thank the staff and the students of Division of Entomology, Department of Entomology and Plant Pathology, Chiang Mai University for their support, encouragements, and arranging this study; all staff and the students in the laboratory of Entomology, Faculty of Agriculture, Kagawa University for their help, support and encouragements, and Prof. Johan Billen for comments on the manuscript.

References

Buranapanichpan, A. and Y. Chanbang. 2014. Infestation of coffee berry borer and controlling efficiency of attractants. Journal of Agriculture 30(3): 223-231.

De la Mora, A., G. Pérez-Lachaud and J.P. Lachaud. 2008. Mandible strike: the lethal weapon of *Odontomachus opaciventris* against small prey. Behavioural Processes 78(1): 64-75.

Gonthier, D.J., K.K. Ennis, S.M. Philpott, J. Vandermeer and I. Perfecto. 2013. Ants defend coffee from berry borer colonization. BioControl 58(6): 815-820.

Jaramillo, J., E. Muchugu, F.E. Vega, A. Davis, C. Borgemeister and A. Chabi-Olaye. 2011. Some like it hot: the influence and implications of climate change on coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and coffee production in East Africa. PLoS One 6(9): e24528.

Jiménez-Soto, E., J.A. Cruz-Rodríguez, J. Vandermeer and I. Perfecto. 2013. *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) and its interactions with *Azteca instabilis* and *Pheidole synanthropica* (Hymenoptera: Formicidae) in a shade coffee agroecosystem. Environmental Entomology 42(5): 915-924.

Kaspari, M. 1996. Worker size and seed size selection by harvester ants in a Neotropical forest. Oecologia 105(3): 397-404.

Le Pelley, R.H. 1968. Pests of Coffee. Longmans, Green and Co. Ltd., London. 415 p.

Onishi, Y., W. Jaitrong, P. Suttiprapan, S. Buranapanichpan, Y. Chanbang and F. Ito. 2016. Ant species diversity in coffee plantation in Chiang Mai province, Northern Thailand. The Thailand Natural History Museum Journal 10(1): 33-48.

Philpott, S. M. and I. Armbrecht. 2006. Biodiversity in tropical agroforests and the ecological role of ants and ant diversity in predatory function. Ecological Entomology 31(4): 369-377.

R Core Team. 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

Riwthong, S., P. Schreinemachers, C. Grovermann and T. Berger. 2015. Land use intensification, commercialization and changes in pest management of smallholder upland agriculture in Thailand. Environmental Science and Policy 45: 11-19.

Suttiprapan, P. and Y. Chanbang. 2014. Survey of insect pests of Arabica coffee and their natural enemies in Chiang Mai and Chiang Rai provinces. Journal of Agriculture 30(3): 233-242.

Thayaping, P. and P. Suttiprapan. 2015. Geo-information technology application for studying species diversity and distribution of Arabica coffee insect pests in Chiang Mai and Chiang Rai provinces. Journal of Agriculture 31(2): 203-213.

Vega, F. E., F. Infante, A. Castillo and J. Jaramillo. 2009. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. Terrestrial Arthropod Reviews 2(2): 129-147.

การควบคุมหนอนเจาะลำต้นกาแฟ *Xylotrechus quadripes* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae) ในสภาพแปลงปลูก

Control of Coffee White Stem Borer, *Xylotrechus quadripes* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae) in field Conditions

พีระยา คำดี[1/] **เยาวลักษณ์ จันทร์บาง**[1/*] **และ ไสว บูรณพานิชพันธุ์**[1/]

Phiraya Kumdi[1/], Yaowaluk Chanbang[1/*] and Sawai Buranapanichpan[1/]

[1/]*ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200*

[1/]*Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

**Corresponding author: Email: lukksu@hotmail.com*

(Received: 1 August 2016; Accepted: 31 August 2016)

Abstract: Outbreak survey of coffee white stem borer (CWSB), *Xylotrechus quadripes* Chevrolat, was carried out in arabica coffee plantations of Ban Pa Miang, Chae Son sub-district, Mueang Pan district, Lampang province and Ban Mon Ngo, Mueang Kai sub-district, Mae Taeng district, Chiang Mai province. Number of infested plants caused by CWSB in Ban Pa Miang and Ban Mon Ngo were 87 and 58% respectively. CWSB sex pheromone, (s) 2-hydroxy-3-decanone, and sticky cross-vane trap were tested for attracting CWSB for 8 months. Only 5 males and 3 females of CWSB were caught during November 2015 to June 2016. The results indicated that both male and female responded to 2-hydroxy-3-decanone. Other cerambycids were also caught in this pheromone trap especially *Demonax* sp. 2 which found in April, 2016 (103 adults). Two mechanical control measures were done using stem rubbing and stem rubbing incorporated with stem painting with white latex paint in order to remove insect eggs and prevent egg deposition. The results showed that there was no CWSB infestation on the treated plants while the untreated control showed 42.5% of infestation.

Keywords: Coffee white stem borer, *Xylotrechus quadripes*, arabica coffee, sex pheromone, 2-hydroxy-3-decanone, mechanical control

บทคัดย่อ: การสำรวจการระบาดหนอนเจาะลำต้นกาแฟ (*Xylotrechus quadripes* Chevrolat) ในพื้นที่แปลงปลูกกาแฟของเกษตรกร พบว่าบ้านป่าเหมี้ยง ตำบลแจ้ซ้อน อำเภอเมืองปาน จังหวัดลำปาง มีการระบาด 87% และพื้นที่บ้านม่อนเงาะ ตำบลเมืองก๋าย อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ มีการระบาด 58% การทดสอบประสิทธิภาพของฟีโรโมนเพศ (s)-2-hydroxy-3-decanone ร่วมกับกับดัก cross-vane trap เป็นเวลา 8 เดือน พบตัวเต็มวัยเพศผู้ 5 ตัว และตัวเต็มวัยเพศเมีย 3 ตัว แสดงให้เห็นว่าแมลงทั้ง 2 เพศ มีการตอบสนองต่อกับดักฟีโรโมนเพศในอัตราที่ต่ำ และฟีโรโมนเพศดังกล่าวยังสามารถดึงดูดตัวเต็มเต็มของด้วงหนวดยาว (วงศ์ Cerambycidae) ชนิดอื่นด้วย โดยในเดือนเมษายน 2559 พบด้วงหนวดยาว *Demonax* sp. 2 103 ตัว ทำการศึกษาเพื่อกำจัดไข่และป้องกันการวางไข่ของแมลงโดยวิธีกล โดยการขัดผิวเปลือกลำต้นกาแฟ และการขัดผิวเปลือกลำต้นร่วมกับการทาสีขาวที่ลำต้นกาแฟ พบว่าหลังจากขัดผิวเปลือกลำต้นกาแฟและการขัดผิวเปลือกลำต้นร่วมกับการทาสีลำต้นกาแฟเป็นเวลา 8 เดือน ไม่พบต้นกาแฟแสดงอาการที่ถูกแมลงเข้าทำลาย ขณะที่ชุดควบคุมพบการเข้าทำลายของแมลงสูงถึง 42.50%

คำสำคัญ: *Xylotrechus quadripes* กาแฟอะราบิกา 2-hydroxy-3-decanone การควบคุมโดยวิธีกล

คำนำ

แมลงศัตรูกาแฟจัดเป็นอุปสรรคในการปลูกเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ส่งผลทำให้ผลผลิตเสียหายเป็นอย่างมากโดยแมลงศัตรูกาแฟอะราบิกาที่พบทางภาคเหนือ ได้แก่ เพลี้ยหอยสีเขียว (*Coccus viridis* Green) ซึ่งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเข้าทำลายกาแฟ โดยการดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณยอดอ่อน ใบอ่อน และผลอ่อน (ชุลีรัตน์ และคณะ, 2559) แมลงที่เข้าทำลายผล กาแฟ โดยตรงกัดกินอยู่ภายในเมล็ดกาแฟ คือ มอดเจาะผลกาแฟ (*Hypothenemus hampei*) (เผ่าไทย และปิยะวรรณ, 2558; อนุตร และเยาวลักษณ์, 2557) และแมลงที่เข้าทำลายภายในลำต้นกาแฟ ได้แก่ หนอนเจาะลำต้นกาแฟ (*Xylotrechus quadripes*) และหนอนเจาะกิ่งกาแฟ (*Zeuzera coffeae*) ทำให้กิ่ง หรือต้นกาแฟแห้งตาย (จริยา, 2540) หนอนเจาะลำต้นกาแฟ *X. quadripes* เป็นแมลงที่เข้าทำลายอยู่ภายในลำต้นกาแฟ ตัวเต็มวัยเป็นด้วงหนวดยาวขนาดเล็ก โดยระยะตัวหนอนเข้าทำลายและกัดกินเนื้อไม้อยู่ภายในลำต้น และกิ่งของต้นกาแฟ ส่งผลทำให้ต้นกาแฟแสดงอาการใบเหลือง กิ่งและลำต้นแห้งเหี่ยว หากตัวหนอนควั่นลำต้นเป็นแนวขวางมักทำให้ลำต้นกาแฟหักล้มได้ (จริยา, 2534; Visitpanich, 1994) เป็นสาเหตุที่สำคัญ ทำให้ไม่สามารถเก็บผลผลิตกาแฟได้ หากมีหนอนเจาะลำต้นกาแฟเข้าทำลายมาก ๆ ทำให้ต้นกาแฟเหี่ยวตายทั้งต้น โดยต้นกาแฟที่แห้งตายมักพบรอยเจาะออกของตัวเต็มวัย นอกจากกาแฟแล้วหนอนเจาะลำต้นกาแฟยังมีพืชอาศัยอื่น ๆ อีกหลายชนิด ได้แก่ พุดซ้อน มะลิดอย เพกา ประดู่ จามจุรี คูณ ต้นเข็ม สัก และเขี้ยวกระแต (Santosh *et al*., 2011) หนอนเจาะลำต้นกาแฟ มีเขตการแพร่ระบาดกว้างขวางในประเทศเพื่อนบ้านหลายประเทศ เช่น อินเดียตอนใต้ แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และจีนตอนใต้ (Hayashi and Makihara,1981) จากการสำรวจแปลงปลูกกาแฟของประเทศอินเดียพบว่าในพื้นที่เนินเขาพบการระบาดของหนอนเจาะลำต้นกาแฟ 9.7% (Shylesha and Veeresh, 1995) โดยประเทศจีนทางตอนใต้พบการระบาดของหนอนเจาะลำต้นกาแฟในแปลงปลูกกาแฟเพียง 1.04% (Rhainds *et al*., 2002) ในภาคเหนือพื้นที่ปลูกกาแฟอะราบิกามีรายงายการเข้าทำลายของหนอนเจาะลำต้นกาแฟ (จริยา, 2534) และการศึกษาเกี่ยวกับแมลงศัตรูและโรคที่สำคัญในพื้นที่ปลูกกาแฟอะราบิกาบนที่สูงรายงานว่าหนอนเจาะลำต้นกาแฟ มีการระบาดรุนแรงที่สุดในพื้นที่ขยายผลโครงการหลวงโหล่งขอด จังหวัดเชียงใหม่ คือ 69% (เยาวลักษณ์ และคณะ, 2557) ซึ่งจากการศึกษาของ Jayarama *et al*. (2007) พบว่าการใช้ฟีโรโมน 2-hydroxy-3-decanone ร่วมกับกับดัก cross-vane trap โดยเป็นฟีโรโมนตัวเต็มวัยเพศผู้ สามารถควบคุมจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียหนอนเจาะลำต้นกาแฟได้ใน ประเทศอินเดีย และจากการรายงานของปิยะวรรณ และเยาวลักษณ์ (2557) รายงานว่า ตัวเต็มวัยของหนอนเจาะลำต้นกาแฟถูกดักได้

ในกับดักดัดแปลงร่วมกับสารล่อ CMU-C1 ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2554 - กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2555 คิดเป็น 0.74% ของแมลงที่ได้จากกับดักในแปลงปลูกกาแฟอะราบิกาทางภาคเหนือ ทั้งนี้การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับหนอนเจาะลำต้นกาแฟในประเทศไทยยังมีข้อมูลน้อย ทำให้ขาดข้อมูลที่ทันสมัย ทันเหตุการณ์ ในการเฝ้าระวังการระบาดของแมลงชนิดนี้ที่สร้างความเสียหาย ต่อผลผลิตกาแฟ และการป้องกันกำจัดหนอนเจาะลำต้นกาแฟทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากตัวหนอนเข้าทำลายอยู่ภายในลำต้นกาแฟทำให้ไม่ทราบถึงการเข้าทำลายของแมลง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับหนอนเจาะลำต้นกาแฟในแปลงปลูกกาแฟอะราบิกาเพิ่มเติมเพื่อได้ข้อมูลที่ถูกต้อง ซึ่งวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อสำรวจและประเมินการระบาดของหนอนเจาะลำต้นกาแฟในสภาพแปลงปลูกกาแฟอะราบิกา และศึกษาวิธีการในป้องกันกำจัดหนอนเจาะลำต้นกาแฟ โดยการทดสอบประสิทธิภาพของฟีโรโมนเพศ 2-hydroxy-3-decanone และการใช้วิธีกลในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะลำต้นกาแฟในพื้นที่แปลงปลูกกาแฟอะราบิกาทางภาคเหนือของประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจและการประเมินอัตราการระบาดของหนอนเจาะลำต้นกาแฟในแปลงปลูกกาแฟ

สุ่มสำรวจต้นกาแฟพันธุ์อะราบิกาและประเมินอัตราการระบาดของหนอนเจาะลำต้นกาแฟ จำนวน 100 ต้น ในแปลงปลูกกาแฟของเกษตรกร จำนวน 2 ราย ในพื้นที่บ้านป่าเหมี้ยง ตำบลแจ้ซ้อน อำเภอเมืองปาน จังหวัดลำปาง ตั้งอยู่พิกัด ละติจูด: 19°10'35.30" เหนือ ลองจิจูด: 98°48'15.90" ตะวันออก และในพื้นที่บ้านม่อนเงาะ ตำบลเมืองก๋าย อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ ตั้งอยู่พิกัด ละติจูด: 18°42'26.28" เหนือ ลองจิจูด: 98°54'37.77" ตะวันออก ซึ่งมีความสูงจาก ระดับน้ำทะเลปานกลาง ประมาณ 1,200 และ 600 เมตร ตามลำดับ โดยประเมินอัตราการระบาดของหนอนเจาะลำต้นกาแฟจากต้นกาแฟพันธุ์อะราบิกา ทุก 2 เดือน ใน 2 พื้นที่ จากลักษณะอาการของต้นกาแฟที่คาดว่าถูกหนอนเจาะลำต้นกาแฟเข้าทำลายมี 5 ลักษณะ ได้แก่ 1) พบรอยควั่นรอบ ๆ กิ่งหรือลำต้นกาแฟ 2) ใบกาแฟมีสีเหลือง 3) พบรูออกตัวเต็มวัยของหนอนเจาะลำต้นกาแฟ 4) ใบหรือลำต้นมีลักษณะเหี่ยวแห้ง และ 5) ต้นกาแฟยืนต้นตาย

2. ศึกษาประสิทธิภาพของฟีโรโมนเพศ 2-hydroxy-3-decanone ในการดึงดูดตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟ

เตรียมกับดัก (cross-vane trap) โดยใช้แผ่นพลาสติกสีขาว (ฟิวเจอร์บอร์ด) ที่มีความหนา 3 มิลลิเมตร ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 10×20 นิ้ว จำนวน 2 แผ่น ใช้มีดตัดเป็นทางยาวบริเวณตรงกลางด้านล่างของแผ่นพลาสติกจนถึงบริเวณตรงกลางของแผ่นพลาสติกทั้ง 2 แผ่น โดยพื้นที่ตรงกลางพลาสติกใช้กรรไกรตัดให้เป็นวงกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 นิ้ว จากนั้นนำพลาสติกทั้ง 2 แผ่น มาประกอบกันเป็นรูปกากบาท แล้วนำไปติดตั้งบนไม้ไผ่ที่มีความสูงจากพื้นดินประมาณ 1.5 เมตร (Kumar, 2010) แล้วใช้กาวเหนียวทาแผ่นพลาสติกให้ทั่วทั้งแผ่น (ภาพที่ 1) ซึ่งพื้นที่บริเวณตรงกลางของกับดักใช้ล่อดแขวนหลอดฟีโรโมน 2-hydroxy-3-decanone (CWSB Lure; Pest Control (India) Private Limited)

ทำการสำรวจแปลงปลูกกาแฟที่มีการเข้าทำลายของหนอนเจาะลำต้นกาแฟในแปลงปลูกกาแฟของเกษตรกรบ้านป่าเหมี้ยง ตำบลแจ้ซ้อน อำเภอเมืองปาน จังหวัดลำปาง ในแปลงที่คาดว่าถูกหนอนเจาะลำต้นกาแฟเข้าทำลายจากอาการ 5 ลักษณะ แล้วนำกับดักฟีโรโมนเพศของตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟจำนวน 10 ชุด ไปติดตั้งให้กระจายแบบสุ่มทั่วทั้งแปลงปลูกกาแฟ เปลี่ยนฟีโรโมน ทุก 2 เดือน จากนั้นบันทึกผลการทดลองโดยการตรวจนับจำนวนตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟที่พบติดบนกับดักฟีโรโมนเพศ

Figure 1. Sticky cross-vane trap was set at 150 cm height above the ground and CWSB lure was hung at the center of window (arrow)

3. **การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีกลในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะลำต้นกาแฟในแปลงปลูกกาแฟอะราบิกา**

การทดสอบมีสมมุติฐานว่า การขัดต้นกาแฟสามารถช่วยกำจัดไข่และป้องกันการวางไข่ของแมลงได้ โดยสำรวจต้นกาแฟ เพื่อสังเกตลักษณะการเข้าทำลายของหนอนเจาะลำต้นกาแฟในแปลงปลูกกาแฟของเกษตรกรบ้านป่าเหมี้ยง ตำบลแจ้ซ้อน อำเภอเมืองปาน จังหวัดลำปาง จำนวน 2 ราย โดยตรวจพบว่ามีต้นกาแฟที่แสดงอาการของการเข้าทำลายจากหนอนเจาะลำต้นกาแฟในเดือนพฤษภาคม 2558 จากนั้นเลือกต้นกาแฟที่ปกติไม่มีการเข้าทำลายของหนอนเจาะลำต้นกาแฟ สังเกตจากต้นกาแฟที่มีใบสีเขียว ไม่พบรอยควั่นรอบ ๆ กิ่ง หรือลำต้นกาแฟ และไม่พบรูเจาะออกของตัวเต็มวัย บริเวณลำต้นหรือกิ่งกาแฟ สุ่มต้นกาแฟปกติดังกล่าวแล้วทำตามกรรมวิธีดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ดำเนินการใด ๆ)
กรรมวิธีที่ 2 ขัดผิวเปลือกลำต้นกาแฟควบคุมหนอนเจาะลำต้นกาแฟ
กรรมวิธีที่ 3 ขัดผิวเปลือกลำต้นกาแฟร่วมกับการทาสีขาวที่ลำต้นกาแฟ

ใช้ฟองน้ำล้างจาน (สตาร์-ไบรท์) การขัดผิวเปลือกลำต้นกาแฟตั้งแต่ส่วนของโคนต้นกาแฟขึ้นไปสูงประมาณ 50 เซนติเมตร และในกรรมวิธีที่ 3 เมื่อขัดเปลือกลำต้นกาแฟแล้ว ใช้สีทาบ้านสีขาวทาทับลงบนลำต้นกาแฟที่ขัดผิวเปลือกลำต้นกาแฟไว้ก่อนหน้านี้ จากนั้นบันทึกลักษณะอาการของต้นกาแฟทุกกรรมวิธีเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเป็นต้นกาแฟปกติ และไม่ทำการใด ๆ ทุก 2 เดือน รวม 4 ครั้ง โดยตรวจลักษณะอาการใบเหลือง ต้นโทรม และจำนวนรูออกตัวเต็มวัยของหนอนเจาะลำต้นกาแฟที่พบในแต่ละครั้ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. **การสำรวจและการประเมินอัตราการระบาดของหนอนเจาะลำต้นกาแฟ**

การสำรวจและประเมินการระบาดของหนอนเจาะลำต้นกาแฟจากต้นกาแฟพันธุ์อะราบิกาในเดือนกรกฎาคม 2558 โดยประเมินจาก 5 ลักษณะ ได้แก่ พบรอยควั่นรอบ ๆ กิ่ง หรือลำต้นกาแฟ (a) ใบกาแฟมีสีเหลือง (b) พบรูออกตัวเต็มวัยของหนอนเจาะลำต้นกาแฟ (c) ใบหรือลำต้นมีลักษณะเหี่ยวแห้ง (d) และต้นกาแฟยืน

ต้นตาย (e) (ภาพที่ 2) ซึ่งสามารถจัดกลุ่ม ลักษณะอาการของต้นกาแฟได้ 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มลักษณะอาการเชิงเดี่ยวของต้นกาแฟ (กลุ่มที่ 1), กลุ่มลักษณะอาการเชิงร่วม 2 อาการของต้นกาแฟ (กลุ่มที่ 2) และกลุ่มลักษณะอาการเชิง ร่วม 3 อาการของต้นกาแฟ (กลุ่มที่ 3) ซึ่งจากลักษณะอาการของ ต้นกาแฟทั้ง 3 กลุ่ม (ตารางที่ 1) ในแปลงกาแฟเกษตรกรบ้านป่าเหมี้ยง พบว่า กลุ่มที่ 1 มีจำนวนต้นกาแฟที่มีใบสีเหลืองมาก สุดเป็น 19% ส่วนกลุ่มที่ 2 พบจำนวนต้นกาแฟมีใบสีเหลืองร่วมกับลำต้นกาแฟที่มีลักษณะเหี่ยวแห้งมากสุด 13% และกลุ่มที่ 3 พบจำนวนต้นกาแฟที่มีรอยควั่นรอบลำต้นร่วมกับใบกาแฟสีเหลือง และลำต้นกาแฟที่มีลักษณะเหี่ยวแห้งมากสุดคิดเป็น 10% ส่วนในแปลงกาแฟเกษตรกรบ้านม่อนเงาะ จากลักษณะอาการของต้นกาแฟ ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า มีจำนวนต้นกาแฟปกติที่ไม่มี การเข้าทำลายของแมลงมากสุดคิดเป็น 66% โดยกลุ่มที่ 1 พบต้นกาแฟที่มีลักษณะเหี่ยวแห้งและต้นกาแฟที่มีรอยควั่นรอบลำต้นมากสุด กลุ่มที่ 2 พบจำนวนต้นกาแฟมีใบสีเหลืองร่วมกับลำต้นกาแฟที่มีลักษณะเหี่ยวแห้งมากสุด และกลุ่มที่ 3 พบจำนวนต้นกาแฟที่มีรอยควั่นรอบลำต้นร่วมกับใบกาแฟสีเหลืองและลำต้นกาแฟที่มีลักษณะเหี่ยวแห้งมากสุด คิดเป็น 6, 7 และ 3% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ในช่วงเดือนกรกฎาคม 2558 ถึงเดือนมีนาคม 2559 รวมระยะเวลา 8 เดือน พบว่า หนอนเจาะลำต้นกาแฟมีการระบาดในแปลงปลูกกาแฟเพิ่มสูงขึ้น สามารถจัดกลุ่มลักษณะอาการของต้นกาแฟเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มลักษณะอาการเชิงเดี่ยวของต้นกาแฟ (กลุ่มที่ 1), กลุ่มลักษณะอาการเชิงร่วม 2 อาการของต้นกาแฟ (กลุ่มที่ 2), กลุ่มลักษณะอาการเชิงร่วม 3 อาการของต้นกาแฟ (กลุ่มที่ 3) และกลุ่มลักษณะอาการเชิงร่วม 4 อาการของต้นกาแฟ (กลุ่มที่ 4) โดยในแปลงกาแฟบ้านป่าเหมี้ยง พบต้นกาแฟปกติ โดยเป็นต้นที่ไม่แสดงอาการของการเข้าทำลายโดยหนอนเจาะลำต้นกาแฟเพียง 13% (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่า ในแปลงปลูกกาแฟบ้านป่าเหมี้ยงซึ่งเป็นพื้นที่แปลงปลูกกาแฟในสภาพกลางแจ้งและมีไม้บังร่มน้อยมีการระบาดของหนอนเจาะลำต้นกาแฟสูงถึง 87%

Figure 2. Five symptoms of coffee plants infested by coffee white stem borer (CWSB); ridges of larval damage around stems (a), yellow leaves (b), some exit holes of adults (c), wilted leaves and dieback stems (d), totally died (e)

Table 1. Three major damage categories caused by coffee white stem borer (CWSB) of Ban Pa Miang, Chae Son sub-district, Mueang Pan district, Lampang province in July 2015

Damage category	Damage characteristics of CWSB in coffee plants	Number of plants	Percentage
No damage	green leaves and healthy plant	34	34%
Group 1	yellow leaves	19	29%
(single symptom)	dried stems	1	
	exit holes	2	
	ridges of larval damage around stem	7	
Group 2	yellow leaves + dried stems	13	22%
(combination of 2 symptoms)	wilted stem + exit holes	3	
	yellow leaves + exit holes	1	
	yellow leaves + ridges of larval damage around stem	5	
Group 3	ridges of larval damage around stem + yellow leaves + dried stems	10	15%
(combination of 3 symptoms)	yellow leaves + dried stems + exit holes	5	

Table 2. Three major damage categories caused by coffee white stem borer (CWSB) of Ban Mon Ngo, Mueang Kai sub-district, Mae Taeng district, Chiang Mai province in July 2015

Damage category	Damage characteristics of CWSB in coffee plants	Number of plants	Percentage
No damage	green leaves and healthy plant	66	66%
Group 1	yellow leaves	5	17%
(single symptom)	dried stems	6	
	ridges of larval damage around stem	6	
Group 2	yellow leaves + dried stems	7	14%
(combination of 2 symptoms)	wilted stem + exit holes	1	
	yellow leaves + ring of larval damage around stem	6	
Group 3	ridges of larval damage around stem + yellow leaves + dried stems	3	3%
(combination of 3 symptoms)			

ขณะที่ในแปลงกาแฟบ้านม่อนเงาะเป็นพื้นที่แปลงปลูกกาแฟที่มีไม้บังร่มค่อนข้างมาก พบต้นกาแฟปกติ 42% (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่า ในแปลงปลูกกาแฟบ้านม่อนเงาะมีการระบาดของหนอนเจาะลำต้นกาแฟ (58%) น้อยกว่าแปลงปลูกกาแฟบ้านป่าเหมี้ยง โดยสอดคล้องกับการรายงานของ จริยา (2540) รายงานว่า ต้นกาแฟที่ยืนต้นตาย หรือแห้งเหี่ยวตาย 80% ของต้นกาแฟที่ถูกเข้าทำลายโดยถูกหนอนเจาะลำต้นกาแฟในแปลงปลูกกาแฟอะราบิกาทางภาคเหนือ ส่วนใหญ่เป็นแปลงปลูกกาแฟในสภาพกลางแจ้ง และมีไม้บังร่มน้อย เช่นเดียวกับการรายงานของเยาวลักษณ์ และคณะ (2557) ได้ทำการสำรวจแมลงศัตรูและโรคที่สำคัญในพื้นที่ปลูกกาแฟอะราบิกาบนพื้นที่สูง ในแปลงปลูกกาแฟจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย จำนวน 8 พื้นที่ ได้แก่ ป่าแป๋ ม่อนเงาะ ป่าเมี่ยง ตีนตก ห้วยโป่ง โหล่งขอด แม่สลอง และวาวี พบว่า ในแปลงปลูกกาแฟโครงการขยายผลโครงการหลวงโหล่งขอด

Table 3. Four major damage categories caused by coffee white stem borer (CWSB) of Ban Pa Miang, Chae Son sub-district, Mueang Pan district, Lampang province in March 2016

Damage category	Damage characteristics of CWSB in coffee plants	Number of plants	Percentage
No damage	green leaves and healthy plant	13	13%
Group 1	yellow leaves	12	17%
(single symptom)	ridges of larval damage around stem	5	
Group 2	yellow leaves + dried stems	22	30%
(combination of 2 symptoms)	wilted stem + exit holes	4	
	yellow leaves + ridges of larval damage around stem	4	
Group 3	ridges of larval damage around stem + yellow leaves + dried stems	15	32%
(combination of 3 symptoms)	yellow leaves + dried stems + exit holes	17	
Group 4	ridges of larval damage around stem + yellow leaves + dried	5	5%
(combination of 4 symptoms)	stems + exit holes		
Dead tree		3	3%

Table 4. Four major damage categories caused by coffee white stem borer (CWSB) of Ban Mon Ngo, Mueang Kai sub-district, Mae Taeng district, Chiang Mai province in March 2016

Damage category	Damage characteristics of CWSB in coffee plants	Number of plants	Percentage
No damage	green leaves and healthy plant	42	42%
Group 1	yellow leaves	7	10%
(single symptom)	ridges of larval damage around stem	3	
Group 2	yellow leaves + dried stems	20	28%
(combination of 2 symptoms)	yellow leaves + ridges of larval damage around stem	6	
	ridges of larval damage around stem + dried stems	2	
Group 3	ridges of larval damage around stem + yellow leaves + dried stems	8	14%
(combination of 3 symptoms)	ridges of larval damage around stem + dried stems + exit holes	2	
	yellow leaves + dried stems + exit holes	4	
Group 4	ridges of larval damage around stem + yellow leaves + dried	1	1%
(combination of 4 symptoms)	stems + exit holes		
Dead tree		5	5%

ที่เป็นพื้นที่แปลงปลูกกาแฟในสภาพการปลูกกลางแจ้ง พบต้นกาแฟที่อาการต้นโทรม ใบกาแฟสีเหลือง และลำต้นเหี่ยว ซึ่งเป็นอาการของต้นกาแฟที่ถูกหนอนเจาะลำต้นเข้าทำลายถึง 69%

2. ศึกษาประสิทธิภาพของฟีโรโมนเพศ 2-hydroxy-3-decanone ในการดึงดูดตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟ

ฟีโรโมนเพศ 2-hydroxy-3-decanone ร่วมกับกับดัก cross-vane trap สามารถดึงดูดตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้น กาแฟ ในแปลงปลูกกาแฟของเกษตรกรบ้านป่าเหมี้ยง ช่วงเดือนพฤศจิกายน 2558 ถึงเดือนเมษายน 2559 พบตัวเต็มวัยหนอน เจาะลำต้นกาแฟเพศผู้ จำนวน 5 ตัว โดยลักษณะของต้นขาทั้ง 2 ข้าง มีความยาวที่ยาวกว่าส่วนปลายปีกของแมลง (ภาพที่ 3a) และพบตัวเต็มวัยของหนอนเจาะลำต้นกาแฟเพศเมีย จำนวน 3 ตัว ที่ลักษณะของต้นขาทั้ง 2 ข้าง มีความยาวสั้นกว่าส่วนปลายปีกของแมลง (ภาพที่ 3b) ซึ่งในการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่ากับดักฟีโรโมนเพศ 2-hydroxy-3-decanone สามารถดึงดูด ได้ทั้งเพศผู้และเพศเมียตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟในอัตราที่ต่ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Rhainds *et al*. (2001) ที่รายงานว่าฟีโรโมนเพศ 2-hydroxy-3-decanone สามารถดึงดูดตัวเต็มวัยเพศเมียในอัตราที่ต่ำ และไม่สามารถควบคุมประชากรของหนอนเจาะลำต้นกาแฟที่เข้าทำลายในแปลงปลูกกาแฟของสาธารณรัฐประชาชนจีนได้ อาจเป็นเพราะตัวเต็มวัยของแมลงทั้ง 2 เพศ มีพฤติกรรมของการผสมพันธุ์ที่ค่อนข้างซับซ้อน โดยต่างจากการศึกษาของ Jayarama *et al*. (2007) ได้รายงานว่าฟีโรโมน 2-hydroxy-3-decanone ซึ่งเป็นฟีโรโมนตัวเต็มวัยเพศผู้สามารถดึงดูดและควบคุมจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียของหนอนเจาะลำต้นกาแฟได้ในประเทศอินเดีย ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะในประเทศอินเดียมีพื้นที่แปลงปลูกกาแฟขนาดใหญ่และประชากรของแมลงมีความหนาแน่นสูง ทำให้การใช้ฟีโรโมนเพศ 2-hydroxy-3-decanone ในประเทศอินเดียสามารถดึงดูดตัวเต็มวัยเพศเมียของหนอนเจาะลำต้นกาแฟได้มากกว่า เมื่อเทียบกับประเทศไทยและสาธารณรัฐประชาชนจีน

นอกจากนี้ฟีโรโมนเพศ 2-hydroxy-3-decanone ร่วมกับกับดัก cross-vane trap ยังสามารถดึงดูดด้วงหนวดยาวในวงศ์ Cerambycidae ชนิดอื่นที่มีลักษณะคล้ายกับตัวเต็มวัยของหนอนเจาะลำต้นกาแฟ จำนวน 5 ชนิด ซึ่งในช่วงเดือนเมษายน 2559 พบด้วงหนวดยาวเหล่านี้มากที่สุดจำนวนทั้งหมด 120 ตัว (ตารางที่ 5) เมื่อวินิจฉัยโดยใช้หนังสือของสุขสวัสดิ์ (2558) สามารถ

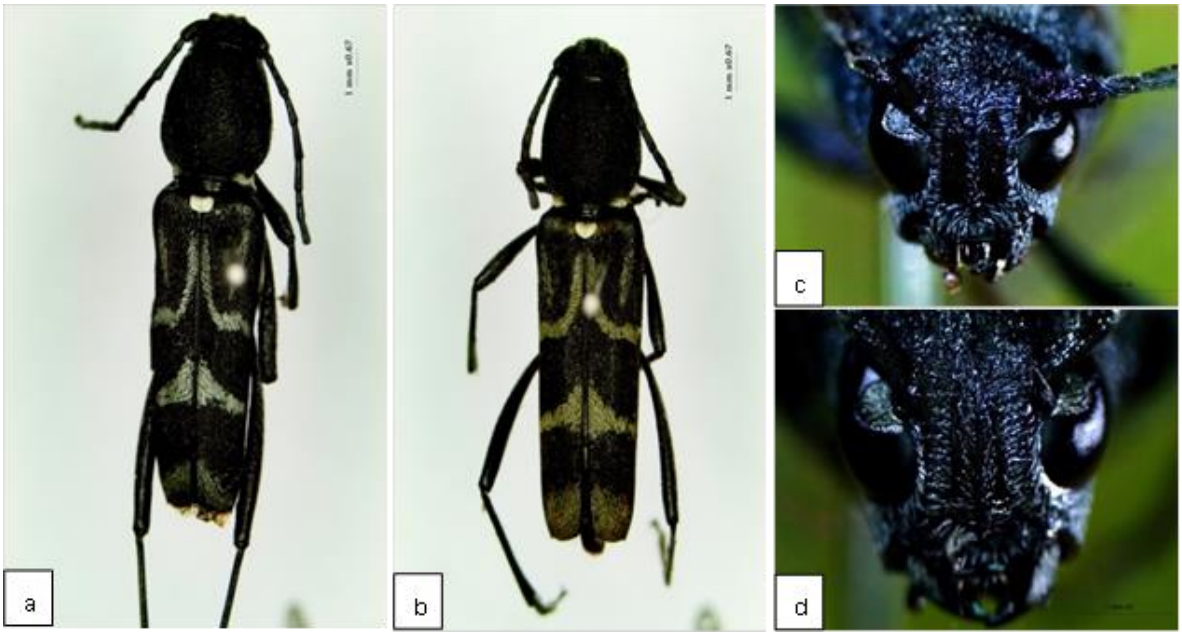

Figure 3. *Xylotrechus quadripes*: male (a), female (b), male front (c), female front (d)

Table 5. Total number of cerambycids (November 2015 to June 2016) in the cross-vane traps

Month/ year	Species	Number of insects in each cross-vane trap										Total	Damage of coffee trees	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		Yes	Unknown
November 2015	*Demonax* sp. 1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2		✓
	Xylotrechus quadripes	0	1 *	0	0	1 **	1 **	0	2 *	0	0	5	✓	
February 2016	*Demonax* sp. 2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1		✓
	Xylotrechus quadripes	0	0	0	0	1 *	0	0	0	0	0	1	✓	
March 2016	*Demonax* sp. 2	0	0	4	2	2	0	7	0	1	3	19		✓
	Chlorophorus sp.	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	4		✓
	Rhaphuma indifferens	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	4		✓
	Rhaphuma sp.	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	4		✓
	Xylotrechus quadripes	0	0	0	1 **	0	0	0	1 *	0	0	2	✓	
April 2016	*Chlorophorus* sp.	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	4		✓
	Demonax sp. 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		✓
	Demonax sp. 2	16	16	13	5	6	9	18	5	12	3	103		✓
	Rhaphuma indifferens	5	1	2	1	0	0	2	0	0	0	11		✓
	Rhaphuma sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		✓
May 2016	*Demonax* sp. 2	0	2	1	0	0	0	1	0	1	1	6		✓
June 2016	*Chlorophorus annularis*	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1		✓

* Male

** Female

จำแนกได้เป็น *Chlorophorus* sp., *Demonax* sp. 1, *Demonax* sp. 2, *Rhaphuma indifferens*, และ *Rhaphuma* sp. จำนวน 4, 1, 103, 11 และ 1 ตัว ตามลำดับ

Hall *et al*. (2006) รายงานการศึกษาฟีโรโมนที่สกัดได้จากตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟเพศผู้ ที่พบในประเทศ อินเดีย และวิเคราะห์ด้วย gas chromatography จากนั้นวัดการตอบสนองของแมลงเพศเมีย เมื่อได้รับสิ่งเร้าเป็นสารเคมี (กลิ่น) ซึ่งผลการตอบสนองพบว่าตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟเพศเมียตอบสนองกับสาระสำคัญ 3 ชนิด ซึ่งเป็นสาร volatile ส่วนใหญ่ที่แมลงเพศผู้ปล่อยออกมา ได้แก่ 1) (S)-2 hydroxy-3-decanone; 2) 3-hydroxy-2decanone และ 3) (S,S)- 2,3-dihydroxyoctane นอกจากนี้ได้ ทำการพิสูจน์ว่า สารสังเคราะห์นี้เป็น ฟีโรโมนเพศ เนื่องจากมีผลดึงดูดเพศเมีย แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับจำนวนเพศผู้ที่ตอบสนอง ซึ่ง Rhainds *et al*. (2001) และ Hall *et al*. (2006) รายงานว่า (S)-2 hydroxy-3-decanone เป็นฟีโรโมนเพศที่ตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟเพศผู้ผลิตออกมา อย่างไรก็ตามเมื่อนำ (S)-2 hydroxy-3-decanone มาทดสอบ พบว่า แมลงเพศเมียมีการตอบสนองต่อฟีโรโมนในระดับต่ำ โดยมีสมมุติฐานหลายประการได้แก่ สารนี้มีผลดึงดูดทั้งเพศผู้และเพศเมีย และพฤติกรรมการสืบพันธุ์ตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟค่อนข้างซับซ้อน ซึ่งฟีโรโมน S)-2 hydroxy-3-decanone มีผลดึงดูดแมลงทั้งเพศผู้ และเพศเมียให้เข้าหา แต่พฤติกรรมของแมลงเพศเมียในธรรมชาติต้องการบินเข้าหาเพศผู้ก่อนการผสมพันธุ์หลายครั้ง เพศเมียมีความสนใจแสดงพฤติกรรมต้องการผสมพันธุ์กับเพศเดียวกัน นอกจากนี้ เพศผู้หลังการผสมพันธุ์มีพฤติกรรมป้องกันเพศผู้ตัวอื่นเข้าหาเพศเมีย ด้วยพฤติกรรมดังกล่าวทำให้ความสนใจฟีโรโมนสังเคราะห์ลดลง (Rhainds *et al*., 2001)

นอกจากนี้ Rhainds *et al*. (2001) ได้ทดลองใช้ตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟทั้งเพศผู้และเพศเมียบรรจุอยู่ในซองวางร่วมกับกับดักกาวเหนียวเพื่อให้เป็นตัวดึงดูดแมลงในธรรมชาติ พบว่า แมลงทั้งสองเพศตอบสนองเข้าหาแมลงที่กับดักได้ดีทั้งสองเพศโดยที่แมลงเพศเมียที่เป็นตัวดึงดูด (อยู่กับกับดัก) สามารถดึงดูดแมลงทั้งเพศผู้และเพศเมียในธรรมชาติ แต่พบเพศเมียจำนวนน้อยกว่า และเมื่อนำแมลงเพศผู้เป็นตัวล่อในทำนองเดียวกัน ก็สามารถดึงดูดแมลงได้ทั้งสองเพศแต่พบว่า เพศเมียเข้าหาในจำนวนที่มากกว่า แมลงเพศผู้ จะเห็นได้ว่าในธรรมชาติเอง ตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟมีการตอบสนองที่ดึงดูดเพศตรงข้ามทั้งสองเพศ สำหรับเพศผู้ที่ไม่ได้ผสมพันธุ์มาก่อน (unmated male) มีผลดึงดูดแมลงเพศเมียได้ไม่แตกต่างจากการใช้ฟีโรโมนสังเคราะห์ (Hall *et al*., 2006; Murphy *et al*., 2008)

ในการทดลองนี้ การใช้ฟีโรโมนสังเคราะห์ S)-2 hydroxy-3-decanone ยังสามารถดักด้วงหนวดยาวชนิด *Demonax* sp. 2 ได้ในปริมาณที่มากกว่าตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hall *et al*. (2006) ที่ทำการศึกษาในประเทศอินเดีย พบว่า *Demonax balyi* มาติดกับดักในจำนวนที่สูงกว่าตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีกลในการควบคุมหนอนเจาะลำต้นกาแฟ

ต้นกาแฟที่ขัดผิวเปลือกลำต้นในช่วงความสูง 50 เซนติเมตร จากโคนต้นกาแฟ และการขัดผิวเปลือกลำต้นร่วมกับการทาสีขาวที่ลำต้นกาแฟในช่วงเวลาเดียวกัน เพื่อกำจัดไข่และป้องกันการวางไข่ของแมลง ในพื้นที่แปลงปลูกกาแฟของเกษตรกรบ้านป่าเหมี้ยง จำนวน 2 ราย เลือกต้นกาแฟจำนวน 10 ต้น ในแต่ละแปลง โดยหลังจากขัดผิวเปลือกลำต้นกาแฟและการขัดผิวเปลือกลำต้นร่วมกับการทาสีลำต้นกาแฟในเดือนกรกฎาคม 2558 โดยหลังจากการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีกลเป็นเวลา 8 เดือน พบว่า ต้นกาแฟในแปลงปลูกกาแฟอะราบิกาของเกษตรกรทั้ง 2 ราย ไม่แสดงอาการของการถูกเข้าทำลายโดยหนอนเจาะลำต้นกาแฟ ซึ่งไม่พบลักษณะอาการที่คาดว่าถูกหนอนเจาะลำต้นเข้าทำลายดังกล่าว ต้นกาแฟในแปลงปลูกกาแฟทั้ง 2 แปลง ไม่ปรากฏอาการรอยควั่นรอบ ๆ กิ่ง หรือรอบลำต้นกาแฟ ไม่พบลักษณะอาการที่กิ่งหรือลำต้นมีลักษณะเหี่ยวแห้ง ใบของกาแฟมีสีเขียว และไม่พบรูเจาะออกตัวเต็มวัยของหนอนเจาะลำต้นกาแฟ สำหรับชุดควบคุมต้นกาแฟในแปลงปลูกกาแฟอะราบิกาของเกษตรกรทั้ง 2 ราย โดยต้นกาแฟที่ไม่ได้ดำเนินการใด ๆ พบการทำลายของหนอนเจาะลำต้น 42.50% (ตารางที่ 6) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bhat *et al*. (1992) รายงานว่าการใช้ถุงกระสอบป่านหรือใยมะพร้าวขัดเอาเปลือกผิวของลำต้น กาแฟออกไป ก่อนถึงช่วงเวลาการออกเป็นตัวเต็มวัยของหนอนเจาะลำต้นกาแฟ สามารถควบคุมและป้องกันตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ลงบนลำต้นกาแฟได้ นอกจากนี้การขัดผิวเปลือกลำต้นกาแฟโดยใช้ถุงมือใยมะพร้าว (coir glove) กับต้นกาแฟที่มีอายุประมาณ 3-4 ปี ในช่วงเดือนกรกฎาคม - สิงหาคม ก่อนถึงช่วงเวลาที่แมลงผสมพันธุ์และวางไข่ สามารถป้องกันตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ลงบนเปลือกลำต้นกาแฟได้ 25.70% และช่วยกำจัดไข่ของแมลงออกไปจากลำต้นกาแฟ (Murphy *et al*., 2008)

Table 6. Number of infested coffee plants caused by coffee white stem borer (CWSB) at Ban Pa Miang, Chae Son sub-district, Mueang Pan district, Lampang province from July 2015 to March 2016

Month after trunk scrubbing and stem painting	Number of infested coffee plant			Percentage of infested plant
	trunk scrubbing (n=20)	trunk scrubbing and stem painting (n=20)	control group (n=40)	
0	0	0	0	0.00
2	0	0	1	2.50
4	0	0	11	27.50
6	0	0	14	35.00
8	0	0	17	42.50

สรุป

การสำรวจการระบาดของหนอนเจาะลำต้นในแปลงปลูกกาแฟของเกษตรกรบ้านป่าเหมี้ยง ตำบลแจ้ซ้อน อำเภอเมืองปาน จังหวัดลำปาง และพื้นที่เกษตรกรบ้านม่อนเงาะ ตำบลเมืองก๋าย อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่า ในแปลงปลูกกาแฟของเกษตรทั้ง 2 ราย มีการระบาดของหนอนเจาะลำต้นกาแฟสูง คิดเป็น 87 และ 58% ตามลำดับ สำหรับการควบคุมหนอนเจาะลำต้นกาแฟ แบบรวมวิธี โดยการใช้ฟีโรโมนเพศตัวเต็มวัยหนอนเจาะลำต้นกาแฟ 2-hydroxy-3-decanone ร่วมกับกับดัก cross-vane trap ในพื้นที่ของเกษตรกรบ้านป่าเหมี้ยง เป็นระยะเวลา 8 เดือน พบว่า ฟีโรโมนเพศสามารถดึงดูดตัวเต็มวัยเพศผู้ 5 ตัว และตัวเต็ม วัยเพศเมียเพียง 3 ตัว เท่านั้น โดยการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ตัวเต็มวัยทั้ง 2 เพศ มีการตอบสนองต่อกับดักฟีโรโมนเพศ ในอัตราที่ต่ำ และการควบคุมโดยวิธีกลเพื่อกำจัดไข่และป้องกันการวางไข่ของแมลง โดยการขัดผิวเปลือกลำต้นกาแฟ และการขัดผิวเปลือกลำต้นร่วมกับการทาสีขาวที่ลำต้นกาแฟในพื้นที่เกษตรกรบ้านป่าเหมี้ยง จำนวน 2 ราย พบว่า หลังจากการขัดผิวเปลือกลำต้นกาแฟและการขัดผิวเปลือกลำต้นร่วมกับการทาสีลำต้นกาแฟ เป็นเวลา 8 เดือน ไม่พบต้นกาแฟแสดงอาการที่ถูกเข้าทำลายโดยหนอนเจาะลำต้นกาแฟ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบการเข้าทำลายของหนอนเจาะลำต้นกาแฟ 42.50% ซึ่งผลการทดลองนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมและลดการเข้าทำลายของหนอนเจาะลำต้นกาแฟในแปลงปลูกกาแฟอะราบิกาได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวง และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนในการทำการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จริยา วิสิทธิ์พานิช. 2534. การศึกษานิเวศวิทยาของหนอนเจาะต้นกาแฟ *Xylotrechus quadripes* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae) ในภาคเหนือของประเทศไทย: รูปร่างลักษณะและชีววิทยาของแมลง. วารสารเกษตร 7(3): 228-241.

จริยา วิสิทธิ์พานิช. 2540. แมลงศัตรูกาแฟอราบิก้าบนพื้นที่สูงของประเทศไทยและแนวทางในการป้องกันกำจัด. หจก. สมศักดิ์การพิมพ์, เชียงใหม่. 42 หน้า.

ชุลีรัตน์ รังสรรค์ ปิยะวรรณ สุทธิประพันธ์ และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง. 2559. ชีววิทยาของเพลี้ยหอยสีเขียว (*Coccus viridis* Green) และการควบคุมด้วยสารฆ่าแมลงและเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในแปลงปลูกกาแฟ. วารสารเกษตร 32(1): 83-93.

ปิยะวรรณ สุทธิประพันธ์ และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง. 2557. การสำรวจแมลงศัตรูกาแฟอาราบิก้าและแมลงศัตรูธรรมชาติในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย. วารสารเกษตร 30(3): 233-242.

เผ่าไท ถายะพิงค์ และปิยะวรรณ สุทธิประพันธ์. 2558. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศในการศึกษาความหลากชนิดและการแพร่กระจายของแมลงศัตรูกาแฟอราบิกาในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย. วารสารเกษตร 31(2): 203-213.

เยาวลักษณ์ จันทร์บาง ปิยะวรรณ สุทธิประพันธ์ อรอุมา เรืองวงษ์ และรัตนาพร ไชยศรี. 2557. แมลงศัตรูและโรคที่สำคัญ ในพื้นที่ปลูกกาแฟอราบิก้าบนพื้นที่สูง. สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน), เชียงใหม่.

สุขสวัสดิ์ พลพินิจ. 2558. ด้วงสวยงามในประเทศไทย เล่ม 1. The Sun Group, กรุงเทพฯ. 214 หน้า.

อนุตร บูรณพานิชพันธุ์ และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง. 2557. การเข้าทำลายของมอดเจาะผลกาแฟและประสิทธิภาพของสารล่อเพื่อการควบคุม. วารสารเกษตร 30(3): 223-231.

Bhat, P.K., A.B. Ramprasad and D.K.S. Gowda. 1992. Effective control of white stem-borer by debarking the main stem and thick primaries of Arabica coffee. Canadian Journal of Plant Science 72(2): 25-28.

Hall, D.R., A. Cork, S.J. Phythian, S. Chittamuru, B.K. Jayarama, M.G. Venkatesha, K. Sreedharan, P.K.V. Kumar , H.G. Seetharama and R. Naidu. 2006. Identification of components of male-produced pheromone of coffee white stem borer, *Xylotrechus quadripes*. Journal of Chemical Ecology 32(1): 195-219.

Hayashi, M. and H. Makihara. 1981. The Cerambycidae (Coleoptera) of Nepal colleted by the Kyushu University Scientific Expedition. Esakia 17: 183-200.

Jayarama, M.G.V., M.V.D Souza and D.R. Hall. 2007. (S)-2-Hydroxy-3-decanone as sex pheromone for monitoring and control of coffee white stem borer (*Xylotrechus quadripes*). pp. 1291-1300. *In*: Proceedings of the 21st International Conference on Coffee Science, 11-15 September, Montpellier, France (Publication No. 2-900212-20-0). Association Scientifique Internationale du Cafe´ (ASIC), Paris.

Kumar, P.K.V. 2010. Biology and management of the coffee white stem borer, *X. quadripes* Chevr. (Online). Available: http://eol.org/data_objects/18593266 (June 22, 2015).

Murphy, S.T., N. Phiri, K. Sreedharan, D. Kutywayo and C. Chanika. 2008. Integrated Stem Borer Management in Smallholder Coffee Farms in India, Malawi and Zimbabwe. Final Technical Report. CABI, Wallingford. 309 p.

Rhainds, M., C.C Lan, S. King, R. Gries, M.L. Zhen and G. Gries. 2001. Pheromone communication and mating behaviour of coffee white stemborer, *Xylotrechus quadripes* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae). Applied Entomology and Zoology 36: 299-309.

Rhainds, M., C.C. Lan, M.L. Zhen and G. Gries. 2002. Incidence, symptoms, and intensity of damage by three coffee stem borers (Coleoptera: Cerambycidae) in South Yunan, China. Journal of Economic Entomology 95(1): 106-112.

Santosh, P., H.L. Sreenath, P.K. Vinod Kumar, H.G. Seetharama and R.P. Jayarama. 2011. New record of coffee white stem borer *Xylotrechus quadripes* Chevrolat on *Psilanthus bengalensis* in India. Journal of Plantation Crops 39(3): 396-398.

Shylesha, A.N. and G.K. Veeresh. 1995. Incidence of coffee white stem borer *Xylotrechus quadripes* Chevr. In major coffee growing tracts of Karnataka. Journal of Hill Research 8(2): 239-241.

Visitpanich, J. 1994. The biology and survival rate of the coffee stem borer, *Xylotrechus quadripes* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae) in northern Thailand. Japanese Journal of Entomology 62(4): 731-745.

ปฏิกิริยาของข้าวลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} (ขาวดอกมะลิ 105/อาบาญ่า) x ชัยนาท 1 กับเพลี้ยกระโดดหลังขาว

Reactions of Backcross Rice Lines BC_4F_{3-4} (KDML105/Abhaya) x Chai Nat 1 on Whitebacked Planthopper

วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ[1/*] สมชาย ธนสินชยกุล[2/] ไสว บูรณพานิชพันธุ์[3/] เจตน์ คชฤกษ์[4/] และ คณิตา เกิดสุข[4/]

Weerathep Pongprasert[1/*], Somchai Tanasinchayakul[2/], Sawai Buranapanichpan[3/], Jate Kotcharerk[4/] and Kanita Kerdsuk[4/]

[1/]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

[1/] Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment Naresuan University, Mueang, Phitsanulok 65000, Thailand

[2/]ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[2/]Department of Entomology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[3/]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

[3/]Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[4/]ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก อ. วังทอง จ.พิษณุโลก 65000

[4/]Phitsanulok Rice Research Center, Wang Thong, Phitsanulok 65000, Thailand

**Corresponding author: Email: weerathepp@gmail.com*

(Received: 1 August 2016; Accepted: 31 August 2016)

Abstract: Host plant resistance is one of the main post in insect management strategy to control insect pest. Therefore, the total of 6 BC_4F_{3-4} backcross rice lines ((Abhaya/KDML 105) x Chai Nat 1) were evaluated their reactions on 5 whitebacked planthopper (WBPH) populations collected from paddy fields in lower northern Thailand, Sukhothai, Phitsanulok, Kamphaeng Phet, Phichit, and Nakhon Sawan provinces, under greenhouse condition. All six BC_4F_{3-4} backcross rice lines and 10 standard varieties were planted in seedling box in insect case and WBPH nymphs at 2^{nd}-3^{rd} instar were released at the rate of 5 insects per plant. The reaction of rice responding to the WBPH infestation was evaluated at day 14 after insects released based on standard evaluation system for rice from International Rice Research Institute (IRRI) and then elite lines were selected. In addition, the relationships of rice damage caused by WBPH infestation at day 14 and simple sequence repeat (SSR) molecular markers was determined. The result revealed that the backcrossed line, A12-26-201-428, was an elite line, significantly high resistance to WBPH populations from all 5 areas in lower northern region.

The marker-trait association analysis, a total of 2 quantitative trait loci (QTLs), potentially resistant to WBPH population from Phichit: *qRmWBPH6* and *qRmWBPH12* was found on chromosome 6 and 12 linked to marker RM463 and RM225 respectively.

Keywords: Whitebacked planthopper resistance, molecular marker, Chai Nat 1, Abhaya, QTL

บทคัดย่อ: พืชต้านทานเป็นวิธีการควบคุมหลักที่สำคัญในกลยุทธ์ของการบริหารจัดการศัตรูพืช จึงได้ทำการศึกษาถึงปฏิกิริยาของ ข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ((อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105) x ชัยนาท 1) จำนวน 6 สายพันธุ์ ร่วมกับพันธุ์ข้าวมาตรฐานทดสอบ จำนวน 10 พันธุ์ โดยใช้กลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาว ครอบคลุมพื้นที่ 5 จังหวัด คือ สุโขทัย พิษณุโลก กำแพงเพชร พิจิตร และ นครสวรรค์ ในสภาพเรือนทดลอง ปลูกสายพันธุ์ข้าวและพันธุ์ข้าวทดสอบในกระบะเพาะ ภายในกรงเลี้ยงแมลง ปล่อยตัวอ่อนเพลี้ยกระโดดหลังขาววัยที่ 2-3 จำนวนเฉลี่ย 5 ตัวต่อต้น ตรวจสอบปฏิกิริยาของข้าวต่อการลงทำลายในวันที่ 14 วันหลังปล่อยเพลี้ยลงทำลาย ด้วยมาตรฐานการประเมินของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ คัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่เหมาะสม และทำการวิเคราะห์ลักษณะการแสดงออกของปฏิกิริยาของข้าวต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดหลังขาวกับโมเลกุลเครื่องหมายแบบ SSR พบว่า สายพันธุ์ข้าวที่มีความโดดเด่นมากที่สุดคือ A12-26-201-428 แสดงปฏิกิริยาต้านทานต่อการลงทำลายของประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวครอบคลุมทั้ง 5 จังหวัดภาคเหนือตอนล่างมากที่สุด และพบตำแหน่งของยีนที่แสดงความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวใกล้กับโมเลกุลเครื่องหมาย 2 ตำแหน่ง คือ RM463 และ RM225 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากจังหวัดพิจิตรและให้ชื่อ QTL เหล่านี้ว่า *qRmWBPH6* และ *qRmWBPH12* ซึ่ง QTL นี้วางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 6 และ 12 ตามลำดับ

คำสำคัญ: ความต้านทานเพลี้ยกระโดดหลังขาว โมเลกุลเครื่องหมาย ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ข้าวพันธุ์อาบาญ่า ตำแหน่งของลักษณะเชิงปริมาณ

คำนำ

เพลี้ยกระโดดหลังขาว (*Sogatella furcifera* (Horvath)) จัดอยู่ในวงศ์ Delphacidae อันดับ Hemiptera เป็นแมลงศัตรูข้าวที่มีความสำคัญในเอเชียตะวันออก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเอเชียใต้ รวมทั้งในไมโครนีเซีย บราซิลและกลุ่มประเทศในแคริบเบียน ลงทำลายข้าวหลายสายพันธุ์ ทำให้ต้นข้าวมีอาการเหี่ยวและไหม้ (Khush, 1984) นอกจากนี้ยังเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสมาสู่ข้าว ทำให้ข้าวมีอาการแห้งและไหม้ตาย หรือไม่สามารถออกรวง (Renganayaki *et al*., 2002; Tang *et al*., 1994) ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงและไม่คุ้มค่าแก่การลงทุน (สุวัฒน์, 2544) การควบคุมเพลี้ยกระโดดหลังขาวมักนิยมใช้สารเคมีฆ่าแมลงเป็นหลัก (สำนวนและวีรเทพ, 2548) ซึ่งมีผลกระทบต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมเป็นอย่างรุนแรง การควบคุมโดยใช้ข้าวพันธุ์ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดนั้นเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดแมลงที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก และเป็นวิธีการที่ปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม (Jena and Mackill, 2008)

ในช่วง 3 ทศวรรษ ที่ผ่านมาได้มีการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานชนิดต่าง ๆ มากมาย เช่น ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 (SPR60), สุพรรณบุรี 90 (SPR90), ปทุมธานี 33 (PTB33), ชัยนาท 1 (CTN1), พิษณุโลก 2, กข29 และ กข41 เป็นต้น ที่มีคุณสมบัติต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดทั้งเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยกระโดดหลังขาวได้ อย่างไรก็ตาม คุณลักษณะต้านทานที่มีในข้าวแต่ละสายพันธุ์นั้นมีข้อจำกัดเช่นกัน โดยเมื่อปลูกข้าวพันธุ์นั้น ๆ เป็นพื้นที่กว้างและต่อเนื่องเป็นเวลานาน มีผลทำให้ระดับความต้านทานลดลงได้ ทำให้ต้องมีการพัฒนาพันธุ์

ข้าวสายพันธุ์ใหม่ ๆ รองรับตลอดเวลา โดยวิธีการพัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานในปัจจุบันมีได้หลายลักษณะวิธีการ แต่การพัฒนาข้าวพันธุ์ต้านทานโดยปรับปรุงข้าวพันธุ์ต้านทานเดิมที่ได้รับความนิยมปลูก และเป็นที่ต้องการของตลาดให้มีคุณสมบัติต้านทานเพิ่มขึ้นเป็นแนวทางที่ได้รับความนิยมมากอีกวิธีหนึ่ง ประกอบกับมีรายงานการวิจัยพบว่ายีนต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลบางชนิดสามารถแสดงความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดหลังขาวได้ (จิรพงศ์ และคณะ, 2552; Tan *et al*., 2004)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมกลับระหว่างพันธุ์อาบาญ่าซึ่งเป็นแหล่งผู้ให้ (donor) ยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Qbph6* และ *Qbph12* กับพันธุ์ชัยนาท 1 โดยวิธี marker assisted selection (MAS) ตั้งแต่ พ.ศ. 2545 จนถึงขณะนี้ได้ลูกผสมกลับรุ่น BC_4F_{3-4} ที่มียีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Qbph6* และ *Qbph12* และมีลักษณะทาง phenotype อื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกับ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 มาก จำนวน 6 สายพันธุ์ และได้ทำทดสอบข้าวอาบาญ่าและข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงบางพันธุ์ในเบื้องต้นกับเพลี้ยกระโดดหลังขาวของจังหวัดพิษณุโลก พบว่ายีนดังกล่าวมีแนวโน้มสามารถแสดงความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวได้ จึงได้จัดทำการศึกษาถึงคุณลักษณะความต้านทานของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับระยะ BC_4F_{3-4} ((อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105) x ชัยนาท 1) จำนวน 6 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการถ่ายยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Qbph6* และ *Qbph12* แล้ว กับประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวขึ้น เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวลูกผสมกลับดังกล่าวที่สามารถต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวได้ และเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติทางพันธุกรรมด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย ร่วมกับการวิเคราะห์เชิงปริมาณของลักษณะความต้านทานที่แสดงออกในข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับดังกล่าวกับประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่นาชลประทานของ 5 จังหวัดภาคเหนือตอนล่างขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บรวบรวมประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่นาชลประทานของพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง ครอบคลุมพื้นที่ใน 5 จังหวัด คือ สุโขทัย พิษณุโลก กำแพงเพชร พิจิตร และนครสวรรค์

ทำการเลี้ยงและขยายเพิ่มจำนวนแมลง บนข้าวพันธุ์ไทซุงเนทีฟ 1 (Taichung Native 1, TN1) ซึ่งอ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาว

ทำการปลูกข้าวลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ((อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105) x ชัยนาท 1) จำนวน 6 สายพันธุ์ ข้าวพันธุ์เปรียบเทียบ คือ อาบาญ่า, อาบาญ่าx ขาวดอกมะลิ 105, พิษณุโลก 2 (PHL2), ชัยนาท 1 (CNT1), สุพรรณบุรี 60 (SPR60), สุพรรณบุรี 90 (SPR90) และ กข29 (RD29) โดยมีข้าวพันธุ์ PTB33 และ ราตูฮีเนติ (Rathu Heenati) เป็นพันธุ์มาตรฐานต้านทาน และพันธุ์ TN1 เป็นพันธุ์มาตรฐานไม่ต้านทาน ในกระบะเพาะ ในสภาพกรงเลี้ยงแมลง ในโรงเรือน ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 5 ซ้ำ

ปล่อยประชากรของเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากแหล่งปลูกข้าวของจังหวัดพิษณุโลก ในระยะตัวอ่อนวัยที่ 2-3 จำนวน 5 ตัวต่อต้น ลงในกรงเลี้ยงต้นข้าวทดสอบแต่ละสายพันธุ์ เมื่อข้าวอายุประมาณ 6-7 วัน หรือมีใบประมาณ 2-3 ใบต่อต้น ตรวจการกระจายตัวของแมลงโดยปัดบริเวณแถวข้าวทดสอบเพื่อให้แมลงเคลื่อนย้ายกระจายได้ทั่วบริเวณแถวข้าวทดสอบในกระบะเพาะ

บันทึกผลลักษณะการเข้าทำลายพันธุ์ข้าวทดสอบของเพลี้ยกระโดดหลังขาว และเปรียบเทียบผลที่ 14 วันหลังทำการปล่อยเพลี้ยกระโดดหลังขาวลงทำลาย โดยใช้มาตรฐานตาม Standard Evaluation System for Rice ของ IRRI (2002)

ดำเนินการในทำนองเดียวกันกับประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่จังหวัดสุโขทัย กำแพงเพชร พิจิตร และ นครสวรรค์ จนครบทุกพื้นที่ วิเคราะห์ผล จัดกลุ่มสายพันธุ์ข้าวโดย hierarchical cluster analysis ใช้วิธีการคำนวณการจัดกลุ่มโดย between-group linkage และคำนวณระยะความแตกต่างด้วยวิธี squared Euclidean distance

ทำการคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายแบบ simple sequence repeat (SSR) ที่แสดงผลเป็น polymorphic ระหว่างข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง ((อาบาญ่าx ขาวดอกมะลิ 105) x ชัยนาท 1) โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายแบบ SSR จากโครโมโซมของข้าวทั้ง 12 ชุด ที่ได้รับการพัฒนาจากแหล่งต่าง ๆ เช่น Rice Cornell SSR 2001 เป็นต้น

ตรวจสอบตำแหน่งของลักษณะเชิงปริมาณทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง (อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105) x ชัยนาท 1 ระยะ BC_4F_{3-4} ทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยการวิเคราะห์ตำแหน่งของลักษณะเชิงปริมาณ (QTL) ของความต้านทานที่แสดงออกในข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงดังกล่าวกับประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่นาข้าวแหล่งต่าง ๆ ที่อยู่ในเขตชลประทานของภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

วิเคราะห์ผลและคัดเลือกคัดเลือกข้าว BC_4F_{3-4} ที่ผ่านการทดสอบ

ผลการทดลอง

ประเมินความต้านทานและคัดเลือกข้าวต้านทานจากข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} (อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105 X ชัยนาท 1) กับประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

ผลการทดสอบปฏิกิริยาของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ((อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105) x ชัยนาท 1) จำนวน 6 สายพันธุ์ ร่วมกับ พันธุ์ข้าวเปรียบเทียบ จำนวน 10 พันธุ์ โดยใช้กลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจำนวน 5 พื้นที่ ภายหลังการปล่อยเพลี้ยกระโดดหลังขาวลงทำลาย 14 วัน (ตารางที่ 1) พบว่าปฏิกิริยาของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ต่อประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก มีระดับความต้านทานในช่วงปานกลางเท่านั้น รวมทั้งในส่วนของพันธุ์เปรียบเทียบทุกพันธุ์ โดยจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีความต้านทานระดับปานกลาง (MR) มีจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ A12-26-201-428 ซึ่งจัดว่ามีระดับต้านทานสูงที่สุดต่อประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพิษณุโลก กลุ่มที่สอง คือกลุ่มที่ค่อนข้างอ่อนแอ (MS) มีจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ A12-11-171-401, A12-11-171-402, A12-26-201-436, A12-11-165-359 และ A12-11-170-381 เทียบเท่ากับพันธุ์เปรียบเทียบทุกพันธุ์ทั้งอาบาญ่า, อาบาญ่าxขาวดอกมะลิ 105, CNT1, PTB33, PHL2, SPR60, SPR90, RD29 และ ราตูฮีเนติ แม้แต่พันธุ์มาตรฐานไม่ต้านทาน TN1 จัดอยู่ในระดับนี้เช่นกัน (MS)

ปฏิกิริยาของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ต่อประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่จังหวัดสุโขทัยมีระดับความต้านทานจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความต้านทานระดับปานกลาง (MR) มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วย A12-11-165-359, A12-11-170-381, A12-11-171-401 และ A12-26-201-428 เทียบเท่ากับพันธุ์เปรียบเทียบ อาบาญ่า, อาบาญ่าxขาวดอกมะลิ 105, CNT1, SPR90, RD29, PHL2 และราตูฮีเนติ กลุ่มที่สอง คือ กลุ่มที่มีระดับค่อนข้างอ่อนแอ (MS) มีจำนวน 2 สายพันธุ์ ประกอบด้วย A12-11-171-402 และ A12-26-201-436 เทียบเท่ากับพันธุ์มาตรฐานต้านทานเปรียบเทียบ PTB33 และ SPR60 แต่อย่างไรก็ตาม ข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ทุกสายพันธุ์มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดหลังขาวสูงกว่าพันธุ์มาตรฐานไม่ต้านทาน TN1 ที่มีระดับอ่อนแอ (S)

ปฏิกิริยาของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ต่อประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่จังหวัดพิจิตร มีระดับความต้านทานจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความต้านทานระดับปานกลาง (MR) มีจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ A12-26-201-428 เทียบเท่ากับพันธุ์เปรียบเทียบ อาบาญ่าxขาวดอกมะลิ 105 และ SPR90 กลุ่มที่สอง คือ กลุ่มที่มีระดับ

ค่อนข้างอ่อนแอ (MS) มีจำนวน 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย A12-11-165-359, A12-11-170-381, A12-11-171-401, A12-11-171-402 และ A12-26-201-436 เทียบเท่ากับพันธุ์มาตรฐานต้านทานเปรียบเทียบอาบาญ่า, CNT1, PTB33, RD29, PHL2, SPR60 และ ราตูฮีเนติ ข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ทุกสายพันธุ์มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดหลังขาวสูงกว่าพันธุ์มาตรฐานไม่ต้านทาน TN1 ที่มีระดับอ่อนแอ (S)

Table 1. Reactions of 6 ((Abhaya/KDML105) X Chai Nat 1)) backcross lines and 10 standard rice varieties responded to whitebacked planthopper (WBPH) collected from Phitsanulok (PSL), Sukhothai (SKT), Phichit (PHC), Kamphaeng Phet (KPP) and Nakhon Sawan (NKS) at 14 days after WBPH released

Name / plant code	Damage reaction scale				
	PSL	SKT	PHC	KPP	NKS
A12-11-165-359	MS	MR	MS	R	MR
A12-11-170-381	MS	MR	MS	MR	MR
A12-11-171-401	MS	MR	MS	MR	R
A12-11-171-402	MS	MS	MS	MR	R
A12-26-201-428	MR	MR	MR	R	R
A12-26-201-436	MS	MS	MS	R	MS
Abhaya	MS	MR	MS	MR	MS
Abhaya x KDML105	MS	MR	MR	R	MS
CNT1	MS	MR	MS	R	MR
TN1	MS	S	S	S	MS
PTB33	MS	MS	MS	MR	MR
SPR90	MS	MR	MR	MR	MS
RD29	MS	MR	MS	MR	MS
PHL2	MS	MR	MS	MR	MR
SPR60	MS	MS	MS	MS	MS
Rathu Heenati	MS	MR	MS	R	R

R=resistance, MR=mild resistance, MS=mild susceptible, S=susceptible

ปฏิกิริยาของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ต่อประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่จังหวัดกำแพงเพชร มีระดับความต้านทานจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความต้านทานระดับสูง (R) มีจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ A12-11-165-359, A12-26-201-428 และ A12-26-201-436 เทียบเท่ากับพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ อาบาญ่าxขาวดอกมะลิ 105, CNT1 และ ราตูฮีเนติ กลุ่มที่สอง คือ กลุ่มที่มีระดับค่อนข้างต้านทาน (MR) มีจำนวน 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย A12-11-170-381, A12-11-171-401 และ A12-11-171-402 เทียบเท่ากับพันธุ์มาตรฐานต้านทานเปรียบเทียบ อาบาญ่า, PTB33, SPR90, RD29 และ PHL2 ส่วนพันธุ์ SPR60 มีระดับค่อนข้างอ่อนแอ ข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ทุกสายพันธุ์มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดหลังขาวสูงกว่าพันธุ์มาตรฐานไม่ต้านทาน TN1 ที่มีระดับอ่อนแอ (S)

ปฏิกิริยาของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ต่อประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่จังหวัดนครสวรรค์ มีระดับความต้านทานจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความต้านทานระดับสูง (R) มีจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ A12-11-171-401, A12-11-171-402 และ A12-26-201-428 เทียบเท่ากับพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ ราตูฮีเนติ กลุ่มที่สอง คือ กลุ่มที่มีระดับค่อนข้างต้านทาน (MR) มีจำนวน 2 สายพันธุ์ ประกอบด้วย A12-11-165-359 และA12-11-170-381 เทียบเท่ากับพันธุ์มาตรฐานต้านทานเปรียบเทียบ CNT1, PTB33 และ PHL2 กลุ่มที่สาม คือ กลุ่มที่มีระดับค่อนข้างอ่อนแอ (MS) มีจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ A12-26-201-436 เทียบเท่ากับพันธุ์

มาตรฐานต้านทานเปรียบเทียบ อาบาญ่า, อาบาญ่า x ขาวดอกมะลิ 105, RD29, SPR90 และ SPR60 รวมทั้ง TN1

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยรวมระหว่างสายพันธุ์ข้าวกับประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่ ต่าง ๆ ด้วยวิธี hierarchical cluster analysis และสร้างเป็นแผนผังความสัมพันธ์ (dendrogram) พบว่าข้าวสายพันธุ์ A12-26-201-428 มีความต้านทานเพลี้ยกระโดดหลังขาวได้สูงสุด สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ รวมทั้งพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ ทั้ง 10 พันธุ์ ในกลุ่มที่มีระดับความต้านทานที่ต่ำกว่า ข้าวสายพันธุ์ A12-26-201-428 ประกอบด้วย 2 กลุ่มใหญ่ ๆ กลุ่มแรก มีเพียงกลุ่มย่อยเดียว มีสายพันธุ์ A12-26-201-436 เพียงสายพันธุ์เดียวในกลุ่มนี้ ระดับความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวเทียบเท่ากับ สายพันธุ์พ่อคือ อาบาญ่า x ขาวดอกมะลิ 105, อาบาญ่า, SPR90 และ RD29 กลุ่มที่สอง มี 3 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยแรก มีสายพันธุ์ A12-11-170- 381 เพียงสายพันธุ์เดียวในกลุ่มนี้ ระดับความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวเทียบเท่ากับ PTB33 และ PHL2 กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยข้าว A12-11-171-401 และ A12-11-171-402 เท่านั้น ส่วนกลุ่มย่อยที่ 3 ประกอบด้วย สายพันธุ์ A12-11-165-359 เพียงสายพันธุ์เดียวในกลุ่มนี้ ระดับความต้านทานาต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวเทียบเท่ากับพันธุ์แม่คือ CNT1 และราตูฮีเนติ ส่วนพันธุ์ SPR60 และ TN1 นั้นเป็นกลุ่มอ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาว (ภาพที่ 1)

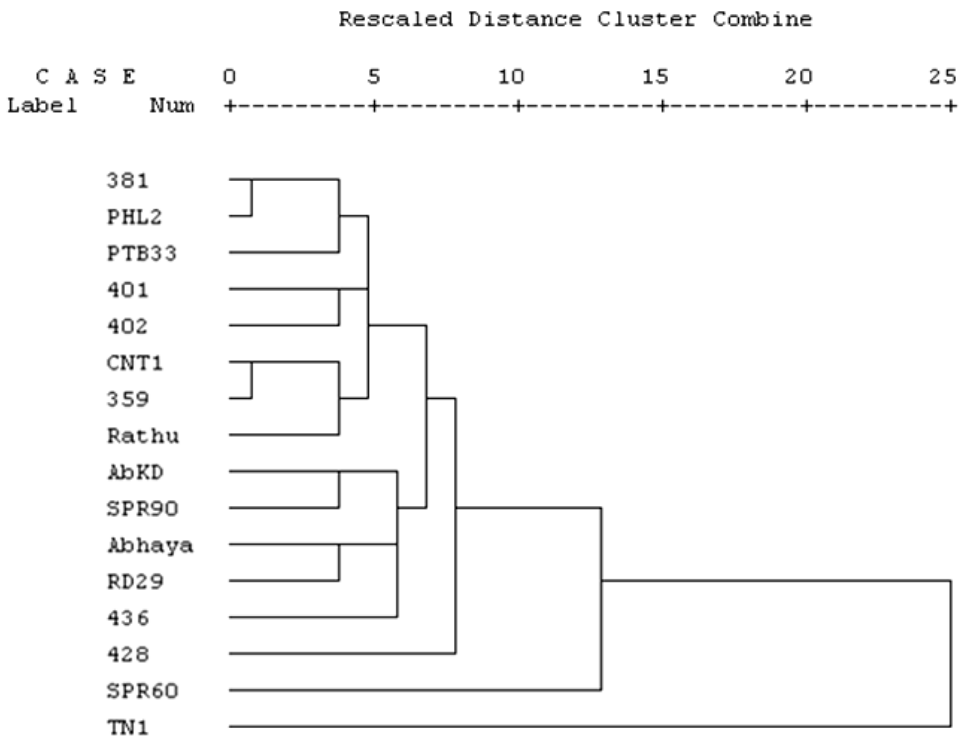

Figure 1. Dendrogram presents the relationship of 6 ((Abhaya/KDML105) x Chai Nat 1) backcross lines A12-11-165-359(359), A12-11-170-381(381), A12-11-171-401(401), A12-11-171-402(402), A12-26-201-428(428), A12-26-201-436(436) and 10 standard rice varieties Abhaya, Abhaya x KDML105 (AbKD), Chai Nat 1 (CNT1), Taichung Native 1 (TN1), PTB33, Suphan Buri 60 (SPR60), Suphan Buri 90 (SPR90), RD29, Phitsanulok 2 (PHL2), Rathu Heenati (Rathu) responded to 6 whitebacked planthopper (WBPH) populations collected from Phitsanulok, Sukhothai, Phichit, Kamphaeng Phet and Nakhon Sawan at 14 days

ตรวจสอบตำแหน่งของลักษณะเชิงปริมาณทางพันธุกรรม (QTL) ของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} (อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105 x ชัยนาท 1)

จากการศึกษาสัดส่วนทางพันธุกรรมของประชากรข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ((อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105) x ชัยนาท 1) จำนวน 6 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ CNT1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ทั้งหมด 163 ตำแหน่ง พบว่า มีเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ CNT1 และอาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105 (polymorphism) จำนวน 48 ตำแหน่ง โดยการเกิด polymorphism ในแต่ละโครโมโซมเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 28.93 ซึ่งโครโมโซมที่ 3 มีการเกิด polymorphism สูงที่สุดคือร้อยละ 42.85 ส่วนโครโมโซมที่ 7 มีการเกิด polymorphism น้อยที่สุดคือร้อยละ 9.10 (ตารางที่ 2) และจากการคำนวณค่าสัดส่วนทางพันธุกรรมข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ในสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ (percent of recurrent parent, %RP) พบว่า อยู่ระหว่าง 84.38-91.67%

การวิเคราะห์ตำแหน่งของลักษณะเชิงปริมาณ (QTL) ของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} (อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105 x ชัยนาท 1) ที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวโดยการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับคะแนนความเสียหายของข้าวที่อายุ 14 วันหลังปล่อยเพลี้ยกระโดดหลังขาวลงทำลาย พบว่า มีเครื่องหมายโมเลกุล 2 ตำแหน่ง คือ RM463 และ RM225 มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากจังหวัดพิจิตร วางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 6 และ 12 และให้ชื่อว่า *qRmWBPH6* และ *qRmWBPH12* (ตารางที่ 3)

Table 2. Ratio of polymorphic markers between Chai Nat 1 and Abhaya/KDML105

Chromosome number	Numbers of markers	Numbers of polymorphic markers	Numbers of monomorphic markers	Polymorphism (%)
1	14	4	10	28.57
2	16	5	11	31.25
3	14	6	8	42.85
4	16	4	12	25.00
5	13	4	9	30.76
6	16	6	10	37.5
7	11	1	10	9.09
8	14	5	9	35.71
9	12	4	8	33.33
10	12	3	9	25.00
11	12	3	9	25.00
12	13	3	10	23.07

Table 3. Numbers of QTLs based on RM markers/damage score linkage found on chromosome 6 and 12

RGM	QTL	Chr.	Marker	Mean of damage			Effect
				CNT1	Het	Abhaya/KDML105	
PHC	*qRmWBPH12*	12	RM463	4.20	-	2.67	1.53
	qRmWBPH6	6	RM225	4.20	-	2.67	1.53

วิจารณ์

จากผลการประเมินปฏิกิริยาของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ทั้ง 6 สายพันธุ์ ร่วมกับพันธุ์ข้าวมาตรฐาน 10 สายพันธุ์กับประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่ 5 จังหวัดในภาคเหนือตอนล่าง พบว่าปฏิกิริยาของข้าวในการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดหลังขาวนั้นมีความแตกต่างไปตามแหล่งที่มาของประชากรของเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่ต่าง ๆ อาการใบเหลืองของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มีความหลากหลายและชัดเจนเมื่อทำการประเมินที่ 14 วันหลังปล่อยเพลี้ยกระโดดหลังขาวลงทำลาย

ความรุนแรงของปฏิกิริยาการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของข้าวเกิดขึ้นกับประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากจังหวัดพิษณุโลก และพิจิตรมากที่สุด ในขณะที่ปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวต่อประชากรของเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากกำแพงเพชรพบความรุนแรงน้อยที่สุด สอดคล้องกับผลการศึกษาของ สุพร และคณะ (2556) ซึ่งพบว่า ประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากจังหวัดพิษณุโลก มีความรุนแรงในการลงทำลายมากที่สุด รองลงมาคือพิจิตรและสุโขทัย แสดงถึงสภาพของเพลี้ยกระโดดหลังขาวในภาคเหนือตอนล่างว่าปัจจุบันมีความหลากหลาย มีความจำเพาะต่อพื้นที่เช่นเดียวที่พบในกรณีของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (พุฒิพงษ์ และคณะ, 2555) และแมลงบั่ว (วีรเทพ และคณะ, 2557) ในภาคเหนือตอนล่าง ซึ่งความหลากหลายดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้จากหลายเหตุปัจจัยทั้งจากพันธุ์ข้าวที่นิยมปลูก การดูแลและการจัดการของเกษตรกรโดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของการใช้สารควบคุมศัตรูพืช (Savary *et al*., 2012; Tanaka *et al*., 2000) และการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ (Mackill *et al*., 2010) อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานเพลี้ยกระโดดหลังขาวที่แน่นอนเกี่ยวกับชีวชนิด

เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาของข้าวพันธุ์เปรียบเทียบต่าง ๆ พบว่าข้าวพันธุ์ที่แสดงความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวได้ดีมีเพียง 2 พันธุ์เท่านั้น คือ CNT1 และราตูฮีเนติ อย่างไรก็ตามความต้านทานที่พบจากข้าวทั้ง 2 พันธุ์จำกัดอยู่เฉพาะประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่ของจังหวัดสุโขทัย นครสวรรค์ และกำแพงเพชรเท่านั้น ส่วนประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลกและพิจิตรนั้น ข้าวทั้ง 2 พันธุ์ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวได้ลดลง ส่วนพันธุ์ PTB33 ซึ่งต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ดีกลับต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวได้น้อยมาก เป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาของสุพร และคณะ (2556) ส่วนข้าวพันธุ์ SPR60 นั้น สุพร และคณะ (2556) พบว่า มีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวได้ดีมาก แต่จากการศึกษาทดสอบในครั้งนี้ข้าวพันธุ์ SPR60 มีปฏิกิริยาอ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวอย่างสิ้นเชิง เทียบได้กับข้าวมาตรฐานไม่ต้านทาน TN1

ผลการประเมินปฏิกิริยาของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ กับเพลี้ยกระโดดหลังขาวคือ 14 วันของข้าวลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ทั้ง 6 สายพันธุ์ พบข้าวที่มีความโดดเด่นมากที่สุดคือ A12-26-201-428 สามารถต้านทานต่อการลงทำลายของประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากกำแพงเพชรและนครสวรรค์ได้ดี ต้านทานปานกลางกับเพลี้ยเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพิษณุโลก พิจิตร และสุโขทัย ตามด้วย A12-11-171-401, A12-11-165-359 และ A12-11-170-381 ต้านทานได้ดีกับประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากสุโขทัย กำแพงเพชร และนครสวรรค์ A12-11-171-402 ต้านทานได้ดีกับประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจาก กำแพงเพชรและนครสวรรค์ ซึ่งข้าวสายพันธุ์ A12-26-201-428 มีคุณสมบัติต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในภาคเหนือตอนล่าง (พุฒิพงษ์ และคณะ, 2555) และต้านทานแมลงบั่วจากพื้นที่จังหวัดตากได้ดี (วีรเทพ และคณะ, 2557) ข้าวสายพันธุ์ A12-26-201-428 จึงมีความโดดเด่นมากต่อการพัฒนาต่อยอดในอนาคต ในส่วนของการปรับปรุงพันธุ์ และแม้ว่าระดับความต้านทานไม่สูงมากนักแต่จากแนวคิดและผลของการศึกษาประสิทธิภาพข้าวต้านทานต่อแมลงศัตรูพืชพบว่าข้าวที่มีลักษณะต้านทานในระดับกลาง มักแสดงความต้านทานต่อแมลงได้ยาวนาน และทนทานได้นานกว่าข้าวที่มีลักษณะความต้านทานในระดับสูงแบบเดี่ยว ๆ (Heinrichs, 1986; Bosque-Perez and Buddenhagen, 1992) ข้าวสายพันธุ์ A12-26-201-428 จึงมีแนวโน้มสามารถพัฒนาสู่การใช้ประโยชน์ในการบริหารจัดการศัตรู

ข้าวได้ในอนาคต ทั้งนี้จากการศึกษาตำแหน่งเชิงปริมาณของยีนที่แสดงความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาว โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบกับโมเลกุลเครื่องหมาย SSR พบว่ายีนดังกล่าวอยู่ใกล้กับโมเลกุลเครื่องหมาย 2 ตำแหน่ง คือ RM463 และ RM225 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากจังหวัดพิจิตร วางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 6 และ 12 และให้ชื่อ QTLs ว่า *qRmWBPH6* และ *qRmWBPH12* ซึ่งมีแหล่งที่มาจากข้าว CNT1 สอดคล้องกับผลปฏิกิริยาต้านทานเพลี้ยกระโดดหลังขาวของข้าว CNT1 และปฏิกิริยาของสายพันธุ์ผสมกลับ อาบาญ่า x ขาวดอกมะลิ 105 กับ CNT1 มีปฏิกิริยาต้านทานที่สูงขึ้นได้ชัดเจนแบบก้าวกระโดดจากสายพันธุ์พ่อ อาบาญ่า x ขาวดอกมะลิ 105 และครอบคลุมประชากรของเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่ต่าง ๆ เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีของสายพันธุ์ A12-26-201-428 เทียบกับ สายพันธุ์พ่อ และพันธุ์แม่ ที่ 14 วัน

สรุป

ในการศึกษาปฏิกิริยาของ ข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ((อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105) x ชัยนาท 1) จำนวน 6 สายพันธุ์ ร่วมกับ พันธุ์ข้าวมาตรฐานทดสอบจำนวน 10 พันธุ์ โดยใช้กลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาว ครอบคลุมพื้นที่ 5 จังหวัด คือ สุโขทัย พิษณุโลก กำแพงเพชร พิจิตร และนครสวรรค์ พบว่าข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ((อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105) x ชัยนาท 1) มีปฏิกิริยาต้านทานต่อการเข้าทำลายของกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคเหนือตอนล่างแตกต่างกัน สายพันธุ์ข้าวที่มีความโดดเด่นมากที่สุดคือ A12-26-201-428 แสดงปฏิกิริยาต้านทานต่อการลงทำลายของประชากรเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากจังหวัดกำแพงเพชร และนครสวรรค์ได้ดี ต้านทานปานกลางกับเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากจังหวัดพิษณุโลก พิจิตร และสุโขทัย นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับคะแนนความเสียหายของข้าวที่อายุ 14 วันหลังปล่อยเพลี้ยกระโดดหลังขาวลงทำลาย ของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ((อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105) x ชัยนาท 1) พบตำแหน่งของยีนที่แสดงความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวใกล้กับโมเลกุลเครื่องหมาย RM463 และ RM225 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาวจากจังหวัดพิจิตร และให้ชื่อ QTLs ว่า *qRmWBPH6* และ *qRmWBPH12* ซึ่งวางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 6 และ 12 มีแหล่งที่มาจากข้าว CNT1 และได้ทำการคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ A12-26-201-428 เพื่อพัฒนาต่อยอดในส่วนของการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยนเรศวร หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก และศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนล่าง ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยเป็นอย่างดีทั้งในส่วนของ งบประมาณ เครื่องมือ ข้อมูล และอุปกรณ์

เอกสารอ้างอิง

จิรพงศ์ ใจรินทร์ วราภรณ์ วงศ์บุญ กิจติพงษ์ เพ็งรัตน์ สงวน เทียงดีฤทธิ์ พิกุล ลีลากุด และ กัลยา สานเสน. 2552. การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและมีคุณภาพเมล็ดเหมือนขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย. หน้า 187-207. *ใน*: เอกสารประกอบการประชุมข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2552. กรมการข้าว, กรุงเทพฯ.

พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์ วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ ไสว บูรณพานิช พันธุ์ จิราพร กุลสาริน สุรเดช ปาละวิสุทธิ์ และ เจตน์ คชฤกษ์. 2555. ปฏิกิริยาของข้าวลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ระหว่าง อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105) กับ ชัยนาท 1 ต่อประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล. วารสารเกษตร 28(2): 113-123.

วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ สมชาย ธนสินชยกุล สุรเดช ปาละวิสุทธิ์ เจตต์ คชฤกษ์ และ คณิตา เกิดสุข.

2557. ปฏิกิริยาของข้าวลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} ((อาบาญ่า/ขาวดอกมะลิ 105) x ชัยนาท 1) กับแมลงบั่ว ในภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย. วารสารเกษตร 30(2): 151-159.

สุพร กิมขาว วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ ไสว บูรณพานิชพันธุ์ จิราพร กุลสาริน และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง. 2556. ปฏิกิริยาของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_{3-4} (ราตูฮีเนติ/ขาวดอกมะลิ 105 x ชัยนาท 1) ต่อเพลี้ยกระโดดหลังขาว ในภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย. วารสารเกษตร 29(1): 45-54.

สุวัฒน์ รวยอารีย์. 2544. เรียนรู้การจัดการศัตรูข้าวโดยวิธีผสมผสาน. เอกสารวิชาการ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สำนวน ฉิมพกา และวีรเทพ พงษ์ประเสริฐ. 2548. ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูข้าวของเกษตรกร อำเภอตะพานหิน จังหวัดพิจิตร. วารสารเกษตรนเรศวร 8(1): 77-94.

Bosque-Perez, N. A. and I. W. Buddenhagen. 1992. The development of host-plant resistance to insect pests: outlook for the tropics. pp. 235-249. *In*: S. B. J. Menken, J.H. Visser and P. Harrewijin (eds.). Proceedings of 8th International Symposium on Insect-Plant Relationships. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Heinrichs, E.A. 1986. Prospectives and directions for the continued development of insect-resistant rice varieties. Agriculture, Ecosystems and Environment 18: 9-36.

IRRI. 2002. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute, Los Baños. 54 p.

Jena, K.K. and D.J. Mackill. 2008. Molecular markers and their use in marker-assisted selection in rice. Crop Science 48: 1266-1276.

Khush, G.S. 1984. Breeding for resistance to insects. Journal of Environmental Protection and Ecology 7: 147-165

Mackill, D.J., A.M. Ismai, A.M. Pamplona, D.L. Sanchez, J.J. Carandang and E.M. Septininghih. 2010. Stress tolerant rice varieties for adaptation to a changing climate. Crop, Environment and Bioinformatics 7: 250-259.

Renganayaki, K., K.F. Allan, S. Sadasivam, S. Pammi, S.E. Harrington, S.R. McCouch, S. M. Kumar and A.S. Reddy. 2002. Mapping and progress toward map-based cloning of brown planthopper biotype-4 resistance gene introgressed from *Oryza officinalis* into cultivated rice, *O sativa*. Crop Science 42: 2112-2117.

Savary, S., F. Horgan, L. Willocquet and K.L. Heong. 2012. A review of principles for sustainable pest management in rice. Crop Protection 32: 54-63.

Tan, G.X., O.M. Weng, X. Ren, Z. Huang, L.L. Zhu and G.C. He. 2004. Two whitebacked planthopper resistance genes in rice share the same loci with those for brown planthopper resistance. Heredity 92: 212-217.

Tanaka, K., S. Endo and H. Kazano. 2000. Toxicity of insecticides to predators of rice planthopper: spiders, the mirid bug and the dryinid wasp. Applied Entomology and Zoology 35: 177-187.

Tang, J.Y., J.A. Cheng and G.A. Norton. 1994. An expert system for forecasting the risk of white-backed planthopper attack in the first crop season in China. Crop Protection 13: 463-473.

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเรือด *Cimex hemipterus* (Fabricius) โดยใช้เทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน

Mass Rearing of *Cimex hemipterus* (Fabricius) Using Membrane Feeding Technique

หัทยา พัฒนะพงศ์พันธุ์[1/] เยาวลักษณ์ จันทร์บาง[1/*] และ ไสว บูรณพานิชพันธุ์[1/]

Hattaya Pattanapongphan[1/], Yaowaluk Chanbang[1/*] and Sawai Buranapanichpan[1/]

[1/]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

[1/]Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: lukksu@hotmail.com*

(Received: 15 August 2016; Accepted: 18 November 2016)

Abstract: Mass rearing of bed bug, *Cimex hemipterus* (Fabricius) by using membrane feeding technique was carried out in laboratory condition, 25-30 °C and 75 %RH. Bed bugs were fed through paraffin membrane with blood of pig, cow, chicken, rabbit and human. The result revealed that the shortest period from egg stage to adult emergence was 37.42 ± 5.19 days when fed with rabbit blood. While, the developmental periods of bed bugs when fed with the blood of chicken, pig and human were 46.71 ± 4.75, 48.83 ± 1.72 and 91.11 ± 9.52 days, respectively. In addition, bed bugs fed with rabbit blood at every 3-day interval exhibited the shortest nymphal period of 38.38 ± 10.79 days while those of every 5- and 7-day intervals were 52.27 ± 7.58 and 61.62 ± 9.47 days, respectively. Bed bugs were not able to develop to adult stage when fed with rabbit blood at every 9-day interval. Hence, rabbit blood was suitable for mass rearing bed bugs and might be fed at every 3-day interval.

Keywords: Bed bugs, *Cimex hemipterus*, animal blood, membrane feeding technique

บทคัดย่อ: การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเรือด *Cimex hemipterus* (Fabricius) โดยใช้เทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรนได้ดำเนินการในสภาพห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เลือดสุกร เลือดโค เลือดไก่ เลือดกระต่าย และเลือดมนุษย์ พบว่า เรือดที่ใช้เลือดกระต่ายเป็นอาหารมีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยใช้ระยะเวลาตั้งแต่ระยะไข่จนไปเป็นตัวเต็มวัยสั้นที่สุดคือ 37.42 ± 5.19 วัน รองลงมา ได้แก่ เลือดไก่ เลือดสุกร และเลือดมนุษย์ ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตเท่ากับ 46.71 ± 4.75, 48.83 ± 1.72 และ 91.11 ± 9.52 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้การให้เลือดกระต่าย ทุก ๆ 3 วัน เป็นอาหารให้เรือด พบว่า เรือดสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยใช้เวลาในการเจริญเติบโตในระยะตัวอ่อน เท่ากับ 38.38 ± 10.79 วัน รองลงมาคือการให้เลือดทุก ๆ 5 และ 7 วัน โดยใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตเป็น 52.27 ± 7.58 และ 61.62 ± 9.47 วัน ตามลำดับ ส่วนการให้เลือดทุก ๆ 9 วัน เรือดไม่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้ ดังนั้นการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเรือด *C. hemipterus* ให้ได้ผลดีโดยใช้เทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน ควรใช้เลือดกระต่ายเป็นอาหาร และให้อาหารทุก ๆ 3 วัน

คำสำคัญ: เรือด *Cimex hemipterus* เลือดสัตว์ เทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน

คำนำ

เรือด (bed bug) เป็นแมลงที่สำคัญทางการแพทย์ชนิดหนึ่ง ซึ่งในประเทศไทยพบเรือด 2 ชนิด คือ *Cimex hemipterus* (Fabricius) และ *Cimex lectularius* (Linnaeus) จัดเป็นปรสิตขนาดเล็กของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีกด้วยการดูดเลือด และสร้างความรำคาญ โดยเลือดมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเรือด จึงจำเป็นต้องใช้สัตว์ในการทดลอง การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเรือดในห้องปฏิบัติการเพื่อนำไปใช้ในการทดลองนั้นมีการใช้กระต่าย หนู หรือไก่ เป็นแหล่งให้อาหารเรือด ซึ่งปัจจุบันพบว่า ได้เกิดปัญหาขึ้นเกี่ยวกับการใช้สัตว์ทดลอง เนื่องจากมีผู้ใช้สัตว์เป็นจำนวนมากจนเกิดความละเลยคุณธรรมที่พึงมีต่อสัตว์ ไม่คำนึงถึงชีวิตสัตว์ที่จะต้องสูญเสียไปในการทดลองแต่ละครั้ง ทำให้เกิดความทรมานและสร้างความเจ็บปวดแก่สัตว์ อีกทั้งยังไม่คำนึงถึงความกดดันที่สัตว์ได้รับจากการถูกกักขัง สูญเสียอิสรภาพ จึงมีมาตรฐานในระดับสากล โดยสถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สพสว.) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) กำกับดูแลบังคับใช้กฎหมายแห่งพระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558 มีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 14 กันยายน พ.ศ. 2558 เป็นต้นมา กำหนดให้ผู้ใช้สัตว์ทดลองมีจรรยาบรรณการใช้สัตว์ขึ้น เพื่อเป็นแนวทางปฏิบัติในการใช้สัตว์อย่างถูกต้อง เหมาะสมตามหลักวิชาการ เป็นมาตรฐานที่ยอมรับ และเป็นผลดีต่อการพัฒนาคุณภาพชีวิตของมนุษย์และสัตว์ (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ, 2555) โดยทั่วไปวิธีการเลี้ยงเรือดแบบเดิมนั้นใช้กระต่ายเป็นสัตว์อาศัย โดยจับกระต่ายมัดติดกับแท่นนอน ให้อาหารเรือดโดยการดูดกินเลือดกระต่ายโดยตรงเป็นเวลา 15 นาที สัปดาห์ละ 1-2 ครั้ง เพื่อให้เรือดสามารถเจริญเติบโตและสามารถนำไปใช้ในงานทดลองต่อไปได้ (Gilbert, 1964) แต่วิธีการนี้เป็นการทรมานสัตว์ที่ใช้ทดลอง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเรือดที่ใช้เลือดจากไก่ กระต่าย สุกร โค และมนุษย์เป็นอาหาร โดยใช้เทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน (membrane feeding technique) เพื่อเป็นแนวทางการเลี้ยงขยายปริมาณเรือดเพื่อใช้ในงานทดลองต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเรือด

การเพาะเลี้ยงเรือด *C. hemipterus* ได้เลี้ยงในแก้วพลาสติกใสที่มีกระดาษลูกฟูกบรรจุอยู่เพื่อให้เรือดใช้เป็นที่อยู่อาศัยและวางไข่ ปิดด้วยผ้าขาวบางที่ปากแก้วกันเรือดหลบหนี จากนั้นนำแก้วพลาสติกพร้อมเรือดใส่ลงในกล่องพลาสติกควบคุมความชื้นที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ และวางไว้ภายในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส การให้เลือดกระต่ายเป็นอาหารแก่

เรือด กระทำทุก ๆ 3 วัน โดยใช้เทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน อุปกรณ์ให้เลือดด้วยเทคนิคนี้ (ภาพที่ 1) ประกอบด้วยภาชนะแก้วสำหรับใส่เลือด (glass feeder) แล้วปิดปากภาชนะแก้วด้วยแผ่นพาราฟิล์ม คว่ำส่วนปากลง แล้วค่อย ๆ หยดเลือดลงตรงช่องทางด้านใต้ภาชนะ ภาชนะนี้มีช่องว่างสำหรับให้น้ำจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่มีอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส หมุนเวียนผ่านเพื่อรักษาอุณหภูมิของเลือดในภาชนะแก้วอยู่ที่ประมาณ 37 องศาเซลเซียส (Montes *et al.,* 2002) ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลือดที่ใช้เป็นอาหารแก่เรือด ให้เรือดดูดกินเลือดผ่านแผ่นพาราฟิล์มนานประมาณ 15-20 นาที ต่อการให้เลือด 1 ครั้ง

2. การศึกษาการเจริญเติบโตของเรือด

ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเรือดที่ได้รับเลือดของสัตว์ที่แตกต่างกันเป็นอาหาร คือเลือดจากสุกร โค ไก่ กระต่าย โดยนำเลือดจากสัตว์ดังกล่าวผสมสารกันเลือดแข็งตัว (heparin) (BD Biosciences, Inc., Franklin Lakes, NJ, USA) โดยเลือดสุกร จากภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลือดโค จากคุณทักชษ์มนณ์ แสนสุวรรณ เลือดไก่ จากคุณทองคำ ศรีวิกะ เลือดกระต่าย จากศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเลือดมนุษย์ เป็นเลือดที่หมดอายุการใช้งาน จากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ ที่มีการผสมสารกันเลือดแข็งตัวคือ CPDA-1 (citrate-phosphate-dextrose-adenine)

ทำการแยกไข่เรือดที่ติดอยู่กับกระดาษลูกฟูกที่ได้จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณ ลงในถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์ ถ้วยละ 1 ฟอง ปิดปากถ้วยด้วยผ้าขาวบาง และบรรจุถ้วยลงในกล่องควบคุมความชื้นที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ และวางไว้ภายในห้องปฏิบัติการตามวิธีการของ Suwannayod *et al.* (2010) การศึกษาการเจริญเติบโตของเรือดที่ได้รับเลือดแต่ละชนิด ทำการทดลอง 30 ซ้ำ ๆ ละ 1 ฟอง เมื่อไข่ฟักเป็นตัวอ่อน ทำการให้เลือดแต่ละชนิดแก่เรือด ทุก ๆ 3 วัน โดยใช้เทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน สังเกตและบันทึกการเจริญเติบโตของเรือดในแต่ละระยะ โดยบันทึกจำนวนวันที่ใช้ในการฟักของไข่ การเจริญเติบโตในแต่ละวัยของตัวอ่อนจนกระทั่งฟักออกเป็นตัวเต็มวัย จากนั้นวัดขนาดลำตัวของเรือดเมื่อเรือดเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตในแต่ระยะโดยวิธี least significant difference (LSD)

3. การศึกษาความถี่ของการให้เลือดเป็นอาหาร

นำเลือดที่ให้ผลดีกับการเจริญเติบโตของเรือดในข้อ 2 มาใช้เลี้ยงเรือดในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน ทำการให้เลือดดังกล่าวเมื่อเรือดฟักออกจากไข่ ให้เลือดเป็นอาหารกับเรือดทุก ๆ 3, 5, 7 และ 9 วัน ในทุกช่วงเวลาในการให้เลือดทำการทดลอง 6 ซ้ำ ๆ ละ 5 ตัว จากนั้นสังเกตและบันทึกการเจริญเติบโตของเรือดในแต่ละวัยของตัวอ่อนจนกระทั่งฟักออกเป็นตัวเต็มวัย ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน และ

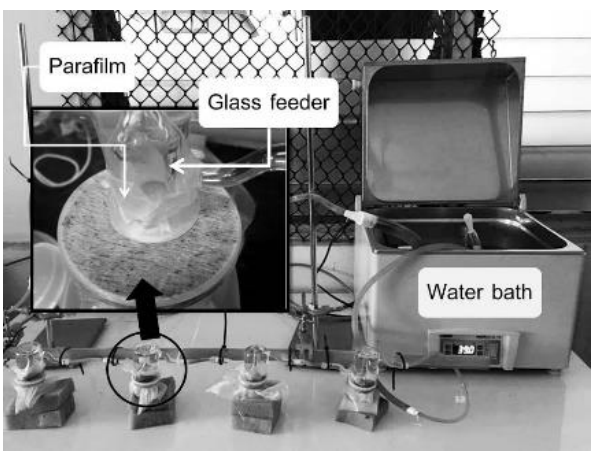

Figure 1. Membrane feeding system for bed bug, *Cimex hemipterus* (Fabricius)

เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตในแต่ระยะโดยวิธี LSD

การศึกษาครั้งนี้ ได้ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ของสถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์ เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สพสว.) ภายใต้การกำกับดูแลบังคับใช้กฎหมายแห่งพระราชบัญญัติสัตว์ เพื่องานวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558 โดยสำนักงานคณะกรมการวิจัยแห่งชาติ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเรือด

จากการใช้เลือดจากสุกร โค ไก่ กระต่าย และมนุษย์ เลี้ยงเรือด *C. hemipterus* ด้วยเทคนิคการให้เลือดผ่านเมมเบรน ทุก ๆ 3 วัน พบว่า เลือดกระต่ายมีผลทำให้เรือดมีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยตัวอ่อนของเรือดมี 5 วัย แต่ละวัยใช้เวลา 8.83 ± 5.47, 8.73 ± 6.06, 6.78 ± 2.46, 5.93 ± 2.60 และ 5.58 ± 1.50 วัน ตามลำดับ และใช้เวลาในการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะไข่ถึงระยะตัวเต็มวัยสั้นที่สุด คือ 37.42 ± 5.19 วัน (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับ Suwannayod *et al.* (2010) ที่รายงานว่าเรือด *C. hemipterus* ที่เลี้ยงด้วยการดูดเลือดกระต่ายโดยตรงทุก ๆ 2 วัน มีการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะไข่ถึงระยะที่ตัวอ่อนฟักเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลา 37.80 ± 8.78 วัน การเลี้ยงเรือดด้วยเลือดไก่และเลือดสุกร เรือดใช้เวลาในการเจริญเติบโต 46.71 ± 4.75 และ 48.83 ± 1.72 วัน ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงด้วยเลือดโค เรือดไม่สามารถพัฒนาไปสู่ตัวอ่อนวัยที่ 3 ได้ ส่วนเรือดที่เลี้ยงด้วยเลือดมนุษย์ เรือดใช้เวลาในการเจริญเติบโตมากที่สุด คือ 91.11 ± 9.52 วัน ซึ่งสอดคล้องกับ Johnson (1937) ที่รายงานว่า ชนิดของเลือดมีผลต่อการเจริญเติบโตของเรือด โดยเรือดที่เลี้ยงด้วยเลือดไก่ เลือดสุกร เลือดกระต่าย เรือดใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตน้อยกว่าเลือดมนุษย์

นอกจากนี้ เมื่อเลี้ยงเรือดด้วยเลือดกระต่าย พบว่า ตัวอ่อนมีการพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัยสูงที่สุด คือ 40.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เรือดที่เลี้ยงด้วยเลือดของมนุษย์ ไก่ และสุกร มีค่าเท่ากับ 30.00, 23.33 และ 20.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ส่วนเลือดโคเมื่อนำมาใช้เลี้ยงตัวอ่อนของเรือดตายหมดตั้งแต่ตัวอ่อนวัยที่ 3 ซึ่งการเลี้ยงเรือดด้วยเลือดมนุษย์ เรือดมีอัตราการรอดสูงถึง 70.00 เปอร์เซ็นต์ โดยสอดคล้องกับการรายงานของ Rahim and Ab Majid (2014) ที่รายงานว่า เรือด *C. hemipterus* เมื่อเลี้ยงเรือดด้วยเลือดมนุษย์ โดยใช้เทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน เรือดมีอัตราการตายอยู่ในช่วง 28.30-35.65 เปอร์เซ็นต์ แต่เรือดที่อยู่รอดยังสามารถสืบพันธุ์ได้ และจากการศึกษาของ Montes *et al.* (2002) พบว่า เลือดที่ผสมสารกันเลือดแข็งตัว (heparin) เหมาะสมต่อการเลี้ยงเรือด *C. lectularius* ด้วยเทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน ซึ่งเรือดในระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัยที่ดูดกินเลือดผ่านเมมเบรน สามารถลอกคราบและวางไข่ได้

Table 1. Durations of various developmental stages of bed bug when fed with various sources of blood under laboratory condition (n=30)

Blood source	Developmental stage[1/] (days)						Total immature period (days)
	Egg stage	Nymphal stage					
		Instar I	Instar II	Instar III	Instar IV	Instar V	
Rabbit	5.00 ± 0.91 b	8.83 ± 5.47 c	8.73 ± 6.06 b	6.78 ± 2.46 a	5.93 ± 2.60 b	5.58 ± 1.50 b	37.42 ± 5.19 c
Pig	4.90 ± 0.30 bc	16.54 ± 6.86 b	7.00 ± 2.63 b	5.89 ± 2.93 a	11.48 ± 1.31 a	11.90 ± 1.65 a	48.83 ± 1.72 b
Cow	4.80 ± 0.41 c	19.00 ± 6.78 b	12.50 ± 7.78 ab			N/A[2/]	
Chicken	5.00 ± 0.00 b	7.57 ± 6.58 c	13.92 ± 4.40 a	6.83 ± 3.04 a	8.76 ± 1.23 ab	9.43 ± 4.20 ab	46.71 ± 4.75 b
Human	7.04 ± 0.20 a	45.73 ± 6.18 a	8.10 ± 4.31 b	8.67 ± 5.68 a	8.55 ± 3.24 ab	14.00 ± 5.38 a	91.11 ± 9.52 a

[1/] Means within column followed by the same letters are not significantly different according to LSD test ($P \leq 0.05$)

[2/] Not available

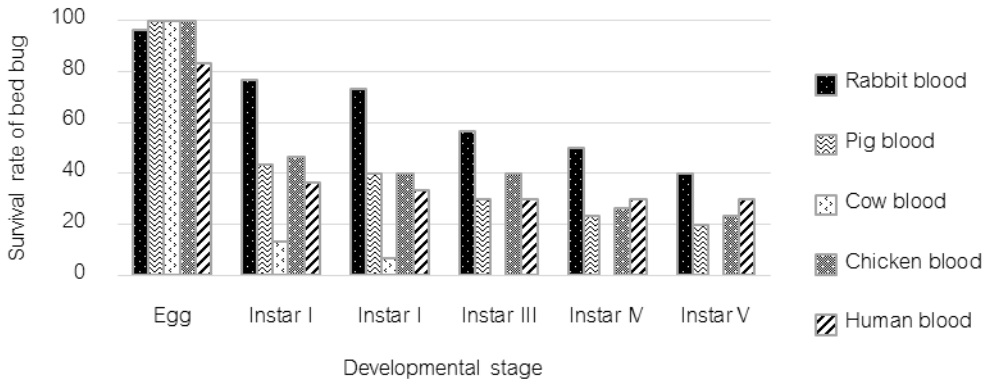

Figure 2. Average survival rate in various developmental stages of bed bug when fed with various sources of blood under laboratory condition

เมื่อเรือดมีการพัฒนาไปถึงตัวเต็มวัย ได้ทำการวัดขนาดของลำตัว โดยวัดขนาดลำตัวตามความยาวของเรือด พบว่า ขนาดลำตัวของตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เรือดเพศผู้ที่เลี้ยงด้วยเลือดกระต่าย สุกร ไก่ และมนุษย์ เรือดมีขนาดลำตัวเท่ากับ 3.55 ± 3.08, 3.88 ± 0.11, 3.77 ± 0.05 และ 3.61 ± 0.20 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนเพศเมียเมื่อเลี้ยงด้วยเลือดทั้ง 4 ชนิด มีขนาดลำตัวใหญ่กว่าเพศผู้ คือ 4.33 ± 0.16, 4.62 ± 0.31, 4.59 ± 0.31 และ 4.20 ± 0.28 มิลลิเมตร ซึ่งขนาดลำตัวของเพศเมียไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

2. การศึกษาช่วงเวลาของการให้เลือดเป็นอาหาร

จากผลการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเรือด *C. hemipterus* ในข้อ 1 พบว่า เลือดกระต่ายให้ผลการเจริญเติบโตของเรือดดีที่สุด จึงนำเลือดกระต่ายมาศึกษาช่วงเวลาในการให้เลือดเป็นอาหารแก่เรือดด้วยเทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน โดยให้เลือดทุก ๆ 3, 5, 7 และ 9 วัน กับตัวอ่อนเรือดที่เพิ่งฟักออกจากไข่ พบว่า การให้เลือดทุก ๆ 3 วัน ตัวอ่อนของเรือดสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับการให้เลือดทุก 5, 7 และ 9 วัน ซึ่งเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตในระยะตัวอ่อนทั้งหมดเท่ากับ 38.38 ± 10.79 วัน รองลงมาคือการให้เลือดทุก ๆ 5 และ 7 วัน โดยเรือดใช้เวลาในการเจริญเจริญเติบโตในระยะตัวอ่อน เท่ากับ 52.27 ± 7.58 และ 61.62 ± 9.47 วัน ตามลำดับ ส่วนการให้เลือดทุก 9 วัน พบว่า เรือดไม่สามารถพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัยได้ (ตารางที่ 3)

การให้เลือดทุกช่วง 3 วัน มีผลทำให้ตัวอ่อนของเรือดพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัยได้มากที่สุด คือ 53.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ การให้เลือดทุกช่วง 5 และ 7 วัน ตัวอ่อนของเรือดสามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้ 43.33 และ 26.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการให้เลือดทุกช่วง 9 วัน ตัวอ่อนของเรือดตายหมดตั้งแต่ตัวอ่อนวัยที่ 3 (ภาพที่ 3) จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่าช่วงเวลาของการให้เลือดมีผลต่อการเจริญเติบโตและการมีชีวิตรอดของเรือด หากเว้นช่วงของการให้อาหารนานขึ้น

การให้อาหารในช่วงเวลาที่ยาวนานขึ้น ทำให้เรือดใช้เวลาในการเจริญเติบโตยาวนานขึ้นด้วย ขณะเดียวกันการอยู่รอดของเรือดมีอัตราต่ำลงทุกขณะ ทั้งนี้เนื่องจากเรือดขาดสารอาหารเพื่อไปใช้ในการเจริญเติบโต แต่ถ้าช่วงเวลาของการให้อาหารในแต่ละครั้งลดลง การอยู่รอดของเรือดมีอัตราสูงมากขึ้น ดังรายงานของ Adkins and Arant (1959) พบว่า การเลี้ยงเรือด *C. lectularius* ดูดกินเลือดกระต่ายโดยตรง 3 ครั้งต่อสัปดาห์ สามารถลดอัตราการตายในระยะตัวอ่อนวัยที่ 1 ได้

จากการสังเกตพฤติกรรมการกินเลือดกระต่ายของเรือดในเบื้องต้น พบว่า การเลี้ยงเรือดด้วยใช้เทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน ทุก ๆ 2 วัน เรือดไม่กินอาหาร ซึ่งเริ่มกินอาหารในวันที่ 3 ดังนั้นจึงให้อาหารแก่เรือดทุก ๆ 3 วัน โดยเรือดมีอัตราการรอด 53.33 เปอร์เซ็นต์ แต่จาก

Table 2. The size of adult bed bug when fed with various sources of blood under laboratory condition (n=30)

Blood source	Size of adult (mm) ±SD[1/]	
	Male	Female
Rabbit	3.55 ± 3.08 a	4.33 ± 0.16 a
Pig	3.88 ± 0.11 a	4.62 ± 0.31 a
Chicken	3.77 ± 0.05 a	4.59 ± 0.31 a
Human	3.61 ± 0.20 a	4.20 ± 0.28 a

[1/] Means within column followed by the same letters are not significantly different according to LSD test ($P \leq 0.05$)

Table 3. Durations of nymphal stage of bed bug when fed with rabbit blood at various feeding intervals under laboratory condition (n=30)

Feeding interval	Nymphal stage[1/] (days)					Total nymphal
(days)	Instar I	Instar II	Instar III	Instar IV	Instar V	period (days)
3	8.12 ± 2.39 a	8.81 ± 2.58 b	7.94 ± 2.98 b	6.81 ± 2.56 b	7.00 ± 2.78 b	38.38 ± 10.79 c
5	7.96 ± 2.22 a	11.26 ± 3.26 b	13.29 ± 4.23 a	14.18 ± 7.47 a	8.00 ± 2.68 ab	52.27 ± 7.58 b
7	9.00 ± 2.00 a	17.33 ± 9.26 a	13.88 ± 4.91 a	13.00 ± 7.05 a	10.50 ± 4.00 a	61.62 ± 9.47 a
9	8.41 ± 2.29 a	11.38 ± 4.29 b	12.40 ± 4.62 a		N/A[2/]	

[1/] Means within column followed by the same letters are not significantly different according to LSD test ($P \leq 0.05$).

[2/] Not available

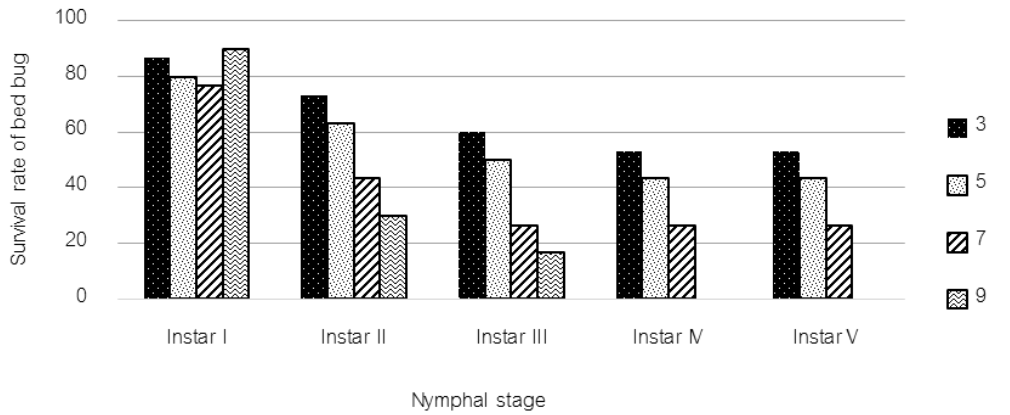

Figure 3. Average survival rate of developmental stages of bed bug when fed with rabbit blood at various feeding day intervals under laboratory condition

การศึกษาของของสุดธิดา (2553) พบว่า การให้อาหารแก่เรือดโดยดูดเลือดของกระต่ายโดยตรง ทุก ๆ 2 วัน ค่อนข้างมีความถี่ที่เรือดได้รับอาหารค่อนข้างสูงกว่าการดำรงชีวิตในสภาพธรรมชาติ ทำให้เรือดมีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการให้อาหารแก่เรือดบ่อยครั้ง หรือให้อาหารแก่เรือดทุกวัน จะเป็นภาระของผู้ปฏิบัติงานอย่างมาก เพราะเป็นงานที่ค่อนข้างละเอียดและต้องใช้เวลามาก นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มการทรมานสัตว์ที่ถูกนำเลือดมาใช้เลี้ยงเรือดซึ่งในทางปฏิบัติควรสอดคล้องตามพระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558

สรุป

การศึกษาการเจริญเติบโตของเรือด *C. hemipterus* ที่เลี้ยงด้วยเทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน ทุก ๆ 3 วัน เลือดกระต่ายให้ผลการเจริญเติบโตของเรือดดีที่สุด โดยใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะไข่จนพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยสั้นที่สุดคือ 37.42 ± 5.19 วัน รองลงมา ได้แก่ เลือดไก่ เลือดสุกร และเลือดมนุษย์ ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโต 46.71 ± 4.75, 48.83 ± 1.72 และ 91.11 ± 9.52 วัน และช่วงเวลาในการให้เลือดกระต่าย ทุก ๆ 3 วัน ตัวอ่อนเรือดสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยใช้เวลาในการเจริญเติบโตในระยะตัวอ่อน 38.38 ± 10.79 วัน รองลงมาคือช่วงเวลาที่ให้เลือดทุก ๆ 5 และ 7 วัน ที่ใช้เวลาในการเจริญเติบโตในระยะตัวอ่อนนาน 52.27 ± 7.58 และ 61.62 ± 9.47 วัน ตามลำดับ และการให้เลือดทุก ๆ 9 วัน เรือดไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้ ในการศึกษาครั้งนี้เลือดกระต่ายเหมาะสมที่นำมาใช้ในการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเรือด *C. hemipterus* ด้วยเทคนิคการให้อาหารผ่านเมมเบรน และช่วงเวลาการให้อาหารที่เหมาะสม คือ ทุก ๆ 3 วัน เพราะเป็นการช่วยลดการทรมานสัตว์ทดลองและลดภาระการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่สนับสนุนเลือดกระต่าย ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนเลือดสุกร คุณทักชษ์ มนณ์ แสนสุวรรณ์ ที่สนับสนุนเลือดโค คุณทองคำ ศรีวิกะ ที่สนับสนุนเลือดไก่ ธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ที่สนับสนุนเลือดมนุษย์ และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ. 2555. จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.nlac.mahidol.ac.th/nlacth/index.php?option=com_content&view=article&id=130&Itemid=211 (7 กุมภาพันธ์ 2558).

สุดธิดา สุวรรณยศ. 2553. ชีววิทยาของเรือดที่พบในประเทศไทยและประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงในการควบคุม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 60 หน้า.

Adkins, T.R., Jr. and F.S. Arant. 1959. A technique for the maintenance of a laboratory colony of *Cimex lectularius* L. on rabbits. Journal of Economic Entomology 52(4): 685-686.

Gilbert, I.H. 1964. Laboratory rearing of cockroaches, bed bugs, human lice, and fleas. Bulletin of the World Health Organization 31: 561-563.

Johnson, C.G. 1937. The relative values of man, mouse, and domestic fowl as experimental hosts for the bed-bug, *Cimex lectularius*. Journal of Zoology A107(1): 107-126.

Montes, C., C. Cuadrillero and D. Vilella. 2002. Maintenance of a laboratory colony of *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) using an artificial feeding technique. Journal of Medical Entomology 39(4): 675-679.

Rahim, A.H.A. and A.H. Ab Majid. 2014. Laboratory rearing of tropical bed bugs (*Cimex hemipterus*, Fabricius) using artificial feeding system. Proceedings of the 13th Symposium of the Malaysian Society of Applied Biology. June 8-10, 2014. Pahang, Malaysia.

Suwannayod, S., Y. Chanbang and S. Buranapanichpan. 2010. The life cycle and

effectiveness of insecticides against the bed bugs of Thailand. Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health 41(3): 548-554.

การควบคุมไร *Suidasia pontifica* ด้วยความร้อนและฟอร์มาลดีไฮด์ ร่วมกับกรดโพรพิโอนิกในอาหารสุกร

Control of *Suidasia pontifica* Using Heat and Formaldehyde Incorporated with Propionic Acid in Swine Feed

สุพิชฌาย์ แสนสุวรรณ์[1/] และ เยาวลักษณ์ จันทร์บาง[1/*]

Supitcha Saensuwan[1/] and Yaowaluk Chanbang[1/*]

[1/]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

[1/]Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: lukksu@hotmail.com*

(Received: 1 August 2016; Accepted: 31 August 2016)

Abstract: Effect of heat from feed processing on number of scaly grain mites, *Suidasia pontifica* was determined in 5 steps of swine feed processing i.e. mixer, conditioner (79 °C for 30 seconds), pelleting (83 °C for less than a second), cooler and warehouse in laboratory condition which maintained 29.74 ± 2.25 °C and 64 ± 11.38% RH. The first scaly grain mites were found at the mixer process in next coming examination period at day 52. At the conditioner and pelleting processes scaly grain mites were found at day 56 and 64, respectively. The evidence for presence of first scaly grain mites found in mixer was demonstrated earlier than in conditioner and pelleting for 4 and 12 days, respectively while in cooler and warehouse (ambient temperature), the first scaly grain mites was found in the same as conditioner and pelleting. In the 2nd experiment, formaldehyde and propionic acid at rate of 3 kg/ton was mixed in swine feed during processing. The swine feed without formaldehyde and propionic acid was prepared as the untreated control. The swine feed sampling in each step stored in 27.25 ± 2.55 °C and 65.03 ± 9.18% RH. The first scaly grain mites was found in untreated control, mixer and warehouse in day 32. While scaly grain mites in conditioner and pelleting were in day 52 and 48, respectively. So the evidence for presence of first scaly grain mites found in swine feed produced with formaldehyde and propionic acid in mixer and warehouse showed earlier than in conditioner and pelleting for 20 and 16 days, respectively.

Keywords: Scaly grain mites, *Suidasia pontifica*, swine feed, formaldehyde, propionic acid

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของความร้อนจากระบบการผลิตอาหารสุกรในการยับยั้งไร *Suidasia pontifica* เป็นไรที่พบในอาหารสัตว์ ตัวอย่างอาหารสุกรที่สุ่มจาก 5 ขั้นตอนการผลิตหลัก ได้แก่ mixer, conditioner (ความร้อน 79 °C ประมาณ 30 วินาที), pelleting (มีความร้อน 83 °C เป็นเวลาต่ำกว่า 1 วินาที), cooler และ warehouse นำมาเก็บรักษาในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 29.74 ± 2.25 °C และความชื้นสัมพัทธ์ 64 ± 11.38% จากนั้นสุ่มตัวอย่างอาหารสัตว์และตรวจนับจำนวนไรทุก 4 วัน พบว่า อาหารที่ตำแหน่ง mixer เริ่มพบไรในวันที่ 52 ในขณะที่ตำแหน่ง conditioner และ pelleting เริ่มพบไรในวันที่ 56 และ 64 ตามลำดับ ซึ่งอาหารที่ผ่านความร้อนในตำแหน่ง conditioner และ pelleting พบการปนเปื้อนไรช้ากว่าตำแหน่งที่ไม่มีการใช้ความร้อน (mixer) 4 และ 12 วัน ตามลำดับ ส่วนอาหารในตำแหน่ง cooler และ warehouse ซึ่งอาหารกลับมาผ่านอุณหภูมิสภาพบรรยากาศประมาณ 30-40 °C เริ่มพบไรเช่นเดียวกับตำแหน่ง conditioner และ pelleting ในการทดลองที่ 2 ได้นำฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิก อัตรา 3 กิโลกรัมต่อตัน มาใช้ผสมกับอาหารสุกรระหว่างการผลิต สุ่มตัวอย่างมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 27.25 ± 2.55 °C และความชื้นสัมพัทธ์ 65.03 ± 9.18% ตรวจนับจำนวนไรทุก 4 วัน พบว่า ในวันที่ 32 เริ่มพบไรในตำแหน่ง mixer, warehouse และชุดควบคุม (ไม่ใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิก) ส่วนอาหารในตำแหน่ง conditioner และ pelleting เริ่มพบไรในวันที่ 52 และ 48 วัน ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิกในการผลิตอาหารสุกร มีผลทำให้วันที่เริ่มพบไรในตำแหน่ง conditioner และ pelleting ช้ากว่าในตำแหน่ง mixer, warehouse และชุดควบคุม 20 และ 16 วัน ตามลำดับ

คำสำคัญ: ไรผิวย่น *Suidasia pontifica* อาหารสุกร ฟอร์มาลดีไฮด์ กรดโพรพิโอนิก

คำนำ

วัตถุดิบในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ เช่น ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ปลาป่น และกากถั่วเหลือง เป็นส่วนประกอบสำคัญในการผลิตอาหารสัตว์หลายชนิด เช่น อาหารสุกร อาหารไก่ เป็นต้น ซึ่งอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ส่วนใหญ่มีการซื้อวัตถุดิบเก็บไว้เป็นเวลานาน มักพบการระบาดของแมลงศัตรูในโรงเก็บ ได้แก่ ด้วงงวงข้าวโพด (*Sitophilus zeamais*) มอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) ผีเสื้อข้าวโพด (*Ephestia cautella*) (Trematerra and Fiorilli, 1999) เหาหนังสือ (*Liposcelis* spp.) มอดยาสูบ (*Lasioderma serricorne*) และไรศัตรูในโรงเก็บชนิดต่าง ๆ ส่งผลให้แมลง และไรติดไปกับอาหารสัตว์สำเร็จรูประหว่างการนำไปใช้เลี้ยงสัตว์ แม้ว่าจะมีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูในวัตถุดิบอาหารมาก่อนก็ตาม โดยเฉพาะปัจจุบันพบว่าปัญหาที่สำคัญมักเกิดจากไรปนเปื้อน และระบาดในอาหารสัตว์สำเร็จรูป ส่งผลเสียต่อคุณภาพอาหารสัตว์

ไรที่มักพบส่วนใหญ่เป็นไรผิวย่น (scaly grain mite) *Suidasia pontifica* (Oudemans) (Astigmata: Acaridae) ไรชนิดนี้มีลักษณะลำตัวรูปไข่ อ่อนนิ่ม ขนาดปานกลาง สีขาวหรือสีครีม ขาสั้นสีน้ำตาลอ่อน ผิวของลำตัวมีลักษณะเป็นร่อยย่นแตกเป็นช่องเล็ก ๆ คล้ายรูปเซลล์เรียงต่อกัน (พลอยชมพู และคณะ, 2559) ส่วนท้ายของลำตัวมีเส้นขนยาวออกมา 2 เส้น ซึ่งพบไรชนิดนี้เข้าทำลายผลผลิตทางการเกษตรหลากหลายชนิด เช่น อาหารสัตว์ อาหารเสริมสำหรับสัตว์ ปลาแห้ง ถั่วลิสง และกระเทียม เป็นต้น (วัฒนา และคณะ, 2546) หากมีการเข้าทำลายในเมล็ดธัญพืชทำให้เมล็ดธัญพืชแตกเป็นผุยผง (พลอยชมพู และคณะ, 2559) นอกจากนี้ผู้ประกอบการโรงงานอาหารสัตว์ในประเทศไทยมีข้อสังเกตว่าอาหารสัตว์ที่มีไรเข้าทำลายอาหารมักมีกลิ่นคล้ายตะไคร้ส่งผลให้ความน่ากิน (palatability) ของอาหารลดลง และลดอัตราการเจริญเติบโตของสุกร และเป็นตัวนำพาและแพร่กระจายเชื้อราเข้าสู่วัตถุดิบและอาหารสัตว์ (Wilkin and Thind, 1984) ซึ่งในต่างประเทศ ไร *Tyrophagus putrescentiae* หรือ mold mite มักปล่อยของเสียที่มีกลิ่นคล้ายกลิ่นมะนาวหรือเรียกว่า “lemon-scented” ออกมา

ส่วนไร *Acarus siro* หรือ flour mite เป็นไรที่พบในโรงเก็บรักษาผลิตผลทางการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมล็ดธัญพืช พบว่า มีการปล่อยกลิ่นคล้ายมินท์ “minty odour” (Nayak and Emery, 2007) ซึ่งไรทั้งสองชนิดนี้ยังไม่พบการรายงานว่ามีในประเทศไทย (พลอยชมพู และคณะ, 2551)

โรงงานผลิตอาหารสัตว์ มีการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดไพรพิโอนิกทำความสะอาดระบบการผลิต เนื่องจากเป็นกรดธรรมชาติที่นำมาใช้ผสมกับอาหารสัตว์เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และรักษาคุณภาพของอาหาร และขั้นตอนการผลิตอาหารสัตว์บางขั้นตอนมีการใช้ความร้อนจึงมีสมมุติฐานว่า ความร้อน และกรดธรรมชาติมีผลต่อการเจริญเติบโตของไร ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในกระบวนการผลิตอาหารสุกร และประสิทธิภาพของความร้อนในการผลิตร่วมกับฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดไพรพิโอนิกที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไร *S. pontifica* ในอาหารสุกร

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ผลของความร้อนในระบบการผลิตอาหารสุกรที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไร *S. pontifica*

ทำการสุ่มตัวอย่างอาหารจากวัตถุดิบที่เคลื่อนที่ในกระบวนการผลิตอาหารสุกรในโรงงานผลิตอาหารสัตว์ จังหวัด ราชบุรี โดยใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นวัตถุดิบหลักที่มีการผลิตอาหารผ่าน 5 ขั้นตอน ได้แก่ การผสม (mixer) การคลุกไอน้ำ (conditioner) การอัดเม็ด (pelleting) การอบเย็น (cooler) และโกดังอาหารสำเร็จรูป (warehouse) ก่อนการผลิตเครื่องจักรได้รับการทำความสะอาดโดยการล้างระบบลำเลียง เก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 วัน แต่ละวัน สุ่มเก็บตัวอย่างบริเวณช่องเก็บตัวอย่างในแต่ละตำแหน่งการผลิต ปริมาณ 1.5 กิโลกรัม ใส่ถุงซิปปิดสนิท พร้อมติดฉลาก ระบุ วัน/เดือน/ปี ที่ผลิตและเก็บตัวอย่าง แล้วนำตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการแมลงศัตรูในโรงเก็บ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ โดยมีตำแหน่งที่ศึกษา ดังนี้ต่อไปนี้

ตำแหน่งที่ 1 อาหารสุกรที่ผ่านตำแหน่งผสม (mixer) ส่วนที่ผสมคลุกเคล้าวัตถุดิบให้เป็นเนื้อเดียวกัน

ตำแหน่งที่ 2 อาหารสุกรที่ผ่านตำแหน่งคลุกไอน้ำ (conditioner) ใช้อุณหภูมิประมาณ 79 องศาเซลเซียส

ตำแหน่งที่ 3 อาหารสุกรที่ผ่านตำแหน่งอัดเม็ด (pelleting) ใช้อุณหภูมิประมาณ 83 องศาเซลเซียส

ตำแหน่งที่ 4 อาหารสุกรที่ผ่านตำแหน่งอบเย็น (cooler) จนกว่าอุณหภูมิอาหารอยู่ที่ ±5 องศาเซลเซียส

ตำแหน่งที่ 5 อาหารสุกรที่ผ่านตำแหน่งโกดังอาหารสำเร็จรูป (warehouse)

ตำแหน่งที่ 6 ชุดควบคุม (อาหารก่อนการล้างระบบการผลิต)

นำตัวอย่างอาหารสุกรจากตำแหน่งต่าง ๆ มาแบ่งสุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10 กรัม ใส่ลงในถ้วยพลาสติกใสปิดปากถ้วยด้วยกระดาษสา ซึ่งอาหารสุกรแต่ละถ้วยเตรียมสำหรับการตรวจนับจำนวนไรในแต่ละวัน โดยการตรวจนับปริมาณใช้วิธีสุ่มย่อย (subsampling) จำนวน 5 ครั้ง หลังจากนับไรในอาหารแล้วจะไม่นำกลับมานับอีก และเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์สำหรับการตรวจนับจำนวนไร 23 ถ้วย เพื่อตรวจนับทุก 4 วัน เป็นระยะเวลา 92 วัน โดยนำถ้วยพลาสติกที่เก็บตัวอย่างอาหารสุกร เก็บในกล่องพลาสติกที่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพอุณหภูมิห้อง ช่วงอุณหภูมิประมาณ 25-32 องศาเซลเซียส ทุกตำแหน่งทำ 4 ซ้ำ

ข้อมูลจำนวนไรที่พบในอาหารสุกรนำมาหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance) โดยมี 2 ปัจจัย ได้แก่ ตำแหน่งการผลิตอาหารสุกร และระยะเวลาที่เก็บรักษาอาหารสุกร และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี least significant difference (LSD)

2. การเจริญเติบโตของไรในอาหารสุกรหลังผสมฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิก

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการกำจัดไร สารฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดไพรพิโอนิกร่วมกับอุณหภูมิในระบบการผลิตอาหารสัตว์ โดยทำการผสมสารฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิก ปริมาณ 3 กิโลกรัมต่อตัน กับอาหารสัตว์ในตำแหน่ง mixer ซึ่งสารดังกล่าวได้รับอนุญาตถูกต้องตามกฎหมายให้ใช้ผสมอาหารสัตว์ได้ โดยมีขั้นตอนการผลิตเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 ทำการสุ่มตัวอย่างอาหารสัตว์ในแต่ละตำแหน่งของขั้นตอนการผลิต จำนวน 1.5 กิโลกรัม และนำมาตรวจนับจำนวนไรในห้องปฏิบัติการและหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ผลการศึกษา เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของความร้อนในระบบการผลิตอาหารสุกรที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไร *S. pontifica*

ในวันที่ 1 ของการผลิตอาหารสุกร ตัวอย่างที่สุ่มจากตำแหน่งต่าง ๆ นำมาเก็บรักษาในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 29.74 ± 2.25 °C และความชื้นสัมพัทธ์ 64 ± 11.38% พบว่า อาหารที่ตำแหน่ง mixer ไม่พบการเกิดไรในอาหารสุกรหลังจากการผลิตและเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 48 วัน และเริ่มพบไรในวันที่ 52 ในขณะที่ตำแหน่ง conditioner ซึ่งมีความร้อน 79 °C ประมาณ 30 วินาที และตำแหน่ง pelleting มีความร้อน 83 °C เป็นเวลาต่ำกว่า 1 วินาที อาหารที่สุ่มมาเก็บรักษาเริ่มพบไรในวันที่ 56 และ 64 ตามลำดับ สรุปได้ว่า อาหารที่ผ่านความร้อนในตำแหน่ง conditioner และ pelleting พบการปนเปื้อนไรช้ากว่าตำแหน่งที่ไม่มีการใช้ความร้อน ได้แก่ mixer เป็นเวลา 4 และ 12 วัน ตามลำดับ ส่วนอาหารสุกรที่สุ่มตรวจในตำแหน่ง cooler และ warehouse ซึ่งอาหารกลับมาผ่านอุณหภูมิสภาพบรรยากาศประมาณ 30-40 °C เริ่มพบไรเช่นเดียวกับอาหารที่ตำแหน่ง conditioner และ pelleting (ภาพที่ 1) และจากการสำรวจไรในอาหารที่ผ่านขบวนการผลิตอาหารสุกรเป็นเวลา 6 วัน หลังการทำความสะอาดระบบลำเลียง อาหารสุกรที่ผลิตในวันที่ 1, 2 และ 3 ในขั้นตอนการผลิตอาหารสุกรและเก็บรักษาไว้ 32 วันไม่พบการปนเปื้อนของไร แต่พบไรจากอาหารที่ผลิตในวันที่ 4,5 และ 6 หลังการล้างท่อลำเลียงอาหารในช่วงเวลาที่เก็บรักษาเท่ากัน โดยปริมาณของไรแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 1) อาหารที่ผลิตในวันที่ 4 หลังจากการล้างท่อลำเลียง พบปริมาณไรต่อกรัมสูงสุดในตำแหน่ง conditioner (1,824.0) รองลงมาเป็นตำแหน่ง mixer (640.0), cooler (148.0) และ

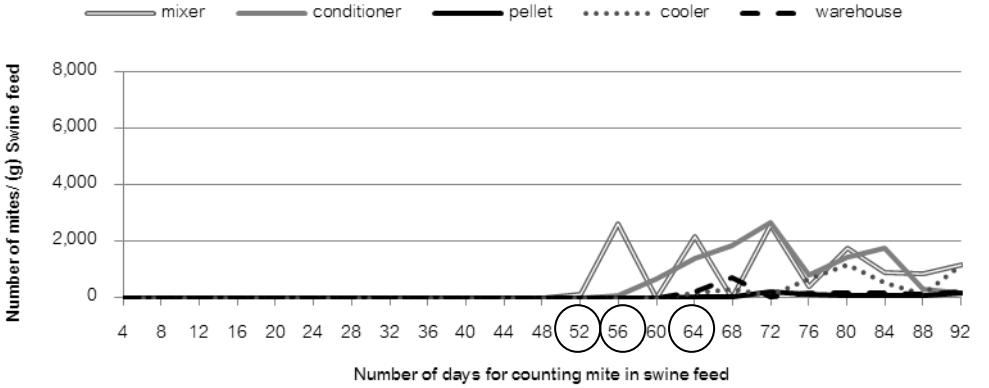

Figure 1. The first scaly grain mites found (in circle) in swine feed produced through 5 steps including mixer, conditioner, pelleting, cooler and warehouse. When feed samples were examined every 4 day interval for 92 days

Circle at day 52: shows mites contamination found in mixer step

Circle at day 56: shows mites contamination found in conditioner and cooler steps

Circle at day 64: shows mites contamination found in pelleting and warehouse steps

warehouse (170.4) ส่วนในวันที่ 5 ตำแหน่งที่พบไร (ตัวต่อกรัม) สูงสุด ได้แก่ mixer (1,785.6) รองลงมาเป็น cooler (449.6) warehouse (392.8) pelleting (64.8) และ conditioner (0) ตามลำดับ และจำนวนไรที่เกิดขึ้นในวันที่ 6 ของการผลิตพบว่า ปริมาณไรมีความผันผวนระดับหนึ่งแต่มีแนวโน้มว่า เมื่ออาหารสัตว์ได้ผ่านในตำแหน่ง conditioner และ pelleting เป็นต้นไป มีปริมาณไรลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนจำนวนไรที่ได้จากตัวอย่างอาหารสัตว์หลังเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 60 วัน จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และการล้างท่อลำเลียงอาหารมีแนวโน้มต่อการลดจำนวนของไร (ตารางที่ 2)

และเมื่ออาหารสัตว์ที่สุ่มในวันต่าง ๆ เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 92 วัน (ตารางที่ 3) พบว่าปริมาณไรที่เจริญอยู่ในอาหารที่ผลิตในตำแหน่งต่างกัน มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า พบจำนวนไรผิวย่นน้อยกว่าการเก็บรักษาอาหารสัตว์ไว้เป็นเวลา 60 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการปะปนของไรตัวห้ำ โดยเฉพาะไร *Cheyletus* sp. ซึ่งเป็นไรตัวห้ำในโรงเก็บที่คอยควบคุมโดยธรรมชาติ (Boese, 1985) รวมถึงปัจจัยด้านคุณภาพอาหาร ความหนาแน่น และปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งอาหารสัตว์ที่มีการเก็บรักษาไว้เป็นเวลานานมีความเสี่ยงที่จะทำให้ไรที่ปะปนอยู่ในวัตถุดิบผลิตอาหารสัตว์สามารถเจริญสร้าง

Table 1. Numbers of scaly grain mites, *Suidasia pontifica* found in various swine feed processing without formaldehyde and propionic acid in day 1-6 after line cleaning. When samples were stored for 32 days

Feed	Number of mites /g (mean ± SD)[1/]					
processing	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days
Mixer	0	0	0	640.0 ± 559.21^{b}	1,785.6 ± 490.26^{a}	489.6 ± 687.11^{ab}
ner	0	0	0	1,824.0 ± 618.08^{a}	0^{c}	640.0 ± 183.42^{a}
Pelleting	0	0	0	40.8 ± 25.25^{c}	64.8 ± 60.79^{bc}	20.0 ± 12.36^{bc}
Cooler	0	0	0	148.0 ± 125.15^{bc}	449.6 ± 171.46^{b}	0^{c}
Warehouse	0	0	0	170.4 ± 87.53^{bc}	392.8 ± 98.86^{bc}	0^{c}

[1/]Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$

Table 2. Numbers of scaly grain mites, *Suidasia pontifica* found in various swine feed processing without formaldehyde and propionic acid in day 1-6 after line cleaning. When samples were stored for 60 days

Feed	Number of mites /g (mean ± SD)[1/]					
processing	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days
Mixer	0^{a}	768.0 ± 508.58^{a}	2,380.8 ± 1,314.4^{a}	2,393.6 ± 842.73^{ab}	6,246.4 ± 3,044.0^{a}	20,966 ± 6441.0^{a}
Conditioner	652.8 ± 1,305.6^{a}	0^{b}	2,457.6 ± 1,306.7^{a}	2,803.2 ± 1,346.5^{ab}	2,086.4 ± 1,409.9^{ab}	5,785.6 ± 6,101.6^{b}
Pelleting	0^{a}	104.8 ± 74.42^{b}	10.4 ± 12.08^{b}	839.2 ± 631.62^{b}	182.4 ± 186.39^{b}	412.0 ± 749.89^{bc}
Cooler	279.2 ± 286.48^{a}	342.4 ± 259.65^{b}	144.8 ± 203.32^{b}	1,353.6 ± 737.78^{b}	5,926.4 ± 4,308.1^{a}	0^{c}
Warehouse	0^{a}	0^{b}	0^{b}	5,126.4 ± 3,958.6^{a}	5,678.4 ± 5,804.1^{a}	77.6 ± 67.35^{bc}

[1/]Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$

Table 3. Numbers of scaly grain mites, *Suidasia pontifica* found in various swine feed processing without formaldehyde and propionic acid in day 1-6 after line cleaning. When samples were stored for 92 days

Feed processing	Number of mites /g (mean ± SD)[1/]					
	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days
Mixer	1,139.2 ± 2,046.5[a]	1,292.8± 953.64[b]	601.6 ± 355.65[b]	665.6 ± 667.57[a]	294.4 ± 169.17[bc]	2,201.6 ± 2,072.2[a]
Conditioner	153.6 ± 41.80[a]	422.4± 268.90[b]	1,241.6 ± 2,213.4[ab]	294.4 ± 284.69[a]	819.2 ± 247.32[a]	588.8± 555.39[b]
Pelleting	152.8 ± 98.47[a]	1,292± 1,451.9[b]	104.0 ± 75.79[b]	281.6 ± 227.06[a]	76.0 ± 50.28[c]	556.8± 409.80[b]
Cooler	1,181.6 ± 1,169.8[a]	3,590.4± 2,495.3[a]	3,926.4 ± 2,992.7[a]	492.8 ± 467.10[a]	630.4 ± 384.76[ab]	672.0± 517.57[ab]
Warehouse	205.6 ± 119.91[a]	470.4± 230.49[b]	198.4 ± 189.44[b]	332.8 ± 351.01[a]	571.2 ± 317.40[ab]	454.4± 251.15[b]

[1/]Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$

ปัญหาได้ สภาพการผลิตอาหารสัตว์ถึงแม้ว่าได้ผ่านความร้อนมาระดับหนึ่งแต่เมื่อเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิที่สูงประมาณ 29 °C จัดว่าเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จึงทำให้ไรสามารถเจริญเติบโตได้เป็นอย่าง จากรายงานของ Hubert *et al.* (2013) พบว่า อุณหภูมิที่ 30 °C เหมาะสมต่อการเพิ่มประชากรของไร *T. putrescentiae* เช่นกัน นอกจากนี้จากการสังเกตอาหารที่มีการปนเปื้อนของไร พบว่าอาหารมีกลิ่นเปลี่ยนคล้ายกลิ่นตระไคร้ ซึ่งกลิ่นดังกล่าวจะเริ่มพบพร้อมกับวันที่เริ่มพบการปนเปื้อนของไร โดยปริมาณไรประมาณ 1,000 ตัว จะมีกลิ่นตระไคร้เล็กน้อย ส่วนไรปริมาณประมาณ 10,000 ตัว กลิ่นตระไคร้จะรุนแรงมากขึ้น

2. ผลการเจริญเติบโตของไร *S. pontifica* ในอาหารสุกรหลังผสมฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิก

ในวันที่ 1 ของการผลิตอาหารสัตว์ที่ผสมฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิก อาหารสุกรที่ผลิตก่อนการล้างระบบลำเลียง (ชุดควบคุม) และอาหารที่ผลิตหลังจากการล้างระบบลำเลียง โดยหลังจากสุ่มตัวอย่างและเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ 27.25 ± 2.55 °C และความชื้นสัมพัทธ์ 65.03 ± 9.18% ตรวจนับจำนวนไรทุก 4 วันพบว่า เริ่มพบไรในตัวอย่างอาหารสัตว์ในวันที่ 32 พบในชุดควบคุม และตำแหน่ง mixer และ warehouse ในขณะที่ตำแหน่ง conditioner และ pelleting เริ่มพบไรในวันที่ 52 และ 48 วัน ในสภาพการจัดการเดียวกัน อาหารที่ผสมฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิกผลิตในตำแหน่ง conditioner และ pelleting มีการพบไรช้าลงถึง 20 และ 16 วันตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ส่วนอาหารที่ตำแหน่ง cooler พบการปนเปื้อนในวันที่ 44 (ภาพที่ 2) นอกจากนี้อาหารสุกรที่ผลิตใน 5 ตำแหน่งที่ผลิตในวันที่ 1-6 เก็บรักษาเป็นเวลา 32 วัน หลังจากการสุ่มตัวอย่าง พบว่า อาหารที่ตำแหน่ง conditioner, pelleting และ cooler ไม่พบการปนเปื้อนของไร (ตารางที่ 4) ส่วนอาหารที่เก็บรักษาเป็นเวลา 60 และ 92 วัน หลังสุ่มตัวอย่าง ทั้ง 5 ตำแหน่งการผลิต พบว่า อาหารทั้ง 5 ตำแหน่งมีปริมาณของไรแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยอาหารที่ ตำแหน่ง mixer พบปริมาณการปนเปื้อนของไรมากที่สุด (ตารางที่ 5 และ 6) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอาหารที่ผลิตในวันที่ 1, 3 และ 5 วัน พบมอดแป้ง มอดยาสูบ และเหาหนังสือเข้าทำลายร่วมกับไร ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณไรลดลง อย่างไรก็ตาม การผลิตอาหารในแต่ละวัน มีความแตกต่างกันในแต่ละชุดวัตถุดิบที่นำมาใช้มีระดับการปนเปื้อนที่ไม่สม่ำเสมอ ทั้งนี้พบว่าในวันที่ 3 และ 4 อาหารสัตว์ได้เริ่มต้นผ่านตำแหน่ง mixer กลับไม่พบไรเลย (ตารางที่ 4) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าวัตถุดิบที่นำมาใช้ เช่น ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์อาจมีการจัดการแมลงและไรได้เป็นอย่างดี เช่น การรมด้วยฟอสฟีน ซึ่งทำให้อาหารสัตว์ที่เก็บตัวอย่างในตำแหน่งต่าง ๆ ไม่พบไรเข้าปนเปื้อน กรณีผสมฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิกเข้าไปในขบวนการผลิต พบว่าส่งผลทำให้จำนวนไรในอาหารสัตว์ในตำแหน่ง conditioner, pelleting, cooler

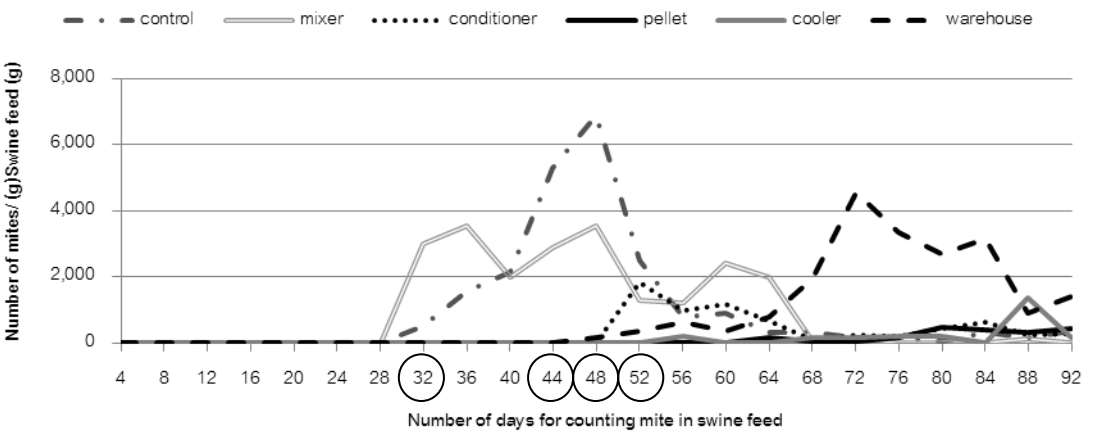

Figure 2. The first scaly grain mite found (in circle) in swine feed mixed with formaldehyde and propionic acid produced through 5 steps include mixer, conditioner, pelleting, cooler and warehouse. When feed samples were examined every 4 day interval for 92 days

Circle at day 32: shows mites contamination found in control, mixer and warehouse steps

Circle at day 52: shows mites contamination found in conditioner step

Circle at day 48: shows mites contamination found in pelleting step

Circle at day 44: shows mites contamination found in cooler step

Table 4. Numbers of scaly grain mites, *Suidasia pontifica* found in various swine feed processing with formaldehyde and propionic acid in day 1-6 after line cleaning. When samples were stored for 32 days

Feed processing	Number of mites /g (mean ± SD)[1/]					
	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days
Mixer	3,001.6±1,245.6[a]	640.0±430.91[a]	0	0	1,004.8±468.03[a]	633.6±380.50[a]
Conditioner	0[b]	0[b]	0	0	0[b]	0[b]
Pelleting	0[b]	0[b]	0	0	0[b]	0[b]
Cooler	0[b]	0[b]	0	0	0[b]	0[b]
Warehouse	0.4±0.79[b]	0[b]	0	0	0[b]	0[b]

[1/]Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$

Table 5. Numbers of scaly grain mites, *Suidasia pontifica* found in various swine feed processing with formaldehyde and propionic acid in day 1-6 after line cleaning. When samples were stored for 60 days

Feed processing	Number of mites /g (mean ± SD)[1/]					
	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days
Mixer	2,432.0 ± 1,269.7[a]	2,886.4 ± 1,695.2[a]	1,164.8 ± 471.81[a]	396.8 ± 87.44[a]	806.4 ± 311.09[a]	857.6 ± 477.33[a]
Conditioner	1,164.8 ± 664.12[b]	0[b]	172.8 ± 241.40[b]	0[b]	0[b]	230.4 ± 460.80[b]
Pelleting	3.2 ± 4.53[c]	1.2 ± 1.53[b]	0[b]	0[b]	0[b]	0.2 ± 0.05[b]
Cooler	13.9 ± 5.46[c]	212.0 ± 258.84[b]	444.8 ± 766.96[b]	0[b]	0[b]	308.4 ± 269.7[b]
Warehouse	364.8 ± 205.32[bc]	340.0 ± 382.97[b]	30.0 ± 27.26[b]	0[b]	1.63 ± 3.18[b]	0.97 ± 0.22[b]

[1/]Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$

Table 6. Numbers of scaly grain mites, *Suidasia pontifica* found in various swine feed processing with formaldehyde and propionic acid in day 1-6 after line cleaning. When samples were stored for 92 days

Feed processing	Number of mites /g (mean ± SD)[1/]					
	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days
Mixer	12.8 ± 25.6[b]	268.8 ± 188.70[a]	0[b]	448.2 ± 345.29[a]	1,728.0 ± 759.85[a]	0[c]
Conditioner	268.8 ± 234.16[b]	0[a]	217.6 ± 313.88[ab]	0.27 ± 0.13[b]	365.0 ± 456.96[b]	0[c]
Pelleting	441.6 ± 118.93[b]	396.8 ± 170.45[a]	15.6 ± 15.69[b]	78.0 ± 86.06[b]	52.0 ± 19.62[b]	0[c]
Cooler	172.8 ± 173.16[b]	1,843.2 ± 2,809.0[a]	688.0 ± 526.35[ab]	160.0 ± 236.08[b]	455.5 ± 732.26[b]	195.2 ± 54.68[a]
Warehouse	1,420.8 ± 714.82[a]	1,097.6 ± 879.29[a]	1,081.6 ± 1,043.2[a]	12.4 ± 9.83[b]	0[b]	65.6 ± 25.80[b]

[1/]Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$

และ warehouse มีแนวโน้มลดลงได้ชัดเจนยิ่งขึ้น กรณีที่ท่อลำเลียงอาหารสัตว์พบการปนเปื้อนของไร อาจส่งผลให้ปริมาณไรเพิ่มขึ้นได้ระดับหนึ่ง เช่นเดียวกับการรายงานของฉัตราภรณ์ และคณะ (2557) พบว่า การใช้อาหารสัตว์ที่ไม่มีไรปะปนอยู่ผสมสารฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้น 0.136:0.032 เปอร์เซ็นต์ใช้ทำความสะอาดท่อลำเลียงที่มีไรปนเปื้อนในท่อลำเลียง พบว่าอาหารที่นำไปทำความสะอาด ไรไม่สามารถเจริญได้ในเดือนแรกแต่เริ่มพบในเดือนที่ 2 ดังนั้นในการควบคุมไรในการผลิตอาหารสัตว์อาจทำได้โดยการรวมวิธี ด้วยการผสมฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิกทำความสะอาดระบบการผลิต ร่วมกับการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิกผสมลงในอาหารสัตว์ในอัตราที่เหมาะสม จะเป็นแนวทางในการควบคุมปริมาณไรอย่างมีประสิทธิภาพ

สรุป

ความร้อนจากระบบการผลิตอาหารสุกรใน ตำแหน่ง conditioner ซึ่งมีความร้อน 79 °C ประมาณ 30 วินาที และตำแหน่ง pelleting มีความร้อน 83 °C ในเป็นเวลาต่ำกว่า 1 วินาที มีผลต่อจำนวนไร *Suidasia pontifica* ในอาหารสัตว์ที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 32 วัน มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่ง mixer และอาหารที่ผ่านความร้อนในตำแหน่ง conditioner และ pelleting ทำให้การปนเปื้อนของไรช้ากว่าตำแหน่งที่ไม่มีการใช้ความร้อน (mixer) 4 และ 12 วัน ตามลำดับ การนำฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิกอัตรา 3 กิโลกรัมต่อตัน มาใช้ผสมกับอาหารสุกรระหว่างการผลิตยังมีผลทำให้วันที่เริ่มพบการปนเปื้อนของไรในตำแหน่ง conditioner และ pelleting ช้ากว่าในตำแหน่ง mixer, warehouse 20 และ 16 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้ในการทำความสะอาดระบบลำเลียงสามารถชะลอการปนเปื้อนของไรในอาหารสัตว์ได้ 32 วัน (1 เดือน) อย่างไรก็ตามการทำความสะอาดระบบลำเลียงอาหารสัตว์ในการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิกควรทำสัปดาห์ละครั้งสำหรับการควบคุมไร *S. pontifica*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการวิจัยได้รับทุนสนับสนุนวิจัยจาก P.V.T. Manufacturing Co., Ltd. จ. นนทบุรี และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และขอขอบคุณ ดร. พลอยชมพู กรวิภาสเรือง นักกีฏวิทยาชำนาญการ กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้กรุณาให้ความรู้และอบรมทางด้านไรศัตรูในโรงเก็บ

เอกสารอ้างอิง

ฉัตราภรณ์ กุณาวงค์ เยาวลักษณ์ จันทร์บาง ไสว บูรณพานิชพันธุ์ และอำมร อินทร์สังข์. 2557. การควบคุมไร *Suidasia pontifica* Oudemans ในอาหารไก่โดยใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิก. วารสารเกษตร 30(3): 243-252.

พลอยชมพู กรวิภาสเรือง มานิตา คงชื่นสิน และเทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์. 2551. อนุกรมวิธานไรศัตรู โรงเก็บของประเทศไทย. หน้า 1559-1564. *ใน*: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551 เล่มที่ 3. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

พลอยชมพู กรวิภาสเรือง วัฒนา จารณศรี มานิตา คงชื่นสิน เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ และวิมลวรรณ โชติวงศ์. 2559. ไรศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. เอกสารประกอบการบรรยายในการอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง "ไรศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด ครั้งที่ 3" กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 185 หน้า.

วัฒนา จารณศรี มานิตา คงชื่นสิน และเทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์. 2546. อนุกรมวิธานของไรบนผลผลิตทางการเกษตร. หน้า 792-801. *ใน*: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2546 เล่มที่ 2. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Boese, J.L. 1985. Mite. pp. 63-82. *In:* J.R. Gorman (ed.). Principles of Food Analysis for Filth, Decomposition and Foreign Matter. FDA Technical Bulletin NO.1. Food and Drug Administration, Washington, D.C.

Hubert, J., S. Pekar, R. Aulicky, M. Nesvorna and S. Vaclav. 2013. The effect of stored barley cultivars, temperature and humidity on population increase of *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor* and *Tyrophagus putrescentiae*. Experimental and Applied Acarology 60(2): 241-252.

Nayak, M.K. and R.N. Emery. 2007. Pest of stored grain. pp. 40-62. *In:* P. Bailey (ed.). Pests of Field Crops and Pastures: Identification and Control. CSIRO Publishing, Collingwood, VIC.

Trematerra, P. and F. Fiorilli. 1999. Occurrence of arthropods in a central Italy feed-mill. Journal of Pest Science 72(6): 158-163.

Wilkin, D.R. and B.B. Thind. 1984. Stored product mites detection and loss assessment in animal feed. Proceedings of the Third International Working Conference on Stored Product Entomology. Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA.

การใช้แอคติโนมัยซีทจากดินเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ

Using of Soil Actinomycetes to Inhibit *Ralstonia solanacearum* Causal Agent of Tomato Wilt Disease

อรอุมา เรืองวงษ์[1/*] และ เบญจวรรณ ใจจันทรา[1/]

On-Uma Ruangwong[1/*] and Benjawan Jaijanthra[1/]

[1/]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

[1/]Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: On-uma.r@cmu.ac.th*

(Received: 15 August 2016; Accepted: 18 November 2016)

Abstract: Actinomycetes were isolated from soil surrounding tomato root which collected from tomato plantation areas of Inthanon Royal Agricultural Station and Khun Wang Royal Project Development Center. A total of 126 actinomycetes isolates were obtained and used for evaluation of antagonistic activity against *Ralstonia solanacearum* (causes bacterial wilt disease of tomato) by using dual culture method on NA medium. Seventeen actinomycetes isolates demonstrated an ability to inhibit growth of *R. solanacearum*. The highest antagonistic activity are shown by T-11 isolate with 16.50 mm of inhibition zone. Moreover, T-11 isolate could produce siderophore and cellulase enzyme under agar plate assay. Identification of isolate T-11 based on 16S rRNA gene sequencing was analyzed to confirm the species. The result showed that partial gene sequencing of T-11 isolate was 96% homology with *Streptomyces mirabilis*.

Keywords: Wilt disease, tomato, actinomycetes

บทคัดย่อ: การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณรอบรากของต้นมะเขือเทศในแปลงปลูกของสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง สามารถแยกเชื้อได้จำนวน 126 ไอโซเลท เมื่อคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร NA พบแอคติโนมัยซีทที่เป็นปฏิปักษ์ จำนวน 17 ไอโซเลท โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค คือ ไอโซเลท T-11 ซึ่งมีความกว้างบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 16.50 มิลลิเมตร เมื่อนำไอโซเลท T-11 มาตรวจสอบการสร้างสารสำคัญบางชนิด พบว่าไอโซเลท T-11 สามารถสร้างสาร siderophore และสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารทดสอบได้ และเมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของไอโซเลท T-11 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลท T-11 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวเหมือนกับเชื้อ *Streptomyces mirabilis* ถึง 96 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: โรคเหี่ยวเขียว มะเขือเทศ แอคติโนมัยซีท

คำนำ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae มะเขือเทศมีการเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนและเขตอบอุ่น (สุชีลา และคณะ, 2552) แหล่งผลิตมะเขือเทศสดแหล่งใหญ่ในประเทศไทย คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือซึ่งมีสภาพภูมิอากาศเหมาะสมสำหรับการปลูก (มณีฉัตร, 2554) โรคสำคัญที่พบเข้าทำลายมะเขือเทศ คือ โรคเหี่ยวเขียว (bacterial wilt) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 200 ชนิด และอยู่รอดในดินได้เป็นเวลานาน (Prior *et al*., 1998) เมื่อเชื้อแบคทีเรียนี้เข้าสู่พืชทางช่องเปิดบริเวณราก จากนั้นเจริญไปตามระบบท่อลำเลียงน้ำ (xylem) มีการเพิ่มจำนวน และแพร่กระจายไปทั่วต้น ขณะเดียวกันเชื้อแบคทีเรียขับสารในกลุ่ม exopolysaccharide (EPS) ออกมาในปริมาณมาก จึงทำให้เกิดการอุดตันในระบบท่อลำเลียงน้ำ ส่งผลให้ต้นพืชขาดน้ำ และแสดงอาการเหี่ยวตายทั้งต้น โดยที่ต้นและใบยังเขียวอยู่ (Saile *et al*., 1997) นอกจากนี้เชื้อสาเหตุยังแพร่ระบาดไปกับน้ำได้ จึงเป็นการยากที่จะทำการป้องกันกำจัดโรค การปลูกมะเขือเทศบนพื้นที่สูง มักพบปัญหาการระบาดของโรคเหี่ยวเขียว เมื่อพบการระบาดของโรคและมีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด ซึ่งหากนำมาใช้อย่างไม่ถูกต้องและถูกวิธี อาจเป็นอันตรายต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค และอาจยังปนเปื้อนหรือตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้ ในการลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธีชีวภาพหรือชีววิธี (biological control หรือ biocontrol) เป็นวิธีที่นำสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวมทั้งจุลินทรีย์มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (จิระเดช, 2546) จากวิธีการดังกล่าวจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับนำมาใช้ควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ เนื่องมีความปลอดภัยต่อการนำไปใช้และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

เชื้อแอคติโนมัยซีท (actinomycetes) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีลักษณะคล้ายเชื้อรา พบอาศัยอยู่ในดิน หรือในต้นพืช (endophyte) หรือเป็น saprophyte อยู่บริเวณรอบรากพืช (Coombs and Franco, 2003) เชื้อแอคติโนมัยซีท สามารถผลิตสารได้หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ และสารยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา เช่น nikkomycin และ polyoxin (Nolan and Cross, 1988) และเชื้อแบคทีเรีย เช่น oleandomycin (Swan *et al*., 1994) จึงมีความสำคัญทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม (Boudjella *et al*., 2006) ในด้านการเกษตร ได้มีการศึกษาและนำเชื้อแอคติโนมัยซีทมาทดลองใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช ได้แก่ Sadeghi *et al*. (2006) นำ *Streptomyces* จำนวน 2 ไอโซเลท (S2 และ C) ที่แยกจากดินบริเวณที่ปลูกข้าวสาลี มาใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคเน่าคอดินของ sugar beet ได้ ในขณะเดียวกัน Sharifi *et al*. (2007) ได้ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดิน จำนวน 178 ไอโซเลท และพบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน

43 ไอโซเลท ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่า โคนเน่าของแตงได้ นอกจากนี้ Ko *et al.* (2010) ได้แยกเชื้อ *Streptomyces* strain TKA-5 จากดิน โดยเชื้อมีความสามารถในการย่อยสลายเศษพืชผัก และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคใบไหม้ของพริก และเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดใน spoon cabbage ได้ จากที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินที่มีการปลูกมะเขือเทศบนพื้นที่สูงเพื่อนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวในมะเขือเทศ

นำต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวเขียวมาทำการแยกเชื้อ โดยตัดส่วนของลำต้นบริเวณติดกับรากมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ใช้ใบมีดที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ตัดบริเวณส่วนเหนือโคนต้น หั่นให้ละเอียด และหยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที จากนั้นใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงใน suspension และ streak ลงบนอาหาร TZC (tetrazolium chloride agar; peptone 1 กรัม, glucose 0.5 กรัม, pancreatic digest of casein 0.1 กรัม, 2,3,5–triphenyl tetrazolium chloride solution 10 มิลลิลิตร, distilled water 990 มิลลิลิตร, agar 17 กรัม) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีสีขาวขุ่น ตรงกลางโคโลนีมีสีชมพู มา streak อีกครั้งบนอาหาร TZC เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บไว้ใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

2. การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค และการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลันของพืชต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร NA (nutrient agar; peptone 5 กรัม, beef extract 3 กรัม, agar 20 กรัม, distilled water 1 ลิตร) และ TZC โดยวิธี streak plate บ่มเชื้อไว้ 24-48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบสีและรูปร่างลักษณะโคโลนี นอกจากนี้นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ข้างต้นนำมาย้อมสีตามวิธีของ Gram เพื่อศึกษาปฏิกิริยาการติดสีของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลันของพืชต่อเชื้อ *R. solanacearum* โดยการนำเชื้อมาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี streak บนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเตรียม bacterial suspension โดยการขูดโคโลนีของเชื้อ *R. solanacearum* ที่เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหารแล้วนำไปใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (O.D. = 0.2) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/ml) จากนั้นนำ bacterial suspension ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าไปในช่องว่างระหว่างเซลล์ของใบยาสูบใบเล็ก (*Nicotiana rustica*) อายุ 1 เดือน โดยฉีดอย่างช้า ๆ บริเวณข้างเส้นใบทางด้านใต้ใบ และฉีดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับข้างต้นในอีกฝั่งของใบเดียวกัน เพื่อเป็นชุดเปรียบเทียบ แล้วตรวจสอบผลภายใน 48 ชั่วโมง

3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

นำเชื้อ *R. solanacearum* มาเพิ่มปริมาณโดยการ streak บนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเตรียม bacterial suspension ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น นำต้นมะเขือเทศที่มีอายุ 30 วัน มาใช้ในการทดสอบ มีการทำแผลที่รากของต้นมะเขือเทศโดยใช้มีดที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% จากนั้นนำมีดดังกล่าวแทงลงไปในดินบริเวณรอบรากของ

ต้นมะเขือเทศ โดยเอียงทำมุม 45 องศา เพื่อตัดรากที่อยู่ใต้ดิน แล้วจึงราด bacterial suspension ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อต้น ในชุดควบคุมราดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นตรวจสอบการเกิดโรคเหี่ยวเขียวทุกวันหลังการปลูกเชื้อ โดยสังเกตอาการเหี่ยวเขียวที่เกิดขึ้นบนใบ

4. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดิน

เก็บดินบริเวณรอบรากของต้นมะเขือเทศที่ไม่เป็นโรคในแปลงปลูกที่มีรายงานการระบาดของโรคเหี่ยวเขียว โดยเป็นแปลงของเกษตรกรที่เป็นสมาชิกของสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ จำนวน 9 ตัวอย่าง และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง จำนวน 10 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างดินทั้งหมดมาตากแดดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ วิธีการนี้จะช่วยลดประชากรเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Jeffrey, 2008) จากนั้นนำตัวอย่างดินที่แห้งแล้วมาแยกเชื้อด้วยวิธี soil dilution plate โดยชั่งดินตัวอย่างละ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ทิ้งให้ตกตะกอนสักครู่ ใช้ micro pipette ดูดสารแขวนลอยดิน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้สารแขวนลอยดินเข้ากันแล้วเจือจางต่อไปแบบเดิม นำสารแขวนลอยดินที่ความเข้มข้น 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปแยกเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA, PDA (potato dextrose agar; มันฝรั่ง 200 กรัม, dextrose 20 กรัม, agar 15 กรัม, distilled water 1 ลิตร) และ IMA-2 (inhibitory mold agar-2; glucose 5 กรัม, soluble starch 5 กรัม, beef extract 1 กรัม, yeast extracts 1 กรัม, NZ-case (enzyme hydrolyzed casein) 2 กรัม, NaCl 2 กรัม, $CaCO_3$ 1 กรัม, agar 15 กรัม, distilled water 1 ลิตร) ที่มีการเติม Bavistin FL (carbendazim) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ในอัตรา 1 ไมโครลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ แยกเชื้อที่เจริญขึ้นมาบนผิวหน้าอาหาร NA, PDA และ IMA-2 โดย streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่แยกได้ เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บเป็น stock culture นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

5. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวเขียว

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 126 ไอโซเลทจาก stock culture มาเพิ่มปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ 3 วัน เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 cfu/ml การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ใช้วิธี dual culture โดยเทอาหาร NA ปริมาณ 18 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นดูด bacterial suspension หยดลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ย bacterial suspension ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหาร (culture disc) มาวางลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อ *R. solanacearum* โดยวาง culture disc ห่างจากขอบจานอาหารเป็นระยะ 2 เซนติเมตร วางทั้งหมด 4 ซ้ำ ในชุดควบคุมใช้อาหาร NA ที่ไม่มีเชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญอยู่ โดยวางในวิธีการเดียวกัน บ่มเชื้อไว้ 48-72 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) หรือบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

6. การทดสอบการสร้างสาร siderophore และการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (จากผลการทดสอบวิธีที่ 5) มาตรวจสอบการสร้างสาร siderophore ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Louden *et al.* (2011) โดยนำใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์มาวางลงบนผิวหน้าอาหาร chrome azurol S (CAS; chrome azurol S 60.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 50 มิลลิลิตร, hexadecyltrimethyl ammonium bromide 72.9 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 40 มิลลิลิตร, King's medium B base 42.23 กรัม, distilled water 900 มิลลิลิตร) บ่มไว้ที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารที่เกิดขึ้น สำหรับการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hankin and Anagnostakis (1977) ทำโดยขีดเชื้อแอคติโนมัยซีท

ปฏิปักษ์บนอาหาร carboxymethylcellulose (CMC; $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัม, $MgSO_4$ 1 กรัม, $CaCl_2$ 1 กรัม, $MnSO_4$ 1 กรัม, carboxyl methyl cellulose 10 กรัม, yeast extract 1 กรัม, glucose 10, Agar 18 กรัม, distilled water 1 ลิตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการย้อมสี โดยนำสารละลาย Congo red 1 เปอร์เซ็นต์ เทให้ท่วมผิวหน้าอาหาร เขย่าให้ทั่ว บ่มไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างสารละลายออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ (1 N NaCl) สังเกตลักษณะ clear zone ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ เชื้อ หากพบ clear zone แสดงว่าเชื้อทดสอบมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้

7. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (จากผลการทดสอบวิธีที่ 6) มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ การเจริญ ลักษณะโคโลนี รูปร่าง สีและขนาด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2

8. จัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีท

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ (จากผลการทดสอบวิธีที่ 7) โดยสกัดดีเอ็นเอของเชื้อด้วย DNA extraction kit (FavorPreP Tissue Genomic DNA Extraction (FAVORGEN)) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ด้วย primer 27F/1492R (27F: 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3', 1492R: 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเป้าหมายด้วยเครื่อง PCR thermocycle (GeneAmp® PCR System 9700) และตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1% agarose gel การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequence) จาก PCR product ข้างต้นทำโดยการสกัดแยกดีเอ็นเอหลังจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วย GF-1 ambiclean kit และจากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานไว้ใน GenBank จาก The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อใช้จัดจำแนกชนิดของเชื้อ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวในมะเขือเทศ

การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการเหี่ยวเขียว โดยที่ใบและลำต้นยังเป็นสีเขียวอยู่ โดยวิธี streak plate บนอาหาร TZC พบว่าโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะรี สีชมพู ขอบโคโลนีสีขาว โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือก ผิวมัน (ภาพที่ 1)

2. การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้อต้นของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค และการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลันของพืชต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

การศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ TZC โดยวิธีการ streak plate เพื่อศึกษาลักษณะ สีและโคโลนีของเชื้อ พบว่าโคโลนีของเชื้อบนอาหาร TZC มีโคโลนีรูปร่างรี สีชมพู ขอบโคโลนีมีสีขาว โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือก ผิวมัน และโคโลนีของเชื้อบนอาหาร NA มีลักษณะรี สีขาวขุ่น โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือก ผิวมัน ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวตรงกับลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์รุนแรง ตามการรายงานของ

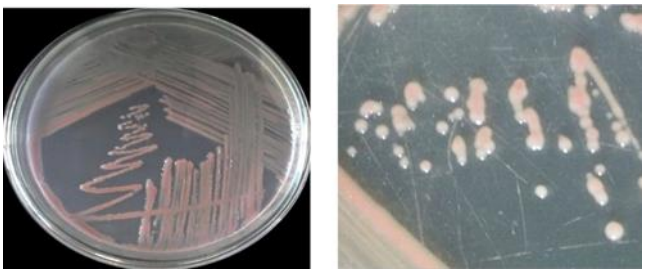

Figure 1. Colonies of *Ralstonia solanacearum* on TZC agar medium

Kelman (1954) จากการทดสอบการย้อมสีแกรม (Gram's stain) เพื่อดูลักษณะการย้อมติดสีแกรมของเชื้อสาเหตุโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียย้อมติดสีแดง แสดงว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น (rod shape) หัวและท้ายมน การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลันของยาสูบต่อเชื้อ *R. solanacearum* พบว่าเชื้อแบคทีเรียทำให้ใบยาสูบเกิดอาการเหลืองที่ใบบริเวณที่ปลูกเชื้อ ซึ่งต่อมาเกิดอาการตายของเนื้อเยื่อภายใน 48 ชั่วโมง หลังจากการปลูกเชื้อ ซึ่งยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ตามการรายงานของ Schaad (1988)

3. การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคด้วยการราด bacterial suspension บริเวณโคนต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 30 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้ต้นมะเขือเทศแสดงอาการเหี่ยวในวันที่ 3 หลังจากการปลูกเชื้อ โดยที่ต้นมะเขือเทศเกิดอาการเหี่ยว ใบลู่ลงในขณะที่ใบยังเขียวอยู่ (ภาพที่ 2a) จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น และการทดสอบความสามารถในการก่อโรค สามารถสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้ในการทดลองนี้เป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคกับมะเขือเทศได้ ดังนั้น จึงนำเชื้อดังกล่าวนี้ไปใช้ในงานทดลองต่อไป

4. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดิน

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินรอบรากของต้นมะเขือเทศบนอาหาร NA, PDA และ IMA-2 ที่เติมสารฆ่าเชื้อรา carbendazim พบว่าสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินรวมทั้งหมด 126 ไอโซเลท โดย 39 ไอโซเลท ได้จากแปลงเกษตรกรของสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ และ 87 ไอโซเลท จากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง โดยใน 126 ไอโซเลทนี้ พบบนอาหาร NA จำนวน 42 ไอโซเลท, PDA จำนวน 26 ไอโซเลท และ IMA-2 จำนวน 68 ไอโซเลท การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหารต่างชนิดกัน โดยการประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อราแทนการเติมสารแอนติไบโอติก เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา อาหารแต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้แตกต่างกัน จากการทดลองเห็นได้ว่า อาหาร IMA-2 สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้มากที่สุด ในขณะที่อาหาร NA และ PDA ก็สามารถนำมาใช้แยกกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทในดินได้เช่นกัน แต่ได้ปริมาณที่น้อยกว่า

5. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวเขียว

การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทปฏิปักษ์ ด้วยวิธี dual culture พบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เป็นปฏิปักษ์ จำนวน 17 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) ได้แก่ ไอโซเลท T-1, T-2, T-4, T-5, T- 6, T-7, T-8, T-10, T-11, T-12, T-13 และ T-17

Figure 2. Wilt symptom of tomato seedling at 3 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum* (a) when compared with non-inoculatedl tomato seedling (b)

Table 1. Inhibition zone by 17 antagonistic actinomycetes isolates against *Ralstonia solanacearum* by dual culture method

Antagonistic actinomycetes isolate	Inhibition zone (mm)
T-1	10.00 bcd1
T-2	7.25 d
T-3	9.00 bcd
T-4	6.75 d
T-5	5.75 d
T-6	13.25 ab
T-7	8.75 bcd
T-8	8.25 cd
T-9	6.00 d
T-10	7.50 d
T-11	16.50 a
T-12	6.50 d
T-13	12.50 abc
T-14	7.75 cd
T-15	7.25 d
T-16	10.25 bcd
T-17	15.25 a
control	0.00 e
CV (%)	20.94

1/ Means followed by the same letter within columns are not significantly different at 95% confidence level using least significant difference (LSD)

ที่ได้จากการแยกเชื้อบนอาหาร PDA, ไอโซเลท T-3, T-9, T-14, T-15 และ T-16 ได้จากการแยกเชื้อบนอาหาร IMA-2 ทั้งนี้ทุกไอโซเลทเป็นเชื้อที่แยกได้จากดินในแปลงเกษตรกรของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์นั้นพบ inhibition zone เกิดขึ้น ซึ่งบริเวณดังกล่าวมีความกว้างแตกตกต่างกัน โดยพบว่าไอโซเลท T-11 แสดงผลการยับยั้งมากที่สุด โดยมี inhibition zone เท่ากับ 16.50 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3b) รองลงมาคือ ไอโซเลท T-17 และ ไอโซเลท T-6 มีความกว้างบริเวณยับยั้งเท่ากับ 15.25 (ภาพที่ 3c) และ 13.25 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3d) ตามลำดับ ซึ่ง inhibition zone ที่พบนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่พบการเกิดบริเวณยับยั้ง (ภาพที่ 3a) ในขณะที่เชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ไอโซเลทอื่น ๆ มีค่าเฉลี่ยการยับยั้งอยู่ในช่วง 5.75-12.50 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับรายงานโดย Jeffrey (2008) ที่แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดิน และพบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 37 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้

6. การทดสอบการสร้างสาร siderophore และการสร้างเอนไซม์ cellulase

การตรวจสอบการสร้างสาร siderophore ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลท T-11 บนอาหาร chrome azurol S พบว่าหลังจากบ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบการเปลี่ยนสีอาหารจากสีฟ้าเป็นสีส้มรอบ

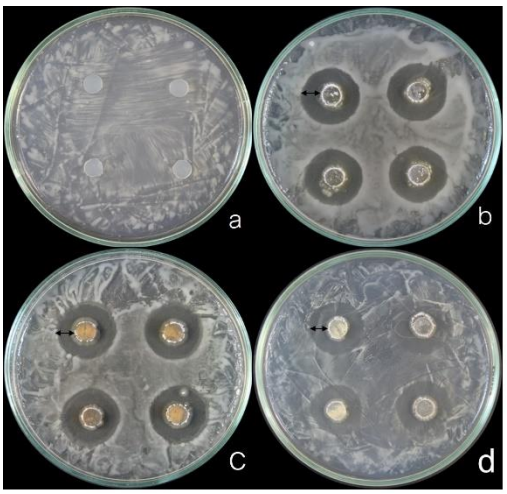

Figure 3. Inhibition zone of actinomycetes isolates on NA against growth of *Ralstonia solanacearum* compared with control (a); inhibition zone by isolate T-11 (b), T-17 (c) and T-6 (d)

ชิ้นวุ้นที่มีไอโซเลท T-11 เจริญอยู่ แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท T-11 มีการสร้างสาร siderophore ซึ่ง siderophore เป็นสารเมแทโบไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) สามารถสร้างได้โดยเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และพืช มีความจำเพาะเจาะจงกับธาตุเหล็กสูง เชื้อราและแบคทีเรียมักจะสร้างขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนหรือไม่มีธาตุเหล็ก และจะปล่อย siderophore ออกมานอกเซลล์ และจะไปแย่งจับเหล็กของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เพื่อแยกเอาเหล็กที่จับได้นำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งผลจากการขาดธาตุเหล็กอาจทำให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่าง ๆ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เช่น เชื้อ *Streptomyces* หลายสปีชีร์สามารถผลิตสาร desferrioxamine siderophores (Challis and Hopwood, 2003) จากเหตุผลดังกล่าวจึงอาจเป็นไปได้ว่า siderophore ที่สร้างโดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลท T-11 นี้อาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศได้

นอกจากนี้ ไอโซเลท T-11 มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่มีการปล่อยออกมาบนอาหาร CMC โดยพบว่าหลังจากบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และเมื่อย้อมด้วยสี Congo red นั้น พบลักษณะของ clear zone เกิดขึ้นรอบไอโซเลท T-11 แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท T-11 มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Abdulla and El-Shatoury (2006) ที่แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดิน ในกลุ่ม *Kibdelosporangium*, *Micromonospora*, *Streptomyces* และ *Nocardioides* โดยเชื้อดังกล่าวมีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่สามารถย่อยสลายฟางข้าวได้ เนื่องจากมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบของเซลล์พืช

7. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีท

การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท T-11 บนอาหาร IMA-2 พบโคโลนีของเชื้อมีรูปร่างกลม โคโลนีมีสีน้ำตาลเข้ม ขนาดเล็ก เฉลี่ย 1-3 มิลลิเมตร ขอบหยักตรงกลางของโคโลนีมีลักษณะนูนขึ้นคล้ายไข่ดาว เมื่อทิ้งไว้นานบนอาหารจะพบการสร้างผงแป้งสีขาวปนเทาบนโคโลนี และเชื้อจะเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำตาลเข้ม-ดำ (ภาพที่ 4) การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการรายงานโดย Mendez *et al.* (1985) ที่กล่าวว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทมีการสร้างเส้นใยใต้ผิวอาหาร และสามารถสร้างรงควัตถุที่เป็นชนิดละลายน้ำ และไม่ละลายน้ำ จึงทำให้สีของอาหารเปลี่ยนแปลงไปได้ โดยสีที่เกิดขึ้นอาจมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเจริญของเชื้อและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อได้

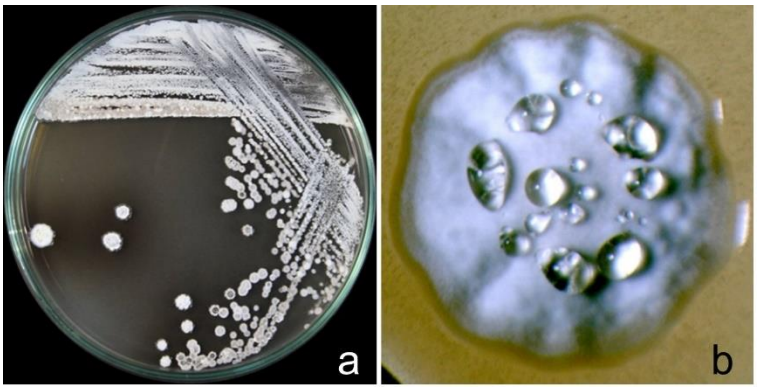

Figure 4. Actinomyces isolate T-11 on IMA-2 medium for 7 days (a) and single colony (b)

8. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีท

การตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท T-11 ในบริเวณ 16S rRNA gene ด้วยไพร์เมอร์ 27F/1492R พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,500 bp และเมื่อนำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rRNA gene ได้โดยมีขนาด 1,241 bp เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือน (sequence alignment) ในฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท T-11 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Streptomyces mirabilis* strain 3662 (Accession no. EF371431.1), *S. mirabilis* strain NBRC 13450 (Accession no. NR041137.1) และ *S. mirabilis* strain CSSP107 (Accession no. NR115357.1) โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันถึง 96% ซึ่งจากผลการวิจัยครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับรายงานของ Xie *et al.* (2010) ที่แยกเชื้อ *S. mirabilis* strain DUT001 จากดินได้ ในขณะเดียวกันก็พบว่า strain DUT001 มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารในกลุ่ม nitropolycyclic aromatic และ polynitrated aromatic ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวเป็นสารพิษและเป็นสารก่อมะเร็งที่ได้จากการผลิตพลาสติก สารกำจัดศัตรูพืช หรืออุตสาหกรรมผลิตยา เป็นต้น นอกจากนี้ El-Sayed (2012) รายงานว่า ได้แยกเชื้อ *S. mirabilis* strain NSQu-25 จากดิน และเชื้อดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ได้ แต่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ต่ำ

สรุป

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินรอบรากของมะเขือเทศเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศในห้องปฏิบัติการ สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ ไอโซเลท T-11 นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท T-11 สามารถสร้างสาร siderophore และเอนไซม์เซลลูเลสได้ และจากการจำแนกชนิดโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลท T-11 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rRNA gene ที่เหมือนกับเชื้อ *S. mirabilis* อย่างไรก็ตามควรนำเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท T-11 นี้ไปศึกษาต่อในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และกระตุ้นการสร้างสารที่มีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* หรือหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับนำไปทดสอบในสภาพโรงเรือนทดลอง หรือในแปลงปลูกมะเขือเทศบนพื้นที่สูงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนงบประมาณจากทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2556 ขอขอบคุณ ผศ.ดร. อังสนา อัครพิศาล สำหรับอุปกรณ์ต่าง ๆ ขอขอบคุณ คุณกาญจนา วิชิตตระกูลถาวร ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง และขอขอบคุณ ผศ.ดร. วสุ

ปฐมอารีย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับการอนุเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อแอคติโนมัยซีท

เอกสารอ้างอิง

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2546. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 204 หน้า.

มณีฉัตร นิกรพันธุ์. 2554. พริก มะเขือเทศ. โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพฯ. 271 หน้า.

สุชีลา เตชะวงค์เสถียร ชานนท์ ลาภจิตร เกศจิตต์ ขาม-คุลา จันทร์แรม คำหนู วุฒิพงษ์ ยคหล้า ธงชัย ประสมสวย และภราดร สื่อมโนธรรม. 2552. การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศรับประทานสดผลเล็ก. วารสารโครงการหลวง 13(2): 2-10.

Abdulla, H.M. and S.A. El-Shatoury. 2006. Actinomycetes in rice straw decomposition. Waste Management 27(6): 850-853.

Boudjella, H., K. Bouti, A. Zitouni, F. Mathieu, A. Lebrihi and N. Sabaou. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosprangium* Sg10 isolated from a Saharan soil. Microbiological Research 161(4): 288-298.

Challis, G.L. and D. Hopwood. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proceedings of the National Academy of Sciences 100 Suppl2: 14555-14561.

Coombs, J.T. and C.M.M. Franco. 2003. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. Applied and Environmental Microbiology 69(9): 5603-5608.

El-Sayed, M.H. 2012. Di-(2-ethylhexyl) phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from the culture filtrate of newly isolated soil Streptomyces (*Streptomyces murabilis* Strain NSQu-25). World Applied Sciences Journal 20(9): 1202-1212.

Hankin, L. and S.L. Anagnostakis. 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect C_x cellulase activity of micro-organisms. Journal of General Microbiology 98(1): 109-115.

Jeffrey, L.S.H. 2008. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. African Journal of Biotechnology 7(20): 3697-3702.

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. Phytopathology 44(12): 693-695.

Ko, W.H., Y.J. Tsou, M.J. Lin and L.L. Chern. 2010. Activity and characterization of secondary metabolites produced by a new microorganism for control of plant diseases. New Biotechnology 27(4): 397-402.

Louden, B.C., D. Haarmann and A.M. Lynne. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. Journal of Microbiology & Biology Education 12(1): 51-53.

Mendez, C., A.F. Brana, M.B. Manzanal and C. Hardisson. 1985. Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. Canadian Journal of Microbiology 31(5): 446-450.

Nolan, R.D. and T. Cross. 1988. Isolation and screening of actinomycetes. pp. 1-32. *In*: M.

Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordarski (eds.). Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, San Diego.

Prior, P., C. Allen and J. Elphinstone. 1998. Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer-Verlag, Berlin. 447 p.

Sadeghi, A., A.R. Hessan, H. Askari, S. Aghighi and G.H. Shahidi Bonjar. 2006. Biological control potential of two *Streptomyces* isolates on *Rhizoctonia solani,* the causal agent of damping-off of sugar beet. Pakistan Journal of Biological Sciences 9(5): 904-910.

Saile, E., J.A. McGarvey, M.A. Schell and T.P. Denny. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology 87(12): 1264-1271.

Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 158 p.

Sharifi, F., G.H. Shahidi Bonjar, S. Aghighi, P. Rashid Farrokhi, E. Khalesi, M.J. Mahdavi and H. Taraz. 2007. Antagonistic potential of Iranian native *Streptomyces* strains in biocontrol of *Pythium aphanidermatum*. Resarch Journal of Biological Sciences 2(3): 232-235.

Swan, D.G., A.M. Rodriguez, C. Vilches, C. Mendez and J.A. Salas. 1994. Characterisation of a *Streptomyces* antibioticus gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence. Molecular and General Genetics 242(3): 358-362.

Xie, B., J. Yang and Q. Yang. 2010. Isolation and characterization of an efficient nitro-reducing bacterium, *Streptomyces mirabilis* DUT001, from soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26: 855-862.

ผลของอัลตราไวโอเลตบีต่อปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน ของพริกขี้หนูพันธุ์เรดเดวิลและซุปเปอร์ฮอท F_1

Effects of Ultraviolet-B on Capsaicin and Dihydrocapsaicin Contents of Hot Chili cvs. Red-devil and Superhot F_1

ภรณ์สุดา ปัญญานิล[1/] วูลแฟรม สเปรียร์[2/] โจฮันเนส แมกซ์[3/] และ ดรุณี นาพรหม[1/]

Pornsuda Panyanil[1/], Wolfram Spreer[2/], Johannes Max[3/] and Daruni Naphrom[1/]

[1/]ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1/]Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2/]ภาควิชาเกษตรที่สูงและทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[2/]Department of Highland Agriculture and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[3/]HochschuleGesenheim University, Von-Lade-Strabe 1, 65366 Gesenheim, Germany

**Corresponding author: Email: dnaphrom@gmail.com*

(Received: 1 August 2016; Accepted: 31 August 2016)

Abstract: Study on the effects of ultraviolet-B (UV-B) on capsaicin and dihydrocapsaicin contents of hot chili cvs. Red-devil and Superhot F_1 was carried out during May, 2013 - July, 2014 at the Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. Experimental design was factorial 3x2 in CRD. There were 3 replications and 10 chili plants were used as an experimental unit. Factor A was 3 planting conditions; planting under non-blocked UV-B greenhouse, planting under blocked UV-B greenhouse and planting in open field (control). Factor B was 2 hot chili cultivars; 'Red-devil' and 'Superhot F_1'. Hot chili plants were planted under each treatment. The results revealed that there was no interaction between 2 factors on fruit fresh weight per plant, fruit dry weight per plant and capsaicin content. They were not different significances between 2 cultivars. The chili plants grown under blocked and non-blocked UV-B greenhouses gave higher fruit fresh weight, fruit dry weight and capsaicin content than control treatments. There was an interaction of dihydrocapsaicin content between 2 factors. 'Red-devil' chili grown under blocked UV-B greenhouse had higher dihydrocapsaicin content than non-blocked and open field treatments, while 'Superhot F_1' chili in both greenhouse had no different dihydrocapsaicin content but higher than open field treatment significantly. Comparison between 2 cultivars, the dihydrocapsaicin contents were not significantly different between 2 cultivars in blocked UV-B greenhouse. 'Red-devil' chili grown under non-blocked UV-B had less dihydrocapsaicin content than 'Superhot F_1'. On the other hand, the 'Red-devil 'had dihydrocapsaicin content higher than 'Superhot F_1' in open field treatment.

Keywords: Photosynthesis, greenhouse roofing plastic, light intensity, secondary metabolite

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของแสงอัลตราไวโอเลตบีต่อปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินของพริกขี้หนู ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2556 - กรกฎาคม 2557 ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (3×2) ในการวางแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 3 ซ้ำ หนึ่งหน่วยทดลองคือ 10 ต้น ประกอบด้วยปัจจัยที่ 1 คือ สภาพการปลูก 3 แบบ ได้แก่ การปลูกในโรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ไม่ป้องกันรังสี UV-B การปลูกโรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ป้องกันรังสี UV-B และการปลูกนอกโรงเรือน (ควบคุม) ปัจจัยที่ 2 คือ พันธุ์พริกขี้หนู 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เรดเดวิล และพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท F_1 ปลูกพริกขี้หนูภายใต้สภาพตามกรรมวิธีต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่าทั้งสองปัจจัยไม่มีปฏิสัมพันธ์กันต่อน้ำหนักผลสดต่อต้น น้ำหนักผลแห้งต่อต้น และปริมาณแคปไซซิน โดยทั้งสองพันธุ์ตอบสนองไม่แตกต่างกัน การปลูกพริกขี้หนูภายใต้โรงเรือนหลังคาพลาสติกทั้งที่ป้องกัน และไม่ป้องกัน UV-B ทำให้น้ำหนักผลสด น้ำหนักผลแห้ง ปริมาณแคปไซซินมากกว่าการปลูกนอกโรงเรือน สำหรับปริมาณไดไฮโดรแคปไซซิน พบว่าทั้งสองปัจจัยมีปฏิสัมพันธ์กัน พันธุ์เรดเดวิลที่ปลูกภายใต้โรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ป้องกันรังสี UV-B มีปริมาณไดไฮโดรแคปไซซินมากกว่าปลูกภายใต้โรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ไม่ป้องกันรังสี UV-B และการปลูกนอกโรงเรือน ส่วนพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท F_1 การปลูกภายใต้โรงเรือนทั้งสองกรรมวิธีให้ปริมาณไดไฮโดรแคปไซซินไม่แตกต่างกัน แต่ให้ปริมาณมากกว่าการปลูกนอกโรงเรือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสองสายพันธุ์ที่ปลูกภายใต้โรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ป้องกันรังสี UV-B จะมีปริมาณไดไฮโดรแคปไซซินไม่แตกต่างกัน แต่การปลูกภายใต้โรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ไม่ป้องกันรังสี UV-B พันธุ์เรดเดวิลจะมีปริมาณไดไฮโดรแคปไซซินน้อย กว่าพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท F_1 ในขณะที่การปลูกนอกโรงเรือนพันธุ์เรดเดวิลมีปริมาณไดไฮโดรแคปไซซินมากกว่าพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท F_1

คำสำคัญ: การสังเคราะห์แสง พลาสติกหลังคาโรงเรือน ความเข้มแสง สารทุติยภูมิ

คำนำ

พริกเป็นพืชผักที่มีความสำคัญในชีวิตประจำวันของคนไทย เป็นพืชเศรษฐกิจในการส่งออก เนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์ได้หลายประการ เช่น อาหาร อุตสาหกรรม เกษตรกรรม และการแพทย์ (อบเชย, 2541) น้ำสกัดชีวภาพของผลพริกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ (ปิลันธนา, 2559) ภายในผลพริกมีสารแคปไซซินอยด์ (capsaicinoids) ให้กลิ่นและความเผ็ดร้อน ประกอบด้วย แคปไซซิน (capsaicin) ร้อยละ 61 ไดไฮโดรแคปไซซิน (dihydrocapsaicin) ร้อยละ 22 และสารอื่น ๆ ร้อยละ 17 (Salzer *et al.,* 1975) แคปไซซินเป็นสารทุติยภูมิที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมที่ซับซ้อนภายในพืช โดยอาศัยน้ำตาลกลูโคสจากการสังเคราะห์แสงเป็นสารตั้งต้นและพลังงานในการหายใจช่วยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของสารอินทรีย์จนได้สารแคปไซซินอยด์ (พิทยา, 2551) การปลูกพริกในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชอย่างแพร่หลายเนื่องจากปัญหาโรคและแมลง ทำให้เกิดการสะสมและตกค้างในผลผลิต ส่งผลต่อสุขภาพเกษตรกรและผู้บริโภค การปลูกพืชในระบบโรงเรือนจึงนิยมมากขึ้น และมีการพัฒนาพลาสติกหลังคาโรงเรือนที่สามารถลดการส่องผ่านของรังสีอัลตราไวโอเลตบีหรือรังสี UV-B ซึ่งเป็นรังสีที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ อีกทั้งทำให้แมลงมองเห็นสภาพในโรงเรือนค่อนข้างมืด จึงไม่เหมาะสำหรับอาศัยหรือแพร่พันธุ์ของแมลง นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความเผ็ดในพริกอีกด้วย (บุญรักษ์, 2552) รังสีอัลตราไวโอเลตบีเป็นรังสีที่แผ่กระจายจากดวงอาทิตย์ มีช่วงความถี่ระหว่าง 280-315 นาโนเมตร เป็นปัจจัยความเครียดทางสิ่งแวดล้อม ส่งผลต่อพืชโดยยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง ลดชีวมวล การเปลี่ยนแปลงรงควัตถุ มีผลต่อการสร้างโปรตีนหรือทำลายดีเอ็นเอ (Jordan, 1996) ทำให้พื้นที่ใบและความหนาใบลดลง ปล้องสั้น น้ำหนักสดลดลง ลดการเจริญเติบโตของราก ทำให้ดอกเป็นหมัน การผสมพันธุ์และผลผลิตลดลง (Sunita *et al*., 2014) อีกทั้งยังเพิ่มการเสื่อมของคลอโรฟิลล์ (Anu *et al.,* 1997) อุทัย และคณะ (2552) พบว่า การปลูกพริกเพื่อเพิ่มปริมาณแคปไซ-

ซินเพียงอย่างเดียวในโรงเรือนสีน้ำเงินที่มีความยาวคลื่น 400-500 นาโนเมตร สามารถเพิ่มปริมาณได้มากที่สุดถึง 2.5 เท่า เมื่อเทียบกับการปลูกนอกโรงเรือนหรือในโรงเรือนสีใส

ความสัมพันธ์ทางสรีรวิทยาของรังสี UV-B กับสารให้ความเผ็ดในพริกขี้หนูมีการศึกษาวิจัยน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของรังสี UV-B ต่อคุณภาพผล ปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินใน พริก เพื่อพัฒนาคุณภาพพริกให้สอดคล้องกับความต้องการของผู้บริโภค ผู้แปรรูปทั้งภาคอุตสาหกรรมและการแพทย์ เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลผลิต

อุปกรณ์และวิธีการ

คัดเลือกต้นพริกขี้หนูพันธุ์เรดเดวิล และพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท F_1 ที่สมบูรณ์ อายุประมาณ 30 วัน ปลูกในถุงพลาสติกที่ใช้วัสดุปลูกเป็นขุยมะพร้าวและมะพร้าวสับที่ราดเชื้อราไตรโคเดอร์มา ให้น้ำและปุ๋ยอยู่ในระบบน้ำหยดอย่างสม่ำเสมอทุกต้น วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (3×2) ในการวางแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 3 ซ้ำ โดยหนึ่งหน่วยทดลองใช้ต้นพริกขี้หนู 10 ต้น

ปัจจัยที่ 1 สภาพการปลูก จำนวน 3 แบบ ได้แก่ การปลูกในโรงเรือนพลาสติกที่ไม่ป้องกันรังสี UV-B (พลาสติกโพลีเอทิลีน) การปลูกโรงเรือนหลังคาพลาสติกป้องกันรังสี UV-B (พลาสติกโพลีเอทิลีนผสมสารไทเทเนียมไดออกไซด์ร่วมกับโลหะออกไซด์) และการปลูกนอกโรงเรือน (กรรมวิธีควบคุม)

ปัจจัยที่ 2 ชนิดพันธุ์พริกขี้หนู จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เรดเดวิล และพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท F_1

นำถุงปลูกพริกไว้ในโรงเรือนมุ้งลวดหลังคามุงพลาสติก และวางไว้กลางแจ้ง ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ติดตั้ง data logger (Delta-t Devices Ltd., England) จำนวนโรงเรือนละ 1 เครื่อง และนอกโรงเรือน 1 เครื่อง เพื่อบันทึกความเข้มแสง รังสี UV-B อุณหภูมิอากาศ และความชื้นในวัสดุปลูก เมื่อเก็บเกี่ยวผลแล้ว นำผลพริกชั่งน้ำหนักสดและนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อชั่งน้ำหนักแห้ง นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistic 8.0 ใช้ least significant difference (LSD) test เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การสกัดแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน

ใช้วิธีการของ Hoffman *et al.* (1983) นำพริกแห้งบดละเอียดชั่งน้ำหนัก 12.5 กรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เทสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปสกัดที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้ววางไว้ให้เย็นเพื่อตกตะกอน จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรองไนลอนขนาด 0.45 ไมโครเมตร (PVDE membrane) แล้วนำสารละลายใสที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC)

การวัดปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน

เครื่อง HPLC ที่ใช้เป็น Shimadzu LC-10 series ควบคุมด้วย binary gradient pump รุ่น LC-10ADvp เชื่อมต่อด้วย degasser รุ่น DGU-14A, auto injector รุ่น SIL-10AD, UV-vis spectrometric detector รุ่น SPD-10A และ system controller SCL-10A สารสกัดถูกแยกด้วยคอลัมน์ชนิด reverse phase C18 ยี่ห้อ Restek® อนุภาค 5 ไมโครเมตร ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร ใช้เฟสเคลื่อนที่ระบบไอโซเครติคของ acetonitrile : 1% formic acid (45 : 55) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณที่ฉีด 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วยระบบ ultraviolet spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สารละลายมาตรฐานที่ใช้คือ แคปไซซิน และไดไฮโดรแคปไซซิน จากบริษัท Sigma-Aldrich Co., Ltd. ตามวิธีการของ AOAC (2000)

ผลการทดลองและวิจารณ์

อุณหภูมิอากาศและความชื้นในวัสดุปลูก

เมื่อศึกษาอุณหภูมิอากาศและความชื้นในวัสดุปลูกในโรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ไม่ป้องกันรังสี UV-B ป้องกันรังสี UV-B และการปลูกนอกโรงเรือน ระหว่าง

เดือนกุมภาพันธ์ถึงกรกฎาคม 2557 พบว่าอุณหภูมิเฉลี่ยในโรงเรือนที่ป้องกันรังสี UV-B สูงกว่าโรงเรือนที่ไม่ป้องกันรังสี UV-B และนอกโรงเรือน โดยมีค่าสูงที่สุดที่ 30.8, 29.9 และ 29.9 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ภาพที่ 1) สภาพอากาศในโรงเรือนทั้ง 3 กรรมวิธี มีอุณหภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการปลูกพริกซึ่งพริกสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศร้อนชื้น (ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน, 2556) ในขณะที่ความชื้นในวัสดุปลูกภายนอกโรงเรือนสูงกว่ากรรมวิธีที่ปลูกในโรงเรือน ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 59.5 และ 81.9 ในเดือนกุมภาพันธ์ และกรกฎาคม ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในเดือนกุมภาพันธ์ (ฤดูหนาว) และเดือนกรกฎาคม (ฤดูฝน) กรรมวิธีที่ปลูกนอกโรงเรือนเป็นสภาพเปิดจึงทำให้ได้รับน้ำค้างหรือน้ำฝนได้อย่างเต็มที่

ความเข้มแสงในโรงเรือน

จากการวัดความเข้มแสงในช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม 2557 โรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ป้องกันรังสี UV-B มีค่าความเข้มแสงที่พืชสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์แสงโดยมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือโรงเรือน

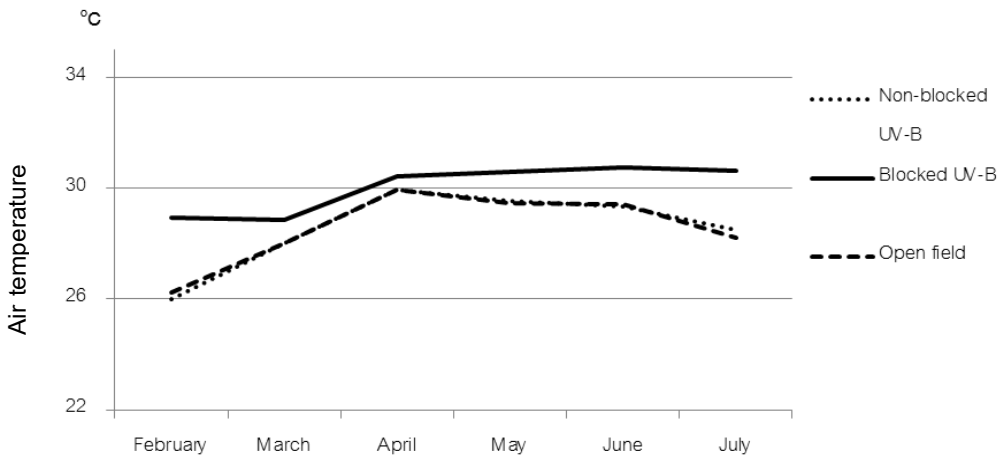

Figure 1. Air temperatures in different treatments during February - July 2014

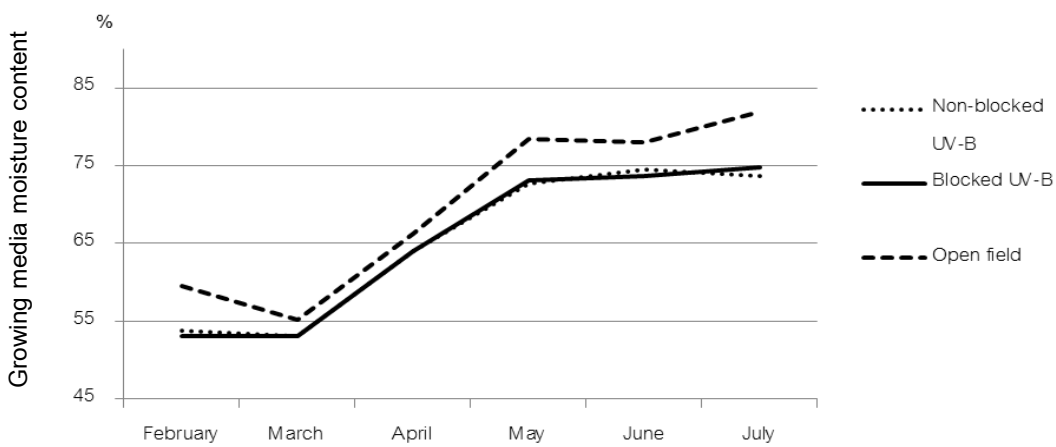

Figure 2. Growing media moisture contents in different treatments during February - July 2014

หลังคาพลาสติกที่ไม่ป้องกันรังสี UV-B และค่าต่ำสุดคือสภาพนอกโรงเรือน (ภาพที่ 3) ในทางกลับกันเมื่อศึกษาค่าความเข้มของรังสี UV ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงกรกฎาคม พบว่าในเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน ปริมาณแสง UV-B ค่อนข้างคงที่ในทุกกรรมวิธี ต่อจากนั้นปริมาณเพิ่มขึ้นช้า ๆ หลังจากเดือนเมษายน และมีปริมาณมากที่สุดในเดือนกรกฎาคม เมื่อเปรียบเทียบแต่ละกรรมวิธีพบว่าความเข้มแสง UV-B ภายนอกโรงเรือนมีค่ามากที่สุด รองลงมาคือโรงเรือนที่ไม่ป้องกันรังสี UV-B และความเข้มแสงน้อยที่สุดในโรงเรือนที่ป้องกันแสง UV-B ซึ่งสามารถลดปริมาณรังสี UV-B ได้ 2.0-2.6 เท่า (ภาพที่ 4) เนื่องจากพลาสติกหลังคาโรงเรือนที่ไม่ป้องกันรังสี UV-B ผลิตจากฟิล์มโพลีเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ (low density polyethylene, LDPE) มีลักษณะค่อนข้างใส มีความยืดหยุ่นสูง สามารถลดการส่องผ่านของรังสีอินฟราเรดได้ระดับหนึ่ง ในขณะที่พลาสติกที่ป้องกันรังสี UV-B มีการเติมสารไทเทเนียมไดออกไซด์ร่วมกับโลหะออกไซด์ จึงสามารถป้องกันรังสี UV ที่เป็นอันตรายต่อพืช และเพิ่มประสิทธิภาพการลดการส่องผ่านของรังสีอินฟราเรด (กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2552) ส่งผลให้พืชมีการสังเคราะห์แสงและเจริญเติบโตได้ดีกว่าเนื่องจากรังสี UV-B ทำให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงลดลง เช่น ลดความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มไทลาคอยล์ การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนลดลง เกิดการลดลงของน้ำหนักแห้ง แป้ง และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (Sunita *et al*., 2014)

น้ำหนักของผลพริกหลังการเก็บเกี่ยว

ปัจจัยที่ทำการศึกษาทั้งสองปัจจัยไม่มีปฏิสัมพันธ์กันต่อน้ำหนักผลสดและน้ำหนักผลแห้ง ทั้งสองพันธุ์มีน้ำหนักผลสดและน้ำหนักผลแห้งไม่แตกต่างกัน โดยพันธุ์เรดเดวิลและพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท F_1 มีน้ำหนัก

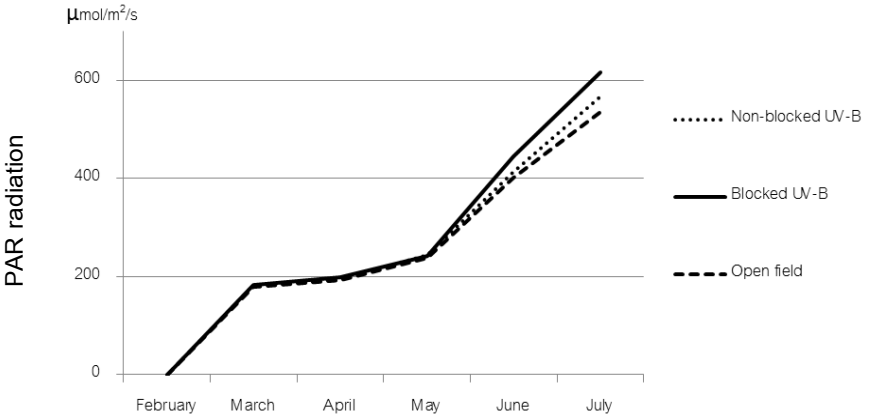

Figure 3. PAR radiation in different treatments during February - July 2014

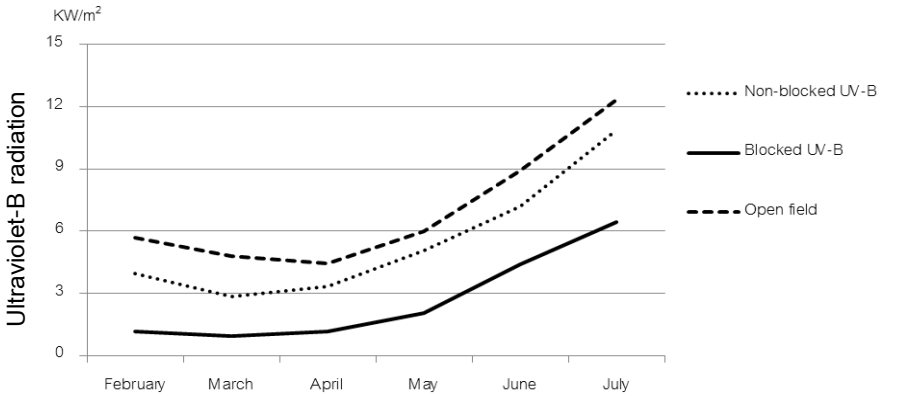

Figure 4. Ultraviolet-B radiations in different treatments during February - July 2014

ผลสดเท่ากับ 232 และ 234 กรัมต่อต้น และน้ำหนักผลแห้งเท่ากับ 47 และ 48 กรัมต่อต้น ตามลำดับ สำหรับการปลูกพริกขี้หนูในสภาพแสงที่แตกต่างกันพบว่า ต้นพริกขี้หนูที่ปลูกในโรงเรือนหลังคาพลาสติกทั้งสองชนิดให้น้ำหนักผลสดเท่ากับ 292 - 301 กรัมต่อต้น ซึ่งมากกว่าการปลูกนอกโรงเรือนที่มีน้ำหนักผลสดเท่ากับ 107 กรัมต่อต้น นอกจากนี้การปลูกพริกขี้หนูในโรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ป้องกันรังสี UV-B และไม่ป้องกันรังสี UV-B ให้น้ำหนักผลแห้งไม่แตกต่างกัน คือ 60 และ 58 กรัมต่อต้น ตามลำดับ และให้น้ำหนักผลแห้งมากกว่าการปลูกนอกโรงเรือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพริกขี้หนูที่ปลูกนอกโรงเรือนได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมภายนอกอื่น ๆ เช่น ลม ฝน โรคและแมลง ทำให้ผลผลิตเกิดความเสียหายไปได้ อีกทั้งปัจจัยจากการได้รับรังสี UV-B ซึ่งมีผลยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช ส่งผลให้พริกมีการสะสมอาหารน้อยลง จึงมีผลกระทบต่อน้ำหนักผลและผลผลิตลดลง (Kakani *et al*., 2003) สอดคล้องกับการทดลองของ Krizek *et al*. (1997) ได้ศึกษาผลของการยับยั้งรังสี UVA-B ต่อการเจริญเติบโตของแตงกวา พบว่าน้ำหนักสดของแตงกวาเพิ่มขึ้นร้อยละ 19 - 22 เมื่อปลูกในสภาพไม่มีรังสี UVA-B เช่นเดียวกับ Tsormpatsidis *et al*. (2008) พบว่าการปลูกผักกาดหอมห่อภายใต้รังสี UV-B มีน้ำหนักแห้งน้อยกว่าการปลูกภายใต้สภาพรังสี UV-A และ UV-C ร้อยละ 10 - 34 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซิน

การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของแคปไซซินโดยเทคนิคการแยกสารผสมที่อยู่ในสภาวะของเหลว ความเข้มข้น 0.84 กรัมต่อมิลลิลิตร โครมาโทแกรมแสดงเวลา (retention time) ของสารละลายมาตรฐานของแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์เท่ากับ 13.34 และ 20.35 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 5)

Table 1. Fruit fresh and dry weights of hot chilies under different treatments

Treatments	Fruits fresh weight per plant (g)	Fruits dry weight per plant (g)
'Red-devil' in non-blocked UV-B	286	57
'Red-devil' in blocked UV-B	297	58
'Red-devil' open field	300	59
'Superhot F_1' in non-blocked UV-B	303	60
'Superhot F_1' in blocked UV-B	109	27
'Superhot F_1' open field	104	26
Main factor: A		
Non-blocked UV-B	292 a	58 a
Blocked UV-B	301 a	60 a
Open field	107 b	27 b
Main factor: B		
'Red-devil'	232	47
'Superhot F_1'	234	48
AxB	ns	ns
A	*	*
B	ns	ns
%CV	16.0	17.6

ns = not significantly difference

Means within column with the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$ by LSD

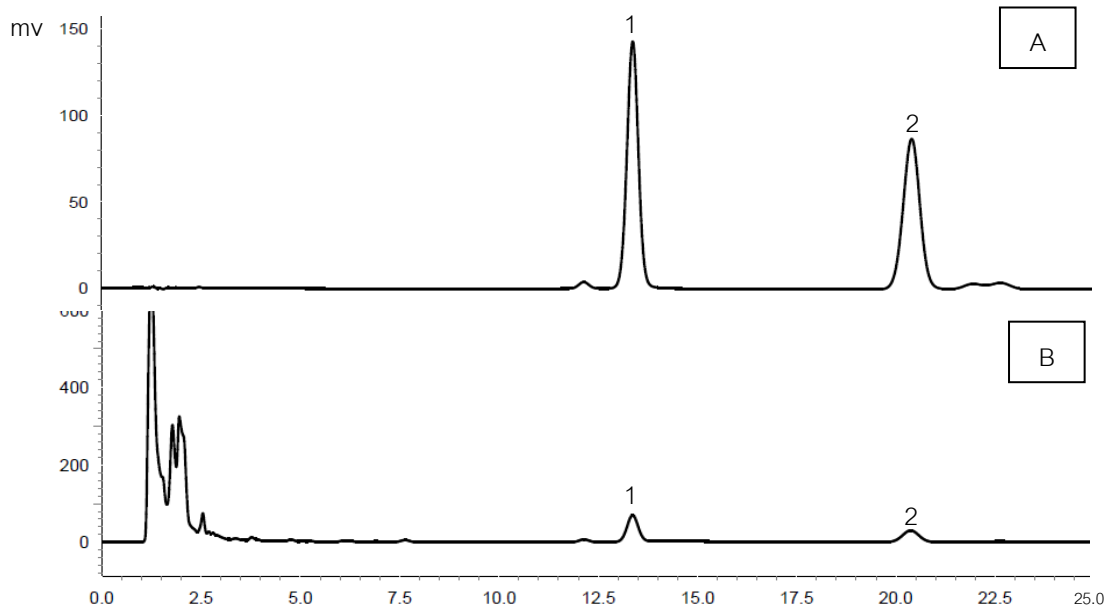

Figure 5. HPLC chromatograms of hot chilies fruits extract (A) and standard solution (B), 1: capsaicin, 2: dihydrocapsaicin

ปัจจัยที่ทำการศึกษาทั้งสองปัจจัยไม่มีปฏิสัมพันธ์กันต่อปริมาณแคปไซซิน โดยพันธุ์ของพริกขี้หนูทั้งสองพันธุ์มีปริมาณแคปไซซินไม่แตกต่างกัน คือ 1.83 และ 1.81 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ การปลูกพริกขี้หนูภายใต้โรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ป้องกันแสง UV-B มีปริมาณแคปไซซินเท่ากับ 2.29 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีค่ามากกว่าโรงเรือนหลังคาพลาสติกไม่ได้ป้องกันแสง UV-B เท่ากับ 1.99 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนการปลูกนอกโรงเรือนที่มีปริมาณแคปไซซินเท่ากับ 1.78 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

สำหรับปริมาณไดไฮโดรแคปไซซินปัจจัยที่ศึกษาทั้งสองปัจจัยมีปฏิสัมพันธ์กัน โดยพันธุ์พริกขี้หนูแต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมแต่ละที่ปลูกแตกต่างกัน พันธุ์เรดเดวิลที่ปลูกภายใต้โรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ป้องกันรังสี UV-B มีปริมาณไดไฮโดรแคปไซซินเท่ากับ 1.24 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าปลูกภายใต้โรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ไม่ป้องกันรังสี UV-B และการปลูกนอกโรงเรือนที่มีปริมาณไดไฮโดรแคปไซซินเท่ากับ 0.89 และ 0.76 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท F_1 การปลูกภายใต้โรงเรือนหลังคาพลาสติกที่ป้องกันรังสี UV และที่ไม่ป้องกันรังสี UV-B ให้ปริมาณไดไฮโดรแคปไซซินไม่แตกต่างกันคือ 1.17 และ 1.22 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ซึ่งให้ค่ามากกว่าการปลูกนอกโรงเรือนที่มีปริมาณเท่ากับ 0.50 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) ในการทดลองนี้การปลูกต้นพริกขี้หนูทั้งสองพันธุ์โรงเรือนทำให้มีการสะสมปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินมากขึ้น เมื่อเทียบกับการปลูกกลางแจ้ง โดยปกติปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง ความชื้น ปริมาณธาตุอาหารและน้ำในดิน ความเครียดจากสภาวะต่าง ๆ มีผลโดยตรงต่อการสะสมของสารทุติยภูมิในพืช (Ramakrishna and Ravishankar, 2011) ในสภาพที่ความเข้มแสงและอุณหภูมิสูงทำให้มีการสะสมปริมาณแคปไซซินในพริกมากกว่าสภาพที่มีความเข้มแสงต่ำ (Gao *et al.*, 2008) ในการทดลองนี้โรงเรือนทั้งสองชนิดมีปริมาณรังสี UV-B น้อยกว่านอกโรงเรือนและมีความเข้มแสงที่พืชสามารถใช้ในการสังเคราะห์แสงได้ รวมถึงอุณหภูมิในโรงเรือนป้องกันรังสี UV มีค่าสูงกว่าสภาพนอกโรงเรือน จึงอาจทำให้มีการ

Table 2. Capsaicin and dihydrocapsaicin contents in hot chilies under different treatments

Treatments	Capsaicin contents (mg/g dry weight)	Dihydrocapsaicin contents (mg/g dry weight)
'Red-devil' in non-blocked UV-B	2.03	0.89 b
'Red-devil' in blocked UV-B	2.20	1.24 a
'Red-devil' open field	1.27	0.76 b
'Superhot F_1' in non-blocked UV-B	1.95	1.17 a
'Superhot F_1' in blocked UV-B	2.36	1.22 a
'Superhot F_1' open field	1.11	0.50 c
Main factor: A		
Non-blocked UV-B	1.99 b	1.03 b
Blocked UV-B	2.29 a	1.23 a
Open field	1.78 c	0.63 c
Main factor: B		
'Red-devil'	1.83	0.96
'Superhot F_1'	1.81	0.96
AxB	ns	*
A	*	*
B	ns	ns
%CV	21.29	20.22

ns = not significantly difference

Means within column with the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$ by LSD

สะสมปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินมากกว่า อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของรังสี UV-B ต่อปริมาณสารสำคัญในพริกในแปลงปลูกยังไม่มีรายงานมากนัก Wang (2004) พบว่าปริมาณแคปไซซินในพริกจะลดลงเมื่อมีปริมาณไนโตรเจนในดินเพิ่มขึ้นต้นพริกที่ปลูกกลางแจ้งได้รับปริมาณน้ำฝนมากกว่าต้นพริกที่ปลูกในโรงเรือนและความชื้นในวัสดุปลูกมีมากกว่าอาจทำให้รากพืชดูดธาตุไนโตรเจนขึ้นไปใช้มาก จึงทำให้มีปริมาณแคป-ไซซินน้อยกว่า ดังนั้นการปลูกพริกขี้หนูภายใต้โรงเรือนหลังคาพลาสติกน่าจะทำให้คุณภาพผลผลิตดีขึ้นและมีการสะสมสารสำคัญเพิ่มขึ้นได้มากกว่าการปลูกนอกโรงเรือน

สรุป

การปลูกพริกขี้หนูพันธุ์เรดเดวิลและซุปเปอร์ฮอท F_1 ภายใต้โรงเรือนหลังคาพลาสติกทั้งที่ป้องกัน และไม่ป้องกันอัลตราไวโอเลตบี ทำให้น้ำหนักผลสด น้ำหนักผลแห้ง ปริมาณแคปไซซินและไดไฮโดรแคปไซซินมากกว่าการปลูกพริกขี้หนูนอกโรงเรือน

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2552. ฟิล์มโพลีเทคพลาสติกสำหรับคลุมโรงเรือน. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.most.go.th/main/index.php/org/1712.htl (1 พฤษภาคม 2557).

บุญรักษ์ กาญจนวรวณิชย์. 2552. ฟิล์มคัดกรองแสง การเกษตร. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.mtec.or.th. (30 มิถุนายน 2556).

ปิลันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล และชนากานต์ รัตนศักดิ์ชัย-ชาญ. 2559. ประสิทธิภาพของน้ำสกัดชีวภาพจากเศษเหลือพริกต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในสภาพห้องปฏิบัติการ. วารสารเกษตร 32(1): 61-72.

พิทยา สรวมศิริ. 2551. อุตสาหกรรมพืชเครื่องเทศ. วนิดาเพรส, เชียงใหม่. 292 หน้า.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน. 2556. คู่มือการปลูกพริก. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.kukr.lib.ku.ac.th (23 มกราคม 2558).

อบเชย อิ่มสบาย. 2541. พริกตำรับอาหารเพื่อสุขภาพ. แสงแดด, กรุงเทพฯ. 111 หน้า.

อุทัย วิชัย เมธา รัตนากรพิทักษ์ ศิริรัตน์ จันท์จารุณี จิตต์พร เครือเนตร ธรรมรัตน์ ปัญญธรรมาภรณ์ สิริกุล วะสี และกรุง สิตะธนี. 2552. การพัฒนาการเพิ่มผลผลิตสาร capsaicin และ capsanthin ในพริกโดยใช้โรงเรือนระบบคัดกรองแสง. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ. 57 หน้า.

Anu, L., R. Julkunen-Tiitto, H. Reinien and P. Aphalo. 1997. Host-plant preference of an insect herbivore mediated by UV-B and CO_2 in relation to plant secondary metabolites. Systematic and Ecology 26: 1-12.

AOAC. 2000. Capsaicinoids in capsicums and their extractives. AOAC Official Methods of Analysis 43: 14-16.

Gao, S., L.L. He, J.Q. Chen and Y.P. Gao. 2008. Effects of light intensity on contents of capsaicin and its metabolizing competition matters in pepper fruits. J. Henan Agricultural Sciences 4: 27.

Hoffman, P.G., M.C. Lego and W.G. Galetto.1983. Separation and quantitation of red pepper major heat principles by reverse-phase high pressure liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry 31: 1326-1329.

Jordan, B.R. 1996. The Effects of Ultraviolet-B Radiation on Plants. Academic Press, New York. 162 p.

Kakani, V.G., K.R. Reddy, D. Zhao and K. Sailaja. 2003. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. Agricultural and Forest Meteorology 120: 191-218.

Krizek, D.T., R.M. Mirecki and S.J. Britz. 1997. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cucumber. Physiologia Plantarum 100: 886-893.

Ramakrishna, A. and G.A. Ravishankar. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling and Behavior 6(11): 1720-1731.

Salzer, U.J., G. Haarmann and G. Reimer. 1975. Analytical evaluation of seasoning extracts (oleoresin) and essential oils from seasoning. Flavours 6(4): 206-210.

Sunita, K., A. Jajoo and K.N. Guruprasad. 2014. Impact of increasing ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes. Journal of Photochemistry and Photobiology 2(4): 1011-1344.

Tsormpatsidis, E., R.G.C. Henbest, F.J. Davis, N.H. Battey, P. Haley and A. Wagstaffe. 2008. UV irradiance as a major influence on growth, development and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce revolution grown under polyethylene films. Environment and Experimental Botany 63: 232-239.

Wang, J.L. 2004. Effects of Light Intensity and Nitrogen Fertilizer on Capsaicin Metabolism, Quality and Yield of Hot Pepper. Northeast Agricultural University, China. 641 p.

ผลของยูเรียและแคลเซียมซัลเฟตต่อการเจริญเติบโตของเรพซีด ที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย

Effects of Urea and Calcium Sulphate on Growth and Development of Rapeseed (*Brassica napus* L.) Grown in Northern Thailand

ภรณ์พรรณ วงศ์สถาน[1/] ชูชาติ สันธทรัพย์[1/] และ ดรุณี นาพรหม[1/*]

Pornpun Wongsathan[1/], Choochad Santasub[1/] and Daruni Naphrom[1/*]

[1/]ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

[1/] Department of Plant Science and Soil Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: dnaphrom@gmail.com*

(Received: 1 August 2016; Accepted: 18 November 2016)

Abstract: Study on effects of urea and calcium sulphate on growth and development of 'Rapool Comfort' rapeseed was carried out at Chiang Mai Royal Agricultural Research Center (Khun Wang), Mae Win sub-district, Mae Wang district, Chiang Mai province. An elevation is 1,300 meters above mean sea level (msl). Experimental design was random complete block designed (RCBD) with 3 blocks and 5 fertilizer applications; no fertilizer (control), urea 21 kg/rai, urea 42 kg/rai, $CaSO_4$ 17 kg/rai and $CaSO_4$ 35 kg/rai. Fertilizer amounts were divided and applied at 2 stages of growth; 40% were applied at stem elongation stage and another 60% at flower development stage. Results showed that applications of urea fertilizer and $CaSO_4$ 17 kg/rai gave stem height about 44.87-48.97 cm at 18 weeks after transplanting, which had no differences as compared to control. However, they were higher stem height than $CaSO_4$ 35 kg/rai treatment (38.30 cm). Numbers of leave and flowering plant were different in all treatments. Furthermore, the fertilizer treatments had no effect on number of flower, except the application of $CaSO_4$ 17 kg/rai which gave fewer flower than control treatment. Urea 42 kg/rai gave significantly lower pod setting than others, while $CaSO_4$ 35 kg/rai treatment increased pod setting, seed number and grain yield. It gave significantly higher oil content than control treatment. Composition of rapeseed oil consists of 5 fatty acids; 62.60% oleic acid, 19.48% linoleic acid, 8.04% linolenic acid, 5.15% palmitic acid, 3.22% steric acids and 1.51% in others.

Keywords: Pod setting, grain yield, fatty acid

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของยูเรียและแคลเซียมซัลเฟตต่อการเจริญเติบโตรวมถึงคุณภาพและปริมาณผลผลิตของเรพซีดพันธุ์ Rapool Comfort ทำการทดลอง ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ ตำบลแม่วิน อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ระดับความสูง 1,300 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) ทำการทดลอง 3 บล็อก และให้ปุ๋ย 5 กรรมวิธีได้แก่ ควบคุม (ไม่ใส่ปุ๋ย) ยูเรีย 21 กก./ไร่ ยูเรีย 42 กก./ไร่ แคลเซียมซัลเฟต 17 กก./ไร่ และ แคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่ โดยแบ่งให้ปุ๋ย 2 ครั้งในช่วงการเจริญเติบโต คือ ครั้งที่ 1 ให้ปุ๋ยร้อยละ 40 ของแต่ละกรรมวิธีในระยะการยืดตัวของลำต้น และครั้งที่ 2 ให้ปุ๋ยร้อยละ 60 ของแต่ละกรรมวิธีในระยะการแทงช่อดอก ผลการศึกษาพบว่าการให้ปุ๋ยยูเรียทั้ง 2 อัตรา และปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 17 กก./ไร่ มีความสูงของต้นระหว่าง 44.87-48.97 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 18 หลังย้ายปลูก ซึ่งไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม แต่มากกว่ากรรมวิธีที่ให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความสูงของต้นที่ 38.30 เซนติเมตร ในขณะที่จำนวนใบ และจำนวนต้นที่ออกดอกไม่มีความแตกต่างกันในทุกกรรมวิธี การให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 17 กก./ไร่ ที่ให้จำนวนดอกน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กรรมวิธีอื่นไม่มีความแตกต่างกัน การให้ปุ๋ยยูเรีย 42 กก./ไร่ ทำให้มีการติดฝักน้อยกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การใส่ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่ ทำให้การติดฝัก จำนวนเมล็ดและผลผลิตเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังให้ปริมาณน้ำมันมากกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ องค์ประกอบของน้ำมันเรพซีดพันธุ์ Rapool Comfort ประกอบด้วยกรดไขมัน 5 ชนิด ได้แก่ โอเลอิก (omega 9) ร้อยละ 62.60 ลิโนเลอิก (omega 6) ร้อยละ 19.48 ลิโนเลนิก (omega 3) ร้อยละ 8.04 ปาล์มิติก ร้อยละ 5.15 สเตียริก ร้อยละ 3.22 และกรดไขมันอื่น ๆ ร้อยละ 1.51

คำสำคัญ: การติดฝัก ผลผลิตเมล็ด กรดไขมัน

คำนำ

เรพซีด (Rapeseed) (*Brassica napus* L.) อยู่ในวงศ์ Brassicaceae วงศ์เดียวกับกะหล่ำปลี มัสตาด และพืชอีกกว่า 3,000 สายพันธุ์ มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศแคนาดา (Appelqvist and Ohlson, 1972) เรพซีดเป็นพืชที่มีความสำคัญอย่างมากในทวีปยุโรปตั้งแต่ศตวรรษที่ 13 และได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ขึ้นมาใหม่จึงได้ชื่อใหม่ว่า คาโนล่า (canola) เป็นพืชน้ำมันที่สำคัญลำดับที่ 3 ของโลกรองจากถั่วเหลือง และปาล์มน้ำมัน (Ahmadi and Bahrani, 2009) ในประเทศเขตหนาวเรพซีดเป็นพืชไร่หลักที่สำคัญทางเศรษฐกิจที่มีผลผลิตถึง 47 ล้านตันจากทั่วโลกในปี ค.ศ. 2007 (FAO, 2007) มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย เช่น การผลิตน้ำมัน อาหารสัตว์ พลังงานทางเลือก ฯลฯ (Chongo and McVetty, 2000) เนื่องจากน้ำมันของเรพซีดมีคุณสมบัติยึดเกาะได้ดีกับโลหะที่เปียก (Oplinger *et al*., 1989) เหมาะเป็นสารหล่อลื่นเครื่องจักรใต้น้ำ ใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลสำหรับเป็นแหล่งเชื้อเพลิง และใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น น้ำมันหล่อลื่น น้ำมันเชื้อเพลิง สบู่ เครื่องสำอาง และยังใช้ในการบริโภคของปศุสัตว์และคน น้ำมันจากเมล็ดเรพซีดอุดมไปด้วย กรดไขมันไม่อิ่มตัว oleic 61%, linoleic 20%, linolenic 10%, eicosenoic 1% และกรดไขมันอิ่มตัว ปาล์มิติก และสเตียริก เพียง 7% ส่วนใหญ่การผลิตเรพซีดเพื่อใช้ในการบริโภคจะพบในประเทศเขตหนาว เนื่องจากเรพซีดต้องการอุณหภูมิต่ำในช่วงหนึ่ง (ระหว่าง 12-25 °C) เพื่อกระตุ้นการแทงช่อดอก (bolting) หรือเรียกว่ากระบวนการ vernalization แต่หากมีอุณหภูมิสูงขึ้นก็สามารถลบล้างการกระตุ้นที่เกิดจากอุณหภูมิต่ำได้หรือที่เรียกว่า devernalization (DPI, 2011) การตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำที่แตกต่างกันยังทำให้เกิดการแบ่งสายพันธุ์เรพซีดออกเป็น พันธุ์ที่ปลูกในฤดูหนาว (winter crop variety) ที่ต้องการอุณหภูมิต่ำที่ยาวนานเพื่อกระตุ้นการแทงช่อดอก อีกพันธุ์หนึ่งคือพันธุ์ที่ปลูกในฤดูใบไม้ผลิ (spring crop variety) ซึ่งต้องการอุณหภูมิต่ำสั้นกว่า

ด้วยปัจจัยทางด้านอุณหภูมิที่ทำให้ประเทศในแถบเอเชียบางประเทศเท่านั้นที่สามารถปลูกเรพซีดและให้ผลผลิตได้ เช่น จีน ญี่ปุ่น ปากีสถาน และบังกลาเทศ เป็นต้น ปัจจุบันมีการขยายพื้นที่เพาะปลูกมายังแถบ

เอเชียเพิ่มมากขึ้นแต่ในประเทศไทยนั้นยังไม่พบรายงานว่ามีการปลูกเป็นการค้า ซึ่งพื้นที่ตอนบนทางภาคเหนือของประเทศไทยจะมีอุณหภูมิต่ำในช่วงฤดูหนาวของทุกปี จึงคาดว่าน่าจะสามารถปลูกเรพซีดและให้ผลผลิตได้ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษาข้อมูลการเจริญเติบโตและผลผลิตของเรพซีดในประเทศไทย นอกจากปัจจัยด้านอุณหภูมิ ธาตุอาหารของพืชก็เป็นสิ่งสำคัญที่จะส่งเสริมให้คุณภาพและปริมาณของผลผลิตดีขึ้น คุณภาพของผลผลิตที่ดีจึงต้องคำนึงถึงปริมาณของธาตุอาหารที่พืชจะได้รับ ซึ่งเรพซีดมีความต้องการไนโตรเจน และซัลเฟอร์ 9.60-19.20 กก./ไร่ และ 3.20-6.40 กก./ไร่ ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณความต้องการที่สูงกว่าธัญพืชชนิดอื่น จึงทำให้ธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์มีอิทธิพลอย่างมากต่อการพัฒนา การเจริญเติบโตและปริมาณผลผลิตของเรพซีด (Khan *et al*., 2011; Mansoori, 2012; Jan *et al*., 2002)

เรพซีดเป็นพืชที่สะสมน้ำมันจึงตอบสนองต่อซัลเฟอร์ได้ดี (Asare and Scarisbrick, 1995; De Pascale *et al*., 2008) ในสภาวะที่ขาดแคลนซัลเฟอร์จะส่งผลทำให้คุณภาพของเมล็ดและผลผลิตลดลง ร้อยละ 40 (Abdallah *et al*., 2010) ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารพืชที่เพิ่มการเจริญเติบโตทางด้านสืบพันธุ์ (McGrath and Zhao, 1996) และยังพบปริมาณซัลเฟอร์สูงในเมล็ดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ การขาดแคลนซัลเฟอร์พบได้บ่อยขึ้นและส่งผลให้ปริมาณผลผลิตลดลง หากมีการให้ซัลเฟอร์ในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยในการพัฒนาของดอกและฝักให้เป็นไปได้ง่ายขึ้น (Potarzycki, 2004; Franzen and Lukach, 1997) เนื่องจากซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโน โปรตีน น้ำมัน ตลอดจนวิตามินของพืช ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดคุณภาพของผลผลิตพืช โดยเฉพาะพืชวงศ์ถั่ว และพืชน้ำมัน (สมเจตน์, 2532) สำหรับไนโตรเจนก็เป็นธาตุอาหารหลักของพืชที่จำเป็นและต้องการในปริมาณมากเพื่อการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ เป็นองค์ประกอบของอินทรีย์สาร เช่น เป็นองค์ประกอบของโปรตีน กรดอะมิโน ฮอร์โมนพืช กรดนิวคลีอิก สารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ ที่พืชสะสมไว้ และโคเอนไซม์ (พิทยา, 2555) ดังนั้นการใช้ธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ในอัตราที่เหมาะสมจึงน่าจะเป็นปัจจัยหลักในการผลิตให้ได้มาซึ่งปริมาณและคุณภาพที่ดีของผลผลิตเรพซีดที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการทดลอง ณ สถานีเกษตรหลวงขุนวาง ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ ระดับความสูง 1,300 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง สุ่มเก็บตัวอย่างดินในแปลงปลูกทดสอบจำนวน 10 จุด นำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดินดังต่อไปนี้ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldahl, ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ด้วยวิธี Bray II, ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ด้วยวิธี flame photometry, ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ ด้วยวิธี atomic absorption spectrophotomtry) และปริมาณซัลเฟอร์ที่สกัดได้ด้วยวิธี gelatin-$BaCl_2$ (มงคล, 2548) โดยทดลองกับเรพซีดพันธุ์ Rapool Comfort (winter rapeseed) วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) ทำการทดลอง 3 บล็อก โดยหนึ่งหน่วยการทดลองเท่ากับต้นเรพซีด 8 ต้น ที่ปลูกในแปลงย่อยพื้นที่ 1 ตารางเมตร 1 บล็อกเท่ากับ 5 แปลงย่อย และให้ปุ๋ย 5 กรรมวิธีได้แก่ ควบคุม (ไม่ใส่ปุ๋ย) ยูเรีย 21 กก./ไร่ ยูเรีย 42 กก./ไร่ แคลเซียมซัลเฟต 17 กก./ไร่ และ แคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่

โดยใช้ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) เป็นแหล่งของธาตุไนโตรเจนและปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$: sulfur 18.55%) เป็นแหล่งของธาตุซัลเฟอร์ แบ่งให้ปุ๋ย 2 ครั้งในช่วงการเจริญเติบโต คือ ครั้งที่ 1 ให้ปุ๋ย 40% ของแต่ละกรรมวิธีในระยะการยืดตัวของลำต้น และครั้งที่ 2 ให้ปุ๋ย 60% ของแต่ละกรรมวิธี ในระยะการแทงช่อดอก (Gallejones *et al*., 2012; Lancashire *et al*., 1991) บันทึกอุณหภูมิอากาศตลอดระยะการเจริญเติบโตของพืชโดยติดตั้งเครื่องบันทึกข้อมูล (data logger: รุ่น HOBO UA-002-64) ไว้กลางแปลงปลูก บันทึกการเจริญเติบโตของต้น ได้แก่ ความสูงของต้น และจำนวนใบ จำนวนต้นที่ออกดอก และจำนวนดอก จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อฝัก บันทึกผลผลิตและคุณภาพ ได้แก่ น้ำหนัก 1,000 เมล็ด ผลผลิตเมล็ดที่ความชื้น 5-6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำมัน โดยสกัดน้ำมันด้วยวิธี Soxhlet

extraction และปริมาณกรดไขมัน โดยวิธี gas chromatography วิเคราะห์ผลการทดลองโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลอง

คุณสมบัติทางเคมีของดิน

คุณสมบัติทางเคมีของดินในแปลงปลูกเรพซีดก่อนทำการทดลอง พบว่าระดับความเป็นกรด ด่างของดินมีค่าอยู่ที่ 5.42 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมีค่าร้อยละ 0.34 ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์มีค่าเท่ากับ 610 มก./กก. ระดับของโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ของดินมีค่าเท่ากับ 169 มก./กก. ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้มีค่าเท่ากับ 463 มก./กก. และปริมาณซัลเฟอร์ที่แลกเปลี่ยนได้ของดินมีค่าเท่ากับ 29 มก./กก. (ตารางที่ 1)

การเจริญเติบโตด้านลำต้น

การให้ปุ๋ยในทุกกรรมวิธีไม่มีผลต่อความสูงของต้นเรพซีดในสัปดาห์ที่ 18 หลังปลูก โดยมีความสูงของต้นอยู่ในช่วง 44.87-48.97 เซนติเมตร เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งมีความสูงของต้นเท่ากับ 44.37 เซนติเมตร ยกเว้นกรรมวิธีการให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่ ที่ให้ความสูงของต้นเท่ากับ 38.3 เซนติเมตร ซึ่งน้อยกว่ากรรมวิธีให้ปุ๋ยอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามจำนวนใบของทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีจำนวนใบอยู่ในช่วง 15.33-17.17 ใบ (ตารางที่ 2)

การให้ปุ๋ยทุกกรรมวิธีให้จำนวนต้นที่ออกดอกไม่แตกต่างกันอยู่ในช่วงร้อยละ 58-70 และมีจำนวนดอกอยู่ระหว่าง 72-62 ดอก/ช่อ ซึ่งไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม ยกเว้นกรรมวิธีที่ให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 17 กก./ไร่ ที่มีจำนวนดอกที่ 52 ดอก/ช่อ ซึ่งน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่ มีจำนวนฝักที่ 238.40 ฝัก/ต้น มากกว่ากรรมวิธีที่ให้ปุ๋ยยูเรีย 21 กก./ไร่ และกรรมวิธีที่ให้ยูเรีย 42 กก./ไร่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีจำนวนฝัก 84.60 ฝัก/ต้น และ 8.20 ฝัก/ต้น ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกับกรรมวิธีที่ให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 17 กก./ไร่ และกรรมวิธีควบคุม ที่มีจำนวนฝัก 149.60 ฝัก/ต้น และ 134.20 ฝัก/ต้น ตามลำดับ สำหรับจำนวนเมล็ดต่อฝัก พบว่า เมื่อให้ปุ๋ยยูเรีย 35 กก./ไร่ ทำให้จำนวนเมล็ดต่อฝักมากกว่าทุกกรรมวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 20 เมล็ด/ฝัก รองลงมาคือการให้ปุ๋ยยูเรีย 21 กก./ไร่ คือ 15 เมล็ด/ฝัก (ตารางที่ 3)

Table1. Soil chemical characteristics

pH (H_2O 1:2)	Total nitrogen (%)	Available phosphorus (mg/kg)	Exchangeable potassium (mg/kg)	Exchangeable calcium (mg/kg)	Exchangeable sulfur (mg/kg)
5.42	0.34	611	170	463	30

Table 2. Height of plant and number of leaf at 18 weeks after transplanting

Treatments	Plant height (cm)[1/]	Number of leaf[1/]
Control (no fertilizer)	44.37 ab	16.83
Urea 21 kg/rai	44.87 a	16.67
Urea 42 kg/rai	47.43 a	15.33
$CaSO_4$ 17 kg/rai	48.97 a	17.17
$CaSO_4$ 35 kg/rai	38.30 b	16.50
Significant	*	ns

[1/] Means within column with the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$ by LSD

ns = not significantly difference

ผลผลิตและคุณภาพ

น้ำหนัก 1,000 เมล็ดของเรพซีดพันธุ์ Rapool Comfort ความชื้นร้อยละ 5 มีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 3.63-4.18 กรัม กรรมวิธีที่ให้แคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่ มีปริมาณผลผลิตเมล็ดมากที่สุดคือ 30.88 กรัม/เมตร^2 รองลงมาคือการให้แคลเซียมซัลเฟต 17 กก./ไร่ มีปริมาณผลผลิตเมล็ดเท่ากับ 15.54 กรัม/เมตร^2 ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกรรมวิธีการให้ปุ๋ยไนโตรเจนให้ปริมาณผลผลิตเมล็ดต่ำกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ อย่างไรก็ตามกรรมวิธีการให้ปุ๋ยทุกกรรมวิธีมีแนวโน้มให้ปริมาณน้ำมันมากกว่ากรรมวิธีควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่ ที่ให้ปริมาณน้ำมันมากกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันเรพซีดประกอบด้วยกรดไขมัน 5 ชนิด ได้แก่ โอเลอิก (omega 9) ร้อยละ 62.60 ลิโนเลอิก (omega 6) ร้อยละ 19.48 ลิโนเลนิก (omega 3) ร้อยละ 8.04 ปาล์มิติก ร้อยละ 5.15 สเตียริก ร้อยละ 3.22 และกรดไขมันอื่น ๆ ร้อยละ 1.51 (ตารางที่ 5) ซึ่งกรดไขมันหลักโอเลอิก และ ลิโนเลอิก เป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid)

อุณหภูมิกับระยะการเจริญเติบโต

อุณหภูมิที่บันทึกได้ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2557 ถึงเดือนเมษายน 2558 (ภาพที่ 1) สอดคล้องกับระยะการเจริญเติบโตของเรพซีดดังนี้ เดือนธันวาคม 2557 และเดือนมกราคม 2558 อุณหภูมิกลางคืนลดต่ำลงอย่างต่อเนื่องระหว่าง 8.97-10.45 °C ในช่วงนี้เรพซีดอยู่ในระยะการผลิตใบ และระยะการยืดขยายของลำต้น ซึ่งช่วงอุณหภูมิต่ำดังกล่าวเป็นตัวกระตุ้นให้เรพซีดเริ่มกระบวนการ vernalization และสิ้นสุดกระบวนการในเดือนกุมภาพันธ์ 2558 ซึ่งสัมพันธ์กับระยะการพัฒนาของตาดอก และต้นเรพซีดเข้าสู่ระยะการออกดอกในเดือนมีนาคมที่มีอุณหภูมิกลางคืน 15.62 °C หลังจากนั้นเป็นระยะของการติดฝักและการพัฒนาของเมล็ดในเดือนเมษายน ที่มีอุณหภูมิกลางคืน 18.44 °C และเก็บเกี่ยวเมล็ดในเดือนพฤษภาคม 2558 (ภาพที่ 2)

Table 3. Flowering plant, flower number, pod setting and seed setting after treatments

Treatments	Flowering plant (%)	Flower no. /inflorescence	Pods/plant	Seeds/pod
Control (no fertilizer)	70	72 a	134.20 ab	4 c
Urea 21 kg/rai	58	66 a	84.60 bc	15 b
Urea 42 kg/rai	63	62 ab	8.20 c	3 c
$CaSO_4$ 17 kg/rai	58	52 b	149.60 ab	7 c
$CaSO_4$ 35 kg/rai	63	64 a	238.40 a	20 a
Significant	ns	*	*	*

* Means within column with the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$ by LSD
ns = not significantly difference

Table 4. Seeds weight (g), grain yield (g/m^2) and oil content (%) after treatments

Treatments	1000-seeds weight (g)	Grain yield (g/m^2)	Oil content (%)
Control (no fertilizer)	4.10	11.10 c	17.89 b
Urea 21 kg/rai	3.63	5.18 d	21.36 ab
Urea 42 kg/rai	3.94	7.74 cd	22.02 ab
$CaSO_4$ 17 kg/rai	4.18	15.54 b	21.58 ab
$CaSO_4$ 35 kg/rai	3.94	30.88 a	22.61 a
Significant	ns	*	*

* Means within column with the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$ by LSD
ns = not significantly difference

Table 5. Fatty acids in rapeseed oil cv. Rapool Comfort

Fatty acids	Fatty acid contents (% oil g/ 100 g oil)
C16:0 palmitic	5.15
C18:0 steric	3.22
C18:1 oleic	62.60
C18:2 linoleic	19.48
C18:3 linolenic	8.04
Other	1.51

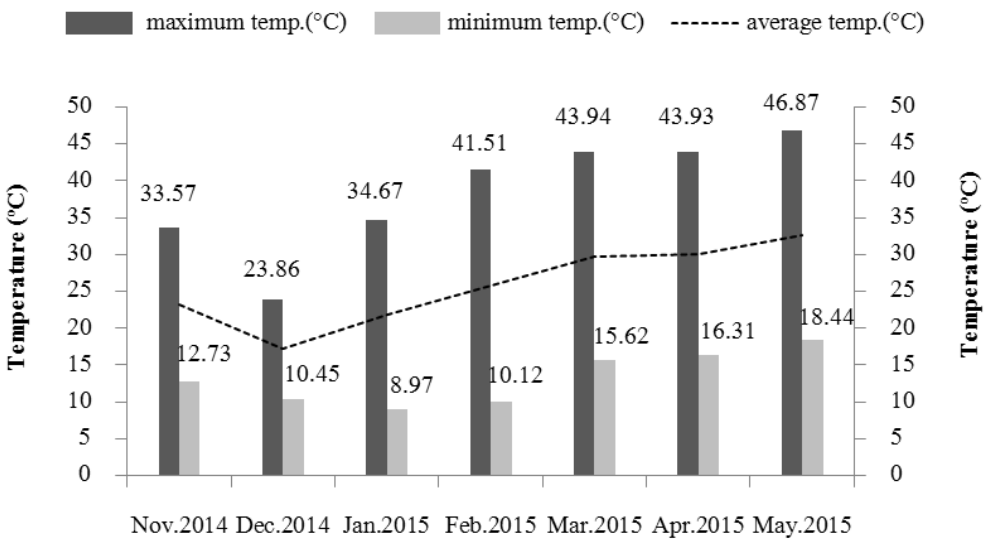

Figure 1. Maximum and minimum of temperature (°C) during growing season (November 2014 - May 2015)

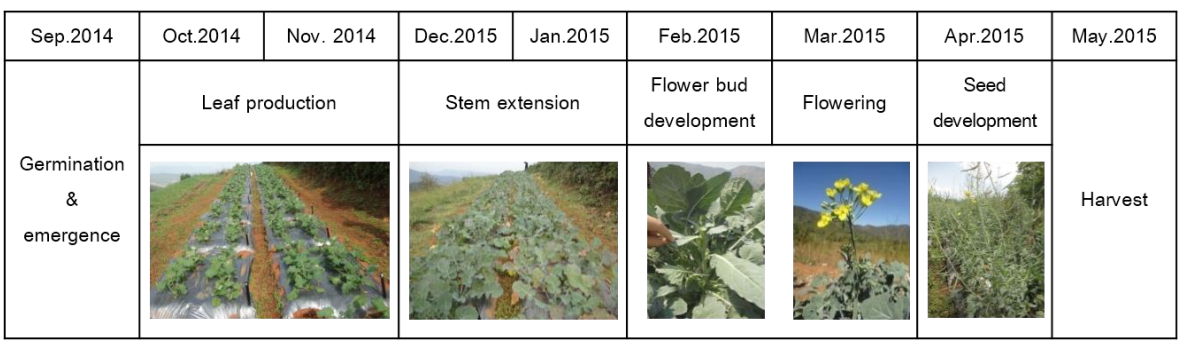

Figure 2. Growth and development of rapeseed (September 2014 - May 2015)

วิจารณ์

การให้ปุ๋ยในทุกกรรมวิธีไม่มีผลต่อความสูงของต้นเรพซีด ยกเว้นการให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่ ทำให้ความสูงของต้นน้อยกว่าการให้ปุ๋ยกรรมวิธีอื่น ๆ ซึ่งอาจเป็นเพราะปริมาณไนโตรเจนในดินซึ่งเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นและต้องการมากในช่วงของการเจริญเติบโตทางกิ่งใบมีปริมาณมากพอสำหรับการเจริญเติบโตของเรพซีดพันธุ์ Rapool Comfort ดังนั้นการเพิ่มอัตราปุ๋ยไนโตรเจนจึงไม่มีผลต่อความสูงของต้น ในขณะที่การให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่ อาจเป็นอัตราที่สูงเกินไปทำให้ความสูงของต้นน้อยกว่าการให้ปุ๋ยกรรมวิธีอื่น การให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟตที่มากเกินไปจะทำให้มีการสะสมไอออนของซัลเฟตในดินมากขึ้นส่งผลให้ค่า pH ต่ำลง (พิทยา, 2555) ซึ่งอาจมีผลต่อการดูดใช้ธาตุอาหารชนิดอื่นๆ ได้ การผลิตเมล็ดเรพซีดอย่างปราณีตเป็นสิ่งที่ซับซ้อน และมีขั้นตอนที่คาบเกี่ยวกับระยะการดูดใช้ไนโตรเจนและการเคลื่อนย้ายของไนโตรเจนในรากพืช ไปจนถึงระยะดอกบาน (Bouchet *et al*., 2016)

การให้ไนโตรเจนในปริมาณที่สูงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เมล็ดงอกไปจนถึงสัปดาห์ที่ 16 มีผลให้ปริมาณน้ำมันของเมล็ดลดลง แต่อย่างไรก็ตามขึ้นอยู่กับช่วงเวลาของการให้ไนโตรเจนและสภาพพื้นที่เพาะปลูกด้วย (Brennan, 2016) มีรายงานว่าการให้ปุ๋ยแอมโมเนียมไนเตรท และแคลเซียมซัลเฟตอัตราสูง (25.60 กก./ไร่ และ 6.40 กก./ไร่ ตามลำดับ) ในช่วงแรกของการเจริญเติบโต (0-60 วัน) มีผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ (vegetative growth) ของคาโนล่าที่ปลูกในแอฟริกาใต้ (Ngezimana and Agenbag, 2013) อย่างไรก็ตาม Khan *et al*. (2011) พบว่าเมื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 6.40 กก./ไร่ ที่ 42 วันหลังการหว่านเมล็ดผลให้มีความสูงของต้นคาโนล่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 27 การตอบสนองต่อธาตุอาหารของเรพซีดจะแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อมที่ปลูกโดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติของดิน ซึ่งคุณสมบัติของดินที่ทำการทดลองมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดอยู่สูง เมื่อมีการให้ปุ๋ยยูเรียซึ่งเป็นแหล่งของธาตุไนโตรเจนเพิ่มขึ้น มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตทางด้านกิ่งใบจึงทำให้ปริมาณผลผลิตเมล็ดลดลงเมื่อเทียบกับการให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟตที่มีแน้วโน้มของปริมาณผลผลิตเมล็ดเพิ่มขึ้น แม้ว่าปริมาณซัลเฟอร์ในดินพบว่ามีอยู่ในระดับที่สูงแล้วก็ตาม

จากการทดลองนี้ต้นเรพซีดพันธุ์ Rapool Comfort สามารถออกดอกได้ร้อยละ 58-70 ซึ่งไม่แตกต่างกันในแต่ละกรรมวิธีการให้ปุ๋ย อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นการออกดอกของเรพซีด เนื่องจากเรพซีดนั้นเป็น vernalized plant ต้องการอุณหภูมิต่ำช่วงหนึ่งเพื่อชักนำให้ออกดอก (Sovero, 1993) ในการทดลองนี้อุณหภูมิต่ำสุดจะอยู่ในช่วงเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ (8.97-10.12 °C) ซึ่งน่าจะเป็นอุณหภูมิต่ำที่ต่ำพอในการกระตุ้นการออกดอกของเรพซีดพันธุ์ Rapool Comfort รวมถึงมีระยะเวลาที่ได้รับอากาศหนาวเย็นนานเพียงพอ ซึ่ง Rao and Raymer (1991) รายงานว่าอุณหภูมิกลางวัน 18.50 °C และอุณหภูมิกลางคืน 12 °C สามารถชักนำให้เรพซีดออกดอกได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะของการเจริญเติบโตของเรพซีดเช่นกัน หากเรพซีดมีการเจริญเติบโตไม่เต็มที่ส่งผลให้การตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำยืดเวลาออกไป (delay) อาจทำให้การชักนำโดยอุณหภูมิต่ำเป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์ส่งผลต่อการเจริญเติบโตในระยะต่อไปได้ (DPI, 2011) สำหรับจำนวนดอกต่อช่อพบว่าการให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 17 กก./ไร่ มีผลให้จำนวนดอกน้อยที่สุด ในขณะที่กรรมวิธีอื่น ๆ ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจำนวนฝักต่อต้นและจำนวนเมล็ดต่อฝักจะตอบสนองได้ดีกับการให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Mansoori (2012) ที่พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับไนโตรเจนและซัลเฟอร์นั้นส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนฝักต่อต้นและเมล็ดต่อฝักได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้มีรายงานผลการทดลองอีกว่าการให้ปุ๋ยซัลเฟอร์มีผลทำให้จำนวนฝัก/ต้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (Asare and Scarisbrick, 1995) ซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนบางชนิดที่ต้องการสำหรับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน อีกด้านหนึ่งจำเป็นต่อการสร้างโครงสร้างของโปรตีนระหว่างการเจริญเติบโตและการพัฒนาของคาโนล่า นอกจากนี้ซัลเฟอร์ยังสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตและเพิ่มการสะสมน้ำมันในเมล็ดได้

(Zhao *et al*., 1993; Jan *et al*., 2002; Sattar *et al*., 2011) อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบว่าจำนวนเมล็ดต่อฝักค่อนข้างน้อย อาจเนื่องจากช่วงที่มีการบานของดอกอุณหภูมิสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องมีอุณหภูมิสูงสุด และต่ำสุด เฉลี่ยที่ 43.96 °C/15.62 °C และ 43.97 °C/16.31 °C ตามลำดับ ด้วยอุณหภูมิที่สูงมากในตอนกลางวันอาจส่งผลให้ดอกบางส่วนเสียหายและฝ่อไม่สามารถผสมและติดเมล็ดได้ Young *et al*. (2004) กล่าวว่าในช่วงการบานของดอกถ้าอุณหภูมิในกลางวันและกลางคืนสูง 27°C/17°C จะส่งผลให้ละอองเรณูเป็นหมันไม่ติดเมล็ดผลผลิตลดลงได้

น้ำหนัก 1000 เมล็ดของเรพซีดพันธุ์ Rapool Comfort ในทุกกรรมวิธีที่สามารถเก็บผลผลิตได้มีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 3.6-4.5 กรัม สอดคล้องกับผลการทดลองของ Mansoori (2012) ที่มีน้ำหนัก 1,000 เมล็ดของเรพซีดอยู่ระหว่าง 3.20-4.20 กรัม อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการเพิ่มขึ้นของระดับไนโตรเจนและซัลเฟอร์สามารถส่งผลให้น้ำหนัก 1,000 เมล็ดเพิ่มขึ้นได้เช่นกัน (Ahmad and Abdin, 2000) ซึ่งโดยทั่วไปเมล็ดเรพซีดจะมีน้ำหนัก 1,000 เมล็ดอยู่ระหว่าง 3-6 กรัม แต่อย่างไรก็ตามขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ สภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต (DPI, 2011) เรพซีดพันธุ์ Rapool Comfort มีปริมาณผลผลิตและเปอร์เซ็นต์น้ำมันจากเมล็ด ซึ่งมีการตอบสนองได้ดีกับกรรมวิธีที่ให้แคลเซียมซัลเฟต สอดคล้องกับ Mansoori (2012) ที่กล่าวว่าการให้ซัลเฟอร์ 9.60 กก./ไร่ มีผลให้ปริมาณน้ำมันในเมล็ดเรพซีดในชุดควบคุมจากร้อยละ 34.57 เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 39.10 ได้ เนื่องจากซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนบางชนิดที่ต้องการสำหรับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน อีกด้านหนึ่งจำเป็นต่อการสร้างโครงสร้างของโปรตีนระหว่างการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเรพซีด อีกทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตและสามารถเพิ่มการสะสมน้ำมันในเมล็ดสกุล Brassica (McGrath and Zhao, 1996) (Zhao *et al*., 1993; Jan *et al*., 2002; Sattar *et al*., 2011) ด้านองค์ประกอบกรดไขมันพบว่า กรดไขมันหลักที่พบจะเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ร้อยละ 62 คือ กรดโอเลอิก (oleic acid) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วในน้ำมันเรพซีดจะพบอยู่ปริมาณมากกว่าร้อยละ 61 (DPI, 2011; Kramer *et al*., 1983)

สรุป

เรพซีดพันธุ์ Rapool Comfort สามารถปลูกออกดอก และให้ผลผลิตเมล็ดได้ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทยที่ระดับความสูง 1,300 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล การให้ปุ๋ยทุกกรรมวิธีไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น (vegetative growth) ยกเว้นการให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่ ที่ให้ความสูงของต้นน้อยกว่าการให้ปุ๋ยกรรมวิธีอื่น สำหรับในระยะการเจริญเติบโตทางด้านสืบพันธุ์ (reproductive growth) จากคุณสมบัติของดินที่มีปริมาณไนโตรเจนอยู่สูงการให้ปุ๋ยยูเรีย 21 กก./ไร่ และ 42 กก./ไร่ มีแนวโน้มปริมาณผลผลิตเมล็ดลดลง และการให้ปุ๋ยแคลเซียมซัลเฟต 35 กก./ไร่ จะสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดเรพซีดให้ดีขึ้นได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการจัดสรรทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นกลาง ประจำปีงบประมาณ 2557 และขอขอบคุณศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (ขุนวาง) ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ ที่สนับสนุนพื้นที่ในการปลูกเรพซีด

เอกสารอ้างอิง

พิทยา สรวมศิริ. 2555. ธาตุอาหารในการผลิตพืชสวน. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 326 หน้า.

มงคล ตั๊ะอุ่น. 2548. เทคนิคและการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการดิน พืช ดิน น้ำและปุ๋ย. ภาควิชาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 300 หน้า.

สมเจตน์ ศรีทองคำ. 2532. ความต้องการธาตุฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์ของถั่วเหลืองที่ปลูกในชุดดินที่สำคัญทางภาคเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 111 หน้า.

Abdallah, M., L. Dubousset, F. Meuriot, P. Etienne, J.C. Avice and A. Ourry. 2010. Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetable growth of *Brassica napus* L. Journal of Experimental Botany 61(10): 2635-2646.

Ahmad, A. and M.Z. Abdin. 2000. Interactive effect of sulphur and nitrogen on the oil and protein concentrations and on the fatty acid profiles of oil in the seeds of rapeseed (*Brassica campestris* L.) and mustard (*Brassica juncea* L. Czern. and Coss.). Journal of Agronomy and Crop Science 185(1): 49-54.

Ahmadi, M. and M.J. Bahrani. 2009. Yield and yield components of rapeseed as influenced by water stress at different growth stages and nitrogen levels. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences 5(6): 755-761.

Appelqvist, L.Å. and R. Ohlson. 1972. Rapeseed: Cultivation, Composition, Processing and Utilization. Elsevier Publishing Company, Inc., New York. 391 p.

Asare, E. and D.H. Scarisbrick.1995. Rate of nitrogen and sulphur fertilizers on yield, yield components and seed quality of oilseed rape *(Brussica napus* L.). Field Crops Research 44: 41-46.

Bouchet, A.S., A. Laperche, C. Bissuel-Belaygue, R. Snowdon, N. Nesi and A. Stahl. 2016. Nitrogen use efficiency in rapeseed: A review. Agronomy for Sustainable Development 36(2): 1-20.

Brennan, R.F. 2016. Effect of time of application and amount of nitrogen fertilizer on seed yield and concentration of oil in canola (*Brassica napus*). Plant Nutrition 39: 337-347.

Chongo, G. and P.B.E. McVetty. 2000. Relationship of physiological characters to yield parameters in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Can. Plant Science 81(1): 1-6.

De Pascale, S., A. Maggio, F. Orsini, A. Bottino and G. Barbieri. 2008. Sulphur fertilization affects yield and quality of friarielli (*Brassica rapa* L.) subsp. *sylvestris* L. Janch. var. *esculenta* Hort.) grown on a floating system. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 83: 743-748.

Department of Primary Industries (DPI). 2011. Canola growth & development. Department of Primary Industries, State of New South Wales. 88 p.

FAO. 2007. The State of Food and Agriculture. FAO Agriculture Series No. 38. Rome. 240 p.

Franzen, D.W. and J. Lukach. 1997. Fertilizing mustard and canola. Bull. North Dakota State University Extension Service. North Dakota State University, Fargo, ND. 8 p.

Gallejones P., A. Castello´n, A. del Prado, O. Unamunzaga and A. Aizpurua. 2012. Nitrogen and sulphur fertilization effect on leaching losses, nutrient balance and plant quality in a wheat–rapeseed rotation under a humid Mediterranean climate. Nutrient Cycling in Agroecosystems 93: 337-355.

Jan, A., N. Khan, N. Khan, I.A. Khan and B. Khattak. 2002. Chemical composition of canola as affected by nitrogen and sulphur. Asian Journal of Plant Sciences 1: 519-521.

Khan T.A., R. Norton, R. Edis, C. Walker and D. Chen. 2011. Comparing N and S sources to improve yield and nutrient efficiency in canola cropping systems in south-eastern Australia. pp. 154-158. *In*: Proceedings of 7th Australian Research Assembly on Brassicas, Wagga Wagga, NSW.

Kramer, J.K.G., F.D. Sauer and W.J. Pigden. 1983. High & low erucic acid rapeseed oils. Academic Press Canada, Ontario. 569 p.

Lancashire, P.D., H. Bleiholder, T.V.D. Boom, P. Langelüddeke, R. Stauss, E. Weber and A. Witzenberger. 1991. A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. Annals of Applied Biology 119(3): 561-601.

Mansoori, I. 2012. Response of canola to nitrogen and sulfur fertilizers. International Journal of Agriculture and Crop Science 4: 28-33.

McGrath, S.P. and F.J. Zhao. 1996. Sulphur uptake, yield responses and the interactions between nitrogen and sulphur in winter oilseed rape (*Brassica napus*). Journal of Agricultural Science 126(2): 53-62.

Ngezimana, W. and G.A. Agenbag. 2013. Effects of nitrogen and sulphur on canola (*Brassica napus* L.) vegetative and reproductive growth. African Journal of Aricultural Research 8(39): 4887-4894.

Oplinger, E.S., L.L. Hardman, E.T. Gritton, J.D. Doll and K.A. Kelling. 1989. Canola (Rapeseed). (Online). Available: http://www.hort. purdue.edu/newcrop/afcm/canola.html (April 1, 2013).

Potarzycki, J. 2004. Winter oilseed rape nitrogen fertilization efficiency as induced by sulphur application. Department of Agricultural Chemistry, Agricultural University, Poznań, Poland.

Rao, M.S.S. and P.L. Raymer 1991. Vernalization and photoperiod requirements for the adaptability of oilseed rape (*Brassica napus* and *B. campestris*) to the southeastern United States. pp. 738-742. *In*: Proceedings of 8th International Rapeseed Congress on Rapeseed in a Changing World. Saskatoon, Canada.

Sattar, A., M.A. Cheema, M.A. Wahid, M.F. Saleem and M. Hassan. 2011. Interactive effect of sulpher and nitrogen on growth, yield and quality of canola. Crop Environ. 2: 32-37.

Sovero, M. 1993. Rapeseed a new oilseed crop for the United States. pp. 302-307. *In*: J. Janick and J.E. Simon (eds.). New Crops. Wiley, New York.

Young, L.W., R.W. Wilen and P.C. Bonham-Smith. 2004. High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. Journal of Experimental Botany 55(396): 485-495.

Zhao, F., P.E. Bilsborrow, E.J. Evans and J.K. Syers. 1993. Sulphur turnover in the developing pods of single and double low varieties of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture 62: 111-119.

การคัดเลือกสายพันธุ์ก้าวหน้าพันธุ์ข้าวเจ้าก่ำไม่ไวต่อช่วงแสง และมีปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดสูง

Selection for Photoperiod Insensitive Advanced Lines and High Grain Anthocyanin of Purple Glutinous Rice

ธรรมนูญ หัทยานันท์[1/] ชนากานต์ เทโบลต์ พรมอุทัย[1, 2/] และ ศันสนีย์ จำจด[1, 2/*]

Tammanoon Huttayanun[1/], Chanakan Thebault Prom-u-thai[1, 2/] and Sansanee Jamjod[1, 2/*]

[1/]ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1/]Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2/]ศูนย์วิจัยข้าวล้านนา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[2/]Lanna Rice Research Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: sansanee.cm@gmail.com*

(Received: 1 September 2016; Accepted: 9 December 2016)

Abstract: Anthocyanin is a major compound with anti-oxidative properties which can protect against oxidative damages implicated in a range of diseases and it is commonly found in the purple rice grain. Purple rice varieties are photoperiod sensitivity which can be grown only once a year and contains low anthocyanin content. This research was to develop the advanced purple rice lines with high anthocyanin content and photoperiod insensitivity. Seeds of the F_4 population between KDK (glutinous rice) and PTT 1 (non-glutinous rice) were used to grow in plant-to-row and selected for the F_5 population during wet season in 2013. The plants were recorded for flowering dates, plant height, grain weight. pericarp color and endosperm type. Plants with desirable traits and purple pericarp seeds were selected. F_6 population were grown during dry season in 2014. Ten varieties were found with the character of photoperiod insensitivity plants, purple color in culm and leaves with short plant type and high grain yield, and the seed of non-glutinous endosperm type with purple pericarp color. The 10 varieties were grown for evaluation and selection of F_7 population and it was found photoperiod insensitivity character in all varieties with shorter day to flowering, ranged between 96-103 days and plant height compared with the parent, 79.7-83.2 cm, but similar seed size. The seeds were purple color with non-glutinous endosperm type with anthocyanin content ranging from 31.4 to 58.8 mg/100 g which were 25-135% higher than KDK. Seeds of all varieties will be evaluated and selected for the further study.

Keywords: Selection rice, purple rice, anthocyanin, photoperiod insensitivity

บทคัดย่อ: ข้าวก่ำมีแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระสาเหตุของการเกิดโรคสำคัญต่าง ๆ ในปริมาณสูง โดยทั่วไปเป็นข้าวเหนียวและไวต่อช่วงแสงทำให้สามารถปลูกได้ปีละครั้งเดียว เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณค่าทางโภชนาการของข้าวก่ำ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ข้าวเจ้าก่ำ ที่มีปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดสูงและไม่ไวต่อช่วงแสง โดยนำเมล็ดจากประชากรลูกผสมชั่วที่ 4 ระหว่างข้าวเหนียวก่ำดอยสะเก็ดและข้าวเจ้าปทุมธานี 1 ที่มีลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงมาเป็นประชากรตั้งต้น ปลูกคัดเลือกชั่วที่ 5 ในฤดูนาปี 2556 แบบต้นต่อแถว บันทึกวันออกดอก ความสูง น้ำหนักต่อต้น สีเยื่อหุ้มเมล็ด และชนิดแป้ง คัดเลือกต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง ปลูกคัดเลือกต่อในชั่วที่ 6 ในฤดูนาปรังปี พ.ศ. 2557 และคัดเลือกได้ต้นไม่ไวต่อช่วงแสง เป็นข้าวเจ้ามีเยื่อหุ้มเมล็ดลำต้นและใบสีม่วง ต้นเตี้ย และให้ผลผลิตสูงจำนวน 10 สายพันธุ์ ปลูกประเมินและคัดเลือกในชั่วที่ 7 พบว่าทั้ง 10 สายพันธุ์มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง มีอายุวันออกดอกอยู่ในช่วง 96-103 วัน มีต้นเตี้ยใกล้เคียงพันธุ์พ่อมีความสูงอยู่ในช่วง 79.7-83.2 เซนติเมตร และมีขนาดเมล็ดเรียวยาวใกล้เคียงกับพันธุ์พ่อ มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง เป็นชนิดข้าวเจ้า มีปริมาณแอนโทไซยานินอยู่ในช่วงระหว่าง 31.4-58.8 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ซึ่งสูงกว่าพันธุ์แม่ร้อยละ 25-134 ซึ่งจะได้คัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะเป็นข้าวเจ้าก่ำ ไม่ไวแสงและมีเมล็ดเรียว เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ: การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวลูกผสม ข้าวเจ้าก่ำ แอนโทไซยานิน ไม่ไวต่อช่วงแสง

คำนำ

ข้าวก่ำ (purple rice) หรือข้าวเหนียวดำเป็นข้าวพื้นเมืองของประเทศไทย มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจากข้าวทั่วไปโดยมักพบสีม่วงปรากฏบนส่วนต่าง ๆ ของต้น กาบใบ แผ่นใบ กลีบดอก เปลือกเมล็ด และเยื่อหุ้มเมล็ด (ดำเนิน และ ศันสนีย์, 2543) โดยสามารถพบได้ ในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ในปัจจุบันกำลังได้รับความนิยมและความสนใจมากขึ้น เนื่องจากข้าวก่ำประกอบไปด้วยสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งเป็นรงควัตถุสีม่วงมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Hui *et al*., 2010) ช่วยต้านทานโรคต่าง ๆ เช่น ลดและยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งในเม็ดเลือดของหนู (Punyatong *et al*., 2008) ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งท่อหายใจในปอด (Chen *et al*., 2006) และการขยายของเนื้องอก ลดระดับไขมันในเลือด ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง (Blando *et al*., 2004) ลดความเครียดจากการออกซิเดชัน ลดการอักเสบในร่างกาย (Xia *et al*., 2003) และสามารถป้องกันโรคเบาหวาน (Wrolstad, 2001) ซึ่งปริมาณสารแอนโทไซยานินนี้จะมีความแปรปรวนความในช่วงกว้างในระหว่างพันธุกรรมของข้าวก่ำพันธุ์นั้น ๆ ด้วย (สุภาภรณ์ และชนากานต์, 2559) นอกจากนี้ยังพบคุณค่าทางโภชนาการของกลุ่มข้าวเหนียวก่ำ ที่ประกอบไปด้วยปริมาณสารอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ ไขมัน โปรตีน แคลเซียม ฟอสฟอรัส และโปตัสเซียม ในข้าวกล้องที่มีปริมาณสูงกว่าข้าวขาวอีกด้วย (Xu *et al*., 2001) การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวก่ำที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงจึงดำเนินต่อเนื่องมาถึงปัจจุบัน

ดำเนิน และศันสนีย์ (2543) ได้คัดเลือกสายพันธุ์ข้าวก่ำดอยสะเก็ดที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงจากวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์แท้ (pure line selection) ที่สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับการขึ้นทะเบียนพันธุ์ และส่งเสริมการปลูกร่วมไปถึงการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพหลายชนิด อย่างไรก็ตามข้าวก่ำดอยสะเก็ดเป็นข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งมีลักษณะลำต้นสูง ตอบสนองต่อช่วงแสง สามารถปลูกได้เพียง 1 ฤดู ต่อปี และมีผลผลิตต่อพื้นที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์ปรับปรุงสมัยใหม่ที่ให้ผลผลิตสูง เพื่อแก้ไขปัญหานี้ ทีมวิจัยจึงได้สร้างลูกผสมระหว่างข้าวเหนียวก่ำดอยสะเก็ดและพันธุ์ปทุมธานี 1 ศึกษาการกระจายตัวและคัดเลือกลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสงในชั่วที่ 2 ในฤดูนาปรังและปลูกคัดเลือกต่อในชั่วที่ 3 พบการกระจายตัวของชนิดแป้งและสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยเฉพาะสีเยื่อหุ้มเมล็ดที่พบจะสามารถแบ่งได้ 3 สี คือ สี ม่วง น้ำตาล ขาว โดยพบว่าปริมาณแอนโทไซ-

ยานินจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มสีเมล็ดหรือไม่พบเลย ในขณะที่เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวไม่พบสารแอนโทไซยานินเลย เช่นเดียวกับพันธุ์พ่อปทุมธานี 1 (พีรนันท์, 2557)

สำหรับงานทดลองนี้เป็นงานต่อเนื่องได้นำเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากชั่วที่ 4 ที่มีสีเยื่อหุ้มม่วงทั้งเมล็ดมาเป็นประชากรตั้งต้น คัดเลือกต่อในชั่วที่ 5-6 และประเมินสายพันธุ์ในชั่วที่ 7 เพื่อให้ได้สายพันธุ์ก้าวหน้าข้าวเจ้าก่ำที่มีลักษณะต้นเตี้ย มีปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดสูง และไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุกรรม

ศึกษาประชากรลูกผสม ระหว่างพันธุ์ข้าวก่ำดอยสะเก็ด (KDK) ซึ่งเป็นข้าวเหนียวมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีแอนโทไซยานินในเมล็ดสูง และมีลักษณะไวต่อช่วงแสง กับข้าวเจ้าพันธุ์ปรับปรุงสมัยใหม่ไม่ไวต่อช่วงแสง พันธุ์ปทุมธานี 1 (PTT1) ซึ่งลูกผสมชั่วที่ 2 คัดเลือกเฉพาะต้นที่ออกดอก ในฤดูนาปรัง ปี พ.ศ. 2555 และ ชั่วที่ 3 ในฤดูนาปี ปี พ.ศ. 2555 โดยเลือกต้นที่มีลำต้นสีม่วงและเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงตั้งแต่ครึ่งเมล็ดขึ้นไป จำนวน 204 ต้น แต่ละต้นนับเป็น 1 family (พีรนันท์, 2557) ในฤดูนาปรัง ปี พ.ศ. 2556 ปลูกคัดเลือกชั่วที่ 4 เฉพาะต้นที่ออกดอกและมีต้นสีม่วงและเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง จำนวน 83 ต้น แต่ละต้นนับเป็น 1 family เช่นเดียวกัน

การคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 5

ปลูกคัดเลือกข้าวลูกผสมชั่วที่ 5 และพันธุ์พ่อแม่ในกระถาง ฤดูนาปี ในปี พ.ศ. 2556 (สิงหาคม 2556 - มกราคม 2557) เพาะเมล็ดใน Petri-dishes ปลูกในกระถางพลาสติก มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ปลูกจำนวน 1 ต้นต่อหลุม จำนวน 5 ต้นต่อกระถาง กระถางละ 1 family หลังย้ายปลูก 30 วัน และ 60 วัน ให้ปุ๋ยสูตร 16-20-0 อัตรา 20 กก./ไร่ และ สูตร 46-0-0 อัตรา 25 กก./ไร่ ตามลำดับ การจัดการน้ำให้น้ำอยู่ในสภาพน้ำขังตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงระยะสุกแก่จึงงดน้ำเพื่อให้สะดวกแก่การเก็บเกี่ยว การป้องกันกำจัดศัตรูข้าวทำตามความเหมาะสมของการระบาดที่พบตลอดระยะการปลูก บันทึกวันออกดอกที่ 50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 315 ต้น เมื่อถึงระยะสุกแก่ บันทึกความสูงจากโคนต้นถึงคอรวง เก็บเกี่ยวแบบแยกต้น ชั่งน้ำหนักต่อต้น โดยแต่ละต้นสุ่มตัวอย่างเมล็ดต้นละ 10 เมล็ดมากะเทาะเปลือกบันทึกสีเยื่อหุ้มเมล็ด ส่วนชนิดข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียว ทดสอบจากการติดสีสารละลายไอโอดีน โดยวิธีการย้อมสีแป้งในเมล็ดด้วย potassium iodine (KI) โดยแป้งที่ย้อมติดสีน้ำเงินแสดงว่าเป็นข้าวเจ้า ส่วนสีน้ำตาลแสดงว่าเป็นข้าวเหนียว (Jeng *et al*., 2009; Yamanaka *et al*., 2004; Kimiko *et al*., 2003; Yanagisawa *et al*., 2003; Chang and Bardenas, 1965) และนำต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงตั้งแต่ครึ่งเมล็ดขึ้นไป ปลูกคัดเลือกในฤดูปลูกถัดไป

การคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 6

ปลูกคัดเลือกข้าวลูกผสมชั่วที่ 6 และพันธุ์พ่อแม่ในกระถาง ฤดูนาปรัง ในปี พ.ศ. 2557 (มีนาคม - กรกฎาคม) ใช้วิธีการจัดการและบันทึกข้อมูลเช่นเดียวกับชั่วที่ 5 คัดเลือกจำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง มีลักษณะเป็นข้าวเจ้า และมีสีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงหรือดำทั้งเมล็ด เพื่อปลูกประเมินสายพันธุ์ในฤดูปลูกถัดไป

การประเมินข้าวลูกผสมชั่วที่ 7

ปลูกประเมินเปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่ โดยปลูกในกระถาง ฤดูนาปี ในปี พ.ศ. 2557 (สิงหาคม - พฤศจิกายน) จำนวน 5 ต้นต่อกระถาง ปลูกข้าวลูกผสมชั่วที่ 7 และพันธุ์พ่อแม่สายพันธุ์ละ 5 กระถางจำนวน 10 สายพันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 5 ซ้ำ มีการจัดการและบันทึกข้อมูล เช่นเดียวกันกับชั่วที่ 5 และ 6 แต่จะสุ่มตัวอย่างเมล็ดแต่ละต้น วัดขนาดเมล็ดทั้งข้าวเปลือกและข้าวกล้อง จากนั้นนำเมล็ดแต่ละต้นมารวมกัน สุ่มชั่งน้ำหนักข้าวกล้อง 2.5 กรัม เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานิน ของเมล็ดข้าว ด้วยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี ซึ่งดัดแปลง จากวิธี pH differential method (Giusti and Wrolstad, 2001) ค่าที่ได้เป็นปริมาณสารโมโนเมอริคแอนโทไซยานิน (monomeric anthocyanin)

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์ ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของข้าวลูกผสมชั่วที่ 7 และพันธุ์พ่อแม่

ผลการทดลอง

การคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 5

จำนวนวันออกดอกเฉลี่ยเท่ากับ 90 วัน ซึ่งอยู่ในช่วงของพันธุ์พ่อแม่ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100 และ 113 วันตามลำดับ (ภาพที่ 1a) ส่วนความสูงเฉลี่ยของชั่วที่ 5 เท่ากับ 96.3 เซนติเมตร ซึ่งมากกว่าพันธุ์พ่อแต่ยังน้อยกว่าพันธุ์แม่ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 78.9 และ 141.9 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 1b) ในขณะที่น้ำหนักต่อต้น ชั่วที่ 5 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.5 กรัมต่อต้น ซึ่งใกล้เคียงกับพันธุ์พ่อที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.2 กรัมต่อต้น ในขณะเดียวกันพันธุ์แม่มีน้ำหนักเพียง 3.0 กรัมต่อต้นเท่านั้น (ภาพที่ 1c) ชนิดแป้งพบชนิดแป้งที่เป็นข้าวเหนียวมากที่สุดมี 47.0% ของ family ทั้งหมด (ตารางที่ 1) ส่วนสีเยื่อหุ้มเมล็ด ไม่พบ family ที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีขาวทั้งหมดเลย ส่วนใหญ่พบ family ที่มีทั้งสีเมล็ดม่วงและขาวใน family เดียวกัน เท่ากับ 55.4% รองลงมาคือ family ที่มีเยื่อหุ้มสีม่วงทั้งหมด (ตารางที่ 2) คัดเลือกเฉพาะต้นที่มีเมล็ดสีม่วงตั้งแต่ครึ่งเมล็ดขึ้นไปจำนวน 200 ต้น นำไปปลูกต่อในชั่วที่ 6

การคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 6

ชั่วที่ 6 นี้ พันธุ์แม่ไม่ออกดอก ส่งผลให้วัดความสูงไม่ได้และไม่ให้ผลผลิต วันออกดอกของชั่วที่ 6 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 86 วัน ซึ่งน้อยกว่าพันธุ์พ่อและชั่วที่ 5 (ภาพที่ 2a) ความสูงของชั่วที่ 6 มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 119.6 เซนติเมตร ซึ่งเพิ่มขึ้นจากชั่วที่ 5 และมากกว่าพันธุ์พ่อ (ภาพที่ 2b) ในขณะที่ผลผลิตมีน้ำหนักเมล็ดต่อต้นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.8 กรัมต่อต้น ในขณะที่พันธุ์พ่อมีน้ำหนักเท่ากับ 4.6 กรัมต่อต้น (ภาพที่ 2c) ในด้านเมล็ดพบ family ที่เป็นชนิดข้าวเหนียวทั้งหมดมากที่สุดมี 59.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชนิดข้าวเจ้าทั้งหมดมีเพียง 8.9 เปอร์เซ็นต์ซึ่งน้อยที่สุดในกลุ่ม (ตารางที่ 1) ส่วนสีเยื่อหุ้มเมล็ดพบ family ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงอย่างเดียวมากที่สุดมากถึง 74.7 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวน family ทั้งหมด ในขณะไม่พบ family ที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีขาวทั้งหมดเช่นเดียวกับชั่วที่ 5 (ตารางที่ 2) จากนั้นคัดเลือกเฉพาะต้นที่มีความสูงเท่ากับพันธุ์พ่อ มีต้นและเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและเป็นชนิดข้าวเจ้า จำนวน 10 ต้น เพื่อปลูกประเมินในชั่วที่ 7 ต่อไป

การประเมินข้าวลูกผสมชั่วที่ 7

จำนวนวันออกดอกแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพันธุ์พ่อปทุมธานี 1 และพันธุ์แม่ข้าวก่ำดอยสะเก็ดมีจำนวนวันออกดอกเฉลี่ย เท่ากับ 101 และ 144 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ข้าวลูกผสมชั่วที่ 7 มีจำนวนวันออกดอกอยู่ในช่วง 96-103 วัน ซึ่งค่อนไปทางพันธุ์พ่อ ความสูงของต้นเมื่อวัดถึงคอรวง พันธุ์พ่อและแม่มีความสูงเฉลี่ย เท่ากับ 85.8 และ 146.4 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ข้าวลูกผสมชั่วที่ 7 มีความสูงเฉลี่ย อยู่ในช่วง 81.1-83.2 เซนติเมตร โดยข้าวลูกผสมที่มีความสูงมากที่สุดคือสายพันธุ์ที่ 5 รองลงมาคือ สายพันธุ์ที่ 6 ซึ่งมีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 83.2 และ 82.2 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ที่ 7 มีความสูงเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ 79.7 เซนติเมตร จำนวนรวงต่อต้นและจำนวนช่อดอกต่อรวงไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ส่วนเปอร์เซ็นต์เมล็ดดี น้ำหนัก 100 เมล็ด และน้ำหนักต่อกระถางทดลอง ลูกผสมชั่วที่ 7 ส่วนใหญ่มีค่าเข้าใกล้ไปทางพันธุ์ปทุมธานี 1 (ตารางที่ 3)

ปริมาณแอนโทไซยานินเปรียบเทียบข้าวลูกผสมชั่วที่ 7 กับข้าวก่ำดอยสะเก็ดพันธุ์แม่ ซึ่งข้าวลูกผสมนั้น มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าพันธุ์แม่ทั้ง 10 พันธุ์ โดยพันธุ์ที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดคือ พันธุ์ที่ 1, 6 และ 9 มีปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 58.4, 55.5 และ 55.0 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์แม่ มีปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 25.8 มิลลิกรัม/100 กรัม (ตารางที่ 3)

ลักษณะสีเปลือกเมล็ดพบว่าข้าวสายพันธุ์ก้าวหน้าชั่วที่ 7 ทั้ง 10 สายพันธุ์มีสีเปลือกสีเยื่อหุ้มเหมือนกับพันธุ์แม่ทั้งหมด โดยมีสีเปลือกเมล็ดสีม่วง และสีเยื่อหุ้มเมล็ดม่วงดำ ในขณะที่พันธุ์พ่อเปลือกเมล็ดสีฟางและสีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ชนิดแป้งที่พบเป็นชนิดข้าวเจ้าทั้ง 10 สายพันธุ์ ซึ่งเหมือนกับพันธุ์พ่อ ในขณะที่พันธุ์แม่เป็นชนิดข้าวเหนียว (ตารางที่ 4)

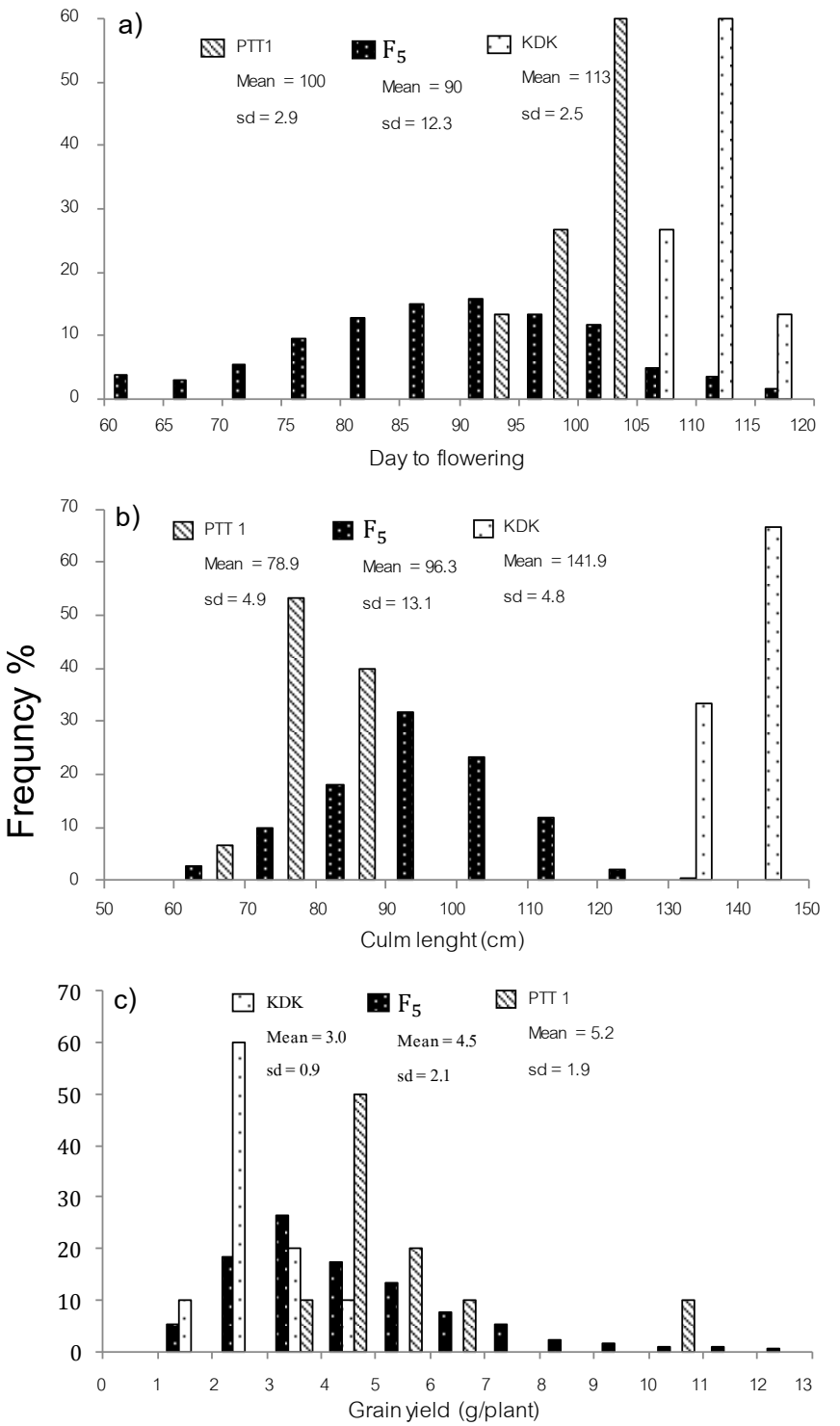

Figure 1. Frequency distribution (%) of parents and F_5 populations between purple glutinous Kum Doi Saket and white non-glutinous Pathum Thani 1 rice varieties
a) Day to flowering b) Culm length (cm) c) Grain yield (g/plant)

Table 1. Distribution of endosperm type in F_5 and F_6 between purple glutinous Kum Doi Saket (KDK) and white non-glutinous Pathum Thani 1 (PTT1) rice varieties

Starch type	Endosperm type	F_5 (Rainy season)		F_6 (Dry season)	
		Family number	%	Family number	%
KDK Type	Glutinous	39	47.0	47	59.5
Segregation	Glutinous and Non-Glutinous	18	21.7	25	31.6
PTT 1 Type	Non-Glutinous	26	31.3	7	8.9
Total		83	100	79	100

Table 2. Distribution of pericarp color in F_5 and F_6 between purple glutinous Kum Doi Saket (KDK) and white non-glutinous Pathum Thani 1 (PTT1) rice varieties

Pericarp type	Pericarp color	F_5 (Rainy season)		F_6 (Dry season)	
		Family number	%	Family number	%
KDK Type	Purple	41	49.4	59	74.7
Segregation	Purple and White	42	50.6	20	25.3
PTT 1 Type	White	0	0.0	0	0.0
Total		83	100	79	100

Table 3. Days to flowering, culm length (cm), yield components, grain yield and grain anthocyanin concentrations (mg/100 g) of selected F_7 lines

Lines/ Varieties	Days to flowering	Culm length (cm)	Number of panicles/ plant	Number of spikelets/ panicle	Filled grain (%)	100 seed weight (g)	Grain yield (g/pot)	Anthocyanin (mg/100g)
1	96 e	81.1 cd	9	103	93.1 a	2.0 de	36.2 a	58.4 a
2	98 de	82.4 cd	7	96	93.0 a	2.2 c	29.1 abc	35.2 def
3	98 cde	81.5 cd	8	100	94.3 a	2.1 cd	33.0 ab	47.9 abc
4	102 bc	82.6 cd	8	102	93.9 a	1.9 def	28.0 abc	37.4 cde
5	100 bcd	83.2 bc	9	94	92.7 a	1.9 f	32.6 ab	44.2 bcd
6	100 bcd	82.2 cd	9	96	92.3 a	2.0 def	32.2 ab	55.5 ab
7	100 bcd	79.7 d	9	102	93.9 a	1.9 ef	24.0 bcd	41.5 cde
8	103 b	80.9 cd	8	99	55.4 c	2.0 def	13.2 e	35.5 def
9	99 cde	81.1 cd	9	95	74.0 b	2.0 def	18.3 de	55.0 ab
10	101 bcd	81.2 cd	9	100	94.9 a	2.4 b	27.2 abcd	31.4 ef
KDK (check)	144 a	146.4 a	7	91	87.4 a	2.6 a	21.3 cde	25.1 f
PTT1 (check)	101 bcd	85.8 b	8	102	89.3 a	2.5 ab	29.7 abc	not detected
F-test	**	**	ns	ns	**	**	**	**
LSD 0.05	3.3	3.1	-	-	9.2	5.9	10.7	11.4
CV (%)	2.5	2.8	18.7	9.9	8.2	0.2	31.2	15.9

** are significantly difference at $P<0.05$,respectively. ns is non-significantly difference

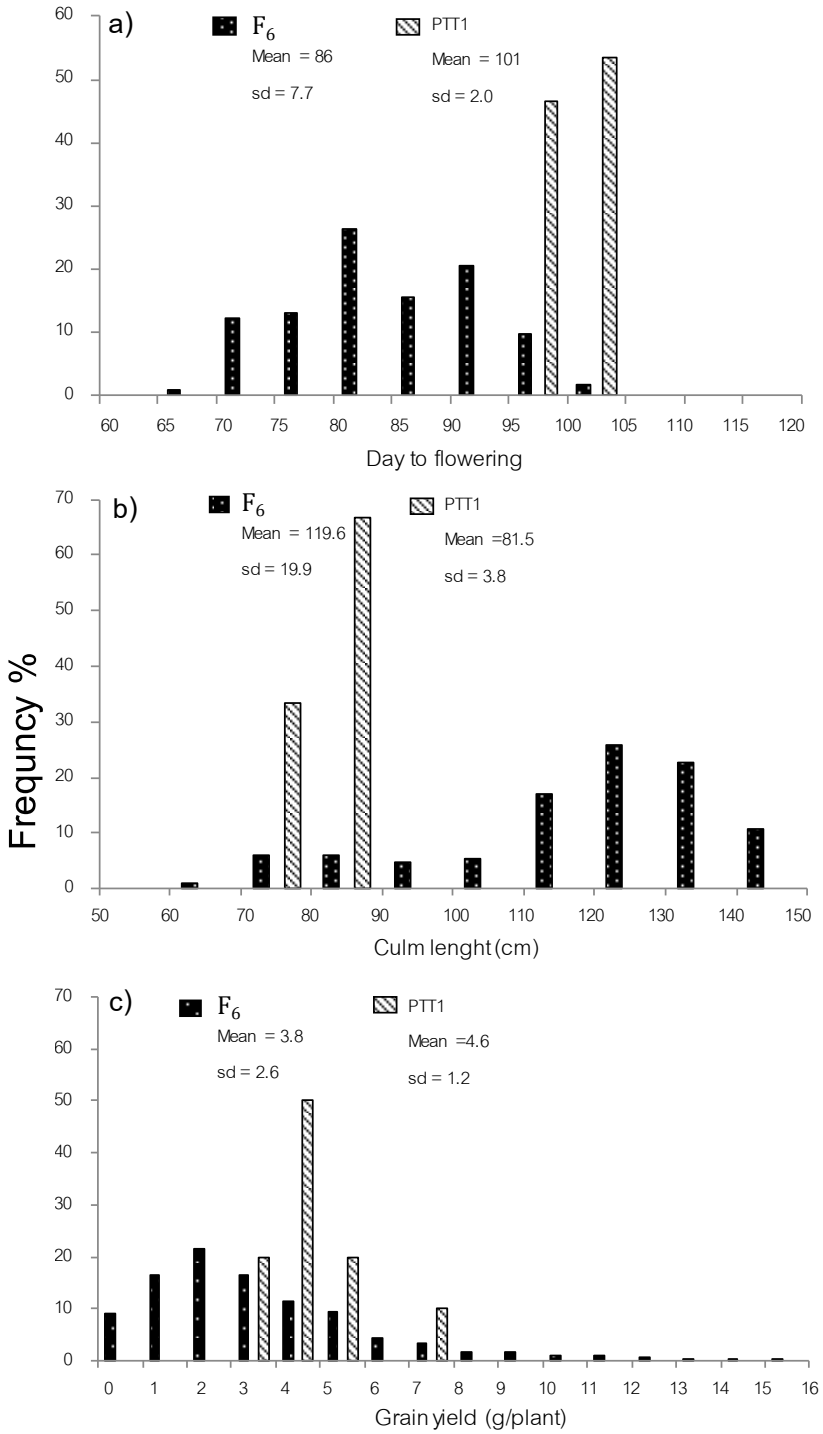

Figure 2. Frequency distribution (%) of parents and F_6 populations between purple glutinous Kum Doi Saket and white non-glutinous Pathum Thani 1 rice varieties
a) Day to flowering b) Culm length (cm) c) Grain yield (g/plant)

Table 4. Some grain characteristics of selected F_7 lines

Lines/ Varieties	Pericarp color	Endosperm type	Paddy rice (mm)			Brown rice (mm)			Anthocyanin (mg/100g)
			Grain length	Grain width	Lengh/Width ratio	Brown rice length	Brown rice width	Lengh/Width ratio	
1	purple	non-glutinous	9.9 bcd	2.9 bc	3.5 bcd	6.6 cd	2.0 bc	3.3 b	58.4 a
2	purple	non-glutinous	9.9 bcd	2.9 bc	3.5 bcd	6.8 c	2.1 b	3.3 b	35.2 def
3	purple	non-glutinous	9.9 bcd	3.0 bc	3.3 d	7.2 b	1.9 c	3.8 a	47.9 abc
4	purple	non-glutinous	9.8 Cd	2.9 bc	3.4 bcd	6.8 c	2.0 bc	3.4 b	37.4 cde
5	purple	non-glutinous	9.6 De	2.8 c	3.4 bcd	6.5 cd	1.9 c	3.4 b	44.2 bcd
6	purple	non-glutinous	9.7 Cd	2.8 bc	3.4 bcd	6.8 c	1.9 c	3.5 b	55.5 ab
7	purple	non-glutinous	9.7 cde	2.9 bc	3.4 bcd	6.7 c	2.0 bc	3.3 b	41.5 cde
8	purple	non-glutinous	9.7 Cd	2.7 c	3.6 bc	6.6 cd	1.9 c	3.4 b	35.5 def
9	purple	non-glutinous	9.4 E	2.8 c	3.4 cd	6.6 cd	1.9 c	3.4 b	55.0 ab
10	purple	non-glutinous	10.6 A	2.8 c	3.8 a	7.5 a	2.0 bc	3.8 a	31.4 ef
KDK (check)	purple	non-glutinous	10.0 Bc	3.7 a	2.7 e	6.4 d	2.4 a	2.7 c	25.1 f
PTT1 (check)	white	Glutinous	10.1 B	2.8 bc	3.6 ab	7.1 b	2.0 bc	3.5 b	not detected
	F-test		**	**	**	**	**	**	**
	LSD 0.05		0.3	0.2	0.2	0.3	0.1	0.3	11.4
	CV (%)		2.5	4.7	4.5	3.3	5.8	6.4	15.9

** are significantly difference at $P<0.05$, respectively. ns is non-significance difference

ส่วนขนาดของเมล็ด สายพันธุ์ที่ 3 และ 10 มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของทั้งข้าวเปลือกและข้าวกล้องมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวลูกผสมด้วยกัน โดยทั้งข้าวเปลือกและข้าวกล้อง มีอัตราส่วนเท่ากันคือ 3.8 มม. ซึ่งไม่แตกต่างจากพันธุ์ปทุมธานี 1 พันธุ์พ่อ (ตารางที่ 4)

วิจารณ์

งานทดลองนี้ได้แสดงผลการคัดเลือกข้าวลูกผสมเพื่อลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง ชนิดข้าวเจ้าเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและมีสารแอนโทไซยานินสูง จากผลการทดลองสามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์ก้าวหน้าชั่วที่ 7 ที่มีลักษณะตรงตามที่ต้องการ ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ สายพันธุ์เหล่านี้มีความคงตัวทางพันธุกรรมในลักษณะทางสัณฐาน โดยมีสีของแผ่นใบ กาบใบ หูใบ ปล้อง ยอดเกสรตัวเมีย ยอดดอก เปลือกเมล็ด และเยื่อหุ้มเมล็ด มีสีม่วงเหมือนพันธุ์แม่ก่ำดอยสะเก็ด มีปริมาณสารแอนโทไซยานินในแต่ละสายพันธุ์สูงกว่าข้าวก่ำดอยสะเก็ดพันธุ์แม่ ซึ่งจำเป็นจะต้องมีการทดสอบในชั่วต่อไปเพื่อยืนยันผลที่ได้ในครั้งนี้ การคัดเลือกเมล็ดสีดำเพื่อเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินนั้น ถึงแม้ว่า Rahman *et al*. (2013) พบว่าเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีม่วงดำทั้งเมล็ดมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีม่วงครึ่งเมล็ด สีน้ำตาล และสีขาวตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม พีรนันท์ (2557) พบว่าต้นที่มีเยื่อหุ้มสีม่วงเข้ม สามารถพบได้ทั้งในต้นที่ไม่มีแอนโทไซยานินเลย มีแอนโทไซยานินบ้างเล็กน้อยไปจนถึงมีค่าแอนโทไซยานินสูง สอดคล้องกับการศึกษาของเบญจวรรณ (2553) ที่ประเมินข้าวลูกผสมชั่วที่ 8 ระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับก่ำดอยสะเก็ดจำนวน 2 สายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกข้าวเจ้าก่ำ พบปริมาณแอนไซยานินอยู่ในช่วงขอบเขตที่กว้าง โดยข้าวเจ้าก่ำสายพันธุ์ที่ 107 อยู่ในช่วง 75.3-292.0 มิลลิกรัม/ 100 กรัม และสายพันธุ์ที่ 173 อยู่ในช่วง 38.2-170.5 มิลลิกรัม/ 100 กรัม และการศึกษา

ของบุรินทร์ (2556) ที่ปริมาณข้าวลูกผสมชั่วที่ 10 ขนิดข้าวเจ้าก่ำคู่ผสมเดียวกันนี้ มีปริมาณแอนโทไซยานินสะสมอยู่ในช่วง 2.81-8.65 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ดังนั้น ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวสีดำเพื่อปริมาณแอนโทไซยานินสูง นอกจากจะคัดเลือกโดยสายตาแล้วควรจะมีการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธีทางเคมีร่วมด้วยเพื่อยืนยันผลการคัดเลือก

นอกจากลักษณะต้นเตี้ย ทรงกอตั้ง ไม่ไวต่อช่วงแสงแล้ว ในสายพันธุ์ก้าวหน้าส่วนใหญ่มีลักษณะเมล็ดคล้ายกับพันธุ์ปทุมธานี 1 ทุกสายพันธุ์มีอัตราความยาวต่อความกว้างของข้าวเปลือกและข้าวกล้องมากกว่าพันธุ์แม่ก่ำดอยสะเก็ด พบ 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ที่ 3 และ 10 มีความยาวเมล็ดและอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของเมล็ดข้าวกล้องสูงกว่าหรือเท่ากับพันธุ์พ่อปทุมธานี 1 ทั้งสองสายพันธุ์นี้จะได้นำไปปลูกขยายและทดสอบพันธุ์ในฤดูปลูกต่อไป ในด้านอายุวันออกดอกสายพันธุ์ก้าวหน้าตอบสนองต่อการคัดเลือกโดยนอกจากจะไม่ไวต่อช่วงแสงและออกดอกในช่วงเดียวกันกับสายพันธุ์พ่อ จึงสามารถใช้เป็นทางเลือกสำหรับการปลูกข้าวสีชนิดข้าวเจ้าให้ได้ผลผลิตสูงปลูกได้มากกว่าหนึ่งครั้งต่อปี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

ดำเนิน กาละดี และศันสนีย์ จำจด. 2543. พันธุศาสตร์การปรับปรุงพันธุ์และโภชนศาสตร์เกษตรของข้าวเหนียวดำ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

บุรินทร์ พิชัยรัตน์. 2556. การประเมินอิทธิพลของปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างพันธุกรรมกับสภาพแวดล้อมต่อลักษณะทางพืชไร่ของข้าวเจ้าก่ำที่พัฒนาพันธุ์จากโครงการผสมพันธุ์ข้าวก่ำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

เบญจวรรณ พลโคต. 2553. การประเมินสายพันธุ์ก้าวหน้าในประชากรลูกผสมชั่วที่ 8 ระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดเพื่อคัดเลือกลักษณะข้าวเจ้าก่ำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

พีรนันท์ มาปัน. 2557. การควบคุมทางพันธุกรรมของปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวก่ำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สุภาภรณ์ ญะเมืองมอญ และชนากานต์ เทโบลต์ พรมอุทัย. 2559. ความแปรปรวนของปริมาณแอนโทไซยานินและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมืองของไทย. วารสารเกษตร 32(2): 191-199.

Blando, F., C. Gerardi and I. Nicoletti. 2004. Sour cherry (*Prunus cerasus* L.) anthocyanin as ingredients for functional foods. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2004(5): 253-258.

Chang, T.T. and E.A. Bardenas. 1965. The morphology and varietal characteristics of the rice plant. Technical Bulletin 4. International Rice Research Institute, Laguna. 40 p.

Chen, P.N. W.H. Kuo, C.L. Chiang, H.L. Chiou, Y.S. Hsieh and S.C. Chu. 2006. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. (Online). Available: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279706002134 (June 12, 2016).

Giusti, M.M and R.E. Wrolstad. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy.

Current Protocols in Food Analytical Chemistry F1.2.1-F1.2.13.

Hui, C., Y. Bin, Y. Xiaoping, Y. Long, C. Chunye, M. Mantian and L. Wenhua. 2010. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. Nutrition and Cancer 62: 1128-1136.

Jeng, T.L., C.S. Wang, T.H. Tseng, M.T. Wu and J.M Sung. 2009. Nucleotide polymorphisms in the waxy gene of NaN_3-induced waxy rice mutants. Journal of Cereal Science 49(1): 112-116.

Kimiko, I., H. Ozaki, K. Okada, H. Hori, Y. Takeda and T. Mitsui. 2003. Introdution of *Wx* transgene into *wx* mutants leads to both high- and low- amylose rice. Plant and Cell Physiology 44(5): 473-480.

Punyatong, M., P. Pongpiachan, P. Pongpiachan, D. Karladee and S. Mankhetkorn. 2008. Cytotoxicity of crude proanthocyanidin extract from purple glutinous rice bran (*Oryza sativa* L.) (Kum Doi Saket) compared with cyanidin 3-glucoside on X63 myeloma cancer cell lines. Kasetsart Journal: Natural Science 42(4): 676-681.

Rahman, M.M., K.E. Lee, E.S. Lee, M.N. Matin, D.S. Lee, J.S. Yun, J.B. Kim and S.G. Kang. 2013. The genetic constitutions of complementary genes *Pp* and *Pb* determine the purple color variation in pericarps with cyanidin-3-*O*-glucoside depositions in black rice. Journal of Plant Biology 56: 24-31.

Wrolstad, R.E. 2001. The possible health benefits of anthocyanin pigments and polyphenolics. (Online). Available: Http://lpi.oregonstate.edu/ss01/anthocyanin.html (June 12, 2016).

Xia, M., W.H. Ling, J. Ma, D.D. Kitts and J. Zawistowski. 2003. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E deficient mice. Journal of Nutrition 133: 744-751.

Xu, Z., N. Hua and J.S. Godber. 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and gamma-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 2077-2081.

Yamanaka, S., I. Nakamura, K.N. Watanabe and Y. Sato. 2004. Identification of SNPs in the waxy gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary significance during the domestication process of rice. Theoretical and Applied Genetics 108: 1200-1204.

Yanagisawa, T., C. Kiribuch-Otobe, H. Hirano, Y. Suzuki and M. Fujita. 2003. Detection of single nucleotide polymorphism (SNP) controlling the waxy character in wheat by using a derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) marker. Theoretical and Applied Genetics 107: 84-88.

ผลของการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อต่อสมรรถภาพการผลิต การย่อยได้ของโภชนะ ลักษณะเลือด ลักษณะซาก และคุณภาพเนื้อ

Effects of Betaine Anhydrous Supplementation in Drinking Water of Broiler on Performance, Digestibility, Blood Characteristics, Carcass Traits and Quality Meat

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี[1/*] ศักดา ประจักษ์บุญเจษฎา[2/] ทับทิมทิพย์ อินกอง[1/]
ชลธิชา ดวงดี[1/] และ วรางคณา กิจพิพิธ[1/]

Manatsanun Nopparatmaitree[1/*], Sakda Prajukboonjatsada[2/], Thabthimthip Inkong[1/],
Chonticha Duongdee[1/] and Warangkana Kitpipit[1/]

[1/]*คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี ต. สามพระยา อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี 76120*

[1/]*Faculty of Animal Science and Agricultural Technology, Silpakorn University, Phetchaburi IT Campus, Sam Phraya, Cha-am, Phetchaburi 76120, Thailand*

[2/]*ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เพชรบุรี ต. สามพระยา อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี 76120*

[2/]*Phetchaburi Animal Research and Development Center, Sam Phraya, Cha-am, Phetchaburi 76120, Thailand*

**Corresponding author: Email: Nopparatmaitree_m@su.ac.th or Nopparatmaitree_m@silpakorn.edu*

(Received: 24 June 2016; Accepted: 4 October 2016)

Abstract: The experiment was conduct to determine the effects of betaine anhydrous supplementation in drinking water of broiler chickens on productive performance, apparent nutrient digestibility, blood parameter, carcass trait, and quality and nutritive value in meat. Two hundred (Ross 308®) 1 day old of broiler chicks were randomly divided into 2 treatments (5 replications per treatment) with 20 chicks per experimental unit. Betaine anhydrous at 0 and 2 g/l has been added to drinking water. Diets and drinking water was offered ad libitum. The results of this study showed that betaine anhydrous supplementation at 2 g/l affect to feed conversion ratio (1.95 vs 1.73). Betaine increase to feed efficiency per day (0.51 vs 0.58) and index performance (256.60 vs 332.36) different to control group (P<0.05) but does not affect the others productive performance (P>0.05). Including not significantly affect the apparent nutrient digestibility and carcass percentage, cutting percentage and physical meat quality (P>0.05) when compared with the control. But supplementation betaine anhydrous as a lowering number of white blood cells (white blood count), the lymphocyte increase and H/L ratio, ether extract in meat, cholesterol in meat, saturated fatty acid in meat decreased statistically different (P<0.05). In conclusion, supplementation levels of betaine anhydrous at 2 g/l can increase feed conversion ratio, H/L ratio decrease, lower feed cost, increase earnings and increase economic return than control group.

Keywords: Betaine anhydrous, broiler, carcass, digestibility, meat quality, productive performance

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อต่อสมรรถภาพการผลิต การย่อยได้ของโภชนะ ลักษณะเลือด ลักษณะซาก คุณภาพและคุณค่าทางโภชนะในเนื้อ โดยใช้ไก่เนื้อพันธุ์ Ross 308® จำนวน 200 ตัว วางแผนการทดลองสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) จำนวน 2 กลุ่ม ๆ ละ 5 คอก ๆ ละ 20 ตัว ให้ได้รับน้ำดื่มสะอาด (ควบคุม) และเสริมบีเทนแอนไฮดรัสที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตร โดยไก่เนื้อได้รับน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ ผลการทดลองพบว่า การเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตร ช่วยปรับปรุงอัตราแลกเนื้อ (1.95 vs 1.73) เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารต่อวัน (0.51 vs 0.58) และ ดัชนีประสิทธิภาพการผลิต (256.60 vs 332.36) (P<0.05) แต่ไม่มีผลต่อสมรรถภาพการผลิตด้านอื่น การย่อยได้ของโภชนะ เปอร์เซ็นต์ซาก เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วน รวมถึงคุณภาพทางกายภาพของเนื้อไก่ (P>0.05) อย่างไรก็ตามการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อมีผลช่วยทำให้จำนวนของเม็ดเลือดขาว (white blood count) ค่าเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte เพิ่มขึ้น และอัตราส่วนเม็ดเลือดขาว heterophil ต่อ lymphocyte (H/L ratio) ลดลง (P<0.05) รวมถึงสามารถลดปริมาณไขมันรวม คอเลสเตอรอล กรดไขมันอิ่มตัวในเนื้อไก่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตรสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว ลดค่า H/L และลดต้นทุนค่าอาหาร เพิ่มผลกำไรต่อตัวและผลตอบแทนจากการลงทุนที่สูงกว่าไก่เนื้อกลุ่มควบคุม

คำสำคัญ: การย่อยได้ ไก่เนื้อ คุณภาพเนื้อ ซาก บีเทนแอนไฮดรัส สมรรถภาพการผลิต

คำนำ

ไก่เนื้อเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ ในปี พ.ศ. 2557 ปริมาณการส่งออกเนื้อไก่ของประเทศไทยเท่ากับ 570,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 77,700 ล้านบาท ซึ่งเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปี พ.ศ.2556 ที่มีปริมาณการส่งออกเท่ากับ 504,406 ตัน คิดเป็นมูลค่า 66,805 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557) โดยประเทศไทยจัดเป็นผู้ผลิตไก่เนื้อส่งออกรายใหญ่ของโลก หากแต่ประเทศไทยมีที่ตั้งในแถบเส้นสูตรศูนย์ที่มีสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ซึ่งเป็นข้อด้อยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญต่อการเลี้ยงไก่เนื้ออย่างมาก เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในระหว่างวันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีความเครียดเนื่องจากความร้อน (heat stress index: HSI) (มนัสนันท์ และวรางคณา, 2559) ซึ่งส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของไก่เนื้อ (Aengwanich and Chinrasri, 2002; Altan *et al*., 2000) โดยหากไก่เนื้ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีค่า HSI สูงจะส่งผลเสียต่อการเลี้ยงไก่เนื้ออย่างมาก เช่น อัตราการตายสูงโตช้า น้ำหนักลดประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง น้ำหนักตัว ปริมาณอาหารที่กิน กล้ามเนื้อหน้าอกลดลง (Deeb and Cahaner, 2001; Mashaly *et al*., 2004; Temim *et al*., 2000) และอัตราการตายเพิ่มขึ้น (Mahmoud *et al*., 2004) เป็นต้น ดังนั้นเพื่อให้ไก่เนื้อความสามารถในการทนต่อสภาพความร้อนอีกทั้งเพื่อลดปัญหาต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น จึงมีการนำเอาวิธีการต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต เช่น การใช้พัดลมระบายอากาศร่วมกับหลักการระเหยของน้ำเพื่อปรับสภาพอากาศในโรงเรือน รวมทั้งการใช้ สารเสริมเพื่อปรับสมดุลให้ร่างกายของไก่เนื้อ (ปราณี และคณะ, 2548) โดยบีเทนเป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ (Feed additive) ที่น่าสนใจ เนื่องจากความสามารถในการให้หมู่เมทธิลแก่โฮโมซิสเตอีนเพื่อเปลี่ยนไปเป็นเมทไธโอนีน (Cadogan *et al*., 1993) เพื่อช่วยปรับสมดุลออสโมซิสหรือช่วยปรับสมดุลของน้ำในร่างกายและรักษาสมดุลภายในเซลล์ ปัจจุบันมีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการนำบีเทนมาเสริมในอาหารสัตว์อย่างแพร่หลาย เพื่อช่วยลดสภาวะเครียดเนื่องจากความร้อน ปรับปรุงคุณภาพซาก และลดระดับไขมันในเนื้อสัตว์ นอกจากนี้ Amerah and Ravindran (2015) พบว่า การเสริมบีเทนในอาหารของไก่เนื้อช่วยพัฒนาการย่อยได้ของโภชนะในอาหาร ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่เนื้อ และ ช่วยลดผลกระทบจากเชื้อบิด *E. tenella* และ sporozoites ของ *E. acervulina*

(Augustine *et al*., 1997) หากแต่การใช้บีเทนมักพบปัญหาหลายประการเช่นกัน กล่าวคือ บีเทนมักเกิดการแข็งตัวได้ง่ายเมื่อสัมผัสอากาศ ทำให้เกิดความยุ่งยากในการนำใช้ในการผสมอาหาร อีกทั้งบีเทนยังจัดเป็น สารจำพวกวิตามินที่อาจเสียสภาพในกระบวนการอัดเม็ดด้วยความร้อนชื้นในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ และหากจะพัฒนาใช้บีเทนเคลือบสารกันความร้อน หรือ ประยุกต์ใช้บีเทนด้วยกระบวนการพ่นเคลือบผิวเม็ดอาหารหลังการอัดเม็ด (post pelleting liquid coating process) เพื่อป้องกันการเสียสภาพจากความร้อน ผู้ใช้ก็ต้องเพิ่มกระบวนการในการผลิตเข้าไปอีกหนึ่งขั้นตอน ซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มต้นทุนของอาหารที่สูงขึ้น จากปัญหาดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการศึกษาเพื่อแสวงหาวิธีการใช้อย่างง่าย โดยการผสมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มให้ไก่เนื้อกินโดยตรง เพื่อแก้ปัญหาการแข็งตัวของบีเทนการรักษาประสิทธิภาพไว้ และเพื่อความสะดวกต่อการนำไปใช้อีกด้วย

การทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อต่อสมรรถภาพการผลิต การย่อยได้ของโภชนะ ลักษณะเลือด ลักษณะซาก คุณภาพและคุณค่าทางโภชนะของเนื้อ เพื่อเป็นแนวทางเลือกอย่างง่ายในการเพิ่มผลผลิตและเกิดประโยชน์อันจะเป็นการพัฒนาขีดความสามารถ ของเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่เนื้อสู่การเสริมสร้างความเข้มแข็งและยั่งยืนของการปศุสัตว์ต่อไปในอนาคตสู่ความมั่นคงทางด้านอาหารของโลกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

แผนการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) โดยการทดลองครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 ทรีทเมนต์ ทรีทเมนต์ละ 5 ซ้ำ รวมทั้งหมด 10 หน่วยทดลอง ดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 น้ำสะอาด (กลุ่มควบคุม)

ทรีทเมนต์ที่ 2 น้ำสะอาดเสริมบีเทนแอนไฮดรัสชนิดผงละลายน้ำที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตร

สัตว์ทดลองและการการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

ทดลองในไก่เนื้อสายพันธุ์การค้า Ross 308® อายุ 1 วัน จำนวน 200 ตัว (ตัวผู้ 100 ตัว และ ตัวเมีย 100 ตัว) ถูกสุ่มเข้าสู่การทดลองจำนวน 20 ตัวต่อหน่วยทดลอง โดยทำวัคซีนควบคุมโรคตามวิธีที่อธิบายโดยมนัสนันท์ และคณะ (2557) โดยจัดการเลี้ยงไก่เนื้อในคอกขนาด 2.0 x 3.0 เมตร ภายในโรงเรือนแบบเปิดที่มีการจัดการแสงและอุณหภูมิ ตามสภาพแวดล้อมในระหว่างช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2558 โดยไก่เนื้อได้รับน้ำสะอาดและอาหารกินแบบเต็มที่ตลอดเวลา (*ad libitum*)

น้ำและอาหารทดลอง

การทดลองนี้ใช้ระยะเวลาเลี้ยงไก่เนื้อทั้งหมด 35 วัน และใช้อาหารไก่เนื้อเชิงการค้า 2 ระยะ คือ ระยะแรก 0-21 วัน (pre starter) มีโปรตีนหยาบ (crude protein) 23 เปอร์เซ็นต์ และพลังงานใช้ประโยชน์ได้ (metabolizable energy) 3,200 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม และระยะสอง 22-35 วัน (standard starters) มีโปรตีนหยาบ 20 เปอร์เซ็นต์ และพลังงานใช้ประโยชน์ได้ 3,200 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม ตามคำแนะนำของ NRC (1994)

สมรรถภาพการผลิตของไก่เนื้อ

ทำการเลี้ยงไก่เนื้อเพื่อวัดสมรรถภาพการผลิตโดยใช้เวลาทั้งหมด 35 วัน แบ่งเป็น 2 ช่วง คือ 0-21 วัน และ 22-35 วัน บันทึกปริมาณอาหารที่กินได้ น้ำหนักของไก่เนื้อ และจำนวนไก่ตายตลอดช่วงการทดลอง แล้วคำนวณหาค่าสมรรถภาพการผลิต 0-21 วัน 22-35 วัน และ 0-35 วัน ได้แก่ ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน (average daily feed intake: ADFI) น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย (average body weight gain: BWG) อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (average daily gain: ADG) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed conversion ratio: FCR (feed:gain)) หาจาก [ADFI/ADG] ต้นทุนการผลิตเนื้อไก่ 1 กิโลกรัม (feed cost per gain: FCG) หาจาก [FCR x ราคาอาหาร 1 กิโลกรัม] ตามวิธีของ Zhao *et al*. (2003) รวมถึงคำนวณหาอัตราการเลี้ยงรอด (viability) หาจาก

[(จำนวนไก่ที่เหลือ x 100)/จำนวนไก่เริ่มต้น] ตามวิธีของ Khaksefidi and Rahimi (2005) และดัชนีประสิทธิภาพการผลิต (productive index: PI)) หาจาก [(อัตราการเลี้ยงรอด x น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น x 100)/(FCR x จำนวนวันที่เลี้ยง)] ตามวิธีที่อธิบายโดย มนัสนันท์ และคณะ (2558) นอกจากนี้คำนวณหาผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ (economic benefit return) คือ ต้นทุนค่าอาหารต่อตัว (feed cost per gain) มูลค่าจากการขายต่อตัว (salable bird return) กำไรสุทธิต่อตัว (net profits return per bird) และอัตราส่วนผลตอบแทนต่อการลงทุน (return of investment) คือ feed cost per gain (FCG) จากสูตร FCG = (FCR x feed cost x BWG), salable bird return (SBR) จากสูตร SBR= (price of live chicken (40 THB) x BW), net profits return per bird (NPR) จากสูตร NPR = (SBR – FCG), และ return of investment (ROI) จากสูตร ROI= (NPR /FCG) x 100 ตามวิธีของมนัสนันท์ และคณะ (2558)

การย่อยได้รวมของโภชนะในอาหารไก่เนื้อ

ในช่วงไก่เนื้ออายุ 14-21 วัน จะได้รับอาหารทดลองผสมโครมิกซ์ออกไซด์ (Cr_2O_3) 0.3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดสอบการย่อยได้ของโภชนะในอาหารไก่เนื้อ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วง โดยช่วงที่ 1 คือ ไก่เนื้ออายุ 14-18 วัน เป็นช่วงปรับสัตว์ (adjustment period) และ ช่วงที่ 2 คือ ไก่เนื้ออายุ 19-21 วัน เป็นช่วงเก็บตัวอย่าง (sampling period) โดยสุ่มเก็บอาหารของไก่เนื้อทดลองในถุงกันความชื้นและสุ่มเก็บมูลของไก่เนื้อที่ได้รับอาหารทดลองผสมโครมิกซ์ออกไซด์ (Cr_2O_3) 0.3 เปอร์เซ็นต์ ลงในถุงที่มี H_2SO_4 ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีของ Mountzouris *et al*. (2010) จากนั้นนำตัวอย่างอาหารและมูลที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและบดละเอียด แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าวัตถุแห้งโปรตีนหยาบ เยื่อใยรวม ไขมันรวม เถ้า และพลังงาน ตามวิธีของ AOAC (1995) อีกทั้งยังวิเคราะห์หาปริมาณโครมิกซ์ออกไซด์ (Cr_2O_3) ตามวิธีของ AOAC (1995) จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้งรวม (apparent dry matter digestibility) หาจาก [{(% Cr_2O_3ในมูล - % Cr_2O_3 ในอาหาร) x 100}/{% Cr_2O_3 ในมูล}] และ ค่าการย่อยได้ของโภชนะรวม (apparent nutrient digestibility) หาจาก 100-[100x{(% Cr_2O_3 ในอาหาร/% Cr_2O_3 ในมูล) x (% โภชนะในมูล/% โภชนะในอาหาร)}] ตามวิธีของ Sharifi *et al*. (2012)

โลหิตวิทยาของไก่ไข่และองค์ประกอบของกรดไขมันในเลือด

ในวันสุดท้ายการทดลองทำการอดอาหารไก่ไข่ประมาณ 12 ชั่วโมงแล้วสุ่มไก่หน่วยทดลองละ 4 ตัว เพื่อเก็บตัวอย่างเลือดโดยเจาะเลือดไก่บริเวณปีก (wing vein) ตัวละ 2 มิลลิลิตร ตามวิธีของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (2556) เพื่อนำมาวัดความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit, Hct) ค่าเม็ดเลือดแดง (red blood cell; RBC) ค่าเม็ด เลือดขาว (white blood cell; WBC) เม็ดเลือดขาว ชนิดเฮทเทอโรฟิล (heterophil, H) และลิมโฟไซต์ (lymphocyte, L) เพื่อนำไปหาสัดส่วน H/L atio นำซีรั่มไปวิเคราะห์ ค่าคอเลสเตอรอล (cholesterol) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) โดยวิธี enzymatic colorimetric test (CHOD-PAP method)

เปอร์เซ็นต์ซากและคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อ

ในวันสุดท้ายของการทดลองอดอาหารอย่างน้อย 6 ชั่วโมง แล้วสุ่มไก่เนื้อ 4 ตัวต่อหน่วยทดลอง (ตัวผู้และตัวเมีย) เพื่อฆ่าชำแหละและตัดแต่งชิ้นส่วน จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักซากและน้ำหนักชิ้นส่วน แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ซาก [(carcass percentage = {(carcass weight/ live weight)x100}] เปอร์เซ็นต์ซากเย็น [(chill carcass percentage = {(chill carcass weight/ live weight)x100}] และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตัดแต่ง [(cutting percentage = {(cutting weight/ carcass weight x100}] ตามวิธีของสัญชัย (2553); Hossain *et al*. (2012) จากนั้นรวบรวมเนื้ออกไก่เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอลด้วยวิธี C45,994.10 ตามวิธีของ AOAC (1995) และการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (individual fatty acid content) ด้วย GLC ตามวิธีของ Lepage and Roy (1986) นอกจากนั้นทำการวัดค่าความสามารถใน

การอุ้มน้ำ (water holding capacity) ประกอบด้วย dip loss, boiling loss, trawling loss และ roasting loss ตามวิธีของสัญชัย (2553); Ao *et al*. (2011); Liu *et al*. (2012) อีกทั้งวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเนื้ออกที่ 45 นาที (pH 45 min) และที่ 24 ชั่วโมง (pH 2 4h) หลังฆ่าชำแหละด้วย pH meter รุ่น pH 211, Hanna, Padua, Italy ตามวิธีของ Zhou *et al*. (2010) รวมทั้งวัดค่าสีของเนื้ออกหลังเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง ได้แก่ ความสว่าง (lightness: L*), สีแดง (redness: a*) และสีเหลือง (yellowness: b*) ตามวิธีของสัญชัย (2553) และ Ao *et al*. (2011) นอกจากนี้นำตัวอย่างเนื้ออกที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งและทำการบดให้ละเอียด จากนั้นวิเคราะห์หาค่าวัตถุแห้ง เถ้า โปรตีนหยาบ และไขมันรวมตามวิธีของ AOAC (1995)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนท์ที่อิสระต่อกัน ด้วยวิธี Student's t-test ตามวิธีของ Steel and Torrie (1992) โดยใช้โปรแกรม R (R Core Team, 2013) กำหนดค่านัยสำคัญที่ใช้ในการทดสอบที่ $P<0.05$

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อต่อประสิทธิการย่อยได้ของโภชนะ

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยได้ของโภชนะในไก่เนื้อที่ได้รับการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่ม พบว่าไก่เนื้อที่ได้รับการเสริมเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อค่าการย่อยได้ของโภชนะทั้ง สิ่งแห้ง อินทรียวัตถุ เยื่อใยรวม ไขมันรวม และโปรตีนหยาบของไก่เนื้อ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1

โดยปกติเมื่อสัตว์เกิดความเครียดจากสภาพอากาศหรือโรคส่งผลทำให้ความเข้มข้นของน้ำในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเกิดแรงดันออสโมติคและส่งผลให้เซลล์สูญเสียน้ำ ดังนั้นไก่จำเป็นต้องใช้พลังงานจำนวนมากมารักษาสมดุลของน้ำในเซลล์และอุณหภูมิของร่างกาย ดังนั้นกระบวนการเมแทบอลิซึมจะถูกขัดขวาง เพราะไก่จะใช้พลังงานส่วนที่ใช้สำหรับสร้างผลผลิตมาเพื่อการบำรุงรักษาแทน อีกทั้งสัตว์จะอยู่ในสภาวะขาดน้ำ (dehydrate) เพราะน้ำถูกขับออกจากร่างกายมากขึ้น สัตว์ต้องดื่มน้ำมากขึ้นตามเซลล์ร่างกายจะเสียสภาพอย่างรวดเร็ว ไก่จะสูญเสียผลผลิตอย่างรวดเร็วตาม เพราะต้องใช้พลังงานมาเพื่อรักษาการเสื่อมสภาพของเซลล์ หากอุณหภูมิแวดล้อมสูงขึ้นมาก จะสามารถทำให้ไก่ช็อคตายได้ (heat shock) ในทางกลับกันบีเทนเป็นสารประกอบของหมู่เมทิลร่วมกับกรดอะมิโนไกลซีนที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของโคลีน (choline) ซึ่งเป็นตัวกลางให้หมู่เมทิล (methyl donor) ในกระบวนการเมแทบอลิซึม จึงมีความจำเป็นในปฏิกิริยาชีวเคมีของเมไทโอนีน (methionine) และโฮโมซีสทีน (homocysteine) ทำให้ช่วยลดระดับโฮโมซีสทีนในพลาสมา และช่วยการทำงานของตับที่เกี่ยวข้องกับไขมันให้ดีขึ้น อีกทั้งยังช่วยรักษาความสมดุลภายในเซลล์ (osmoprotectant) ดังนั้นกระบวนการเมทาบอลิซมจะไม่ถูกขัดขวาง ส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยได้ของโภชนะ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ratriyanto *et al*. (2009) พบว่าการเสริมบีเทนในอาหารไก่เนื้อต่อการย่อยได้ของโภชนะมีผลทำให้การย่อยได้ของวัตถุแห้ง และโปรตีน และเยื่อใยหยาบเพิ่มขึ้น และสอดคล้องกับการศึกษาของ Ezzat *et al*. (2011) ที่พบว่าการเสริมบีเทนในอาหารไก่เนื้อทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของ โปรตีน และไขมัน เพิ่มขึ้น อีกทั้ง El-Husseiny *et al*. (2007) ยังพบว่าการเสริมบีเทนในอาหารทำให้มีค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของ อินทรียวัตถุ โปรตีนรวม ไขมันรวม เยื่อใยหยาบ เพิ่มขึ้นแตกต่างกัน คุณสมบัติออสโมติกของบีเทนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบของเซลล์ภายในลำไส้ และเพิ่มการทำงานของเซลล์ จึงทำให้มีอิทธิพลต่อการย่อยสารอาหารได้ดีขึ้น (Xu *et al*., 2000) Amerah and Ravindran (2015) พบว่าการเสริมบีเทนที่ระดับ 960 กรัมต่อตัน สามารถเพิ่มการย่อยได้ของสิ่งแห้ง โปรตีนหยาบ ไขมันรวม และกรดอะมิโนของไก่ที่ติดเชื้อบิดมากกว่าอาหารควบคุม

Table 1. Effect of betaine anhydrous supplementation in drinking water on nutrient digestibility

Nutrient digestibility	Betaine anhydrous levels supplementation in drinking water		*Pr*>T
	Control (0 g/l)	2.0 g/l	
Dry matter (%)	85.55 ± 6.40	82.78 ± 3.32	0.5427
Organic matter (%)	87.78 ± 6.03	84.12 ± 3.23	0.4070
Crude fiber (%)	50.46 ± 21.09	58.81 ± 4.64	0.5398
Ether extract (%)	92.30 ± 0.90	92.71 ± 1.64	0.7240
Crude protein (%)	80.59 ± 3.35	85.41 ± 2.86	0.1116

2. ผลการการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อต่อสมรรถภาพการผลิต

การเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อในช่วง 0-21 วัน พบว่า ไก่เนื้อที่ได้รับนำดื่มที่เสริมบีเทนแอนไฮดรัสที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตร มีสมรรถภาพการผลิตไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 2 ในช่วง 21-35 วัน พบว่าไก่เนื้อที่ได้รับน้ำดื่มเสริมบีเทนแอนไฮดรัสมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อตัวต่อวัน และดัชนีประสิทธิภาพการผลิตสูงกว่าไก่เนื้อกลุ่มควบคุม (P<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 3

ส่วนผลการเลี้ยงไก่เนื้อ 0-35 วัน พบว่า ไก่เนื้อที่ได้รับน้ำดื่มเสริมบีเทนแอนไฮดรัส มีอัตราแลกเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้อาหารต่อวัน และดัชนีประสิทธิภาพการผลิตสูงกว่าไก่เนื้อกลุ่มควบคุม (P<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4 เนื่องจากไก่เนื้อที่ได้รับการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสมีค่า H/L ratio ที่ต่ำกว่าไก่เนื้อกลุ่มควบคุม ซึ่งค่า H/L ratio เป็นดัชนีชี้วัดความเครียดภายในตัวของไก่เนื้อ โดยที่ค่าของ H/L ratio ที่ต่ำจะบ่งบอกถึงการที่ไก่เนื้อไม่ได้อยู่ในสภาวะเครียด โดยปกติค่า H/L ratio มีค่าสูงขึ้นตามระดับของความเครียดที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย

การพัฒนาสมรรถนะการผลิตที่ดีขึ้นที่พบในการทดลองครั้งนี้สามารถอธิบายได้จากหลายสมมุติฐาน กล่าวคือ Ratriyanto *et al*. (2009) รายงานว่าบีเทนเป็นสารประกอบของหมู่เมธิลร่วมกับกรดอะมิโนไกลซีนที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของโคลีน (choline) ซึ่งเป็นตัวกลางให้หมู่เมทิล (methyl donor) ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ส่งผลทำให้ไก่เนื้อที่ได้รับการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสมีประสิทธิภาพการย่อยได้ของโภชนะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลทำให้สมรรถภาพการผลิตมีค่าอัตราการแลกเนื้อต่ำ และประสิทธิภาพการใช้อาหารต่อวันเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งแปรผันตรงกับดัชนีประสิทธิภาพการผลิต โดยบีเทนสามารถชดเชย เมไทโอนีน (methionine) เมื่อมีภาวะขาดแคลนเมไทโอนีนในอาหารซึ่งส่งผลต่อสมรรถนะการผลิตของไก่เนื้อได้ (Sun *et al*., 2008) นอกจากนี้อาจเนื่องจากบีเทนสามารถช่วยส่งเสริมให้เยื่อบุลำไส้มีความแข็งแรงเนื่องจากได้รับหมู่เมธิลเพิ่มขึ้น Amerah and Ravindran (2015) พบว่า ในภาวะที่เกิดโรคบิดไก่เนื้อมีความต้องการหมู่เมทิลเพิ่มขึ้น เนื่องจากเยื่อบุลำไส้ของไก่เนื้อถูกทำลายมีความต้องการหมู่เมธิลสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ติดเชื้อบิด (Chiang *et al*., 1996), Klasing *et al*., (2002) พบว่า การ chemotaxis ที่เพิ่มขึ้นของ monocytes และปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์ของแมกโคฟาก์ส (macrophages) อธิบายถึงพยาธิสภาพของลำไส้ที่ดีขึ้น และเมื่อมีการเสริมบีเทนในอาหารของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อบิด โดยผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Attia *et al*. (2009) พบว่าการเสริมบีเทนในอาหารไก่เนื้อปรับปรุงอัตราแลกเนื้อ (P<0.05) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Waldenstedt *et al*. (1999) พบว่าการเสริมบีเทนในอาหารไก่เนื้อที่ระดับ 1 กรัมต่อกิโลกรัมทำให้อัตราการเปลี่ยนอาหารดีขึ้น 12.6 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05) ในขณะเดียวเดียวกันบีเทนยังส่งผลให้อัตราการตายมีแนวโน้มลดลง ซึ่ง ปราณี และคณะ (2548) ที่เสริมบีเทนที่ระดับ 0, 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ลดอัตราการตายของไก่ลงได้ 8.57, 7.38 และ 6.91 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และงานวิจัยของ Waldenstedt *et al*. (1999) ที่เสริมบีเทนมีผลทำให้ลดอัตราการตายลงโดยกลุ่มที่เสริม 1 กรัมต่อกิโลกรัมพบว่าไก่เนื้อทีอัตราการตายต่ำที่สุด Amerah and Ravindran (2015) พบว่าการเสริม

Table 2. Effect of betaine anhydrous supplementation in drinking water on productive performance (0-21 day)

Productive performance	Betaine anhydrous levels supplementation in drinking water		*Pr*>T
	Control (0 g/l)	2.0 g/l	
Average weight (g/bird)	906.40 ±67.80	858.86 ± 29.40	0.3276
Body weight gain (g/bird)	867.21 ± 66.63	819.66 ± 30.35	0.3237
Total feed intake (g/bird)	1,295.20 ± 82.73	1,196.80 ± 27.12	0.1221
Average daily gain (g/bird/day)	41.30 ± 3.18	39.03 ± 1.45	0.3241
Feed intake (g/bird/day)	61.68 ± 3.94	56.99 ± 1.29	0.1222
Feed conversion ratio (FCR)	1.49 ± 0.03	1.46 ± 0.04	0.2594
Performance efficiency ratio (PER)	0.67 ± 0.01	0.68 ± 0.02	0.2746
Viability (%)	98.33 ± 2.89	98.33 ± 2.89	1.0000
Mortality (%)	8.84 ± 2.89	8.84 ± 2.89	1.0000
Productive index	271.47 ± 16.82	263.14± 20.97	0.6196

Table 3. Effect of betaine anhydrous supplementation in drinking water on productive performance (22-35)

Productive performance	Betaine anhydrous supplementation levels in drinking water		*Pr*>T
	Control (0 g/l)	2.0 g/l	
Average weight (g/bird)	2,085.60 ± 74.50	2,136.20 ± 26.82	0.3306
Body weight gain (g/bird)	1,086.60 ± 87.35	1,258.50 ± 41.98	0.0372
Total feed intake (g/bird)	2,516.10 ± 191.23	2,387.90 ± 88.36	0.3515
Average daily gain (g/bird/day)	77.61 ± 6.24	89.89 ± 2.99	0.0372
Feed intake (g/bird/day)	179.20 ± 13.66	170.56 ± 6.31	0.3515
Feed conversion ratio (FCR)	2.33 ± 0.28	1.90 ± 0.11	0.0691
Performance efficiency ratio (PER)	0.44 ± 0.05	0.60 ± 0.03	0.0530
Viability (%)	91.23 ± 8.04	98.25 ± 3.04	0.2301
Mortality (%)	8.77 ± 8.04	1.75 ± 3.04	0.2301
Productive index	204.43 ± 31.87	311.46 ± 34.80	0.0171

บีเทนที่ระดับ 960 กรัมต่อตัน สามารถเพิ่มปริมาณการกินได้และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารที่เพิ่มขึ้นกว่าอาหารควบคุม

3. ผลการการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อต่อโลหิตวิทยา

การเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตร ทำให้จำนวนของเม็ดเลือดขาว (white blood count) ค่าเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte เพิ่มขึ้น (P<0.05) และอัตราส่วนเม็ดเลือดขาวชนิด heterophil ต่อ lymphocyte (H/L ratio) ลดลงแตกต่างกันในทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยการทดลองครั้งนี้ทำการเลี้ยงไก่เนื้อในโรงเรือนเปิดภายใต้สภาพแวดล้อมธรรมชาติ ซึ่งส่งผลต่อความเครียดอันเนื่องมาจากความร้อนได้มากกว่าไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้โรงเรือนแบบปิด (tunnel ventilation and

Table 4. Effect of betaine anhydrous supplementation in drinking water on productive performance (0-35)

Productive performance	Betaine anhydrous supplementation levels in drinking water		*Pr*>T
	Control (0 g/l)	2.0 g/l	
Average weight (g/bird)	2,085.60 ± 74.50	2,136.20 ± 26.82	0.3306
Body weight gain (g/bird)	1,953.80 ± 80.80	2,078.20 ± 25.45	0.0638
Total feed intake (g/bird)	3,811.20 ± 267.88	3,584.80 ± 115.44	0.2499
Average daily gain (g/bird/day)	55.82 ± 2.31	49.38 ± 0.73	0.0641
Feed intake (g/bird/day)	108.89 ± 7.65	102.42 ± 3.30	0.2497
Feed conversion ratio (FCR)	1.95 ± 0.12	1.73 ± 0.05	0.0425
Performance efficiency ratio (PER)	0.51 ± 0.03	0.58 ± 0.02	0.0238
Viability (%)	89.47 ± 5.27	96.49 ± 3.04	0.1161
Mortality (%)	10.50 ± 5.27	3.51 ± 3.04	0.1161
Productive index	256.60 ± 23.76	332.36 ± 15.64	0.0099

Table 5. Effect of betaine anhydrous supplementation in drinking water on blood parameter

Blood parameter	Betaine anhydrous supplementation levels in drinking water		*Pr*>T
	Control (0 g/l)	2.0 g/l	
Hematocrit (%)	22.67 ± 11.02	35.00 ± 3.61	0.1391
Hemoglobin	13.00 ± 1.00	13.03 ± 1.29	0.9735
RBC ($x10^6/mm^3$)	1.67 ± 0.58	2.50 ± 0.25	0.0829
WBC ($x10^6/mm^3$)	15,933.00 ± 4,781.60	38,333.00 ± 10,151.00	0.0259
Heterophil (%)	35.33 ± 7.57	22.00 ± 4.00	0.0543
Lymphocyte (%)	54.67 ± 6.11	73.00 ± 6.56	0.0240
H/L Ratio	0.66 ± 0.22	0.31 ± 0.08	0.0499
Cholesterol (mg/dl)	178.67 ± 11.85	180.33 ± 12.06	0.8727
HDL (mg/dL)	119.00 ± 15.62	131.00 ± 14.18	0.3803
LDL (mg/dL)	47.67 ± 12.89	36.00 ± 12.17	0.3180
Triglyceride (mg/dl)	60.33 ± 6.66	66.00 ± 7.55	0.3848

evaporative cooling systems house) เมื่อสัตว์เครียดฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์จะถูกกระตุ้นให้หลั่งเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งส่งผลทำให้เม็ดเลือดขาวชนิด เฮทเทอโรฟิล เจริญเต็มที่และถูกปลดปล่อยมาจากไขกระดูก (bone marrow) แล้วเข้าสู่กระแสเลือดมากขึ้น ในขณะที่เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์มีปริมาณลง เนื่องจากถูกเคลื่อนย้ายกลับไปยังไขกระดูกและเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (วิโรจน์, 2538) สอดคล้องกับรายงานของ Altan *et al*. (2000) กล่าวว่าสัตว์ที่อยู่ในสภาวะเครียดจะมีการหลั่งฮอร์โมนหลายชนิด เช่น คอร์ติซอล (cortisol) ซึ่งมีผลกดภูมิคุ้มกันโรคของร่างกาย ทำให้ค่า H/L ratio เพิ่มสูงขึ้น เมื่อร่างกายสัตว์ได้รับสิ่งเร้า จากสภาพแวดล้อมทั้งภายใน และภายนอกที่ไม่เหมาะสม เช่น การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ช่วงแสง อายุ และน้ำหนักตัว ล้วนส่งผลต่อความเครียดที่เกิดขึ้นในตัวไก่ ทำให้จำนวนเฮทเทอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น และจำนวนลิมโฟไซต์ลดลงโดยปกติ H/L ratio จะมีค่าสูงขึ้นตามระดับของ

ความเครียดที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่าบีเทนจะเข้าไปช่วยรักษาสมดุลน้ำภายในเซลล์ เนื่องจากบีเทนเป็นสารประกอบของหมู่เมทิลร่วมกับกรดอะมิโนไกลซีนที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของโคลีน (choline) ซึ่งเป็นตัวกลางให้หมู่เมธิลในกระบวนการเมแทบอลิซึมเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นผู้ให้หมู่เมทิล (methyl donor) จึงมีความจำเป็นในปฏิกิริยาชีวเคมีของเมไทโอนีน (methionine) และโฮโมซีสทีน (homocysteine) ทำให้ช่วยลดระดับโฮโมซีสทีนในพลาสมา และช่วยการทำงานของตับที่เกี่ยวข้องกับไขมันให้ดีขึ้นอีกทั้งยังช่วยรักษาความสมดุลภายในเซลล์ (osmoprotectant) ส่งผลต่อค่าของเม็ดเลือดขาวชนิดเฮทเทอโรฟิลลดลงลิมโฟไซต์เพิ่ม และแปรผันตรงต่อค่า H/L ratio ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ratriyanto *et al*. (2009) พบว่าการเสริมบีเทนในอาหารไก่เนื้อต่อลักษณะเลือดมีผลทำให้ H/L ratio แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ส่วน triglyceride ไม่แตกต่างกัน (P>0.05) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Awad *et al*. (2014) ที่ศึกษาการเสริมบีเทน ในอาหารเป็ดที่ระดับ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อกิโลกรัม พบว่าจำนวนลิมโฟไซต์เพิ่มขึ้น และจำนวนเฮทเทอโรฟิลลดลง มีผลทำให้ H/L Ratio ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม Sayed and Downing (2011) พบว่าการเสริมบีเทนที่ระดับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรช่วยช่วยลด H/L ratio และระดับกลูโคสในเลือดของไก่เนื้อ

4. ผลการการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อต่อคุณภาพซากและคุณภาพเนื้อ

การเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตรไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ซาก และเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนของไก่เนื้อ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 6 ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ กันยา และคณะ (2555) ที่พบว่าการเสริมบีเทนในอาหารไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ซาก อก สันใน น่อง และสะโพก ของไก่เนื้อ (P>0.05) ซึ่งขัดแย้งกับ Zhan and Ku (1999) ที่พบว่า การเสริมบีเทน 0.10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปริมาณกล้ามเนื้อหน้าอกเพิ่ม ซึ่ง McDevitt *et al*. (1999) อธิบายว่าการเสริมบีเทนสามารถเพิ่มเนื้ออกของไก่ได้เมื่อมีระดับเมทไทโอนีนในอาหารเพียงพอ สอดคล้องกับ ปราณีและคณะ (2548) พบว่าการเสริมบีเทนระดับ 0.10 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ปริมาณเนื้อ หน้าอก หนัง สันใน เพิ่มขึ้น (P<0.05) ในขณะที่คุณลักษณะอื่นของคุณภาพซากและคุณภาพเนื้อไม่แตกต่างกัน (P>0.05) จากการศึกษาถึงผลกระทบในทางบวกของการเสริมบีเทน (Alirezaei *et al*., 2012) และผลกระทบด้านลบในภาวการณ์ขาดเมทไทโอนีนต่อคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อ (Liu *et al*., 2010) โดย Fu *et al*. (2016) อธิบายถึงการเสริมบีเทนสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase มีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidant ในเนื้ออกในสภาพที่ขาดเมทไธโอนีนในการช่วยลดความเสื่อมของเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่าการเสริมบีเทนไม่มีผลต่อคุณภาพเนื้อ

Saunderson and Mackinlay (1990) กล่าวว่า บีเทนเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการให้หมู่เมทิลในปฏิกิริยาสังเคราะห์คาร์นิทีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวนำพากรดไขมันเข้าสู่ไมโตคอนเดรียเพื่อย่อยสลายไขมันให้ได้พลังงานเพื่อใช้ในร่างกาย ดังนั้นการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อคุณภาพเนื้อ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าคะแนนสี และค่าการสูญเสียน้ำของเนื้อไก่ (P>0.05) แต่ทำให้ค่าไขมันรวมและเถ้าลดลง (P<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 7 ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับ กันยา และคณะ (2555) ที่ระบุว่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำเนื่องจากการแช่เย็น (dip loss) ของเนื้ออกไม่แตกต่างกัน (P>0.05) และมีค่า yellowness ของเนื้ออกกลุ่มควบคุมน้อยที่สุด (P<0.05) ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น Chu *et al*. (1987) กล่าวว่าค่าความเข้มสีเหลืองในเนื้ออกส่วนใหญ่เกิดจากสีของกล้ามเนื้อชนิด white fiber ดังนั้นปริมาณไขมันในอกที่ลดลงทำให้มีสัดส่วนของกล้ามเนื้อเพิ่มมากขึ้นจากผลการศึกษาพบว่าไก่เนื้อที่ได้รับน้ำดื่มเสริมบีเทนแอนไฮดรัสมีการสะสมของไขมันลดลง Wang *et al*. (2004) และ Garcia and Stefan (2000) ได้อธิบายว่าบีเทนสามารถให้เมทธิลแก่ dimethyletathanolamine เปลี่ยนแปลงเป็น trimethylethanolamine สำหรับการสังเคราะห์เลซิติน โดยเลซิตินมีหน้าที่ช่วยในการขนส่งของไขมันผ่านร่างกาย แต่ในสภาวะที่อาหารขาดเมไทโอนีน สำหรับ

Table 6. Effect of betaine anhydrous supplementation in drinking water on carcass and cutting percentage

Carcass and cutting percentage	Betaine anhydrous supplementation levels in drinking water		*Pr*>T
	Control (0 g/l)	2.0 g/l	
Thai carcass percentage (%)	84.02 ± 1.12	83.81 ± 3.59	0.9265
Carcass percentage (%)	75.94 ± 1.03	81.90 ± 2.53	0.8446
Chill carcass percentage (%)	74.42 ± 1.00	74.10 ± 2.47	0.8443
Shank (%)	3.35 ± 0.18	3.42 ± 0.12	0.6411
Boneless breast (%)	29.85 ± 1.06	29.32 ± 1.77	0.6786
Pectoralis major (%)	25.20 ± 0.88	24.81 ± 1.35	0.6970
Pectoralis minor (%)	4.65 ± 0.26	4.51 ± 0.45	0.6647
Wing stick (%)	6.59 ± 0.38	6.83 ± 0.55	0.5691
Tulip (%)	4.29 ± 0.10	3.60 ± 0.78	0.2635
Thigh (%)	16.81 ± 0.91	17.25 ± 2.34	0.7765
Drumstick (%)	11.01 ± 0.24	11.01 ± 0.65	1.0000
Skeletal bone (%)	18.91 ± 2.38	18.24 ± 1.44	0.6953

Table 7. Effect of betaine anhydrous supplementation in drinking water on meat quality

Meat quality	Betaine anhydrous supplementation levels in drinking water		*Pr*>T
	Control (0 g/l)	2.0 g/l	
pH1	6.08 ± 0.28	6.02 ± 0.17	0.367
pH24	5.86 ± 0.31	5.88 ± 0.42	0.482
Color at 24 hour after chill storage at 4 ºC			
L* (Lightness)	55.87 ± 1.70	54.51 ± 1.22	0.3251
A* (Redness)	0.16 ± 0.66	0.81 ± 0.86	0.3530
B* (Yellowness)	9.76 ± 1.77	9.11 ± 1.34	0.6352
Water holding capacity			
Cooking loss (%)	21.75 ± 3.12	21.99 ± 2.25	0.9187
Trawling loss (%)	10.01 ± 1.46	8.68 ± 1.19	0.2876
Roasting loss (%)	21.06 ± 1.94	20.55 ± 1.74	0.7515
Dip loss (%)	4.55 ± 0.74	4.34 ± 1.21	0.8066
Nutrient composition in meat			
Dry matter	26.52 ± 2.01	26.11 ± 2.31	0.427
Moisture	73.48 ± 4.65	73.89 ± 3.98	0.366
Crude protein	23.72 ± 0.14	23.99 ± 0.09	0.055
Ether extract	2.07 ± 0.03	1.18 ± 0.02	0.026
Ash	1.46 ± 0.05	1.35 ± 0.04	0.043

การสังเคราะห์โปรตีน บีเทนสามารถให้หมู่เมธิลที่ในการสังเคราะห์คาร์นิทีนเพื่อใช้ในวิถีเบต้าออกซิเดชันของกรดไขมันสายโซ่ยาว (Saunderson and Mackinlay, 1990) โดยบีเทนสามารถทำหน้าที่แทนโดยสามารถให้หมู่เมทิลในปฏิกิริยาการกระตุ้นการทำงานของหลายเอนไซม์ ซึ่งมีความจำเป็นในการสังเคราะห์โปรตีน และการเผาผลาญพลังงาน (energy metabolism) การสังเคราะห์เมไทโอนีนจากโฮโมซีสทีน การสังเคราะห์คาร์นิทีน (carnitine) ครีเอทีน (creatine) และ ฟอสฟาติดิลโคลีน (phosphatidylcholine) โดยบีเทน ทำหน้าที่ให้หมู่เมทิลทำให้โฮโมซีสทีนเปลี่ยนเป็นเมไทโอนีน และเอส-อะดีโนซิลเมไทโอนีน ซึ่งเป็นหมู่เมธิลที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ คาร์นิทีน (carnitine) (Cadogan *et al*., 1993) โดยคาร์นิทีนจะทำการลำเลียงขนส่งกรดไขมันสายยาว (long chain fatty acids) จาก cytosol เข้าไปเผาผลาญใน mitochondrial matrix เพื่อเปลี่ยนให้เป็นพลังงาน โดยกระบวนการสลายกรดไขมันที่เรียกว่า เบต้า-ออกซิเดชัน (β-oxidation) เพื่อสลายเป็นพลังงาน (ATP) สามารถช่วยในการเปลี่ยนแปลงพลังงาน และส่งผลทำให้ลดการสะสมไขมันในร่างกาย (พจน์ และคณะ, 2543) จากการศึกษาของ Fernandez-Figares *et al*. (2002) พบว่า ในกล้ามเนื้อมีการสะสมคาร์นิทีน และสารประกอบกรดไขมันคาร์นิทีน (carnitine-fatty acid complex) มากขึ้นช่วยให้การใช้ประโยชน์ได้ของไขมันดีขึ้น

การเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตร ทำให้ระดับคอเลสเตอรอล กรดโอเลอิก (oleic acid) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวรวม (monounsaturated fatty acid) กรดปาล์มิติก (palmitic acid) และกรดไขมันอิ่มตัวรวม (saturated fatty acid) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (P<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 8 ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าบีเทนมีอิทธิพลต่อการเผาผลาญ คอเลสเตอรอล โดยเอมไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) จัดเป็นเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลและตัวรับ LDL และ HDL ที่มีหน้าที่ในการขนส่งของส่วนประกอบไลโปโปรตีนเข้าสู่เซลล์ โดยการทดลองเสริมบีเทนในอาหารสุกรสามารถเพิ่ม HMGCR expression ในกล้ามเนื้อ *L. Lumborum* (Albuquerque *et al*., 2017)

5. ผลการการเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อต่อผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ

การเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตร ทำให้ต้นทุนค่าอาหารต่อตัวน้อยกว่าไก่เนื้อกลุ่มควบคุม (P<0.05) อีกทั้งผลกำไรต่อตัว และผลตอบแทนจากการลงทุน (ROI %) สูงกว่าไก่เนื้อกลุ่มควบคุม (P<0.05) ผลตอบแทนจากการขายต่อตัวของไก่เนื้อทั้งสองกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 9 การเสริมบีเทนแอนไฮดรัสให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจที่ดีกว่าเห็นได้จากต้นทุนค่าอาหารต่อตัวของไก่เนื้อที่เสริมต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริม (60.81 เทียบกับ 67.05 บาทต่อตัว) ส่งผลให้ผลตอบแทนทางกำไรต่อตัวของไก่เนื้อที่เสริมสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริม (11.82 เทียบกับ 3.86 บาทต่อตัว) อีกทั้งไก่เนื้อที่เสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มให้ผลตอบแทนจากการลงทุนที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริม (19.50 เทียบกับ 5.88 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งค่าผลตอบแทนจากการลงทุนทำให้ทราบถึงความคุ้มค่าจากการลงทุนว่าให้ได้รับผลตอบแทนที่น่าพอใจและคุ้มค่าอย่างไร ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองของ ปราณี และคณะ (2548) ที่ระบุว่าการเสริมบีเทนในอาหารของไก่เนื้อ ที่ระดับ 0, 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อต้นทุนค่าอาหารทั้งหมด (P>0.05) ทั้งนี้ต้นทุนค่าอาหารต่อตัวของไก่เนื้อแปรผันตรงกับปริมาณการกินอาหารของสัตว์ กล่าวคือ เมื่อสัตว์มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงทำให้ต้นทุนค่าอาหารลดลงตามไปด้วยโดยการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการเสริมบีเทนสามารถช่วยลดต้นทุนค่าอาหารในการเลี้ยงไก่เนื้อได้ (P<0.05)

Table 8. Effect of betaine anhydrous supplementation in drinking water on cholesterol and fatty acid in meat

Fatty acid composition in meat (g/100 g total fat)	Betaine anhydrous supplementation levels in drinking water		*Pr*>T
	Control (0 g/l)	2.0 g/l	
Cholesterol	70.97 ± 2.14	58.93 ± 1.58	0.0459
Monounsaturated fatty acid	0.74 ± 0.04	0.45 ± 0.03	0.0213
Palmitoleic acid (C16:1c)	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.9187
Veccenic acid (C18:1w7c)	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.2876
Oleic acid (C18:1w9c)	0.62 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.0469
Polyunsaturated fatty acid	0.26 ± 0.06	0.24 ± 0.06	0.8275
Linoleic acid (C18:2w6c)	0.24 ± 0.08	0.22 ± 0.07	0.1456
Eleostearic acid (C18:3w3):ALA	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.8643
Eicosatrienoic acid (C20:3w6)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.8860
Saturated fatty acid	0.61 ± 0.02	0.38 ± 0.04	0.0237
Myristic acid (C14:0)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.0638
Palmitic acid (C16:0)	0.45 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.0356
Stearic acid (C18:0)	0.15 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.4991
Omega 3 fatty acid	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.3135
Omega 6 fatty acid	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.6965
Omega 9 fatty acid	0.63 ± 0.04	0.57 ± 0.03	0.0600

Table 9. Effect of betaine anhydrous supplementation in drinking water on economic benefit return

Economic benefit return	Betaine anhydrous supplementation levels in drinking water		*Pr*>T
	Control (0 g/l)	2.0 g/l	
Feed cost per gain (THB/bird)	67.05 ± 2.14	60.81 ± 2.46	0.0295
Salable bird return (THB/bird)	70.91 ± 2.53	72.63 ± 0.91	0.3303
Net profits return per bird (THB/bird)	3.86 ± 4.31	11.82 ± 1.56	0.0395
Return of investment (%)	5.88 ± 6.50	19.50 ± 3.39	0.0322

สรุป

การเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตร ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้อาหาร และดัชนีประสิทธิภาพการผลิต แต่ไม่มีผลต่อสมรรถนะการผลิตด้านอื่น การย่อยได้ของโภชนะ เปอร์เซ็นต์ซาก เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วน รวมถึงคุณภาพทางกายภาพของเนื้อ นอกจากนี้การเสริมบีเทนแอนไฮดรัสในน้ำดื่มของไก่เนื้อเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาว (white blood count) ค่าเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte และลดอัตราส่วนเม็ดเลือดขาวชนิด Heterophil ต่อ lymphocyte (H/L ratio) รวมถึงลดปริมาณไขมันรวม คอเลสเตอรอล กรดไขมันอิ่มตัวในเนื้อไก่ นอกจากนี้การเสริมบีเทนแอนไฮดรัส ในน้ำดื่มของไก่เนื้อที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตรสามารถช่วยลดต้นทุนค่าอาหาร ช่วยเพิ่มผลกำไรต่อตัว และผลตอบแทนจากการลงทุนที่สูงกว่าไก่เนื้อกลุ่มควบคุม

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่สนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ บริษัท บีอิ้งเวล จำกัด ที่เอื้อเฟื้อผลิตภัณฑ์บีเทนแอนไฮดรัสที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ รวมถึงขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เพชรบุรีที่เอื้อเฟื้อสถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ และห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

กันยา พลเสน สุทธิพงศ์ อุริยะพงศ์สรรค์ ประสาน ตังควัฒนา และ อมรรัตน์ วันอังคาร. 2555. ผลการเสริมบีเทนในอาหารต่อสมรรถภาพการผลิต คุณภาพซาก และคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อ. แก่นเกษตร 40(2): 458-462.

ปราณี ภิรมย์พุด เสกสม อาตมางกูร ชัยภูมิ บัญชาศักดิ์ และ อมรรัตน์ พรหมบุญ. 2548. ผลการเสริมสารบีเทนในอาหารไก่เนื้อที่เลี้ยงในสภาพอากาศร้อนชื้นต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพซาก. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 43. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

พจน์ ศรีบุญลือ โสพิศ วงศคำ และ พัชรี บุญศิริ. 2543. ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี กฤติยา เลิศชุณหเกียรติ จิรัฏฐวัฒน์ ศรีอ่อนเลิศ และวรางคณา กิจพิพิธ. 2557. ผลของการเสริมโปรไบโอติกส์ (แบคโตแซค®) ในน้ำดื่มต่อการย่อยได้ของโภชนะ สัณฐานวิทยาของลำไส้เล็ก เปอร์เซ็นต์ซากและคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อ. แก่นเกษตร 42(2): 221-230.

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี และ วรางคณา กิจพิพิธ.2559. การศึกษาผลของบริเวณและชั้นที่เลี้ยงภายในโรงเรือนแบบปิดต่อสภาพแวดล้อม ดัชนีความเครียดเนื่องจากความร้อน และอัตราการตายของไก่เนื้อ. แก่นเกษตร 43(ฉบับพิเศษ 1): 517-522.

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี วรางคณา กิจพิพิธ ชวลิต ผึ้งปฐมภรณ์ ศราวุธ ม่วงเผือก เอกกมล กมลลาภวรกุล นาฏยา แบ่งลาภ และ เสาวภา เขียนงาม. 2558. ผลของการเสริมซินไบโอติกส์ต่อสมรรถภาพการผลิตไก่เนื้อและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ. วารสารเกษตร 31(3): 221-230.

วิโรจน์ จันทร์รัตน์. 2538. . เลือดและของเหลวในร่างกาย. กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์ปีก. สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้, เชียงใหม่. 873 หน้า.

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 2556. คู่มือการเก็บตัวอย่าง. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://vrdsp.dld.go.-th/ts/images/PDF/SpecimenManual01032556_2.pdf (14 กันยายน 2558).

สัญชัย จตุรสิทธา. 2553. เทคโนโลยีเนื้อสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2557. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2557. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Aengwanich, W. and O. Chinrasri. 2002. Effect of heat stress on body temperature and hematological parameters in male layer. Thai Journal of Physiological Science 15: 27-33.

Altan, O., A. Altan, M. Cabuk and H. Bayraktar. 2000. Effect of heat stress on some blood parameter in broiler. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science 24: 145-148.

Amerah A.M. and V. Ravindran. 2015. Effect of coccidia challenge and natural betaine

supplementation on performance, nutrient utilization, and intestinal lesion scores of broiler chickens fed suboptimal level of dietary methionine. Poultry Science 94(4): 673-680.

Ao, X.J., S. Yoo, T.X. Zhou, J.J.P. Wang, Q.W. Meng, L. Yan, J.H. Cho and I.H. Kim. 2011. Effects of fermented garlic powder supplementation on growth performance, blood profile and breast meat quality in broilers. Livestock Science 141: 85-89.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 19th edition. Association of Official Analytical Chemist, Washington, D.C.

Attia, Y.A., R.A. Hassan and E.M.A. Qota. 2009. Recovery from adverse effects of heat stress on slow-growing chicks in the tropics 1: Effect of ascorbic acid and different levels of betaine. Tropical Animal Health and Production 41: 807-818.

Albuquerque, A., J.A. Neves, M. Redondeiro, M. Laranjo, M.R. Félix, A. Freitas, J.L. Tirapicos and J.M. Martins. 2017. Long term betaine supplementation regulates genes involved in lipid and cholesterol metabolism of two muscles from an obese pig breed. Meat Science 124: 25-33

Alirezaei, M., H.R. Gheisari, V.R. Ranjbar, A. Hajibemani. 2012. Betaine: a promising antioxidant agent for enhancement of broiler meat quality. British Poultry Science 53: 699-707.

Augustine, P.C., J.L. McNaughton, E. Virtanen and L. Rosi. 1997. Effect of betaine on the growth performance of chicks inoculated with mixed cultures of avian *Eimeria* species and on invasion and development of *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina* in *vitro* and *in vivo*. Poultry Science 76: 802-809.

Awad A.L., A.F. Ibrahim, H.N. Fahim and M.M. Beshara. 2014. Effect of dietary betaine supplementation on growth performance and carcass traits of Domyati ducklings under summer conditions. Egyptian Poultry Science 34(4): 1019-1038.

Cadogan, D.J., R.G. Campbell, D. Harrison and A.C. Edwards. 1993. The effect of betaine on the growth performance and carcass characteristics of female pigs. pp. 219. *In*: E.S. Batterhan (ed.). Manipulating Pig Production, Aust. Pig Science Association, Attwood. Victoria.

Chiang, P.K., R.K. Cordon, J. Tal, G.C. Zeng, B.P. Doctor, K. Pardhasaradhi and P.P. Mccann. 1996. S-adenosylmethionine and methylation. The FASEB Journal 10: 471-480.

Chu, Y.H., D.L. Huffman, G.R. Trout and W.R. Egbert. 1987. Color and color stability of frozen restructured beef steaks: effect of sodium chloride, tripolyphosphate, nitrogen atmosphere and processing procedures. Food Science 52: 869-875.

Deeb, N. and A. Cahaner. 2001. Genotype-by-environment interaction with broiler genotypes differing in growth rate. 1. The effects of high ambient temperature and naked-neck genotype on lines differing in genetic background. Poultry Science 80: 695-70.

El-Husseiny, O.M., M.A. Abo-El-Ella, M.O. Abd-Elsamee and M.M. Abd-Elfattah. 2007. Response of broilers performance to dietary betaine and folic acid at different

methionine levels. International Journal of Poultry Science 6(7): 515-523.

Ezzat, W., M.S. Shoeib, S.M.M. Mousa, A.M.A. Bealish and Z.A. Ibrahiem. 2011. Impact of betaine, vitamin C and folic acid supplementation to the diet on productive and reproductive performance of MATROUH poultry strain under Egyptian summer condition. Egyptian Poultry Science 31: 521-537.

Garcia, E.E. and M. Stefan. 2000. The effect of DL-methionine and betaine on growth performance and carcass characteristics in broilers. Animal Feed Science and Technology 87(1-2): 85-93.

Fernandez-Fıgares, I., D. Wray-Cahen, N.C. Steele, R.G. Campbell, D.D. Hall, E. Virtanen and T.J. Caperna. 2002. Effect of dietary betaine on nutrient utilization and partitioning in the young growing feed restricted pig. Journal Animal Science 80: 421-428.

Hossain, M.E., G.W. Kim, S.K. Lee and C.J. Yang. 2012. Growth performance, meat yield, oxidative stability, and fatty acid composition of meat from broiler fed diets supplemented with a medicinal plant and probiotics. Asian Australasian Journal Animal Science 25(8): 1159-1168.

Fu, Q., Z.X. Leng, L.R. Ding, T. Wang, C. Wen and Y.M. Zhou. 2016. Complete replacement of supplemental DL-methionine by betaine affects meat quality and amino acid contents in broilers. Animal Feed Science and Technology 212: 63-69.

Khaksefidi, A. and Sh. Rahimi. 2005. Effect of probiotic inclusion in the diet of broiler chickens on performance, feed efficiency and carcass quality. Asian Australasian Journal Animal Science 18(8): 1153-1156.

Lepage, G. and C.C. Roy. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. Journal of Lipid Research 27: 114-120.

Liu, X., H. Yan, L. Lv, Q. xu, C. Yin, K. Zhang, P. Wang and J. Hu. 2012. Growth performance and meat quality of broiler chickens supplemented with *Bacillus licheniformis* in drinking water. Asian Australasian Journal Animal Science 25(5): 682-689.

Liu, G., K. Zong, L. Zhang and S. Cao. 2010. Dietary methionine affect meat quality and myostatin gene exon 1 region methylation in skeletal muscle tissues of broilers. Agricultural Science China 9: 1338-1346.

Mahmoud, K.Z., F.W. Edens, E.J. Eisenand and G.B. Havenstein. 2004. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (gallus gallus domesticus) subjected to cyclic heat stress. Comparative Biochemistry and Physiology 137: 35-42.

Mashaly, M.M., G.L. Hendricks, M.A. Kalama, A.E. Gehad, A.O. Abbas and P.H. Patterson. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. Poultry Science 83: 889-894.

McDevitt, R., S. Mack and I. Wallis. 1999. The effect of DL-methionine and betaine supplementation on growth performance and carcass composition in male broilers. Feedstuff 3: 11-23.

Mountzouris, K.C., P. Tsirsikos, I. Palamidi, A. Arvanniti, M. Mohnl, G. Schatmayr and K. Fegeros. 2010. Effect of probiotic inclusion level in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulin, and cecal microflora composition. Poultry Science 89: 588-593.

NRC. 1994. Nutrient Requirement of Poultry. 9th ed. NRC, Washington, D.C.

R Core Team. 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Ratriyanto A., R. Mosenthin, R. Bauer and M. Eklund. 2009. Metabolic osmoregulatory and nutritional functions of betaine in monogastric animals. Asian Australasian Journal Animal Science 22: 1461-1476.

Saunderson, C.L. and J. Mackinlay. 1990. Changes in body weight, composition and hepatic enzyme activitiesin response to dietary methionine, betaine and choline levels in growing chicks. British Journal of Nutrition. 63: 339-349.

Sayed, M.A.M. and J. Downing. 2011. The effects of water replacement by oral rehydration fluids with or without betaine supplementation on performance, acid-base balance, and water retention of heat-stressed broiler chickens. Poultry Science 90(1): 157-167.

Sharifi, S.D., A. Dibamerhr, H. Lotfollahian and B. Baurhoo. 2012. Effects of flavomycin and probiotic supplementation to diets containing different sources of growth performance, intestinal morphology, apparent metabolizable energy, and fat digestibility in broiler chickens. Poultry Science 91: 918-927.

Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1992. Principles and Procedures of statistics: A Biometrical Approach. 2nd ed. McGrew-Hill Book Co., Inc., Singapore.

Sun, H., W.R. Yang, Z.B. Yang, Y. Wang, S.Z. Jiang and G.G. Zhang. 2008. Effects of betaine supplementation to methionine deficient diet on growth performance and carcass characteristics of broilers. American Journal of Animal and Veterinary Science 3: 78-84.

Temim, S., A. M. Chagneau, S. Guillaumin, J. Michel, R. Peresson and S. Tesseraud. 2000. Does excess dietary protein improve growth performance and carcass characteristics in heat-exposed chickens. Poultry Science 78: 312-317.

Waldenstedt, L., K. Elwinger, P. Thebo and A. Uggla. 1999. Effect of betaine supplement on broiler performance during an experimental coccidial infection. Poultry Science 78(2) : 182-189.

Wang, Y.Z., Z.R. Xu and J. Feng. 2004. The effect of betaine and DL-methionine on growth performance and carcass characteristics in meat ducks. Animal Feed Science and Technology 116(1-2): 151-159.

Xu, Z., D. Yu and Y. Wang. 2000. The effects of betaine on weanling piglets and its mechanism. Journal of Zhejiang Agricultural University 25: 543-546.

Zhan, X.A. and Z.R. Ku. 1999. Effect of betaine on meat quality and mechanism of the effects in finishing broilers. Journal of Zhejiang Agricultural University 25: 611-614.

Zhao, L., X. Zhang, F. Cho, D. Sun, T. Wang and G. Wary. 2003. Effects of dietary supplementation with fermented *Ginkgo*-leaves on performance, egg quality, lipid

metabolism and egg-yolk fatty acids composition in laying hens. Livestock Science 155: 77-85.

Zhou, X., Y. Wang, Q. Gu and W. Li. 2010. Effect of dietary probiotic, *Bacillus coagulans*, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. Poultry Science 89: 588-593.

ความหลากหลายของจุลินทรีย์และนิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสด

Microbial Diversity and Rumen Ecology of Swamp Buffalo Fed Rice Straw or Fresh Para Grass

สุริยะ สะวานนท์[1/*] สาธกา อินทะเวียง[1/] ภูมพงศ์ บุญแสน[1/] และ พริมา พิริยางกูร[2/]

Suriya Sawanon[1/*], Sataka Intawiang[1/], Phoompong Boonsaen[1/] and Pharima Phiriyangkul[2/]

[1/]ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[1/]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2/]คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[2/]Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

**Corresponding author: Email: agrsusa@ku.ac.th*

(Received: 11 February 2016; Accepted: 8 August 2016)

Abstract: The diversity and population of ruminal bacteria present in the rumen of swamp buffaloes fed rice straw or para grass (*Brachiaria mutica*). Total DNA were extracted from the rumen digesta of 4 swamp buffaloes fed rice straw or para grass. The diversity of bacteria was analyzed by PCR amplification and 16S rDNA clone library sequences. The bacteria population was determined by real-time PCR technique. The 16S rDNA sequences (1,500 bp) of clones were completely sequenced and subjected to a BLAST. In buffaloes fed rice straw, the 102 clones, 49.02% (50 clones) of the clone showed >97% sequence similarity with known isolates, for the remaining 50.98% (52 clones) had <97% similarity. The majority of clones fell into Low G+C Gram-Positive Bacteria (LGCGPB) and Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB) (71.57 and 10.25%, respectively). In buffaloes fed fresh para grass, the 109 clones, 40.37% (44 clones) of the clone showed >97 % sequence similarity with known isolates, for the remaining 59.63% (65 clones) had similarity <97%. The majority of clones fell into LGCGPB and CFB (56.88 and 31.19%, respectively). The population of major groups of known bacteria in the rumina of buffalo fed rice straw or fresh para grass were similar.

Keywords: Swamp buffalo, 16S rDNA clone libraries, rice straw, para grass

บทคัดย่อ: การศึกษาความหลากหลาย และจำนวนประชากรของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสด โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA โดยใช้กระบือปลักโตเต็มวัย เพศเมีย จำนวน 4 ตัว ที่เจาะกระเพาะรูเมน ทำการเก็บตัวอย่างจากกระเพาะรูเมนเพื่อนำมาสกัด DNA ของแบคทีเรียและนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค PCR และการทำห้องสมุดยีนของ 16S rDNA (1,500 bp) ทำการหาจำนวนประชากรของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค real-time PCR และนำลำดับเบสของยีน 16S rDNA ที่ได้จากการโคลนมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยวิธี on line BLAST จากการสุ่มโคลนของยีน 16S rDNA จากกระเพาะรูเมนของกระบือที่กินฟางข้าว จำนวน 102 โคลน พบโคลนที่มีความเหมือนกับแบคทีเรียในฐานข้อมูลมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 49.02 เปอร์เซ็นต์ (50 โคลน) และแบคทีเรียที่มีความเหมือนน้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 50.98 เปอร์เซ็นต์ (52 โคลน) ของแบคทีเรียทั้งหมดในห้องสมุดยีน แบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบ คือ แบคทีเรียกลุ่ม Low G+C Gram-Positive Bacteria (LGCGPB) คิดเป็น 71.57 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การโคลนยีน 16S rDNA จากกระเพาะรูเมนของกระบือที่กินหญ้าขนสด จำนวน 109 โคลน พบโคลนที่มีความเหมือนกับแบคทีเรียในฐานข้อมูล มากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 40.37 เปอร์เซ็นต์ (44 โคลน) และแบคทีเรียที่มีความเหมือนน้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 59.63 เปอร์เซ็นต์ (65 โคลน) ของแบคทีเรียทั้งหมดในห้องสมุดยีน แบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบ คือ แบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB คิดเป็น 56.88 เปอร์เซ็นต์ จำนวนประชากรของแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบได้บ่อยในกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสดมีปริมาณใกล้เคียงกัน

คำสำคัญ: กระบือปลัก ห้องสมุดยีน 16S rDNA ฟางข้าว หญ้าขน

คำนำ

อาหารหยาบเป็นอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสัตว์เคี้ยวเอื้อง อาหารหยาบที่สัตว์เคี้ยวเอื้องกินเข้าไปจะเกิดการหมักย่อยในกระเพาะรูเมน โดยการทำงานของจุลินทรีย์ และได้ผลผลิตเป็นกรดไขมันระเหยง่าย แร่ธาตุ วิตามิน และโปรตีนจากเซลล์จุลินทรีย์ สารอาหารต่าง ๆ เหล่านี้ สัตว์เคี้ยวเอื้องจะนำไปใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิต และให้ผลผลิต เช่น เนื้อและน้ำนม ในกระบวนการหมักย่อยในกระเพาะรูเมน จุลินทรีย์มีส่วนสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการหมักย่อยสลายอาหารและเป็นแหล่งโปรตีนให้กับตัวสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย ที่มีจำนวนประชากรสูงที่สุดถึง 10^{10} - 10^{11} เซลล์/มล. (Makkar and McSweeney, 2010) โดยที่ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียจะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ขึ้นอยู่กับช่วงอายุของสัตว์ สภาพแวดล้อม และอาหารที่สัตว์กินเข้าไป (สุริยะ, 2551) แบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอาหารในกระเพาะรูเมนจะมีความจำเพาะกับสารอาหารแต่ละชนิด เช่น แบคทีเรียกลุ่มย่อยเยื่อใย (fibrolytic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มย่อยโปรตีน (proteolytic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มย่อยแป้ง (amylolytic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มย่อยไขมัน (lipolytic bacteria) เป็นต้น

กระบือปลักเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากอาหารหยาบคุณภาพต่ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของระบบทางเดินอาหารของกระบือเองที่มีศักยภาพในการย่อยอาหารที่ดีเมื่อเทียบกับสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่น (เมธา, 2552) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งส่วนหนึ่งเกิดจากในกระเพาะรูเมนของกระบือมีจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายและมีศักยภาพในการย่อยสลายเยื่อใยได้ดี อย่างไรก็ตามการศึกษาจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนนั้นทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในกระเพาะรูเมนไม่ต้องการออกซิเจน ซึ่งจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงและแยกเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจน ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สามารถจำแนกแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนได้เพียง 20-30 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่อาศัยในกระเพาะรูเมน (สุริยะ, 2551) เมื่อเปรียบเทียบกับ

การใช้เทคนิคการหาความหลากหลายของแบคทีเรียโดยการทำห้องสมุดยีนของ 16S rDNA (Dengdi *et al*., 2005) ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียแต่ละชนิด ทำให้สามารถนำข้อมูลของยีน 16S rDNA ที่ได้ไปใช้ในการศึกษาและพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพการหมักย่อยในกระเพาะรูเมน อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ (Fukuma *et al*., 2012) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาระบบนิเวศและปริมาณประชากรของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยเทคนิคการทำห้องสมุดยีนของ 16S rDNA และจำนวนประชากรของแบคทีเรียที่สำคัญบางชนิดในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าว หรือหญ้าขนสด

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์และอาหารทดลอง

กระบือปลักโตเต็มวัย เพศเมีย ที่เจาะกระเพาะรูเมน (น้ำหนักตัวเฉลี่ย 425.8 ± 22.5 กก.) จำนวน 4 ตัว เลี้ยงในคอกขังเดี่ยว (2.5 x 5 เมตร) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 2 ตัว กระบือกลุ่มแรกได้รับฟางข้าว และกระบือกลุ่มที่สองได้รับหญ้าขนสด กระบือทั้งสองกลุ่มได้รับอาหารหยาบเพียงอย่างเดียว โดยให้กินอย่างเต็มที่วันละ 2 มื้อ (มื้อเช้าเวลา 8:00 น. และมื้อเย็นเวลา 17:00 น.) มีน้ำดื่ม และแร่ธาตุก้อนให้กินตลอดเวลา โดยให้อาหารทดลองเป็นเวลานาน 3 เดือน เพื่อให้จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนมีการปรับตัวเข้ากับอาหารทดลองได้ดีที่สุด และใช้เวลาในการเก็บข้อมูลต่าง ๆ เป็นเวลานาน 1 เดือน จากนั้นทำการเปลี่ยนสลับกลุ่มเพื่อให้กระบือได้รับอาหารหยาบอีกกลุ่มหนึ่ง ทำการปรับอาหารนาน 3 เดือน และทำการเก็บข้อมูลด้านต่าง ๆ นาน 1 เดือนเช่นเดียวกับครั้งแรก

การเก็บตัวอย่างในกระเพาะรูเมน และการสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเก็บตัวอย่างภายในกระเพาะรูเมน (rumen digesta) ผ่านทางช่องเปิดด้านข้างลำตัว (cannula) ของกระบือทั้ง 4 ตัว (กลุ่มละ 2 ตัว) หลังจากให้อาหารมื้อเช้า 6 ชั่วโมง นำตัวอย่าง rumen digesta ของกระบือแต่ละตัวใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง ขนาด 50 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่าง rumen digesta ของกระบือทุกตัวที่ได้รับอาหารชนิดเดียวกัน (ฟางข้าว จำนวน 4 ตัวอย่าง และหญ้าขนสด จำนวน 4 ตัวอย่าง) มาผสมรวมกันและทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA extraction and purification by FavorPrep™ Stool DNA Isolation Mini Kit, FAVORGEN® BIOTECH CORP., Taiwan)

การเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

การเพิ่มจำนวน 16S rDNA ของแบคทีเรีย โดยกระทำภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์ DNA polymerase (Tag recombinant, Fermentas) ด้วยเทคนิค PCR (Lane, 1991) โดยใช้ Universal primer ดังนี้ 27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' และ 1492R 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3' เมื่อ M = A หรือ C และ Y = C หรือ T โดยทำปฏิกิริยาในเครื่อง MultiGene gradient thermal (Labnet, USA) ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา PCR จำนวน 25 รอบ และทำการตรวจสอบผลผลิตของ PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis และสกัดเอาชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดประมาณ 1,500 bp จากการทำ low meltting agarose gel electrophoresis และสกัดเอา DNA เป้าหมาย (16S rDNA) โดยใช้ชุดสกัด QIAEK II Gel Extraction Kit (QIAGEN K.K., Japan)

การหาลำดับเบสของ 16S rDNA

ทำการโคลนยีน 16S rDNA โดยใช้ชุด InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) และใช้ *E. coli* HIT-JM109 เป็นเซลล์ให้อาศัย ทำการตรวจการเชื่อมต่อของ DNA เป้าหมายด้วยเทคนิคการเลือกโคโลนีสีขาว (blue-white selection)

จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่มี DNA เป้าหมาย คือ 16S rDNA ที่มีความยาวประมาณ 1,500 bp เชื่อมต่ออยู่ โดยใช้วิธีการตรวจสอบยีนด้วยเทคนิคการทำ PCR ตามวิธีการที่แนะนำใน InsTAclone™ PCR Cloning Kit จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดที่มี 16S rDNA เป้าหมายขนาด 1,500 bp ตามวิธีที่แนะนำใน Plasmid DNA Extraction Mini Sample Kit (FAVORGEN® BIOTECH CORP., Taiwan) เมื่อได้พลาสมิดที่มีความบริสุทธิ์และทำการตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่สกัดได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อนำไปหาลำดับเบสของ 16S rDNA ต่อไป

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับเบสของ 16S rDNA โดยส่งตรวจที่ First BASE Laboratories Sdn. Bhd, Malaysia (www.base-asia.com) เมื่อได้ลำดับเบสของ 16S rDNA ทั้ง Forward และ Reverse นำมาเปรียบเทียบความถูกต้อง โดยใช้โปรแกรม Ridom Trace Edit และโปรแกรม Clustal X 2.1 นำลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่ทราบชนิดใน GenBank (BLASTn, http://www. ncbi. nlm.nih.gov/BLAST)

การทำแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ

นำเอาลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการโคลน และแบคทีเรียที่อยู่ใน GenBank มาทำการ Multiple aligment และทำการเขียนแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม Clustal x 2.1 และให้ค่า Bootstrap trails = 1,000 นำไฟล์ที่ได้จากโปรแกรม Clustal x 2.1 ไปเขียนแผนภูมิต้นไม้ในโปรแกรม NJPLOT (Perriere and Gouy, 1996)

การวิเคราะห์ประชากรของแบคทีเรียโดยเทคนิค real-time PCR

การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (16S rDNA) โดยนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตัวอย่างที่ทำการสกัดได้ข้างต้นมาทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแบคทีเรียที่สนใจ (ตารางที่ 1) เมื่อทราบความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานที่ได้จากพลาสมิดที่มียีนเป้าหมายของแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ

Table 1. Primer sequences for real-time PCR amplification

Bacteria	Primer sequences (5'-3')	Product size (bp)	References
Total bacteria	[F] CCTACGGGAGGCAGCAG	194	Muyzer *et al.* (1993)
	[R] ATTACCGCGGCTGCTGG		
R. albus	[F] CCCTAAAAAGCAGTCTTAGTTCG	175	Tajima *et al.* (2001)
	[R] CCTCCTTGCGGTTAGAACA		
F. succinogenes	[F] GGTATGGGATGAGCTTGC	446	Tajima *et al.* (2001)
	[R] GCCTGCCCCTGAACTATC		
R. flavefaciens	[F] TCTGGAAACGGATGGTA	295	Koike and Kobayashi (2001)
	[R] CCTTTAAGACAGGAGTTTACAA		
P. ruminicola	[F] GGTTATCTTGAGTGAGAGTT	485	Tajima *et al.* (2001)
	[R] CTGATGGCAACTAAAGAA		
S. ruminantium	[F] TGCTAATACCGAATGTTG	513	Tajima *et al.* (2001)
	[R] TCCTGCACTCAAGAAAGA		
S. bovis	[F] CTAATACCGCATAACAGCAT	869	Tajima *et al.* (2001)
	[R] AGAAACTTCCTATCTCTAGG		
Genus *Prevotella*	[F] CACRGTAAACGATGGATGCC	534	Koike and Kobayashi (2001)
	[R] GGTCGGGTTGCAGACC		
Total Methanogens	[F] GAGGAAGGATGGACGACG GTA	600	Loy *et al.* (2002)
	[R] ACGGGCGGTGTGTGCAAG		

แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน และนำค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายที่อยู่ในตัวอย่างมาทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำให้ทราบจำนวน 16S rDNA เริ่มต้นของแบคทีเรียที่สนใจในตัวอย่าง ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป LightCycler® 480 real-time PCR software ในการวิเคราะห์ (Koike and Kobayashi, 2001)

การศึกษาสภาวะภายในกระเพาะรูเมน

ทำการศึกษาสภาวะภายในกระเพาะรูเมนของกระบือหลังจากได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสดต่อเนื่องเป็นเวลา 3 เดือน โดยทำการเก็บตัวอย่างของเหลวที่อยู่ในกระเพาะรูเมน หลังจากที่ให้อาหารมื้อเช้า 6 ชั่วโมง จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน เพื่อนำตัวอย่างของเหลวไปตรวจวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (EUTECH INSTRUMENTS pH 510, Japan) ปริมาณกรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acid, VFA) ด้วยเครื่อง gas chromatography (GC) รุ่น CP 3800 และปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH_3-N) ตามวิธีของอังคณา และดวงสมร (2532)

การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบ 2 x 2 Crossover design และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป R (Windows 2.9.2)

ผลการทดลองและวิจารณ์

สภาวะภายในกระเพาะรูเมน

ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสดเพียงอย่างเดียว มีค่า 7.33 หรือ 7.40 ตามลำดับ ใกล้เคียงกับ Thu and Preston (1999) รายงานว่ากระบือที่ได้รับฟางข้าวเพียงอย่างเดียวและให้กินอย่างเต็มที่มีค่าความเป็นกรดด่างในกระเพาะรูเมน เท่ากับ 7.32 ในขณะที่ความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมด กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก รวมทั้งสัดส่วนของกรดอะซิติกต่อโพรพิโอนิกในกระบือที่ได้รับฟางข้าวมีค่าสูงกว่ากระบือที่ได้รับหญ้าขนสด (ตารางที่ 2) เนื่องจากฟางข้าวมีปริมาณวัตถุแห้งและผนังเซลล์สูงกว่าหญ้าขน (ปรีชา และทวีพร, 2551; Thu and Preston, 1999) ทำให้จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของกระบือหมักย่อยเยื่อใยจากฟางข้าวได้ดีกว่าหญ้าขนสด (สาธกา และคณะ, 2555) และผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะซิติก และกรดบิวทีริก ได้สูงกว่ากระบือที่ได้รับหญ้าขนสด

กระบือที่ได้รับหญ้าขนสดมีความเข้มข้นแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในกระเพาะรูเมนสูงกว่ากระบือที่ได้รับฟางข้าว (ตารางที่ 2) ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในกระเพาะรูเมนเกิดจากการย่อยสลายของโปรตีน และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนในอาหาร (ฟางข้าว

Table 2. Ruminal condition of swamp buffalo fed rice straw or fresh para grass

Parameter	Rice straw	Para grass	*P*-value
pH	7.33 ± 0.97	7.40 ± 1.60	0.15
Ammonia nitrogen (mg %)	4.29 ± 0.65	6.56 ± 0.68	0.02
Total VFAs (mM/l)	72.74 ± 0.70	60.21 ± 1.67	0.01
- Acetate (mM/l)	33.25 ± 2.66	25.92 ± 2.18	0.01
- Propionate (mM/l)	20.08 ± 0.49	17.29 ± 0.40	0.03
- Butyrate (mM/l)	19.41 ± 1.43	17.00 ± 0.44	0.02
- Acetate : Propionate ratio	1.66 ± 0.16	1.50 ± 0.11	0.01

หรือหญ้าขนสดมีปริมาณโปรตีนรวม 2.56 และ 5.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เมื่อสัตว์กินอาหารเข้าไปโปรตีนจะถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนให้เป็นกรดอะมิโน จากนั้นกรดอะมิโนจะถูกย่อยต่อได้เป็นแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในกระเพาะรูเมน และไนโตรเจนอีกส่วนหนึ่งได้มาจากการนำกลับเข้ามาในกระเพาะรูเมนผ่านทางน้ำลายในรูปของยูเรีย ในขณะที่กรดอะมิโนและแอมโมเนีย-ไนโตรเจนส่วนหนึ่งจะถูกจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์เอง (สุริยะ, 2551) โดยปกติปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนที่ตรวจพบในกระเพาะรูเมนของกระบืออยู่ที่ 5-8 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ (วันเลิศ, 2549)

ความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสด

ทำการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับฟางข้าว โดยทำการโคลนยีน 16S rDNA จำนวน 102 โคลน และทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยวิธี on line BLAST พบลำดับเบส 16S rDNA ของโคลนที่ได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลใน GenBank มากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 โคลน คิดเป็น 49.02 เปอร์เซ็นต์ และลำดับเบส 16S rDNA ของโคลนที่มีความเหมือนกับฐานข้อมูลใน GenBank น้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 52 โคลน คิดเป็น 50.98 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ในขณะที่กระบือที่ได้รับหญ้าขนสด จากการทำโคลนยีน 16S rDNA จำนวน 102 โคลน พบลำดับเบสของ 16S rDNA ที่เหมือนกับลำดับเบสของ 16S rDNA ในฐานข้อมูล มากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 40.37 เปอร์เซ็นต์ และลำดับเบส 16S rDNA ที่มีความเหมือนกับฐานข้อมูล น้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 59.63 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโคลนของยีน 16S rDNA จากทั้งสองห้องสมุดยีนที่เหมือนกับแบคทีเรียที่ทราบชนิดแล้วส่วนใหญ่ คือ *Clostridium* spp. และ *Bacteroides cellulosolvens*

แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนจากกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าว หรือหญ้าขนสด (ภาพที่ 1) แผนภูมิต้นไม้นี้เป็นการนำลำดับเบสของทั้งสองห้องสมุดยีนมาทำการ aliment ร่วมกัน จากนั้นทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้ที่มีทั้งตัวอย่างของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่กระบือได้รับฟางข้าว และหญ้าขนสดเป็นอาหารหลัก เพื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มแบคทีเรียที่ได้รับอาหารหยาบที่แตกต่างกันทั้งสองกลุ่ม พบว่าสามารถแบ่ง

Table 3. Numbers of 16S rDNA clones retrieved from rumen of swamp buffalo fed rice straw or fresh para grass nearest know bacteria in GenBank

Nearest know bacteria	Rice straw		Para grass	
	Number of clone	%	Number of clone	%
>97% Nearest know bacteria	50	49.02	44	40.37
Clostridium spp.	16	15.68	11	10.09
Bacteroides cellulosolvens	10	9.80	12	11.01
Pelotomaculum propionicicum	4	3.92	2	1.83
Acetivibrio cellulolyticus	3	2.94	4	3.67
Butyrivibrio hungatei	3	2.94	1	0.92
Ruminococcus gnavus	3	2.94	2	1.83
Butyrivibrio fibrisolvens	2	1.96	4	3.67
Ruminococcus gauvreauii	1	0.98	2	1.83
Prevotella ruminicola	-	-	2	1.83
Other species	8	7.84	4	3.68
<97% Nearest know bacteria	52	50.98	65	59.63

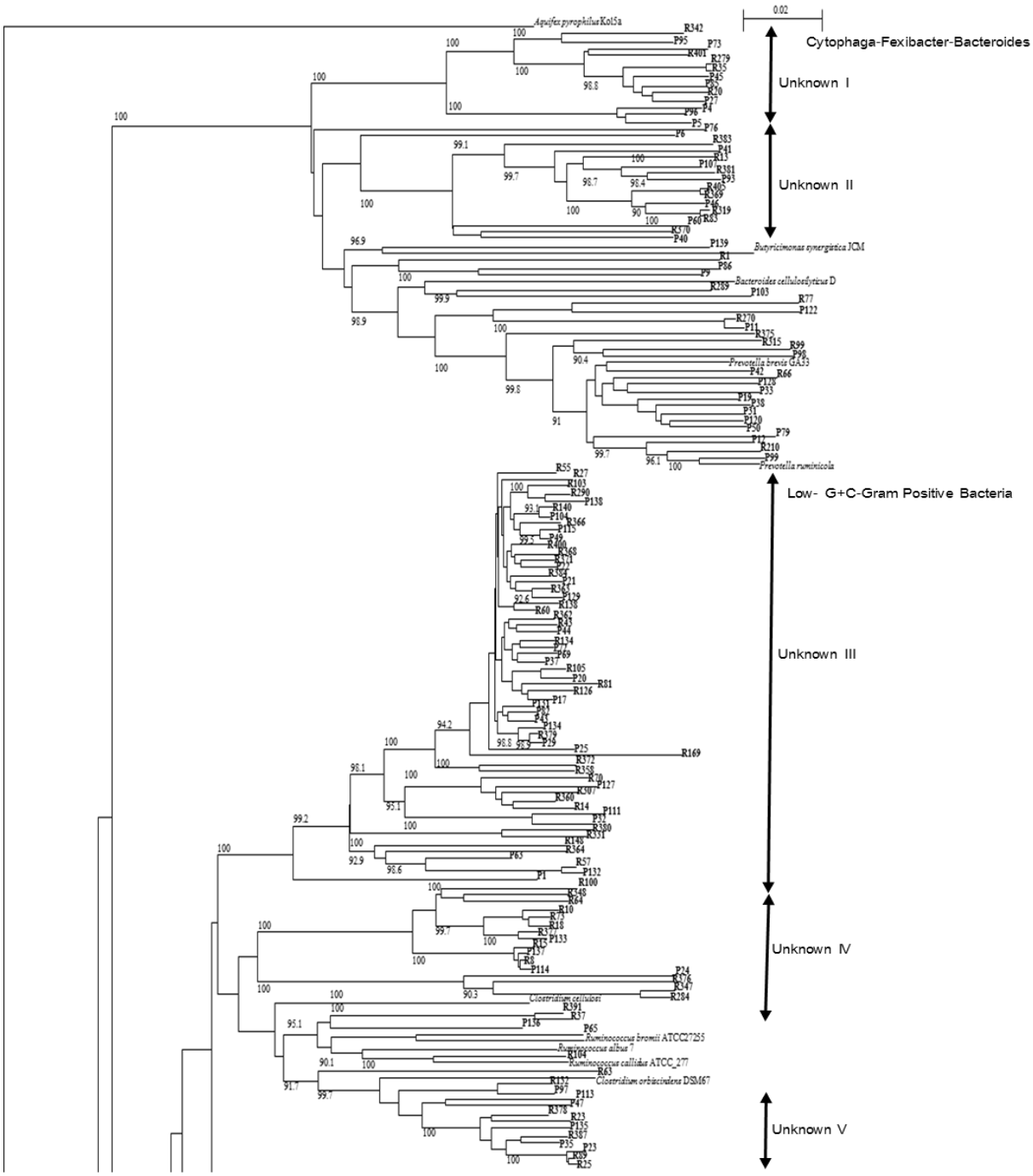

Figure 1. The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences from rumen of swamp buffalo fed rice straw (R clone number) or fresh para grass (P clone number). The tree was constructed using neighbor-joining analysis of a distance matrix obtained from a multiple-sequence alignment. *Aquifex pyrophilus* was used as an out-group sequence

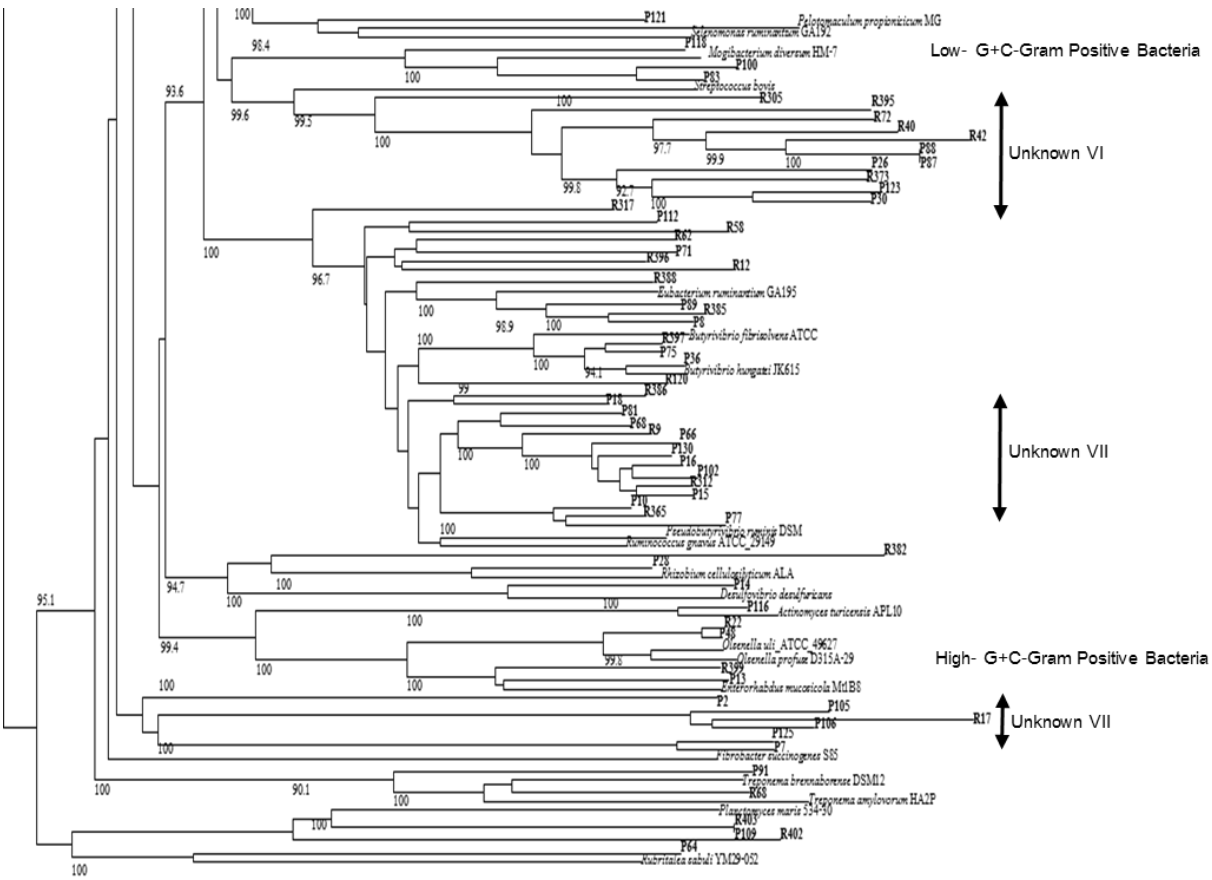

Figure 1. The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences from rumen of swamp buffalo fed rice straw (R clone number) or fresh para grass (P clone number). The tree was constructed using neighbor-joining analysis of a distance matrix obtained from a multiple-sequence alignment. *Aquifex pyrophilus* was used as an out-group sequence

แบคทีเรียออกได้เป็น 4 กลุ่มหลัก คือ 1) Low-G+C Gram-Positive Bacteria (LGCGPB) 2) Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB) 3) High-G+C Gram-Positive Bacteria (HGCGPB) และ 4) Spirochaetes (Tajima *et al*., 1999)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB มีอัตราส่วนสูงที่สุด และพบว่ากระบือที่ได้รับฟางข้าวมีอัตราส่วนของแบคทีเรียในกลุ่ม LGCGPB สูงกว่ากระบือที่ได้รับหญ้าขนสด คือ 71.57 และ 56.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Dengdi *et al*. (2005) พบแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB สูงที่สุดในกระเพาะรูเมนของโค และจามรีที่แทะเล็มหญ้าเพียงอย่างเดียว หรือมีการเสริมอาหารข้นร่วมด้วย นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่อยู่ในกลุ่ม LGCGPB เป็นแบคทีเรียที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใด และพบกลุ่ม Unknown III มากที่สุด รองลงมาคือ Unknown IV (ตารางที่ 4) โดยพบในกระบือที่ได้รับฟางข้าวมากกว่ากระบือที่ได้รับหญ้าขนสด คิดเป็น 31.37 และ 22.94 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่ม Unknown III ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม Unknown IV เท่ากับ 11.76 และ 3.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามจะพบกลุ่ม Unknown VII ในกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับหญ้าขนสด (9.17 เปอร์เซ็นต์) มากกว่ากระบือที่ได้รับฟางข้าว (3.92 เปอร์เซ็นต์) นั่นแสดงให้เห็นว่าชนิดแบคทีเรีย

Table 4. Unknown groups of 16S rDNA clones retrieved from rumen of swamp buffalo fed rice straw or fresh para grass

Bacterial group	Clone name	
	Rice straw	Para grass
Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB)		
Unknown I	R20, R35, R279, R342, R401 (n=5)	P4, P5, P27, P45, P73, P85, P95, P96 (n=8)
Unknown II	R13, R83, R319, R369, R370, R381, R383, R405 (n=8)	P6, P40, P41, P46, P60, P76, P93, P107 (n=8)
High-G+C Gram-Positive Bacteria (HGCGPB)	R382, R22, R399, R17 (n=4)	P28, P14, P116, P48, P13, P64 (n=6)
Low-G+C Gram-Positive Bacteria (LGCGPB)		
Unknown III	R55, R27, R103, R140, R366, R400, R368, R371, R384, R290, R363, R138, R60,R360, R43, R134, R105, R81, R126, R379, R169, R372, R358, R70, R307, R360, R14, R380, R331, R148, R364, R54 (n=32)	P138, P104, P115, P49, P22, P21, P129, P44, P72, P69, P37, P20, P17, P131, P82, P43, P134, P129, P25 (n=19)
Unknown IV	R100, R348, R64, R10, P73, R18, R377, R15, R8, R376, R347, R284 (n=12)	P133, P137, P114, P24 (n=4)
Unknown V	R132, R378, R23, R387, R89, R25 (n=6)	P97, P113, P47, P135, P35, P23, (n=6)
Unknown VI	R305, R72, R40, R42, R373, R395 (n=6)	P88, P87, P26, P123, P30 (n=5)
Unknown VII	R386, R9, R312, R365 (n=4)	P18, P81, P68, P66, P130, P16, P102, P15, P10, P77 (n=10)
Spirochaetes	R68 (n=1)	P1 (n=1)

ในกระเพาะรูเมน โดยเฉพาะในกลุ่ม Unknown III, IV และ VII จะมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของอาหารหยาบที่กระบือได้รับ ทั้งนี้เนื่องมาจากอาหารหยาบต่างชนิดกัน (ฟาง และหญ้าขน) จะมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ทำให้ชนิดของแบคทีเรียที่เข้ามาหมักย่อยมีความแตกต่างกันไปด้วย

ประชากรของแบคทีเรียบางชนิดในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางหรือหญ้าขนสด

การตรวจวัดจำนวนประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิค real-time PCR โดยทำการวิเคราะห์ในกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสำคัญในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง จำนวน 8 กลุ่ม คือ แบคทีเรียทั้งหมด (total bacteria) จุลินทรีย์กลุ่มผลิตมีเทน (total methanogen), *R. albus, R. flavefaciens, F. succinogenes, S. ruminantium, P. ruminicola, S. bovis* และ genus *Prevotella* พบว่ากระบือที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสดมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ใกล้เคียงกัน โดยพบแบคทีเรียในกลุ่ม genus *Prevotella* มากที่สุด รองลงมา คือ จุลินทรีย์กลุ่มผลิตมีเทน ในขณะที่แบคทีเรียชนิดหลักที่ย่อยเยื่อใยในกระเพาะรูเมนพบแบคทีเรีย *R. flavefaciens* ในปริมาณมากที่สุด และตามด้วย *R. albus* และ *F. succinogenes* ตามลำดับ (ภาพที่ 2) สอดคล้องกับการรายงานของภูมพงศ์ และคณะ

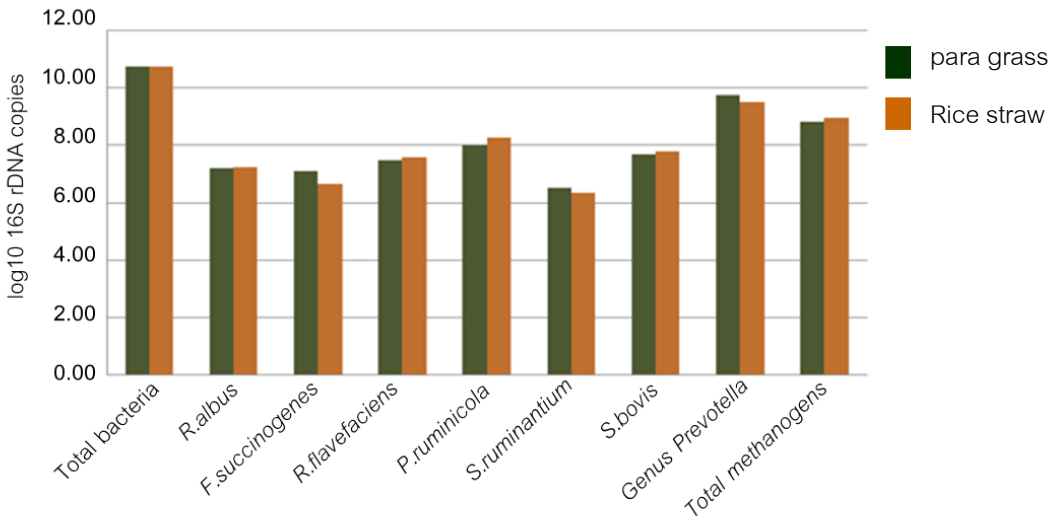

Figure 2. The population size (log10 16S rDNA copies) of total bacteria, total methanogens, *R. albus, R. flavefaciens, F. succinogenes, S. ruminantium, P. ruminicola, S. bovis* and genus *Prevotella* from rumen of swamp buffalo fed rice straw or fresh para grass

(2553) และสมพร (2557) ที่ได้คัดเลือกแบคทีเรียย่อยเยื่อใยจากกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับฟางข้าวอย่างเดียว หรือได้รับฟางข้าวร่วมกับการเสริมอาหารข้นพบแบคทีเรียย่อยเยื่อใยที่ทำการคัดเลือกได้ส่วนใหญ่เป็น *R. albus* และ *R. flavefaciens* แต่ไม่สามารถคัดเลือก *F. succinogenes* จากกระเพาะรูเมนของกระบือได้เลย นั่นแสดงให้เห็นว่า *F. succinogenes* เป็นแบคทีเรียย่อยเยื่อใยที่มีประชากรน้อยในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อได้รับฟางข้าวเพียงอย่างเดียว

สรุป

กระบือที่ได้รับฟางข้าวในกระเพาะรูเมนมีความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่ายสูง แต่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจนต่ำกว่ากระบือที่ได้รับหญ้าขนสด เนื่องจากอาหารหยาบทั้งสองชนิดมีโครงสร้างของผนังเซลล์และปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกันทำให้ผลผลิตจากการหมักย่อยของจุลินทรีย์มีปริมาณที่แตกต่างกัน จากการทำห้องสมุดยีนของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียกลุ่มที่พบมากที่สุดในกระเพาะรูเมนของกระบือ คือ LGCGPB โดยกระบือที่ได้รับฟางข้าวมีอัตราส่วนของแบคทีเรียในกลุ่ม LGCGPB สูงกว่ากระบือที่ได้รับหญ้าขนสด และแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่อยู่ในกลุ่ม LGCGPB เป็นแบคทีเรียที่ยังไม่ทราบชนิด ในขณะที่กระบือที่ได้รับฟางข้าวจะพบแบคทีเรียในกลุ่ม Unknown III และ Unknown IV มากกว่ากระบือที่ได้รับหญ้าขนสด นอกจากนี้ยังพบว่ากระบือที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสดมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียที่กลุ่มหลักบางชนิดใกล้เคียงกัน ในขณะที่พบจำนวนของแบคทีเรียย่อยเยื่อใย *R. flavefaciens* และ *R. albus* มากกว่า *F. succinogenes*

เอกสารอ้างอิง

ปรีชา อินนุรักษ์ และ ทวีพร เรืองพริ้ม. 2551. การเพิ่มศักยภาพการใช้ฟางข้าวเป็นอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ภูมพงศ์ บุญแสน สุริยะ สะวานนท์ ปรีชา อินนุรักษ์ และพริมา พิริยางกูร. 2553. การศึกษาลักษณะบางประการของแบคทีเรียย่อยเยื่อใยที่มีศักยภาพสูงที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก.

ใน: การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 48 สาขาสัตว์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เมธา วรรณพัฒน์. 2552. การผลิตโคเนื้อและกระบือในเขตร้อน. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

วันเลิศ พงษ์โปกุล. 2549. การเพิ่มคุณค่าทางโภชนะของฟางข้าวโดยการหมักย่อยของจุลินทรีย์ในการผลิตโคเนื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมพร ปุ่นโก๋. 2557. การศึกษาความหลากหลายและการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยเยื่อใยและไม่ย่อยเยื่อใยจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาธกา สุริยะ สะวานนท์ พริมา พิริยางกูร และสมจิตร ถนอมวงศ์วัฒนะ. 2555. การเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยเยื่อใย กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณจุลินทรีย์ และสภาวะของกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ ได้รับฟางข้าวกับหญ้าขนสด. *ใน*: การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 50 สาขาสัตว์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

สุริยะ สะวานนท์. 2551. จุลินทรีย์และเทคโนโลยีชีวภาพด้านจุลินทรีย์ในกระเพาะรุเมน. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

อังคณา หาญบรรจง และดวงสมร สินเจิมศิริ. 2532. การวิเคราะห์และประเมินคุณภาพอาหารสัตว์. ภาควิชาสัตวบาล, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Dengdi, A., D. Xiuzhu and D. Zhiyang. 2005. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurun*) estimated by 16S rDNA homology analyses. Anarobe 11: 207-215.

Fukuma, N., S. Koike and Y. Kobayashi. 2012. Involvement of recently cultured group U2 bacterium in ruminal fiber digestion revealed by coculture with *Fibrobacter succinogenes* S85. FEMS Microbiology Letters 336: 17-25.

Koike, S. and Y. Kobayashi. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens.* FEMS Microbial Ecology 204: 361-366.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.). *In*: pp. 115-175. E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.). Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley and Sons, New York.

Loy A., A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J. Ernst, K.H. Schleifer and M. Wagner. 2002. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. Applied and Environmental Microbiology 68(10): 5064-5081.

Makkar, H.P.S. and C.S. McSweeney. 2010. Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants. Springer, Dordrecht.

Muyzer, G., E.C. Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 59(3): 695-700.

Perriere, G. and M. Gouy. 1996. WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. Biochimie 78: 364-369.

Tajima, K., R.I. Aminov, T. Nagamine, K. Ogata, M Nakamura, H. Matsui and Y. Benno. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. FEMS Microbial Ecology 29: 159-169.

Tajima, K., R.I. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura and Y. Benno. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology 67: 2766-2774.

Thu, N.V. and T. R. Preston. 1999. Rumen environment and feed degradability in swamp buffaloes fed different supplements. Livest. Res. Rural Dev. 11(3): 1-7.

ระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีนไวเทลโลจีนินและดัชนีความสมบูรณ์เพศของปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา

Seasonal Expression Lavels of Vitellogenin Gene and Gonadosomatic Index in *Pristolepis fasciata* in Kwan Phayao, Phayao Province

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์[1/, 2/*]

Dutrudi Panprommin[1/, 2/*]

[1/]*สาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จ. พะเยา 56000*

[1/]*Division of Fisheries, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand*

[2/]*ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900*

[2/]*Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand*

**Corresponding author: Email: dutrudeep@yahoo.com*

(Received: 24 May 2016; Accepted: 8 August 2016)

Abstract: The aims of this study were to amplify the partial cDNA sequence of vitellogenin gene (*VTG*) for determination the *VTG* seasonal expression and gonadosomatic index (GSI) of female *Pristolepis fasciata*. The sample fishes were collected from Kwan Phayao for 1 year period between June 2012 and May 2013. The 320-bp fragment of *P. fasciata VTG* (called *PfVTG*) type Ab was amplified from the liver tissue of female fish using RT-PCR technique and VF1 and VR1 primers. A phylogenetic tree based on three types of *VTG*, including Aa, Ab and C from other teleost fishes was constructed for relationship analysis. The nodes were separated into 3 major branches following the type of *VTG*. The *PfVTG* was grouped into the *VTG* type Ab. The seasonal expression levels of *VTG* were determined using real-time PCR. The *VTG* expression levels and GSI were significantly ($P<0.05$) peaked in 2 periods, July and January. This result showed that the *P. fasciata* in Kwan Phayao could spawn one more time per year. The correlation analysis showed the *VTG* expression levels have a significant ($r_s = 0.58$; $P<0.01$) direct relation with the GSI. From these results indicated that apart from the GSI, the seasonal expression of *VTG* could also reflect the spawning season of *P. fasciata* in Kwan Phayao.

Keywords: Vitellogenin gene, gonadosomatic index, *Pristolepis fasciata*, Kwan Phayao

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนไวเทลโลจีนิน (vitellogenin; *VTG*) บางส่วน สำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนตามฤดูกาล และดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index; GSI) ของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียที่รวบรวมได้จากกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา เป็นเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2555 ถึงเดือนพฤษภาคม 2556 โดยนำเนื้อเยื่อตับของปลาเพศเมียมาเพิ่มปริมาณยีน *VTG* ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีน *VTG* ชนิด Ab ได้ โดยมีความยาว 320 คู่เบส ด้วยไพรเมอร์ VF1 และ VR1 และจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน *VTG* ทั้งสามชนิด ได้แก่ Aa, Ab และ C ของปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ พบว่า สามารถแบ่งปลาออกเป็น 3 กลุ่มตามชนิดของยีน *VTG* และยีน *VTG* ที่เพิ่มปริมาณได้ของปลาหมอช้างเหยียบถูกจัดอยู่ในกลุ่มของยีน *VTG* ชนิด Ab เมื่อศึกษาระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน *VTG* และ GSI ของปลาหมอช้างเหยียบ พบว่า ค่าทั้งสองนี้มีระดับสูงสุดใน 2 ช่วงเวลา คือ ในเดือนกรกฎาคมและมกราคมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แสดงให้เห็นว่า ปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยาสามารถวางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้งในรอบปี นอกจากนี้การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน *VTG* และ GSI ด้วยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *VTG* มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่า GSI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (r_s = 0.58; P<0.01) จากผลการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่า นอกจากการใช้ค่า GSI แล้ว ยังสามารถใช้ระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน *VTG* ในการบ่งบอกถึงฤดูกาลวางไข่ของปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยาได้อีกด้วย

คำสำคัญ: ยีนไวเทลโลจีนิน ดัชนีความสมบูรณ์เพศ ปลาหมอช้างเหยียบ กว๊านพะเยา

คำนำ

กว๊านพะเยาเป็นแหล่งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในภาคเหนือ และใหญ่เป็นอันดับ 4 ของประเทศไทย รองลงมาจากบึงบอระเพ็ด หนองหาน และบึงละหาน ตามลำดับ กว๊านพะเยามีความสำคัญต่อคนพะเยาเป็นอย่างมาก ทั้งเพื่อการอุปโภคและบริโภค การใช้เป็นแหล่งน้ำดิบเพื่อการผลิตน้ำประปา การเกษตรและการประมง ตลอดจนเป็นแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญของจังหวัดพะเยา แต่อย่างไรก็ตามน้ำเสียจากกิจกรรมเหล่านี้ถูกปล่อยลงสู่กว๊านพะเยาโดยตรงโดยไม่ผ่านขบวนการบำบัดแต่อย่างใด ทำให้คุณภาพน้ำในกว๊านพะเยาอยู่ในสภาพพอใช้ (กรมควบคุมมลพิษ, 2557) มีการปนเปื้อนของโลหะหนักบางชนิด (Tupwongse *et al*., 2007) และสารฆ่าแมลง (Sapbamrer and Hongsibsong, 2014) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้นได้ (Hanson *et al*., 2007; Ebrahimi and Taherianfard, 2011)

ยีนไวเทลโลจีนิน (vitellogenin; *VTG*) มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นสารตั้งต้นในขบวนการสร้างไข่แดงในสัตว์มีกระดูกสันหลัง รวมถึงปลาด้วยเช่นกัน เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อน มีมวลโมเลกุลประมาณ 300-700 kDa (Johnsen *et al*., 1999) โดยทั่วไปถูกสังเคราะห์ขึ้นในตับของปลาเพศเมียตัวโตเต็มวัยที่พร้อมวางไข่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยเฉพาะ 17β-estradiol (E2) (Wallace, 1985) นอกจากนี้ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index; GSI) มักนิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีของการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาด้วยเช่นกัน โดยมีสมมติฐานว่า ช่วงที่สัตว์น้ำเริ่มวางไข่จะมีค่า GSI สูงสุด แล้วหลังจากนั้นจะลดลงภายหลังจากวางไข่ไปแล้ว (ธนิษฐา และอมรศักดิ์, 2550)

ปลาหมอช้างเหยียบ (*Pristolepis fasciata*) เป็นปลาเศรษฐกิจชนิดหนึ่งในท้องถิ่นของจังหวัดพะเยา นิยมบริโภคทั้งเนื้อและไข่ปลา เนื่องจากเป็นปลาที่มีรสชาติดี และมักนำไข่ปลาชนิดนี้ไปประกอบอาหาร จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยาลดน้อยลง (ศิริลักษณ์ และณัฐวุฒิ, 2557) นอกจากนี้ปลาหมอ

ช้างเหยียบยังเป็นปลากินเนื้อและสัตว์น้ำขนาดเล็ก (สุธิดา และเมธา, 2548) ซึ่งมีความสำคัญต่อความสมดุลของระบบนิเวศในกว๊านพะเยาอีกด้วย

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนไวเทลโลจีนินบางส่วนสำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีนดังกล่าวและดัชนีความสมบูรณ์เพศของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียที่รวบรวมได้จากกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา ตลอดจนศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีนไวเทลโลจีนินและดัชนีความสมบูรณ์เพศ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำในกว๊านพะเยาต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างปลาและการสกัด Total RNA

ทำการรวบรวมปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียในกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา ด้วยเครื่องมือประมงประเภทข่าย ตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2555 ถึงเดือนพฤษภาคม 2556 โดยรวบรวมปลาทุกเดือน เดือนละ 6 ตัวอย่าง ทำการสลบปลาด้วยสารละลาย MS-222 (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 g/l จากนั้นชั่งน้ำหนักปลา และรังไข่เพื่อคำนวณหาดัชนีความสมบูรณ์เพศ (%GSI: น้ำหนักรังไข่ / น้ำหนักปลา x 100) (Htun-Han, 1978) แล้วนำเนื้อเยื่อตับบางส่วนมาสกัด Total RNA โดยใช้ TRI Reagent® (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) และกำจัดดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนใน Total RNA ด้วย DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany) จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ Total RNA ที่สกัดได้ด้วยวิธี 1.0% formaldehyde-agarose gel electrophoresis และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ตามลำดับ

การสังเคราะห์ first-strand cDNA

นำ Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตับของปลาแต่ละตัวอย่าง ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครกรัม มาสังเคราะห์ first-strand cDNA ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป iScript™ Select cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) เพื่อใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการเพิ่มปริมาณยีน *VTG* และ *β-actin* และศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *VTG* ต่อไป

การเพิ่มปริมาณยีน *VTG* และ *β-actin* บางส่วนด้วยเทคนิค RT-PCR

เนื่องจากในฐานข้อมูลต่าง ๆ ยังไม่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* และ *β-actin* ของปลาหมอช้างเหยียบ ดังนั้นจึงต้องทำการเพิ่มปริมาณยีนทั้งสองด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งในการเพิ่มปริมาณยีน *VTG* ใช้ไพรเมอร์ VF1 (5'-CAGGTNTTRGCWCARGAYTG-3') และ VR1 (5'-CCYYTCATCCAGTCNRCAAC-3') ที่ได้จากการทำ alignment ของยีน *VTG* ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จากฐานข้อมูล (Barucca *et al.*, 2006) และยีน *β-actin* ใช้ไพรเมอร์ actinf (5'-CAGGGAGAAGATGACCCAGAT-3') และ actinr (5'-GATACCGCAGGACTCCATACC-3') (Scholz and Gutzeit, 2000) โดยยีน *β-actin* ใช้เป็นยีนอ้างอิงในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *VTG*

ในปฏิกิริยา RT-PCR ที่มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTPs ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 10 µM primers ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร, 1 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Vilnius, Lithuania) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และ first-strand cDNA ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีสภาวะการควบคุมอุณหภูมิจำนวน 30 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ของยีน *VTG* และ *β-actin* ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งทางด้าน 5' และ 3' ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม BLASTn และ BLASTx (Altschul *et al*., 1990) ในการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนที่เป็นไปได้ ตามลำดับ เพื่อให้ทราบชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* ของปลาหมอช้างเหยียบ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* และ *β-actin* ที่ได้ใส่ในฐานข้อมูล GenBank

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG*

ทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* ของปลาหมอช้างเหยียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* ทั้งสามชนิดของปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ในบริเวณเดียวกัน โดยสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura *et al*., 2007) วิธี Neighbor joining (NJ) และกำหนดค่า Bootstrap ที่ 1000 replicates

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *VTG* ด้วยเทคนิค real-time PCR

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* และ *β-actin* ทั้งทางด้าน 5' และ 3' ที่ได้มาประกอบเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม ClustalW (Thompson *et al*., 1994) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 บนฐานข้อมูล GenBank เพื่อใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *VTG* ดังนี้ PfVTG-1fq (5'-AGTAATCTGCCGTACCAGCACCCAG-3') และ PfVTG-1rq (5'-GTTGGAAGCATGGAGAGCGATGCC-3') โดยใช้ยีน *β-actin* เป็นยีนอ้างอิงที่มีไพรเมอร์ ดังนี้ PfACT-1fq (5'-ACTTGGCTGGTCGGGACCTCAC-3') และ PfACT-1rq (5'-TTTCGGCTGTGGTGGTGAAGGAGT-3') จากนั้นทำปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้เครื่อง MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ซึ่งมีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x iQ™ SYBR® Green Supermix ปริมาตร 13 ไมโครลิตร, 5 μM primers ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร และ first-strand cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยมีสภาวะการควบคุมอุณหภูมิจำนวน 40 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที, 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที โดยทำปฏิกิริยาตัวอย่างละ 2 ซ้ำในแต่ละยีน จากนั้นทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *VTG* ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta_{CT}}$ (Livak and Schmittgen, 2001) โดยใช้ค่าระดับการแสดงออกของยีน *VTG* ของเดือนที่สูงที่สุดเป็น reference

การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของยีน *VTG* และค่า GSI ตามฤดูกาลของปลาหมอช้างเหยียบ

ทำการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation analysis) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *VTG* และค่า GSI ของปลาหมอช้างเหยียบในแต่ละเดือน โดยทดสอบสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson product moment correlation) หรือสหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน (Spearman rank correlation) ขึ้นอยู่กับการกระจายตัวของข้อมูล ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (P<0.01)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการแสดงออกของยีน *VTG* และค่า GSI ด้วยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)

ผลการทดลอง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* และ *β-actin* บางส่วน

จากการเพิ่มปริมาณยีน *VTG* และ *β-actin* บางส่วนจากเนื้อเยื่อตับของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมีย พบว่า มีความยาวเท่ากับ 320 และ 478 คู่เบส ตามลำดับ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองยีนที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไปเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ Accession number KU575010 และ KU575011

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่เป็นไปได้ของยีน *VTG* ของปลาหมอช้างเหยียบไปเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn และ BLASTx ตามลำดับ พบว่า ยีน *VTG* ของปลาหมอช้างเหยียบที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นชนิด Ab โดยลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับยีน *VTG* ของปลากะพงขาว (*Dicentrarchus labrax*; Accession number JQ283442) มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 85 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *VTG* ของปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*; Accession number X92804) พบว่า ตรงกับลำดับกรดอะมิโนที่ 1416-1521 ซึ่งอยู่ในตำแหน่งของโดเมน lipovitellin II (LVII)

จากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงและตรวจสอบตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่เป็นไปได้ของยีน *β-actin* ของปลาหมอช้างเหยียบด้วยโปรแกรม BLASTx พบว่า ตรงกับลำดับกรดอะมิโนที่ 116-274 ของปลากา (*Labeo calbasu*; Accession number AF393832)

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG*

เนื่องจากยีน *VTG* มีทั้งหมด 3 ชนิด คือ Aa, Ab และ C จึงทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* ทั้งสามชนิดนี้ในปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ โดยสร้างแผนภูมิต้นไม้ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามชนิดของยีน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* ของปลาหมอช้างเหยียบที่เพิ่มปริมาณได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของยีน *VTG* ชนิด Ab (ภาพที่ 1)

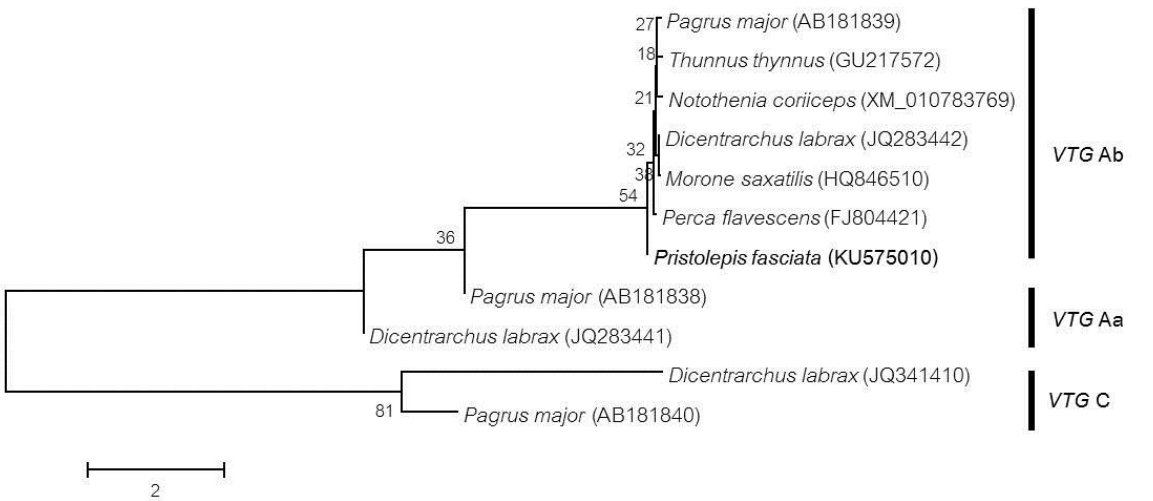

Figure 1. Phylogenetic tree of nucleotide sequences of three types of *VTG*, including Aa, Ab and C from other teleost fishes was constructed using the neighbor joining method. The *VTG*s sequences of fishes and their GenBank accession numbers are shown. The number presented the bootstrap value from 1000 replicates. The number of scale is shown the sequence divergence

ระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน *VTG* ของปลาหมอช้างเหยียบ

เมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *VTG* ของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียในกว๊านพะเยา เป็นระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2555 ถึงเดือนพฤษภาคม 2556 ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่า มีระดับการแสดงออกสูงสุดใน 2 ช่วงเวลา คือ ช่วงแรกมีระดับการแสดงออกของยีน *VTG* เพิ่มขึ้นจากเดือนพฤษภาคม (0.31 ± 0.09%) จนถึงเดือนกรกฎาคม (1.00 ± 0.19%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยมีค่าสูงสุดในเดือนกรกฎาคม และช่วงที่สองมีระดับการแสดงออกของยีน *VTG* เพิ่มขึ้นจากเดือนตุลาคม (0.03 ± 0.02%) จนถึงเดือนมกราคม (0.99 ± 0.14%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยมีค่าสูงสุดในเดือนมกราคม ซึ่งหลังจากเดือนกรกฎาคมและมกราคมแล้ว ระดับการแสดงออกของยีนนี้จะลดลงทันทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ภาพที่ 2A)

ดัชนีความสมบูรณ์เพศตามฤดูกาลของปลาหมอช้างเหยียบ

จากการศึกษาดัชนีความสมบูรณ์เพศของปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยา เป็นระยะเวลา 1 ปี โดยรวบรวมปลาทุกเดือน เดือนละ 6 ตัวอย่าง ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 58.85 ± 17.56 กรัม พบว่า มีค่าสูงสุด 2 ช่วง เช่นเดียวกับการแสดงออกของยีน *VTG* ซึ่งช่วงแรกมีค่าสูงสุดในเดือนกรกฎาคม โดยเพิ่มจากเดือนมีนาคม (2.63 ± 0.15%) จนถึงเดือนกรกฎาคม (10.05 ± 2.61%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และช่วงที่สองมีค่าสูงสุดในเดือนมกราคม โดยเพิ่มจากเดือนตุลาคม (2.17 ± 0.58%) จนถึงเดือนมกราคม (6.83 ± 0.71%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ซึ่งภายหลังจากที่ปลาหมอช้างเหยียบวางไข่แล้ว ค่า GSI จะลดลงทันทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ภาพที่ 2B)

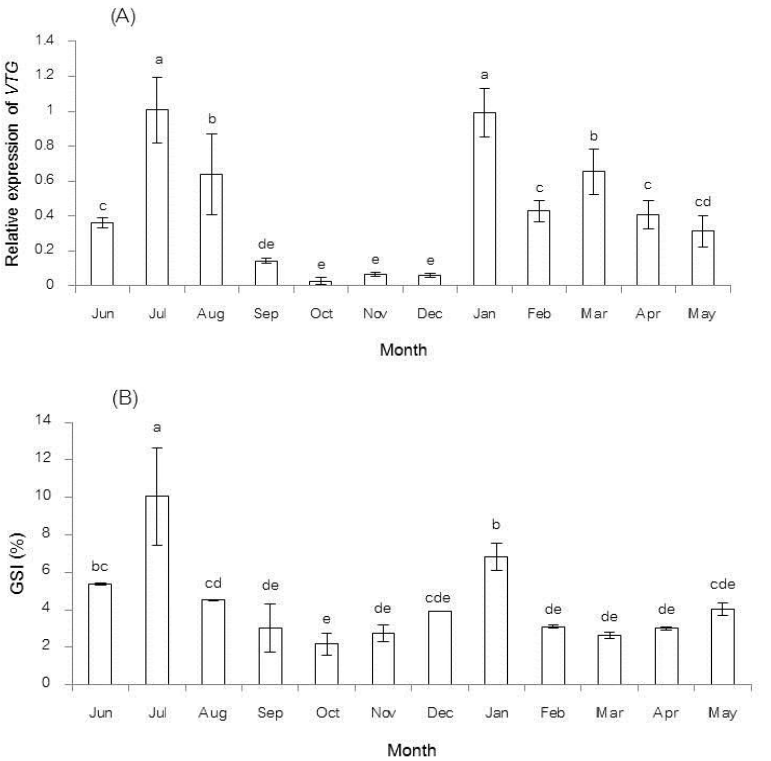

Figure 2. Mean values of relative expression levels of vitellogenin gene (A) and gonadosomatic index (B) in *Pristolepis fasciata* (n = 6 in each month) in Kwan Phayao. Different letters indicate statistically significant differences (P<0.05)

ความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน *VTG* และค่า GSI ของปลาหมอช้างเหยียบ

จากการทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล พบว่าข้อมูลครั้งนี้มีการกระจายไม่เป็นโค้งปกติ ดังนั้นสหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมนมีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน *VTG* มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงหรือโดยตรงกับค่า GSI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (r_s = 0.58; P<0.01) เมื่อระดับการแสดงออกของยีน *VTG* เพิ่มขึ้น ค่า GSI ก็จะเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน และในทางกลับกัน เมื่อระดับการแสดงออกของยีน *VTG* ลดลง ค่า GSI ก็จะลดลงด้วยเช่นเดียวกัน โดยระดับการแสดงออกของยีน *VTG* และค่า GSI จะมีค่าสูงเพิ่มขึ้นในช่วงฤดูกาลวางไข่ และภายหลังจากที่ปลาหมอช้างเหยียบวางไข่แล้วนั้น ค่าทั้งสองจะลดลงทันที

วิจารณ์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* บางส่วน

ในปลาโดยทั่วไปพบยีน *VTG* ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ชนิด Aa, Ab และ C (Yilmaz *et al*., 2015) หรือชนิด I, II และ III (Wang *et al*., 2000) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน *VTG* ของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียได้เป็นชนิด Ab หรือชนิด II นั่นเอง นอกจากนี้ยีน *VTG* แต่ละชนิดยังประกอบด้วย 3 โดเมน คือ โดเมน lipovitellin I (LVI), phosvitin (PV) และ lipovitellin II (LVII) (Wallace, 1985) ซึ่งยีน *VTG* ชนิด Ab ที่เพิ่มปริมาณได้นั้นอยู่ในตำแหน่งของโดเมน lipovitellin II โดยโดเมน lipovitellin ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารจำพวกกรดอะมิโนและไขมันที่สำคัญต่อการพัฒนาของตัวอ่อน (Patiño and Sullivan, 2002)

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG*

จากแผนภูมิต้นไม้ที่แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* ทั้งสามชนิดในปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ พบว่า ยีน *VTG* ทั้งสามชนิดถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน โดยยีนที่เพิ่มปริมาณได้ของปลาหมอช้างเหยียบถูกจัดอยู่ในกลุ่มยีน *VTG* ชนิด Ab เป็นการยืนยันชนิดได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยีน *VTG* ชนิด C ถูกแยกต่างหากออกจากชนิด Aa และ Ab อย่างชัดเจน เนื่องจากชนิด C มีความยาวที่สั้นที่สุด เพราะไม่มีโดเมน phosvitin (Wang *et al*., 2000)

ความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน *VTG* และค่า GSI ของปลาหมอช้างเหยียบ

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน *VTG* และค่า GSI ของปลาหมอช้างเหยียบมีค่าสูงสุดใน 2 ช่วงเวลาเดียวกัน คือ ในช่วงเดือนกรกฎาคมซึ่งเป็นฤดูฝน โดยปลาส่วนใหญ่มักวางไข่ในช่วงนี้และเดือนมกราคม แสดงว่าปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยามีการวางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้งในรอบปี สอดคล้องกับการศึกษาของศิริลักษณ์ และณัฐวุฒิ (2557) ได้ศึกษาฤดูกาลวางไข่ของปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยา ระหว่างเดือนมิถุนายน 2555 ถึงเดือนพฤษภาคม 2556 จากปลาเพศเมีย จำนวน 307 ตัว พบว่า ค่า GSI มีค่าค่อนข้างสูงตลอดทั้งปี โดยสูงสุดในเดือนสิงหาคม แสดงให้เห็นว่า ปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยามีการวางไข่ได้ตลอดทั้งปีหรือมากกว่า 1 ครั้งในรอบปีเช่นเดียวกัน โดยน้ำหนักของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมีย ทั้ง 72 ตัวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีน้ำหนักเฉลี่ย 58.85 ±17.56 กรัม ซึ่งถือว่าอยู่ในช่วงวัยเจริญพันธุ์สามารถใช้เป็นตัวแทนในการศึกษานี้ได้ เนื่องจากมีน้ำหนักใกล้เคียงกับการศึกษาของสุธิดา และเมธา (2548) คือ 39.39 ± 29.93 กรัม นอกจากนี้ยังมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 18.00-170.00 กรัม ตามการศึกษาของศิริลักษณ์ และณัฐวุฒิ (2557) อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามเดือนที่มีค่า GSI สูงสุดของการศึกษานี้มีความแตกต่างจากการศึกษาของศิริลักษณ์ และณัฐวุฒิ (2557) ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากจำนวนและน้ำหนักของปลาตัวอย่างที่แตกต่างกัน

เนื่องจาก *VTG* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนไข่แดงเพื่อเป็นอาหารสำหรับตัวอ่อน ดังนั้นในช่วงฤดูกาลวางไข่ พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *VTG* และค่า GSI สูงสุดในปลาหลายชนิด ได้แก่ ปลาดุกอุย (Panprommin *et al*., 2008) ปลาสลาด และปลาไส้ตัน

ตาขาว (Panprommin *et al*., 2015) โดยระดับการแสดงออกของยีน *VTG* สามารถบ่งบอกได้ถึงระยะของพัฒนาการของไข่ได้ (Mikawa *et al*., 2006)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน *VTG* และค่า GSI ของปลาหมอช้างเหยียบโดยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *VTG* และค่า GSI มีความสัมพันธ์โดยตรงกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Panprommin *et al*. (2015) พบว่า ระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน *VTG* และค่า GSI ของปลาสลาดและปลาไส้ตันตาขาวมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่านอกจากการใช้ดัชนีความสมบูรณ์เพศในการบ่งบอกถึงฤดูกาลวางไข่ของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียในกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยาแล้ว ยังสามารถใช้ระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน *VTG* ได้อีกด้วย นอกจากนี้กรมประมงได้กำหนดให้ตั้งแต่วันที่ 16 พฤษภาคม ถึง 15 กันยายน ของทุกปีเป็นฤดูปลามีไข่ในน่านน้ำจืดในท้องที่ทั่วประเทศ ห้ามมิให้ผู้ใดทำการประมงด้วยเครื่องมือทำการประมง หรือด้วยวิธีใด ๆ ทั้งสิ้น เพื่อให้ปลาได้มีโอกาสผสมพันธุ์ วางไข่ และขยายพันธุ์ต่อไปได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับฤดูกาลวางไข่ของปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยาแล้ว พบว่า สอดคล้องกับช่วงเวลาที่กรมประมงกำหนดบางช่วงเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามก็คาดว่าน่าจะเพียงพอให้ปลาชนิดนี้ได้มีโอกาสขยายพันธุ์ต่อไปได้

สรุป

ยีน *VTG* ที่เพิ่มปริมาณได้จากเนื้อเยื่อตับของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียเป็นชนิด Ab ซึ่งระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีศักยภาพในการบ่งบอกถึงความสมบูรณ์เพศและฤดูกาลวางไข่ได้เช่นเดียวกับค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ เนื่องจากค่าทั้งสองนี้มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อกัน โดยปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียในกว๊านพะเยาสามารถวางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้งในรอบปี คือ ในช่วงเดือนกรกฎาคมและมกราคม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ภายใต้โครงการ “การบริหารจัดการทรัพยากรประมงในกว๊านพะเยา เพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์เชิงอนุรักษ์อย่างยั่งยืน” และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ขอขอบคุณหัวหน้าห้องปฏิบัติการกลาง และคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ. 2557. รายงานประจำปี สำนักจัดการคุณภาพน้ำ พ.ศ. 2557. กรมควบคุมมลพิษ, กรุงเทพฯ. 116 หน้า.

ธนิษฐา ทรรพนันทน์ ใจดี และ อมรศักดิ์ สวัสดี. 2550. คู่มือชีววิทยาประมงภาคปฏิบัติ. บริษัท มิสเตอร์ก๊อปปี้ (ประเทศไทย) จำกัด, กรุงเทพฯ. 92 หน้า.

ศิริลักษณ์ วลัญช์เพียร และ ณัฐวุฒิ งามสม. 2557. ฤดูกาลวางไข่ของปลาหมอช้างเหยียบ (*Pristolepis fasciata*) ในกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา. แก่นเกษตร 42(ฉบับพิเศษ 1): 768-772.

สุธิดา โส๊ะบีน และ เมธา คชาภิชาติ. 2548. ชีววิทยาบางประการของปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 25/2548. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพ.

Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-410.

Barucca, M., A. Canapa, E. Olmo and F. Regoli. 2006. Analysis of vitellogenin gene

induction as a valuable biomarker of estrogenic exposure in various Mediterranean fish species. Environmental Research 101: 68-73.

Ebrahimi, M. and M. Taherianfard. 2011. The effects of heavy metals exposure on reproductive systems of cyprinid fish from Kor river. Iranian Journal of Fisheries Sciences 10(1): 13-24.

Hanson, R., D.K. Dodoo, D.K. Essumang, J. Blay, Jr., and K. Yankson. 2007. The effect of some selected pesticides on the growth and reproduction of fresh water *Oreochromis niloticus*, *Chrysicthys nigrodigitatus* and *Clarias gariepinus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 79(5): 544-547.

Htun-Han, M. 1978. The reproductive biology of the dab *Limanda limanda* (L.) in the North Sea: gonosomatic index, hepatosomatic index and condition factor. Journal of Fish Biology 13: 369-378.

Johnsen, H.K., H. Tveiten, N.P. Willassen and A.M. Arnesen. 1999. Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay. Comparative Biochemistry and Physiology 124 B: 355-362.

Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta Ct) method. Methods 25: 402-408.

Mikawa, N., T. Utoh, N. Horie, A. Okamura, Y. Yamada, A. Akazawa, S. Tanaka, K. Tsukamoto, I. Hirono and T. Aoki. 2006. Cloning and characterization of vitellogenin cDNA from the common Japanese conger *Conger myriaster* and vitellogenin gene expression during ovarian development. Comparative Biochemistry and Physiology B 143(4): 404-414.

Mouchel, N., V. Trichet, A. Betz, J.-P.L. Pennec and L. Wolff. 1996. Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gene 174: 59-64.

Panprommin, D., S. Pithakpol, S. Valunpion and K. Soontomprasit. 2015. Correlation of spawning season and maturational parameters, expression levels of vitellogenin genes in *Notopterus notopterus* and *Anematichthys armatus* in Kwan Phayao, Thailand. Kasetsart University Fisheries Research Bulletin 39(3): 1-14.

Panprommin, D., S. Poompuang and P. Srisapoome. 2008. Molecular characterization and seasonal expression of the vitellogenin gene from Günther's walking catfish *Clarias microcephalus*. Aquaculture 276: 60-68.

Patiño, R. and C.V. Sullivan. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. Fish Physiology and Biochemistry 26(1): 57-70.

Sapbamrer, R. and S. Hongsibsong. 2014. Organophosphorus pesticide residues in vegetables from farms, markets, and a supermarket around Kwan Phayao Lake of Northern Thailand. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 67: 60-67.

Scholz, S. and H.O. Gutzeit. 2000. 17-α-ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). Aquatic Toxicology 50: 363-373.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.

Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680.

Tupwongse, V., P. Parkpian, P. Watcharasit and J. Satayavivad. 2007. Determination of levels of Mn, As, and other metals in water, sediment, and biota from Phayao Lake, Northern Thailand, and assessment of dietary exposure. Journal of environmental science and health. A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 42(8): 1029-1041.

Wallace, R.A. 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. pp. 127-177. *In*: L.W. Browder (ed.). Developmental Biology. vol. i. Plenum Press, New York.

Wang, H., T. Yan, J.T. Tan and Z. Gong. 2000. A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. Gene 256: 303-310.

Yilmaz, O., F. Prat, A.J. Ibañez, H. Amano, S. Koksoy and C.V. Sullivan. 2015. Estrogen-induced yolk precursors in European sea bass, *Dicentrarchus labrax*: Status and perspectives on multiplicity and functioning of vitellogenins. General and Comparative Endocrinology 221: 16-22.

องค์ประกอบทางโภชนาการและปริมาณสารอัลลิซิน ในกระเทียมผงสายพันธุ์ศรีสะเกษ เชียงใหม่ และจีน

Nutritional Compositions and Allicin Content in Garlic Powder Si Sa Ket, Chiang Mai and Chinese Garlic Cultivars

ธัญญารัตน์ สมสู่[1/] สุธา วัฒนสิทธิ์[1/] สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์[2/] และ ศิริวัฒน์ วาสิกศิริ[3/]

Thanyarat Somsu[1/], Sutha Wattanasit[1/], Supreeya Yuenyongsawad[2/] and Siriwat Wasiksiri[3/]

[1/]ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา 90110

[1/]Department of Animal Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

[2/]ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา 90110

[2/]Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

[3/]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา 90110

[3/]Faculty of Veterinary Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

**Corresponding author: Email: nine_koy_auto@hotmail.com*

(Received: 12 July 2016; Accepted: 29 November 2016)

Abstract: The aim of this study is to determine nutritional compositions and allicin concentration of dried garlic powder produced from Si Sa Ket, Chiang Mai and Chinese garlic cultivars. The action of allicin help to inhibit *Salmonella* Typhimurium growth and this research can use a basic data for apply in animals. The results found that Chiang Mai dried garlic powder had the highest (P<0.05) nutritional compositions (90.75 ± 0.03% dry matter, 26.86 ± 0.09% crude protein, 0.94 ± 0.19% crude fat, 4.62 ± 0.03% crude fiber and 3.89 ± 0.04% ash). Chinese dried garlic powder had the highest nitrogen free extract at 63.39 ± 0.33% (P<0.05). Allicin concentration of Chinese dried garlic powder was 7.27 ± 0.55 mg per gram and significantly higher than those of Si Sa Ket dried garlic powder (3.68 ± 0.06 mg per gram) and Chiang Mai dried garlic powder (4.82 ± 0.02 mg per gram) (P<0.05).

Keywords: Garlic powder, garlic, allicin, nutritional compositions

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางโภชนาการและปริมาณสารอัลลิซินของกระเทียมผงในสายพันธุ์ศรีสะเกษ สายพันธุ์เชียงใหม่ และสายพันธุ์จีน และการศึกษาฤทธิ์ของแอลลิซินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Salmonella* Typhimurium เพื่อเป็นข้อมูลทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้นก่อนนำไปประยุกต์ในสัตว์ทดลองต่อไป และจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ากระเทียมผงสายพันธุ์เชียงใหม่มีค่าน้ำหนักแห้ง 90.75 ± 0.03% โปรตีนทั้งหมด 26.86 ± 0.09% ไขมันทั้งหมด 0.94 ± 0.19% กากอาหารทั้งหมด 4.62 ± 0.03% และเถ้า 3.89 ± 0.04% ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่ากระเทียมผงสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรกจะมีมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกระเทียมผงสายพันธุ์จีนอยู่ที่ 63.39 ± 0.33% สำหรับปริมาณสารแอลลิซินพบว่ากระเทียมผงสายพันธุ์จีนมีปริมาณสารแอลลิซินสูงที่สุดในปริมาณ 7.27 ± 0.55 มิลลิกรัมต่อกระเทียมผง 1 กรัม ในขณะที่กระเทียมผงสายพันธุ์ศรีสะเกษและเชียงใหม่มีปริมาณสารอัลลิซินในปริมาณ 3.68 ± 0.06 และ 4.82 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อกระเทียมผง 1 กรัมตามลำดับ (P<0.05)

คำสำคัญ: กระเทียมผง กระเทียมสด อัลลิซิน องค์ประกอบทางโภชนาการ

คำนำ

กระเทียม เป็นพืชล้มลุกในวงศ์ Alliaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Allium sativum* กระเทียมเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถพบได้โดยทั่วไป โดยมีส่วนหัวอยู่ใต้ดิน ในแต่ละหัวประกอบด้วยกลีบเรียงซ้อนกันประมาณ 4-15 กลีบ หยั่งรากลึกประมาณ 16 นิ้ว แผ่ออกกว้างประมาณ 10 นิ้ว ลำต้นมีลักษณะแข็งสีขาว ส่วนใบมีลักษณะยาวแบน ปลายใบแหลมและแคบ สามารถจำแนกประเภทของกระเทียมตามระยะเวลาเก็บเกี่ยว ดังนี้ 1) กระเทียมพันธุ์เบา เป็นกระเทียมที่มีอายุการเก็บเกี่ยวที่ 75 วัน ได้แก่ กระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษ 2) กระเทียมพันธุ์กลาง เป็นกระเทียมที่มีอายุการเก็บเกี่ยวที่ 100-120 วัน ได้แก่ กระเทียมสายพันธุ์เชียงใหม่ และ 3) กระเทียมพันธุ์หนัก เป็นกระเทียมที่มีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 135-150 วัน ได้แก่ กระเทียมสายพันธุ์จีน ซึ่งในประเทศไทยมีแหล่งผลิตกระเทียมอยู่ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครพนม ศรีสะเกษ ชัยภูมิ ในภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดลพบุรี และภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน พะเยา ลำปาง ตาก ลำพูน เชียงราย เพชรบูรณ์ น่าน แพร่และอุตรดิตถ์ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558; Ankri and Mirelman, 1999)

กระเทียมเป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาในการต้านเชื้อจุลชีพต่าง ๆ ได้แก่ เชื้อรา เช่น *Candida albicans* โปรโตซัว เช่น *Giardia lamblia* แบคทีเรีย เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium และไวรัส โดยองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของกระเทียม ได้แก่ allicin, ajoene, S-allylcysteine, diallyl disulfide, S-methylcysteine sulfoxide และ S-allylcysteine sulfoxide ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพต่าง ๆ คือ สารแอลลิซิน (allicin หรือ diallyl thiosulfinate) สารแอลลิซินที่เก็บสะสมในกระเทียมอยู่ในรูปของสารแอลลิอิน (alliin) ซึ่งสารแอลลิอินเป็นสารตั้งต้น แต่เมื่อกระเทียมถูกทำให้แตก อาจด้วยการทุบ บด หรือ หั่นจะมีปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลลิเนส (alliinase) เกิดขึ้น โดยเอนไซม์แอลลิเนสมีกลไกในการเปลี่ยนสารแอลลิอินให้กลายเป็นสารแอลลิซินซึ่งเป็นรูปที่พร้อมที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพต่าง ๆ (Feldberg *et al*., 1988; Ankri and Mirelman, 1999; Curtis *et al*., 2004; Yabaya *et al*., 2010)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางโภชนาการของกระเทียมผงผลิตจากกระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษ สายพันธุ์เชียงใหม่และสายพันธุ์จีน และเปรียบเทียบปริมาณสารแอลลิซินในกระเทียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพจากกระเทียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งความแตกต่างระหว่างองค์ประกอบทางโภชนาการและปริมาณสารแอลลิซินในกระเทียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของกระเทียม ช่วงอายุที่เก็บ

เกี่ยวและสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการปลูก ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน ระยะเวลาของแสงแดดในแต่ละวันและธาตุอาหารที่ให้เสริมขณะปลูก (พิษณุ, 2555) และการศึกษาการใช้พืชสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลายังเป็นทางเลือกหนึ่งในการทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ (Antibiotic) ซึ่งมีผลในการตกค้างในเนื้อสัตว์และมีกฎหมายจำกัดการใช้ในยุโรปตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997 รวมถึงการลดการใช้สารทางเลือกอื่น ๆ ในสัตว์ เช่น พรีไบโอติกส์ โปรไบโอติกส์ และกรดอินทรีย์ เป็นต้น เพื่อช่วยสนับสนุนให้มีการใช้พืชสมุนไพรที่มีในท้องถิ่นเพิ่มมากขึ้นด้วย (มนัสนันท์ และคณะ, 2558; อัจฉรา, 2559; Maron *et al*., 2013)

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ของกระเทียมสดสายพันธุ์จีน เชียงใหม่และศรีสะเกษ นำกระเทียมสดสายพันธุ์ศรีสะเกษ สายพันธุ์เชียงใหม่ และสายพันธุ์จีน ทำการปอกเปลือกให้เหลือเฉพาะส่วนเนื้อกลีบของกระเทียมหลังจากนั้นใช้มีดหั่นกระเทียมเป็นแผ่นบาง ๆ วางลงบนกระจกสไลด์ นำสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% (w/v) หยดลงบนชิ้นส่วนกระเทียมบนกระจกสไลด์แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การเตรียมกระเทียมผงแห้ง นำกระเทียมสดสายพันธุ์ศรีสะเกษ สายพันธุ์เชียงใหม่ และสายพันธุ์จีน ทำการปอกเปลือกให้เหลือเฉพาะส่วนเนื้อกลีบของกระเทียมหลังจากนั้นทุบและสับให้ละเอียด แล้ววางทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ก่อนนำกระเทียมอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จนมีค่าความชื้นน้อยกว่า 10% จากนั้นนำกระเทียมที่ได้มาบดด้วยเครื่องบดละเอียดโดยใช้ตะแกรงขนาด 20 เมช (mesh)

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางโภชนาการ วิเคราะห์หาค่าความชื้น โปรตีนทั้งหมด ไขมันทั้งหมด เถ้ากากอาหารทั้งหมด และไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรกโดยอ้างอิงตามวิธีของ AOAC (1990)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอลลิซิน ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้ butyl parahydroxybenzoate 20 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอลและน้ำกลั่นไม่มีไอออนในอัตราส่วน 50:50 (v/v) จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อ้างอิงตามมาตรฐานของ Office of British Pharmacopoiea (2009) และเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ โดยการใช้กระเทียมผง 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นไม่มีไอออน 20 มิลลิลิตร เขย่า 5 นาที แล้วนำไปสกัดด้วยอ่างอัลตร้าโซนิกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 5,000 รอบต่อนาที 30 นาที หลังจากนั้นทำการแยกสารละลายส่วนใส 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางด้วยกรดฟอร์มิกผสมกับเมทานอลในอัตราส่วน 40:60 (v/v) จนได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการแยกสารละลายสารที่เตรียมในปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่ใช้ในการทดสอบ หลังจากนั้นนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอลลิซินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (1100 Agilent Technologies, Germany) ด้วยคอลัมน์ hypersil ODS ขนาด 4.0 x 250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ คือ เมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 50:50 โดยใช้ตัวตรวจวัดชนิด variable wavelength detector (VWD) และใช้ butyl parahydroxybenzoate เป็นสารมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบกับสารแอลลิซิน โดยการอ้างอิงตามมาตรฐานของ Office of British Pharmacopoiea (2009) และ National Sanitation Foundation (2005)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการและปริมาณสารอัลลิซินของกระเทียมสายพันธุ์จีน พันธุ์เชียงใหม่และพันธุ์ศรีสะเกษ จำนวนตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS) version 9.1.3 for Windows (Cary, NC 27513, USA) สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple range test (Steel and Torrie, 1980)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ของกระเทียมสายพันธุ์จีน พันธุ์เชียงใหม่และพันธุ์ศรีสะเกษ

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของกระเทียมทั้ง 3 สายพันธุ์จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่ามีลักษณะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างกันในส่วนของปริมาณต่อมน้ำมัน โดยพบว่าในพื้นที่ 4x4 ตารางมิลลิเมตร กระเทียมสายพันธุ์จีนมีจำนวนต่อมน้ำมันเท่ากับ 20 ต่อมน้ำมัน กระเทียมสายพันธุ์เชียงใหม่มีจำนวนต่อมน้ำมันเท่ากับ 15 ต่อมน้ำมัน และกระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษมีจำนวนต่อมน้ำมันเท่ากับ18 ต่อมน้ำมัน (P<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าในพื้นที่เท่ากับกระเทียมสายพันธุ์จีนมีความหนาแน่นของต่อมน้ำมันมากกว่ากระเทียมสายพันธุ์เชียงใหม่และสายพันธุ์ศรีสะเกษ

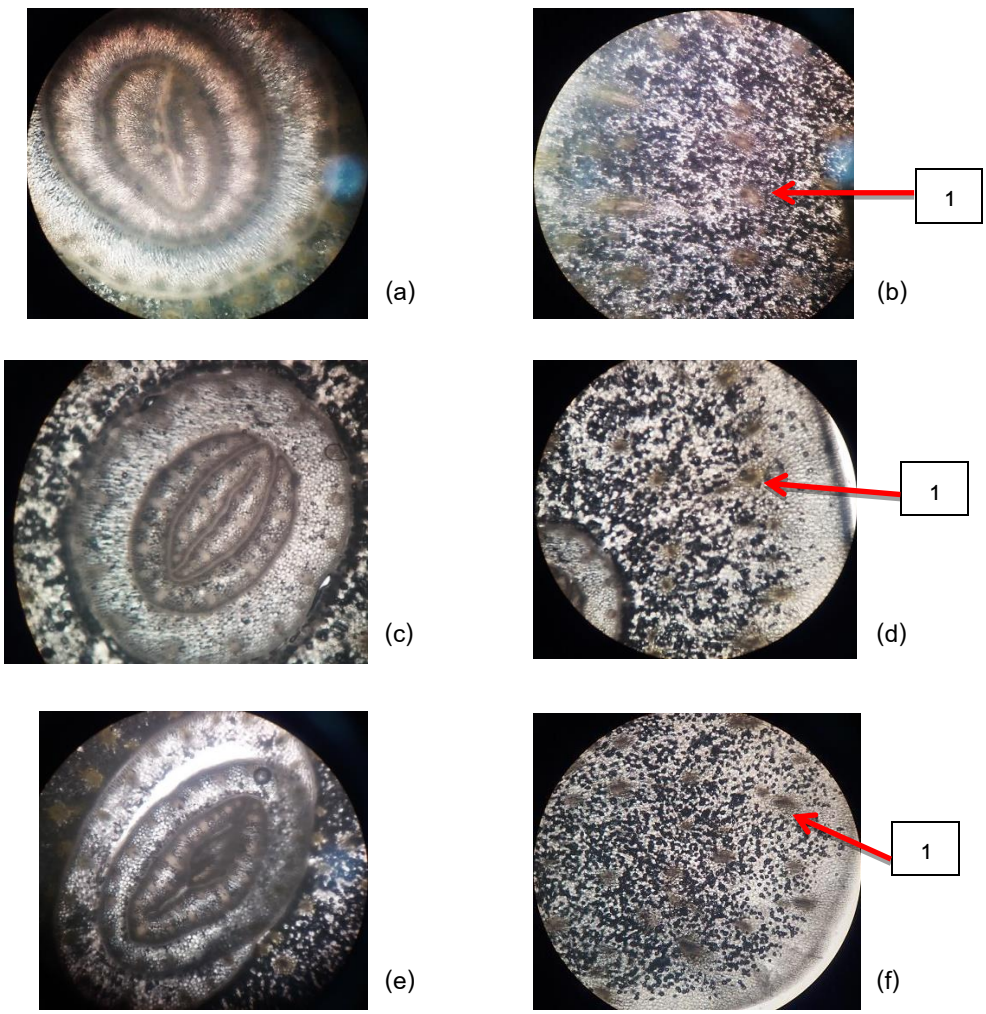

Figure 1. Microscopic characterization of Chinese, Chiang Mai and Si Sa Ket garlic cultivars
(a), (c), (e) Chinese, Chiang Mai and Si Sa Ket garlic cultivars respectively (Total segment). Scale bar = 4 mm
(b), (d), (f) Chinese, Chiang Mai and Si Sa Ket garlic cultivars respectively (only essential oil cavity part), scale bar = 1 mm
(1) essential oil gland

Table 1. Essential oil gland in Chinese, Chiang Mai and Si Sa Ket garlic cultivars (mean ± S.D.)

Cultivars (area 4x4 mm^2)	Number of essential oil gland (glands)
Chinese garlic cultivars	20.00^{a} ± 2.08
Chiang Mai garlic cultivars	15.00^{b} ± 1.00
Si Sa Ket garlic cultivars	18.00^{ab} ± 1.53

[a,b/] Superscript within a column differ significantly at $P<0.05$

องค์ประกอบทางโภชนาการของกระเทียมผงสายพันธุ์ศรีสะเกษ สายพันธุ์เชียงใหม่และสายพันธุ์จีน

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนะอ้างอิงตามวิธีการของ AOAC (1990) พบว่ากระเทียมผงสายพันธุ์ศรีสะเกษมีค่าวัตถุแห้ง โปรตีนรวม ไขมันรวม เยื่อใยรวม เถ้าและไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรก ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่ากระเทียมสายพันธุ์เชียงใหม่จะมีค่าน้ำหนักแห้ง โปรตีนทั้งหมดและเถ้ามากกว่ากระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษและสายพันธุ์จีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และมีค่าไขมันทั้งหมดและกากอาหารทั้งหมดมากกว่ากระเทียมสายพันธุ์อื่น ๆ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่กระเทียมสายพันธุ์จีนมีค่าไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกระเทียมผงสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากการศึกษากระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษ พบว่าค่าโปรตีนทั้งหมดสอดคล้องกับงานทดลองของ Somsri (1985) อ้างโดย Saenkhunthow (2002) ในขณะที่กระเทียมสายพันธุ์เชียงใหม่และสายพันธุ์จีนมีค่าเถ้าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Somsri (1985) อ้างโดย Saenkhunthow (2002) และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยในต่างประเทศพบว่าค่าไขมันรวมในกระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษเท่ากับ 0.94 ± 0.19% ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Okolo *et al*. (2012)ทำการวิเคราะห์ในกระเทียมผงจากประเทศไนจีเรียพบว่ามีค่าไขมันรวมอยู่ที่ 0.87 ± 0.01% และค่าน้ำหนักแห้งของกระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษ เชียงใหม่และจีนเท่ากับ 90.33 ± 0.04%, 90.75 ± 0.03% และ 90.67 ± 0.01% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Oluwatoyin (2014) ทดลองในกระเทียมผงจากประเทศไนจีเรียพบว่ามีค่าน้ำหนักแห้งเท่ากับ 90.30 ± 0.30% ค่าโปรตีนทั้งหมดของกระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษและสายพันธุ์เชียงใหม่มีค่าเท่ากับ 26.22 ± 0.07% และ 26.86 ± 0.09% ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Oluwatoyin (2014) ที่ทำการทดลองในกระเทียมผงจากประเทศไนจีเรียโดยมีค่าโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 27.40 ± 0.50% ในขณะที่ค่าโปรตีนทั้งหมดของกระเทียมสายพันธุ์จีนมีค่าโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 16.93 ± 0.17% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sultan *et al*. (2014) ที่ทดลองในกระเทียมจากประเทศปากีสถานพบว่ามีค่าโปรตีนทั้งหมดอยู่ที่ 17.85 ± 0.77% รวมถึงค่าไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกของกระเทียมสายพันธุ์จีนเท่ากับ 63.39 ± 0.33% ซึ่งมีค่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sultan *et al*. (2014) ที่ทดลองในกระเทียมจากประเทศปากีสถานพบว่ามีค่าไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกอยู่ที่ 63.33 ± 3.10%

ปริมาณสารแอลลิซินจากกระเทียมผงสายพันธุ์ศรีสะเกษ สายพันธุ์เชียงใหม่และสายพันธุ์จีน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารแอลลิซินจากกระเทียมผงสายพันธุ์ศรีสะเกษ สายพันธุ์เชียงใหม่และสายพันธุ์จีนตามมาตรฐานของ National Sanitation Foundation (2005) และ Office of British Pharmachopoeia (2009) ในกระเทียมผงสายพันธุ์ศรีสะเกษ สายพันธุ์เชียงใหม่และสายพันธุ์จีน พบว่ามีปริมาณสารแอลลิซินดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งกระเทียมผงสายพันธุ์จีนนั้นมีค่าสารแอลลิซินสูงกว่ากระเทียมผงสายพันธุ์ศรีสะเกษและสายพันธุ์เชียงใหม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เนื่องมาจากช่วงอายุการเก็บเกี่ยวของกระเทียมสายพันธุ์จีนนั้นมีระยะเวลาที่ยาวนานกว่ากระเทียมสายพันธุ์อื่น ๆ ทำให้การดูดซึมสารอาหารและสารแอลลิซินมาไว้ที่ส่วนของหัวกระเทียมเกิดได้อย่างเต็มที่เมื่อทำการวิเคราะห์จึงพบว่ากระเทียมสายพันธุ์จีนมีปริมาณสารแอลลิซินที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ (พิษณุ, 2555)

Table 2. Nutritional compositions of Si Sa Ket, Chiang Mai and Chinese garlic powder (mean ±S.D.)

Samples	Country	Nutritional compositions (%DM basis)						References
		Dry matter (%)	Crude protein (%)	Crude fat (%)	Crude fiber (%)	Ash (%)	Nitrogen free extract (%)	
Si Sa Ket dried garlic powder	Thailand	$90.33^{c} \pm 0.04$	$26.22^{b} \pm 0.07$	$0.94^{a} \pm 0.19$	$4.62^{a} \pm 0.03$	$3.89^{c} \pm 0.04$	$54.66^{b} \pm 0.23$	-
Chiang Mai dried garlic powder	Thailand	$90.75^{a} \pm 0.03$	$26.86^{a} \pm 0.09$	$1.09^{a} \pm 0.05$	$6.43^{a} \pm 0.88$	$5.03^{a} \pm 0.02$	$51.36^{c} \pm 0.75$	-
Chinese dried garlic powder	Thailand	$90.67^{b} \pm 0.01$	$16.93^{c} \pm 0.17$	$1.05^{a} \pm 0.10$	$4.91^{a} \pm 0.08$	$4.40^{b} \pm 0.00$	$63.39^{a} \pm 0.33$	-
Si Sa Ket dried garlic powder	Thailand	-	28.13	0.43	2.93	5.17	70.03	Somsri (1985) cited in Saenkhunthow (2002)
Chiang Mai dried garlic powder	Thailand	-	23.19	0.43	3.19	4.39	75.03	Somsri (1985) cited in Saenkhunthow (2002)
Chinese dried garlic powder	Thailand	-	20.66	0.44	2.84	4.32	57.79	Somsri (1985) cited in Saenkhunthow (2002)
Nigerian dried garlic powder	Nigeria	95.71 ± 0.65	17.29 ± 0.01	0.87 ± 0.01	3.19 ± 0.15	5.22 ± 0.11	73.46 ± 0.11	Okolo *et al*. (2012)
Nigerian dried garlic powder	Nigeria	90.30 ± 0.30	27.40 ± 0.50	2.50 ± 0.20	1.00 ± 0.60	1.50 ± 0.60	57.80 ± 0.50	Oluwatoyin (2014)
Pakistan dried garlic powder	Pakistan	92.93 ± 0.11	17.85 ± 0.77	0.73 ± 0.03	8.74 ± 0.17	3.57 ± 0.19	63.33 ± 3.10	Sultan *et al*. (2014)

[1/] %Nitrogen free extract (NFE) = 100 - (% crude protein + % crude fiber + % crude fat + % ash)

[a,b,c] Superscript within a column differ significantly at $P<0.05$

Table 3. Quantitative comparison of allicin in Si Sa Ket, Chiang Mai and Chinese garlic powder (mean ± S.D.)

Samples	Country	Allicin content (mg)	References
Si Sa Ket dried garlic powder	Thailand	3.68^{c} ± 0.06	-
Chiang Mai dried garlic powder	Thailand	4.82^{b} ± 0.02	-
Chinese dried garlic powder	Thailand	7.27^{a} ± 0.05	-
Si Sa Ket dried garlic powder	Thailand	2.44	Khajarern *et al*. (2005)
Brazillian dried garlic powder	Brazil	0.19	Farias-Campomanes *et al*. (2014)
Chinese dried garlic powder	Shouguang area, China	3.90	Zhou *et al*. (2015)
Chinese dried garlic powder	Chengwu area, China	4.70	Zhou *et al*. (2015)
Chinese dried garlic powder	Yutai area, China	4.30	Zhou *et al*. (2015)

[a,b,c] Superscript within a column differ significantly at P<0.05

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารแอลลิซินจากกระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษพบว่ามีปริมาณมากกว่างานวิจัยของ Khajarern *et al*. (2005) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณแอลลิซินจากกระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษ (2.44 mg) และ Farias-Campomanes *et al*. (2014) ได้วิเคราะห์ปริมาณสารแอลลิซินในกระเทียมสายพันธุ์พื้นเมืองจากประเทศบราซิล พบว่ามีค่าปริมาณสารแอลลิซินเท่ากับ 0.19 mg ซึ่งน้อยกว่าปริมาณสารในกระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษ สายพันธุ์เชียงใหม่และสายพันธุ์จีน (3.68 ±0.06 mg, 4.82 ±0.02 mg และ 7.27 ±0.05 mg ตามลำดับ) ส่วน Zhou *et al*. (2015) ได้วิเคราะห์ปริมาณสารแอลลิซินจากกระเทียมสายพันธุ์จีนพบว่ามีปริมาณสารแอลลิซินเท่ากับ 4.70 mg (Chengwu area) และ 4.30 mg (Yutai area) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกระเทียมสายพันธุ์เชียงใหม่ (4.82 ±0.02 mg) แต่มากกว่ากระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษ (3.68 ±0.06 mg) และน้อยกว่ากระเทียมสายพันธุ์จีน (7.27 ±0.05 mg) โดยความแตกต่างระหว่างปริมาณสารแอลลิซินที่เกิดขึ้นในกระเทียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของกระเทียม ช่วงอายุที่เก็บเกี่ยวและสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการปลูก ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน ระยะเวลาของแสงแดดในแต่ละวันและธาตุอาหารที่ให้เสริมขณะปลูก (พิษณุ, 2555)

สรุป

จากการศึกษาพบว่ากระเทียมผงสายพันธุ์เชียงใหม่มีค่าน้ำหนักแห้ง ไขมันทั้งหมด กากอาหารทั้งหมดและเถ้ามากกว่ากระเทียมผงที่ผลิตจากกระเทียมสายพันธุ์อื่น ๆ (P<0.05) ในขณะที่กระเทียมผงที่ผลิตจากกระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษมีปริมาณโปรตีนรวมมากกว่ากระเทียมผงสายพันธุ์อื่น ๆ (P<0.05) และปริมาณไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรกจะมีมากที่สุดใน

กระเทียมผงที่ผลิตจากกระเทียมสายพันธุ์จีน (P<0.05) สำหรับปริมาณสารแอลลิซินพบว่ากระเทียมผงที่ผลิตจากกระเทียมสายพันธุ์จีนมีปริมาณสารแอลลิซินสูงที่สุด อยู่ที่ 7.27 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อกระเทียมผง 1 กรัม ในขณะที่กระเทียมผงที่ผลิตจากกระเทียมสายพันธุ์ศรีสะเกษและสายพันธุ์เชียงใหม่มีปริมาณสารแอลลิซินในปริมาณ 3.68 ± 0.06 และ 4.82 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อกระเทียมผง 1 กรัมตามลำดับ (P<0.05) และจากการเปรียบเทียบลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ของกระเทียมทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่ามีลักษณะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างกันในส่วนของตำแหน่งที่สะสมน้ำมันหอมระเหย โดยพบว่ากระเทียมสายพันธุ์จีนจะมีต่อมน้ำมันหนาแน่นกว่ากระเทียมสายพันธุ์เชียงใหม่และสายพันธุ์ศรีสะเกษ โดยสรุปแล้วข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นจากห้องปฏิบัติการเพื่อนำไปเป็นข้อมูลในการศึกษาผลของการใช้สารแอลลิซินจากกระเทียมผงในอาหารสัตว์ต่อการเพิ่มสมรรถนะในการผลิตและการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพก่อโรคต่าง ๆ เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งมีผลในการตกค้างในเนื้อสัตว์และมีกฎหมายจำกัดการใช้ในยุโรปตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ที่ได้สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์ในการทดลอง รวมทั้งนักศึกษาบัณฑิตศึกษา และบุคลากรทุกท่านที่มีส่วนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดียิ่ง

เอกสารอ้างอิง

พิษณุ สุขแก้ว. 2555. ผลของธาตุอาหาร อายุเก็บเกี่ยว และสภาพการเก็บรักษาต่อปริมาณอัลลิซินในกระเทียม (*Allium sativum* L.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา. 72 หน้า.

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี วรางคณา กิจพิพิธ ชวลิต ผึ้งปฐมภรณ์ ศราวุธ ม่วงเผือก เอกกมล กมลลาภวรกุล นาฏยา แบ่งลาภ และ เสาวภา เขียนงาม. 2558. ผลของการเสริมซินไบโอติกส์ต่อสมรรถภาพการผลิตไก่เนื้อและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ. วารสารเกษตร 31(3): 349-366.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. สถานการณ์สินค้าการเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2558. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: www.foodfti.com/Files/Name/CONTENT1257713626911.pdf (19 สิงหาคม 2558).

อัจฉรา นิยมเดชา. 2559. การใช้กรดอินทรีย์ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มก่อโรค (ซัลโมเนลล่า) ในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก. วารสารเกษตร 32(1): 139-149.

Ankri, S. and D. Mirelman. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes Infect. 2: 125-129.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. AOAC International, Washington, D.C. 771 p.

Curtis, H., U. Noll, J. Stormann and A. J. Slusarenko. 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. Physiological and Molecular Plant Pathology 65: 79-89.

Farias-Campomanes, A.M., C.N. Horita, M.A.R. Pollonio and M.A.A. Meireles. 2014. Allicin-rich extract obtained from garlic by pressurized liquid extraction: quantitative determination of allicin in garlic samples. Food and Public Health 4: 272-278.

Feldberg, R.S., S.C. Chang, A.N. Kotik, M. Nadler, Z. Neuwirth, D.C. Sundstrom and N.H. Thompson. 1988. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 32: 1763-1768.

Khajarern, S., B. Sripanidkulchai, J. Khajarern and S. Phoungchandang. 2005. Development of garlic (*Allium sativum* Linn.) as an antimicrobial substance and feed additive for poultry and pig industries. Final report. Khon Kaen University, Khon Kaen. 55 p.

Maron, D. F., T. J. S. Smith and K. E. Nachman. 2013. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. Global Health 9: 1-11.

National Sanitation Foundation. 2005. Determination of allicin in garlic by high-performance liquid chromatography. Allicin by high-performance liquid chromatography (INA method 110.001). (Online). Available: http://www.nature4science.com/Garlic/HTMLs/allicin_testing_method.html (December 8, 2015).

Office of the British Pharmacopoeia. 2009. British Pharmacopoeia. The stationery Office, London. 10952 p.

Okolo, S.C., O.O. Olajide, D.I. Idowu, A.B. Adebiyi, P.P. Ikokoh and A.T. Orishadipe. 2012. Comparative proximate studies on some Nigerian food supplements. Annals of Biological Research 3: 773-779.

Oluwatoyin, A. 2014. Physicochemical characterisation, and antioxidant properties of the seeds and oils of ginger (*Zingiber officinale*) and garlic (*Allium sativum*). Chemical Science 2: 44-50.

Saenkhunthow, U. 2002. Processing methods of garlic (*Allium sativum* Linn.) as powdered herbal feed additive and the effects of its supplementation in diets on performance, disease control and carcass quality of broilers. M.S. Thesis Khon Kaen University, Khon Kaen. 107 p.

Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrics Approach. 2nd ed. McGraw-Hill, New York. 633 p.

Sultan, M.T., A.N. Ahmad, M.S. Saddique, M.Aghazadeh, M. Imran, M.M.N. Qayyum and M.S. Abbas. 2014. Antioxidant and antimicrobial potential of locally sun dried garlic and ginger powder available in district Layyah, Punjab, Pakistan. Pakistan Journal of Nutrition 13: 642-647.

Yabaya, A., A. Orukotan and M. Jonathan 2010. Determination of anti *Salmonella typhi* activity of the crude extract of *Allium sativum* (garlic). Journal of Biological Sciences and Bioconservation 2: 22-28.

Zhou, C., X. Hu, C. Chao, H. Li, S. Zhang, X. Yan, F. Yang and Q. Li. 2015. Quantitation of allicin in garlic-based products: comparisons among spectrophotometry, GC and HPLC. Adv. Journal of Food Science and Technology 9: 269-277.

ปัจจัยที่มีผลต่อสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากเมล็ดแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยเทคนิคการสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

Factors Affecting Anthocyanins Extracted from Dried Kernels of Purple Waxy Corn Using Subcritical Water Extraction Technique and Antioxidant Activity of Extract

รัตนา ม่วงรัตน์[1/*] กรรณิการ์ เรือนหล้า[1/] และ ธัญชนก กันทวงศ์[1/]

Rattana Muangrat[1/], Kannika Ruenlar[1/] and Tunchanok Kantawong[1/]

[1/]สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50100

[1/]Department of Food Engineering, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand

**Corresponding author: Email: rattanamuangrat@yahoo.com*

(Received: 28 October 2015; Accepted: 8 August 2016)

Abstract: Total monomeric anthocyanins extraction from dried kernels of purple waxy corn using subcritical water extraction technique was investigated. The results showed that extraction factors were weight ratios of the dried kernel of purple waxy corn to water (1:2, 1:3, 1:5, 1:6 and 1:9), extraction temperatures (65, 80, 100 and 120 ºC) and extraction times (15, 30, 45 and 60 min) which had affected the total monomeric anthocyanin concentration. The total monomeric anthocyanin concentration increased when the weight ratio of the dried kernel of purple waxy corn to water changed from 1:2 to 1:3 and extraction temperature increased from 65 to 100 ºC. The concentration of the total monomeric anthocyanins obtained was higher than that obtained when the weight ratios of the dried kernel of purple waxy corn to water were 1:5, 1:6 and 1:9, respectively at the extraction temperature of 120 ºC. For the extraction times of 15, 30 and 45 min, there were no significant differences (P<0.05) between the concentrations of the total monomeric anthocyanins in the extracts. These concentrations were higher than the concentration obtained at the extraction time of 60 min. This research found that the high average concentration of the total monomeric anthocyanins was approximately 374.70 ± 6.96 milligrams of cyanidin-3-glucoside equivalents per liter of extract which obtained under the following extraction condition: the weight ratio of the dried kernel of purple waxy corn to water 1:3, the extraction temperature of 100 ºC and the extraction time of 15 min. Furthermore acidic condition (indicated with pH level) and time of storage. on the extract product had affected on anthocyanin stability. The total monomeric anthocyanin concentration at lower pH level and shorter storage time was more stable than that at higher pH level and longer storage time. In the addition, the concentration of dried kernel extract obtained from the extraction condition (the weight ratio of the dried kernel of purple waxy corn to water 1:3, the extraction temperature of 100 ºC

and the extraction time of 15 min) had the antioxidant activity to inhibit 50% of DPPH radical (IC_{50} value) was 10.9 milligrams per milliliter of extract. The DPPH IC_{50} value of the extract was 7.27 times less than that of the standard ascorbic acid solution.

Keywords: Anthocyanins, purple waxy corn, subcritical water extraction, antioxidant activity, DPPH radical

บทคัดย่อ: การศึกษาการสกัดสารแอนโธไซยานินทั้งหมดจากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยเทคนิคการสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติพบว่าปัจจัยในการสกัดได้แก่ อัตราส่วนโดยน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำ (1:2, 1:3, 1:5, 1:6 และ 1:9) อุณหภูมิในการสกัด (65, 80, 100 และ 120 องศาเซลเซียส) และเวลาในการสกัด (15, 30, 45 และ 60 นาที) มีผลต่อความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้จากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง เมื่ออัตราส่วนโดยน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเปลี่ยนจาก 1:2 เป็น 1:3 และอุณหภูมิการสกัดเพิ่มจาก 65 เป็น 100 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้จะมีค่าสูงขึ้นและสูงกว่าที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเท่ากับ 1:5, 1:6 1:9 ตามลำดับ และสูงกว่าเมื่ออุณหภูมิการสกัดเท่ากับ 120 องศาเซลเซียส สำหรับเวลาในการสกัด 15, 30 และ 45 นาที ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดเหล่านี้มีค่าสูงกว่าความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้ที่เวลาสกัด 60 นาที งานวิจัยนี้พบว่าความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้จากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติ มีค่าเฉลี่ยสูงถึง 374.70 ± 6.96 มิลลิกรัมสมมูลย์ของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตร เมื่อสกัดที่อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเท่ากับ 1:3 อุณหภูมิในการสกัดเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส และเวลาในการสกัด 15 นาที นอกจากนี้สภาวะความเป็นกรดด่าง และเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อความคงตัวของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้ เมื่อสภาวะความเป็นกรดสูง (ค่า pH ต่ำ) และเวลาในการเก็บรักษาสั้น สารแอนโธไซยานินจะมีความคงตัวมากกว่าที่สภาวะความเป็นกรดต่ำ (ค่า pH สูง) และเวลาในการเก็บรักษานาน โดยความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงที่สภาวะการสกัดที่อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเท่ากับ 1:3 อุณหภูมิและเวลาในการสกัดเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส และ 15 นาที ตามลำดับ ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) มีค่าประมาณ 10.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัด ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่าสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกประมาณ 7.27 เท่า

คำสำคัญ: แอนโธไซยานิน ข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง การสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระดีพีพีเอช

คำนำ

ข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง (purple waxy corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Zea mays* L. มีสารที่มีประโยชน์คือสารประกอบฟีนอลิกและสารแอนโธไซยานินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงพบเห็นได้ทั่วไปตามท้องตลาด หาซื้อง่ายและราคาถูก จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระทางธรรมชาติ สารแอนโธไซยานินเป็นรงควัตถุหรือสารสี (pigment) ที่ให้สีแดง ม่วง และน้ำเงิน ใช้เป็นสารให้สี ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถช่วยส่งเสริมการทำงานของเม็ดเลือดแดง ช่วยชะลอการเกิดไขมันอุดตันในหลอดเลือด ช่วยลดโอกาสการเกิดมะเร็ง และเสริมภูมิคุ้มกันในร่างกายให้ดีขึ้น เป็นต้น (Shipp and Abdel-Aal, 2010; สุภาภรณ์ และชนากานต์, 2559) ชนิดของสารแอนโธไซยานินที่พบมากในข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงได้แก่

cyaniding-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside และ respective malonated counterparts โดยพบสารแอนโธไซยานินได้ทั้งในซัง ไหม เปลือกหุ้มฝัก และเมล็ดของข้าวโพด (Harakotr *et al*., 2014) ดังนั้นสารแอนโธไซยานินในข้าวโพดสีม่วงจึงเป็นสารสีธรรมชาติที่ปลอดภัย เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Ramos-Escudero *et al*., 2012) และสามารถนำมาผลิตเป็นสีผสมอาหารแทนสีสังเคราะห์ที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการลดปริมาณการนำเข้าสีสังเคราะห์จากต่างประเทศได้ด้วย

การสกัดสารแอนโธไซยานินออกจากวัตถุดิบจึงเป็นขั้นตอนสำคัญและการสกัดสารแอนโธไซยานินมีอยู่หลายวิธี เช่น การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายภายใต้สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติ (subcritical solvent extraction) (Delfanian *et al*., 2015; Plaza and Turner, 2015) การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave extraction) (Abdel-Aal *et al*., 2014) การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิค (ultrasonic extraction) (Demirdoven *et al*., 2015) การสกัดด้วยซอกเล็ต (soxhlet extraction) (Santos *et al.,* 2013) และการแช่ในตัวทำละลาย (Abdel-Aal *et al*., 2014; Demirdoven *et al*., 2015; Delfanian *et al*., 2015) เป็นต้น การสกัดสารแอนโธไซยานินสามารถสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย เช่น เอทานอล เมทานอล และอะซีโตน (Abdel-Aal *et al*., 2014; Demirdoven *et al*., 2015) หรือสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติซึ่งเป็นอีกวิธีที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน โดยเป็นการสกัดที่สภาวะอุณหภูมิของน้ำสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส แต่ไม่เกิน 374 องศาเซลเซียส และความดันเพียงพอที่ทำให้น้ำยังคงมีสถานะเป็นของเหลวอยู่ได้ การสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติเป็นการสกัดที่ไม่มีอันตรายทั้งต่อสารสกัดที่ได้และสิ่งแวดล้อม เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่สะอาดปลอดภัย ราคาถูกหาง่ายและไม่ตกค้างในผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้ การสกัดด้วยวิธีดังกล่าวนี้ยังใช้เวลาในการสกัดน้อยและได้สารสกัดที่มีคุณภาพส่งผลให้วิธีการสกัดมีประสิทธิภาพที่สูงที่จะนำมาสกัดสารที่มีขั้วหรือสารที่มีความมีขั้วต่ำได้ดี (Plaza and Turner, 2015) ดังนั้นงานวิจัยจึงทำการศึกษาหาปริมาณสารแอนโธไซยานินทั้งหมดในเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยการสกัดที่ใช้เทคนิคการสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติ (subcritical water extraction) นอกจากนี้งานวิจัยยังทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารแอนโธไซยานินทั้งหมดจากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงเทคนิคการสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติได้แก่ อัตราส่วนน้ำหนักของเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำ อุณหภูมิและเวลาในการสกัด และสภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) รวมทั้งหาความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้

อุปกรณ์และวิธีการ

งานวิจัยนี้เลือกใช้เมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงพันธุ์แฟนซีสีม่วง 111 จากบริษัทแปซิฟิคเมล็ดพันธุ์ จำกัด มาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อในการสกัดสารแอนโธไซยานินจากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยเทคนิคการสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติได้แก่ อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำ (1:2, 1:3, 1:5, 1:6 และ 1:9) อุณหภูมิในการสกัด (65, 80, 100 และ 120 องศาเซลเซียส) และเวลาในการสกัด (15, 30, 45 และ 60 นาที) ความดันในการสกัดคงที่ประมาณ 1-1.5 บาร์ การสกัดสารแอนโธไซยานินจากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงในระบบปิดด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ทำได้โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างเมล็ดแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง บรรจุลงในถังสกัด เติมน้ำลงไปตามสัดส่วนโดยน้ำหนักของเมล็ดแห้งและน้ำที่กำหนดไว้ จากนั้นปิดฝาถังสกัดให้แน่น แล้วนำไปใส่ในเครื่องทำความร้อน (heater) เปิดเครื่องทำความร้อน และทำการตั้งค่าอุณหภูมิในการสกัด เมื่ออุณหภูมิในถังสกัดได้ตามที่ต้องการแล้วจึงเริ่มทำการจับเวลาในการสกัด เมื่อเสร็จสิ้นการสกัดแล้ว ปิดเครื่องทำความร้อน และทำให้ถังสกัดเย็นด้วยการเป่าอากาศจนกระทั่งถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำถังสกัดออกมาแล้วเปิดฝาถังสกัดเพื่อนำตัวอย่างที่สกัดได้ออกมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ (Super Suction Unit, SS200, Sturdy

Industrial Co., Ltd., Australia) แล้วทำการวิเคราะห์สารสกัดที่ได้ต่อไป งานวิจัยนี้มีขั้นตอนการศึกษาแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อสารสกัดดังนี้

1. การศึกษาเปรียบเทียบอัตราส่วนเมล็ดแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำที่มีผลต่อความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้

นำตัวอย่างเมล็ดแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงมาสกัดโดยใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเมล็ดแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:6 และ 1:9 อุณหภูมิและเวลาในการสกัด 100 องศาเซลเซียส และ 30 นาที ตามลำดับ หลังการสกัดนำสารละลายที่สกัดได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอนโธไซยานินทั้งหมดตามสมการที่ (1) (แสดงในหัวข้อที่ 4)

2. การศึกษาเวลาที่มีผลต่อความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง

นำสภาวะที่ได้ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดมากที่สุดจากข้อ 1 มาศึกษาเวลาในการสกัดที่มีผลต่อความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่อุณหภูมิสกัด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที หลังการสกัดนำสารละลายที่สกัดได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ แล้ววิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอนโธไซยานินทั้งหมดตามสมการที่ (1) (แสดงในหัวข้อที่ 4)

3. การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง

นำสภาวะที่ได้ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดมากที่สุดจากข้อ 1 และ 2 มาศึกษาอุณหภูมิในการสกัดที่มีผลต่อความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมด โดยอุณหภูมิในการสกัดเท่ากับ 65, 80, 100 และ 120 องศาเซลเซียส หลังการสกัดนำสารละลายที่สกัดได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ แล้ววิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอนโธไซยานินทั้งหมดตามสมการที่ (1) (แสดงในหัวข้อที่ 4)

4. การหาความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้จากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยเทคนิคการสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติ

นำตัวอย่างสารสกัดที่ได้จากข้อ 1, 2 และ 3 มาวิเคราะห์เพื่อหาความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้ด้วยวิธี pH Differential method ตามวิธีของ Lee *et al.* (2005) ซึ่งวิธีการวิเคราะห์นี้แสดงความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมด (total monomeric anthocyanins concentration) ในรูปของมิลลิกรัมสมมูลย์ของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรของสารละลายสกัด แสดงดังสมการที่ (1)

ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลย์ของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตร)

$$= \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{(\varepsilon \times 1)}$$

-------สมการที่ (1)

เมื่อ A เท่ากับผลต่างของค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นที่ 510 นาโนเมตรและค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นที่ 700 นาโนเมตรของตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 ลบด้วย ผลต่างของค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นที่ 510 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นที่ 700 นาโนเมตรของตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 MW คือน้ำหนักมวลโมเลกุลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidine-3-glucoside) มีค่าเท่ากับ 499.2 กรัมต่อโมล DF คือ dilution factor (ถ้าใช้ตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จนมีปริมาตรเป็น 3 มิลลิลิตร ใช้ค่า DF เท่ากับ 15) ε คือ molar extinction coefficient ของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 26,900 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร 1,000 คือแฟคเตอร์เปลี่ยนหน่วยจากกรัมเป็นมิลลิกรัม และ 1 คือความกว้างของคิวเวตต์เท่ากับ 1 เซนติเมตร โดยค่าการ

ดูดกลืนแสงวัดด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงแบบ double-beam (PerkinElmer Instruments, Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Shelton, USA)

5. การศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรดด่างที่มีต่อสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้

การศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรดด่างและเวลาการเก็บรักษาที่มีต่อความคงตัวของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้มากที่สุดจากข้อ 1, 2 และ 3 ทำการเก็บรักษาสารสกัดที่เวลาเริ่มต้นและที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยตัวอย่างสารสกัดที่ได้จะเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง หัวข้อนี้ทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างของสารแอนโธ-ไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้ก่อน แล้วจึงทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้ด้วยการเติมกรดซิตริกจนได้ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 1.5 และ 3.0 จากนั้นทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่อง pH meter (Metrohm, 827 pH lab, Switzerland) แล้วนำสารสกัดที่เตรียมได้นี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 ถึง 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

6. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากข้อ 1, 2 และ 3 โดยใช้วิธีดักจับอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$ radical หรือ $DPPH^{\bullet}$ radical scavenging ดัดแปลงตามวิธีของ Tananuwong and Tewaruth (2010) โดยการนำสารสกัดตัวอย่างมาเติมสารทำละลายเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางสารสกัดตัวอย่างลงที่ความเข้มข้น 2, 4, 8 และ 16 เท่าตามลำดับ และเตรียมสารสกัดตัวอย่างที่ไม่ต้องเจือจางอีก 1 หลอด รวมทั้งสิ้น 5 หลอด จากนั้นปิเปตสารสกัดเจือจางลงในขวดสีชาจำนวน 5 ขวดขวดละ 0.15 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายดีพีพีเอช (DPPH solution) ที่มีความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายเมทานอล ทำได้โดยการชั่งสาร DPPH 0.0118 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายเมทานอลจนสารละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเมทานอลให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 2.85 มิลลิลิตร ลงในสารสกัดเจือจางที่เตรียมไว้ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งสารอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (% $DPPH^{\bullet}$ inhibition) แสดงดังสมการที่ (2)

$$\%\ DPPH^{\bullet}\ inhibition = \left[\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}}\right] \times 100$$

-------สมการที่ (2)

เมื่อ $A_{control}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่างของสารสกัดทำโดยใช้เมทานอลจำนวน 0.15 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างของสารสกัด A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเจือจางที่เตรียมไว้ผสมกับสารละลาย DPPH โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และใช้เมทานอลเป็น blank จากนั้นคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้ที่สามารถลดปริมาณสารอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ลงได้ร้อยละ 50 และเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระของสารสกัดกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid solution) โดยเตรียม สารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ระดับความเข้มข้น 0.0625, 0.1250, 0.1875, 0.250, 0.375, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00, 4.00, 6.00 และ 8.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

7. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

แต่ละขั้นตอนการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3) แล้วทำการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น

95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 17.0 for Windows

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาเปรียบเทียบอัตราส่วนเมล็ดแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำที่มีผลต่อความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้

การเปรียบเทียบอัตราส่วนเมล็ดแห้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำที่มีผลต่อความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้ โดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำ เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:6 และ 1:9 อุณหภูมิสกัด100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าที่อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเท่ากับ 1:1 ปริมาณน้ำที่ใช้ที่อัตราส่วนในนี้ไม่เพียงพอในการสกัดจึงไม่สามารถวัดปริมาณสารสกัดได้ จึงแสดงผลของความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเท่ากับ 1:2, 1:3, 1:5, 1:6 และ 1:9 ดังภาพที่ 1 โดยพบว่าความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณน้ำในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงเพิ่มขึ้นจาก 1:2 ถึง 1:3 และความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินจะลดลงเมื่อปริมาณน้ำในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงเพิ่มขึ้นจาก 1:3 ถึง 1:9 เนื่องจากปริมาณน้ำที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้นเมื่อให้ความร้อนในการสกัดจะทำให้ตัวอย่างในถังสกัดเกิดการสะสมความร้อนในปริมาณที่มากขึ้นจนกระทั่งถึงอุณหภูมิการสกัดตามที่ต้องการ (100 องศาเซลเซียส) ทำให้สารสกัดแอนโธไซยานินที่สกัดได้เกิดการสลายตัว ส่งผลให้ความเข้มข้นของสารสกัดแอนโธไซยานินที่สกัดได้มีค่าลดลง (Ravber *et al*., 2015) ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเท่ากับ 1:3 สามารถสกัดสารแอนโธไซยานินที่มีความเข้มข้นมากกว่าที่อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเท่ากับ 1:2, 1:5, 1:6 และ 1:9 ตามลำดับ

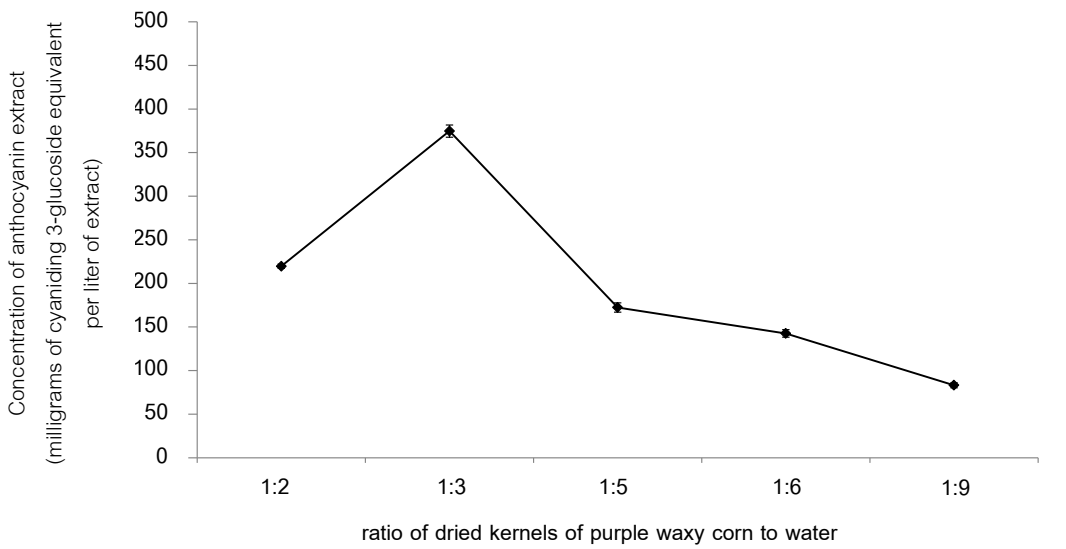

Figure 1. Concentration of total anthocyanin extract from dried kernel of purple waxy corn at ratios of purple waxy corn sample to water 1:2, 1:3, 1:5, 1:6 and1:9, extraction temperature of 100 ºC and extraction time of 30 min

การศึกษาเวลาที่มีผลต่อความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง

ผลของเวลาในการสกัดที่มีต่อความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติ (ที่อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดข้าวโพดต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1:3 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที) แสดงดังภาพที่ 2

จากภาพที่ 2 พบว่าที่เวลาสกัด 15, 30 และ 45 นาที ได้สารสกัดมีความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินประมาณ 361.82, 345.66 และ 336.04 มิลลิกรัมสมมูลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตร ตามลำดับ โดยความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้ที่เวลา 15, 30 และ 45 นาที มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดจาก 45 นาที เป็น 60 นาที ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้มีค่าลดลงจาก 336.04 มิลลิกรัมสมมูลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตร เป็น 234.62 มิลลิกรัมสมมูลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตร หรือลดลงประมาณ 1.43 เท่า ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้ลดลงเนื่องมาจากสารสกัดแอนโธไซยานินที่สกัดได้จะรับความร้อนเป็นระยะเวลาที่นานขึ้นจึงส่งผลให้เกิดการสลายตัวของสารแอนโธไซยานินได้มากขึ้น (Liu *et al.*, 2014; Plaza and Turner, 2015) ซึ่งงานวิจัยนี้เลือกเวลาในการสกัดที่สั้นคือ 15 นาที เพื่อนำไปศึกษาในหัวข้อถัดไป

การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง

ผลของอุณหภูมิในการสกัดที่มีต่อความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติ (ที่อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดข้าวโพดต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1:3 ระยะเวลาในการสกัด 15 นาที อุณหภูมิในการสกัด 65, 80, 100 และ 120 องศาเซลเซียส) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3

จากภาพที่ 3 พบว่าที่อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดข้าวโพดต่อน้ำกลั่น ที่ใช้ในการเท่ากับ 1:3 ระยะเวลาในการสกัด 15 นาที เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดจาก 65 องศาเซลเซียส เป็น 100 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 2.15 เท่า อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในช่วงนี้สามารถช่วยให้สกัดสารแอนโธไซยานินออกจากเมล็ดข้าวโพดได้มากขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิในการสกัดเพิ่มขึ้นจาก 100 องศาเซลเซียส เป็น 120 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้มีค่าลดลง 1.87 เท่า ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของสารแอนโธไซยานินที่ได้รับความร้อนมาก

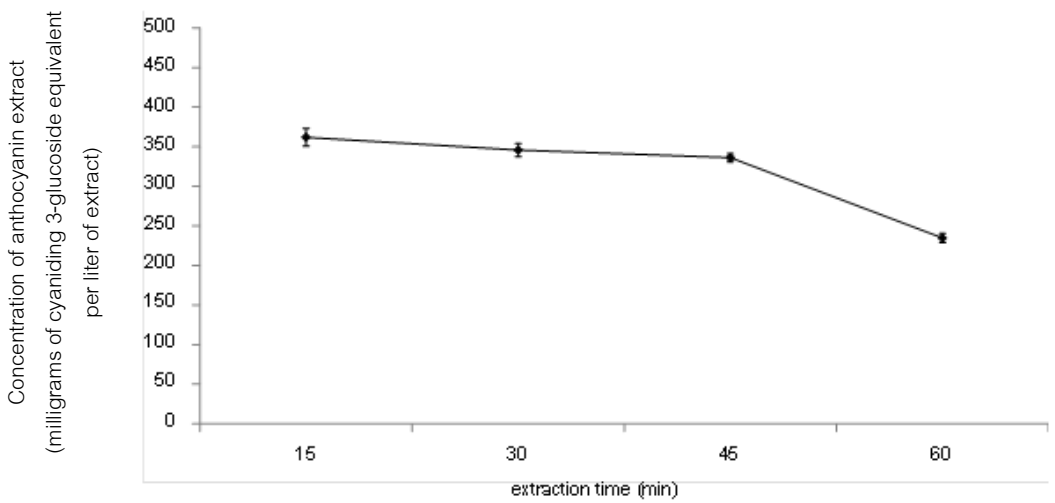

Figure 2. Concentration of total anthocyanin extract from dried kernel of purple waxy corn at ratio of purple waxy corn sample to water 1:3, extraction temperature of 100 ºC for extraction time of 15, 30, 45 and 60 min

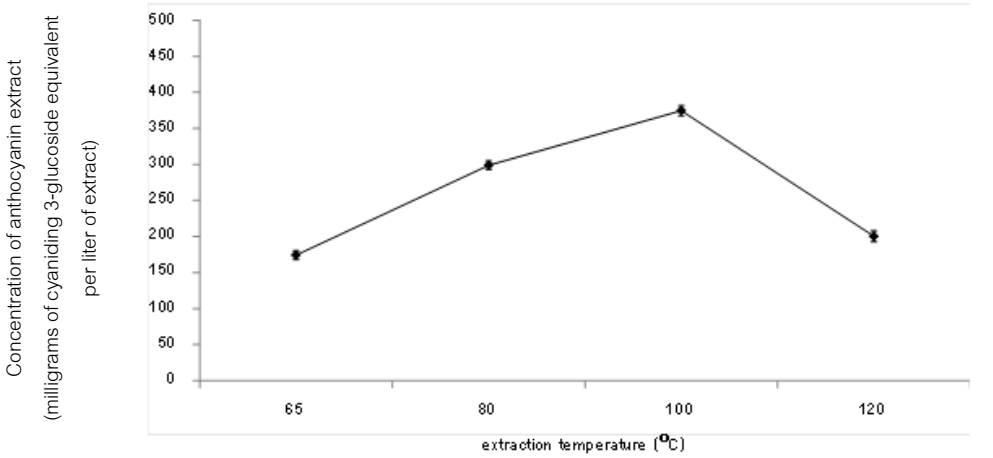

Figure 3. Concentration of total anthocyanin extract from dried kernel of purple waxy corn at ratio of purple waxy corn sample to water 1:3, extraction temperatures of 65, 80, 100 and 120 ºC for extraction time of 15 min

เมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้น (Liu *et al*., 2014; Plaza and Turner, 2015)

การศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรดด่างที่มีต่อสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้

จากการทดลองศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 1.5, 3 และค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายที่สกัดได้ก่อนปรับค่าความเป็นกรดด่างมีค่า 4.24 ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างมีผลต่อความคงตัวของสารแอนโธไซยานินที่สกัดจากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วย (ที่อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเท่ากับ 1:3 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และเวลาที่ใช้ในการสกัด 15 นาที) โดยพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร ผลการศึกษา (แสดงดังภาพที่ 4) พบว่าสภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) มีผลต่อความเข้มข้นและความคงตัวของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้ และที่สภาวะความเป็นกรดต่ำกว่าจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่า และเมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ปรับระดับค่าความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ที่เวลาเริ่มต้น และเมื่อเวลาการเก็บสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารสารสกัดจะลดต่ำลงเมื่อเวลาเก็บรักษาสารสกัดนานขึ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้มีค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าเมื่อเวลาเริ่มต้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดต่ำลงแสดงถึงปริมาณและความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินที่ลดต่ำลง โดยที่สภาวะความเป็นกรดด่างต่ำกว่า (หรือความเป็นกรดสูงกว่า) สารสกัดที่ได้จะมีสีแดงเข้มมากกว่า ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า ซึ่งเป็นไปตามหลักโครงสร้างของแอนโธไซยานิที่ว่าเมื่อค่าความเป็นกรดด่างต่ำ (หรือความเป็นกรดสูง) สารแอนโธไซยานินอยู่ในรูปของ flavylium cation (สีแดง) และมีความเสถียรมากกว่า แต่เมื่อเวลาในการเก็บรักษาการสกัดนานขึ้นจะเร่งการสลายตัวของแอนโธไซยานินและทำให้โครงสร้างของแอนโธไซยานินเปลี่ยนจาก flavylium cation (สีแดง) เป็น chalcone (ไม่มีสี) ส่งผลให้ปริมาณและความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินและความเป็นสีแดงของสารลดลง ผลของค่าการดูดกลืนแสงของค่าความเป็นกรดด่างต่อการสกัดสารแอนโธไซยานินแสดงดังภาพที่ 4 (Laleh *et al*., 2006; Shipp and Abdel-Aal, 2010) นอกจากนี้สารแอนโธไซยานินที่สกัดได้อาจเกิดการพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) ระหว่างการเก็บรักษา จึงส่งผลให้สารแอนโธไซยานินที่วิเคราะห์ได้ในสารสกัดมีปริมาณลดลงได้ (Ochoa *et al*., 1999; Patras *et al*., 2010)

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้

จากผลการทดลองความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH เพื่อหาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ ของสารสกัดจากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติที่อัตราส่วนเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเท่ากับ 1:3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส และ 15 นาที ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานสารละลายกรดแอสคอร์บิก แสดงผลดังภาพที่ 5 ผลการทดลองพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ ของสารสกัดแอนโธไซยานินที่ได้จากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงที่ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} มีค่าความเข้มข้นประมาณ 10.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัด สำหรับสารละลายกรดแอสคอร์บิกมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ ที่ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} มีค่าความเข้มข้นประมาณ 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารละลายกรดแอสคอร์บิกมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงประมาณ 7.27 เท่า

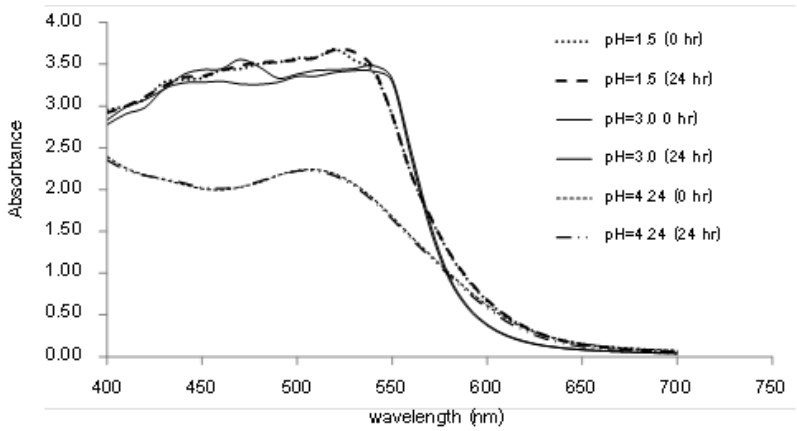

Figure 4. Absorbance and wavelengths of total anthocyanin extract from dried kernel of purple waxy corn using subcritical water extraction (at ratio of dried kernel to water 1:3, extraction temperature of 100 ºC for extraction time of 15 min) during storage for 0 and 24 hr at different pH values (1.5, 3.0 and 4.24) (n=3)

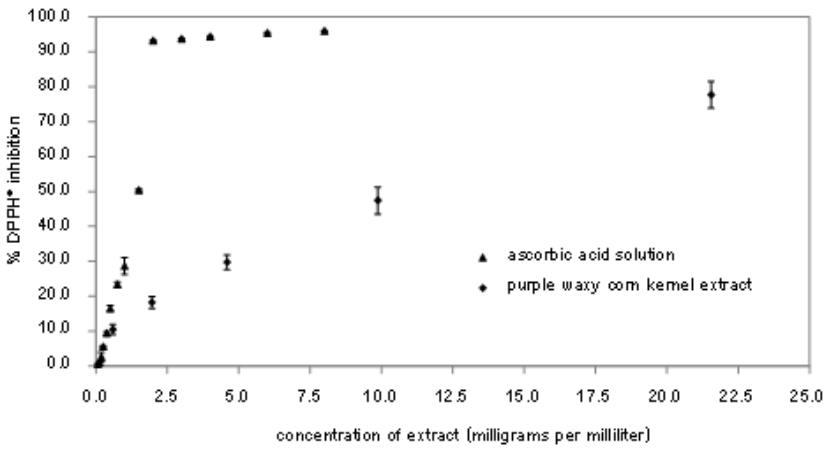

Figure 5. DPPH free-radical scavenging activity of dried kernel extract (at ration of dried kernel to water 1:3, extraction temperature of 100 ºC for 15 min) and ascorbic acid solution as the positive control

สรุป

การสกัดสารแอนโธไซยานินทั้งหมดจากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยเทคนิคการสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติพบว่าสภาวะการสกัดสารแอนโธไซยานินทั้งหมดจากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงที่ได้ความเข้มข้นของสารแอนโธ-ไซยานินที่อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเท่ากับ 1:3 อุณหภูมิในการสกัด 100 องศาเซลเซียส และเวลาในการสกัด 15 นาที ได้ความเข้มข้นของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้มีค่าสูงถึง 374.70 ±6.96 มิลลิกรัมสมมูลของไซยานิดิน-3- กลูโคไซด์ต่อลิตร สภาวะความเป็นกรดด่าง (pH condition) และเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อความคงตัวของสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้ เมื่อสภาวะความเป็นกรดสูง (ค่า pH ต่ำ) และเวลาในการเก็บรักษาสั้น สารแอนโธไซยานินจะมีความคงตัวมากกว่าที่สภาวะความเป็นกรดต่ำ (ค่า pH สูง) และเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น ความเข้มข้นของสารสกัดแอนโธ-ไซยานินที่สกัดได้จากเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงด้วยน้ำที่สภาวะต่ำกว่าจุดวิกฤติที่สภาวะการสกัดข้างต้น (อัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงต่อน้ำเท่ากับ 1:3 อุณหภูมิในการสกัด 100 องศาเซลเซียส และเวลาในการสกัด 15 นาที) มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 หรือ IC50 มีค่าเฉลี่ยประมาณ 10.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัด ซึ่งสารสกัดที่ได้นี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่าสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกประมาณ 7.27 เท่า

เอกสารอ้างอิง

สุภาภรณ์ ญะเมืองมอญ และ ชนากานต์ เทโบลต์พรมอุทัย. 2559. ความแปรปรวนของปริมาณแอนโทไซยานินและ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของข้าวเหนียวก่าพันธุ์พื้นเมืองของไทย. วารสารเกษตร 32(2): 191-199.

Abdel-Aal, E.M., H. Akhtar, I. Rabalski and M. Bryan. 2014. Accelerated, microwave-assisted, andconventional solvent extraction methods affect anthocyanin composition from colored grains. Journal of Food Science 79(2): 138-146.

Delfanian, M., R.E. Kenari and M.A. Sahari. 2015. Influence of extraction techniques on antioxidant properties and bioactive compounds of loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.) skin and pulp extracts. Food Science and Nutrition 3(3): 179-187.

Demirdoven, A., K. Ozdogan and K. Erdogan-Tokatli. 2015. Extraction of anthocyanins from red cabbage by ultrasonic and conventional methods: optimization and evaluation. Journal of Food Biochemistry 39(5): 491-500.

Harakotr, B., B. Suriharn, R. Tangwongchai, M.P. Scott and K. Lertrat. 2014. Anthocyanins and antioxidant activity in coloured waxy corn at different maturation stages. Journal of Functional Foods 9: 109-118.

Laleh, G.H., H. Frydoonfar, R. Heidary, R. Jameei and S. Zare. 2006. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. Pakistan Journal of Nutrition 5(1): 90-92.

Lee, J., R.W. Durst and R.E. Wrolstad. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. Journal of AOAC International 88(5): 1269-1278.

Liu, J., M. Sandahl, P.J.R. Sjoberg and C. Turner. 2014. Pressurised hot water extraction in

continuous flow mode for thermolabile compounds: extraction of polyphenols in red onions. Analytical and Bioanalytical Chemistry 406(2): 441-445.

Ochoa, M.R., A.G. Kesseler, M.B. Vullioud and J.E. Lozano. 1999. Physical and chemical characteristics of raspberry pulp; storage effect on composition and color. LWT-Food Science and Technology 32: 149-153.

Patras, A., N.P. Brunton, C.O. Donnell and B.K. Tiwari. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. Trends in Food Science and Technology 21: 3-11.

Plaza, M. and C. Turner. 2015. Pressurized hot water extraction of bioactives. Trends in Analytical Chemistry 71: 39-54.

Ramos-Escudero, F., M.L. Gonzalez-Miret and A. Garcia-Asuero. 2012. Effect of various extraction systems on the antioxidant activity kinetic and color of extracts from purple corn. Vitae, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica. 19(1): 41-48.

Ravber, M., Ž. Knez and M. Škerget. 2015. Simultaneous extraction of oil- and water soluble phase from sunflower seeds with subcritical water. Food Chemistry 166: 316-323.

Santos, D.T., R.N. Cavalcanti, M.A. Rostagno, C.L. Queiroga, M.N. Eberlin and M.A.M. Meireles. 2013. Extraction of polyphenols and anthocyanins from the Jambul (Syzygium cumini) fruit peels. Food and Public Health 3(1): 12-20.

Shipp, J. and E.S.M. Abdel-Aal. 2010. Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. The Open Food Science Journal 4: 7-22.

Tananuwong, K. and W. Tewaruth. 2010. Extraction and application of antioxidants from black glutinous rice. LWT - Food Science and Technology 43(3): 476-481.

ปริมาณฟักข้าวที่เหมาะสมในการทำน้ำสลัดชนิดข้น

Appropriate Quantity of Gac Fruit in Making Salad Cream

เพ็ญศิริ คงสิทธิ์[1/*]

Phensiri Khongsit[1/*]

[1/]*สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี อ.เมือง จ.ลพบุรี 15000*

[1/]*Division of Food Science and Technology, Faculty of Science and Technology, Thepsatri Rajabhat University, Lop Buri 15000, Thailand*

**Corresponding author: Email: pk_noon@hotmail.com*

(Received: 1 March 2016; Accepted: 8 August 2016)

Abstract: This study was conducted to optimise gac fruit salad cream formulation base on sensory evaluation. The optimised formula was consisted of 0.12% paper, 0.28% salt, 0.82% mustard, 10.91% yolk, 14.89% vinegar, 21.17% sugar and 51.81% vegetable oil. It was found that salad cream with 3% gac fruit was acceptable by panelists. Chemical and physical properties of product were similar with control salad cream. The total soluble solid, pH , antioxidant activity were 61.52 °Brix , 3.27 and 85.47 (g/ml), respectively. The color (L*, a* and b*) were 70.43, 22.71 and 41.12 respectively. Shelf-life of salad cream mixed with gac fruit was studied. The product can be stored at refrigeration temperature (4 ± 2 °C) for 4 weeks. The microbial properties were in line with standard.

Keywords: Salad cream mixed with gac fruit, gac fruit

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว โดยคัดเลือกสูตรพื้นฐานของน้ำสลัดชนิดข้นจากการยอมรับของผู้บริโภค โดยพบว่าสูตรที่เหมาะสมประกอบไปด้วย พริกไทยป่น เกลือ มัสตาร์ด ไข่แดง น้ำส้มสายชู น้ำตาลทราย และน้ำมันพืชในสัดส่วน 0.12, 0.28, 0.82, 10.91, 14.89, 21.17 และ 51.81% ตามลำดับ และปริมาณฟักข้าวที่เหมาะสมในการทำน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว คือ ร้อยละ 3 ซึ่งให้ลักษณะใกล้เคียงน้ำสลัดสูตรควบคุมที่ผู้บริโภคให้การยอมรับมากที่สุด โดยมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดเท่ากับ 61.52 องศาบริกซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.27 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 0.80 กรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความหนืดเท่ากับ 85.47 เซนติพอยส์ ค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*)และค่าสีเหลือง (b*) เท่ากับ 70.43, 22.71 และ 41.12 ตามลำดับ และศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพของน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (4 ± 2 °C) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความหืน ความหนืด และค่าสีเหลืองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ค่าความสว่าง และค่าสีแดง มีแนวโน้มลดลง โดยพบปริมาณจุลินทรีย์ไม่เกินที่มาตราฐานกำหนด

คำสำคัญ: น้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว ฟักข้าว

คำนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคได้หันมาสนใจอาหารเพื่อสุขภาพ (healthy foods) เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากแนวโน้มของการเจ็บป่วยจากโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคเบาหวาน เป็นต้น จะเห็นได้ว่าในระดับประเทศและระดับโลกมีการเพิ่มมาตรการต่าง ๆ เพื่อให้ผู้คนในสังคมมีชีวิตที่แข็งแรงอย่างต่อเนื่อง สุขภาพที่ดีนั้นเริ่มต้นได้ง่ายด้วยการรับประทานอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ (Healthcare, 2557) โดยทั่วไปแล้วอาหารเพื่อสุขภาพ หมายถึง อาหารที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย นอกเหนือจากสารอาหารหลักที่จำเป็นต่อร่างกาย นอกจากนี้ ยังลดอัตราเสี่ยงต่อโรคต่าง ๆ ปัจจุบันอาหารเพื่อสุขภาพได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย (เยาวภา, 2557) โดยเฉพาะสลัดที่มีพื้นฐานดั้งเดิมเป็นอาหารตะวันตกและได้รับความนิยม เนื่องจากได้ชื่อว่าเป็นอาหารเพื่อสุขภาพโดยมี ผักและผลไม้สดเป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งการปลูกผักและผลไม้ของเกษตรกรเป็นอาชีพของคนสวนใหญ่ของประเทศไทย (ยศ และชนินทร์, 2558) ผักและผลไม้อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต วิตามิน เกลือแร่และใยอาหาร ซึ่งให้พลังงานและสารอาหารที่ช่วยให้ระบบขับถ่ายเป็นไปอย่างปกติ อย่างไรก็ตาม น้ำสลัดมีส่วนผสมและคุณค่าทางโภชนาการแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบและส่วนผสมที่ใช้ในการผลิต (ทวีทอง, 2552) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วน้ำสลัด เป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากน้ำส้มสายชูกับเครื่องปรุงรสและมีส่วนผสมของน้ำมันพืช มีลักษณะเป็นของเหลวข้นกึ่งแข็งเป็นอิมัลชันในรูปของน้ำมันในน้ำ ผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกันโดยไม่แยกชั้น เนื่องจากมีส่วนผสมที่เป็นไขมันจึงมีโอกาสเสื่อมเสียได้จากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันทำให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งส่งผลให้มีอายุการเก็บรักษาสั้นลง ปัจจุบันมีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำสลัดให้มีอายุการเก็บรักษานานขึ้นโดยมีการเสริมสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ซึ่งนอกจากจะช่วยรักษาคุณภาพของน้ำสลัดให้มีคุณภาพดีแล้วยังช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการอีกด้วย สำหรับอาหารเพื่อสุขภาพที่มีสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติกำลังได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากสมุนไพรเป็นพืชท้องถิ่น หาได้ง่าย อีกทั้งมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระและป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมัน ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ

ฟักข้าวจัดเป็นพืชสมุนไพรที่อุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่ง ได้แก่ เบต้าแคโรทีน และไลโคปีน ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เป็นสาเหตุของการเกิดสารอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและทำให้อาหารประเภทไขมันเกิดการเหม็นหืนอีกด้วย (สุขุมาลย์, 2543) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำสลัดชนิดข้น โดยเสริมน้ำฟักข้าวที่อุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

โดยมีวัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือ เพื่อศึกษาและคัดเลือกสูตรพื้นฐานของน้ำสลัดชนิดข้น ศึกษาผลของปริมาณฟักข้าวที่เหมาะสมในน้ำสลัดชนิดข้น และศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อคุณภาพของน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดเลือกสูตรพื้นฐานน้ำสลัดชนิดข้น

การศึกษาอัตราส่วนผสมเบื้องต้นของน้ำสลัดชนิดข้นรสดั้งเดิม 3 สูตร ต่อการยอมรับของผู้บริโภค โดยชั่งส่วนผสมตามสูตร ดังตารางที่ 1 โดยปั่นไข่แดงผสมกับน้ำตาลทรายจนขึ้นฟู เติมส่วนผสมที่เหลือ ได้แก่ มัสตาร์ด เกลือ น้ำส้มสายชู และพริกไทยป่น แล้วปั่นผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ประมาณ 15 วินาที จากนั้นเทน้ำมันพืชลงในส่วนผสมทีละน้อย โดยทำการปั่นส่วนผสมให้เข้ากันไปเรื่อย ๆ จนส่วนผสมแข็งตัว จากนั้นใส่น้ำมันพืชจนหมด นำน้ำสลัดชนิดข้นที่ได้บรรจุใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท และนำไปทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ 9-point hedonic scale ทำการทดสอบคุณลักษณะ ได้แก่ สี กลิ่น รสชาติ ความเป็นเนื้อเดียวกัน และการยอมรับโดยรวม ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน ที่ผ่านการฝึกอบรมการทดสอบด้านประสาทสัมผัส

2. การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของฟักข้าวในน้ำสลัดชนิดข้น

ทำการผลิตน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าวจากการคัดเลือกสูตรพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาในขั้นตอนที่ 1 โดยเลือกฟักข้าวที่มีลักษณะผลสุก สีแดงหรือแดงอมส้ม มีอายุการเก็บเกี่ยว 7-8 สัปดาห์ นำฟักข้าวมาผ่าครึ่ง แล้วแยกเนื้อและเมล็ดออกโดยใช้ช้อนคว้านที่เนื้อเยื่อเมล็ดฟักข้าว จากนั้นแยกเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวออกจากเมล็ด และแปรปริมาณฟักข้าว 4 ระดับ คือ 0, 3, 6 และ 9% (w/w) จากนั้นนำน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าวมาทำการตรวจสอบคุณภาพทางด้านกายภาพ โดยวัดความหนืด โดยใช้เครื่อง Viscometer รุ่น LVDV-II+PX และค่าสี โดยใช้เครื่องวัดสี รุ่น Color Flex EZ ส่วนการตรวจสอบทางเคมี โดยวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ตามวิธี AOAC (2000) ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ตามวิธีของ Dasgupta and De (2004) และทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ 9-point hedonic scale กับผู้ทดสอบจำนวน 30 คน ทำการทดสอบคุณลักษณะ ได้แก่ สี กลิ่น รสชาติ ความเป็นเนื้อเดียวกัน และการยอมรับโดยรวม และวางแผนการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) หาค่าเฉลี่ย และความแปรปรวน (ธนกิจ และพิไลรัก, 2559) และตรวจสอบความแตกต่าง ของผลิตภัณฑ์ด้วย DMRT (Duncan's multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อคุณภาพของน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว

ทำการผลิตน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าวโดยใช้สูตรที่คัดเลือกจากตอนที่ 2 โดยนำมาบรรจุใส่ในขวดแก้ว และปิดฝาให้สนิท เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (4 ± 2 ºC) จากนั้นนำมาทดสอบทางด้านกายภาพ โดยวัดความหนืดโดยใช้เครื่อง Viscometer รุ่น LVDV-II+PX และค่าสี โดยใช้เครื่องวัดสี รุ่น Color Flex EZ ส่วนการตรวจสอบทาง

Table 1. The ingredient percentages of salad cream

Ingredient	Formula 1	Formula 2	Formula 3
yolk	10.72	10.32	10.91
salt	2.06	1.99	0.28
pepper	0.12	0.34	0.12
mustard	0.81	0.78	0.82
sugar	20.79	20.02	21.17
vinegar	14.63	17.57	14.89
vegetable oil	50.87	48.98	51.81

เคมี โดยวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ตามวิธีของ Dasgupta and De (2004) และค่าความหืน (TBA) ตามวิธีของ Pearson (1999) การตรวจสอบทางด้านจุลินทรีย์ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ ยีสต์ รา ตามวิธีของ AOAC (2000) และทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ 9-point hedonic scale ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และทำการสุ่มตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์คุณภาพทุก ๆ 1 สัปดาห์ โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomize design (CRD) หาค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนโดยวิธี one-way analysis of variance และตรวจสอบความแตกต่าง ของผลิตภัณฑ์ด้วย DMRT (Duncan's multiple range test)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการคัดเลือกสูตรพื้นฐานน้ำสลัดชนิดข้น

จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ 9-point hedonic scale ของน้ำสลัดชนิดข้นรสดั้งเดิมมา 3 สูตร ผลการทดลอง (ตารางที่ 2) โดยคุณลักษณะด้านสีของน้ำสลัดชนิดข้นทั้ง 3 สูตร พบว่าผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบในด้านสีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนด้านกลิ่นรสชาติ และการยอมรับโดยรวม พบว่าสูตรที่ 1 และ 2 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีความแตกต่างกันกับสูตรที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนคุณลักษณะด้านความความเป็นเนื้อเดียวกัน พบว่าสูตรที่ 1 และ 3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสูตรที่ 1 และ 2 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

จากการศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดชนิดข้นรสดั้งเดิมสามารถคัดเลือกสูตรพื้นฐานที่เหมาะสมได้ โดยเลือกน้ำสลัดชนิดข้นรสดั้งเดิมสูตรที่ 3 คือ ไข่แดง 10.91% เกลือ 0.28% พริกไทยป่น 0.12% มัสตาร์ด 0.82% น้ำตาลทราย 21.17% น้ำส้มสายชู 14.89% และน้ำมันพืช 51.81% เป็นสูตรพื้นฐานในการทดลองต่อไป

2. ผลการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของฟักข้าวในน้ำสลัดชนิดข้น

เมื่อผลิตน้ำสลัดชนิดข้นสูตรที่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากที่สุดในตอนที่ 3.1 ที่มีการแปรปริมาณฟักข้าวเป็น 4 ระดับ คือ 0, 3, 6 และ 9%(w/w) จากน้ำสลัดชนิดข้นสูตรพื้นฐาน และนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ (ตารางที่ 3) โดยวัดค่าความหนืดและค่าสี พบว่า ค่าความหนืดมีค่าอยู่ระหว่าง 83.43-105.27 cP ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เพราะฟักข้าวมีเส้นใยสูง จึงทำให้ความหนืดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ส่วนค่าสี พบว่าน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าวมีค่าความสว่าง (L*) ลดลงจาก 81.18 ไปเป็น 64.69 เมื่อเพิ่มปริมาณของฟักข้าว ทั้งนี้อาจเกิดจากฟักข้าวที่ใช้มีสีส้มของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Aoki *et al*., 2002) เมื่อใส่ปริมาณเพิ่มมากขึ้น จึงทำให้น้ำสลัดชนิดข้นมีค่าความสว่างลดลง และสอดคล้องกับค่าสีแดง (a*) พบว่าน้ำสลัดชนิดข้น มีค่าสีแดงเพิ่มขึ้น จาก 1.54 ไปเป็น 33.33 และค่าสีเหลือง (b*) เพิ่มขึ้นจาก 30.25 ไปเป็น

Table 2. Means hedonic scale of sensory evaluation of salad cream with different formula

Formula	Means hedonic scale of sensory evaluation (scores)				
	Color^{ns}	Odor	Taste	smoothness	Overall acceptability
1	6.93 ± 1.28	5.77^{b} ± 1.83	6.03^{b} ± 1.67	7.03^{ab} ± 1.03	6.47^{b} ± 1.68
2	6.63 ± 1.16	5.63^{b} ± 1.85	5.77^{b} ± 1.65	6.50^{b} ± 1.11	5.93^{b} ± 1.53
3	7.10 ± 1.06	6.63^{a} ± 1.13	7.27^{a} ± 1.17	7.27^{a} ± 1.11	7.27^{a} ± 1.05

Values with different letters in superscript in columns are significantly different (P<0.05)

ns = not significantly different (P<0.05)

Mean ± standard deviation (SD)

49.95 จากผลการทดลอง จะเห็นว่าค่าสีแดงและค่าสีเหลืองเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณฟักข้าวเพิ่มขึ้น ทั้งเนื่องจากสีของฟักข้าวมีสีแดงส้ม เมื่อเพิ่มปริมาณการใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัดชนิดข้นมากขึ้น จึงมีผลทำให้มีค่าสีแดงและสีเหลืองเพิ่มมากขึ้นด้วย

ส่วนการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ มีค่าอยู่ระหว่าง 28.47-63.21 Brix ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 3.18-3.63 เนื่องจากปริมาณฟักข้าวที่เติมลงไปมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6.12 (ยุทธนา, 2553) เมื่อปริมาณฟักข้าวเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้น้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าวมีค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น และจากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ซึ่งนิยมรายงานผลเป็นค่า IC_{50} หมายถึง ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระลดลง 50% โดยพิจารณาจาก ค่าที่มีค่าน้อยจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงพบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.31-4.91 g/ml โดยพบว่าเมื่อเติมฟักข้าวลงไปในน้ำสลัดชนิดข้นในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลทำให้มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากฟักข้าวมีไลโคปีนและบีต้า-แคโรทีนเป็นองค์ประกอบ ทั้งยังเป็นสารตั้งต้นของวิตามินซี และทำหน้าที่เสมือนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (นิธิยา และพิมพ์เพ็ญ, 2553) (ตารางที่ 4)

ส่วนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทดสอบแบบ 9-point hedonic scale พบว่าผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบในด้านความเป็นเนื้อเดียวกันไม่แตกต่างกันในทุกสูตร ส่วนด้านสี พบว่าผู้ทดสอบให้ในสูตรที่ 2 ไม่ต่างจากสูตรที่ 3 และ 4 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรที่ 1 ซึ่งเป็นสูตรควบคุม แต่สูตรควบคุม ไม่แตกต่างจากสูตรที่ 3 ส่วนด้านกลิ่นพบว่า สูตรที่ 2 ไม่ความแตกต่างจากสูตรที่ 3 และ 4 แต่มีความแตกต่างกันกับสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนด้านรสชาติและการยอมรับโดยรวม พบว่าผู้ทดสอบให้คะแนนสูตรที่ 2 ไม่ต่างจากสูตรที่ 3 และ 4 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรควบคุม และสูตรควบคุม ไม่แตกต่างจากสูตรที่ 3 และ 4 ดังแสดงในตารางที่ 5

Table 3. Physical properties of salad cream mixed with gac fruit with different levels of gac fruit

Formular	Viscosity	Color		
	(cP)	L*(lightness)	a*(redness)	b*(yellowness)
1	$83.43^{d} \pm 0.15$	$81.18^{a} \pm 0.32$	$1.54^{d} \pm 0.26$	$30.25^{d} \pm 0.47$
2	$85.47^{c} \pm 0.25$	$70.43^{b} \pm 0.39$	$22.71^{c} \pm 0.31$	$41.12^{c} \pm 0.18$
3	$87.67^{b} \pm 0.25$	$68.11^{c} \pm 0.05$	$27.34^{b} \pm 0.08$	$42.15^{b} \pm 0.07$
4	$105.27^{a} \pm 1.25$	$64.69^{d} \pm 0.13$	$33.33^{a} \pm 0.18$	$49.95^{a} \pm 0.23$

Values with different letters in superscript in columns are significantly different (P<0.05)

Mean ± standard deviation (SD)

Table 4. Chemical properties of salad cream mixed with gac fruit with different levels of gac fruit

Formular	Total soluble solid (°Brix)	pH	DPPH (g/ml)
1	$63.21^{a} \pm 0.04$	$3.18^{d} \pm 0.01$	$4.91^{a} \pm 0.29$
2	$61.52^{b} \pm 0.46$	$3.27^{c} \pm 0.02$	$0.80^{b} \pm 0.01$
3	$54.12^{c} \pm 0.15$	$3.56^{b} \pm 0.02$	$0.53^{c} \pm 0.01$
4	$28.47^{d} \pm 0.45$	$3.63^{a} \pm 0.02$	$0.31^{d} \pm 0.01$

Values with different letters in superscript in columns are significantly different (P<0.05)

ns = not significantly different (P<0.05)

Mean ± standard deviation (SD)

ดังนั้นจากการศึกษาคุณภาพทางเคมี คุณภาพทางกายภาพ และคุณภาพทางประสาทสัมผัสของ น้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าวสามารถคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมได้ โดยเลือกน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าวสูตรที่ 2 คือน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว 3% มีส่วนผสมดังนี้ ไข่แดง 10.59% เกลือ 0.27% พริกไทยป่น 0.12% มัสตาร์ด 0.80% น้ำตาลทราย 20.55% น้ำส้มสายชู 14.46% น้ำมันพืช 50.30% และฟักข้าว 2.91% เป็นสูตรที่ให้ลักษณะที่ดีของน้ำสลัด และมีค่าคะแนนการยอมรับของผู้บริโภคสูงที่สุด

3. ผลการศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อคุณภาพของน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว

ทำการศึกษาน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าวโดยใช้สูตรที่คัดเลือกจากตอนที่ 3.2 มาทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (4 ± 2 ºC) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และทำการสุ่มตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์คุณภาพทุก ๆ 1 สัปดาห์ มาวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี (ตารางที่ 6) ซึ่งผลการทดลองพบว่า เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้สมบัติการต้านอนุมูลอิสระมีค่าลดลง เนื่องจาก

Table 5. Means hedonic scale of sensory evaluation of salad cream with different levels of gac fruit

Formular	Means hedonic scale of sensory evaluation (scores)				
	Color	Odor	Taste	Smoothness^{ns}	Overall acceptability
1(control)	6.23^{b} ±1.36	4.93^{b} ±1.55	6.23^{b} ±1.28	7.33 ±1.21	6.43^{b} ±1.41
2	7.30^{a} ±1.30	6.17^{a} ±1.45	7.03^{a} ±0.86	7.40 ±1.23	7.53^{a} ±1.17
3	6.90^{ab} ±1.77	6.07^{a} ±1.11	6.57^{ab} ±1.43	7.13 ±1.28	6.77^{ab} ±0.97
4	7.10^{a} ±1.73	5.70^{a} ±1.34	6.40^{ab} ±1.30	6.97 ±1.40	7.27^{ab} ±1.60

Values with different letters in superscript in columns are significantly different (P<0.05)

ns = not significantly different (P<0.05)

Mean ± standard deviation (SD)

Table 6. Chemical properties of salad cream mixed with gac fruit during storage

Time (Weeks)	DPPH (g/ml)	pH	TBA (mg malonaldehyde/kg)
0	0.88^{c} ± 0.09	3.27^{e} ± 0.02	1.58^{e} ± 0.08
1	1.56^{c} ± 0.08	3.39^{d} ± 0.02	1.92^{d} ± 0.03
2	2.78^{c} ± 0.08	3.46^{c} ± 0.03	2.11^{c} ± 0.04
3	28.22^{b} ± 0.35	3.58^{b} ± 0.02	2.45^{b} ± 0.04
4	56.06^{a} ± 4.78	3.66^{a} ± 0.03	2.93^{a} ± 0.03

Values with different letters in superscript in columns are significantly different (P<0.05)

ns = not significantly different (P<0.05)

Mean ± standard deviation (SD)

ไลโคปีนในผักและผลไม้จะอยู่รวมกับโปรตีนเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน การบดทำให้ไลโคปีนออกมานอกเซลล์ได้มากขึ้น ทำให้ไลโคปีนที่อยู่รวมกับโปรตีนแตกออก เกิดการปลดปล่อยไลโคปีนทำให้ไลโคปีนมีเสถียรภาพลดลง จึงมีความไวต่อแสง ความร้อน กรด และออกซิเจนมากขึ้น ส่งผลให้ไลโคปีนไม่เสถียรในระหว่างการเก็บรักษาและเกิดการเสื่อมสภาพสลายลงเรื่อย ๆ เมื่อเวลาผ่านไป (เปรมศิริ และรณชัย, 2554) ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งในน้ำสลัด ชนิดข้นมีน้ำมันพืชเป็นส่วนผสม โดยจากการศึกษาของนิธิยา (2553) ค่าความเป็นกรด-ด่างจะบ่งชี้การสลายตัวและการหืนของน้ำมันพืช โดยถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างสูง แสดงว่าโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันพืชสลายตัวได้เป็นกรดไขมันอิสระมาก

ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเดชันของไขมันโดยใช้ thiobarbituric acid เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์คำนวณหาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ และใช้เป็นดัชนีชี้วัดความเหม็นหืนของผลิตภัณฑ์ด้วย (นิธิยา, 2553) ซึ่งในทางประสาทสัมผัสจะเริ่มรู้สึกถึงกลิ่นแปลกปลอมในอาหารได้เมื่อค่า TBA มากกว่า 3.00 mg malonaldehyde/kg (Tanikawa, 1985) จากการทดลองพบว่าค่า TBA เริ่มต้นของน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว มีค่าเท่ากับ 1.58 mg malonaldehyde/kg และมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น แต่มีค่าไม่เกิน 3 mg malonaldehyde/kg เมื่อเก็บรักษานาน 4 สัปดาห์ ถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้ และผู้ทดสอบไม่รับรู้กลิ่นหืนของน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว เนื่องจากฟักข้าวที่เติมลงในน้ำสลัดมีไลโคปีนและเบต้า-แคโรทีนที่มีคุณสมบัติเป็นวัตถุกันหืนตามธรรมชาติ จึงช่วยชะลอการเกิดออกซิเดชันในน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว อีกทั้งได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีส่วนช่วยทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดขึ้นได้ช้า

ส่วนการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ (ตารางที่ 7) พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น ค่าความหนืดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ค่าสีของน้ำสลัด พบว่า น้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าวมีค่าความสว่าง (L*) ลดลง ในขณะที่ค่าสีแดง (a*) และสีเหลือง (b*) กลับมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเก็บรักษา เนื่องจากเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นทำให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดขึ้นระหว่างการเก็บรักษา ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีน้ำตาล

ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์ของน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว 3% ที่อุณหภูมิตู้เย็น (4 ± 2 ºC) (ตารางที่ 8) พบว่าน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว 3% ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ ยีสต์รา อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน สอดคล้องกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำสลัด (มผช 672/2547) ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพด้านประสาทสัมผัสของน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว 3% (ตารางที่ 9) พบว่าการศึกษาคุณลักษณะด้านสี กลิ่น รสชาติ ความเป็นเนื้อเดียวกัน และการยอมรับโดยรวม พบว่าในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการเก็บรักษา ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะเริ่มมีความแตกต่างเมื่อเก็บรักษาใน

Table 7. Physical properties of salad cream mixed with gac fruit during storage

Time (Weeks)	Viscosity (cP)	Color		
0	70,634^{e} ± 238.56	68.67^{a} ± 0.19	29.75^{b} ± 0.86	1.58^{e} ± 0.45
1	72,518^{d} ± 87.56	68.55^{a} ± 0.15	29.20^{c} ± 0.12	1.92^{d} ± 0.21
2	73,404^{c} ± 186.36	66.25^{b} ± 0.17	28.48^{d} ± 0.20	2.11^{c} ± 0.20
3	78,179^{b} ± 703.53	65.68^{c} ± 0.03	28.09^{d} ± 0.21	2.55^{b} ± 0.23
4	79,512^{a} ± 443.39	61.60^{d} ± 0.44	33.86^{a} ± 6.46	2.93^{a} ± 0.99

Values with different letters in superscript in columns are significantly different (P<0.05)

Mean ± standard deviation (SD)

Table 8. Microbial properties of salad cream mixed with gac fruit during storage

Time (Weeks)	Total plate count (cfu/g)	*Salmonella* (cfu/g)	*Staphylococcus aureus* (MPN/g)	*Escherichia coli* (MPN/g)	Yeast and mold (cfu/g)
0	$<1\times10^4$	ND	<3.0	<3.0	<10
1	$<1\times10^4$	ND	<3.0	<3.0	<10
2	$<1\times10^4$	ND	<3.0	<3.0	<10
3	$<1\times10^4$	ND	<3.0	<3.0	<10
4	$<1\times10^4$	ND	<3.0	<3.0	<10

ND = not detected

Table 9. Means hedonic scale of sensory evaluation of salad cream mixed with gac fruit during storage

Time (Weeks)	Means hedonic scale of sensory evaluation (scores)				
	Color	Odor	Taste	Smoothness	Overall acceptability
0	$6.90^{a} \pm 0.84$	$6.40^{a} \pm 0.86$	$6.97^{a} \pm 1.00$	$6.93^{a} \pm 0.78$	$7.07^{a} \pm 0.83$
1	$6.82^{a} \pm 0.64$	$6.35^{ab} \pm 0.92$	$6.90^{a} \pm 1.02$	$6.85^{a} \pm 1.01$	$6.95^{a} \pm 0.95$
2	$6.70^{a} \pm 0.84$	$6.13^{ab} \pm 0.73$	$6.77^{a} \pm 0.82$	$6.53^{ab} \pm 0.90$	$6.53^{ab} \pm 0.86$
3	$6.17^{b} \pm 0.75$	$5.87^{b} \pm 086$	$6.07^{b} \pm 1.08$	$6.10^{b} \pm 0.80$	$6.03^{b} \pm 1.10$
4	$4.60^{c} \pm 0.93$	$4.87^{c} \pm 1.04$	$4.90^{c} \pm 1.27$	$4.57^{c} \pm 1.30$	$4.90^{c} \pm 1.27$

Values with different letters in superscript in columns are significantly different (P<0.05)

Mean ± standard deviation (SD)

สัปดาห์ที่ 3 และ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ส่งผลให้คะแนนความชอบด้านสี กลิ่น รสชาติ ความเป็นเนื้อเดียวกัน และการยอมรับโดยรวม มีค่าลดลง

สรุป

การคัดเลือกสูตรพื้นฐานน้ำสลัดชนิดข้น โดยคัดเลือกจากการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าสูตรที่เหมาะสมคือ ไข่แดง เกลือ พริกไทยป่น มัสตาร์ด น้ำตาลทราย น้ำส้มสายชู และน้ำมันพืช เท่ากับ 10.91%, 0.28%, 0.12%, 0.82%, 21.17%, 14.89% และ 51.81% ตามลำดับ โดยสูตรที่เหมาะสมของน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว คือ การใช้ฟักข้าวในอัตราส่วน 3% ของน้ำสลัดชนิดข้น ซึ่งจะทำให้ได้ลักษณะของน้ำสลัดที่ดีและผู้บริโภคให้การยอมรับ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 54.12 ± 0.15 °Brix ความเป็นกรด-ด่างมีค่าเท่ากับ 3.56 ± 0.02 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระมีค่าเท่ากับ 0.53 ± 0.01 g/ml ค่าสี L* a* และb* เท่ากับ 70.43 ± 0.39, 22.71 ± 0.31 และ 41.12 ± 0.18 ตามลำดับ ค่าความหนืดเท่ากับ 85.47 ± 0.25 cP และคุณภาพด้านประสาทสัมผัส สี กลิ่น รสชาติ ความเป็นเนื้อเดียวกัน และความชอบโดยรวม มีคะแนนความชอบด้านประสาทสัมผัสเท่ากับ 7.30 ± 1.30, 6.17 ± 1.45, 7.03 ± 0.86, 7.40 ± 1.23 และ 7.53 ± 1.17 ตามลำดับ การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อคุณภาพของน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว 3% เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพในด้านต่าง ๆ ระหว่างการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 ± 2 °C พบว่า น้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นได้มากกว่า 4 สัปดาห์ โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มลดลง

ส่วนค่าความหืนมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ค่าความหนืดมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ค่าสี L* มีแนวโน้มลดลง ค่าสี a* มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ค่าสี b* มีแนวโน้มลดลง นอกจากนี้ พบว่าน้ำสลัดชนิดข้นผสมฟักข้าว 3% ตรวจพบการเจริญของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และยีสต์ รา แต่ไม่เกินที่มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำสลัด (มผช.672/2547) และตรวจไม่พบ *Salmonella*

เอกสารอ้างอิง

ทวีทอง หงษ์วิวัฒน์. 2552. น้ำสลัดและซอส. สำนักพิมพ์แสงแดด, กรุงเทพฯ. 160 หน้า.

ธนกิจ ถาหมี และพิไลรัก อินธิปัญญา. 2559. การพัฒนาสูตรชาชงใบหม่อนผสมผลหม่อนโดยใช้การทดลองออกแบบส่วนผสม. วารสารเกษตร 32(2): 235-245.

นิธิยา รัตนาปนนท์ และพิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2553. ค่าเพอร์ออกไซด์. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1615/peroxide-value- (29 กันยายน 2557).

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2553. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 504 หน้า.

เปรมศิริ โรจน์สัจจะกุล และรณชัย ยอดดำเนิน. 2554. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไลโคปีนในน้ำฟักข้าวพร้อมดื่มบรรจุขวดที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนและระหว่างการเก็บรักษา พร้อมการปรับปรุงกระบวนการเพื่อให้ได้มาตรฐาน GMP. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยมหิดล, กาญจนบุรี. 161 หน้า.

ยุทธนา บรรจง. 2553. การพัฒนาน้ำสับปะรดผสมฟักข้าวพร้อมดื่มชนิดพาสเจอไรส์. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 161 หน้า.

ยศ บริสุทธิ์ และชนินทร์ แก้วคะตา. 2558. เงื่อนไขฐานรากในการเข้าสู่อาชีพเกษตรกรรม ของเกษตรกรและบุตรหลานเกษตรกร. วารสารเกษตร 31(2): 215-224.

เยาวภา ขวัญดุษฎี. 2557. ผักพื้นเมืองอาหารไทย. สำนักพิมพ์แสงแดด, กรุงเทพฯ. 286 หน้า.

สุขุมาลย์ หมั่นเจริญ. 2543. การจัดการธุรกิจสมุนไพรไทย: มิติหนึ่งของการส่งเสริมอาชีพท้องถิ่น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 97 หน้า.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2547. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำสลัด. มผช.672/2547. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, กรุงเทพฯ. 6 หน้า.

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC Internationa. 17th ed. AOAC International. Maryland.

Aoki, H., N.T. Kieu, N. Kuze, K. Tomisaka and N. Van Chuyen. 2002. Carotenoid pigments in gac fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng). Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 66(11): 2479-2482.

Dasgupta, N. and B. De. 2004. Antioxidant acivity of *Piper betel* L. leaf extract in vitro. Food Chemistry 88(2): 219-224.

Pearson, D. 1999. The Chemical Analysis of Food. 7th ed. Churchill Living, New York. 575 p.

Healthcare. 2557. อาหารเพื่อสุขภาพ. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http:// www.Healthcarethai.com/category/ (2 เมษายน 2557).

Tanikawa, E. 1985. Marine Product in Japan. 2nd ed. Koseisha-Koseikaku Co., Ltd. Tokyo. 533 p.

ใบบอกรับเป็นสมาชิกวารสารเกษตร
ของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว (ชื่อ)……(สกุล)……..
ในฐานะ ○ ส่วนบุคคล
○ องค์กร/หน่วยงาน (ชื่อ)……
……..
การสื่อสารที่ติดต่อได้ ◯ โทรศัพท์…… ◯ โทรศัพท์มือถือ……
◯ แฟกซ์…… ◯ e – mail……..
ที่อยู่ในการจัดส่งวารสาร : ……
……
……

มีความประสงค์บอกรับเป็นสมาชิกวารสารเกษตรเป็นเวลา (เช็คการเป็นสมาชิกตามระยะเวลาที่ต้องการ)

◯ สมาชิก 1 ปี ตั้งแต่ปี..... อัตราค่าสมาชิก 300 บาท
◯ สมาชิก 2 ปี ตั้งแต่ปี..... อัตราค่าสมาชิก 600 บาท
◯ สมาชิก 5 ปี ตั้งแต่ปี..... อัตราค่าสมาชิก 1,500 บาท

พร้อมนี้ข้าพเจ้าได้จัดส่ง ◯ ธนาณัติ ◯ โอนเงิน ◯ เงินสด มูลค่า……..……บาท

○ ธนาณัติสั่งจ่ายในนาม : คุณลาลิตยา นุ่มมีศรี
ที่ทำการไปรษณีย์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50202

○ โอนเงินเข้าบัญชีออมทรัพย์ ธนาคารกรุงไทย สาขามาหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ชื่อบัญชี Journal of Agriculture Chiangmai University เลขที่บัญชี 456-0-18544-1
พร้อมแฟกซ์หลักฐานการโอนเงิน มายังหมายเลขโทรศัพท์ 053-944040 ต่อ 12 หรือสแกนส่งทาง e-mail : agjournal22@gmail.com

หมายเหตุ :

1. ส่งใบบอกรับเป็นสมาชิกวารสารเกษตรไปที่ : กองบรรณาธิการวารสารเกษตร งานบริหารงานวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50202
2. ท่านที่ประสงค์จะสั่งซื้อวารสารฉบับย้อนหลัง สามารถสั่งซื้อได้ในราคาฉบับละ 100 บาท (รวมค่าจัดส่ง)

นโยบายวารสารเกษตร: ออกตรงเวลา-พัฒนาระดับ impact factor- ผู้เขียนบทความที่ส่งลงตีพิมพ์ต้องสมัครเป็นสมาชิก

คำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ (ต่อ)

รูปแบบในการใช้ภาษาอังกฤษในเนื้อเรื่องภาษาไทย

- ชื่อวิทยาศาสตร์ คำขึ้นต้นให้ใช้อักษรตัวใหญ่ และใช้อักษรตัวเอน
  Meloidogyne incognita
- ชื่อเฉพาะ ให้ขึ้นต้นด้วยอักษรตัวใหญ่ทุกคำ
  Berdmann, Marschner
- ภาษาอังกฤษทั้งในวงเล็บและนอกวงเล็บ ให้ใช้ตัวเล็ก
  completely randomized design , (transition period)
- ตัวย่อ ให้ใช้อักษรตัวใหญ่ทั้งหมด และควรมีคำเต็มบอกไว้ในการใช้ครั้งแรก
  (randomized complete block design, RCBD)
- หัวข้อเรื่อง ให้ขึ้นด้วยอักษรตัวใหญ่
  Abstract, Introduction
- คำแรกที่ตามหลัง คำสำคัญ ให้ขึ้นต้นด้วยอักษรตัวใหญ่
  Keywords : Mango, chlorophyll

การส่งเรื่องเพื่อตีพิมพ์

ให้ส่งบทความ Online เท่านั้น ได้ที่
http://web.agri.cmu.ac.th/agjournal/submission/

การบอกรับเป็นสมาชิก

บอกรับเป็นสมาชิกได้จากใบบอกรับเป็นสมาชิกท้ายเล่ม หรือติดต่อกองบรรณาธิการโดยตรง

การตอบรับบทความ

บทความทุกบทความที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารเกษตร ต้องผ่านการประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิ ไม่น้อยกว่า 2 ท่าน

** กองบรรณาธิการขอสงวนสิทธิ์ในการตรวจและแก้ไขบทความที่เสนอเพื่อการตีพิมพ์ในวารสารเกษตร

** The Editorial Board claims a right to review and correct all articles submitted for publishing

สำนักงานและการติดต่อ (Office and Inquiries)

กองบรรณาธิการวารสารเกษตร

งานบริหารงานวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

โทร. 0 5394 4089-92 ต่อ 12

โทรสาร 0 5394 4089-92 ต่อ 12

Editorial Board, Journal of Agriculture,

Division of Research and International Affairs, Chiang Mai University, Chiang Maii 50200, Thailand

Tel: 0 5394 4089-92

Fax: 0 5394 4666

E-mail: agjournal22@gmail.com

JOURNAL OF AGRICULTURE

A Technical Journal of Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

Volume 33, Issue 1 January - April 2017

ISSN 0857-0841

TCI กลุ่มที่ 1