



วารสารเกษตร

JOURNAL OF AGRICULTURE

วารสารวิชาการของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปีที่ 37 ฉบับที่ 1 มกราคม - เมษายน 2564

คุณภาพผลและปริมาณธาตุอาหารในใบของส้มโอพันธุ์ทองดีและแซนด์เลอร์ที่ผลิตนอกฤดูและในฤดู สาวิกา กอนแสง และ เพ็ญญา จักรสมศักดิ์.....	1
การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ดินลันมังกรสีชมพูโดยใช้สารโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ นิพนธ์ กิตติ วิวัฒน์ บัณฑิตย์ และ ณัฐา โพธาภรณ์.....	15
วงจรชีวิตและความสามารถในการผสมพันธุ์ของกล้วยไม้เหลืองแม่ปิง เอกรัตน์ วสุเพ็ญ จันทลักษณ์ ดิยาณ และ ณัฐา โพธาภรณ์.....	27
คุณสมบัติของถ่านชีวภาพจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์และความสามารถในการปรับปรุงดินกรด พจนีย์ แสงมณี.....	39
ผลของการจัดการน้ำและการพ่นสังกะสีทางใบต่อผลผลิตและการสะสมธาตุอาหาร ในเมล็ดข้าวเหนียว 5 พันธุ์ จินตนา สงค์ศรีอินทร์ สุชาดา จำรัส สุภาภรณ์ ญะเมืองมอญ จิราภรณ์ วีระดิษฐกิจ สิทธิเสวต ลอดแก้ว และ ชนาภาณต์ เทโบลต์ พรหมอุทัย.....	51
ชนิดและการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงวันทองสกุล <i>Bactrocera</i> ที่ทำลายผลพริกบางพันธุ์ ในจังหวัดพิษณุโลก อรอนงค์ พึ่งเขียว วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ จิราพร กุลสาริน และ ยาวาลักษณ์ จันทรืบาง.....	65
การพัฒนาเทคนิคัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์ที่มีความแม่นยำสูงสำหรับประเมินสัดส่วนเพศ ของอสุจิในน้ำเชื้อพ่อโคนม ทฤษฎี คำหล่อ กรวรรณ ศรีงาม ศุภมิตร เมฆฉาย วัชรพงศ์ นรพัลลภ และ นิภา โชคสัจจะวาที.....	75
ผลของระยะเวลาในการบ่มต่อองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารคาร์โบนีนในเนื้อโค ทิพย์ระวี วัชรพงศ์ ศรีมา ทองรวัย ทองสุข เจตนา และ อัจฉรา ชัยน.....	89
ผลของสารพิษทอกซินต่อความเป็นพิษและการตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเอ็มบริโอไก่พื้นเมือง ชมพูนุช หล้าแสงกุล มานินพันธ์ ทองคำ กรวรรณ ศรีงาม วรรณพร ทะพิงค์แก และ มนตรี ปัญญาทอง.....	99
ผลของแหล่งน้ำตลิ่งสู่โครสต่อจุลนาสตร์การหมักไวน์ส้มเกลี้ยง มาลัยพร วงศ์แก้ว คัทลียา ใจดี ณัฐพล อินตา นันทิยา บุญสุข และ พศิน หน่อคำอ้าย.....	109
ผลของปริมาณสารไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลสและระยะเวลาในการอบแห้งต่อคุณภาพ ของวุ้นนางจระเข้ผงด้วยวิธีทำแห้งโฝม - แมท สุภาเวท มานิชม วรางคณา เตมียะ นพพล เล็กสวัสดิ์ และ พัชรีย์ พัฒนากุล.....	121

คำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ

เรื่องที่ต้องพิมพ์

1. เป็นบทความวิจัย บทความปริทัศน์ หรือบทความวิชาการทางด้านเกษตรศาสตร์และสาขาที่เกี่ยวข้อง

2. ต้องไม่เคยได้รับตีพิมพ์มาก่อน (ต้นฉบับ หรือส่วนหนึ่งส่วนใดของต้นฉบับ) และต้นฉบับต้องไม่ได้อยู่ระหว่างกระบวนการพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารหรือสิ่งตีพิมพ์อื่นใด

การเตรียมต้นฉบับ

1. ภาษา เป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ

2. การพิมพ์

1) พิมพ์หน้าเดียวบนกระดาษขนาด A4 พิมพ์แนวตั้ง (portrait orientation) ด้วยโปรแกรมไมโครซอฟต์ เวิร์ด (Microsoft Word for Windows) ตัวอักษรใช้ Cordia New โดยทั่วไปใช้ระยะบรรทัดปกติคือ 1 เท่า หรือ Single ความยาวต้นฉบับไม่เกิน 10 หน้า

2) ชื่อเรื่องให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 18 points พิมพ์ตัวหนา (bold) และจัดกึ่งกลางหน้ากระดาษ สำหรับชื่อเรื่องภาษาอังกฤษ กำหนดให้อักษรตัวแรกของคำให้พิมพ์ด้วยอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ (capital letter)

3) ชื่อผู้เขียนให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 15 points พิมพ์ตัวหนา และจัดกึ่งกลางหน้ากระดาษ

4) ที่อยู่และที่อยู่อีเมลของผู้เขียนให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 12 points พิมพ์ตัวเอียงธรรมดา (normal italic) และจัดกึ่งกลางหน้ากระดาษ

5) บทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 points พิมพ์ตัวธรรมดา (normal) ยกเว้นเฉพาะคำ บทคัดย่อ และ Abstract ให้พิมพ์ตัวหนา และจัดชิดซ้าย

6) เนื้อหาให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 points พิมพ์ตัวธรรมดา (normal)

7) หัวข้อหลัก ได้แก่ คำนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผลการทดลองและวิจารณ์ สรุปเอกสารอ้างอิง ให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 16 points พิมพ์ตัวหนา และจัดกึ่งกลางหน้ากระดาษ

8) หัวข้อย่อย ให้พิมพ์ตัวหนาและจัดชิดซ้าย

9) คำอธิบายตารางและภาพให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 points พิมพ์ตัวหนา โดยคำอธิบายตารางให้พิมพ์ในเนื้อตารางและจัดชิดซ้าย ส่วนคำอธิบายภาพให้พิมพ์ใต้ภาพและจัดกึ่งกลางหน้า และคำอธิบายตารางและภาพถ้ามีมากกว่าหนึ่งบรรทัดให้เริ่มต้นพิมพ์บรรทัดถัดมาตรงกับข้อความของบรรทัดแรก

10) หากมีชื่อวิทยาศาสตร์ปรากฏในบทความ ให้เขียนตามหลักเกณฑ์การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในครั้งแรกที่ปรากฏขึ้นให้สะกดเต็ม เช่น *Meloidogyne incognita* และหลังจากนั้นถ้ามีการระบุชื่อขึ้นอีกให้ย่อชื่อสกุล โดยเขียนเป็น *M. incognita*

11) คำว่า *et al.* และ *P* (*P*-value) ให้พิมพ์เอน

ข้อแนะนำการใช้ภาษา

1) ใช้คำศัพท์ตามพจนานุกรม ฉบับราชบัณฑิตยสถาน และประกาศของราชบัณฑิตยสถาน

2) การเขียนชื่อเฉพาะหรือคำแปลจากภาษาต่างประเทศ ควรพิมพ์ภาษาเดิมของชื่อนั้นๆ ไว้ในวงเล็บในครั้งแรกที่ปรากฏในบทความ โดยพิมพ์เป็นอักษรตัวพิมพ์เล็กทั้งหมด ยกเว้นชื่อเฉพาะให้พิมพ์เฉพาะอักษรตัวแรกเป็นตัวพิมพ์ใหญ่

3) ไม่ควรใช้ภาษาต่างประเทศถ้ามีภาษาไทยใช้อยู่แล้ว

4) รักษาความสม่ำเสมอในการใช้คำ คำศัพท์ และตัวย่อ โดยตลอดทั้งบทความ

การเรียงลำดับหัวข้อ ให้เรียงตามลำดับดังนี้

1. ชื่อเรื่อง (Title) ควรสั้น ชัดเจน และต้องสื่อเป้าหมายหลักของการศึกษาวิจัย มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ต้นฉบับที่เป็นภาษาไทยให้พิมพ์ชื่อเรื่องที่ภาษาไทยก่อน แล้วตามด้วยชื่อเรื่องภาษาอังกฤษในบรรทัดถัดมา หากต้นฉบับเป็นภาษาอังกฤษ ให้พิมพ์ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษก่อนแล้วตามด้วยภาษาไทย

2. ชื่อผู้เขียน ให้ใช้ชื่อเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ หากผู้เขียนมีหลายคนและมีที่อยู่หรือสังกัดแตกต่างกัน ให้ใช้เลขด้วยยก (superscript) ที่ต่างกัน กำกับไว้ท้ายนามสกุลของผู้เขียนที่มีที่อยู่ต่างกันนั้น หากมีผู้เขียนคนเดียว หรือหลายคนที่มีที่อยู่เดียวกัน ไม่ต้องใช้เลขด้วยกำกับท้ายนามสกุลของผู้เขียน นอกจากนี้ ให้ใส่เครื่องหมายดอกจัน (*) กำกับไว้ท้ายนามสกุลของผู้เขียนที่ให้ติดต่อ (corresponding author) ด้วย

3. ที่อยู่ หรือสังกัด ให้ระบุเฉพาะที่อยู่หรือสังกัดของผู้เขียนเท่านั้น มีทั้งที่เป็นภาษาไทยและภาษาอังกฤษ หากที่อยู่มีหลายแห่ง ให้พิมพ์ภาษาไทยของที่อยู่แห่งแรกก่อนแล้วตามด้วยภาษาอังกฤษ จากนั้นพิมพ์ภาษาไทยของที่อยู่แห่งที่สองแล้วตามด้วยภาษาอังกฤษ สลับกัน ในลักษณะนี้เรื่อยไปหากมีมากกว่าสองแห่ง ในกรณีผู้เขียนเป็นนักศึกษา ให้ระบุที่อยู่ตามที่อยู่หรือสังกัดของอาจารย์ที่ปรึกษาเท่านั้น นอกจากนี้ บรรทัดถัดจากที่อยู่ ให้พิมพ์ที่อยู่อีเมล (email address) ของผู้เขียนที่ให้ติดต่อ (corresponding author) ด้วย

4. บทคัดย่อ (Abstract) ควรเป็นเนื้อหาที่สั้น ชัดเจนและเข้าใจง่าย โดยรวมเหตุผลในการศึกษาวิจัย อุปกรณ์ วิธีการ ตลอดจนผลการศึกษาและสรุปด้วย ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ควรเกิน 250 คำ และให้ระบุคำสำคัญ (keywords) ไว้ท้ายบทคัดย่อแต่ละภาษาด้วย คำสำคัญไม่ควรเกิน 5 คำ ต้นฉบับที่เป็นภาษาไทยให้พิมพ์บทคัดย่อภาษาอังกฤษก่อนบทคัดย่อภาษาไทย หากต้นฉบับเป็นภาษาอังกฤษ ให้พิมพ์บทคัดย่อภาษาไทยก่อนบทคัดย่อภาษาอังกฤษ

5. เนื้อหา (Text) ประกอบด้วย

5.1 คำนำ (Introduction) แสดงความเป็นมาและเหตุผลที่นำไปสู่การศึกษาวิจัย อาจรวมการทบทวนเอกสาร (review of literature) และวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยไว้ด้วย

5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ให้อธิบายละเอียดของวัสดุเครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ ในการทดลอง ตลอดจนวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ และแบบจำลองการศึกษาวิจัยที่ชัดเจนและสมบูรณ์

5.3 ผลการทดลองและวิจารณ์ หรือ ผลการศึกษาและวิจารณ์ (Results and Discussion) ให้บรรยายผลการศึกษาวิจัยพร้อมเสนอข้อสรุปในรูปแบบตารางหรือภาพประกอบได้ โดยตารางหรือภาพรวมทั้งคำอธิบายให้จัดทำเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด ถ้ามีตารางหรือภาพในบทความให้อ้างตารางหรือภาพนั้นในเนื้อหาด้วย สำหรับบทวิจารณ์ ควรเชื่อมโยงกับผลการศึกษาว่าสอดคล้องกับสมมติฐาน หรือแตกต่างจากผลงานวิจัยที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหรือไม่อย่างไรและด้วยเหตุใด โดยมีพื้นฐานการอ้างอิงที่เชื่อถือได้

5.4 สรุป (Conclusion) เป็นการสรุปผลที่ได้รับจากการศึกษาวิจัย อาจมีข้อเสนอแนะหรือระบุอุปสรรคและแผนงานวิจัยที่จะดำเนินการต่อไป

5.5 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) อาจมีหรือไม่ก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ให้ทุนวิจัย หรือผู้ช่วยเหลือในงานวิจัย แต่ไม่ได้เป็นผู้ร่วมงานวิจัย

5.6 เอกสารอ้างอิง (References) ให้เรียงเอกสารตามตัวอักษร

หลักการอ้างอิงและการเขียนเอกสารอ้างอิง

เนื่องจากวารสารเกษตรกำลังปรับเข้าสู่ฐานข้อมูล ACI (ASEAN Citation Index) ข้อกำหนดประการหนึ่งก็คือ เอกสารอ้างอิง (reference) ต้องจัดทำเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด ถ้าเป็นภาษาอื่น เช่น ภาษาไทย ต้องแปลเป็นภาษาอังกฤษ แล้ววงเล็บท้ายข้อความว่า in Thai เป็นต้น หลักการอ้างอิงและการเขียนเอกสารอ้างอิง มีดังนี้

1. การอ้างอิงในเนื้อเรื่อง ไม่ควรอ้างอิงถึงเรื่องที่ไม่เกี่ยวข้อง ระบบที่ใช้อ้างอิงคือระบบชื่อและปี (Name-and-year System) ให้ใช้ชื่อสกุลและปี ค.ศ. เช่น Kubo (2003)....หรือ....(Kubo, 2003) ถ้าผู้เขียนมี 2 คน ให้ใช้เป็น Muthita and Kuanprasert (2004)หรือ....(Muthita and Kuanprasert, 2004) หากมีมากกว่า 3 คน ให้ใช้เป็น Bukhari *et al.* (2011)....หรือ....(Bukhari *et al.*, 2015) สำหรับในฉบับอิเล็กทรอนิกส์ให้ระบุชื่อผู้เขียนทุกคนห้ามใช้คำว่า และคณะ หรือ *et al.*

(ดูคำแนะนำการเขียนเอกสารอ้างอิง การส่งต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ และการพิจารณาบทความได้ที่ปกหลังด้านใน)

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	รศ.ดร. ณัฐา โพธาภรณ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Editor	Nuttha Potapohn, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University
รองบรรณาธิการ	ผศ.ดร. ชูชาติ สันธทรัพย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Vice Editor	Choochad Santasup, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University
กองบรรณาธิการ ฝ่ายวิชาการ	ผศ.ดร. ต่อนภา ผุสดี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รศ.ดร. รุจ ศิริสุนทรลักษณ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. บุศรา ลิ้มนิรันดร์กุล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รศ.ดร. ชนาگانต์ เทโบลต์ พรหมอุทัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รศ.ดร. พิชญา พูลลาภ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. อรุมา เรืองวงษ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. ฉันทลักษณ์ ดิทยาน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. พิมพีใจ สีหะนาม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. จิรวรรณ กิจชัยเจริญ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. เสาวลักษณ์ แย้มหมื่นอาจ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Editorial Board (Academic)	Tonapa Pusadee, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Ruth Sirisunyaluck, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University Budsara Limnirankul, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Chanakan Thebault Prom-u-thai, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University Pichaya Poonlarp, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University Yaowaluk Chanbang, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University On-Uma Ruangwong, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Chantalak Tiyyan, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Pimjai Seehanam, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Jirawan Kitchaicharoen, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Saowaluck Yammuen-art, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University

ผศ.ดร. มินตรา ศีลอุดม
 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 รศ.ดร. ไสว บุรณพานิชพันธุ์
 ข้าราชการเกษียณอายุ
 ศ.ดร. จรรย์ จันทลักษณ์
 ข้าราชการเกษียณอายุ
 ศ. ญานฉวี ดร. เมธาวรรณพัฒน์
 มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 ศ.ดร. อังศุมาลย์ จันทวาปัติย์
 ข้าราชการเกษียณอายุ
 ศ.ดร. สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร
 ข้าราชการเกษียณอายุ
 ศ.ดร. ธวัชชัย ศุภดิษฐ์
 สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์
 รศ.ดร. เสวียน เปรมประสิทธิ์
 มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
 รศ.ดร. วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ
 ข้าราชการเกษียณอายุ
 รศ.ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล
 มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 รศ. บำเพ็ญ เขียวหวาน
 มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช
 รศ.ดร. เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน
 ข้าราชการเกษียณอายุ
 รศ.ดร. ธีรนุช เจริญกิจ
 มหาวิทยาลัยแม่โจ้
 ผศ.ดร. ปฎิภาณ สุทธิกุลบุตร
 มหาวิทยาลัยแม่โจ้
 ผศ.ดร. เพ็ญพร เจนการกิจ
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 ผศ.ดร. ไชยวรรณ วัฒนจันทร์
 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
 ผศ.ดร. เสาวคนธ์ วัฒนจันทร์
 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
 กองบรรณาธิการ
 ฝ่ายการจัดการ
 นางลาลิตยา นุ่มมีศรี
 นายมานพ เปี้ยพรรณ
 นางสาววันวิสา บุตรอินทร์

Mintra Seel-audom, Ph.D., Assist. Prof.
 Chiang Mai University
 Sawai Buranapanichpan, Ph.D., Assoc. Prof.
 Retired government official
 Charan Chantalakhana, Ph.D., Prof.
 Retired government official
 Metha Wanapat, Ph.D., Prof.
 Khon Kaen University
 Angsumarn Chandrapatya, Ph.D., Prof.
 Khon Kaen University
 Suchila Techawongstien, D.Agr., Prof.
 Retired government official
 Tawadchai Suppadit, Ph.D., Prof.
 National Institute of Development Administration
 Savent Pampasit, Ph.D., Assoc. Prof.
 Naresuan University
 Weerathep Pongprasert, Ph.D., Assoc. Prof.
 Retired government official
 Petcharat Thummabenjapone, Ph.D., Assoc. Prof.
 Khon Kaen University
 Bumpen Keowan, M.S., Assoc. Prof.
 Sukhothai Thammathirat Open University
 Kriangsak Mengumphan, Ph.D., Assoc. Prof.
 Retired government official
 Theeranuch Jaroenkit, Ph.D., Assoc. Prof.
 Maejo University
 Pathipan Sutigoolabud, Ph.D., Assist. Prof.
 Maejo University
 Penporn Janekamkij, Ph.D., Assist. Prof.
 Kasetsart University
 Chaiyawan Wattanachant, Ph.D., Assist. Prof.
 Prince of Songkla University
 Saowakon Wattanachant, Ph.D., Assist. Prof.
 Prince of Songkla University
 Editorial Board
 (Management)
 Lalitaya Nummisri
 Manop Pearpun
 Wanvisa Butin

บทบรรณาธิการ

วารสารเกษตรเล่มนี้เป็นฉบับแรกของปีที่ 37 ในฉบับนี้ประกอบด้วยบทความทางวิชาการที่มีต้นฉบับเป็นภาษาไทยทั้งหมด จำนวน 11 เรื่อง ประกอบด้วย สาขาพืชสวน 3 เรื่อง สาขาปฐพีศาสตร์ 2 เรื่อง สาขากัญญาวิทยา 1 เรื่อง สาขาสัตวศาสตร์ 3 เรื่อง และสาขาการแปรรูปอาหารและสมุนไพร 2 เรื่อง

ทางวารสารเกษตร เปิดรับบทความวิชาการทางเกษตร วิทยาศาสตร์เกษตร และสาขาที่เกี่ยวข้อง ผู้ที่สนใจส่งบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารเกษตร สามารถหาข้อมูลเพิ่มเติมได้จากเว็บไซต์วารสาร <https://www.tci-thaijo.org/index.php/joacmu/index> หรือสามารถติดต่อมายังกองบรรณาธิการได้ที่ E-mail : agjournal22@gmail.com

รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐา โพธาภรณ์

บรรณาธิการวารสารเกษตร

คุณภาพผลและปริมาณธาตุอาหารในใบของส้มโอพันธุ์ทองดี และแชนด์เลอร์ที่ผลิตนอกฤดูและในฤดู

Fruit Quality and Leaf Nutrient Content of Pummelo cv.Thong Dee and Chandler Bearing Off- season and In- season

สาวิกา กอนแสง และ เพ็ญญา จักรสมศักดิ์
Sawika Konsaeng and Pennapa Jaksomsak^{*}

สาขาวิชาเกษตรเคมี คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

Program in Agricultural Chemistry, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

^{*}Corresponding author: Email: pen_jak11@hotmail.com

(Received: 16 April 2020; Accepted: 21 September 2020)

Abstract: The objective of this research was to evaluate the difference of fruit quality and nutrient in leaf of pummelo cv. Thong Dee and Chandler bearing off - season and in - season. Samples of fruits and leaf bearing off - season and in - season were collected to measure fruit size, fruit qualities (pulp color; L^* , a^* , and b^*), total soluble solid content (TSS), titratable acidity content (TA), and ratio between TSS : TA and analyze nutrients in leaf. It was found that longitudinal and transverse circumference of fruit in - season production were higher than off - season 13.6 % and 11.5 %, respectively. Similarly, fruit qualities; a^* , TSS, and TSS:TA bearing in - season were higher than off - season 164.0 %, 7.5 % and 49.2 %, respectively, excepting TA that off - season production was higher approximately 40.8 %. Moreover, pummelo bearing in - season had leaf nutrients, N, Mg, B and Cu higher than off-season 8.3 %, 54.5 %, 12.5 % and 82.5 %, respectively. The positive correlation was found between a^* and leaf nutrients which were Mg, Zn, Cu, and Fe. Likewise, TSS : TA correlated positively with Mg, Zn, Cu, Mn, and Fe in leaf. This information could be benefit to apply for suitable nutrient management to produce the quality pummelo constantly in all season.

Keywords: Fruit quality, pummelo, leaf nutrient, production season, carotenoid

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความแตกต่างของคุณภาพผลส้มโอ และปริมาณธาตุอาหารในใบของ ส้มโอพันธุ์ทองดีและแซนด์เลอร์ที่ผลิตนอกและในฤดู จากอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย โดยทำการวัดขนาดผล คุณภาพผล (สีของเนื้อผล (L^* , a^* และ b^*) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSS) ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TA) และอัตราส่วนของปริมาณ TSS : TA) รวมทั้งวิเคราะห์ธาตุอาหารในส่วนใบ พบว่า ส้มโอทั้งสองพันธุ์ที่ผลิตในฤดูมีเส้นรอบวงตามแนวตั้ง และเส้นรอบวงตามแนวขวางมากกว่านอกฤดู 13.6 % และ 11.5 % ตามลำดับ ค่า a^* , TSS และ TSS : TA ที่ผลิตในฤดู มีค่ามากกว่านอกฤดู 164.0 %, 7.5 % และ 49.2 % ตามลำดับ ยกเว้น ค่า TA ของส้มโอที่ผลิตนอกฤดูมีค่ามากกว่าในฤดู 40.8 % สำหรับธาตุอาหารในใบ พบว่า ในฤดูมีปริมาณธาตุ N, Mg, B และ Cu มากกว่านอกฤดู 8.3 %, 54.5 %, 12.5 % และ 82.5 % ตามลำดับ ค่า a^* ของผลส้มโอ มีความสัมพันธ์ในทิศทางบวกกับปริมาณธาตุ Mg, Zn, Cu และ Fe ในใบ อัตราส่วน TSS : TA มีค่าเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกับปริมาณธาตุ Mg, Zn, Cu, Mn และ Fe ในใบ ข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำไป ประยุกต์ใช้สำหรับการจัดการธาตุอาหารที่เหมาะสม เพื่อการผลิตส้มโอทั้งสองพันธุ์นี้ให้มีคุณภาพผลที่มีความสม่ำเสมอ ทั้งนอก และในฤดู

คำสำคัญ: คุณภาพผล ส้มโอ ธาตุอาหารในใบ ฤดูผลิต แครทีนอยด์

คำนำ

อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายเป็นพื้นที่ปลูก ส้มโอที่มีศักยภาพในการส่งออกต่างประเทศ โดยมี ตลาดใหญ่คือประเทศจีน และฮ่องกง นอกจากนี้ยังเป็น แหล่งปลูกที่สามารถส่งออกไปยังประเทศกลุ่มยุโรป โดยในปีเพาะปลูก พ.ศ. 2562 มีพื้นที่ปลูกส้มโอรวมทั้งหมด 6,100 ไร่ พื้นที่เก็บเกี่ยวผลผลิต 5,018 ไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 5,071.34 กิโลกรัมต่อไร่ (Department of Agricultural Extension, 2020) พันธุ์ส้มโอที่ปลูกมากที่สุด คือ พันธุ์ ทองดี รองลงมาคือพันธุ์แซนด์เลอร์ (Santasup *et al.*, 2013) ส้มโอพันธุ์ทองดี และแซนด์เลอร์จัดอยู่ในกลุ่มส้มโอ ที่มีเนื้อสีแดง มีสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มแคโรทีนอยด์ ในปริมาณสูง มีคุณสมบัติในด้านโภชนาการและต้าน อนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดโรคมะเร็งต่าง ๆ โรคหัวใจและ หลอดเลือด และเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์วิตามินเอ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค (Edge *et al.*, 1997) และ เป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศ แต่จากการสำรวจและ สัมภาษณ์เกษตรกรเบื้องต้น พบว่า ส้มโอพันธุ์ทองดี และแซนด์เลอร์ที่ให้ผลผลิตนอกฤดูมีความเข้มสีจาง หรือแทบไม่มีสีเมื่อเทียบกับส้มโอในฤดู ซึ่งในทางการค้า ความเข้มสีแดงมีผลต่อความต้องการของตลาด ทำให้ผล ผลิตที่ออกนอกฤดูเป็นที่ต้องการของตลาดน้อยลง อีกทั้งส่งผลกระทบต่อคุณค่าทางโภชนาการ

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุหลักในส่วน ของ เปลือก และเนื้อผล ที่ทำให้พืชวงศ์ส้มมีสีแดง เหลือง และ ส้มแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช พืชวงศ์ส้มแต่ละ ชนิดมีปริมาณแคโรทีนอยด์ และความเข้มข้นในส่วน ของ เปลือก และเนื้อผลแตกต่างกัน รวมทั้งในสายพันธุ์ที่ แตกต่างกัน ปริมาณและองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ ในส่วนเปลือกและเนื้อผลมีความสัมพันธ์กับความเข้มสี ในส่วนเปลือกและเนื้อผลด้วย (Abdelaali *et al.*, 2018) ชนิดสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่พบมากที่สุด ในส้มโอ พันธุ์เนื้อสีแดง ได้แก่ ไลโคพิน (Alquézar *et al.*, 2008; Promkaew *et al.*, 2020) นอกจากพันธุ์กรรมที่มีอิทธิพล ต่อการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ สภาพแวดล้อมก็ส่งผล ต่อการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ด้วย โดยกระบวนการทาง สรีรวิทยาที่ควบคุมการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ คือ การเปลี่ยนคลอโรพลาสต์ไปเป็นโครโมพลาสต์ที่อยู่ใน พลาสติด ถูกควบคุมด้วยปัจจัยสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง และธาตุอาหาร (Alquézar *et al.*, 2008) Zhang *et al.* (2015) รายงานว่าความเข้มแสง สีน้ำเงินที่แตกต่างกันมีผลต่อการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ในเนื้อผลส้มแต่ละพันธุ์แตกต่างกัน การสังเคราะห์ แคโรทีนอยด์ของส้มพันธุ์ขัณฑสีมาจะสูงขึ้นที่ความเข้ม แสงสีฟ้าเท่ากับ 100 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$ ขณะที่ส้มพันธุ์เวเลนเซีย มีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เพิ่มมากขึ้นที่ความเข้มแสงสี ฟ้าเท่ากับ 50 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$ สถานที่ปลูกที่มีสภาพ

ภูมิอากาศแตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณแคโรทีนอยด์แตกต่างกันด้วย ส้มที่ปลูกในเขตเมดิเตอร์เรเนียนที่มีภูมิอากาศแบบเขตร้อนมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าส้มที่ปลูกที่ตาดิที่มีภูมิอากาศแบบเขตร้อน นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงบทบาทของการจัดการธาตุอาหารที่มีผลต่อความเข้มข้น และปริมาณแคโรทีนอยด์ในเนื้อผลของพืชวงศ์ส้ม โดยการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทางดินในอัตราที่ต่ำมีผลทำให้มีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น เนื่องจากธาตุไนโตรเจนในอัตราสูงมีผลยับยั้งการเปลี่ยนรูปของคลอโรพลาสต์ไปเป็นโครโมพลาสต์ในส่วนของผล (Iglesias *et al.*, 2001) นอกจากนี้รสชาติส้มโอ ซึ่งเป็นอีกหนึ่งลักษณะที่มีความสำคัญของการผลิตส้มโอคุณภาพ พบว่า สภาพแวดล้อม โดยเฉพาะธาตุอาหารก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อลักษณะนี้อย่างมาก ในพืชวงศ์ส้ม (Khurshid *et al.*, 2008) แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปริมาณธาตุอาหารในส่วนใบซึ่งมีความแปรผันตามฤดูกาลที่มีผลต่อคุณภาพผลส้มโอ โดยเฉพาะด้านที่เกี่ยวกับความเข้มข้นของเนื้อผล และรสชาติ ยังมีอยู่น้อยมาก ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้ จึงได้ทำการทดลองเพื่อประเมินความแตกต่างของความเข้มข้นของเนื้อผล และรสชาติ รวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างธาตุอาหารในส่วนใบ และความเข้มข้นในเนื้อผล และรสชาติของส้มโอพันธุ์ทองดีและแซนด์เลอร์ที่ผลิตนอกฤดูและในฤดู ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการจัดการธาตุอาหารในการผลิตส้มโอในแต่ละฤดูให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพตามความต้องการ

อุปกรณ์และวิธีการ

การวิจัยครั้งนี้ได้ดำเนินการที่สวนส้มโอของเกษตรกรในตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัด

เชียงราย โดยเก็บข้อมูลในส่วนส้มโอของเกษตรกรที่มีการปลูกส้มโอที่มีลักษณะเนื้อผลสีแดง ได้แก่ พันธุ์ทองดี และพันธุ์แซนด์เลอร์ ที่ผลิตนอกฤดู และในฤดู (ส้มโอนอกฤดูเก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเดือนพฤษภาคม และส้มโอในฤดูเก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเดือนกันยายน) จัดสิ่งทดลองแบบ factorial 2 ปัจจัย ประกอบด้วย ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ พันธุ์ส้มโอจำนวน 2 พันธุ์ (พันธุ์ทองดี และพันธุ์แซนด์เลอร์) และปัจจัยที่ 2 ได้แก่ ฤดูกาลผลิต 2 ฤดู (นอกฤดู และในฤดู) รวมมี 4 กรรมวิธี ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) จำนวน 6 ซ้ำ สำหรับการเก็บตัวอย่างใบในทั้งสองฤดูการผลิต สุ่มเก็บตัวอย่างใบอ่อนที่สุดที่ขยายตัวเต็มที่ (youngest fully expanded leaves) ที่อยู่นอกทรงพุ่ม 20 ใบต่อดัน และผลส้มโอ 5 ผลต่อดัน รวมทั้งสุ่มเก็บตัวอย่างดินในแปลงในทั้งสองฤดูเก็บเกี่ยวเพื่อวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และปริมาณธาตุอาหารในดิน (Table 1) วัดลักษณะทางสัณฐานของผล ได้แก่ เส้นรอบวงตามแนวตั้ง และแนวขวาง วัดความเข้มข้นของเนื้อผลโดยใช้เครื่อง colorimeter (Konica Minolta) รายงานผลเป็นค่า L^* a^* และ b^* ค่า L^* แสดงถึงความสว่างจากค่า $+L^*$ แสดงถึงสีขาว จนถึง $-L^*$ แสดงถึงสีดำ ค่า a^* แสดงถึงสีเขียว $-a^*$ ไปจนถึง แดง $+a^*$ ส่วน b^* แสดงถึงสีน้ำเงิน $-b^*$ ไปเหลือง $+b^*$ นำตัวอย่างเนื้อผลส้มโอมาคั้นน้ำเพื่อวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) จากน้ำคั้นส้มโอด้วย hand refractometer ค่าที่อ่านได้มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TA) โดยใช้น้ำคั้นส้มโอมาไทเทรตด้วยสารละลาย NaOH 0.1 N นำค่าที่ได้มาคำนวณอัตราส่วน TSS : TA ตัวอย่างใบของส้มโอนำมาอบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดตัวอย่างใบ เพื่อวิเคราะห์ธาตุอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ด้วยวิธี Kjeldahl method ฟอสฟอรัส (P) ด้วยวิธี

Table 1. pH, organic matter (OM), and nutrients in soil of pummelo orchard bearing off-season and in-season

Time	pH	OM (%)	P (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (%)	Zn (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Cu (mg/kg)
Off-season	6.0	1.6	5.0	55.0	2,090	0.4	20.3	37.3	129.4	12.3
In-season	6.3	2.3	250.0	277.1	2,032	0.6	7.7	53.1	120.1	16.5

yellow method โบรอน (B) ด้วยวิธี azomethine - H โฟแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) เหล็ก (Fe) สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) อ่านค่าด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer (Puranapong, 2005)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation analysis) ระหว่างคุณภาพส้มโอและธาตุอาหารในใบ

ผลการศึกษา

ขนาดและคุณภาพผลส้มโอพันธุ์แฮนด์เลอร์ และทองดีที่ผลิตนอก และในฤดู

จากการเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ พบว่า ขนาดเส้นรอบวงตามแนวขวางของผลส้มโอทั้งสองพันธุ์มีความแตกต่างกัน แต่เส้นรอบวงตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกัน (Table 2) โดยผลของพันธุ์ทองดีมีเส้นรอบวงตามแนวขวางมากกว่าพันธุ์แฮนด์เลอร์ 6.1 % สำหรับการผลิติด้านนอกฤดูและในฤดูมีผลต่อเส้นรอบวง

ของผลส้มโอทั้งตามแนวตั้ง และตามแนวขวาง (Table 2) ผลส้มโอที่ได้จากการเก็บเกี่ยวในฤดูมีเส้นรอบวงตามแนวตั้ง และตามแนวขวางมากกว่าที่เก็บเกี่ยวนอกฤดู 13.6 % และ 11.5 % ตามลำดับ โดยไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างสองปัจจัยที่มีต่อขนาดผลของส้มโอ เช่นเดียวกันกับลักษณะสีของเนื้อผลที่ไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างสองปัจจัย แต่พบว่า มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ และช่วงระยะเวลาการผลิติด้านส้มโอ (Table 3) จะเห็นได้ว่าพันธุ์แฮนด์เลอร์ มีความเข้มสีแดงของเนื้อผลมากกว่าพันธุ์ทองดีในทั้งสองฤดูการผลิต (Figure 1) การผลิติด้านส้มโอในฤดูของส้มโอทั้งสองพันธุ์มีความเข้มสีแดงในเนื้อผลมากกว่านอกฤดูอย่างชัดเจน โดยพบว่ามีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในค่า L^* และ a^* แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในค่า b^* พันธุ์ทองดีมีค่า L^* มากกว่าพันธุ์แฮนด์เลอร์ 5.5 % แต่กลับมีค่า a^* น้อยกว่า 103.3 % เนื้อผลส้มโอที่ผลิตนอกฤดูมีค่า L^* และ b^* มากกว่าในฤดู 22.0 และ 19.0 % ตามลำดับ ขณะที่ค่า a^* ของส้มโอที่มีการผลิตในฤดูมีค่ามากกว่านอกฤดูถึง 164.0 % (Table 3) จากผลการศึกษาจึงพบว่า ค่า TA และอัตราส่วน TSS : TA มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ขณะที่ไม่พบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในค่า TSS สำหรับค่า TA พบว่า พันธุ์ทองดีมีค่ามากกว่าแฮนด์เลอร์

Table 2. Fruit size (Longitudinal and transverse circumference) of pummelo cultivar Chandler and Thong Dee bearing off-season and in - season

Cultivar	Time of production		
	Off - season	In - season	Mean
Longitudinal circumference (cm)			
Chandler	45.5	51.1	48.3
Thong Dee	45.8	52.6	49.2
Mean	45.6b	51.8a	
P - value	Cultivar ns _{0.05}	Time*** (LSD _{0.05} = 2.2)	Cultivar x Time ns _{0.05}
Transverse circumference (cm)			
Chandler	45.7	50.8	48.2b
Thong Dee	48.3	54.0	51.2a
Mean	47.0b	52.4a	
P - value	Cultivar*	Time*** (LSD _{0.05} = 2.2)	Cultivar x Time ns _{0.05}

Different lower - case letters designate a significant difference between means for cultivars or time with LSD at $P < 0.05$

ns means non - significant different at $P < 0.05$, * and *** means significant different at $P < 0.05$ and 0.001, respectively

51.1 % แต่มีอัตราส่วน TSS : TA น้อยกว่า 55.5 % สำหรับฤดูการผลิตระหว่างนอกและในฤดูมีผลต่อคุณภาพส้มโอทุกลักษณะ อีกทั้งการผลิตในฤดูมีค่า TSS

และอัตราส่วน TSS : TA มากกว่านอกฤดู 7.5 และ 49.2 % ตามลำดับ ส่วนการผลิตนอกฤดูนั้นมีค่า TA มากกว่าในฤดู 40.8 % (Table 4)

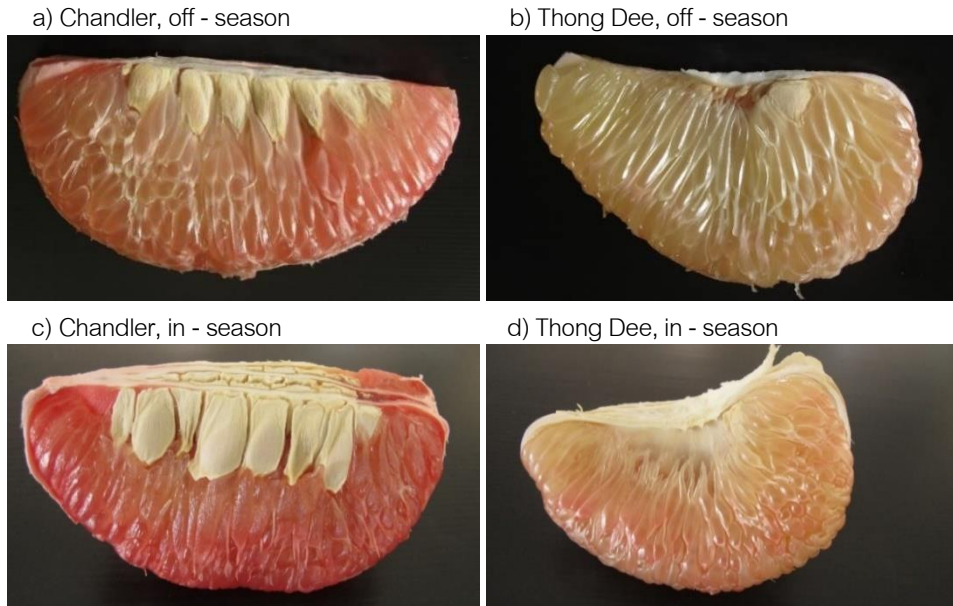


Figure 1. Comparison of pummelo fruit cv. Chandler and Thong Dee bearing in-season and off-season

Table 3. Pulp color (L^* , a^* , b^*) of pummelo cultivar Chandler and Thong Dee bearing off-season and in-season.

Cultivar	Time of production		
	Off-season	In-season	Mean
L^* of pulp			
Chandler	45.2	35.5	40.3b
Thong Dee	45.9	39.1	42.5a
Mean	45.5a	37.3b	
P-value	Cultivar* ($LSD_{0.05} = 2.0$)	Time*** ($LSD_{0.05} = 2.0$)	Cultivar x Time ns _{0.05}
a^* of pulp			
Chandler	2.7	9.5	6.1a
Thong Dee	2.3	3.7	3.0b
Mean	2.5b	6.6a	
P-value	Cultivar** ($LSD_{0.05} = 1.1$)	Time** ($LSD_{0.05} = 1.1$)	Cultivar x Time ns _{0.05}
b^* of pulp			
Chandler	16.8	13.2	15.0
Thong Dee	16.8	14.0	15.4
Mean	16.8a	13.6b	
P-value	Cultivar ns _{0.05}	Time*** ($LSD_{0.05} = 1.1$)	Cultivar x Time ns _{0.05}

Different lower-case letters designate a significant difference between means for cultivars or time with LSD at $P < 0.05$

ns means non-significant different at $P < 0.05$, *, ** and *** mean significant different at $P < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively

Table 4. Total soluble solid (TSS), Titratable acidity (TA), and TSS : TA of pummelo cultivar Chandler and Thong Dee bearing off-season and in - season.

Cultivar	Time of production		
	Off - season	In - season	Mean
Total soluble (TSS, %)			
Chandler	8.2	8.8	8.5
Thong Dee	7.9	8.5	8.2
Mean	8.0b	8.6a	
P- value	Cultivar ns _{0.05}	Time** (LSD _{0.05} = 0.4)	Cultivar x Time ns _{0.05}
Titratable acidity (TA, %)			
Chandler	0.55	0.40	0.47b
Thong Dee	0.82	0.59	0.71a
Mean	0.69a	0.49b	
P- value	Cultivar*** (LSD _{0.05} = 0.05)	Time*** (LSD _{0.05} = 0.05)	Cultivar x Time ns _{0.05}
TSS:TA			
Chandler	14.8	22.1	18.5a
Thong Dee	9.6	14.3	11.9b
Mean	12.2b	18.2a	
P- value	Cultivar*** (LSD _{0.05} = 2.0)	Time*** (LSD _{0.05} = 2.0)	Cultivar x Time ns _{0.05}

Different lower - case letters designate a significant difference between means for cultivars or time with LSD at $P < 0.05$

ns means non - significant different at $P < 0.05$, ** and *** means significant different at $P < 0.01$ and 0.001 , respectively

ปริมาณธาตุอาหารในส่วนใบส้มโอพันธุ์แฮนด์เลอร์ และทองดีที่ผลิตนอก และในฤดู

จากการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณธาตุอาหารในส่วนใบส้มโอ (Table 5) พบว่า ทั้งปัจจัยทางพันธุกรรม และฤดูผลิต มีผลต่อปริมาณธาตุอาหารในส่วนใบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดธาตุอาหาร แต่ไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างสองปัจจัย ปริมาณธาตุอาหารในใบที่พบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้แก่ Ca, B, Zn, Mn และ Fe (Figure 2) พันธุ์ทองดีมีปริมาณธาตุ Ca และ B มากกว่าแฮนด์เลอร์ 18.2 และ 11.2 % ตามลำดับ ขณะที่พันธุ์แฮนด์เลอร์มีปริมาณธาตุ Zn, Mn และ Fe มากกว่าพันธุ์ทองดี 25.4, 49.1 และ 60.8 % ตามลำดับ สำหรับฤดูการผลิตพบว่า การผลิตในฤดู มีปริมาณธาตุ N, Mg, B และ Cu มากกว่านอกฤดู 8.3, 54.5, 12.5 % และ 82.5 % ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างของปริมาณธาตุอื่นๆ ที่เหลือ (Figure 3)

ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของส้มโอและธาตุอาหารในส่วนใบ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของส้มโอและปริมาณธาตุอาหารในส่วนใบ (Table 6) พบว่า ค่า L' มีความสัมพันธ์ในทิศทางลบอย่างมีนัยสำคัญกับธาตุ Mg, Zn, Cu และ Fe ($r = -0.70^{***}, -0.41^*, -0.72^{***}$ และ -0.44^*) ในขณะที่ค่า a'' มีความสัมพันธ์ในทิศทางบวกอย่างมีนัยสำคัญกับธาตุ Mg, Zn, Cu และ Fe ($r = 0.58^{**}, 0.43^*, 0.47^*$ และ 0.55^{**}) ค่า b' มีความสัมพันธ์ในทิศทางลบอย่างมีนัยสำคัญกับธาตุ Mg, Zn และ Cu ($r = -0.67^{***}, -0.45^*$ และ -0.79^{***}) ค่า TSS มีความสัมพันธ์ในทิศทางบวกกับธาตุ Mg, Cu และ Fe ($r = 0.45^*, 0.60^{**}$ และ 0.46^*) ค่า TA มีความสัมพันธ์ในทิศทางลบอย่างมีนัยสำคัญกับธาตุ Mg, Zn, Mn, Cu และ Fe ($r = -0.64^{***}, -0.48^*, -0.50^*, -0.49^*$ และ -0.64^{***}) และอัตราส่วน TSS : TA พบว่า มีความสัมพันธ์ในทิศทางบวกอย่างมีนัยสำคัญกับธาตุ Mg, Zn, Mn, Cu และ Fe ($r = 0.68^{***}, 0.50^*, 0.47^*, 0.54^{**}$ และ 0.65^{***})

Table 5. Effect of pummelo cv. Chandler and Thong Dee, time of production (off - season and in - season) and interaction between two factors on nutrient contents in leaf

Source of variation	Significance									
	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	B (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)
Cultivar (C)	ns	ns	ns	**	ns	*	*	**	ns	***
Time (T)	**	ns	ns	ns	***	*	ns	ns	***	ns
C x T	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns means non-significant difference, *, **, and *** mean significant different at $P < 0.05$, 0.01 , and 0.001 , respectively

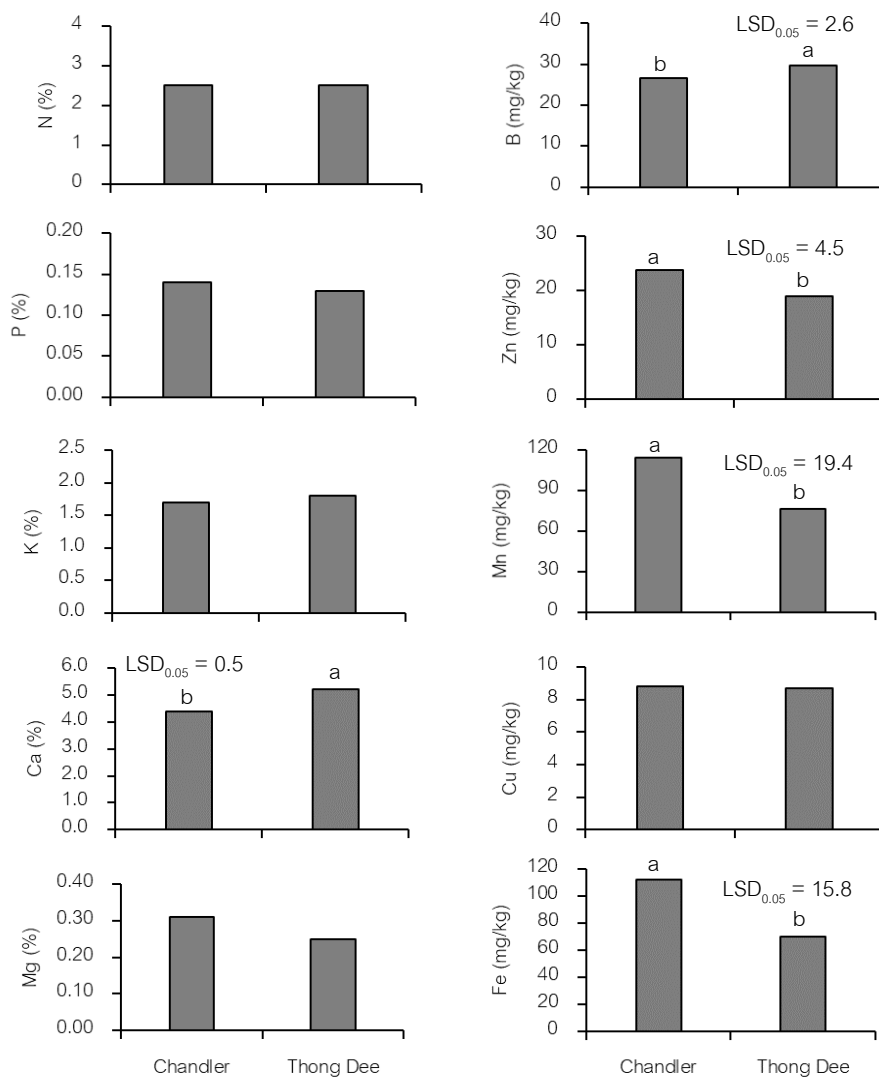
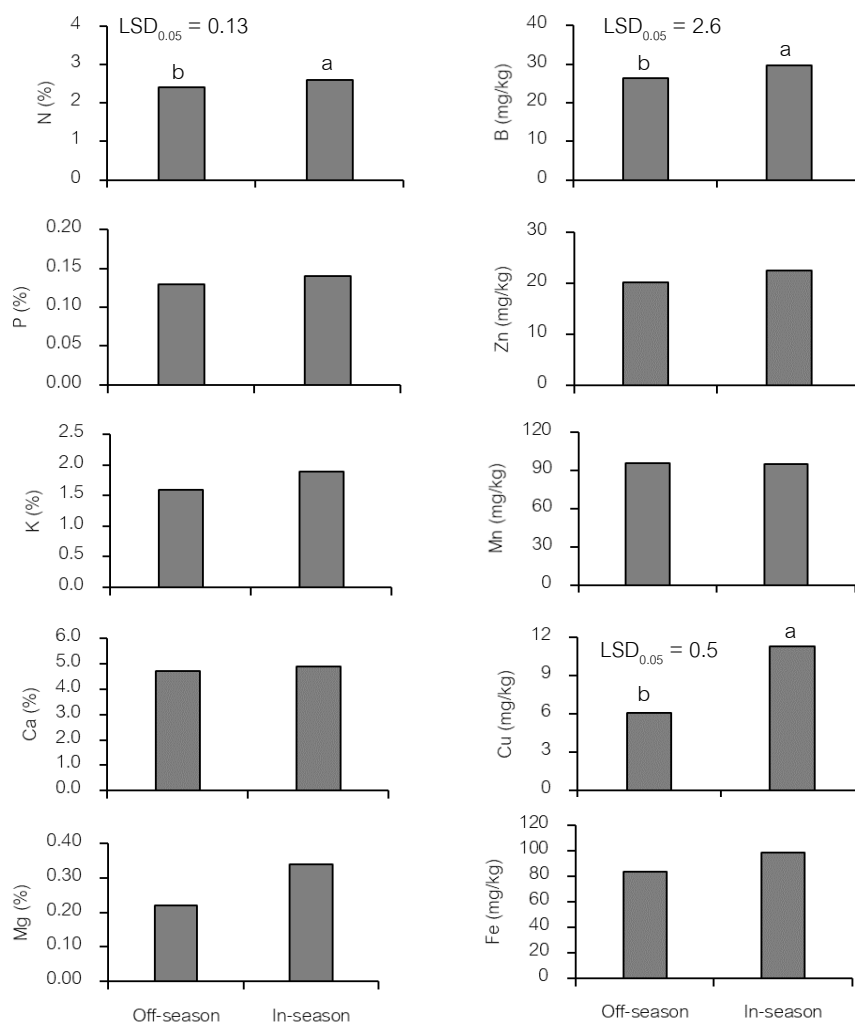


Figure 2. Effects of pummelo cv. Chandler and Thong Dee on nutrients in leaf base on significance which were shown in Table 5 (different lower - case letters designate a significant difference between means for cultivars with LSD at $P < 0.05$)

Table 6. Correlation between nutrients in leaf and quality characteristics (L^* , a^* , b^* , TSS, TA, and TSS : TA) of pummelo cv. Chandler and Thong Dee bearing off-season and in-season

Correlation (r)	N	P	K	Ca	Mg	B	Zn	Mn	Cu	Fe
L^*	ns	ns	ns	ns	-0.70***	ns	-0.41*	ns	-0.72***	-0.44*
a^*	ns	ns	ns	ns	0.58**	ns	0.43*	ns	0.47*	0.55**
b^*	ns	ns	ns	ns	-0.67***	ns	-0.45*	ns	-0.79***	ns
TSS (%)	ns	ns	ns	ns	0.45*	ns	ns	ns	0.60**	0.46*
TA (%)	ns	ns	ns	ns	-0.64***	ns	-0.48*	-0.50*	-0.49*	-0.64***
TSS : TA	ns	ns	ns	ns	0.68***	ns	0.50*	0.47*	0.54**	0.65***

ns means show non-correlation

*, **, and *** means show correlation at $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectivelyFigure 3. Effects of production time (off - season and in - season) on nutrients in leaf base on significance which were shown in Table 5 (different lower - case letters designate a significant difference between means for production time with LSD at $P < 0.05$)

วิจารณ์

การวิจัยในครั้งนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าช่วงระยะเวลาการผลิดและพันธุ์ส้มโอมีผลต่อทั้งคุณภาพผล และปริมาณธาตุอาหารในใบ อีกทั้งคุณภาพผล ได้แก่ ความเข้มสีแดงของเนื้อผล และรสชาติที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณธาตุอาหารในใบ โดยพันธุ์แซนด์เลอร์มีความเข้มสีแดงของเนื้อผลที่บ่งบอกด้วยค่า a^* และรสชาติที่บ่งบอกด้วยอัตราส่วน TSS : TA ดีกว่าพันธุ์ทองดี ซึ่งจากการที่พบว่า พันธุ์แซนด์เลอร์มีความเข้มสีแดงในเนื้อผลมากกว่าพันธุ์ทองดีอาจเนื่องมาจากการสังเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่แตกต่างกัน และองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ที่แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ (Lee, 2001) โดย Chaiwong and Theppakorn (2012) พบว่า ส้มโอพันธุ์แซนด์เลอร์มีปริมาณไลโคปีนสูงกว่าพันธุ์ทองดีถึง 4 เท่า และในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามที่มีเนื้อสีแดงเข้มนั้นพบว่าปริมาณของสารกลุ่มไลโคปีนมากที่สุด โดยคิดเป็น 93 % ของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (Tatmla *et al.*, 2020) สำหรับการผลิดในฤดูทำให้ส้มโอทั้งสองพันธุ์มีคุณภาพผลที่ดีกว่านอกฤดู รวมทั้งขนาดผลด้วย โดยจะเห็นได้จากค่า a^* , TSS และอัตราส่วน TSS : TA ของส้มโอที่ผลิดในฤดูมีค่ามากกว่านอกฤดูอย่างมาก และพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิดนอกฤดู คือพันธุ์แซนด์เลอร์ เนื่องจากค่า % TA น้อยกว่า และอัตราส่วน TSS : TA รวมทั้งความเข้มสีแดงของเนื้อผลมีมากกว่าพันธุ์ทองดีที่ผลิดนอกฤดู

ปริมาณธาตุอาหาร N, Mg, B และ Cu ในใบส้มโอที่มีการผลิดในฤดูมีค่ามากกว่านอกฤดู และค่า a^* ของผลส้มโอ มีค่าเพิ่มขึ้นไปในทิศทางเดียวกับปริมาณธาตุ Mg, Zn, Cu และ Fe ในใบ เช่นเดียวกันกับค่าอัตราส่วน TSS : TA ที่มีค่าเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกับปริมาณธาตุ Mg, Zn, Cu, Mn และ Fe ในใบ คุณสมบัติดินในแปลงที่เก็บตัวอย่างทั้งที่ผลิดนอกฤดู และในฤดูพบว่า มีค่าความเป็นกรดต่าง อินทรีย์วัตถุ และมีปริมาณธาตุอาหารในดินส่วนใหญ่เหมาะสมต่อการปลูกส้มโอเปรียบเทียบกับค่าวิเคราะห์ดินที่เหมาะสมสำหรับการปลูกส้มโอที่รายงานโดย Maneepong (2008) ยกเว้นบางธาตุที่อยู่ในระดับต่ำ ได้แก่ ธาตุ P และ Mn ที่ผลิดในฤดู

ธาตุ K ที่ผลิดนอกฤดู และธาตุ Zn ที่ผลิดทั้งนอกและในฤดู จากการรายงานพบว่า พีชวงศ์ส้มจะเก็บสะสมธาตุอาหารเพื่อใช้ประโยชน์ไว้นาน โดยธาตุอาหารที่ถูกเคลื่อนย้ายไปให้กับส่วนต่าง ๆ ที่กำลังพัฒนานั้นส่วนใหญ่มาจากใบ และธาตุอาหารในส่วนใบนี้มักจะไม่มีความสัมพันธ์กับธาตุอาหารในดิน (Tang *et al.*, 2013) ดังนั้น การวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ของธาตุอาหารกับลักษณะคุณภาพของผล โดยใช้ปริมาณธาตุอาหารในส่วนใบจึงน่าจะเหมาะสมกว่าธาตุอาหารในดิน (Chanvichit *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2015)

ลักษณะความเข้มสีแดงในเนื้อผลส้มโอเกิดจากการสะสมของแคโรทีนอยด์ (Abdelaali *et al.*, 2018; Chaiwong *et al.*, 2010) และกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของพันธุ์แซนด์เลอร์และทองดีคือ 'ไลโคปีน' ซึ่งสภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยหลักอย่างหนึ่งที่ควบคุมสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในส้มโอ Buaban *et al.* (2020) พบว่า ค่า a^* และปริมาณไลโคปีนของส้มโอพันธุ์ทองดีจะมีค่าลดลงเมื่อในช่วงท้ายของการพัฒนาผลก่อนการเก็บเกี่ยว มีอุณหภูมิเฉลี่ยต่ำสุดกว่าน้อยกว่า 20 °C เนื่องจากอุณหภูมิต่ำมีผลไปยังกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ หรือกระตุ้นทำให้ไลโคปีนเปลี่ยนไปเป็น β -carotene เพิ่มขึ้น ซึ่งกระบวนการนี้จะถูกยับยั้งเมื่อมีอุณหภูมิเฉลี่ยสูงกว่า 30 °C ทำให้เกิดการสะสมไลโคปีนเพิ่มขึ้น (Rodrigo *et al.*, 2013) ดังนั้น นี่จึงน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เนื้อส้มโอพันธุ์แซนด์เลอร์ และพันธุ์ทองดีที่ผลิดนอกฤดู ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤษภาคม และมีช่วงพัฒนาผลอยู่ในช่วงฤดูหนาว มีความเข้มสีแดงจางกว่าที่ผลิดในฤดูที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกันยายนและมีช่วงพัฒนาผลในฤดูฝน นอกจากนี้ยังพบว่า ความสมดุลของธาตุอาหาร เช่น ไนโตรเจน ที่มากเกินไป มีอิทธิพลทางลบต่อการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (Lado *et al.*, 2018) ซึ่งจากการทดลองนี้ พบว่า ธาตุ Mg, Zn, Cu และ Fe ในใบมีความสัมพันธ์ทางบวกกับค่าความเข้มสีแดงของเนื้อผล และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีรายงานถึงการจัดการธาตุอาหารเหล่านี้โดยการพ่นทางใบในระดับที่เหมาะสมทำให้มีผลต่อการส่งเสริมการสะสมของปริมาณแคโรทีนอยด์ในผลของพืชหลายชนิด ตัวอย่างเช่น

การพ่นปุ๋ยกลุ่มจุลธาตุ Zn, Cu และ B ทางใบให้กับส้มแมนดารินในระดับความเข้มข้น 0.2 % ส่งผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ในผล รวมทั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงเพิ่มสูงขึ้น (Ilyas *et al.*, 2015) ในงานการพ่นปุ๋ย Fe, Zn, Mn และ B ร่วมกันในรูปแบบที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 mg/L มีผลส่งเสริมให้ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการพ่น (Abdel-Salam, 2016) เช่นเดียวกันนี้การพ่นปุ๋ย $MgSO_4$ ทางใบให้กับต้นแอปเปิลพันธุ์กาลาหลังจากดอกบาน 50 % ทุก ๆ สัปดาห์จำนวน 8 ครั้ง มีผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ในผิวของผลแอปเปิลมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น (Reay *et al.*, 1998) แต่อย่างไรก็ตามบทบาทที่ชัดเจนของทั้งสี่ธาตุนี้ในส่วนใบต่อกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในส่วนเนื้อผลของส้มโอยังไม่พบการรายงานจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในเชิงลึกถึงกระบวนการทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกันระหว่างธาตุอาหารเหล่านี้ต่อกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในส้มโอต่อไป

ความแตกต่างของสภาพอากาศเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลถึงความแปรปรวนของคุณสมบัติที่บ่งบอกถึงรสชาติของผล ได้แก่ % TA และ TSS : TA โดยถ้าในระยะพัฒนาผลมีสภาพอากาศที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิกลางวันและกลางคืน ความชื้นอากาศ ปริมาณน้ำฝน และแสงแดดที่เหมาะสม จะส่งผลให้สามารถผลิตผลไม้ให้มีรสชาติที่ดีได้ ตัวอย่างเช่น ในช่วงพัฒนาผลหากมีความแปรปรวนของอุณหภูมิระหว่างกลางวันและกลางคืนแคบ จะส่งผลให้ต้นมีการเจริญอย่างรวดเร็ว แต่ผลกลับมีคุณภาพลดลงเนื่องจากในสภาพนี้ผลมีอัตราการหายใจสูง การสะสมของคาร์โบไฮเดรตลดลง ส่งผลให้ผลมีการสะสมน้ำตาลได้น้อยลง แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่า สภาพอากาศมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างการจัดการในแปลงปลูก เช่น การจัดการน้ำ และธาตุอาหาร (Lado *et al.*, 2018) เช่น ปริมาณ TSS ของผลจะเพิ่มขึ้น ถ้าในระยะสุดท้ายของการพัฒนาผลมีการจำกัดการให้น้ำและต้นอยู่ในสภาพขาดน้ำ แต่ถ้าเกิดในระยะแรกของการพัฒนาผลจะส่งผลในทิศทางตรงกันข้าม (Pérez-Pérez *et al.*, 2009) ดังนั้น ด้วยสาเหตุที่กล่าวมาข้างต้นนี้จึงน่าจะเป็นเหตุผลทำให้

ค่า % TA TSS และ TSS : TA ระหว่างการผลิตในฤดูและนอกฤดูมีความแตกต่างกันในการทดลอง แต่เพื่อเป็นการบ่งชี้ถึงสภาพแวดล้อมและการจัดการในแปลงต่อลักษณะรสชาติในส้มโอทั้งสองพันธุ์จึงต้องทำการศึกษาต่อไป อีกทั้งการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างทางบวกระหว่างปริมาณธาตุ Mg, Zn, Cu, Mn และ Fe ที่สะสมในใบต่ออัตราส่วน TSS : TA ซึ่งความสัมพันธ์ที่พบนี้อาจเนื่องมาจากธาตุอาหารในกลุ่มนี้มีการทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ทั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง และการเคลื่อนย้ายสารสังเคราะห์ จากการเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ และเมื่อพืชมีปริมาณธาตุอาหารในกลุ่มนี้ในระดับที่เหมาะสมต่อพืช ยังสามารถช่วยให้พืชมีการดูดใช้ธาตุอาหารหลัก และเคลื่อนย้ายไปยังเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ของพืชได้ดี ด้วยเหตุนี้จึงอาจส่งผลให้ผลไม้มีรสชาติที่ดีขึ้น (Anees *et al.*, 2011) ซึ่งได้มีการรายงานถึงการจัดการธาตุอาหารเหล่านี้ที่เหมาะสมมีอิทธิพลทางบวกต่อลักษณะรสชาติของผลไม้ชนิดต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น Balakrishnan (2001) รายงานว่าค่า TSS, ascorbic acid และปริมาณน้ำตาลรวมในผลฝรั่งมีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนค่าความเป็นกรดลดลง เมื่อมีการพ่นปุ๋ย Zn, Fe, Mg และ B ร่วมกัน สำหรับการพ่นปุ๋ย Cu มีรายงานว่าช่วยส่งเสริมให้น้ำส้มมีค่า TSS เพิ่มขึ้น อีกทั้งเพิ่มผลผลิตต่อต้น น้ำหนักผล และขนาดผลอีกด้วย (Khurshid *et al.*, 2008) โดยการให้ปุ๋ยกลุ่มจุลธาตุนี้ทางใบให้ผลดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการให้ทางดิน (Singh *et al.*, 2019) แต่อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันถึงอิทธิพลของธาตุอาหารกลุ่มนี้ต่ออัตราส่วน TSS : TA ในผลส้มโอ จึงควรมีการทดสอบถึงอิทธิพลการจัดการของธาตุอาหารเหล่านี้ในระดับแปลงของแต่ละฤดูการผลิตต่อไป

สรุป

ส้มโอทั้งพันธุ์ทองดีและแซนด์เลอร์ที่ผลิตในฤดูมีคุณภาพผล ทั้งในด้านความเข้มข้นสีแดงของเนื้อผล และรสชาติดีกว่าที่ผลิตนอกฤดู รวมทั้งปริมาณธาตุอาหารในใบก็พบว่า มีความแตกต่างกันระหว่างฤดูกาลผลิตด้วย

ซึ่งทั้งความเข้มข้นสีในเนื้อผล และอัตราส่วน TSS : TA มีความสัมพันธ์ในทิศทางบวกกับปริมาณธาตุอาหาร Mg, Zn, Cu และ Fe ในใบอย่างเห็นได้ชัด ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงข้อมูลเบื้องต้นถึงความแตกต่างของคุณภาพส้มโอระหว่างฤดูการผลิตและความสัมพันธ์ระหว่างธาตุอาหารในส่วนใบต่อคุณภาพของส้มโอ ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาถึงการจัดการธาตุอาหารที่เหมาะสม รวมถึงการจัดการสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่จะช่วยเพิ่มคุณภาพความเข้มข้นสีของเนื้อผล และรสชาติของส้มโอทั้งสองพันธุ์นี้ให้มีความสม่ำเสมอทั้งที่ผลิตนอกฤดูและในฤดู

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนวิจัยคณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2560 ขอขอบคุณเกษตรกรผู้ปลูกส้มโอที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่ศึกษา คุณวรภรณ์ ภูมิพิพัฒน์ และคุณนุจรีย์ พรหมโสภา สำหรับการอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์และสำนักงานเกษตรอำเภอเวียงแก่น สำหรับแหล่งข้อมูลพื้นที่ปลูกส้มโอ

เอกสารอ้างอิง

Abdelaali, S.B., M.J. Rodrigo, O. Saddoud, L. Zacarías, M.R. Hajlaoui and M. Mars. 2018. Carotenoids and colour diversity of traditional and emerging Tunisian orange cultivars (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Scientia Horticulturae* 227: 296-304.

Abdel-Salam, M.M. 2016. Effect of foliar application of salicylic acid and micronutrients on the berries quality of "Bez El Naka" local grape cultivar. *Middle East Journal of Applied Sciences* 6(1): 178-188.

Alquézar, B., M.J. Rodrigo and L. Zacarías. 2008. Carotenoid biosynthesis and their

regulation in citrus fruits. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 2 (Special Issue 1): 23-35.

Anees, M., F.M. Tahir, J. Shahzad and N. Mahmood. 2011. Effect of foliar application of micronutrients on the quality of mango (*Mangifera indica* L.) cv. Dashehari fruit. *Mycopath* 9(1): 25-28

Balakrishnan, K. 2001. Foliar spray of zinc, iron, boron and magnesium on vegetative growth, yield and quality of guava. *Annals of Plant Physiology* 14(2): 151-153.

Buaban, P., D.M. Beckles, O. Mongkolporn and K. Luengwilai. 2020. Lycopene accumulation in pummelo (*Citrus Maxima* [Burm.] Merr.) is influenced by growing temperature. *International Journal of Fruit Science* 20(2): 149-163.

Chaiwong, S and T. Theppakorn. 2012. Physico-chemical properties and antioxidant capacity of pummelo cvs. "Thong Dee" and "Chandler" during growth and maturation. Final Report. Mae Fah Luang University. 116p. (in Thai)

Chaiwong, S., T. Theppakorn, S. Saunphairoch, R. Chusie and U. Khunjan. 2010. Evaluation of flavonoids and anthocyanins of Thai pummelo cv. Thong Dee, Kao Nam Pheung, Kao Tang Gwa, Kao Yai and Tub Tim Siam. Final Report. Thailand Research Fund, Bangkok. 108 p. (in Thai)

Charvichit, P., T. Radanachalee and N. Supakamnerd. 2009. Use of nutrient balance for improving fruit yield and quality of tangerine (*Citrus reticulata* Blanco) cv. Sainampung: III. Effect of fruit development on leaf nutrient concentration. *Journal of Agriculture* 25(2): 109-114. (in Thai)

- Department of Agricultural Extension. 2020. Report of crop production. (Online). Available: <https://production.doae.go.th/> (June 12, 2020). (in Thai)
- Edge, R., D.J. McGarvey and T.G. Truscott. 1997. The carotenoids as anti-oxidants- a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41(3): 189-200.
- Iglesias, D.J., F.R. Tadeo, F. Legaz, E. Primo-Millo and M. Talon. 2001. *In vivo* sucrose simulation of colour change in citrus fruit epicarp: Interactions between nutritional and hormonal signals. *Physiologia Plantarum* 112(2): 244-250.
- Ilyas, A., M.Y. Ashraf, M. Hussain, M. Arshaf, R. Ahmed and A. Kamal. 2015. Effect of micronutrients (Zn, Cu and B) on photosynthetic and fruit yield attributes of *Citrus reticulata* Blanco var. Kinnow. *Pakistan Journal of Botany* 47(4): 1241-1247.
- Khurshid, F., R.A. Khattak and S. Sarwar. 2008. Effect of foliar applied (Zn, Fe, Cu & Mn) in citrus production. *Science Technology and Development* 27(1-2): 34-42.
- Lado, J., G. Gambetta and L. Zacarias. 2018. Key determinants of citrus fruit quality: Metabolites and main changes during maturation. *Scientia Horticulturae* 233: 238-248.
- Lee, H.S. 2001. Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (Cara Cara). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(5): 2563-2568.
- Li, Y., M.Q. Han, F. Lin, Y. Ten, J. Lin, D.H. Zhu, P. Guo, Y.B. Weng and L.S. Chen. 2015. Soil chemical properties, 'Guanximiyu' pummelo leaf mineral nutrient status and fruit quality in the southern region of Fujian province, China. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15(3): 615-628.
- Maneepong, S. 2008. A study of relationship between nutrient and management for improving quality pummelo production in Pak Phanang Basin. Final Report. Thailand Research Fund, Bangkok. 74 p. (in Thai)
- Pérez-Pérez, J.G., J.M. Robles and P. Botía. 2009. Influence of deficit irrigation in phase III of fruit growth on fruit quality in 'lane late' sweet orange. *Agricultural Water Management* 96: 969-974.
- Promkaew, P., N. Pongprasert, C. Wongs-Aree, S. Kaewsuksaeng, P. Opio, S. Kondo and V. Srilaong. 2020. Carotenoids accumulation and carotenoids biosynthesis gene expression during fruit development in pulp of Tubtim-Siam pummel fruit. *Scientia Horticulturae* 260: p. 108870
- Puranapong, N. 2005. Handbook of Soil and Plant Analysis. Maejo University, Chiang Mai. 286 p. (in Thai)
- Reay P.F., R.H. Fletcher and V.J.G. Thomas. 1998. Chlorophylls, carotenoids and anthocyanin concentrations in the skin of "Gala" apples during maturation and the influence of foliar applications of nitrogen and magnesium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76(1): 63-71.
- Rodrigo, M.J., B. Alquezar, E. Alos, V. Medina, L. Carmona, M. Bruno, A.B. Salim and L. Zacarias. 2013. A novel carotenoid cleavage activity involved in the biosynthesis of citrus fruit-specific apocarotenoid pigments. *Journal of Experimental Botany* 64(14): 4461-4478.
- Santasup, C., Y. Chanbang, D. Naphrom and S. Nanan. 2013. Development of quality pummel

- production in Northern Thailand for export. Final Report. Thailand Research Fund, Bangkok. 190 p. (in Thai)
- Singh, A., M. Bakshi, A.S. Brar and S.K. Singh. 2019. Effect of micronutrients in Kinnow mandarin production: A review. International Journal of Chemical Studies 7(3): 5161-5164.
- Tang, Y.Q., L.Z. Peng, C.P. Chun, L.L. Ling, Y.W. Fang and X. Yang. 2013. Correlation analysis on nutrient element contents in orchard soils and sweet orange leaves in southern Jiangxi province of China. Acta Horticulturae Sinica 40(4): 623-632.
- Tatmala, N., G. Ma, L.C. Zhang, M. Kato, and S. Kaewsuksaen. 2020. Characterization of carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression during fruit ripening in red colored pulp of 'Siam Red Ruby' pumelo (*Citrus grandis*) cultivated in Thailand. Horticulture Journal 89(3): 237-243.
- Zhang, L., G. Ma, K. Yamawaki, Y. Ikoma, H. Matsumoto, T. Yoshioka, S. Ohta and M. Kato. 2015. Effect of blue LED light intensity on carotenoid accumulation in citrus juice sacs. Journal of Plant Physiology 188: 58-63.
-

การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ดินลั่นมังกรสีชมพู โดยใช้สารโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ

Chromosome Doubling of *Habenaria erichmichelii* Christenson Using Colchicine *In Vitro*

นิพนธ์ กิตติ วิณัน บัณฑิตย และ ณัฐา โพธาภรณ์
Nipon Kitidee, Weenun Bundithya and Nuttha Potapohn*

ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: natorchid@gmail.com

(Received: 2 June 2020; Accepted: 16 October 2020)

Abstract: Terrestrial orchids, *Habenaria erichmichelii* Christenson is one of the most beautiful terrestrial orchids. Plant is compact with beautiful flowers and has great potential for commercial use as potted plants. Thus, effects of using colchicine *in vitro* was carried out to double chromosome number of *Habenaria erichmichelii* Christenson by soaking 1-month old germinated protocorms in colchicine at different concentrations, 0.0, 0.01, 0.025, 0.05 and 0.10 % (w/v) for 5 and 10 days. The protocorms were cultured on PGR-free MS medium for 4 months. The results showed that the chromosome number from root - tips of the control group were diploid with $2n = 2x = 42$, the chromosome number of those treated with 0.05 % and 0.10 % (w/v) colchicine for 10 days were mixoploid with $2n = 2x = 42$ and $2n = 4x = 84$. Moreover, soaking in 0.01 % colchicine for 10 days gave better survival rate compared with colchicine at concentration of 0.05 % for 10 days, whereas plant height tended to decrease, stomata density was decreased, and stomata size was increased.

Keywords: Improvement, *Habenaria erichmichelii* Christenson, chromosome number, colchicine

บทคัดย่อ: กล้วยไม้ดินลั่นม้งกรสีชมพู เป็นกล้วยไม้ดินที่มีความสวยงามชนิดหนึ่ง เนื่องจากต้นมีขนาดเล็ก กะทัดรัด มีดอกสวยงาม จึงเป็นที่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ในการทำเป็นไม้กระถาง ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ดินลั่นม้งกรสีชมพู โดยใช้สารโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำโพรโตคอร์มหลังจากออกแล้ว 1 เดือน มาแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.0, 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.10 % (w/v) ระยะเวลา 5 และ 10 วัน จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารโคลชิซิน เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของชุดควบคุมมีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 42$ ส่วนการแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.05 % และ 0.10 % ระยะเวลา 10 วัน มีจำนวนโครโมโซมเป็นมิกโซพลอยด์ ($2n = 2x = 42$ และ $2n = 4x = 84$) นอกจากนี้โพรโตคอร์มที่แช่ด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 % ระยะเวลา 10 วัน มีอัตราการรอดชีวิตดีกว่าเมื่อเทียบกับการแช่ด้วยสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน ในขณะที่ความสูงต้นมีแนวโน้มที่ลดลง ความหนาแน่นปากใบลดลง และปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น

คำสำคัญ: การปรับปรุงพันธุ์ กล้วยไม้ดินลั่นม้งกรสีชมพู จำนวนโครโมโซม โคลชิซิน

คำนำ

กล้วยไม้ในสกุลฮาเบนาเรีย (*Habenaria*) และเพคเทลิส (*Pecteilis*) เป็นกล้วยไม้กลุ่มนางอ้วที่มีขนาดเล็กจนถึงขนาดกลาง มีการกระจายพันธุ์ทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อน ในประเทศไทยพบกล้วยไม้ดินสกุลฮาเบนาเรีย จำนวน 37 ชนิด และสกุลเพคเทลิส จำนวน 3 ชนิด (Sitthisatchatham, 2007; Thaithong, 2005) ซึ่งกล้วยไม้ดินลั่นม้งกรสีชมพู (*Habenaria erichmichellii* Christenson) และลั่นม้งกรสีเหลือง (*Habenaria xanthocheila* Ridl.) ได้แยกออกมาจาก *Habenaria rhodocheila* Hance (Kawchadee *et al.*, 2012) กล้วยไม้ดินลั่นม้งกรสีชมพูมีหัวอยู่ใต้ดิน ใบมีลักษณะแกมใบหอก ปลายใบแหลม จนถึงเรียวแหลม ดอกออกปลายยอด ก้านดอกย่อยมีลักษณะเป็นสัน กลีบดอกชั้นนอก และกลีบดอกชั้นในรูปรีมีลักษณะเหมือนฝาครอบ (hood) กลีบดอกชั้นนอกทั้งสองข้างรูปขอบขนาน เมื่อดอกบานเต็มที่ จะบิดม้วนกลีบไปด้านหลังมีสีเขียว มีปาก 3 แฉก แฉกกลางเว้าลึก เป็น 2 แฉกย่อย โดยแฉกด้านข้างทั้งสองกางออก รูปทรงกลม ปากมีหลากหลายสี ตั้งแต่สีแดง ส้ม ชมพู และเหลือง (Hawkes, 1965; Potapohn, 2005; Saikum *et al.*, 2020; Sitthisatchatham, 2007; Teo, 1985) มี วงจรชีวิต การเจริญเติบโตทางลำต้นและการออกดอกในฤดูฝน และพักตัวในช่วงฤดูแล้ง ซึ่งกล้วยไม้ดินลั่นม้งกรสีชมพู

เหมาะสมในการพัฒนาเป็นไม้กระถางได้ แต่เนื่องจากกล้วยไม้ดินลั่นม้งกรสีชมพูมีดอกค่อนข้างบาง และขนาดเล็ก จึงทำให้รูปทรงต้นไม่กะทัดรัดเท่าที่ควร ถ้ามีการพัฒนาให้มีดอกขนาดใหญ่ และดอกหนาขึ้น จะสามารถใช้เป็นไม้กระถางที่สวยงามเหมาะสำหรับใช้เป็นของตกแต่งภายในห้องทำงานหรือบนโต๊ะทำงานได้เป็นอย่างดี การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การผสมพันธุ์ การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมโดยการตัดต่อยีนหรือการส่งถ่ายยีน การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีวิธีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของพืช (polyploid) โดยใช้สารโคลชิซินที่เป็นสารเคมีในการยับยั้งการสร้างไมโครทูบูล (microtubule) ที่ทำให้โครมาติดของโครโมโซมไม่สามารถแยกออกจากกันได้ในระยะอานาเฟส (Caperta *et al.*, 2006) จึงได้เซลล์ที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เพื่อให้ได้พืชมีการสร้างลักษณะใหม่ขึ้นมา สามารถสังเกตการเพิ่มชุดโครโมโซมได้จากความหนาแน่นและขนาดของปากใบ ซึ่งทำให้ปัจจุบันมีการนำสารโคลชิซินมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กันอย่างแพร่หลาย

ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของโคลชิซินและระยะเวลาในการแช่ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ดินลั่นม้งกรสีชมพูที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ดินชนิดอื่นต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ผลของโคลชิซินต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมและอัตราการรอดชีวิตของโพโตคอร์มกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู

ใช้โพโตคอร์มกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู อายุ 1 เดือน ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) จากนั้นนำโพโตคอร์มมาแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.0 (กรรมวิธีควบคุม), 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.10% (w/v) แล้ววางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ในที่มีด ระยะเวลา 5 และ 10 วัน ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการแช่ครบตามกำหนดล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วย้ายโพโตคอร์มลงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารโคลชิซิน ภายใต้อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 เดือน โดยย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมทุกเดือน วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomized design) จำนวน 5×2 กรรมวิธี ซึ่งมีปัจจัย 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่ ทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ซ้ำละ 4 โพโตคอร์ม บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต ได้แก่ ความสูงต้น เป็นต้น อัตราการรอดชีวิตของโพโตคอร์ม จำนวนโครโมโซม และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของตัวแปรในแต่ละกรรมวิธี ด้วยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 16

การตรวจสอบจำนวนโครโมโซม โดยเก็บตัวอย่างปลายรากความยาว 0.5 - 1.0 เซนติเมตร (ที่มีสีขาวขุ่นเล็กน้อย) ในช่วงเวลา 10.00 - 12.00 น. แล้วมาหยุดวงจรเซลล์ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline sulfate ความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างปลายรากด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จึงนำมารักษาสภาพเซลล์ด้วย acetic alcohol fixative อัตราส่วน 1:3 ส่วนของ glacial acetic acid กับ absolute 95 % เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้อมผนังเซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มาลิตี

ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 3 - 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 1 ครั้ง จากนั้นตัดเอาเฉพาะส่วนปลายให้เหลือเพียง 1 มิลลิเมตร แล้วย้อมสีด้วยสารละลาย lacto-propionic orcein เป็นเวลา 5 นาที ใช้เข็มเย็บปลายแหลมขยี้ปลายรากเบา ๆ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ขั้วสีส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชู แล้วนำสไลด์มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดเลนส์ประกอบ นับจำนวนโครโมโซม บันทึกภาพ เปรียบเทียบในแต่ละความเข้มข้นและระยะเวลาที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน นับจำนวนโครโมโซมปลายรากจำนวน 5 ต้น ต้นละ 5 ราก อย่างน้อย 5 เซลล์ต่อแผ่นสไลด์

2. ผลของโคลชิซินต่อความสูงต้น ขนาด และจำนวนเซลล์คุมของกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู

บันทึกข้อมูลความสูงของต้น หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 4 เดือน แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธี ด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 16

การศึกษาลักษณะของเซลล์คุม โดยใช้ยาน้ำยาทาเล็บสีไลทาลบนมิดด้านใต้ใบ เมื่อน้ำยาแห้งจึงลอกเอาน้ำยาทาเล็บออกจากผิวใบ และนำมาวางบนกระจกสไลด์ จากนั้นหยดสีย้อม safranin O 1-2 หยด แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า นับจำนวนเซลล์คุมต่อพื้นที่ 1.0 ตารางมิลลิเมตร และวัดขนาดของเซลล์คุม นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธี ด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 16 (โดยทำการสุ่มจากตัวอย่างกรรมวิธีละ 3 - 5 ใบ ตรวจสอบจำนวน 3 ตำแหน่ง คือ โคนใบ กลางใบ และปลายใบ)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. ผลของโคลชิซินต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมและอัตราการรอดชีวิตของโพโตคอร์มกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู

จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมด้วยวิธีการ Feulgen squash technique เปรียบเทียบกับการได้รับ

โคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ กับชุดควบคุม พบว่า โพรโตคอร์มที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินหรือได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.0, 0.01 และ 0.025 % ไม่พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (Table 1) เมื่อความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินเพิ่มขึ้นจำนวนโครโมโซมเป็นมิกโซพลอยด์โดยชุดควบคุมมีจำนวนโครโมโซม $2n=2x=42$ นอกจากนี้ในการตรวจสอบยังพบว่า การแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน มีจำนวนโครโมโซมเป็นมิกโซพลอยด์ ($2n=2x=42$ และ $2n=4x=84$) โดยมีจำนวนโครโมโซมที่ผสมกันอยู่ระหว่างดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ เช่นเดียวกับการแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.10 % ระยะเวลา 10 วัน มีจำนวนโครโมโซมเป็นมิกโซพลอยด์ ($2n=2x=42$ และ $2n=4x=84$) โดยมีจำนวนโครโมโซมที่ผสมกันอยู่ระหว่างดิพลอยด์ และเตตระพลอยด์ (Table 1) ซึ่งเหมือนกับผลของโคลชิซินต่อการเติบโตและชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ของเอื้องดินใบหมาก พบว่าต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 % สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ได้ นอกจากนี้มีการศึกษาในกล้วยไม้กลุ่มอิงอาศัย เช่น กล้วยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอ เอื้องเงิน และเอื้องคำ เป็นต้นจากการศึกษาของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอพบว่า การแช่สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 % ระยะเวลา 3 วัน มีระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ 100 % (Tilarux and Prasertsirawat, 2014) ส่วนกล้วยไม้เอื้องเงินสามารถเกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้

เมื่อแช่สารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 % ระยะเวลา 4 วัน ทำให้เกิดต้นที่เป็นเตตระพลอยด์ได้ (Petchang, 2010)

ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของโพรโตคอร์มกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู

เมื่อนำโพรโตคอร์มกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพูอายุประมาณ 1 เดือน มาแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.0, 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.10 % (w/v) ระยะเวลา 5 และ 10 วัน แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 4 เดือน ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่โพรโตคอร์มในสารละลายโคลชิซินมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ อยู่ในช่วง 30-60 % เท่านั้น แต่ปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัยมีปฏิสัมพันธ์กัน โดยการเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่มีผลต่อการลดลงของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ซึ่งการแช่โพรโตคอร์มที่ความเข้มข้นต่ำ 0.01 % ระยะเวลา 10 วัน มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าการแช่โพรโตคอร์มที่ความเข้มข้นสูง 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sarathum et al. (2010) รายงานว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน มีผลต่อโพรโตคอร์มของกล้วยไม้เอื้องแซะ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง เช่นเดียวกับรายงานของ Atichart (2014) พบว่า การแช่โพรโตคอร์มด้วยสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้นสูง และระยะเวลานาน ส่งผลให้กล้วยไม้เอื้องคำมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเช่นกัน

Table 1. Chromosome doubling of *Habenaria erichmichelii* with different concentrations and exposure times of colchicine subsequent to culturing on PGR - free MS medium for 4 months

Colchicine concentrations (%)	Chromosome doubling	
	5 days	10 days
0.0	$2n = 2x = 42$ (100 %)	$2n = 2x = 42$ (100 %)
0.01	$2n = 2x = 42$ (100 %)	$2n = 2x = 42$ (100 %)
0.025	$2n = 2x = 42$ (100 %)	$2n = 2x = 42$ (100 %)
0.05	$2n = 2x = 42$ (100 %)	$2n = 2x = 42$ (80 %), $2n = 4x = 84$ (20 %)
0.10	$2n = 2x = 42$ (100 %)	$2n = 2x = 42$ (60 %), $2n = 4x = 84$ (40 %)

Table 2. Survival rate of protocorms shoots of *Habenaria erichmichellii* after treating with different concentrations and exposure times of colchicine after culture subsequent to culturing on PGR - free MS medium for 4 months

Colchicine concentrations (%)	Survival rate (%)*		Mean _{conc} ^{ns}
	5 days	10 days	
0.0	50.00 ± 7.90 ^{ab}	55.00 ± 12.24 ^{ab}	52.50 ± 6.92
0.01	50.00 ± 11.18 ^{ab}	60.00 ± 6.12 ^a	55.00 ± 6.23
0.025	50.00 ± 7.90 ^{ab}	55.00 ± 5.00 ^{ab}	52.50 ± 4.48
0.05	45.00 ± 5.00 ^{ab}	30.00 ± 10.45 ^b	37.50 ± 5.59
0.10	50.00 ± 11.18 ^{ab}	55.00 ± 9.35 ^{ab}	52.50 ± 6.92
Mean _{day} ^{ns}	49.00 ± 3.67	51.00 ± 4.20	
C.V. (%)		19.36	

Colchicine x Days DMRT (0.05) = 237.50

* Mean values followed by the different letters under columns are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

ns = non - significant difference

2. ผลของโคลชิซินต่อความสูงต้น ขนาด และจำนวนเซลล์คุมของกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู

ผลของความเข้มข้นของโคลชิซินร่วมกับระยะเวลาการแช่ต่อความสูงต้น

ผลของปัจจัยหลัก

ต้นจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.025 % มีค่าเฉลี่ยของความสูงต้นมากที่สุด 0.42 ± 0.05 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % มีความสูงต้นเท่ากับ 0.22 ± 0.03 (Table 3, Figure 1)

ผลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย

หลังการเลี้ยง 4 เดือน ต้นจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.025 % ระยะเวลา 10 วัน ทำให้มีความสูงต้นเฉลี่ยเท่ากับ 0.46 ± 0.07 เซนติเมตร ซึ่งมากกว่าต้นจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน มีความสูงต้นเฉลี่ย 0.20 ± 0.06 เซนติเมตร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 3, Figure 1) สอดคล้องกับการศึกษาของ Tipvaree (2009) ศึกษาผลของโคลชิซินต่อการเติบโตและชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ของเถืองดินใบหมาก พบว่าการให้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 %

มีผลให้ความสูงต้น ความยาวใบ ความยาวราก และจำนวนรากลดลง

ผลของความเข้มข้นของโคลชิซินร่วมกับระยะเวลาการแช่ต่อความหนาแน่นของเซลล์คุม

ผลของปัจจัยหลัก

ใบจากโพโตคอร์มที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซิน มีค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นของเซลล์คุมมากที่สุด 77.20 ± 0.61 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกรรมวิธีที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.10 % นอกจากนี้จำนวนวันที่แช่สารละลายโคลชิซินที่ 5 วัน ให้ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเซลล์คุม 59.62 ± 2.73 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร มากกว่าการแช่สารละลายโคลชิซินที่ 10 วัน โดยมีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเซลล์คุม 56.70 ± 2.31 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร (Table 4)

ผลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย

หลังการเลี้ยง 4 เดือน ใบจากโพโตคอร์มที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 5 และ 10 วัน มีความหนาแน่นของเซลล์คุมเฉลี่ยมากที่สุด 78.60 ± 0.60 และ 75.80 ± 0.58 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับทุกกรรมวิธีที่มีการแช่สารละลายโคลชิซิน

ระยะเวลา 5 และ 10 วัน ไปจากโปรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % ระยะเวลา 5 วัน และไปจากโปรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.10 % ระยะเวลา 10 วัน มีความหนาแน่นของเซลล์คัมต่ำสุด 41.20 ± 2.56 และ 44.10 ± 0.48 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตรตามลำดับ (Table 4)

Table 3. Effects of colchicine concentrations and exposure times on plant height of *Habenaria erichmichellii* after culture on PGR - free MS medium for 4 months

Colchicine concentrations (%)	Plant height (cm)*		Mean _{conc} **
	5 days	10 days	
0.0	0.32 ± 0.04^{ab}	0.40 ± 0.10^{ab}	0.36 ± 0.05^{AB}
0.01	0.24 ± 0.06^{ab}	0.42 ± 0.06^{ab}	0.33 ± 0.05^{AB}
0.025	0.38 ± 0.07^{ab}	0.46 ± 0.07^a	0.42 ± 0.05^A
0.05	0.24 ± 0.04^{ab}	0.20 ± 0.06^b	0.22 ± 0.03^B
0.10	0.26 ± 0.07^{ab}	0.38 ± 0.03^{ab}	0.32 ± 0.04^{AB}
Mean _{day} ^{ns}	0.28 ± 0.02	0.37 ± 0.03	
C.V. (%)	0.15		

Colchicine x Days DMRT (0.05) = 0.01

* Mean values followed by the different letters under columns are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

** Mean values followed by the different letters of the same column are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

ns = non - significant difference

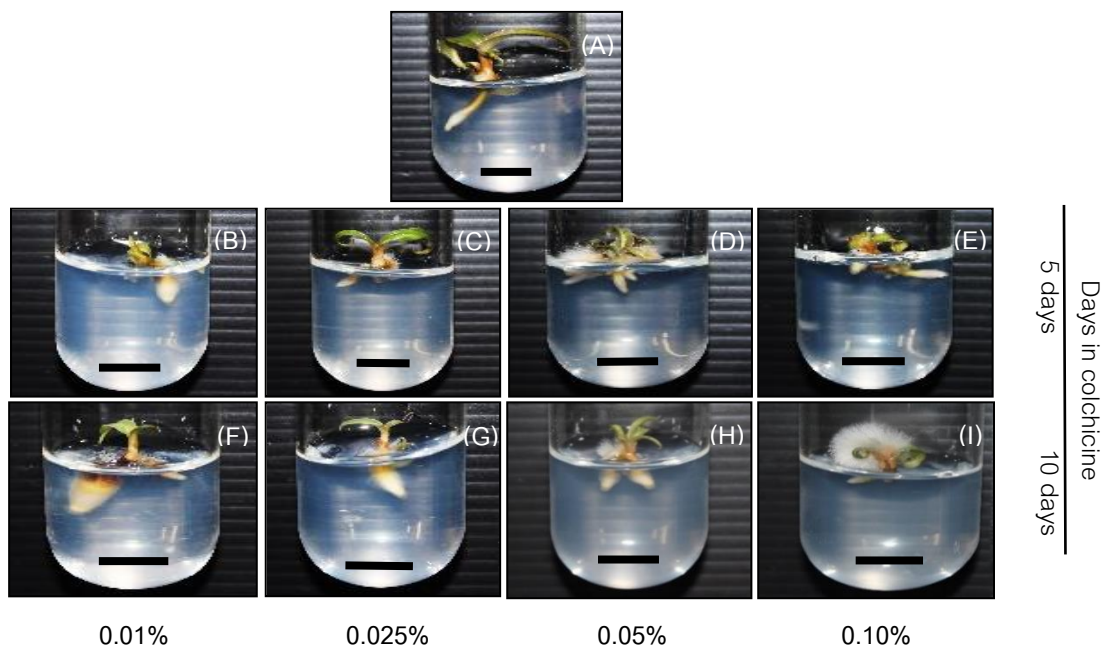


Figure 1. *Habenaria erichmichellii* treated with colchicine at various concentrations and days after culture on PGR - free MS medium for 4 months. (A) = 0.0 % colchicine (control) (B) = 0.01 % colchicine for 5 days (C) 0.025 % colchicine for 5 days (D) = 0.05 % colchicine for 5 days (E) = 0.10 % colchicine for 5 days (F) = 0.01 % colchicine for 10 days (G) = 0.025 % colchicine for 10 days (H) = 0.05 % colchicine for 10 days, and (I) = 0.10 % colchicine for 10 days

Table 4. Effects of colchicine concentrations and exposure times on guard cell density of *Habenaria erichmichelii* after culture on PGR - free MS medium for 4 months

Colchicine concentrations (%)	Guard cell density (0.5 mm ²)*		Mean _{conc} **
	5 days	10 days	
0.0	78.60 ± 0.60 ^a	75.80 ± 0.58 ^a	77.20 ± 0.61 ^A
0.01	57.10 ± 0.88 ^d	62.00 ± 0.98 ^c	59.55 ± 1.02 ^B
0.025	69.00 ± 0.57 ^b	49.60 ± 0.73 ^e	59.30 ± 3.26 ^B
0.05	41.20 ± 2.56 ^f	52.00 ± 1.78 ^e	46.60 ± 3.21 ^C
0.10	52.20 ± 1.92 ^e	44.10 ± 0.48 ^f	48.15 ± 1.73 ^C
Mean _{day} ***	59.62 ± 2.73 ^A	56.70 ± 2.31 ^B	
C.V. (%)		12.50	

Colchicine x Days DMRT (0.05) = 342.39

* Mean values followed by the different letters under columns are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

** Mean values followed by the different letters of the same column are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

*** Mean values followed by the different letters of the same row are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

ns = non - significant difference

ผลของความเข้มข้นของโคลชิซินร่วมกับ ระยะเวลาการแช่ต่อความกว้างของเซลล์ปากใบ

ผลของปัจจัยหลัก

ใบจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % มีค่าเฉลี่ยของความกว้างของเซลล์ปากใบ $14.51 \pm 0.62 \mu\text{m}$ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มากกว่าใบจากโพโตคอร์มที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซิน ใบจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.01 และ 0.025 % นอกจากนี้จำนวนวันที่แช่สารละลายโคลชิซินที่ 10 วัน ให้ค่าเฉลี่ยความกว้างของเซลล์ปากใบ $13.12 \pm 0.34 \mu\text{m}$ มากกว่าเซลล์ปากใบที่แช่สารละลายโคลชิซิน 5 วัน (Table 5, Figure 2)

ผลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย

หลังการเลี้ยง 4 เดือน ใบจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % ระยะเวลา 5 วัน และใบจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.10 % ระยะเวลา 10 วัน ทำให้มีความกว้างของเซลล์ปากใบเฉลี่ย 16.35 ± 0.17 และ $15.92 \pm 0.58 \mu\text{m}$ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มากกว่าใบจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน ใบจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน

0.01 % ระยะเวลา 10 วัน ใบจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.025 % ระยะเวลา 10 วัน ใบจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.10 % ระยะเวลา 5 วัน ใบจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.025 % ระยะเวลา 5 วัน ใบจากโพโตคอร์มที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 10 วัน ใบจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.01 % ระยะเวลา 5 วัน และใบจากโพโตคอร์มที่ไม่เติมสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 5 วัน ซึ่งมีความกว้างของเซลล์ปากใบเฉลี่ย 12.67 ± 0.16 , 12.63 ± 0.62 , 12.59 ± 0.32 , 12.05 ± 0.28 , 11.91 ± 0.43 , 11.79 ± 0.20 , 11.74 ± 0.28 และ $10.29 \pm 0.39 \mu\text{m}$ ตามลำดับ (Table 5, Figure 2)

ผลของความเข้มข้นของโคลชิซินร่วมกับ ระยะเวลาการแช่ต่อความยาวของเซลล์ปากใบ

ผลของปัจจัยหลัก

ใบจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.01 % และ 0.05 % มีค่าเฉลี่ยของความยาวของเซลล์ปากใบ 42.78 ± 0.78 และ $45.45 \pm 2.64 \mu\text{m}$ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งมากกว่าใบจากโพโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.025 และ 0.10 % และใบจากโพโตคอร์มที่ไม่แช่

สารละลายโคลชิซิน นอกจากนี้จำนวนวันที่แช่สารละลายโคลชิซินที่ 5 วัน ให้ค่าเฉลี่ยความยาวของเซลล์ปากใบ $39.39 \pm 1.82 \mu\text{m}$ มากกว่าความยาวของเซลล์ปากใบที่แช่สารละลายโคลชิซิน 10 วัน ที่เท่ากับ $35.66 \pm 1.09 \mu\text{m}$ (Table 6, Figure 2)

ผลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย

หลังการเลี้ยง 4 เดือน ใบจากไพโรโตคอรึมที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % ระยะเวลา 5 วัน ทำให้มีความยาวของเซลล์ปากใบเฉลี่ย $51.83 \pm 2.13 \mu\text{m}$ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งมากกว่าใบจากไพโรโตคอรึมที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.01 % ระยะเวลา 5 และ 10 วัน ใบจากไพโรโตคอรึมที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน ใบจากไพโรโตคอรึมที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.025 % ระยะเวลา 5 และ 10 วัน ใบจากไพโรโตคอรึมที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.10 % ระยะเวลา 10 และ 5 วัน และใบจากไพโรโตคอรึมที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 5 และ 10 วัน ซึ่งมีความยาวของเซลล์ปากใบเฉลี่ย 44.47 ± 0.66 , 41.09 ± 0.94 , 39.08 ± 0.98 , 38.58 ± 1.49 , 36.34 ± 1.36 , 35.35 ± 0.39 , 33.29 ± 3.04 ,

28.76 ± 1.05 และ $26.45 \pm 0.57 \mu\text{m}$ ตามลำดับ (Table 6, Figure 2) โดย Fehr (1987) ได้อธิบายเกี่ยวกับพืชที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัว ซึ่งเซลล์จะมีขนาดเพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้ขนาดของปากใบยาวกว่าพืชปกติที่เป็นพืชดิพลอยด์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Silva *et al.* (2000) ศึกษาผลการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ของกล้วยไม้แคทลียา พบว่า ต้นที่เป็นดิพลอยด์มีความหนาแน่นของปากใบมากกว่าต้นเตตระพลอยด์ นอกจากนี้ Chinachit and Sreemaung (2008) ศึกษาผลของโคลชิซินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ ploidy ในกล้วยไม้ดิน หมูกลิ้ง พบว่า กล้วยไม้ดินหมูกลิ้งที่เป็นต้นเตตระพลอยด์มีขนาดปากใบและขนาดเซลล์คุมใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีความหนาแน่นของปากใบน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ เช่นเดียวกับ Petbanna (2011) ศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ดินใบหมาก *Spathoglottis plicata* Blume var. *alba* โดยใช้โคลชิซินและออร์ซาลินในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ต้นมิกลิพลอยด์มีขนาดเซลล์คุมความหนาใบ ความยาวปากใบ จำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุม จำนวนหน่อต่อต้นมากกว่าต้นดิพลอยด์

Table 5. Effects of colchicine concentrations and exposure times on stomata width of *Habenaria erichmichellii* after culture on PGR - free MS medium for 4 months

Colchicine concentrations (%)	Stomata width (μm)*		Mean _{conc} **
	5 days	10 days	
0.0	10.29 ± 0.39^c	11.79 ± 0.20^b	11.04 ± 0.32^C
0.01	11.74 ± 0.28^b	12.63 ± 0.62^b	12.19 ± 0.35^B
0.025	11.91 ± 0.43^b	12.59 ± 0.32^b	12.25 ± 0.28^B
0.05	16.35 ± 0.17^a	12.67 ± 0.16^b	14.51 ± 0.62^A
0.10	12.05 ± 0.28^b	15.92 ± 0.58^a	13.99 ± 0.72^A
Mean _{day} ***	12.47 ± 0.43^B	13.12 ± 0.34^A	
C.V. (%)		1.94	

Colchicine x Days DMRT (0.05) = 18.62

* Mean values followed by the different letters under columns are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

** Mean values followed by the different letters of the same column are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

*** Mean values followed by the different letters of the same row are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

Table 6. Effects of colchicine concentrations and exposure times on stomata length of *Habenaria erichmichellii* after culture on PGR - free MS medium for 4 months

Colchicine concentrations (%)	Stomata length (μm)*		Mean _{conc} **
	5 days	10 days	
0.0	28.76 ± 1.05^f	26.45 ± 0.57^f	27.60 ± 0.68^D
0.01	44.47 ± 0.66^b	41.09 ± 0.94^{bc}	42.78 ± 0.78^A
0.025	38.58 ± 1.49^{cd}	36.34 ± 1.36^{de}	37.46 ± 1.02^B
0.05	51.83 ± 2.13^a	39.08 ± 0.98^{cd}	45.45 ± 2.64^A
0.10	33.29 ± 3.04^e	35.35 ± 0.39^{de}	34.32 ± 2.22^C
Mean _{day} ***	39.39 ± 1.82^A	35.66 ± 1.09^B	
C.V. (%)	7.61		

Colchicine x Days DMRT (0.05) = 74.50

* Mean values followed by the different letters under columns are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

** Mean values followed by the different letters of the same column are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

*** Mean values followed by the different letters of the same row are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

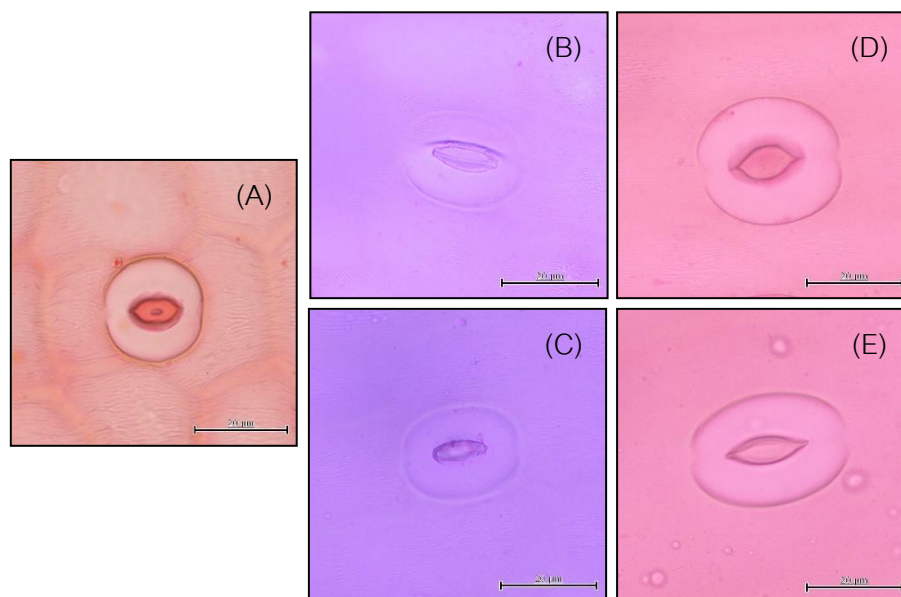


Figure 2. The thickness and length of the stomata cell of *Habenaria erichmichellii* after culture on PGR - free MS medium for 4 months (bar 20 μm) (A) 0.0 % colchicine (control) (B) 0.05 % colchicine for 5 days (C) 0.10 % colchicine for 5 days (D) 0.05 % colchicine for 10 days, and (E) 0.10 % colchicine for 10 days

สรุป

การแช่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ดินลิ้นมังกร สีชมพูในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.10 % ระยะเวลา 10 วัน มีจำนวนโครโมโซมเป็น มิโทซอไรต์ ($2n = 2x = 42$ และ $2n = 4x = 84$) นอกจากนี้โปรโตคอร์มที่แช่ด้วยสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.01 % ระยะเวลา 10 วัน มีอัตราการรอดชีวิตดีกว่าเมื่อเทียบกับการแช่ด้วยสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน ในขณะที่ความสูง ต้นมีแนวโน้มลดลง ความหนาแน่นปากใบลดลง และ ปากใบมีขนาดใหญ่ โดยการใช้สารโคลชิซิน 0.05 % เหมาะแก่การนำไปใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และประหยัดการใช้สารเคมี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์บริการวิชาการและ ถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และ อุปกรณ์สำหรับการทำงานวิจัย และสำนักงานบริหาร งานวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนการวิจัย ในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Atichart, P. 2014. Effect of concentration and duration of colchicine on survival rate and cell characteristic of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. protocorm. *KKU Science Journal* 42(2): 372-379. (in Thai)
- Caperta, A.D., M. Delgado, F. Ressurreicao, A. Meister, R.N. Jones, W. Viegas and A. Houben. 2006. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in C-metaphase cells. *Protoplasma* 227(2-4): 147-153.
- Chinachit, W. and S. Sreemaung. 2008. Colchicine affecting the alteration of ploidy level in plantlets of *Eulophia andamanensis* Reichb. f. *Agricultural Science Journal* 39(3) (Suppl.): 275-277. (in Thai)
- Fehr, W.R. 1987. *Principles of Cultivar Development* Vol.1. New York: Macmillan.
- Hawkes, A.D. 1965. *Encyclopedia of Cultivated Orchids: An Illustrates, Descriptive Manual of the Members of the Orchidaceae Currently in Cultivation*. Faber and Faber, London. 602 p.
- Kawchadee, C., W. Bundithya, C. Sotthikul and N. Potapohn. 2012. Interspecific and intergeneric crossability of some *Habenaria* and *Pecteilis*, terrestrial orchids. *Journal of Agriculture* 28(3): 263-272. (in Thai)
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Petbanna, U. 2011. Chromosome doubling of *Spathoglottis plicata* Blume var. *alba* using colchicine and oryzalin *in vitro*. M. Sc. Thesis. Walailak University, Nakhon Si Thammarat. 105 p. (in Thai)
- Petchang, R. 2010. The effects of colchicine concentration and treatment duration on growth and chromosome number in *Dendrobium draconis* Rchb. f. *Journal of Science and Technology Mahasarakham University* 29(4): 413-419. (in Thai)
- Potapohn, N. 2005. *Orchidology 1*. Handout. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. 215 p. (in Thai)
- Saikum, C., K. Kunasakdakul and N. Potapohn. 2020. Crossability and *in vitro* seed

- germination of some terrestrial orchid species of genus *Habenaria* and *Pecteilis*. Journal of Agriculture 36(1): 47-58. (in Thai)
- Sarathum, S., M. Hegele, S. Tantivivat and M. Nanakorn. 2010. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. European Journal of Horticultural Science 75(3): 123-127.
- Silva, P.A.K.X., S.C. Jacques and M.H.B. Zanettini. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. Ciencia Rural, Santa Maria 30(1): 105-111.
- Sitthisatchatham, S. 2007. Wild Orchid of Thailand. Home and Garden, Bangkok. 495 p. (in Thai)
- Teo, C.K.H. 1985, Native Orchids of Peninsula Malaysia. Kyodo-Shing Loong Printing Industries (Pte) Ltd., Kuala Lumpur. 119 p.
- Thaithong, O. 2005. Orchids of Thailand. Home and Garden, Bangkok. 461 p. (in Thai)
- Tilarux, P. and S. Prasertsiriwat. 2014. Effects of colchicine in the induction of polyploidy of *Dendrobium fredericksianum* Rchb.f. (var. *oculatum*). Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University 16(1): 61-68. (in Thai)
- Tipvaree, V. 2009. Effects of colchicine on growth and polyploid induction of *Spathoglottis plicata*. M. S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 82 p. (in Thai)
-

วงจรชีวิตและความสามารถในการผสมพันธุ์ของกล้วยไม้เหลืองแม่ปิง

Life Cycle and Crossabilities of *Eulophia flava* (Lindl.) Hook.f.

เอกรัตน์ วสุเพ็ญ จันทลักษณ์ ตียายน และ นัฏฐา โพธารมณ
Ekarat Vasupen, Chantalak Tiyyayon and Nuttha Potapohn*

ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: natorchid@gmail.com

(Received: 8 August 2020; Accepted: 30 November 2020)

Abstract: *Eulophia flava* (Lindl.) Hook.f. has been found in Wiang Pa Pao district, Chiang Rai province. The inflorescence was 124 ± 32.5 cm tall and consisted of 35 ± 12 florets per inflorescence. Blooming period is mid - May to mid - June. At present, this orchid is rarely found. Thus, selfing and crossabilities of *E. flava* with 4 different species, *E. dufosseii*, *E. macrobulbon*, *E. pauciflora* and *E. spectabilis*, and 2 genera, *Cymbidium aloifolium* and *Geodorum citrinum*, were studied. The results showed that *E. flava* is 100 % self - compatible, it can be used as female parent for interspecific and intergeneric cross with some species including *E. dufosseii*, *E. macrobulbon*, *E. spectabilis*, *C. aloifolium* and *G. citrinum*. Interspecific hybridization could yield good seed pods with many seeds, whereas intergeneric one could give only few seeds. The chromosome number was $2n = 54$. The viability and germination of seed from various capsule age, 90, 120, 150, 180 and 210 days, were investigated. The result showed that seeds viability test with 1 % TTC were 57.8, 91.3, 89.9, 89.8 and 98.5 %, respectively. The germination on MS media were 8.4, 9.3, 14.1, 26.4 and 47.5 %, respectively. Furthermore, younger seeds had longer germination period than older seeds.

Keywords: Life cycle, chromosome number, seed viability

บทคัดย่อ: เหลืองแม่ปิงเป็นกล้วยไม้ที่พบได้ที่อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย มีช่อดอกสูง 124 ± 32.5 เซนติเมตร มีดอกย่อย 35 ± 12 ดอกต่อช่อ ดอกบานช่วงกลางเดือนพฤษภาคมถึงกลางเดือนมิถุนายน ปัจจุบันพบได้ค่อนข้างน้อย จึงได้ศึกษาความสามารถในการผสมตัวเองและผสมข้ามของ *E. flava* กับกล้วยไม้ 4 ชนิด ได้แก่ *E. dufosseii*, *E. macrobulbon*, *E. pauciflora* และ *E. spectabilis* และกล้วยไม้ต่างสกุล 2 สกุล ได้แก่ *Cymbidium aloifolium* และ *Geodorum citrinum* พบว่า *E. flava* สามารถผสมตัวเองได้ 100 % และใช้เป็นแม่พันธุ์ผสมข้ามกับกล้วยไม้บางชนิด ได้แก่ *E. dufosseii*, *E. macrobulbon*, *E. spectabilis*, *C. aloifolium* และ *G. citrinum* ซึ่งฝักที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดติดฝักได้ดีมีจำนวนเมล็ดมาก ส่วนฝักที่เกิดจากการผสมข้ามสกุลติดเมล็ดน้อย จำนวนโครโมโซมเท่ากับ $2n = 54$ การทดสอบความมีชีวิตและความงอกของเมล็ดจากฝักอายุ 90, 120, 150, 180 และ 210 วัน พบว่าความมีชีวิตของเมล็ดเมื่อทดสอบด้วย 1 % TTC เท่ากับ 57.8, 91.3, 89.9, 89.8 และ 98.5 % ตามลำดับ ส่วนความงอกของเมล็ดบนอาหารวุ้นสูตร MS เท่ากับ 8.4, 9.3, 14.1, 26.4 และ 47.5 % ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เมล็ดอายุน้อยใช้เวลาในการงอกนานกว่าเมล็ดที่อายุมาก

คำสำคัญ: วงจรชีวิต จำนวนโครโมโซม ความมีชีวิตของเมล็ด

คำนำ

กล้วยไม้เป็นหนึ่งในไม้นดอกที่ได้รับความนิยมในหลาย ๆ ประเทศ มูลค่าของดอกกล้วยไม้ในตลาดโลกประมาณ 400 ล้านเหรียญสหรัฐ ส่วนหนึ่งเป็นกล้วยไม้เขตร้อน (Department of International Trade Promotion, 2019) เนื่องจากมีความหลากหลายของสี สัน ขนาด และรูปทรงของดอก ทำให้มีการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีลักษณะดีตามที่ต้องการ กล้วยไม้หลายชนิดมีความสามารถในการผสมตัวเอง แต่บางชนิดไม่สามารถผสมตัวเองได้ต้องมีการผสมข้ามต้นเท่านั้น นอกจากนี้กล้วยไม้ยังมีคุณสมบัติที่ดีคือสามารถผสมข้ามชนิดและข้ามสกุลได้ เช่น *Phalaenopsis x intermedia* ซึ่งเป็นลูกผสมข้ามชนิดที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ และ *Laeliocattleya Elegans* ที่เป็นลูกผสมข้ามสกุล (De et al., 2014) การผสมพันธุ์กล้วยไม้เพื่อสร้างลูกผสมใหม่ นอกจากเพื่อใช้ประโยชน์ทางการค้า ยังเป็นการตอบสนองความต้องการที่หลากหลายของผู้บริโภค

กล้วยไม้สกุล *Eulophia* จัดอยู่ใน Tribe *Cymbidieae* และ Subtribe *Eulophiinae* (Dressler, 1993) เป็นกล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) ที่มีหัวสะสมอาหาร พบมากกว่า 200 ชนิดทั่วโลก (van der Cingel, 2001) และหลายชนิดมีรายงานว่า เป็นพืชที่ถูกคุกคาม

และเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ กล้วยไม้สกุล *Eulophia* ที่พบในประเทศไทยมี 14 ชนิด (Chayamarit et al., 2014) แต่ละชนิดมีลักษณะของหัว ต้น และดอกแตกต่างกัน

Eulophia flava (Lindl.) Hook.f. หรือ เหลืองแม่ปิงเป็นกล้วยไม้สกุล *Eulophia* ชนิดหนึ่งที่พบในประเทศไทย ซึ่งช่อดอกมีความสวยงามและโดดเด่นเป็นกล้วยไม้ที่พบในธรรมชาติเพียงบางพื้นที่ โดย Chayamarit et al. (2014) รายงานว่าพบได้ในบริเวณป่าดิบชื้น จังหวัดเพชรบูรณ์ และ Rungruang (2001) รายงานว่าพบในอุทยานแห่งชาติแม่ปิง จังหวัดลำพูน โดยมีลักษณะของลำต้นใต้ดินเป็นหัวสามารถสร้างหัวใหม่ได้ปีละ 1 หัว ช่อดอกตั้งตรงสูง 73 - 170 เซนติเมตร ดอกย่อยสีเหลืองสด 9 - 41 ดอกต่อช่อ ออกดอกในเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อจำนวนประชากรมีหลายปัจจัย ได้แก่ การสืบพันธุ์โดยอาศัยเมล็ดตามธรรมชาติ เป็นไปได้ยาก เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็ก การเกิดขึ้นเองในสภาพธรรมชาติจะเกิดขึ้นได้ค่อนข้างน้อย และดอกมักถูกทำลายโดยแมลงศัตรูพืช ทำให้ดอกพัฒนาเป็นฝักและเมล็ดได้น้อย นอกจากนี้การสร้างหัวใหม่ในแต่ละปีเกิดขึ้นได้น้อยเช่นเดียวกัน

เพื่อเป็นการอนุรักษ์และศึกษาการใช้ประโยชน์ จึงได้มีการศึกษาวงจรชีวิต ความสามารถในการผสมตัวเอง ผสมข้ามชนิดและข้ามสกุลของ *E. flava*

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ ผลของอายุฝักต่อความมีชีวิตและการงอกของเมล็ด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์และเป็นข้อมูลในการพัฒนาพืชชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพันธุ์พืช

E. flava (Lindl.) Hook.f. และกล้วยไม้ที่นำมาผสมข้ามชนิด ได้แก่ *Eulophia dufosseii*, *E. macrobulbon*, *E. pauciflora* และ *E. spectabilis* ส่วนกล้วยไม้ที่นำมาผสมข้ามสกุล ได้แก่ *Cymbidium aloifolium* และ *Geodorum citrinum* (Figure 1)

วงจรชีวิต

ศึกษาวงจรชีวิตในรอบ 1 ปีของ *E. flava* ที่พบในอำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลปานกลางประมาณ 630 เมตร และ *Eulophia* spp. อีก 2 ชนิด ที่นำมาผสมข้ามกับ *E. flava* ซึ่งเป็นชนิดที่หายากและยังไม่มีเคยมีรายงานการศึกษามาก่อน ได้แก่ *E. dufosseii* และ *E. pauciflora* ซึ่งปลูกและเจริญเติบโตในจังหวัดเชียงใหม่ ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 310 เมตร โดยบันทึกช่วงเวลาออกดอก การเจริญเติบโตทางใบ และการพักตัว

ความสามารถในการผสมพันธุ์

1) การผสมภายในชนิด (intraspecific hybridization) ของ *E. flava* โดยการถ่ายเรณูด้วยมือ



Figure 1. Flower of *Eulophia flava*; (A) inflorescence, (B) leaves, (C) flower, (D) rhizome, (E) *E. dufosseii*, (F) *E. macrobulbon*, (G) *E. pauciflora*, (H) *E. spectabilis*, (I) *Cymbidium aloifolium* and (J) *Geodorum citrinum* (scale bar = 1 cm)

(hand - pollination) ในช่วงเวลา 9.00 - 10.00 น. ประกอบด้วย 2 กรรมวิธี คือ ถ่ายเรณูในต้นเดียวกัน และถ่ายเรณูข้ามต้น จำนวน 30 ดอกต่อกรรมวิธี และทดสอบการผสมตัวเองของ *E. dufosseii* และ *E. pauciflora* โดยถ่ายเรณูในต้นเดียวกัน จำนวน 3 ดอกต่อชนิด

2) การผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) นำ *E. flava* ผสมข้ามชนิดกับ *E. dufosseii*, *E. macrobulbon*, *E. pauciflora*, *E. spectabilis* และ ผสมข้ามสลับพ่อแม่ (reciprocal cross) โดยผสมข้าม อย่างน้อย 5 ดอกต่อคู่ผสม ทำการถ่ายเรณูเวลา 8.00 - 10.00 น.

3) การผสมข้ามสกุล (intergeneric hybridization) ของ *E. flava* กับ *C. aloifolium* และ *G. citrinum* พร้อมทั้งผสมสลับพ่อแม่ โดยผสมข้าม อย่างน้อย 5 ดอกต่อคู่ผสม ทำการถ่ายเรณูเวลา 8.00 - 10.00 น.

บันทึกผลการทดลองจากจำนวนฝักที่ผสมติด เทียบกับจำนวนดอกที่ทำการผสมทั้งหมด สำหรับ กล้วยไม้ที่มีช่วงดอกบานไม่ตรงกันจะเก็บรักษาเรณู ตามวิธีของ Inpar and Potapohn (2009) นำเมล็ด ลูกผสมที่ได้มาเพาะในสภาพปลอดเชื้อ และคำนวณ เปอร์เซ็นต์ความงอกจากเมล็ดที่งอกเทียบกับจำนวน เมล็ดที่เพาะทั้งหมด

เซลล์พันธุศาสตร์

ศึกษาจำนวนโครโมโซมของ *Eulophia* 3 ชนิด ได้แก่ *E. flava*, *E. dufosseii* และ *E. pauciflora* เตรียมสไลด์ด้วยวิธี squash technique ดัดแปลงจาก Felix and Guerra (2000) โดยศึกษาช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างราก (5.00 น., 6.00 น., 7.00 น., 8.00 น., 9.00 น., 10.00 น., 11.00 น., 12.00 น. และ 13.00 น.) และระยะเวลา pre-treatment ที่เหมาะสม (4, 12 และ 24 ชั่วโมง) ในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากมี ขั้นตอนดังนี้ ตัดปลายรากยาว 5 มิลลิเมตร pretreat ด้วย 0.002 M 8-hydroxyquinolin ที่อุณหภูมิ 4 °C ตามเวลาที่กำหนด จากนั้นแช่ในสารละลาย acetic - alcohol fixative ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3 - 12 ชั่วโมง ย่อยผนังเซลล์ด้วย 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 °C

เป็นเวลา 8 นาที และย้อมด้วยสี aceto - orcein เป็นเวลา 30 นาที

ผลของอายุฝักต่อความมีชีวิตและการงอกของเมล็ด

การศึกษาความมีชีวิตของเมล็ด (seed viability) ใช้เมล็ดจากฝักที่ได้จากการผสมตัวเองของ *E. flava* อายุ 90, 120, 150, 180 และ 210 วัน แต่ละช่วง อายุทำ 10 ซ้ำ โดยตัดเมล็ดใส่ในจานแก้ว (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร นับเมล็ด ก่อนทดสอบละลาย 1 % 2,3,5 - triphenyltetrazolium chloride (TTC) ลงไป 5 มิลลิตร ปิดฝาจานแก้วแล้ว นำไปวางในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมล็ดที่มีชีวิตคือเมล็ดที่ย้อมติดสีแดงบริเวณเอ็มบริโอ บันทึกจำนวนเมล็ดที่ติดสีแดง

ศึกษาการงอกของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ (in vitro seed germination) โดยเก็บฝักที่มีอายุ 90, 120, 150, 180 และ 210 วัน มาตัดแต่งและล้างทำความสะอาดก่อนฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย 15 % Clorox นาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่น้ำ ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ในตู้ปลอดเชื้อ ลงไฟและฆ่าฝัก แล้วเทเมล็ดทั้งหมดลงในจานแก้ว ใช้ช้อนตักสาร (spatula) ขนาดเล็กตักเมล็ดโรยบนอาหารวุ้นสูตร Murashige and Skoog 1962 (MS) ขวดละ 1 ช้อน จำนวน 10 ขวด ซึ่งในการเพาะเมล็ดแต่ละช่วงอายุ ได้ทำการนับจำนวนเมล็ดใน 1 ช้อน ทั้งหมด 10 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงวางไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 °C บันทึกจำนวนวันในการงอก และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอกจากจำนวนเมล็ด ที่งอกต่อจำนวนเมล็ดที่เพาะทั้งหมด

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การงอกด้วย ANOVA

ผลการศึกษาและวิจารณ์

วงจรชีวิต

E. flava เริ่มการเจริญเติบโตโดยแทงตายอด โผล่พ้นดินในช่วงปลายเดือนเมษายน ตาดอกมีการพัฒนาเร็วกว่าตาใบ ดอกบานในช่วงกลางเดือน พฤษภาคมถึงกลางเดือนมิถุนายน เมื่อดอกบาน

(self-incompatible, SI) เช่นเดียวกับที่พบในกล้วยไม้หลาย ๆ ชนิดในสกุล *Dendrobium* (Niu *et al.*, 2018) โดย SI เป็นกลไกในพืชที่ป้องกันการผสมตัวเอง ทำให้พืชมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในสายพันธุ์ (Zhang *et al.*, 2009) ส่วนการที่ฝักมีขนาดใหญ่ขึ้นนั้น คาดว่าเป็นเพราะออกซินที่อยู่บริเวณของกลุ่มเรณู ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ช่วยกระตุ้นการสร้างและการเจริญเติบโตของอวุลที่อยู่ในรังไข่ แม้ว่าจะไม่มีการปฏิสนธิฝักก็ยังคงเติบโตได้แต่ไม่เมล็ด (Millner *et al.*, 2015)

การผสมข้ามชนิดและข้ามสกุล พบว่า เมื่อให้ *E. flava* เป็นแม่พันธุ์ สามารถผสมข้ามกับ *E. dufosseii*, *E. macrobulbon*, *E. spectabilis*, *C. aloifolium* และ *G. citrinum* ติดฝักได้ 60.0, 33.3, 100.0, 25.0 และ 40.0 % ตามลำดับ เมื่อนำเมล็ดลูกผสมเพาะบนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 13.0, 4.6, 6.0, 0.0 และ 6.9 % ตามลำดับ ส่วนการผสมกับ *E. pauciflora*

ไม่ติดฝัก เมื่อให้ *E. flava* เป็นพ่อพันธุ์ สามารถผสมข้ามกับ *E. spectabilis* และ *G. citrinum* ติดฝักได้ 100.0 และ 40.0 % ตามลำดับ เมื่อนำเมล็ดลูกผสมเพาะบนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การงอก 10.1 และ 4.1 % ตามลำดับ ส่วนการผสมข้ามกับกล้วยไม้อีก 4 ชนิด ไม่ประสบความสำเร็จ (Table 2) โดยการผสมข้ามชนิดได้ฝักขนาดใหญ่และติดเมล็ดมาก ส่วนฝักที่ได้จากการผสมข้ามสกุลมีขนาดเล็กและติดเมล็ดน้อย ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการผสมข้ามมีหลายปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิอากาศและความชื้นขณะทำการถ่ายเรณู จำนวนโครโมโซม ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม และความเข้ากันได้ระหว่างเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย (Krasaechai, 1996) นอกจากนี้ความมีชีวิตของเรณูมีผลต่อการผสมเกสรด้วยเช่นกัน ซึ่งการใช้เรณูที่ไม่สมบูรณ์หรือมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ต่ำเกินไปทำให้การถ่ายเรณูล้มเหลวได้ (Thammatha *et al.*, 2016)

Table 2. Fruit set percentage of intraspecific, interspecific and intergeneric hybridization of *Eulophia* spp. and alliances

Female plant	Male plant	Number of hybridized flowers	Number of seed pods	Fruit set (%)	Seed germination (%)
<i>Eulophia flava</i>	x <i>Eulophia flava</i>	60	60	100	8.4
<i>Eulophia dufosseii</i>	x <i>Eulophia dufosseii</i>	3	0	0	-
<i>Eulophia pauciflora</i>	x <i>Eulophia pauciflora</i>	3	3	100	5.7
<i>Eulophia flava</i>	x <i>Eulophia dufosseii</i>	5	3	60.0	13.0
<i>Eulophia dufosseii</i>	x <i>Eulophia flava</i>	5	0	0	-
<i>Eulophia flava</i>	x <i>Eulophia macrobulbon</i>	6	2	33.3	4.6
<i>Eulophia macrobulbon</i>	x <i>Eulophia flava</i>	5	0	0	-
<i>Eulophia flava</i>	x <i>Eulophia pauciflora</i>	5	0	0	-
<i>Eulophia pauciflora</i>	x <i>Eulophia flava</i>	5	0	0	-
<i>Eulophia flava</i>	x <i>Eulophia spectabilis</i>	6	6	100	6.0
<i>Eulophia spectabilis</i>	x <i>Eulophia flava</i>	6	6	100	10.1
<i>Eulophia flava</i>	x <i>Cymbidium aloifolium</i>	8	2	25.0	0
<i>Cymbidium aloifolium</i>	x <i>Eulophia flava</i>	8	0	0	-
<i>Eulophia flava</i>	x <i>Geodorum citrinum</i>	5	2	40.0	6.9
<i>Geodorum citrinum</i>	x <i>Eulophia flava</i>	5	2	40.0	4.1

ในการศึกษานี้ *E. pauciflora* และ *C. aloifolium* ไม่สามารถใช้เป็นแม่พันธุ์ผสมข้ามกับ *E. flava* ได้ แม้ว่าจะมีโครโมโซมใกล้เคียงกันและมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมก็ตาม อาจเป็นเพราะเกสรเพศผู้และเพศเมียไม่สามารถเข้ากันได้ เนื่องจาก *E. pauciflora* และ *C. aloifolium* มีดอกขนาดเล็กกว่า *E. flava* มาก ซึ่งอาจจะมีผลต่อการงอกของหลอดเรณูเข้าไปในรังไข่ สอดคล้องกับการศึกษาของ Pintajam *et al.* (2016) ที่พบว่า *E. macrobulbon* และ *E. spectabilis* มีจำนวนโครโมโซมต่างกันแต่สามารถผสมข้ามกันได้ โดยใช้ *E. spectabilis* เป็นแม่พันธุ์ แต่เมื่อใช้ *E. macrobulbon* เป็นแม่พันธุ์จะไม่ติดฝัก เนื่องจาก *E. macrobulbon* มีดอกขนาดเล็กกว่า *E. spectabilis* มาก จึงมีท่อรังไข่เล็กและแคบกว่าท่อของกลุ่มนเรณู ในกรณีของคู่ผสมระหว่าง *E. flava* x *E. pauciflora*, *E. dufosseii* x *E. flava* และ *E. macrobulbon* x *E. flava* ผสมข้ามไม่สำเร็จ เนื่องจากช่วงเวลาในการออกดอกแตกต่างกัน การเก็บรักษาเรณูของต้นพ่อพันธุ์เป็นเวลา 7 - 9 เดือน ทำให้เรณูสูญเสียความมีชีวิต เมื่อทดสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีประยุกต์ของ Rodjanawijid *et al.* (2016) โดยนำเรณูที่เก็บรักษาไว้มาเพาะบนอาหารวุ้นที่เติม

2 % sucrose วางในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ไม่มีเรณูที่งอกได้ แม้ว่าอุณหภูมิ 4 °C สามารถเก็บรักษาเรณูของ *Dendrobium* บางชนิดได้นานถึง 8 เดือน (Inpar and Potapohn, 2009) แต่อาจยังไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเรณูของกล้วยไม้ที่ใช้ในการทดลองนี้

เซลล์พันธุศาสตร์

ในขั้นตอนการหาจำนวนโครโมโซมนั้น *Eulophia* แต่ละชนิดมีช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างรากและ pre - treatment แตกต่างกัน โดยเวลาที่เหมาะสมเป็นดังนี้ *E. flava* เก็บรากเวลา 7.00 - 7.30 น. ใช้เวลา pretreat 24 ชั่วโมง ในขณะที่ *E. dufosseii* เก็บรากเวลา 7.00 - 7.20 น. pretreat เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ *E. pauciflora* เก็บรากเวลา 10.00 น. pretreat เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการตรวจสอบจำนวนโครโมโซม พบว่า *E. flava* จากแหล่งธรรมชาติ 3 แหล่ง มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ $2n = 54$ ตรงกับรายงานของ Deng *et al.* (2009) ที่พบว่า *E. flava* ในประเทศจีนมีโครโมโซมเท่ากับ $2n = 54$ ส่วนจำนวนโครโมโซมของ *E. dufosseii* เท่ากับ $2n = 54$ และ *E. pauciflora* เท่ากับ $2n = 56$ (Figure 2) จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ชนิดอื่นที่

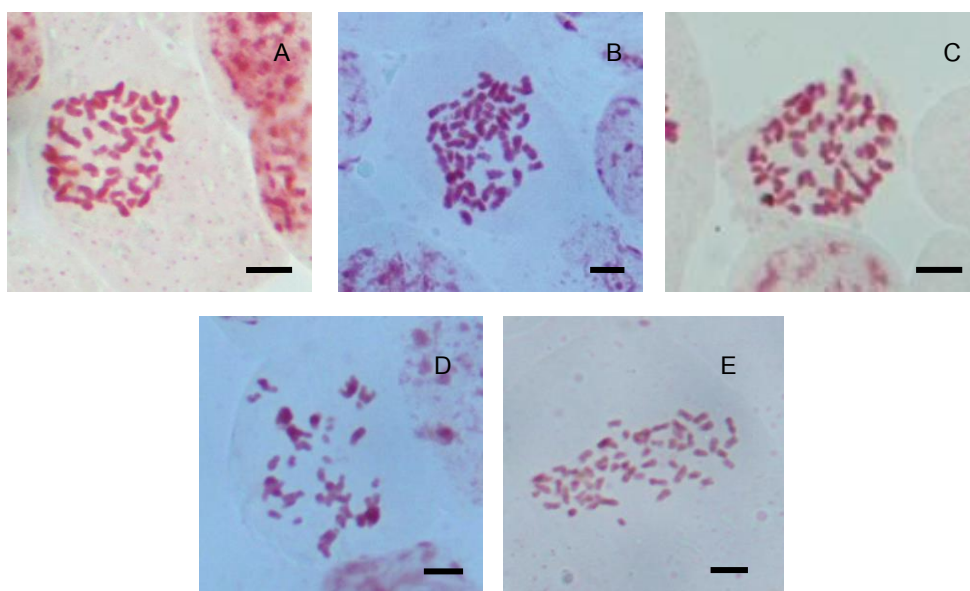


Figure 2. Chromosome numbers of *Eulophia* spp. (scale bar = 5 μ m) (A - C) *Eulophia flava* from 3 natural habitats $2n = 54$, (D) *Eulophia dufosseii* $2n = 54$, (E) *Eulophia pauciflora* $2n = 56$

นำมาผสมข้ามกับ *E. flava* มีรายงานไว้เป็นดังนี้ *E. macrobulbon* เท่ากับ $2n = 48$ (Pintajam *et al.*, 2016) *E. spectabilis* เท่ากับ $2n = 54$ (Pintajam *et al.*, 2018) *G. citrinum* เท่ากับ $2n = 54$ (Thongsan, 2008) และ *C. aloifolium* เท่ากับ $2n = 40$ (Aoyama, 1989)

ผลของอายุฝักต่อความมีชีวิตและการงอกของเมล็ด

การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดโดยใช้ TTC ทำให้เอ็มบริโอที่หายใจยอมติดสีแดง และเอ็มบริโอที่ตายไม่มีชีวิตไม่ติดสี จากการทดลอง พบว่า เมล็ดของ *E. flava* แต่ละช่วงอายุมีการติดสีแตกต่างกัน เมล็ดอายุ 90 วัน มีเมล็ดที่ติดสีเข้ม ติดสีจาง และไม่ติดสี จากการสุ่มตัวอย่างคิดเป็น 12.8, 47.7 และ 39.5 % ตามลำดับ เมล็ดอายุ 120-180 วัน ส่วนใหญ่ยอมติดสีเข้ม ส่วนเมล็ดอายุ 210 วัน เมื่อแช่เมล็ดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไม่สามารถมองเห็นการติดสีที่เอ็มบริโอได้ เมื่อเพิ่มเวลาแช่เมล็ดเป็น 72 ชั่วโมง จึงติดสีจาง (Figure 3) ความมีชีวิตของเมล็ดจากฝักอายุ 90, 120,

150, 180 และ 210 วัน เท่ากับ 57.8, 91.3, 89.9, 89.8 และ 98.5 % ตามลำดับ เมล็ดจากฝักอายุตั้งแต่ 120-210 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 3) สอดคล้องกับการศึกษาใน *Cephalanthera falcata* ที่พบว่า เมล็ดจากฝักอายุ 50-60 วัน มีเปอร์เซ็นต์การยอมติดสีต่ำ เมล็ดจากฝักอายุ 70-100 วัน ติดสีได้มากขึ้น เมล็ดจากฝักอายุ 110 วัน มองเห็นเอ็มบริโอที่ติดสีไม่ชัดเจน เนื่องจากผนังออวูลชั้นใน (inner integument) ที่อยู่รอบเอ็มบริโอมีสีน้ำตาลเข้ม และเมล็ดจากฝักอายุ 140 วัน ไม่ติดสียอม แต่เมื่อลอกเอาเฉพาะเอ็มบริโอมาแช่ใน TTC พบว่า ติดสีแดงเข้ม (Yamazaki and Miyoshi, 2006) เปลือกเมล็ดชั้นนอก (testa) และผนังออวูลชั้นใน มีผลต่อการยอมด้วย TTC ในเมล็ดที่ยังอ่อนสลาย TTC สามารถเข้าไปยังเอ็มบริโอโดยผ่านช่องเปิดขนาดเล็ก เช่น รูปบริเวณ suspensors เมื่อเมล็ดอายุมากขึ้นจะมีการสะสมของสารทุติยภูมิซึ่งอาจเป็นลิกนิน

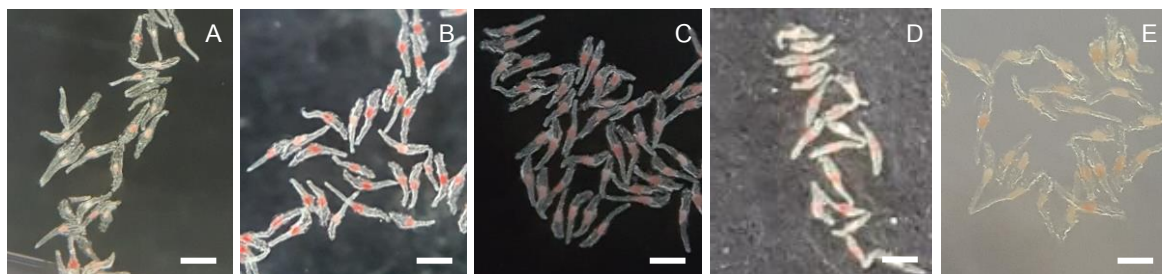


Figure 3. Seed of *Eulophia flava* at different age, (A) 90 - day, (B) 120 - day, (C) 150 - day, (D) 180 - day, and (E) 210 - day. Seeds with red stained in the middle were viable seeds (scale bars = 1 mm)

Table 3. Viability and germination of different seed age of *Eulophia flava*

Seed ages (days)	Seed viability (%)	Seed germination (%)	Days to germination
90	57.8 ^b	8.4 ^c	61
120	91.3 ^a	9.3 ^c	52
150	89.9 ^a	14.1 ^c	40
180	89.8 ^a	26.4 ^b	36
210	98.5 ^a	47.5 ^a	30

Means within the same column follow by different letters showed significantly different ($P \leq 0.05$) according to Duncan's multiple range test

หรือคิวติน ส่วนเปลือกเมล็ดชั้นนอกมีการสะสม
ซูเบอรินและไขมันมากขึ้น ทำให้น้ำหรือสารละลายไม่
สามารถซึมผ่านเข้าไปยังเอ็มบริโอได้ง่าย (Kauth *et al.*,
2008; Yamazaki and Miyoshi, 2006)

การเพาะเมล็ดจากฝักที่มีอายุแตกต่างกัน
ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ฝักอายุ 210 วัน มีเปอร์เซ็นต์
ความงอกสูงที่สุด (47.5 %) รองลงมาเป็นฝักอายุ 180 วัน
(26.4 %) ส่วนฝักอายุ 90, 120 และ 150 วัน มีเปอร์เซ็นต์
ความงอกต่ำ (8.4, 9.3 และ 14.1 % ตามลำดับ) (Table 3)
ระยะเวลาในการงอกของเมล็ด พบว่า ฝักอายุ 90 วัน
ใช้เวลางอกนานที่สุด คือ 61 วัน ส่วนฝักอายุ 210 วัน
ใช้เวลาในการงอก 30 วัน (Table 3) เช่นเดียวกับ
Habenaria rhodocheila Hance ที่พบว่า เมล็ดจากฝัก
อายุมากสามารถงอกได้ดีและเร็วกว่าเมล็ดจากฝัก
อายุน้อย การนำเมล็ดอ่อนไปเพาะต้องใช้เวลาพัฒนา
เอ็มบริโอต่อจนถึงจุดที่พร้อมงอกจึงทำให้งอกช้า
(Piyatrakul, 2004) ในทางตรงกันข้ามกับกล้วยไม้ดิน
บางชนิดที่เมล็ดอ่อนซึ่งเอ็มบริโอยังไม่โตเต็มที่
สามารถงอกในสภาพปลอดเชื้อได้เร็วกว่าเมล็ดแก่
(Godo *et al.*, 2010) เช่น *Calanthe tricarinata* เมล็ดอ่อน
มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น แต่เมล็ดแก่
เต็มที่จะงอกได้น้อยลง เนื่องจาก ABA ซึ่งเป็นสารยับยั้ง
การเจริญเติบโตมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นกว่าในเมล็ดอ่อน
5 เท่า (Lee *et al.*, 2007) ในกล้วยไม้ *Dactylorhiza*
maculata พบว่า เมล็ดแก่มี ABA มากกว่าเมล็ดอ่อน 14
เท่า (van der Kinderen, 1987) ABA ในเมล็ดทำหน้าที่
ควบคุมการแก่ของเอ็มบริโอ การพักตัวและการงอก
(Lee *et al.*, 2007) แม้ว่าปริมาณ ABA จะมีความสัมพันธ์
กับการงอกของเมล็ดในหลอดทดลอง แต่อาจมีปัจจัยอื่นที่
ส่งผลต่อการงอก เช่น การพัฒนาของเปลือกเมล็ด
(seed coat) อย่างไรก็ตามเมล็ดกล้วยไม้แต่ละชนิดมี
ความหนาของเปลือกเมล็ดและคุณสมบัติในการซึมผ่าน
ของน้ำแตกต่างกัน และ ABA ในเมล็ดอาจไม่ได้นำไปสู่
การพักตัว ทั้งนี้ต้องพิจารณาถึงการกระจายของฮอร์โมน
ในเซลล์และความไวของเซลล์ต่อฮอร์โมนร่วมด้วย
(van der Kinderen, 1987) ซึ่งในการทดลองนี้เมล็ดของ
E. flava ที่อายุมากมีเอ็มบริโอที่พัฒนาเต็มที่แล้วทำให้มี
ความพร้อมที่จะงอกได้เร็วกว่าเมล็ดอ่อน

สรุป

E. flava มีการเจริญเติบโตช่วงปลายเดือน
เมษายนโดยออกดอกก่อนใบ ดอกบานกลางเดือน
พฤษภาคมถึงกลางเดือนมิถุนายน จากนั้นใบจะยุบตัว
ในเดือนธันวาคม จำนวนโครโมโซมของ *E. flava* จาก
ทุกแหล่งมีจำนวนเท่ากันคือ $2n = 54$ มีความสามารถ
ผสมตัวเองได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นแม่พันธุ์ผสมข้ามชนิด
และข้ามสกุลได้ โดยสามารถผสมกับ *E. duofosseii*,
E. macrobulbon, *E. spectabilis*, *C. aloifolium* และ *G.*
citrinum ส่วนการผสมกับ *E. pauciflora* ไม่ติดฝัก
ส่วนใหญ่คู่ที่ผสมติดฝักได้สังเกตว่ามีจำนวนโครโมโซม
เท่ากันหรือต้นแม่พันธุ์มีจำนวนโครโมโซมมากกว่า
นอกจากนี้ฝักที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดจะติดเมล็ดได้
มาก แต่ฝักที่ได้จากการผสมข้ามสกุลจะติดเมล็ดน้อย
ความมีชีวิตและความงอกของเมล็ด *E. flava* แปรผัน
ตามอายุเมล็ดที่เพิ่มขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล
อีสานที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย และขอขอบคุณ
คุณสมัย โคกกรวด และ คุณแจ่มจันทร์ นักสิทธิ์ ที่เอื้อเฟื้อ
สถานที่และต้นพันธุ์ในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Aoyama, M. 1989. Karyomorphological studies in
Cymbidium and its allied genera,
Orchidaceae. Bulletin of the Hiroshima
Botanical Garden 11: 1-121.
- Chayamarit, K., R. Pooma and N. Pattharahirantracin.
2014. A Checklist of Plants in Thailand,
Volume I. Office of Natural Resources and
Environmental Policy and Planning, Bangkok.
238 p. (in Thai)
- Chung, M.Y. and M.G. Chung. 2003. The breeding
systems of *Cremastra appendiculata* and

- Cymbidium goeringii*: high levels of annual fruit failure in two self-compatible orchids. *Annales Botanici Fennici* 40: 81-85.
- De, L.C., P. Pathak, A.N. Rao and P.K. Rajeevan. 2014. Commercial Orchids. De Gruyter Open Ltd., Warsaw. 322 p.
- Deng, X., R. Mo, Y. Luo and M. Lin. 2009. The karyotype analysis of *Eulophia flava*. *Journal of Fujian Forestry Science and Technology* 4: 80-83.
- Department of International Trade Promotion. 2019. Orchid fact sheet. (Online). Available: https://www.ditp.go.th/contents_attach/539560/539560.pdf (October 27, 2019). (in Thai)
- Dressler, R.L. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Cambridge University Press, Cambridge. 314 p.
- Felix, L.P. and M. Guerra. 2000. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. *Genetics and Molecular Biology* 23(4): 957-978.
- Godo, T., M. Komori, E. Nakaoki, T. Yukawa and K. Miyoshi. 2010. Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 46: 323-328.
- Inpar, C. and N. Potapohn. 2009. Effects of temperature and storage period on pollinia viability percentage on *Dendrobium scabrilingue* Lindl., *D. anosmum* Lindl., *D. parishii* Rchb. f. and *D. peguanum* Lindl. *Journal of Agriculture* 25(2): 101-108. (in Thai)
- Kauth, P. J., D. Dutra, T. R. Johnson, S. L. Stewart, M. E. Kane and W. Vendrame. 2008. Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. pp. 375-391. In: J. A. T. da Silva (ed.). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*, Volume V. Global Science Books, Ltd., London.
- Krasaechai, A. 1996. Flowering Crops Improvement. Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. 271 p. (in Thai)
- Lee, Y., C. Lu, M. Chung, E.C. Yeung and N. Lee. 2007. Developmental changes in endogenous abscisic acid concentrations and asymbiotic seed germination of a terrestrial orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132(2): 246-252.
- Millner, H.J., A.R. McCrea and T.C. Baldwin. 2015. An investigation of self-incompatibility within the genus *Restrepia*. *American Journal of Botany* 102(3): 487-494.
- Niu, S., J. Huang, Q. Xu, P. Li, H. Yang, Y. Zhang, G. Zhang, L. Chen, Y. Niu, Y. Luo and Z. Liu. 2018. Morphological type identification of self-incompatibility in *Dendrobium* and its phylogenetic evolution pattern. *International Journal of Molecular Sciences* 19(9): 2595, doi: 10.3390/ijms19092595.
- Pintajam, P., C. Tiayon and N. Potapohn. 2016. Interspecific and intergeneric crossabilities of *Eulophia macrobulbon* (Par. & Pchb. f.) Hook. f. and *E. spectabilis* (Dennst.) Suresh. *Journal of Agriculture* 32(3): 299-308. (in Thai)
- Pintajam, P., W. Bundithya and N. Potapohn. 2018. Intraspecific and interspecific crossability of some *Eulophia* species. *Maejo International Journal of Science and Technology* 12(3): 241-250.
- Piyatrakul, P. 2004. Factors influencing germination and seedling development of *Habenaria rhodocheila* Hance. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 171 p. (in Thai)

-
- Rodjanawijid, S., P. Sornchai, D. Sumrittinun, N. Dechsangkranon, B. Kongsamai and S. Chanprame. 2016. The technique for pollinia separation and pollen germination test for certain *Dendrobium* cultivars. *Agricultural Science Journal* 47(3): 305-316. (in Thai)
- Rungruang, C. 2001. Population variation of *Eulophia flava* (Lindl.) Hook.f. in Mae Ping National Park, Lamphun province. M.S. Thesis. Kasetsart University, Bangkok. 78 p. (in Thai)
- Thammatha, P., S. Techawongstien and S. Techawongstien. 2016. Appropriate time of pollination on fruit set of pummelo cv. Manee Esan crossed with pummelo cv. Thong Dee. *Songklanakarin Journal of Plant Science* 3(Suppl. I): M01/31-36. (in Thai)
- Thongsan, A. 2008. Characterization and hybridization of *Geodorum* spp. collected from Khun Mae Kwang National Reserved Forest. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 174 p. (in Thai)
- van der Cingel, N. A. 2001. *An Atlas of Orchid Pollination: America, Africa, Asia and Australia*. A. A. Balkema Publishers, Rotterdam. 296 p.
- van der Kinderen, G. 1987. Absciscic acid in terrestrial orchid seeds: a possible impact on their germination. *Lindleyana* 2(2): 84-87.
- Yamazaki, J. and K. Miyoshi. 2006. *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 98(6): 1197-1206.
- Zhang, Y., Z. Zhao and Y. Xue. 2009. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. *Annual Review of Plant Biology* 60: 21-42.
-

คุณสมบัติของถ่านชีวภาพจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์และ ความสามารถในการปรับปรุงดินกรด

Characteristics of Biochar Derived from Cashew Nut Shell and Potential for Acid Soil Amelioration

พจนีย์ แสงมณี*
Podjanee Sangmanee*

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ จ. อุดรดิตถ์ 53000
Division of Agriculture, Faculty of Agriculture, Uttaradit Rajabhat University, Uttaradit 53000, Thailand

*Corresponding author: Email: psangmanee191@gmail.com

(Received: 2 February 2020; Accepted: 1 December 2020)

Abstract: Uttaradit province is the largest area of cashew nut (*Anacardium occidentale*) production in Thailand. The average yield of cashew nut is 5,000 ton in each year. Cashew nut shell, is a waste of community derived after shelling process, produced 3,700 - 4,000 ton annually. Presently, some of cashew nut shell has been exported for industrial use or compressed for cashew nut shell liquid commonly known as CNSL. Although, the crude of cashew nut shell still remained problematic and should be upcycled. Biochar obtained from cashew nut shell was studied about its benefits for agricultural application such as a soil conditioner or plant nutrients resource. Therefore, the chemical properties of cashew nut shell biochar (CNSC) was characterised. The effect of CNSC on changing of soil pH, EC and mineralization of some nutrients was also investigated employing liming material and FGD gypsum as a benchmark. The study showed that CNSC has pH of 10.3 and contains mainly stable carbon (57.71 %) and 3.24 % of K. The efficacy of CNSC is inferior to lime considering from the rate of CNSC between 10 - 50 times of LR were applied in order to rise soil pH. Potassium was the main component of CNSC that play a key role in decrease of soil acidity. Moreover, available P and exchangeable K were increased after CNSC application which has not effect EC values.

Keywords: Biochar, cashew nut shell, acid soil, soil amendment

บทคัดย่อ: จังหวัดอุดรธานีเป็นแหล่งเพาะปลูกมะม่วงหิมพานต์แหล่งใหญ่ที่สุดของประเทศไทย มีผลผลิตเมล็ดมะม่วงหิมพานต์โดยเฉลี่ย 5,000 ตันต่อปี ภายหลังจากกระบวนการกะเทาะเมล็ดจะมีเปลือกหุ้มเมล็ดมะม่วงหิมพานต์เป็นของเสียชุมชนประมาณ 3,500 - 4,000 ตัน ปัจจุบันได้มีการกำจัดโดยการขายออกนอกพื้นที่หรือมีการบีบอัดเอาน้ำมัน (cashew nut shell liquid, CNSL) เพื่อนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรม กระบวนการดังกล่าวยังคงเหลือกากของเปลือกหุ้มเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ที่สร้างปัญหาขยะชุมชนที่จำเป็นต้องหาแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ งานวิจัยนี้จึงได้มีการนำเปลือกหุ้มเมล็ดมะม่วงหิมพานต์มาเป็นวัตถุดิบในการทำถ่านชีวภาพ (cashew nut shell biochar, CNSC) และศึกษาการใช้ประโยชน์ทางการเกษตร เช่น สารปรับปรุงดิน และแหล่งธาตุอาหารพืช ดังนั้นจึงทำการทดสอบคุณสมบัติทางเคมี ผลของการใช้ CNSC ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH, EC และการปลดปล่อยธาตุอาหารพืช โดยใช้ปูนขาวและยิปซัมในการเปรียบเทียบ ผลการศึกษา พบว่า CNSC มีคุณสมบัติเป็นต่างจัดโดยมีค่า pH 10.3 และมีคาร์บอนที่เสถียรเป็นองค์ประกอบหลัก (57.71%) มีโพแทสเซียมเป็นธาตุอาหารที่พบมากที่สุดคือ 3.24 % ประสิทธิภาพในการปรับค่า pH ของ CNSC น้อยกว่าปูนขาวพิจารณาจากอัตราการใช้ CNSC เพื่อการปรับค่า pH ของดินที่อยู่ในช่วง 10-50 เท่าของ LR โดยมีโพแทสเซียมซึ่งเป็นแคทไอออนที่เป็นด่างเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ความเป็นกรดในดินลดลง นอกจากนี้ การใส่ CNSC ยังช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้โดยไม่ส่งผลต่อค่าการนำไฟฟ้า

คำสำคัญ: ถ่านชีวภาพ เปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ ดินกรด สารปรับปรุงดิน

คำนำ

จังหวัดอุดรธานีเป็นแหล่งเพาะปลูกมะม่วงหิมพานต์แหล่งใหญ่ที่สุดของประเทศไทย มีพื้นที่เพาะปลูก 27,286 ไร่ ส่วนใหญ่เป็นการเพาะปลูกแบบอาศัยน้ำฝน สภาพดินมีความเป็นกรดจัดรุนแรง ปัจจุบันมะม่วงหิมพานต์ให้ผลผลิตรวม 7,192 ตัน (Uttaradit Provincial Agriculture and Cooperatives Office, 2019) ภายหลังจากการเก็บเกี่ยวมีการกะเทาะเมล็ดและแปรรูปในพื้นที่ เมื่อกะเทาะเมล็ดแล้วจะได้เปลือกเมล็ดซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปีเนื่องจากมีผลผลิตที่เริ่มเก็บเกี่ยวได้แล้วและจากการขยายพื้นที่เพาะปลูก ปัจจุบันมีการจัดการเปลือกเมล็ดด้วยการบีบอัดเพื่อสกัดเป็นน้ำมันที่เรียกว่า cashew nut shell liquid (CNSL) จำหน่ายออกนอกพื้นที่เพื่อนำไปใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรม เปลือกเมล็ดที่ผ่านการบีบอัดเอาน้ำมันออกแล้วถูกปล่อยทิ้งไว้ให้ย่อยสลายตามธรรมชาติ ไม่ต่ำกว่าปีละ 2,880 - 3,120 ตัน (Klaichom *et al.*, 2017) เศษเหลือดังกล่าวไม่นิยมนำมาทำปุ๋ยหมัก เนื่องจาก เปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ยังมี CNSL ที่ยังหลงเหลืออยู่ มีความเป็นกรดรุนแรง และเป็นพิษต่อผิวหนัง (Andonaba *et al.*, 2017)

ถ่านชีวภาพ (biochar) เป็นวัสดุที่ผ่านกระบวนการเผาไหม้ด้วยสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำหรือ กระบวนการไพโรไลซิส (pyrolysis) โดยวัตถุดิบที่นิยมนำมาใช้ส่วนใหญ่ ได้แก่ เศษเหลือทางการเกษตร เช่น ช้างข้าวโพด เศษไม้ แกลบ ชนิดของถ่านชีวภาพ ชนิดของดิน และสภาพแวดล้อมทางดิน มีผลต่อการปลดปล่อยธาตุอาหารพืชและการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างของดิน (pH) เช่น การใส่ถ่านชีวภาพจากช้างข้าวโพด อัตรา 2.5 % โดยน้ำหนัก ทำให้ pH ของดินเพิ่มขึ้นและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพริกที่ปลูกในดินเปรี้ยว (Pearaksa and Saeng-ngam, 2018) ในขณะที่การใส่ถ่านชีวภาพจากแกลบ อัตรา 2 ตันต่อไร่ในดินเนื้อปูนสภาพน้ำขัง ทำให้ดินมีค่า pH ลดลงเล็กน้อย และส่งเสริมการสะสมธาตุเหล็กและทองแดงในเมล็ดข้าว โดยการลดลงของค่า pH ในสภาพน้ำขังเกิดจากคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบในถ่านชีวภาพละลายออกมาและเปลี่ยนโครงสร้างเป็นกรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) ก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยา Hydrolysis ต่อจนกลายเป็นไบคาร์บอเนตไอออน (HCO_3^-) และไฮโดรเจนไอออน (H^+) (Leksungnoen *et al.*, 2017) ในขณะที่การใส่ถ่านชีวภาพจากไม้ยูคาลิปตัส อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ ในดินน้ำขังทำให้ค่า pH สูงขึ้น และมีแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้

ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น แต่ทำให้อินทรีย์วัตถุในดิน ไนโตรเจนทั้งหมด และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ลดลง ถ่านชีวภาพส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในช่วงอายุ 30 และ 45 วันหลังหว่านข้าว แต่ในระยะ 70 วันหลังหว่านกลับพบว่า ข้าวมีการสะสมน้ำหนักแห้งของรากลดลง (Manaonok *et al.*, 2017) จะเห็นได้ว่าถ่านชีวภาพแต่ละชนิดมีผลต่อค่า pH ของดิน การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของพืชที่แตกต่างกัน ดังนั้น การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของถ่านชีวภาพจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ และเปรียบเทียบผลของการใช้ถ่านชีวภาพจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์กับสารปรับปรุงดินชนิดอื่นในการปรับปรุงดินกรดและการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารในดิน

อุปกรณ์และวิธีการ

เนื่องจากคุณสมบัติและความสามารถในการปรับค่า pH ของ CNCS ยังไม่ทราบแน่ชัด จึงเลือกวัสดุปรับปรุงดินมาเทียบเคียงกับ CNCS เป็นวัสดุที่เป็นต่างจัด แต่ความสามารถในการปรับค่า pH

มีความแตกต่างกัน ได้แก่ ปูนขาว และยิปซัมและวิเคราะห์คุณสมบัติของวัสดุปรับปรุงดิน ได้แก่ ค่า pH ค่าการนำไฟฟ้า (EC) คาร์บอนทั้งหมด ปริมาณธาตุอาหารทั้งหมด และรูปที่เป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียมและแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ รวมถึงความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวก (CEC) และ ค่าสมมูลแคลเซียมคาร์บอเนต (CCE) (Table 1) ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง วัสดุปรับปรุงดินทุกชนิดจะนำมาร้อนผ่านตะแกรกร้อนขนาด 2 มิลลิเมตร แล้วนำไปอบด้วยอุณหภูมิ 105 °C จนน้ำหนักคงที่

การเตรียมวัสดุปรับปรุงดินที่จะนำมาทดสอบทำโดยนำเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ที่บีบอัดเอาน้ำมันออกแล้วมาเผาด้วยกระบวนการไพโรไลซิสแบบช้าด้วยอุณหภูมิต่ำกว่า 500 °C การเผาถ่านดังกล่าวทำให้เกิดถ่านชีวภาพประมาณ 35 % ผลผลิตที่ได้เป็นถ่านชีวภาพจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ (cashew nut shell biochar หรือ CNCS) เปรียบเทียบกับวัสดุปรับปรุงดิน ได้แก่ ปูนขาว (slaked lime หรือ Ca(OH)_2) และยิปซัมสังเคราะห์ (flue gas desulfurization gypsum หรือ FGD - gypsum) มีสูตรทางเคมีคือ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Table 1. Chemical properties and methods of analysis

Chemical properties	Methods of analysis
pH	pH meter (soil : water = 1 : 5) *
EC	Conductivity meter (soil : water = 1 : 5)*
Total C and organic C	Dry combustion and Walkley and Black (1934)
Total P	Nitric - perchloric digestion, Vanadomolybdate method**
Total K, Ca, Mg	Nitric - perchloric digestion, Atomic absorption spectrophotometry (AAS)**
Available P	Extracted the soil with Bray II and determined calorimetrically using molybdenum blue method*
Exchangeable K, Ca, Mg	Extracted the soil with 1M NH_4OAc pH 7 determined with atomic absorption spectrophotometer*
Total S	Nitric-perchloric digestion, Turbidimetric method*
Cation exchange capacity (CEC)	Leach the soil with ammonium acetate method at pH 7.0 followed by Kjeldahl Distillation*
Calcium carbonate equivalent (CCE)	Titrimetric method* and Erich and Ohno (1992)

* Therajindakajorn (2009), ** Suwanwong (2001)

ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการกำจัดก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ของโรงไฟฟ้าที่ใช้ถ่านหินเป็นเชื้อเพลิง (Kaweewong, 2018)

สำหรับการเปรียบเทียบผลของสารปรับปรุงดินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีของดินและปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ ดินที่ใช้ในการทดลองเก็บจากพิกัด 100.93824E, 17.819018N พื้นที่เพาะปลูกจัดอยู่ในชุดดินปึกธงชัย (Coarse - loamy, siliceous, subactive, isohyperthermic Typic (Kandic) Peleustults) เป็นพื้นที่ลาดชันเชิงซ้อน (slope complex) ที่มีการชะล้างดินสูง เนื้อดินร่วนปนทราย เมื่อนำดินมาวิเคราะห์หาคุณสมบัติทางเคมี (Table 1) พบว่า ดินมีค่า pH เป็นกรดจัดมาก (4.95), ค่า EC 0.04 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร, ความต้องการปูน (lime requirement: LR) เท่ากับ 1.1 ตันต่อไร่ วัดค่าโดยใช้ชุดทดสอบดินที่พัฒนาโดยคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นวิธีการสกัดดินด้วยน้ำยา Woodruff buffer สำหรับปริมาณธาตุอาหารในดิน พบว่า มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 342 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, โพแทสเซียม, แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 228, 818 และ 221 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

เตรียมหน่วยทดลองโดยการชั่งดิน 100 กรัม ใส่ภาชนะพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร สูง 9.5 เซนติเมตร แล้วชั่งวัสดุปรับปรุงดินตามอัตราที่กำหนดโดยพิจารณาจากค่า CCE ของสารปรับปรุงดินแต่ละชนิด เช่น อัตรา LR ของปูนขาวใช้น้ำหนัก 0.35 กรัม ผสมคลุกเคล้ากับดินให้เข้ากัน และเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณน้ำที่ทำให้ดินมีความชื้นเพียงพอที่จะทำปฏิกิริยากับสารปรับปรุงดิน รักษาความชื้นทุก 3 วัน โดยพิจารณาจากน้ำหนักที่หายไปแล้วเติมน้ำกลั่นจนหน่วยทดลองมีน้ำหนักเท่ากับตอนใส่น้ำลงไปครั้งแรก

วางแผนการทดลองแบบ สุ่ม สมบูรณ์ (completely randomized design) จำนวน 4 ซ้ำ ทั้งหมด 10 กรรมวิธี ดังนี้ ควบคุม, ปูนขาว ยิปซัม และ CNSC อัตรา LR, 10 LR, 50 LR จากนั้นจึงติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติดิน เช่น pH EC ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้

(Table 1) ภายหลังจากการใส่สารปรับปรุงดินที่ระยะเวลา 3, 7, 14, 30 และ 60 วัน

การวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ Statistix 8.0

ผลการศึกษาและวิจารณ์

สมบัติทางเคมีของวัสดุปรับปรุงดิน

จากการวิเคราะห์วัสดุปรับปรุงดินที่นำมาใช้ในการทดสอบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ปูนขาว ยิปซัม และ CNSC พบว่า วัสดุทุกชนิดมีฤทธิ์เป็นด่าง สำหรับค่า CCE ของปูนขาวมีค่ามากที่สุด คือ 135 % ขณะที่ยิปซัมและ CNSC มีค่า CCE ใกล้เคียงกันคือ 114 และ 113 % สำหรับ CNSC ซึ่งเป็นถ่านชีวภาพ พบว่า มีปริมาณคาร์บอนที่เสถียรเป็นหลัก (57.71 %) สำหรับคาร์บอนอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายได้พบน้อยมาก (0.71 %) แสดงให้เห็นว่าการใส่ CNSC เป็นการเพิ่มคาร์บอนที่เสถียรในดิน มีปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมทั้งหมดสูง ในขณะที่ปูนขาวและยิปซัมซึ่งเป็นแร่ พบว่า มีปริมาณแคลเซียมทั้งหมดสูงมาก สำหรับปริมาณแมกนีเซียมทั้งหมด มีปริมาณต่ำและใกล้เคียงกันในวัสดุปรับปรุงดินทุกชนิด ส่วนกำมะถันทั้งหมดพบมากที่สุด ในยิปซัม 12.87 % ปริมาณธาตุอาหารในรูปที่เป็นประโยชน์ พบว่า มีสัดส่วนเป็นไปตามปริมาณธาตุอาหารที่วิเคราะห์ได้ในรูปของปริมาณธาตุอาหารทั้งหมด โดยฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โพแทสเซียมและแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ของ CNSC พบมากที่สุด ในขณะที่ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ของปูนขาวและยิปซัมมากกว่า CNSC ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวก หรือค่า CEC พบว่า CNSC มีค่ามากที่สุดรองลงมาคือ ปูนขาวและยิปซัม ตามลำดับ (Table 2) เนื่องจากเปลือกมะม่วงหิมพานต์มีคาร์โบไฮเดรต และฟีนอลเป็นองค์ประกอบเมื่อเผาเป็นถ่านชีวภาพแล้วทำให้กลายเป็นหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลและคาร์บอกซิลจำนวนมากที่ทำให้ถ่านชีวภาพมีค่า CEC สูง (Kookana et al., 2011) จากการพิจารณา

สมบัติทางเคมี สามารถกล่าวโดยสรุปได้ว่า CNSC เป็นถ่านชีวภาพที่มีฤทธิ์เป็นด่าง มีคาร์บอนในรูปที่เสถียร มีปริมาณธาตุอาหารหลักโดยเฉพาะอย่างยิ่งโพแทสเซียมสูง และมีปริมาณธาตุอาหารในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ได้แก่ ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์โพแทสเซียมและแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้สูงกว่าปูนขาวและยิปซัม

การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างและการนำไฟฟ้าของดินภายหลังการใส่สารปรับปรุงดิน

การใส่สารปรับปรุงดินทุกชนิดมีผลทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมตลอดช่วงที่ทำการศึกษ เมื่อพิจารณาค่า pH ที่เกิดจากการใส่วัสดุทั้ง 3 ชนิดในอัตราเดียวกัน ในระยะเวลา 3 วันหลังจากใส่ จะเห็นว่าการใส่ปูนขาวอัตรา LR มีประสิทธิภาพทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้นและแตกต่างจากการใส่ยิปซัมและ CNSC อัตรา LR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในช่วง 7 และ 14 วัน เป็นช่วงที่ค่า pH เพิ่มขึ้นในทุกกรรมวิธี แต่พบว่า การใส่ยิปซัมและ CNSC อัตรา LR กลับไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม และในช่วง 30 และ 60 วันหลังจากใส่ พบว่า

ค่า pH ของการใส่ CNSC อัตรา 10 LR ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใส่ปูนขาว อัตรา LR การใส่ปูนขาวในอัตรา 10 LR และ 50 LR รวมถึงยิปซัมและ CNSC อัตรา 50 LR ทำให้ค่า pH เปลี่ยนแปลงในช่วง 6.16 - 8.42 (Table 3)

ค่าการนำไฟฟ้า (EC) จากการใส่ปูนขาว และ CNSC ทุกอัตราส่วนใหญ่ ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมตลอดช่วงที่ทำการทดลองและให้ค่า EC ต่ำกว่า 0.2 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร (Table 3) การใส่ยิปซัมทำให้ค่า EC เพิ่มขึ้นตามอัตราที่ใส่ทุกอัตรา โดยเฉพาะอัตรา 10 LR และ 50 LR ทำให้ค่า EC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่น และอยู่ในช่วง 1.02 - 1.73 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร จะเห็นว่าการใช้ CNSC ทุกอัตราไม่ทำให้เกิดไอออนอิสระในดินมากเกินไปจนส่งผลให้เกิดดินเค็มหรือมีผลกระทบต่อพืช ในขณะที่ยิปซัมทำให้ค่า EC สูงขึ้นได้ตามอัตราที่ใช้และอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดได้ เนื่องจากมีปริมาณแคลเซียมและกำมะถันที่สูงแต่มีธาตุอื่น ๆ ในปริมาณน้อย (Table 1)

Table 2. Characteristic of lime, FGD gypsum and cashew nut shell char used in the experiment

Parameter	Slaked lime	FGD gypsum	CNSC
pH	13.2	12.4	10.3
Calcium carbonate equivalent (CCE, %)	135	114	113
Total C (dry combustion, %)	ND	ND	57.71
Organic C (wet combustion, %)	ND	ND	0.71
Total P (%)	0.01	0.01	0.50
Total K (%)	0.11	0.10	3.24
Total Ca (%)	64.16	21.57	0.57
Total Mg (%)	0.570	0.004	0.040
Total S (%)	ND	12.87	0.14
Available P (mg/kg)	66	56	576
Exchangeable K (mg/kg)	229	434	8,679
Exchangeable Ca (mg/kg)	19,182	26,680	1,387
Exchangeable Mg (mg/kg)	253	640	1,063
Cation exchange capacity (cmol/kg)	16.65	10.90	33.53

ND = Not detected

Table 3. Changing of soil pH and soil electrical conductivity after application of lime, FGD gypsum and CNSC at different rates

Treatment	pH					EC (mS/cm)				
	3 DAA [#]	7 DAA	14 DAA	30 DAA	60 DAA	3 DAA	7 DAA	14 DAA	30 DAA	60 DAA
1. Control	5.00 ^e	4.86 ^{fg}	5.27 ^f	4.41 ^f	4.69 ^e	0.05 ^c	0.09 ^{def}	0.08 ^f	0.16 ^d	0.16 ^d
2. Lime LR	5.79 ^c	5.74 ^{de}	6.02 ^d	5.69 ^d	6.04 ^c	0.05 ^c	0.06 ^{ef}	0.13 ^e	0.17 ^d	0.16 ^d
3. Gypsum LR	4.75 ^f	4.77 ^g	5.25 ^f	4.85 ^e	5.41 ^d	0.28 ^c	0.31 ^c	0.34 ^c	0.41 ^c	0.35 ^c
4. CNSC LR	5.05 ^e	5.11 ^{fg}	5.39 ^f	4.96 ^e	5.21 ^d	0.23 ^c	0.07 ^{ef}	0.10 ^f	0.18 ^d	0.14 ^d
5. Lime 10LR	7.74 ^a	7.32 ^b	7.98 ^b	7.98 ^a	7.76 ^a	0.93 ^c	0.13 ^{de}	0.19 ^d	0.22 ^d	0.20 ^d
6. Gypsum 10LR	4.95 ^{ef}	5.01 ^{fg}	5.42 ^f	5.05 ^e	5.33 ^d	1.02 ^b	1.03 ^b	1.14 ^b	1.25 ^b	1.08 ^b
7. CNSC 10LR	5.30 ^d	5.37 ^{ef}	5.75 ^e	5.48 ^d	5.68 ^{cd}	0.05 ^c	0.05 ^f	0.08 ^f	0.16 ^d	0.15 ^d
8. Lime 50LR	7.94 ^a	7.87 ^a	8.42 ^a	8.16 ^a	8.14 ^a	0.11 ^c	0.15 ^d	0.19 ^d	0.24 ^d	0.22 ^d
9. Gypsum 50LR	6.16 ^b	6.24 ^{cd}	6.94 ^c	6.88 ^c	7.08 ^b	1.63 ^a	1.49 ^a	1.60 ^a	1.73 ^a	1.53 ^a
10. CNSC 50LR	6.31 ^b	6.46 ^c	7.10 ^c	7.22 ^b	7.27 ^b	0.07 ^c	0.09 ^{def}	0.12 ^e	0.19 ^d	0.13 ^d
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

Means within the same column followed by different letters showed significantly different between treatments by Tukey's HSD test

** = Significantly different at $P < 0.01$, [#] = Days after application

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าการกำหนดอัตราการใช้วัสดุปรับปรุงดินที่จำแนกเป็นวัสดุปูนสามารถพิจารณาได้จากค่า LR อย่างไรก็ตาม การใส่ CNSC เพื่อทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้นจนอยู่ในระดับใกล้เคียงกับการใส่วัสดุปูน ยังต้องใส่ในอัตราที่มากกว่า ดังจะเห็นได้จากกรณีที่ใช้ CNSC ในอัตรา 10 LR แสดงให้เห็นว่า ไม่สามารถใช้ค่า CCE ของ CNSC ในการกำหนดอัตราการใช้ CNSC ได้ เนื่องจากความสามารถในการปรับค่า pH ของถ่านชีวภาพมีความจำเพาะกับชนิดของวัตถุดิบที่นำมาเผาเป็นถ่านชีวภาพและชนิดของดิน ความสามารถในการเพิ่มค่า pH ขึ้นอยู่ปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปริมาณธาตุที่เป็นด่าง (basic cations) ที่เป็นองค์ประกอบของถ่านชีวภาพ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม และ โซเดียม (Novotny *et al.*, 2015) ในกรณีของ CNSC จะเห็นได้ชัดเจนว่าโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบหลักที่ทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้น โดย CNSC ยังมีบทบาทเช่นเดียวกับบทบาทของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ของวัสดุปูน คือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์แทนที่ด้วยไฮโดรเจนไฮดรอกไซด์และอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ในรูปที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable form) ที่ดูดซับ

อยู่บนผิวของอนุภาคดิน กล่าวคือทำให้ปริมาณกรดที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable acidity) ในดินลดลง (Chintala *et al.*, 2014) นอกจากนี้ CNSC ยังมีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลที่ช่วยดูดซับโปรตอนในสารละลายดินหรือเกิดปฏิกิริยาการใช้โปรตอน (proton consumption reaction) ส่งผลให้ความเข้มข้นของโปรตอนในสารละลายดินลดลงจนทำให้ความเป็นกรดของดินลดลง (Chintala *et al.*, 2014; Kookana *et al.*, 2011)

สำหรับยิปซัม ซึ่งจัดเป็นแร่เกลือซัลเฟตและเมื่อใส่ลงไปในดินจะแตกตัวอย่างสมบูรณ์ไม่ทำให้ pH เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้วัสดุปูนในอัตราเดียวกัน แม้ยิปซัมจะมีปริมาณแคลเซียมที่ละลายได้มากกว่าวัสดุชนิดอื่น แต่ในงานวิจัยนี้สันนิษฐานได้ว่า ยิปซัมมีคุณสมบัติในการเป็นวัสดุปรับปรุงดินกรดในลักษณะของการเข้าไปทำปฏิกิริยากับเหล็กและอลูมิเนียมในดินเช่นเดียวกับปูนขาว แต่ประสิทธิภาพยังไม่เท่ากับการใช้ปูนขาว การเปลี่ยนแปลงค่า pH เพียงเล็กน้อยภายหลังจากการใส่ยิปซัม สอดคล้องกับการศึกษาของ Kaweewong *et al.* (2018) ที่พบว่า

ค่า pH เพิ่มขึ้นเพียง 0.1 หน่วยจากการใส่ยิปซัมอัตรา 2 ตันต่อไร่ Siriwal (2011) อธิบายกลไกการเพิ่มค่า pH ของยิปซัมจากการที่ยิปซัมทำปฏิกิริยากับเหล็ก และอลูมิเนียมในดินเป็นหลัก โดยการที่แคลเซียมเข้าไปแทนที่อลูมิเนียมในดิน จากนั้นอลูมิเนียมจึงไปจับกับซัลเฟต เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของอะลูมิเนียมไฮดรอกซีซัลเฟต (AlOHSO_4) หรืออะลูมิเนียมซัลเฟตแคตไอออน (AlSO_4^+ complex ion) หรือจากการที่หมู่ซัลเฟต (SO_4^{2-}) ที่แตกตัวจากยิปซัมเข้าไปแทนที่หมู่ไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) ในดินแล้ว ไฮดรอกไซด์ถูกปลดปล่อยออกมาเป็นอิสระในดินและรวมตัวกับไฮโดรเจนไอออน (H^+) เกิดเป็นน้ำ

ปริมาณธาตุอาหารพืชภายหลังการใส่สารปรับปรุงดิน

ภายหลังการใส่สารปรับปรุงดิน พบว่าปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมในทุกช่วงเวลาภายหลังการใส่ (Table 4) แต่การใส่ปูนขาวอัตรา 10 LR และ 50 LR พบว่า มีปริมาณฟอสฟอรัสไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม การเปลี่ยนแปลงค่า pH มีผลต่อรูปของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ เช่น กรณีที่ดินมีค่า pH

ต่ำกว่า 6 ฟอสฟอรัสมักอยู่ในรูป H_2PO_4^- แต่เมื่อค่า pH สูงกว่า 6 ฟอสฟอรัสจะเปลี่ยนรูปเป็น HPO_4^{2-} การเปลี่ยนรูปดังกล่าว ทำให้แรงดูดยึดฟอสฟอรัสกับเหล็กออกไซด์ลดลง ทำให้พืชดูดไปใช้ได้ง่ายขึ้น (Ruksabo *et al.*, 2018) อย่างไรก็ตามหากค่า pH สูงเกินไป ฟอสฟอรัสจะถูกตรึงโดยแคลเซียมไอออน เกิดเป็นแคลเซียมฟอสเฟตหรือเกิดสภาวะเกินปูน (over liming) ภายหลังจากการใส่สารปรับปรุงดิน จะเห็นได้ว่าฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นตามอัตราการใส่ยิปซัมและ CNSC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม อันเป็นผลมาจากค่า pH เพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่เหมาะสมต่อการละลายของธาตุฟอสฟอรัสที่มีอยู่เดิมในดินและปลดปล่อยออกมา การใส่ยิปซัมทุกอัตราและการใส่ CNSC อัตรา 10 LR และ 50 LR ทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นตลอดช่วงที่ทำการทดลอง การใส่ปูนขาวกลับทำให้ค่าฟอสฟอรัสต่ำลงอย่างชัดเจนอันเกิดจากสภาวะเกินปูน จึงสรุปได้ว่าการใส่ยิปซัมทุกอัตราและ CNSC ที่อัตรา 10 LR และ 50 LR ไม่เกิดผลกระทบต่อความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดิน แต่ทำให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่พืชดูดใช้ได้มากขึ้น

Table 4. Changing of available phosphorus and exchangeable potassium after application of lime, FGD gypsum and CNSC at different rates

Treatment	Available P (mg/kg)					Exchangeable K (mg/kg)				
	3 DAA [#]	7 DAA	14 DAA	30 DAA	60 DAA	3 DAA	7 DAA	14 DAA	30 DAA	60 DAA
1. Control	255 ^{de}	285 ^d	289 ^{de}	270 ^{ef}	319 ^d	325 ^c	262 ^c	108 ^c	193 ^c	173 ^c
2. Lime LR	244 ^{de}	288 ^d	269 ^{de}	283 ^{def}	348 ^{cd}	264 ^c	274 ^{bc}	129 ^c	199 ^c	206 ^{bc}
3. Gypsum LR	356 ^{bc}	344 ^{bcd}	448 ^{bcd}	323 ^{cde}	418 ^{bcd}	356 ^c	276 ^b	171 ^c	188 ^c	159 ^c
4. CNSC LR	306 ^{bcd}	322 ^{cd}	343 ^{cde}	325 ^{cde}	326 ^d	182 ^c	159 ^d	200 ^c	185 ^c	279 ^{bc}
5. Lime 10LR	266 ^{cde}	288 ^d	309 ^{cde}	271 ^{ef}	373 ^{cd}	234 ^c	248 ^{bcd}	126 ^c	229 ^{bc}	250 ^{bc}
6. Gypsum 10LR	364 ^b	421 ^{ab}	473 ^{bc}	387 ^{abc}	512 ^b	215 ^c	182 ^{cd}	183 ^c	182 ^c	305 ^{bc}
7. CNSC 10LR	313 ^{bcd}	374 ^{bc}	423 ^{bcd}	360 ^{bcd}	370 ^{cd}	273 ^c	223 ^{bcd}	307 ^{bc}	327 ^b	481 ^b
8. Lime 50LR	179 ^e	195 ^e	218 ^e	210 ^f	304 ^d	247 ^c	260 ^{bc}	109 ^c	151 ^c	145 ^c
9. Gypsum 50LR	466 ^a	464 ^a	553 ^{ab}	458 ^a	665 ^a	1,220 ^a	438 ^a	1,354 ^a	699 ^a	253 ^{bc}
10. CNSC 50LR	371 ^b	492 ^a	684 ^a	418 ^{ab}	476 ^{bc}	675 ^b	503 ^a	761 ^b	729 ^a	1,317 ^a
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

Means within the same column followed by different letters showed significantly different between treatments by Tukey's HSD test

** = Significantly different at $P < 0.01$, [#] = Days after application

ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้มีความแตกต่างกันจากการใส่วัสดุปรับปรุงดินแต่ละชนิด ส่วนใหญ่ การใส่ยิปซัมและ CNSC โดยเฉพาะในอัตรา 50 LR ทำให้ค่าโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้มีค่าสูงกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกช่วงเวลาทำการทดลอง (Table 4) เช่น การใส่ยิปซัมจะทำให้ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้เพิ่มขึ้นเป็น 1,220 และ 1,354 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในช่วง 3 และ 14 วันหลังจากใส่และลดลงหลังจากนั้น ในขณะที่การใส่ CNSC ทำให้ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้เพิ่มขึ้นเป็น 1,317 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในช่วง 60 วันหลังจากใส่ สำหรับการใส่ปูนขาว ยิปซัม และ CNSC ในอัตราอื่น ๆ ไม่ทำให้ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดช่วงทำการศึกษ ส่วนใหญ่ต่ำกว่า 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Table 4)

ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามอัตราการใช้ปูนขาวและยิปซัมและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีควบคุมตลอดช่วงทำการทดลอง (Table 5) โดยเฉพาะการใส่ยิปซัมในอัตรา

50 LR มีปริมาณมากกว่า 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รองลงมาคือการใส่ปูนขาวในอัตรา 50 LR, ยิปซัมและปูนขาวอัตรา 10 LR ตามลำดับ และการใส่ยิปซัมอัตรา 10 LR ทำให้ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ต่ำกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การเพิ่มอัตรา CNSC ไม่มีผลทำให้ปริมาณแคลเซียมเพิ่มขึ้น และการใส่ CNSC อัตรา 50 LR ไม่ทำให้ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม (Table 5)

จะเห็นได้ว่า การใส่ CNSC ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน สอดคล้องกับปริมาณแคลเซียมทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ใน CNSC ที่มีเพียง 0.57 % (Table 2) แต่การใส่ยิปซัมสามารถเพิ่มปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ และส่งผลโดยตรงต่อค่า EC แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมแม้จะไปทำปฏิกิริยาบางส่วนกับเหล็กและอะลูมิเนียมในดินแล้วยังมีส่วนของแคลเซียมที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาเป็นไอออนที่อยู่อย่างอิสระในสารละลายดิน การที่มีแคลเซียมไอออนละลายอยู่ในดินมากเกินไปอาจส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตของพืช เช่น เกิดภาวะดื้อใช้ธาตุอาหารแบบปฏิปักษ์ (antagonism) ระหว่างแคลเซียมกับ

Table 5. Changing of exchangeable calcium and magnesium after application of lime, FGD gypsum and CNSC at different rates

Treatment	Exchangeable Ca (mg / kg)					Exchangeable Mg (mg / kg)				
	3 DAA [#]	7 DAA	14 DAA	30 DAA	60 DAA	3 DAA	7 DAA	14 DAA	30 DAA	60 DAA
1. Control	949 ^{cd}	676 ^d	588 ^c	1,175 ^c	817 ^d	233 ^b	241 ^b	202 ^{bc}	215 ^c	200 ^c
2. Lime LR	1,312 ^{cd}	1,088 ^d	797 ^c	1,115 ^c	1,254 ^{cd}	218 ^{bc}	238 ^b	199 ^{bc}	214 ^c	216 ^c
3. Gypsum LR	1,308 ^{cd}	1,022 ^d	1,027 ^c	1,168 ^c	1,389 ^{cd}	224 ^b	234 ^b	201 ^{bc}	209 ^{cd}	235 ^c
4. CNSC LR	878 ^{cd}	711 ^d	655 ^c	822 ^c	1,005 ^d	220 ^{bc}	238 ^b	216 ^{bc}	218 ^{bc}	1,156 ^b
5. Lime 10LR	2,822 ^{bc}	3,004 ^c	2,398 ^b	2,811 ^b	2,732 ^{bc}	166 ^d	190 ^c	147 ^c	157 ^e	172 ^c
6. Gypsum 10LR	3,476 ^b	3,554 ^{bc}	3,081 ^b	3,592 ^b	3,700 ^b	173 ^{cd}	201 ^c	165 ^{bc}	197 ^{de}	169 ^c
7. CNSC 10LR	880 ^{cd}	717 ^d	606 ^c	840 ^c	1,149 ^{cd}	225 ^b	231 ^b	149 ^c	236 ^{bc}	1,277 ^b
8. Lime 50LR	3,898 ^b	4,004 ^b	3,695 ^b	3,883 ^b	3,929 ^b	143 ^d	181 ^c	120 ^c	131 ^e	169 ^c
9. Gypsum 50LR	19,920 ^a	21,010 ^a	19,367 ^a	22,100 ^a	15,757 ^a	619 ^a	378 ^a	436 ^a	475 ^a	1,105 ^b
10. CNSC 50LR	816 ^d	660 ^d	593 ^c	719 ^c	1,040 ^{cd}	265 ^b	259 ^b	270 ^b	260 ^b	3,240 ^a
F - test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

Means within the same column followed by different letters showed significantly different between treatments by Tukey's HSD test

** = Significantly different at $P < 0.01$, [#] = Days after application

โพแทสเซียม แมกนีเซียม เหล็ก แมงกานีส และโบรอน ในดิน อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาก็เห็นได้ว่า ยิปซัม เป็นแหล่งแคลเซียมที่สำคัญ ละลายน้ำได้ดี แคลเซียมสามารถเคลื่อนที่ในดินได้ดี และไปทำปฏิกิริยากับอะลูมิเนียม จึงช่วยลดพิษของอะลูมิเนียมที่มีต่อการเจริญเติบโตของรากพืชได้ นิยมใช้ยิปซัมในการปรับสมดุลธาตุโซเดียมในดินเค็ม (Wang *et al.*, 2017; Watt and Dick, 2014) เนื่องจากยิปซัมมีแคลเซียมและกำมะถันเป็นองค์ประกอบหลัก จากการศึกษาปริมาณธาตุอาหารที่สะสมในใบทุเรียนและลองกองที่ปลูกในระบบวนเกษตร ของจังหวัดอุดรธานี พบว่าส่วนใหญ่ธาตุอาหารแคลเซียมอย่างชัดเจน และมีปริมาณกำมะถันในดินค่อนข้างต่ำ (Sangmanee *et al.*, 2011, 2018) และแคลเซียมเป็นธาตุอาหารที่เคลื่อนที่ไม่ได้ในพืช ดังนั้น วิธีการที่ได้ผลดีที่สุดคือการใส่ทางดินมากกว่าการฉีดพ่นทางใบ แต่ข้อควรระวังระวังในการใช้ยิปซัมปรับปรุงดิน คือ เป็นสารที่ให้แคลเซียมอย่างเดียว แต่ไม่ปรับค่า pH ดังนั้น จึงควรมีการใช้วัสดุปูนที่มีความสามารถในการปรับค่า pH ก่อนจากนั้นจึงใช้ยิปซัมในปริมาณที่เหมาะสมในช่วงที่พืชต้องการแคลเซียมในปริมาณมาก เช่น ช่วงที่ทุเรียนเริ่มออกดอกซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่ทุเรียนแตกรากอ่อนที่จะสามารถดูดซึมธาตุอาหารในดินได้มากจนถึงช่วงการสร้างผลผลิต

ปริมาณ แมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้มีความแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาหลังจากใส่วัสดุปรับปรุงดิน ในช่วงภายหลังจากใส่ 30 วันแรกการใส่ยิปซัม 50LR ทำให้ปริมาณแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้แตกต่างจากกรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และส่วนใหญ่ต่ำกว่า 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Table 4) แต่ที่ระยะ 60 วัน พบว่า แมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรรมวิธีที่ใส่ CNSC อัตรา 50LR พบแมกนีเซียมเพิ่มขึ้นเป็น 3,240 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคือ CNSC อัตรา 10LR และ LR ซึ่งมีปริมาณไม่แตกต่างจากการใส่ยิปซัมอัตรา 50LR และอยู่ในช่วง 1,105 - 1,277 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่กรรมวิธีอื่นมีปริมาณต่ำลงไปอยู่ในช่วงไม่เกิน 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Table 5)

การเพิ่มขึ้นของปริมาณแมกนีเซียมที่เพิ่มขึ้นตามเวลาอาจเป็นผลมาจากปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนกันระหว่างแคลเซียม โพแทสเซียม กับแมกนีเซียมในดิน (Table 5)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุปรับปรุงดินทั้งสามชนิดจะเห็นว่า CNSC เป็นถ่านชีวภาพที่มีฤทธิ์เป็นด่างจัด สามารถใช้เป็นวัสดุปรับปรุงดินกรดเป็นวัสดุที่ช่วยเพิ่มปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ให้แก่ดิน ทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้นได้หากใช้ในอัตรา 10 LR หรือ 11 ตันต่อไร่ จากข้อมูลปริมาณของเศษเหลือของเปลือกเมล็ดในแต่ละปีมีประมาณ 2,880 - 3,120 ตัน (Klaichom *et al.*, 2017) เมื่อนำมาเผาเป็นถ่านชีวภาพ CNSC จะได้ 1,008 - 1,092 ตัน หากนำไปใช้เพื่อปรับปรุงดินกรดในอัตรา 11 ตันต่อไร่ จะใช้ปรับปรุงพื้นที่เพาะปลูกพืชที่มีสภาพเป็นดินกรดเพียง 91 - 99 ไร่ ซึ่งถือว่าใช้ได้กับพื้นที่เพาะปลูกไม่มาก อย่างไรก็ตาม จากคุณสมบัติของถ่านชีวภาพที่มีความพูนสูงและน้ำหนักเบา จึงควรนำมาพัฒนาเป็นสารปรับปรุงดินกรดร่วมกับวัสดุปูน นอกจากนี้ ควรมีการทดสอบต่อถึงผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นกรณีที่น่า CNSC ไปใช้กับดินที่ปลูกพืชหลากหลายชนิด เนื่องจาก CNSC ยังมีน้ำมันที่หลงเหลือจากการเผา ซึ่งอาจมีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช หรือมีกลิ่นที่ช่วยไล่ศัตรูพืชในดิน

สรุป

ถ่านชีวภาพจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ (cashew nut shell char, CNSC) ที่ได้จากการเผาด้วยสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ พบว่า มีคุณสมบัติเป็นด่างจัดโดยมีค่า pH 10.3 มีคาร์บอนที่เสถียรเป็นองค์ประกอบหลัก 57.71 % และมีโพแทสเซียมเป็นธาตุอาหารที่พบมากที่สุดคือ 3.24 % การศึกษาอัตราการใช้ CNSC ในชุดดินปักษ์งชัย เพื่อการเพิ่ม pH ของดินให้เทียบเท่ากับค่า LR ต้องใช้ CNSC อัตรา 10 เท่าของ LR ทั้งนี้การเพิ่มค่า pH อาจเป็นผลจากบทบาทของโพแทสเซียมที่เป็นองค์ประกอบของ CNSC การใส่ CNSC ไม่ทำให้ค่า EC เพิ่มขึ้นตามอัตราที่ใช้ การเพิ่มขึ้นของค่า pH ส่งผลให้การตรึงฟอสฟอรัส

ในดินลดลง ทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้จากการที่ CNSC มีโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบปริมาณสูงทำให้มีโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2560 จากสำนักงานวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ ขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ ที่สนับสนุนพื้นที่ทำวิจัย และนายวัฒนา บุ่งตั้ง นายบริพัฒน์ พุ่มพวง นักศึกษาผู้ช่วยวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Andonaba, J.-B., S.S. Lompo, V. Ouédraogo, F. Ouédraogo, M.S. Ouédraogo, I. Konaté, B. Diallo and A. Traoré. 2017. Skin damage and aesthetic disadvantage observed in women in the hand craft shelling chain of cashew nuts in a factory to Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 7: 211-220.
- Chintala, R., J. Mollinedo, T.E. Schumacher, D.D. Malo and J.L. Julson. 2014. Effect of biochar on chemical properties of acidic soil. *Archives of Agronomy and Soil Science* 60(3): 393-404.
- Erich, M.S. and T. Ohno. 1992. Titrimetric determination of calcium carbonate equivalence of wood ash. *Analyst* 117(6): 993-995.
- Kaweewong, J. 2018. Using flue gas desulfurization (FGD) gypsum, by-product of coal-fired power plants in agriculture. *King Mongkut's Agricultural Journal* 36(1): 161-172. (in Thai)
- Kaweewong, J., J. Meesumlee and K. Sompuk. 2018. Effects of flue gas desulfurization gypsum on selected soil properties and rice growth cv. Sanpatong 1. *The Golden Teak: Science and Technology Journal* 5(2): 23-35. (in Thai)
- Klaichom, P., G. Intuwong and P. Nathiang. 2017. Participatory technology transfer of CNSL oil extraction for adding value to wasted cashew nut shell from food processing. pp. 271-279. *In: Proceedings of Thailand Research Symposium, Bangkok.* (in Thai)
- Kookana, R.S., A.K. Sarmah, L. van Zwieten, E. Krull and B. Singh. 2011. Biochar application to soil: agronomic and environmental benefits and unintended consequences. *Advances in Agronomy* 112: 103-143.
- Leksungsoen, P., W. Wisawapipat and D. Ketrot. 2017. Impacts of rice husk biochar on solubility of micronutrients and rice growth cultivated in a calcareous soil. *Songklanakarin Journal of Plant Science* 4(3): 65-74. (in Thai)
- Manaonok, J., S. Gonkhamdee, K. Dejbhimon, W.K. Polpinit and D. Jothiyangkoon. 2017. Biochar: its effect on soil properties and growth of wet-direct seeded rice (a pot trial). *Khon Kaen Agriculture Journal* 45(2): 209-220. (in Thai)
- Novotny, E.H., C.M.B. de Freitas Maia, M.T. de Melo Carvalho and B.E. Madari. 2015. Biochar: Pyrogenic carbon for agricultural use - A critical review. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 39(2): 321-344.
- Pearaksa, P. and S. Saeng-ngam. 2018. Effect of biochar application on growth and efficiency of photosynthesis of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Super Hot) under acid soil. *Khon Kaen Agriculture Journal* 46(Suppl. 1): 338-343. (in Thai)

- Raksabo, T., W. Wisawapipat, S. Aramrak and N. Chittamart. 2018. Effects of rice husk ash and biochar on phosphorus fractions in an acid sulfate paddy soil and rice growth. *Songklanakarin Journal of Plant Science* 5(4): 85-99.
- Sangmanee, P., A. Bhromsiri and H. Tamura. 2011. Plant nutrient status of soil in durian and longkong orchards under agroforestry system in Uttaradit province. *Journal of Agriculture* 27(2): 197-208. (in Thai)
- Sangmanee, P., V. Somniyam and P. Chaikla. 2018. Development of plant analysis procedure to assist plant nutrition management for durian. Final report. The Thailand Research Fund, Bangkok. 86 p. (in Thai)
- Siriwal, N. 2011. Improving soil quality with gypsum for agricultural sustainability. Rajamangala University of Technology Phra Nakhon Research Journal 5(1): 118-126.
- Suwanwong, S. 2001. Method of Plant Analysis. Kasetsart University Press, Bangkok. 141 p. (in Thai)
- Therajindakajorn, P. 2009. Handbook of Soil Chemical Analysis. Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen. 169 p. (in Thai)
- Uttaradit Provincial Agriculture and Cooperatives Office. 2019. Agricultural data of Uttaradit province. (Online). Available: <https://www.opsmoac.go.th/uttaradit-home> (December 10, 2019). (in Thai)
- Walkley, A. and I.A. Black. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37(1): 29 - 38.
- Wang, S.J., Q. Chen, Y. Li, Y.Q. Zhuo and L.Z. Xu. 2017. Research on saline-alkali soil amelioration with FGD gypsum. *Resources, Conservation and Recycling* 121: 82-92.
- Watts, D.B. and W.A. Dick. 2014. Sustainable uses of FGD gypsum in agricultural systems: introduction. *Journal of Environmental Quality* 43(1): 246-252.
-

ผลของการจัดการน้ำและการพ่นสังกะสีทางใบต่อผลผลิตและ การสะสมธาตุอาหารในเมล็ดข้าวเหนียว 5 พันธุ์

Effects of Water Management and Zinc Foliar Fertilizer on Grain Yield and Nutrient Accumulation of Five Glutinous Rice Varieties

จินตนา สงค์ศรีอินทร์¹ สุชาดา จำรัส¹ สุภาภรณ์ ญะเมืองมอญ¹ จีราภรณ์ วีระดิษฐกิจ¹
สิทธิเสวต ลอดแก้ว² และ ชนกานต์ เทโบลต์ พรหมอุทัย^{1*}

Jintana Songsriin¹, Suchada Jumrus¹, Supapohn Yamuangmorn¹, Jeeraporn Veeradittakit¹,
Sithisavet Lordkaew² and Chanakan Thebault Prom-u-thai^{1*}

¹สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹Division of Agronomy, Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ศูนย์วิจัยระบบทรัพยากรเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

²Center for Agricultural Resource System Research, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: chanakan.p@cmu.ac.th; chanakan15@hotmail.com

(Received: 8 April 2020; Accepted: 30 November 2020)

Abstract: Grain yield and quality can be improved by agronomical managements such as water and fertilizer. The objective of this study was to evaluate the responses of grain yield and zinc (Zn) and nitrogen (N) concentrations on water management and foliar Zn application among five glutinous rice varieties. The experiment was arranged in factorial in RCBD with two replications. Five glutinous rice varieties (RD4, RD6, RD10, RD14 and SPT1) were grown under waterlogged and non-flooded soils with and without applying of foliar Zn fertilizer. The results showed that rice grown under well-drained soil had reduced grain yield and individual grain weight by averaged about 34 % and 7 %, respectively. Similarly, the lower straw dry weight and number of filled grain was found in rice grown under the non - flooded soil. Applying foliar Zn increased grain Zn concentration by 43 - 92 % which was found in all rice varieties. Grain N concentration of rice applied with foliar Zn also increased by 9 - 12 % in RD4, RD6 and RD14, but the statistical difference was not found in RD10 and SPT1 varieties. This experiment indicated that growing glutinous rice under the non - flooded soil resulted in the reduction of grain yield. In the meantime, foliar Zn application could improve the number of filled grains and an individual grain weight as well as effectively increased grain Zn and N concentrations. The different response among glutinous rice varieties on water management and Zn fertilizer application would be useful information to manage the appropriated environmental condition for rice growing to improve grain yield and quality.

Keywords: Glutinous rice, grain nutrient, foliar zinc fertilizer, water management

บทคัดย่อ: ผลผลิตเชิงปริมาณและคุณภาพของข้าวสามารถควบคุมได้โดยการจัดการปัจจัยการผลิตให้มีความเหมาะสม เช่น น้ำและธาตุอาหาร การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการตอบสนองของผลผลิตและการสะสมธาตุสังกะสีและไนโตรเจนต่อการจัดการน้ำและการพ่นสังกะสีในข้าวเหนียวพันธุ์ต่าง ๆ วางแผนการทดลองแบบ factorial in RCBD โดยปลูกข้าวเหนียว 5 พันธุ์ (กข4, กข6, กข10, กข14 และสันป่าตอง 1) ภายใต้สภาพน้ำขังและไม่ขังน้ำ ร่วมกับการจัดการปุ๋ยสังกะสี 2 แบบ คือ พ่นและไม่พ่นสังกะสี ผลการทดลองพบว่า ข้าวที่ปลูกภายใต้สภาพไม่ขังน้ำมีผลผลิตเมล็ดและน้ำหนักเมล็ดต่ำกว่าข้าวที่ปลูกภายใต้สภาพน้ำขังโดยเฉลี่ยเท่ากับ 34 และ 7 % ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับน้ำหนักแห้งฟางและจำนวนเมล็ดดีที่ลดลงเมื่อปลูกในสภาพไม่ขังน้ำ แต่การตอบสนองแตกต่างกันในข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์ นอกจากนี้การพ่นสังกะสีทางใบทำให้ข้าวมีความเข้มข้นสังกะสีเพิ่มขึ้น 43-92 % ในข้าวทั้ง 5 พันธุ์ และความเข้มข้นไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 9-12 % ในพันธุ์ กข4, กข6 และ กข14 ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างในพันธุ์ กข10 และสันป่าตอง 1 การทดลองนี้บ่งชี้ว่าการปลูกข้าวเหนียวในสภาพไม่ขังน้ำส่งผลให้มีผลผลิตเมล็ดลดลง ในขณะเดียวกันการพ่นสังกะสีสามารถเพิ่มจำนวนเมล็ดดีและน้ำหนักเมล็ด รวมทั้งเพิ่มความเข้มข้นสังกะสีและไนโตรเจนในเมล็ดได้ การตอบสนองที่แตกต่างกันในข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่อการจัดการน้ำร่วมกับการพ่นสังกะสีทางใบให้เหมาะสมกับพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพเมล็ดต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวเหนียว ธาตุอาหารในเมล็ด การพ่นสังกะสีทางใบ การจัดการน้ำ

คำนำ

ข้าวเหนียว (glutinous rice) เป็นพืชอาหารหลักที่มีการเพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ โดยพบว่า ประเทศไทยมีการปลูกข้าวเหนียวคิดเป็นร้อยละ 26 ของพื้นที่เพาะปลูกข้าวทั้งหมด (OAE, 2019) นอกจากการบริโภคข้าวเหนียวภายในประเทศแล้ว การส่งออกข้าวเหนียวไปยังต่างประเทศยังมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทยอีกด้วย (TREA, 2019) แต่เนื่องจากสภาวะโลกร้อนที่เกิดขึ้นส่งผลให้เกิดความแปรปรวนของสภาวะอากาศ การจัดการน้ำที่ไม่มีประสิทธิภาพอาจส่งผลกระทบต่อ การเพาะปลูกข้าวมากขึ้นในอนาคต จากข้อมูลทางสถิติของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรคาดว่าผลผลิตข้าวนาปีและข้าวนาปรัง ปีเพาะปลูก 2562/63 ลดลงที่ร้อยละ 3.6 และ 32.4 ตามลำดับ เนื่องจากได้รับผลกระทบจากภาวะแล้ง ปริมาณฝนที่ต่ำกว่าปกติและไม่ทั่วถึง ส่งกระทบต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวและผลผลิต (BOF, 2019) เนื่องจากน้ำเป็นปัจจัยหลักในการผลิตพืชเกือบทุกชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะปลูกข้าวนาสวนซึ่งต้องมีการขังน้ำตลอดช่วงระยะการเจริญเติบโต โดยพบว่า การเปลี่ยนจากการปลูกข้าวนาสวนแบบน้ำขังเป็นแบบไม่ขังน้ำส่งผลให้ข้าว

มีผลผลิตลดลง เนื่องจากการลดลงของจำนวนเมล็ดต่อรวง (Anning *et al.*, 2018) ในขณะเดียวกันการปลูกข้าวแบบเปียกสลับแห้ง (alternate wetting and drying irrigation) ที่ระดับความขึ้นดินสูงกว่า - 20 kPa กลับไม่ส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลง แต่เมื่อปลูกข้าวแบบเปียกสลับแห้งที่ระดับความขึ้นต่ำกว่า - 20 kPa พบว่า ผลผลิตลดลง 22 % (Carrizo *et al.*, 2017) จึงเห็นได้ว่าการจัดการน้ำโดยการรักษาปริมาณน้ำหรือความชื้นในดินในระดับที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกข้าวมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการช่วยลดความเสี่ยงในการสูญเสียผลผลิต ในงานวิจัยที่มุ่งเน้นเกี่ยวกับการจัดการน้ำในการเพาะปลูกข้าวเหนียวในประเทศไทยยังมีการศึกษาไม่มากนัก การตอบสนองของปริมาณผลผลิตต่อการเปลี่ยนแปลงระบบการปลูกจากสภาพน้ำขังเป็นไม่ขังน้ำหรือน้ำแห้งในข้าวเหนียวพันธุ์ต่าง ๆ อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการตัดสินใจเลือกพันธุ์ปลูกให้เหมาะสมกับการปลูกข้าวระบบน้ำน้อยในอนาคตได้

การจัดการธาตุอาหารพืชมีความสำคัญต่อการสร้างผลผลิตและคุณภาพทางโภชนาการของข้าว เช่นเดียวกัน ธาตุสังกะสีเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์มากกว่า 100 ชนิดและมีส่วนช่วยในการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ

เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในพืช (Broadley *et al.*, 2012) การใส่ปุ๋ยสังกะสีในนาข้าวพบว่า สามารถช่วยเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์รวมถึงผลผลิตเมล็ดในข้าว (Rana and Kashif, 2014) สังกะสียังเป็นธาตุที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของมนุษย์ เนื่องจากมีส่วนเกี่ยวข้องกับเอนไซม์มากกว่า 300 ชนิดในร่างกาย ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ทำหน้าที่ในกระบวนการเผาผลาญ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมันและแอลกอฮอล์ (Coleman, 1998) ดังนั้น อาการผิดปกติของร่างกาย เช่น มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง การพัฒนาการของทารกไม่สมบูรณ์ อาจเกิดขึ้นได้หากขาดธาตุสังกะสีในร่างกาย (Gibson *et al.*, 2007) โดยร่างกายต้องการปริมาณสังกะสีที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 9-15 มิลลิกรัมต่อวัน ขึ้นอยู่กับความต้องการที่ต่างกันตามอายุและเพศ (Institute of Medicine Panel on Micronutrients, 2001) จากผลสำรวจพบว่า ปริมาณหนึ่งในสามของประชากรโลกอยู่ในภาวะเสี่ยงต่อการขาดธาตุสังกะสี โดยเฉพาะธาตุสังกะสีในข้าวซึ่งเป็นอาหารหลักของประชากรไทยและอีกหลายภูมิภาคในโลกแต่กลับพบว่า มีธาตุสังกะสีในเมล็ดในปริมาณต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับธัญพืชอื่น ๆ (Black *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2004) โดยเป้าหมายปริมาณสังกะสีที่ต้องการในข้าวคือ 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (IRRI, 2015) จากการรายงานก่อนหน้านี้ ข้าวเจ้าพันธุ์ไทยมีปริมาณสังกะสีสะสมอยู่ในช่วง 15.5 ถึง 30.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Laenoi *et al.*, 2015) แสดงให้เห็นว่าข้าวบางสายพันธุ์มีปริมาณสังกะสีสะสมอยู่ค่อนข้างต่ำ ดังนั้น การบริโภคข้าวที่มีสังกะสีสูงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยป้องกันการขาดธาตุสังกะสีในร่างกายได้ การพ่นสังกะสีทางใบเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าว (Phuphong *et al.*, 2018; Cakmak and Kutman, 2018) แต่ผลงานวิจัยนี้ยังไม่เฉพาะเจาะจงในแต่ละสภาพแปลงปลูกทั่วประเทศที่อาจแตกต่างกันโดยเฉพาะในเขตที่มีปัญหาการขาดแคลนน้ำ อีกทั้งการศึกษาการพ่นสังกะสีในพันธุ์ข้าวเหนียวไทยยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจน ดังนั้นการดำเนินงานวิจัยควรควบคู่ไปกับการวิจัยทางด้านพันธุ์ข้าว การศึกษาการตอบสนองของการใส่ปุ๋ยสังกะสีในข้าวแต่ละพันธุ์ภายใต้การจัดการน้ำ

ที่แตกต่างกันจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการตอบสนองของผลผลิตและการสะสมธาตุอาหารในเมล็ดข้าวต่อการพ่นปุ๋ยสังกะสีทางใบในเหนียวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลูกภายใต้สภาพน้ำขังและไม่ขังน้ำเพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้ไปใช้เป็นข้อมูลในการแนะนำการจัดการน้ำและการพ่นสังกะสีให้เหมาะกับพันธุ์ข้าวเพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการปรับปรุงผลผลิตและคุณภาพเมล็ดข้าวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การปลูกข้าวและการเก็บข้อมูล

งานวิจัยนี้ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล ศูนย์วิจัยสถิติและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยวางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) จำนวน 2 ซ้ำ และจัดชุดการทดลองแบบแฟคทอเรียล $5 \times 2 \times 2$ ประกอบด้วยข้าวเหนียว 5 พันธุ์ คือ กข4 (RD4), กข6 (RD6), กข10 (RD10), กข14 (RD14) และสันป่าตอง 1 (SPT1) โดยปลูกในสภาพการจัดการน้ำ 2 แบบ คือ น้ำขัง (waterlogged) และไม่ขังน้ำ (non-flooded) ร่วมกับการจัดการปุ๋ยสังกะสี 2 แบบ คือ พ่นสังกะสี (Zn+) และไม่พ่นสังกะสี (Zn-) ทำการทดลองในฤดูนาปีช่วงเดือนกรกฎาคม - พฤศจิกายน พ.ศ. 2560 เพาะเมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์ละ 20 กรัม ในถาดพลาสติกนาน 14 วัน จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 28 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร บรรจุดินแห้ง กระถางละ 15 กิโลกรัม โดยดินที่ใช้ปลูกมีลักษณะดินร่วนปนทราย มีค่าปฏิกิริยาดินเป็นกรดปานกลาง เท่ากับ 5.82 (ดิน : น้ำ, 1 : 1) ปริมาณอินทรีย์วัตถุร้อยละ 1.38 ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 35.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 39.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (NH_4OAc , pH 7) และสังกะสีที่เป็นประโยชน์ต่อพืช 0.73 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Zn available, DTPA) ปลูกแบบต้นเดี่ยวกระถางละ 5 ต้น โดยมีการจัดการน้ำที่ต่างกัน คือ สภาพน้ำขัง (waterlogged) โดยทำการขังน้ำประมาณ 10 เซนติเมตร เหนือระดับผิวดินตลอด

การปลูก และสภาพน้ำไม่ขัง (non - flooded) โดยรักษา ระดับความชื้นในดินให้อยู่ในช่วง 18-20 % ด้วยเครื่องวัด ความชื้นดิน (HH2 Moisture Meter, Delta - T - Devices Cambridge - England) โดยให้น้ำวันละ 2 ครั้ง เข้าและ เย็น (ครั้งละประมาณ 3 ลิตร) โดยไม่มีน้ำท่วมขังเหนือ ระดับผิวดิน ใส่ปุ๋ยเคมีเกรด 15-15-15 ในอัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ หรือ 11.9 กรัมต่อกระถาง แบ่งใส่จำนวน 4 ครั้ง ในอัตราที่เท่ากันในระยะหลังปลูกข้าว 2 สัปดาห์ ระยะข้าวแตกกอ ระยะข้าวตั้งท้องและระยะออกดอก ฟันปุ๋ยสังกะสีทางใบที่ระดับความเข้มข้น 0.5 % $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในอัตรา 130 ลิตรต่อไร่ ฟันจำนวน 3 ครั้ง ในระยะแทงรวง ระยะออกดอกและระยะน้ำนม เก็บเกี่ยวผลผลิตเมล็ดและองค์ประกอบผลผลิตที่ ระยะสุกแก่ บันทึกน้ำหนักผลผลิตที่ความชื้นเมล็ด 14 % จากนั้นนำเมล็ดไปกะเทาะเปลือกให้ได้ข้าวกล้องเพื่อนำไปวิเคราะห์ธาตุอาหารต่อไป ส่วนของผลผลิตฟาง นำไปอบลดความชื้นที่อุณหภูมิ 75 °C นาน 72 ชั่วโมง แล้วชั่งพร้อมบันทึกน้ำหนักแห้งฟาง บันทึกข้อมูล องค์ประกอบผลผลิต ได้แก่ ความสูงต้น ความยาวรวง จำนวนหน่อต่อกอ จำนวนรวงต่อต้น เปอร์เซ็นต์ เมล็ดดี และน้ำหนัก 1,000 เมล็ด

การวิเคราะห์ธาตุอาหารในเมล็ด

วิเคราะห์ความเข้มข้นธาตุสังกะสีในเมล็ด ข้าวกล้องโดยวิธีการ dry ashing เผาตัวอย่างโดยใช้ อุณหภูมิ 540 °C นาน 8 ชั่วโมง และนำสารละลาย ตัวอย่างมาอ่านค่าด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer (AA) เปรียบเทียบความเข้มข้น จากสารละลายมาตรฐานของสังกะสี (Allan, 1961) วิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนทั้งหมด (total Kjeldahl nitrogen) ในเมล็ดข้าวกล้องโดยการย่อย ตัวอย่าง (digestion) ใน Kjeldahl digestion apparatus จากนั้นกลั่น (distillation) และไทเทรตเพื่อหาปริมาณ ไนโตรเจน (titration) (Bremner, 1960)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลผลผลิตเมล็ด องค์ประกอบผลผลิต และความเข้มข้นธาตุสังกะสีและไนโตรเจนในเมล็ดไป วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่าง

ระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีในข้าวเหนียว 5 พันธุ์ โดยหาค่า least significant difference (LSD) ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SX for Window เวอร์ชัน 9.0

ผลการทดลอง

ผลผลิตเมล็ด น้ำหนักฟางแห้ง และองค์ประกอบ ผลผลิต

ผลการศึกษาพบว่า การจัดการน้ำและพันธุ์ข้าว มีผลต่อความแตกต่างของผลผลิตเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($P < 0.01$) (Table 1) การปลูกข้าวเหนียวภายใต้สภาพน้ำขัง โดยเฉลี่ยเท่ากับ 34 % โดยพบว่าพันธุ์ กข6 มีผลผลิตเมล็ดสูงสุด รองลงมาคือพันธุ์ กข 14, สันป่าตอง 1, กข4 และ กข10 ตามลำดับ ในขณะที่ การฟันสังกะสีไม่มีผลต่อความแตกต่างของผลผลิต เมล็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) พบ ปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างการจัดการน้ำและพันธุ์ข้าว ต่อความแตกต่างของน้ำหนักแห้งฟางอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($P < 0.01$) (Table 1) โดยพันธุ์ กข 14 และ สันป่าตอง 1 เมื่อปลูกภายใต้สภาพน้ำขังมีน้ำหนัก แห้งฟางต่ำกว่าการปลูกข้าวแบบน้ำขังเท่ากับ 24 และ 40 % ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างของน้ำหนัก แห้งฟางภายใต้การจัดการน้ำทั้ง 2 แบบ ในข้าวพันธุ์อื่น ๆ นอกจากนี้พบการฟันสังกะสีมีผลต่อน้ำหนักแห้งฟาง แตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (Figure 1A) โดยการฟันสังกะสีส่งผลให้ พันธุ์ กข14 มีน้ำหนักแห้งฟางลดลง 25 % เมื่อเทียบ กับการไม่ฟันสังกะสี อย่างไรก็ตามการฟันสังกะสี ไม่มีผลต่อความแตกต่างของน้ำหนักแห้งฟางใน ข้าวเหนียวพันธุ์อื่น ๆ

สำหรับองค์ประกอบผลผลิต พบว่า การจัดการ น้ำมีผลต่อความยาวรวงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยการปลูกข้าวในสภาพขังน้ำส่งผลให้มีความยาวรวงมากกว่าการปลูกข้าวในสภาพน้ำไม่ขังน้ำ เฉลี่ยเท่ากับ 7 % (Table 1) ในส่วนของเปอร์เซ็นต์เมล็ด ดีและความสูงต้น พบการจัดการน้ำมีผลต่อเปอร์เซ็นต์

เมล็ดดีในข้าวแต่ละพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (Table 1) การปลูกข้าวภายใต้สภาพไม่ขังน้ำ ส่งผลให้ข้าวมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีต่ำกว่าการปลูกข้าวภายใต้สภาพน้ำขังเท่ากับ 15, 5, 14 และ 7 % ในพันธุ์ กข6, กข10, กข14 และสันป่าตอง 1 ตามลำดับ ยกเว้น พันธุ์ กข4 ที่ไม่พบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์เมล็ดดี ต่อสภาพการจัดการน้ำที่แตกต่างกัน และการตอบสนอง ของความสูง พบว่า พันธุ์ กข6, กข10 และสันป่าตอง 1 เมื่อปลูกภายใต้สภาพน้ำขังมีลำต้นสูงกว่าข้าวที่ปลูก

ในสภาพไม่ขังน้ำ เท่ากับ 23, 16 และ 11 % ตามลำดับ แต่ไม่พบอิทธิพลของการจัดการน้ำต่อความสูงต้นใน พันธุ์อื่น ๆ นอกจากนี้การพ่นสังกะสีมีผลต่อน้ำหนัก 1,000 เมล็ด แตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (Figure 1B) การพ่นสังกะสี ส่งผลให้ข้าวมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีเพิ่มขึ้นเท่ากับ 5 % ในพันธุ์ กข10 เมื่อเทียบกับการไม่พ่นสังกะสี ในขณะที่ การพ่นสังกะสีไม่มีผลต่อความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์ เมล็ดดีในพันธุ์อื่น ๆ

Table 1. Grain yield, straw dry weight and yield components of five glutinous rice varieties grown in waterlogged and non - flooded soil conditions

Variety	Water condition	Grain yield (g pot ⁻¹)	Straw dry weight (g pot ⁻¹)	No. of tillers plant ⁻¹	No. of panicles plant ⁻¹	Filled grain (%)	1,000 grain weight (g)	Culm length (cm)	Panicle length (cm)
RD4	waterlogged	112	249 ^e	11	10	92 ^{ab}	29.5	120 ^{cd}	28
	non - flooded	74	249 ^e	11	10	91 ^{bc}	26.0	117 ^{de}	27
RD6	waterlogged	161	377 ^{bc}	9	9	95 ^a	27.0	174 ^a	28
	non - flooded	108	378 ^{bc}	12	11	81 ^e	25.0	141 ^b	27
RD10	waterlogged	94	298 ^{de}	10	9	92 ^{bc}	30.5	120 ^{cd}	25
	non - flooded	76	277 ^{de}	13	11	87 ^d	28.5	104 ^g	24
RD14	waterlogged	129	424 ^b	10	10	89 ^{cd}	29.8	115 ^{def}	26
	non - flooded	77	321 ^{cd}	12	11	77 ^f	28.8	109 ^{fg}	25
SPT1	waterlogged	129	503 ^a	12	11	87 ^d	30.5	125 ^c	27
	non - flooded	72	303 ^{de}	11	10	81 ^e	28.0	112 ^{ef}	25
Variety mean									
RD4		93 ^{bc}	249 ^b	11	10	92 ^a	27.8 ^b	118 ^b	27 ^a
RD6		134 ^a	377 ^a	10	10	88 ^b	26.0 ^c	158 ^a	27 ^{ab}
RD10		85 ^c	287 ^b	11	10	89 ^{ab}	29.5 ^a	112 ^c	25 ^d
RD14		103 ^b	372 ^a	11	10	83 ^c	29.3 ^a	112 ^c	25 ^{cd}
SPT1		100 ^b	403 ^a	12	11	84 ^c	29.3 ^a	118 ^b	26 ^{bc}
Water mean									
	waterlogged	125 ^a	350	10	10	91 ^a	29.5 ^a	131 ^a	27 ^a
	non - flooded	81 ^b	326	12	11	83 ^b	27.3 ^b	117 ^b	25 ^b
Variety		**	**	ns	ns	**	**	**	**
Water		**	ns	ns	ns	**	**	**	**
Variety x Water		ns	**	ns	ns	**	ns	**	ns
CV (%)		15.6	11.7	16.8	17.2	2.8	2.5	3.4	4.0
Correlation (r) with grain yield			0.40 ^{ns}	-0.46*	-0.12 ^{ns}	0.49*	0.10 ^{ns}	0.75**	0.62**

Significant difference within column at $P < 0.05$ indicated by different lowercase letters

ns, *, ** indicates non-significant difference and significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively

The data was obtained from the mean of plants applied with and without foliar Zn fertilizer application

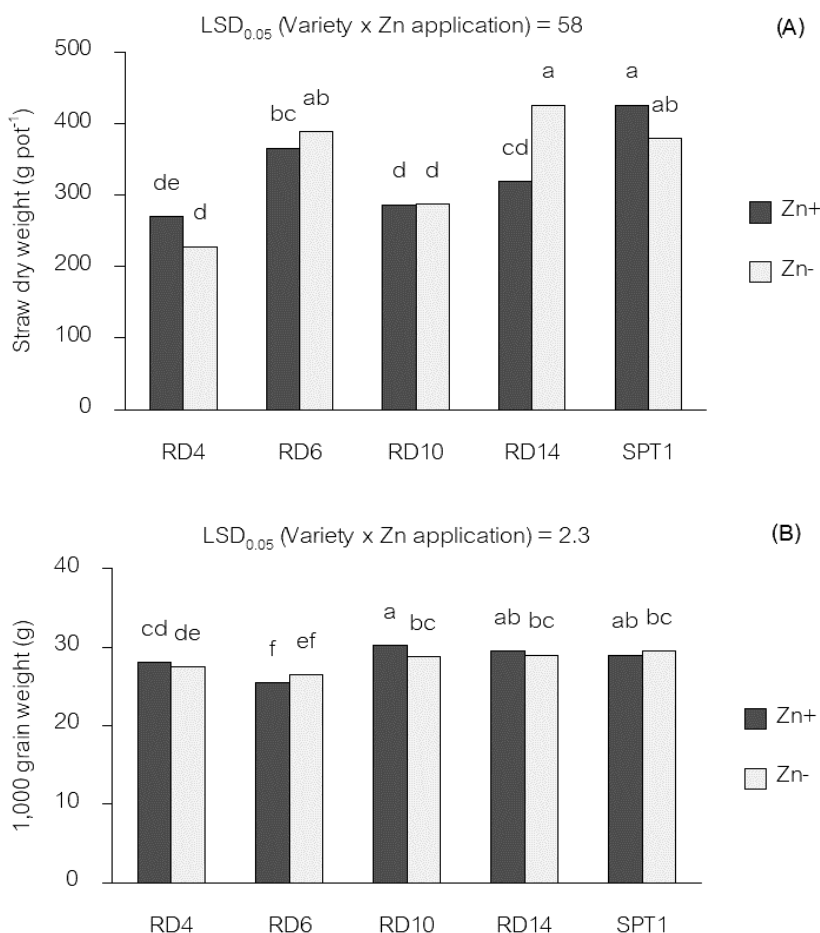


Figure 1. Straw dry weight (A) and 1,000 grain weight (B) of five glutinous rice varieties with and without foliar Zn fertilizer application. Significant difference at $P < 0.05$ indicated by different lowercase letters above the bars. The data was obtained from the mean of plants grown in waterlogged and non - flooded soil conditions

ความเข้มข้นสังกะสีและไนโตรเจนในเมล็ดข้าวกล้อง

การพ่นสังกะสีทางใบมีผลต่อความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้องแตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Figure 2) การพ่นสังกะสีส่งผลให้เมล็ดมีความเข้มข้นสังกะสีเพิ่มขึ้นเท่ากับ 57, 63 และ 43 % ในพันธุ์ กข4, กข10 และ กข14 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเมล็ดที่ไม่มีการพ่นสังกะสี ในขณะที่พันธุ์สันป่าตอง 1 และ กข6 มีการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดสูงถึง 76 และ 92 % ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่พบอิทธิพลของการจัดการน้ำต่อความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้อง ($P < 0.05$) ในขณะที่การจัดการน้ำมีผลต่อความเข้มข้นไนโตรเจน

ในเมล็ดข้าวกล้องแตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (Figure 3) โดยพบว่าพันธุ์ กข4 และ กข6 เมื่อปลูกภายใต้สภาพไม่ขังน้ำมีความเข้มข้นไนโตรเจนในเมล็ดสูงกว่าข้าวที่ปลูกภายใต้สภาพน้ำขังเท่ากับ 15 และ 12 % ตามลำดับ ซึ่งตรงกันข้ามกับการตอบสนองในพันธุ์ กข10 และสันป่าตอง 1 ที่พบว่าการปลูกข้าวภายใต้สภาพน้ำขังมีความเข้มข้นไนโตรเจนในเมล็ดสูงกว่าการปลูกข้าวภายใต้สภาพไม่ขังน้ำเท่ากับ 8 และ 15% ตามลำดับ ในขณะที่เกี่ยวกับการจัดการน้ำไม่มีผลต่อความแตกต่างกันของความเข้มข้นไนโตรเจนในเมล็ดพันธุ์ กข14 นอกจากนี้

พบการพ่นสังกะสีทางใบมีผลต่อความเข้มข้นไนโตรเจนในเมล็ดแตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Figure 4) โดยการพ่นสังกะสีส่งผลให้เมล็ดข้าวพันธุ์ กข4, กข6 และ กข14 มีความเข้มข้นไนโตรเจนในเมล็ดสูงกว่าเมล็ดที่ไม่มีการพ่นสังกะสีเท่ากับ 12, 10 และ 9 % ตามลำดับ ในขณะที่การพ่นสังกะสีไม่มีผลต่อความแตกต่าง

ของความเข้มข้นไนโตรเจนในเมล็ดพันธุ์ กข10 และ สันป่าตอง 1

อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตเมล็ดกับความเข้มข้นสังกะสีและไนโตรเจนในข้าวกล้องทั้ง 5 พันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เช่นเดียวกันกับไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสังกะสีและไนโตรเจนในข้าวกล้องทั้ง 5 พันธุ์ ($P < 0.05$)

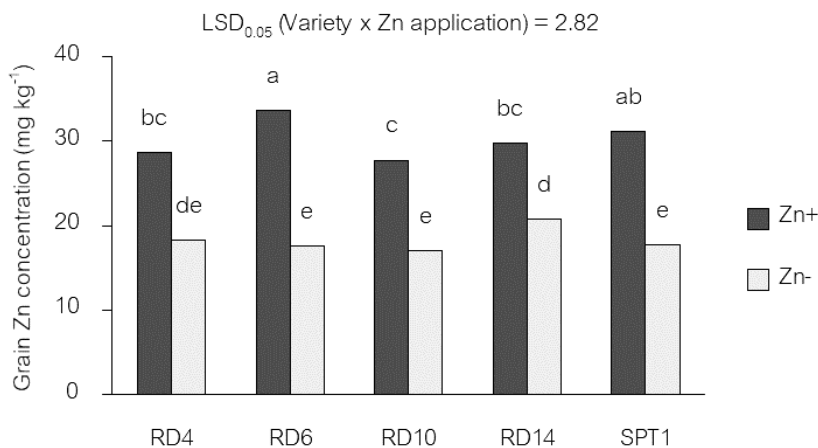


Figure 2. Grain Zn concentration of five glutinous rice varieties with and without foliar Zn fertilizer application. Significant difference at $P < 0.05$ indicated by different lowercase letters above the bars

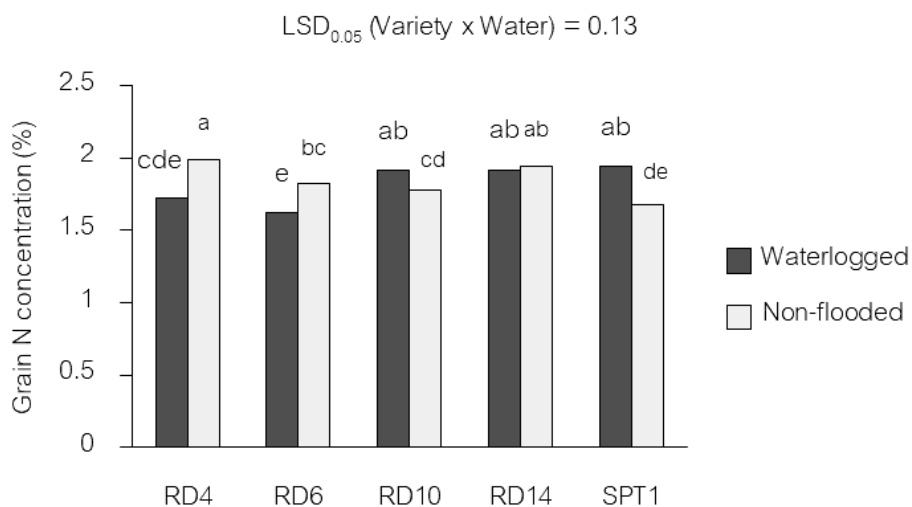


Figure 3. Grain N concentration of five glutinous rice varieties grown in waterlogged and non - flooded soil conditions. Significant difference at $P < 0.05$ indicated by different lowercase letters above the bars

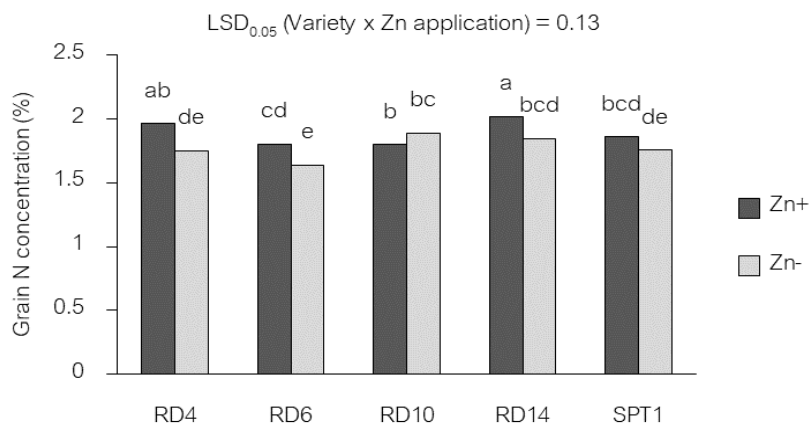


Figure 4. Grain N concentration of six glutinous rice varieties with and without foliar Zn fertilizer application.

Significant difference at $P < 0.05$ indicated by different lowercase letters above the bars

วิจารณ์

ปัญหาการขาดแคลนน้ำที่เกิดบ่อยและรุนแรงขึ้นในแต่ละปีสร้างความเสียหายต่อการผลิตข้าวเป็นอย่างมาก ดังนั้น การจัดการน้ำให้มีประสิทธิภาพพร้อมกับการวิจัยค้นคว้าพันธุ์ข้าวที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในสภาพน้ำขังและไม่ขังน้ำน่าจะสามารถนำมาใช้ในการแก้ปัญหาในระบบการเพาะปลูกข้าวในอนาคต จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการปลูกข้าวเหนียวทั้ง 5 พันธุ์ ในสภาพไม่ขังน้ำส่งผลให้ข้าวมีการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตลดลงเมื่อเทียบกับการปลูกในสภาพน้ำขังอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากพันธุ์ข้าวเหนียวที่ใช้ทดสอบทั้งหมดเป็นข้าวนาสวนซึ่งโดยปกติมีการขังน้ำตลอดระยะเวลาการเพาะปลูก การเปลี่ยนแปลงระบบการปลูกจากน้ำขังเป็นไม่ขังน้ำอาจส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตทางด้านสรีรวิทยาพืชและการสร้างผลผลิต โดยพบว่า การปลูกข้าวนาสวนภายใต้การปลูกแบบเปียกสลับแห้งส่งผลให้ข้าวมีปริมาณคลอโรฟิลล์ อัตราการสังเคราะห์แสง อัตราการหายใจ และอัตราการคายน้ำลดลง และส่งผลให้ผลผลิตเมล็ดลดลง (Khairi *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2018) เนื่องจากความชื้นในดินมีผลโดยตรงต่อปริมาณน้ำภายในต้นพืช โดยพบว่า ปริมาณความชื้นในดินที่ลดลงทำให้ข้าวมีปริมาณน้ำในใบและการชักน้ำการเปิดปากใบลดลงเช่นเดียวกัน

(Zaman *et al.*, 2018) การทดลองนี้พบผลผลิตลดลงในข้าวเหนียวทุกพันธุ์ แต่ระดับการลดลงมีความแตกต่างกัน โดยพันธุ์ กข10 มีผลผลิตลดลง 20 % เมื่อเทียบกับพันธุ์อื่น ๆ ที่ลดลงมากถึง 33-44 % แสดงให้เห็นว่าพันธุ์ดังกล่าวสามารถปรับตัวในการเจริญเติบโตได้ทั้งในน้ำขังและน้ำแห้งเมื่อเทียบกับพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจใช้เป็นแนวทางในการศึกษาทางสรีรวิทยาเชิงลึกต่อไป เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบการตอบสนองของผลผลิตต่อสภาพน้ำมีความแตกต่างกันในข้าว 2 ชนิด พันธุ์ข้าวนาสวนเมื่อปลูกภายใต้สภาพไม่ขังน้ำมีผลผลิตลดลง 31 % เมื่อเทียบกับการปลูกแบบน้ำขัง แต่พันธุ์ข้าวไร่ พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของผลผลิตเมื่อปลูกภายใต้สภาพน้ำที่แตกต่างกัน (Rinsinjoy *et al.*, 2019) แต่อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้พันธุ์ที่มีศักยภาพให้ผลผลิตสูงถือเป็นปัจจัยที่ต้องพิจารณาเป็นลำดับต้น ๆ เช่น ในกรณีพันธุ์ กข4 และ กข6 เมื่อนำมาปลูกภายใต้สภาพไม่ขังน้ำมีระดับการลดลงของผลผลิตที่ใกล้เคียงกัน แต่พบว่าพันธุ์ กข6 ที่ปลูกทั้งใน 2 สภาพการจัดการน้ำมีผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ กข4 ดังนั้น การเลือกใช้พันธุ์ที่มีผลผลิตสูงและมีความเสถียรซึ่งอาจเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถลดความเสียหายได้หากต้องปลูกข้าวภายใต้สภาพน้ำน้อย นอกจากนี้การลดลงของเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีและน้ำหนัก 1,000 เมล็ด สอดคล้องกับการลดลงของผลผลิตเมล็ด

แสดงให้เห็นว่า การลดลงของผลผลิตอาจต้องพิจารณาถึง การตอบสนองขององค์ประกอบผลผลิตในลักษณะอื่น ๆ ร่วมด้วย สอดคล้องกับการลดลงของน้ำหนักเมล็ดในข้าว ที่ปลูกภายใต้สภาพไม่ขังน้ำ (aerobic) และการให้น้ำแบบ ชั่วคราว (intermittent irrigation) ส่งผลให้ข้าวมีผลผลิต โดยรวมลดลง (Joshi *et al.*, 2018; Pascual and Wang, 2017) ในขณะที่งานวิจัยของ Khairi *et al.* (2015) ระบุว่า การควบคุมปริมาณน้ำในดินให้สูงกว่าจุดอิ่มตัวของน้ำ ในดิน (saturated soil) สามารถลดการสูญเสียจำนวน เมล็ดดีได้ในข้าวที่ปลูกแบบเปียกสลับแห้ง เนื่องจาก ความเครียดน้ำที่เกิดโดยเฉพาะในระยะที่ข้าวเริ่มแทงรวง เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ดอกเป็นหมันและส่งผลให้มี จำนวนเมล็ดลึบมากขึ้น (Kato *et al.*, 2009) นอกจากนี้ การขาดน้ำในระยะดังกล่าวอาจทำให้การเคลื่อนย้าย สารอาหารจากลำต้นไปยังเมล็ดลดลง เนื่องจากมีจำนวน เซลล์เอนโดสเปิร์มลดลง (endosperm cells) และส่งผลให้เมล็ดมีขนาดเล็กลง (Xue *et al.*, 2008) แสดงให้เห็น ว่าปริมาณน้ำในดินมีความสำคัญอย่างมากต่อการสร้าง ผลผลิตโดยเฉพาะในระยะออกดอก เนื่องจากปริมาณน้ำ ในดินที่ไม่เพียงพออาจส่งผลต่อความสมบูรณ์ของดอก และส่งผลต่อขนาดเมล็ดที่ลดลงในตอนสุดท้าย แต่ทั้งนี้ การปลูกข้าวภายใต้สภาพไม่ขังน้ำทำให้ข้าวมีจำนวนต้น ต่อกอและจำนวนรวงต่อกอเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่การเพิ่มขึ้น ดังกล่าวไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของผลผลิต ดังนั้น การรักษาระดับปริมาณน้ำให้เหมาะสมหรือมีการขังน้ำในระยะ ที่ข้าวกำลังออกดอกอาจเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถ ควบคุมขนาดของ sink โดยเฉพาะจำนวนเมล็ดดีและ น้ำหนักเมล็ดได้ นอกจากนี้การพ่นสังกะสีทางใบทำให้ ข้าวมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากพืชมี ความต้องการสังกะสีในปริมาณที่สูงเพื่อใช้ในการสร้าง โปรตีนใน pollen tubes (Ender *et al.*, 1983) สอดคล้อง กับงานวิจัยของ Karim *et al.* (2012) และ Firdous *et al.* (2018) ที่รายงานว่า การพ่นสังกะสีทางใบช่วยเพิ่มความ มีชีวิตของละอองเกสรและส่งผลให้ข้าวมีเปอร์เซ็นต์ ความเป็นหมันลดลง นอกจากนี้การพ่นสังกะสีทางใบ ยังทำให้ข้าวมีน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้นในข้าวบางพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ในข้าวสาลี (El-Dahshouri *et al.*, 2017) แสดงให้เห็นว่า การพ่นสังกะสี

อาจเป็นประโยชน์ต่อการปลูกข้าวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ภายใต้สภาพไม่ขังน้ำหรือน้ำแห้ง เนื่องจากสังกะสีช่วย ให้ข้าวมีจำนวนเมล็ดดีและน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม พันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ไม่มีการตอบสนอง ต่อการพ่นสังกะสีในลักษณะของการเพิ่มน้ำหนักเมล็ด แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองในลักษณะดังกล่าวอาจ ถูกกำหนดด้วยการจัดการน้ำและปัจจัยอื่น ๆ เช่น พันธุกรรมข้าว และการจัดการธาตุอาหารอื่น ๆ ด้วย จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สภาพน้ำในดินและ การพ่นปุ๋ยสังกะสีมีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้าง ผลผลิตของข้าวเหนียวที่ปลูกในสภาพกระถางเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในสภาพ แปลงปลูก และจำนวนซ้ำที่เพิ่มขึ้นเพื่อความถูกต้องและ แม่นยำของข้อมูลในงานทดลองต่อไป

ธาตุสังกะสีในเมล็ดเป็นคุณค่าทางโภชนาการ อย่างหนึ่งที่มีความสำคัญต่อผู้บริโภคข้าว ดังนั้น งานวิจัย ปัจจุบันจึงมุ่งเน้นหาวิธีการเพิ่มธาตุสังกะสีมากขึ้น ซึ่งประกอบไปด้วยการปรับปรุงพันธุ์และการจัดการ สภาพแวดล้อมในแปลงปลูก การพ่นสังกะสีทางใบเป็น วิธีที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าว (Phuphong *et al.*, 2018) เนื่องจากสังกะสีเคลื่อนย้าย จากใบไปสะสมในเมล็ดได้โดยตรง เมื่อเทียบกับการใส่ทางดินที่สังกะสีมีความเป็นประโยชน์ต่ำและมีการเคลื่อนย้ายช้าภายในต้นพืช อีกทั้งอาจเกิดการสูญเสีย ธาตุอาหารจากการชะล้างของดิน (Broadley *et al.*, 2012; Kannan, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ ที่แสดงให้เห็นว่า การพ่นปุ๋ยสังกะสีทางใบสามารถเพิ่ม การสะสมสังกะสีในข้าวเหนียวได้สูงถึง 28 - 34 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม ซึ่งอยู่ในช่วงของระดับความเข้มข้นที่ตรง ตามวัตถุประสงค์ของการเพิ่มสังกะสีในเมล็ดข้าว (28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) (IRRI, 2015) นอกจากนี้ งานทดลองยังพบอีกว่า ข้าวเหนียวในแต่ละพันธุ์มีระดับ การเพิ่มขึ้นของธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าวแตกต่างกัน ในพันธุ์ กข6 พบว่า มีปริมาณสังกะสีเพิ่มขึ้นเกือบหนึ่งเท่า ในขณะที่พันธุ์ กข14 มีสังกะสีเพิ่มขึ้นในเมล็ดเพียง ครึ่งหนึ่งของเมล็ดที่ไม่มีการพ่นสังกะสี เช่นเดียวกับ งานวิจัยในข้าวจำนวน 4 พันธุ์ ที่พบว่า การพ่นสังกะสี ทางใบช่วยเพิ่มความเข้มข้นสังกะสีประมาณ 14 - 50 %

(Tuiwong *et al.*, 2015) อาจกล่าวได้ว่าพันธุกรรมข้าวเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดความแตกต่างของการสะสมสังกะสีในข้าวแต่ละพันธุ์ Impa *et al.* (2013a) รายงานว่าความสามารถในการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารจากส่วนใบไปยังเมล็ดมีความแตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์ โดยพันธุ์ที่มีศักยภาพในการดึงธาตุสังกะสีจากส่วนลำต้นเหนือดินมาใช้ในเมล็ดสูงจะมีการสะสมธาตุสังกะสีในเมล็ดสูงตามไปด้วย นอกจากนี้พบว่า ปริมาณสังกะสีที่สะสมในส่วนลำต้นเหนือดินในปริมาณที่เหมาะสมทั้งในระยะก่อนดอกบานและหลังดอกบานมีผลต่อการเคลื่อนย้ายสังกะสีไปยังส่วนเมล็ด โดยพบว่า การเคลื่อนย้ายสังกะสีจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องหลังจากที่ข้าวเข้าสู่ระยะออกดอก (Stomph *et al.*, 2014) แม้ว่าการพ่นสังกะสีส่งผลให้ข้าวมีการสะสมสังกะสีเพิ่มขึ้นในบริเวณส่วนของใบ แต่เคลื่อนย้ายสังกะสีจากใบไปยังเมล็ดอาจถูกจำกัด Doolette *et al.* (2018) ระบุว่า การเคลื่อนย้ายสังกะสีจากส่วนใบไปยังเมล็ดอาจลดลงเนื่องจากสังกะสีบางส่วนจับกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น phytate และ citrate จากงานวิจัยดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมข้าวที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายสังกะสีจากลำต้นเหนือดินในส่วนต่าง ๆ ไปยังส่วนของเมล็ดมีความแตกต่างกัน ซึ่งความสามารถในการดูดใช้ธาตุอาหารอาจเป็นตัวกำหนดให้ข้าวแต่ละพันธุ์มีการสะสมสังกะสีในเมล็ดแตกต่างกัน การศึกษาการสะสมสังกะสีในส่วนของใบและเมล็ดควบคู่กันในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ อาจทำให้เกิดความเข้าใจกลไกการเคลื่อนย้ายสังกะสีมากขึ้น

สังกะสีเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของโปรตีนสังกะสีที่จับกับโปรตีนมีบทบาทสำคัญต่อความเสถียรของโครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ รวมทั้งรักษาสสมดุลของกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทางพันธุกรรม (Broadley *et al.*, 2012) โดยพบว่า การใส่สังกะสีทางดินในอัตราที่เพิ่มขึ้นในข้าวสาลีส่งผลให้เมล็ดมีโปรตีนเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดเพิ่มขึ้นในส่วน of ใบง เช่น nitrate reductase และ glutamine synthetase โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงดอกบาน ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีบทบาทต่อการนำไนโตรเจนไปใช้ประโยชน์ในการสร้างผลผลิตและคุณภาพ

เมล็ด (Liu *et al.*, 2015) จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การพ่นสังกะสีสามารถเพิ่มความเข้มข้นไนโตรเจนในเมล็ดข้าวกล้องได้เช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของโปรตีนในเมล็ดข้าวกล้องเมื่อมีการพ่นสังกะสีทางใบ (Hussain *et al.*, 2018; Rana and Kashif, 2014) แสดงให้เห็นว่าสังกะสีอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนในเมล็ด แต่อย่างไรก็ตาม ข้าวเหนียวที่บริโภคกันส่วนใหญ่จะเป็นในรูปของข้าวขาว ซึ่งธาตุอาหารของส่วนใหญ่วมถึงจุลธาตุอย่างเช่นสังกะสีจะถูกเก็บสะสมในบริเวณส่วนของเนื้อเยื่อรำชั้นนอก (outer aleurone layers) และมีการเคลื่อนย้ายจากส่วนเนื้อเยื่อรำชั้นนอกไปยังเอนโดสเปิร์มในปริมาณที่ต่ำ (Impa *et al.*, 2013b) โดยส่วนมากการเคลื่อนย้ายสังกะสีไปยังเมล็ดจะมีประสิทธิภาพและรวดเร็วในช่วงแรกของการเติมเต็มเมล็ด และจะมีการเคลื่อนย้ายลดลงเมื่อเมล็ดเข้าสู่ระยะการสะสมคาร์โบไฮเดรต (Wang *et al.*, 2011) ดังนั้น การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการสะสมธาตุสังกะสีในส่วน of เมล็ดข้าวขาวด้วยวิธีการพ่นธาตุสังกะสีทางใบที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น ระยะเวลาพ่นและอัตราที่เหมาะสมที่เฉพาะเจาะจงในข้าวแต่ละพันธุ์ หรือการพ่นสังกะสีร่วมกับธาตุอาหารอื่น ๆ อาจเป็นแนวทางในการเพิ่มธาตุอาหารในข้าวขาวและเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคมากขึ้น

สรุป

การจัดการน้ำมีความสำคัญต่อการสร้างผลผลิตของข้าว จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าการปลูกข้าวเหนียวภายใต้สภาพไม่ขังน้ำส่งผลให้ผลผลิตเมล็ดลดลงอย่างมาก เนื่องจากข้าวมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีและน้ำหนักเมล็ดลดลง แต่ไม่พบการลดลงของจำนวนหน่อตอกและจำนวนรวงต่อต้น แสดงให้เห็นว่าจำนวนเมล็ดดีและน้ำหนักเมล็ดอาจเป็นองค์ประกอบผลผลิตที่สำคัญที่จะใช้ประเมินการตอบสนองต่อระบบการเพาะปลูกข้าวแบบใช้น้ำน้อยต่อไป การจัดการน้ำที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การปลูกแบบเปียกสลับแห้งหรือมีการขังน้ำในช่วงที่ข้าวออกดอกอาจเป็นแนวทางในการลดความเสียหายอันเนื่องมาจากความไม่เสถียรของจำนวน

เมล็ดดีและน้ำหนักเมล็ดได้ ในขณะที่เกี่ยวกับการพ่นสังกะสีเป็นวิธีที่สามารถช่วยปรับปรุงผลผลิตของข้าวได้เนื่องจากสังกะสีทำให้ข้าวมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีและน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การพ่นสังกะสีทางใบเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มธาตุสังกะสีและไนโตรเจนในเมล็ดข้าวกล้องได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยระดับการเพิ่มขึ้นนั้นมีความแตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์ ซึ่งการตอบสนองต่อสภาพน้ำและการพ่นสังกะสีที่แตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์สามารถใช้เป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการศึกษากลไกการตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาต่อไป ข้าวที่มีศักยภาพในการเจริญเติบโตได้ดีในสภาพไม่ขังน้ำโดยมีการสูญเสียผลผลิตน้อยที่สุดและเป็นพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมธาตุสังกะสีและไนโตรเจนในเมล็ดสูง อาจเป็นลักษณะที่ดีในการคัดเลือกพันธุ์ให้สามารถปลูกได้ดีในสภาพน้ำแห้ง โดยมีปริมาณผลผลิตและคุณภาพทางโภชนาการสูง

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนทุนวิจัยส่วนหนึ่งจากโครงการวิจัยปุ๋ยสังกะสีในข้าว (www.havestzinc.org) คณะเกษตรศาสตร์และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Allan, J.E. 1961. The determination of zinc in agricultural materials by atomic-absorption spectrophotometry. *Analyst* 86(1025): 530-534.

Anning, D., J. Ofori, I. Addai and Y. Abdulai. 2018. Effect of water management and nitrogen fertilizer sources on yield and water use efficiency of lowland rice. *Journal of Ghana Science Association* 18(1): 32-40.

BOF. 2019. Report of price in importance crop in Thailand for the 4th phase of 2019 (rice). Bank of Thailand, Bangkok. 17 p. (in Thai)

Black, R.E., L.H. Allen, Z.A. Bhutta, L.E. Caulfield, M. de Onis, M. Ezzati, C. Mathers and J. Rivera. 2008. Maternal and child under nutrition: global and regional exposures and health consequences. *The Lancet*. 371(9608): 243-260.

Bremner, J.M. 1960. Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *The Journal of Agricultural Science* 55(1): 11-33.

Broadley, M., P. Brown, I. Cakmak, Z. Rengel and F. Zhao. 2012. Function of Nutrients: Micronutrients. pp. 191-248. *In*: P. Marschner (ed.). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3rd ed. Academic Press, San Diego.

Brown, K.H., J.A. Rivera, Z. Bhutta, R.S. Gibson, J.C. King, B. Lonnerdal, M.T. Ruel, B. Sandtröm, E. Wasantwisut and C. Hotz. 2004. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food and Nutrition Bulletin* 25(1 Suppl. 2): S99-203.

Cakmak, I and U.B. Kutman. 2018. Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. *European Journal of Soil Science* 69(1): 172-180.

Carrijo, D.R., M.E. Lundy and B.A. Linquist. 2017. Rice yields and water use under alternate wetting and drying irrigation: A meta-analysis. *Field Crops Research* 203: 173-180.

Coleman, J.E. 1998. Zinc enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* 2(2): 222-234.

Doolette, C.L., T.L. Read, C. Li, K.G. Scheckel, E. Donner, P.M. Kopittke, J.K. Schjoerring and E. Lombi. 2018. Foliar application of zinc sulphate and zinc EDTA to wheat leaves: differences in mobility, distribution, and speciation. *Journal of Experimental Botany* 69(18): 4469-4481.

- El-Dahshouri, M.F., M.M. El-Fouly, R.K.M. Khalifa and H.M.A. El-Ghany. 2017. Effect of zinc foliar application at different physiological growth stages on yield and quality of wheat under sandy soil conditions. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal (Special Issue)*: 193-200.
- Ender, C., M.Q. Li, B. Martin, B. Povh, R. Nobiling, H.D. Reiss and K. Traxel. 1983. Demonstration of polar zinc distribution in pollen tubes of *Lilium longiflorum* with the Heidelberg proton microprobe. *Protoplasma* 116: 201-203.
- Firdous, S., B.K. Agarwal, D.K. Shahi and S. Bhushan. 2018. The effect of zinc fertilization on rice productivity and economics in acid alfisol of Jharkhand, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (Special Issue 7)*: 2676-2682.
- Gibson, R.S., M.S. Manger, W. Krittaphol, T. Pongcharoen, S. Gowachirapant, K.B. Bailey and P. Winichagoon. 2007. Does zinc deficiency play a role in stunting among primary school children in NE Thailand? *British Journal of Nutrition* 97(1): 167-175.
- Hussain, S., K. Sahar, A. Naeem, M. Zafar-ul-Hye and M. Aon. 2018. Combined zinc and nitrogen applications at panicle initiation for zinc biofortification in rice. *Periodicum Biologorum* 120(2-3): 105-110.
- Impa, S.M., A. Gramlich, S. Tandy, R. Schuln, E. Frossard and S.E. Johnson-Beebout. 2013a. Internal Zn allocation influences Zn deficiency tolerance and grain Zn loading in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science* 4: 534, doi: 10.3389/fpls.2013.00534.
- Impa, S.M., M.J. Morete, A.M. Ismail, R. Schuln and S.E. Johnson-Beebout. 2013b. Zn uptake, translocation and grain Zn loading in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes selected for Zn deficiency tolerance and high grain Zn. *Journal of Experimental Botany* 64(10): 2739-2751.
- Institute of Medicine Panel on Micronutrients. 2001. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. National Academy Press, Washington. 773 p.
- IRRI. 2015. Biofortification. (Online). Available: <https://www.iri.org/biofortification> (21 October, 2020).
- Joshi, R., B. Singh and A. Shukla. 2018. Evaluation of elite rice genotypes for physiological and yield attributes under aerobic and irrigated conditions in Tarai areas of Western Himalayan region. *Current Plant Biology* 13: 45-52.
- Kannan, S. 2010. Foliar fertilization for sustainable crop production. pp. 371-402. *In*: E. Lichtfouse (ed.). Genetic Engineering, Biofertilisation, Soil Quality and Organic Farming. Sustainable Agriculture Reviews, volume 4. Springer, Dordrecht.
- Karim, M.R., Y.Q. Zhang, R.R. Zhao, X.P. Chen, F.S. Zhang and C.Q. Zou. 2012. Alleviation of drought stress in winter wheat by late foliar application of zinc, boron, and manganese. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175(1): 142-151.
- Kato, Y., M. Okami and K. Katsura. 2009. Yield potential and water use efficiency of aerobic rice (*Oryza sativa* L.) in Japan. *Field Crops Research* 113(3): 328-334.

- Khairi, M., M. Nozulaidi, A. Afifah and M.S. Jahan. 2015. Effect of various water regimes on rice production in lowland irrigation. *Australian Journal of Crop Science* 9(2): 153-159.
- Laenoi, S., B. Dell, C. Prom-u-thai and B. Rerkasem. 2015. Iron and zinc variation along the grain length of different Thai rice varieties. *ScienceAsia* 41(6): 386-391.
- Liu, H.E., Q.Y. Wang, Z. Rengel and P. Zhao. 2015. Zinc fertilization alters flour protein composition of winter wheat genotypes varying in gluten content. *Plant, Soil and Environment* 61: 195-200.
- OAE. 2019. Agricultural production. (Online). Available: <http://www.oae.go.th/assets/portals/1/fileups/prcaidata/files/type%20rice%2061.pdf> (March, 10 2020). (in Thai)
- Pascual, V.J. and Y.M. Wang. 2017. Impact of water management on rice varieties, yield, and water productivity under the system of rice intensification in Southern Taiwan. *Water* 9(1): 3, doi: 10.3390/w9010003.
- Phuphong, P., I. Cakmak, B. Dell and C. Prom-u-thai. 2018. Effects of foliar application of zinc on grain yield and zinc concentration of rice in farmers' fields. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences* 17(3): 181-190.
- Rana, W.K. and S.R. Kashif. 2014. Effect of different zinc sources and methods of application on rice yield and nutrients concentration in rice grain and straw. *Journal of Environmental and Agricultural Sciences* 1: 9.
- Rinsinjoy, R., S. Lordkaew and C.T. Prom-u-thai. 2019. Zinc accumulation in upland and wetland rice grown under non-flooded and flooded conditions. *Journal of Agriculture* 35(3): 425-434. (in Thai)
- Stomph, T.J., W. Jiang, P.E.L. Van Der Putten and P.C. Struik. 2014. Zinc allocation and re-allocation in rice. *Frontiers in Plant Science* 5: 8, doi: 10.3389/fpls.2014.00008.
- TREA. 2019. Rice exports statistics. (Online). Available: http://www.thairiceexporters.or.th/List_%20of_statistic.htm (10 March, 2020). (in Thai)
- Tuiwong, P., P. Jaksomsak, B. Rerkasem and C.T. Prom-u-thai. 2015. Effect of foliar zinc application on grain yield and zinc accumulation in brown rice of local and improved varieties. *Khon Kaen Agriculture Journal* 43(4): 605-612. (in Thai)
- Wang, Y.X., A. Specht and W.J. Horst. 2011. Stable isotope labelling and zinc distribution in grains studied by laser ablation ICP-MS in an ear culture system reveals zinc transport barriers during grain filling in wheat. *New Phytologist* 189(2): 428-437.
- Xue, C., X. Yang, B. Bouman, W. Deng, Q. Zhang, W. Yan, T. Zhang, A. Rouzi and H. Wang. 2008. Optimizing yield, water requirements, and water productivity of aerobic rice for the North China Plain. *Irrigation Science* 26(6): 459-474.
- Zaman, N.K., M.Y. Abdullah, S. Othman and N.K. Zaman. 2018. Growth and physiological performance of aerobic and lowland rice as affected by water stress at selected growth stages. *Rice Science* 25(2): 82-93.

ชนิดและการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงวันทองสกุล *Bactrocera* ที่ทำลายผลพริกบางพันธุ์ในจังหวัดพิษณุโลก

Species and Population Dynamics of Fruit Fly Genus *Bactrocera* infested on Some Chili Fruit Cultivars in Phitsanulok Province

อรอนงค์ พึ่งเขียว¹ วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ^{1*} จิราพร กุลสาริน² และ เยาวลักษณ์ จันทร์บาง²
On-anong Phungkhav¹, Weerathep Pongprasert^{1*}, Jiraporn Kulsarin² and Yaowaluk Chanbang²

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก 65000

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

²ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

²Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: weerathepp@gmail.com

(Received: 8 August 2020; Accepted: 9 December 2020)

Abstract: The study on species and population dynamics of fruit fly (*Bactrocera* spp.) on 6 popular chili cultivars: Kaw Num Jomtong, Hyouk, Kow Sabun - Ngar, Yok Siam, Khi Nu Suan and Supper Hot was carried out in Phitsanulok province. The objectives were included of the study on the species and numbers fruit flies and their parasitoids, population dynamics and environmental factors and the relation of the fruit fly infestation on those 6 chili varieties and chili morphological characters. The result showed that only one species of insect pest (*Bactrocera latifrons*) and parasitoid (*Diachasmimorpha longicaudata*) were found. Population of *B. latifrons* was found on 6 species of chili peppers at 75 days old and increased continuously to reach the highest amount at 110 - 117 days old before declining until harvesting. The highest regression of parasitoid and fruit fly was found only at 42.51 %. Maximum temperature was high potential to affect *B. latifrons* population infesting Super Hot cultivar (84.02 %). The highest infestation was found on Kew Noom Chom Thong, Youk, Kaw Sabun - Nga, Yok Siam due to the largest fruit size and wrinkle skin. Meanwhile, the orange - yellow color of chili fruit was highly attacked by chili fruit fly more than yellow, red and green colors.

Keywords: Chili fruit fly, *Bactrocera latifrons*, chili cultivars, population dynamics

บทคัดย่อ: การศึกษาชนิดและการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงวันทองสกุล *Bactrocera* ที่ลงทำลายผลพริก 6 พันธุ์ คือ เชี่ยวหนุ่มจอมทอง พริกหยวก ขาวสับนงา หยกสยาม ขี้นุสวณ ขี้นุสอุปเปอร์ฮอท ที่นิยมปลูกในจังหวัดพิษณุโลก มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของแมลงวันทอง และศัตรูธรรมชาติ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงวันทอง และปัจจัยทางกายภาพที่เกี่ยวข้อง ตั้งแต่ติดผลจนถึงเก็บเกี่ยว และเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลพริกทั้ง 6 พันธุ์ ต่อการลงทำลายของแมลงวันทองพริก ผลการศึกษาพบแมลงวันทองชนิดเดียวที่ลงทำลายพริกตลอดฤดูการปลูกคือ *Bactrocera latifrons* และพบแตนเบียนหนอนแมลงวันทองชนิดเดียวคือ *Diachasmimorpha longicaudata* จำนวนประชากรแมลงวันทอง ในพริก 6 สายพันธุ์ เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในทิศทางเดียวกัน ตั้งแต่พริกติดผลอายุ 75 วัน และสูงสุดที่อายุ 110-117 วัน จากนั้นลดลงจนถึงช่วงการเก็บเกี่ยว แตนเบียนมีอิทธิพลต่อแมลงวันทอง ร้อยละ 42.51 ($R^2 = 0.4251$) ปัจจัยทางกายภาพมีผลน้อยมากต่อประชากรของแมลงวันทอง ยกเว้นในกรณีของพริกพันธุ์อุปเปอร์ฮอท พบว่า ระดับอุณหภูมิสูงที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรแมลงวันทองที่ลงทำลาย ร้อยละ 84.02 พบการเข้าทำลายจากแมลงวันทอง *B. latifrons* สูงมากในพริกพันธุ์เชียวหนุ่มจอมทอง หยกขาวสับนงา และหยกสยาม และมีแนวโน้มเกี่ยวข้องกับขนาดของผล และรอยย่นของผิวผล ทั้งนี้ สีเหลืองส้มของผลมีแนวโน้มดึงดูดแมลงวันทองพริกมากกว่าผลสีเหลือง แดง และเขียว

คำสำคัญ: แมลงวันทองพริก พันธุ์พริก การเปลี่ยนแปลงประชากร

คำนำ

พริก (*Chili, Capsicum* spp.) จัดเป็นพืชผักที่นิยมบริโภคทั้งในรูปพริกสดและผลิตภัณฑ์พริกแปรรูปแบบต่าง ๆ ในประเทศไทยมีการปลูกพริกหลายชนิด เช่น พริกขี้หนู พริกใหญ่ พริกขี้ฟ้า พริกยักษ์ และพริกหยวก มีพื้นที่ปลูกโดยรวมมากกว่า 224,939 ไร่ (Office of Agricultural Economics, 2017) มีผลผลิตออกสู่ตลาดได้ตลอดทั้งปี ในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย มีพื้นที่ปลูกพริกกระจายในหลายจังหวัด คือ พิษณุโลก สุโขทัย ตาก นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ และมีแนวโน้มขยายเพิ่มขึ้นทุกปี (Hassunthathai and Mooncharwna, 2008) พันธุ์พริกที่เกษตรกรนิยมปลูก คือ พริกเชียวหนุ่มจอมทอง พริกหยกสยาม พริกหยวก พริกยักษ์หวาน พริกขี้หนูอุปเปอร์ฮอท และขาวสับนงา การปลูกพริกในพื้นที่ขนาดใหญ่ปัญหาที่เกษตรกรมักประสบคือแมลงศัตรูพืชลงทำลายทำให้ผลผลิตเสียหาย ไม่ได้คุณภาพ แมลงศัตรูพริกที่สำคัญที่สร้างความเสียหายต่อผลพริกรุนแรงและยากต่อการควบคุมมาก คือ แมลงวันทอง *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) แมลงวันทองที่ลงทำลายพริกในไทยพบ 3 ชนิด ได้แก่ แมลงวันทอง *Bactrocera latifrons*,

B. cucurbitae และ *B. dorsalis* ส่วนที่ลงทำลายพริกมากที่สุดคือ *B. latifrons* ซึ่งจัดเป็นแมลงศัตรูพริกที่พบแพร่กระจายทั่วประเทศไทย ลงทำลายพืชในวงศ์ Solanaceae เช่น มะเขือ มะเขือเทศ ยาสูบ และพริก เป็นต้น สามารถลงทำลายผลพริกตั้งแต่ ระยะติดผล โดยตัวเต็มวัยเจาะวางไข่ในผลพริก ตัวอ่อนที่ฟักออกมาเข้าซอนซักกัดกินเนื้อเยื่ออยู่ภายในผลพริกนานถึง 2 สัปดาห์ (Jaturat, 2007) จนเหลืองแต่เปลือกผลเน่าเสีย ร่วงหล่นไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ (Siri, 2007; Stonehouse *et al.*, 2004) ในช่วงระยะเริ่มแรกของการเข้าทำลายสังเกตได้ยากมาก จนกว่าเมื่อรอยเจาะวางไข่เริ่มชัด ผลบิดเบี้ยว หรือเน่า จึงสามารถเห็นผลพริกที่เสียหายได้ชัดเจน ซึ่งในช่วงระยะเวลาดังกล่าวเกษตรกรไม่สามารถทำการป้องกันกำจัดได้อย่างทันทั่วทั้งที่แล้ว ในประเทศมาเลเซียแมลงวันพริกสร้างความเสียหายต่อผลผลิตสูงถึง 60 - 80 % (Shimizu *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตาม ความเสียหายของผลพริกจากการลงทำลายของแมลงวันทองนั้นมีแนวโน้มแตกต่างกันไปตามพันธุ์พริก และชนิดของแมลงวันทอง (Wingsanoi and Siri, 2011) ดังนั้น การปลูกพริกพันธุ์ที่เหมาะสมจึงมีแนวโน้มที่สามารถลดการลงทำลายของแมลงวันทองพริกบางชนิดได้ ซึ่งสามารถใช้เป็น

แนวทางในการพัฒนาระบบการบริหารจัดการแมลงศัตรูพริกได้ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลพันธุ์และการลงทำลายของแมลงวันทองพริกในเขตภาคเหนือตอนล่างยังมีรองรับน้อยมาก จึงได้ทำการศึกษาชนิดและการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงวันทองสกุล *Bactrocera* ที่ลงทำลายผลพริกบางพันธุ์ขึ้น โดยใช้พื้นที่ปลูกพริกในจังหวัดพิษณุโลกเป็นแนวทางในการศึกษา ซึ่งครอบคลุมในส่วนของชนิดและการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงวันทองและแมลงศัตรูธรรมชาติ ตั้งแต่ติดผลจนถึงเก็บเกี่ยว รวมทั้งลักษณะพื้นฐานวิทยาที่สำคัญของผลพริกที่มีความสัมพันธ์เชื่อมโยงต่อการลงทำลาย เปรียบเทียบในผลพริก 6 พันธุ์ที่นิยมปลูกในเขตภาคเหนือตอนล่างคือ เชี่ยวหนุ่มจอมทอง พริกหยวก ขาวสับนงา หยกสยาม ชีหนูสวน และชีหนูซูปเปอร์ฮอท

วิธีดำเนินงานวิจัย

เตรียมแปลงแบบยกร่องขนาด 1 x 30 เมตร แต่ละแปลงจะปลูกต้นพริกมีระยะห่างระหว่างต้นพริก 50 เซนติเมตร โดยจัดพื้นที่ให้สอดคล้องกับแผนการทดลองทางสถิติแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design: RCBD) จำนวน 6 ซ้ำ ในแต่ละกรรมวิธีมีขนาดของหน่วยทดลอง คือ 1 x 5 เมตร

เพาะเมล็ดพริก ทั้งหมด 6 พันธุ์ คือ เชี่ยวหนุ่ม จอมทอง พริกหยวก ขาวสับนงา หยกสยาม ชีหนูสวน ชีหนูซูปเปอร์ฮอท ที่นิยมปลูกในเขตภาคเหนือตอนล่าง ในถาดหลุมสำหรับเพาะพริก จากนั้นทำการดูแลรักษาจนต้นกล้าพริกอายุ 30-40 วัน สูงประมาณ 15-20 เซนติเมตร มีใบจริง 5-7 ใบ ทำการย้ายปลูกในแปลงที่เตรียมไว้

เมื่อพริกอายุ 75 วัน หรือเริ่มติดผล ทำการสุ่มเก็บผลพริกแต่ละสายพันธุ์ จากในแปลงทดสอบทุก 7 วัน จำนวน 8 ครั้ง จนพริกมีอายุ 124 วัน (ระยะผลอ่อนของพริกไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยวหรือระยะสุกแก่) โดยใช้การสุ่มเก็บผลพริกแบบปะปนกัน ทั้งหมด 10 ผลต่อต้น จำนวน 10 ต้นต่อพันธุ์ นำผลพริกใส่กล่องเลี้ยงแมลงบันทึกรายละเอียดพันธุ์ได้แก่ ลักษณะ ผิวน้ำ ขนาด และสีของผลวัน เดือน ปี ที่เก็บ วางบนชั้นในช่องที่มีอุณหภูมิ 25 °C ตรวจสอบและบันทึกชนิดและปริมาณของแมลงวันทอง

และศัตรูธรรมชาติที่พบจากผลพริก หลังจากเก็บผลพริก 20 วัน

วิเคราะห์ การเปลี่ยนแปลงประชากรแมลงวันทอง และศัตรูธรรมชาติที่พบ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ประชากรแมลงวันทองกับแมลงเบียนที่พบในพริกแต่ละพันธุ์

วิเคราะห์สมการความสัมพันธ์ประชากรแมลงวันทองกับสภาพแวดล้อม คือความชื้น (relative humidity) อุณหภูมิระดับสูงสุด (maximum temperature) และอุณหภูมิระดับต่ำสุด (minimum temperature) จากเครื่องวัดสภาพภูมิอากาศจากแปลงปลูก ณ วันที่เก็บผลผลิต วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของจำนวนแมลงวันทองที่พบในพริกพันธุ์ต่าง ๆ และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan's new multiple range test และศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะประจำพันธุ์ของพริก ผิวน้ำ ขนาด สี ของผล ต่อจำนวนแมลงวันทองที่พบ

ผลการวิจัย

ผลการสำรวจแมลงวันทองพริกจากพริกทั้ง 6 พันธุ์ ทุกสัปดาห์ จำนวน 8 ครั้ง ตั้งแต่พริกติดผลชุดแรกคืออายุ 75 วัน จนเก็บเกี่ยว พบแมลงวันทองพริก (*B. latifrons*) เพียงชนิดเดียวในพริกทั้ง 6 พันธุ์ โดยเริ่มพบแมลงวันทองพริกตั้งแต่การสำรวจครั้งแรกในพริกพันธุ์สับนงา เฉลี่ย 2 ตัวต่อต้น ส่วนพันธุ์อื่น ๆ เริ่มพบครั้งแรกในการสำรวจครั้งที่ 2 ที่ 82 วันเฉลี่ยที่ 4 - 12 ตัวต่อต้น จากนั้นจำนวนประชากรของแมลงวันทองพริกเพิ่มขึ้นต่อเนื่องในพริกทุกพันธุ์ และถึงจุดสูงสุดที่ 110 วัน ในพริกพันธุ์ เชี่ยวหนุ่มจอมทอง หยวก ขาวสับนงา หยกสยาม และชีหนูสวน เฉลี่ย 60, 62, 62, 25 ตัวต่อต้นตามลำดับ ส่วนพันธุ์ซูปเปอร์ฮอท จำนวนแมลงวันทองพริกสูงสุดที่ 117 วัน เฉลี่ย 24 ตัวต่อต้น จากนั้นประชากรของแมลงวันพริกลดลงอย่างต่อเนื่องจนครบ 124 วัน (Figure 1) โดยในช่วง 75 - 96 วัน การเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรแมลงวันทองพริกในพริกทุกพันธุ์ ไม่แตกต่างทางสถิติ แต่หลังจากนั้นที่ 103, 110, 117 และ 124 วัน พบจำนวนแมลงวันทองที่

ลงทำลายผลพริกทั้ง 6 พันธุ์มีความแตกต่าง ชัดเจนขึ้น สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มแรก ประกอบด้วย เชียงใหม่จอมทอง ห้วยขวางบ้านนา หยกสยาม เป็นกลุ่มที่พบจำนวนแมลงวันทองพริกลงทำลายสูง โดยพริกห้วยขวางพบจำนวนแมลงวันทองสูงมากที่สุด ที่ 52, 62, 62 และ 41 ตัวต่อต้น คิดเป็นอัตราการลงทำลาย

ร้อยละ 5.2, 6.0, 6.2 และ 4.2 ของผลพริกตามลำดับ กลุ่มที่สองประกอบด้วย ชีหนุสวน และซูปเปอร์ฮอต เป็นกลุ่มที่พบจำนวนแมลงวันทองพริกลงทำลายน้อย โดยพริกซูปเปอร์ฮอต พบน้อยที่สุดเฉลี่ย 8, 18, 24 และ 14 ตัวต่อต้น ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการลงทำลาย ร้อยละ 0.8, 1.8, 2.4 และ 1.4 ตามลำดับ (Table 1)

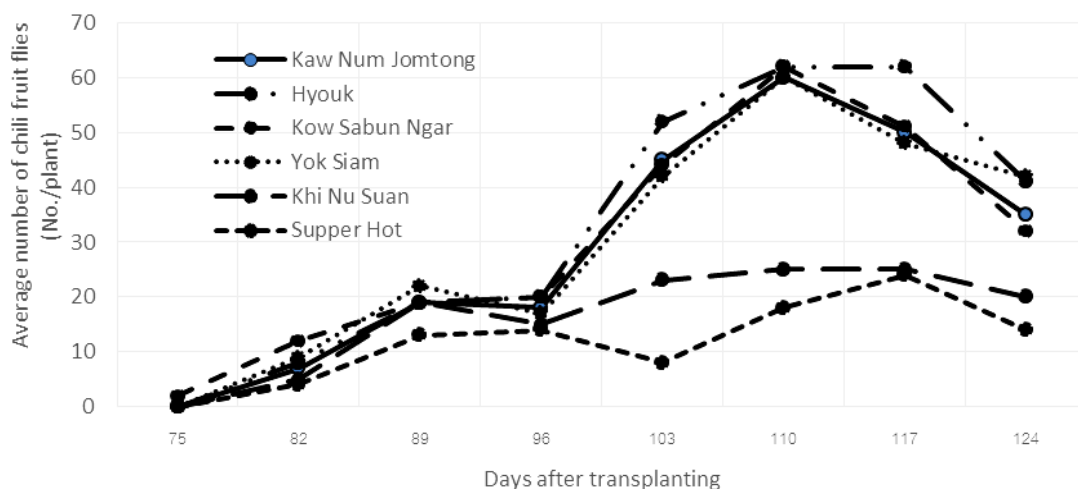


Figure 1. Population fluctuation of chili fruit flies (insects / plant) on 6 cultivars during fruit formation to harvesting (75 - 124 days old)

Table 1. Percentage of damaged chili fruit of 6 cultivars from fruit formation to harvesting stage (75 - 124 days old)

Cultivars	Percentage of fruit damaged in each chili age after transplanting (days)								Averages
	75	82	89	96	103	110	117	124	
Kaw Num Jomtong	0.0 ^a	0.7 ^a	1.9 ^a	1.8 ^a	4.5 ^{bc}	6.0 ^b	5.0 ^{bc}	3.5 ^{bc}	2.9 ^b
Hyok	0.0 ^a	0.8 ^a	1.9 ^a	2.0 ^a	5.2 ^c	6.0 ^b	6.2 ^c	4.1 ^{bc}	3.2 ^b
Kow Sabun Ngar	0.2 ^a	1.2 ^a	1.9 ^a	2.0 ^a	4.4 ^{bc}	6.0 ^b	5.1 ^{bc}	3.2 ^b	3.0 ^b
Yok Saim	0.0 ^a	0.9 ^a	2.2 ^a	1.7 ^a	4.2 ^{bc}	6.0 ^b	4.8 ^b	4.2 ^{bc}	3.0 ^b
Khi Nu Suan	0.0 ^a	0.5 ^a	1.1 ^a	1.5 ^a	2.3 ^a	2.5 ^a	2.5 ^a	2.0 ^a	1.5 ^a
Supper Hot	0.0 ^a	0.5 ^a	1.3 ^a	1.4 ^a	0.8 ^a	1.8 ^a	2.4 ^a	1.4 ^a	1.2 ^a

Means within column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$)

จากผลการสำรวจพบศัตรูธรรมชาติของแมลงวันทองพบแตนเบียนหนอนแมลงวันทอง *Diachasmimorpha longicaudata* เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่เจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยและออกมาจากหนอนของแมลงวันทองในผลพันธุ์พริกหยวกที่สุ่มเก็บจากแปลงทดลองคิดเป็นร้อยละ 2 - 5 โดยมีความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงประชากร กับประชากรแมลงวันทองที่พบ ร้อยละ 42.51 ($R^2 = 0.4251$) (Table 2)

เมื่อทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงวันทองพริกที่พบในพริกแต่ละพันธุ์ กับปัจจัย

ทางกายภาพ ได้แก่ ความชื้น และอุณหภูมิระดับสูงสุดและระดับต่ำสุด จากสภาพอากาศที่แปลงปลูก ณ วันที่สุ่มเก็บผลผลิตพริก พบว่า ปัจจัยกายภาพมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงวันทองในระดับต่ำมาก ยกเว้นในกรณีของพริกพันธุ์ซูเปอร์ฮอต พบว่าอุณหภูมิระดับสูงที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรแมลงวันทองที่ลงทำลายร้อยละ 84.02 ภายใต้ความสัมพันธ์แบบเส้นตรงบนสมการ $y = 6.18x - 112.36$ เมื่อ X คือ ระดับอุณหภูมิสูงสุด และ Y คือ จำนวนประชากรแมลงวันทอง (Figure 2)

Table 2. The number of adults of *Diachasmimorpha longicaudata* emerging from fruit fly infesting 10 chili fruits of Hyouk cultivars

Weeks	Number of <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> from each chili fruit										Total number of insects (insects / 10 chili fruits)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
5	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

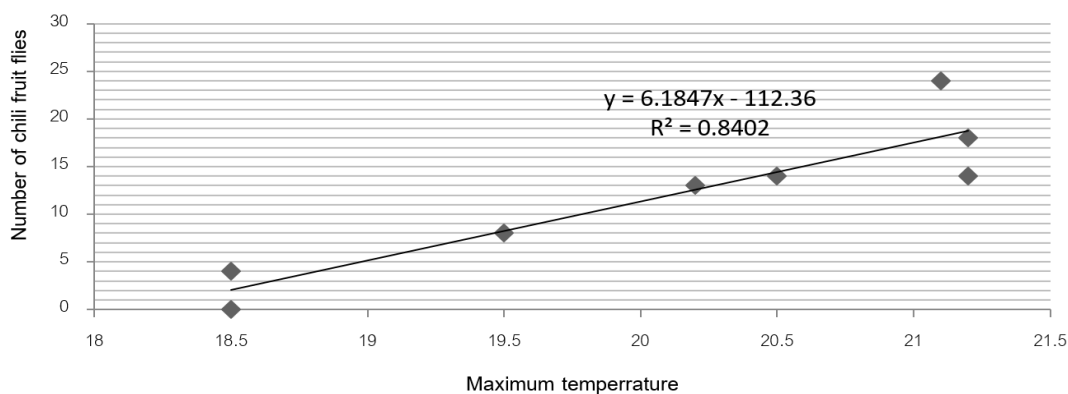


Figure 2. The relationship between population of chili fruit flies in Supper Hot cultivar and maximum temperature

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของผลพริกคือ ความกว้าง ความยาว เฉลี่ย และผิวของผลกับจำนวนแมลงวันทองพริกที่ลงทำลาย พบว่า ความกว้างของผลพริก 6 พันธุ์ มีความสัมพันธ์กับการลงทำลายของแมลงวันทองสูง ร้อยละ 55.17 - 88.7 ในขณะที่ความยาวพบร้อยละ 64.94 - 92.52 โดยพริกหยวกเป็นพันธุ์ที่มีขนาดกว้าง - ยาว สัมพันธ์กับจำนวนแมลงวันทองพริกที่พบมากที่สุด (Table 3)

เมื่อทำการจัดกลุ่มพันธุ์พริกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผิวของผลคือ รอยย่น (wrinkle) เรียบ (smooth) มันลื่น (slippery) หนา (thick) และวิเคราะห์ร่วมกับจำนวนแมลงวันทองพริกที่ลงทำลาย

พบว่า พื้นผิวของผลพริกที่ลักษณะย่น พบแมลงวันทองพริกลงทำลายมากที่สุดเฉลี่ย 20 ผลต่อต้น ซึ่งเป็นลักษณะของผลพริก เขียวหนุ่มจอมทอง หยวก ขาวสบัน งาม และหยกสยาม ส่วนขี้หนูสวน และชูเปอร์ฮอท ที่มีผิวเรียบ หนา ลื่น พบจำนวนแมลงวันทองพริกลงทำลายน้อยกว่า โดยเฉพาะลักษณะผิวหนา เฉลี่ยที่ 3.2 ผลต่อต้น (Figure 3)

ส่วนลักษณะของสีผิวของผลนั้น พบว่า ตั้งแต่ระยะติดผลจนถึงเก็บเกี่ยว สีผลของพริกประกอบด้วย 5 สี คือ เหลืองเขียว เขียว ส้มเหลือง แดงส้ม และแดงจัด โดยสีที่พบว่า แมลงวันลงทำลายมากที่สุดคือสีส้ม เหลือง เฉลี่ย 20.1 ผลต่อต้น รองลงมาคือสีแดงจัด และแดงส้ม เฉลี่ย 14.2 และ 11.6 ผลต่อต้น (Figure 4)

Table 3. The correlation coefficient values present the relation of width and length of 6 chili cultivars on the number of chili fruit flies

Cultivars	Correlation coefficient values (r)	
	Width (cm)	Length (cm)
Hyouk	88.7	92.52
Yok Siam	81.7	72.71
Kow Sabun Ngar	76.51	71.69
Kaw Num Jomtong	62.01	69.49
Khi Nu Suan	60.29	67.01
Supper Hot	55.17	64.94

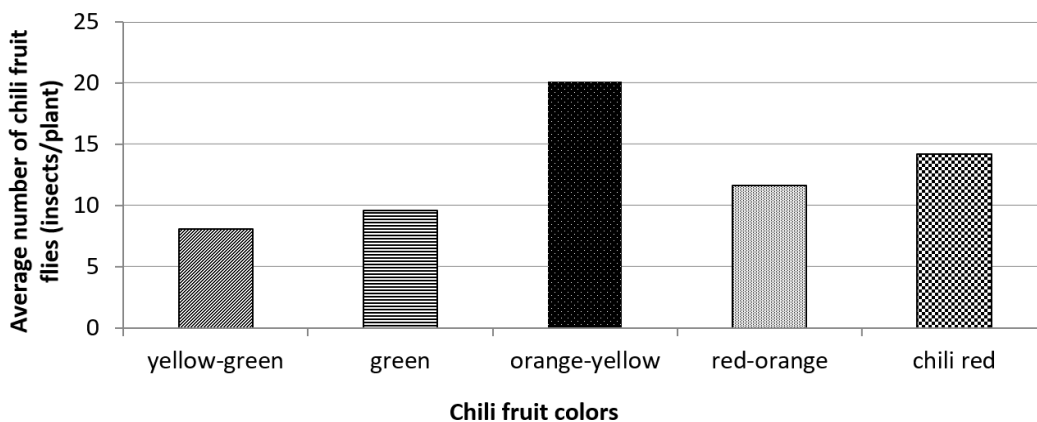


Figure 3. Infestation preference of chili fruit flies on the 4 types of chili fruit skin types from 6 chili cultivars

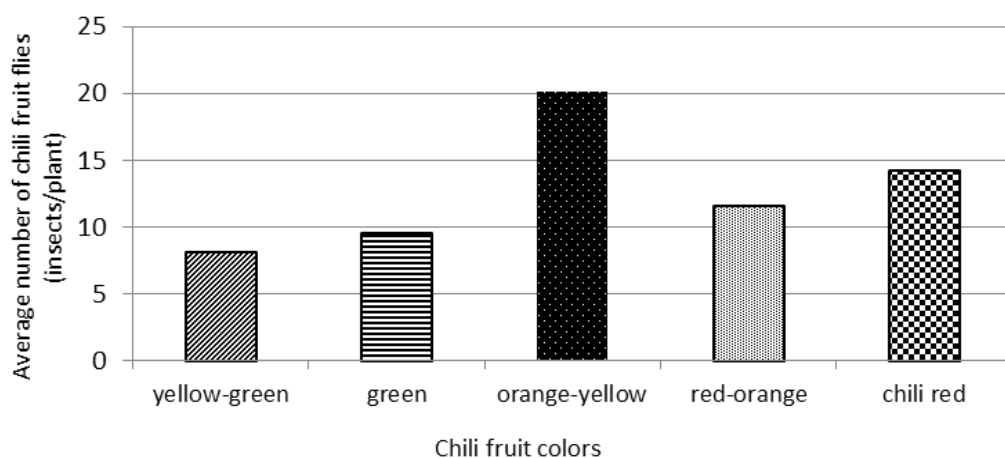


Figure 4. Infestation preference of chili fruit flies on the 5 chili fruit colors of 6 chili cultivars

วิจารณ์

ในสภาพแปลงพริกทั่วไปมักพบแมลงวันทองหลายชนิด เช่น *B. latifrons*, *B. cucurbitae* และ *B. dorsalis* ลงทำลายผลพริกร่วมกัน ทั้งผลพริก *Capsicum annuum* ที่อยู่บนต้นและหล่นบนพื้น โดยมีสัดส่วนของ *B. latifrons* สูงกว่าชนิดอื่นคิดเป็นร้อยละ 51.48 และ 70.0 ตามลำดับ (Liquidó et al., 1994) จากผลการศึกษานี้พบแมลงวันทองชนิดเดียวคือ *B. latifrons* ลงทำลายพริก 6 พันธุ์ตลอดระยะเวลาการปลูกตั้งแต่ผลพริกชุดแรกจนเก็บเกี่ยว และมีประชากรสูงสุดในช่วงอายุพริกที่ 110 - 117 วัน เฉลี่ย 18 - 62 ผลต่อต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Harris et al. (2003) ที่พบแมลงวันทองพริก (*B. latifrons*) เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ลงทำลายพริกแสดงถึงความเฉพาะเจาะจงของแมลงวันทองพริกต่อพริกพันธุ์ต่าง ๆ มากกว่าแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ทั้งนี้ Vargas and Nishida (1985) พบว่า แมลงวันทองพริก (*B. latifrons*) สามารถลงทำลายตั้งแต่พริกอายุ 64 - 133 วันหลังปลูกซึ่งเป็นระยะติดผลจนถึงระยะเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยพบความเสียหายของผลพริกสูงถึง 79.6 ตัวต่อกิโลกรัม เมื่อพริกอายุ 73 - 123 วันหลังปลูก

ศัตรูธรรมชาติ ของแมลงวันทองโดยทั่วไปคือแตนเบียน *Diachasmimorpha longicaudata* สามารถลงทำลายหนอนแมลงวันทองพริกในสภาพแปลงสูงกว่าร้อยละ 70 (Liquidó et al., 1994) แต่ในการศึกษานี้

พบการลงทำลายแมลงวันทองพริกเฉพาะในพริกหยวกเท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 2 - 5 ในขณะที่ปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงวันทองพริกน้อยมาก ยกเว้น อุณหภูมิระดับสูงที่มีผลต่อแมลงวันทองพริกในพริกขี้นหนูซูเปอร์ฮอทเท่านั้นคิดเป็นร้อยละ 84.02 สอดคล้องกับการศึกษาของ Nandihalli et al. (1989) ที่พบว่า ปัจจัยของอุณหภูมิ 29.5 °C เป็นอุณหภูมิสูงสุดที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงวันทองมากที่สุดร้อยละ 64

Balagawi et al. (2005) รายงานว่า รูปร่างและขนาดของผลพริกถือเป็นปัจจัยสำคัญต่อการค้นหาแหล่งวางไข่ที่เหมาะสมของแมลงวันผลไม้ โดยผลที่มีขนาดใหญ่ตอบสนองต่อความชอบในการวางไข่ของแมลงวันผลไม้และดึงดูดแมลงให้ลงวางไข่มากกว่าผลไม้ขนาดเล็ก (Poramarcom, 2000) เช่นเดียวกับในการศึกษานี้ที่พบว่า การลงทำลายของแมลงวันทองพริกในพริก 6 พันธุ์ มีแนวโน้มชอบลงทำลายในพริกหยวกเขียวหนุ่มจอมทอง ขาวสับนงา หยกสยาม มากที่สุดและลงทำลายพริกขี้นหนูสวน และซูเปอร์ฮอท น้อยที่สุดและเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลพริก พบว่า มีความสัมพันธ์กับลักษณะความกว้างและความยาว ร้อยละ 88.7 และ 92.5 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Jaturat (2007) ที่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวสูงถึงร้อยละ 85 - 95 ซึ่งหมายถึงผลพริกขนาดใหญ่มีแนวโน้มถูกลงทำลายได้มากกว่าผลพริกขนาดเล็ก

ทั้งนี้ เนื่องจากขนาดของผลมีส่วนสำคัญต่อการรอดชีวิตของหนอนแมลงวันทองในผล ผลขนาดใหญ่มีอาหารและพื้นที่อาศัยรองรับการเจริญเติบโตได้มากกว่า (Peck and McQuate, 2004) ในขณะที่ Wingsanoi and Siri (2011) พบว่า ความกว้างและยาวของผลพริกมีความสัมพันธ์การลงทำลายร้อยละ 49 และ 25 เท่านั้น ส่วนลักษณะผิวของผล พบว่า ผิวที่ย่นของผลทั้ง 4 พันธุ์ข้างต้น ดึงดูดให้แมลงวันทองพริกลงทำลายได้มากกว่าผิวเรียบ เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Wingsanoi and Siri (2011) ทั้งนี้ เป็นผลจากพฤติกรรมการเลือกของแมลงวันทองในการวางไข่ ที่ชอบวางไข่ในผลที่มีผิวขรุขระ มีรอยแตกย่น (Prokopy and Koyama, 1982) มากกว่าผิวเรียบ มัน และเหนียว (Pritchard, 1969)

นอกจากนี้ สีของผลในระยะต่าง ๆ มีผลอย่างมากต่อความชอบในการลงทำลายของแมลง โดย Smith (1989) พบว่า แมลงในอันดับ Coleoptera, Diptera, Homoptera, Lepidoptera และ Thysanoptera ตอบสนองต่อเม็ดสี (pigment) สีเหลือง หรือสีเหลืองเขียว ที่มีความยาวแสงระหว่าง 500 - 580 นาโนเมตรมากที่สุด Jaturat (2007) รายงานว่า แมลงวันทองพริกสามารถลงทำลายผลพริกได้ทุกสี ทั้งสีเขียว เขียวอ่อน เหลือง และแดง ในขณะที่ Pickering and Stock (2003) รายงานว่า สีขาว และ เหลืองเป็นสีที่ดึงดูดแมลงในอันดับ Diptera มากที่สุด อย่างไรก็ตาม ช่วงความถี่ของสีอาจมีความแตกต่างไปตามกลุ่มของแมลงได้เช่นกัน ในกรณีของแมลงวันทอง พบว่า มีการตอบสนองต่อสีแตกต่างกันไปตามชนิดของแมลงวันทอง เช่น *Anastrepha obliqua* ตอบสนองต่อแสงช่วง 380 ถึง 570 นาโนเมตร ซึ่งอยู่ในช่วงของแสงอัลตราไวโอเล็ตและช่วงแสงสีเหลือง (López-Guillén *et al.*, 2009) เช่นเดียวกับ *Rhagoletis pomonella* ตอบสนองต่อแสงช่วง 380 ถึง 670 นาโนเมตร ซึ่งอยู่ในช่วงของแสงอัลตราไวโอเล็ตและช่วงแสงสีแดง (Drew *et al.*, 2003) โดยมี ช่วงที่ตอบสนองสูงสุดมีคือ 600 ถึง 625 นาโนเมตร เป็นช่วงของแสงสีส้มถึงแดง (Agee, 1985) ในขณะที่ Robacker *et al.* (1990) และ Robacker (1992) พบว่า *Anastrepha ludens* มีความจำเพาะในตอบสนองต่อแสงสีเหลืองและเขียวมากที่สุด อย่างไรก็ตาม *A. suspensa* ตอบสนองต่อ

สีส้มมากที่สุด (580 - 590 นาโนเมตร) (Greany *et al.*, 1977) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลการศึกษานี้ที่พบว่า สีผลพริกที่ดึงดูดแมลงวันทองได้ดีอยู่ในช่วงแดงสีเหลืองส้มถึงแดง ซึ่งอยู่ในระยะผลสุก โดยสีส้มเหลืองดึงดูดได้สูงสุด เฉลี่ย 20.1 ตัวต่อต้น ส่วนในระยะผลอ่อนนั้นสีที่ดึงดูดแมลงวันทองพริกมากที่สุดเป็น เขียว แตกต่างจากผลการศึกษาของ Wingsanoi and Siri (2011) ที่พบว่า แมลงวันพริก (*B. latifrons*) ลงทำลายผลสีเขวามากกว่าสีเขียว

สรุป

การศึกษานิตและปริมาณของแมลงวันทอง *Bactrocera* ที่ลงทำลายในพริก 6 พันธุ์และศัตรูธรรมชาติ พบว่า แมลงวันทองชนิดเดียว คือ *B. latifrons* ตลอกระยะการปลูกตั้งแต่ผลพริกชุดแรกจนเก็บเกี่ยวรวมระยะเวลา 8 สัปดาห์ และเช่นเดียวกับแตนเบียนหนอนแมลงวันทองที่พบ *D. longicaudata* ชนิดเดียว จากหนอนแมลงวันทองพริกที่ลงทำลายพริกหยวก โดยการเปลี่ยนแปลงประชากรแตนเบียนหนอนแมลงวันทอง มีความสัมพันธ์ กับการเปลี่ยนแปลงประชากรแมลงวันทองพริกร้อยละ 42.51

ประชากรของแมลงวันทองเริ่มพบลงทำลายในพริกในช่วงที่พริกอายุ 75 วัน และสูงสุดที่ 110 - 117 วัน โดยพบการลงทำลายสูงในพริกหยวก ขาวสับนงา หยกสยาม และเขียวหนุ่มจอมทอง อยู่ในช่วงร้อยละ 3.2 - 6.2 ในขณะที่พันธุ์พริกขี้หนูสวน และซูเปอร์ฮอทพบน้อยกว่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.8 - 2.5

ปัจจัยกายภาพมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงวันพริกในระดับต่ำมาก ยกเว้นในกรณีของพริกพันธุ์ซูเปอร์ฮอท ระดับอุณหภูมิสูงที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรแมลงวันทองพริกที่ลงทำลายร้อยละ 84.02

ความกว้าง - ยาว ของผลพริกหยวก สัมพันธ์กับจำนวนแมลงวันทองพริกที่พบมากที่สุด ร้อยละ 88.7 และ 92.52 ตามลำดับ ลักษณะเย้นของพื้นผิวผลพริกเขียวหนุ่มจอมทอง หยวก ขาวสับนงา และหยกสยามพบแมลงวันทองพริกลงทำลายมากที่สุดเฉลี่ย 20

ผลต่อต้าน ส่วนพื้นผิวผลเรียบ หนา ลื่น ของพริก ขี้หนูสวน และซูเปอร์ฮอท พบจำนวนแมลงวันทองพริกลงทำลายน้อยกว่าสีที่พบว่า แมลงวันลงทำลายมากที่สุดคือ สีส้มเหลือง เฉลี่ย 20.1 ผลต่อต้าน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเกษตรกรแปลงตำบลบ้านป่า อำเภอมะนัง จังหวัดพิษณุโลกในการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี กลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกพริก ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษาและทุกท่านที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องให้สำเร็จ ลุล่วงอย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่าที่สุด ทำให้งานวิจัยประสบความสำเร็จและลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Agee, H.R. 1985. Spectral response of the compound eye of the wild and laboratory-reared apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella*. Journal of Agricultural Entomology 2(2): 147-154
- Balagawi, S., S. Vijayasegaran, R.A.I. Drew and S. Raghu. 2005. Influence of fruit traits on oviposition preference and offspring performance of *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae) on three tomato (*Lycopersicon lycopersicum*) cultivars. Australian Journal of Entomology 44(2): 97-103.
- Drew, R.A.I., R.J. Prokopy and M.C. Romig. 2003. Attraction of fruit flies of the genus *Bactrocera* to colored mimics of host fruit. Entomologia Experimentalis et Applicata 107(1): 39-45.
- Greany, P.D., H.R. Agee, A.K. Burditt and D.L. Chambers. 1977. Field studies on color preferences of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). Entomologia Experimentalis et Applicata 21(1): 63-70.
- Harris, E.J., N.J. Liquido and C.Y.L. Lee. 2003. Patterns in appearance and fruit host utilization of fruit flies (Diptera: Tephritidae) on the Kalaupapa Peninsula, Molokai, Hawaii. Proceedings of the Hawaiian Entomological Society 36: 69-78.
- Hassunthathai, N. and S. Mooncharwna. 2008. Comparative study of chili production systems in Phitsanulok province. M.S. Thesis. Naresuan University, Phitsanulok. 63 p. (in Thai)
- Jaturat, K. 2007. The relationship between morphological characteristics of chilli fruits and infestation of fruit fly (*Bactrocera latifrons* (Hendel). M.S. Thesis. Kasetsart University, Bangkok. 97 p. (in Thai)
- Liquido, N.J., E.J. Harris and L.A. Dekker. 1994. Ecology of *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae) populations: host plants, natural enemies, distribution, and abundance. Annals of the Entomological Society of America 87(1): 71-84.
- López-Guillén, G., A. Virgen and J.C. Rojas. 2009. Color preference of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). Revista Brasileira de Entomologia 53(1): 157-159.
- Nandihalli, B.S., B.V. Patil, S. Somasekhar and P. Hugar. 1989. Influence of weather parameters on the population dynamics of *Spodoptera litura* (Fb.) in pheromone and light traps. Karnataka Journal of Agricultural Science 2: 62-67.
- Office of Agricultural Economics. 2017. Agricultural Statistical Documents of Thailand, year 2017. Office of Agricultural Economics, Bangkok.

-
- Peck, S.L. and G.T. McQuate. 2004. Ecological aspects of *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae) on Maui, Hawaii: Movement and host preference. *Environmental Entomology* 33(6): 1722-1731.
- Pickering, C.M. and M. Stock. 2003. Insect colour preference compared to flower colours in the Australian Alps. *Nordic Journal of Botany* 23(2): 217-233.
- Pritchard, G. 1969. The ecology of a natural population of Queensland fruit fly, *Dacus tryoni*. II. The distribution of eggs and its relation to behaviour. *Australian Journal of Zoology* 17(2): 293-311.
- Poramarcom, P. 2000. Oviposition behavior of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* and melon fly, *Bactrocera cucurbitae* for the development of population control. Faculty of Agriculture Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok. 37 p. (in Thai)
- Prokopy, R.J. and J. Koyama. 1982. Oviposition site partitioning in *Dacus cucurbitae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 31(4): 428-432.
- Robacker, D.C., D.S. Moreno and D.A. Wolfenbarger. 1990. Effects of trap color, height, and placement around trees on capture of Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 83(2): 412-419.
- Robacker, D.C 1992. Effects of shape and size of colored traps on attractiveness to irradiated, laboratory-strain Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* 75(2): 230-241.
- Shimizu, Y., T. Kohama, T. Uesato, T. Matsuyama and M. Yamagishi. 2007. Invasion of solanum fruit fly *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae) to Yonsguni Island, Okinawa Prefecture, Japan. *Applied Entomology and Zoology* 42(2): 269-275.
- Siri, N. 2007. Fruit fly (*Bactrocera latifrons*): Potential of chili production for the Thailand export industry at present and in the future. Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 46 p (in Thai)
- Smith, C.M. 1989. Plant Resistance to Insect: A Fundamental Approach. John Wilog & Sons, New York 286 p.
- Stonehouse, J., J. Mumford, A. Poswal, R. Mahmood, A.H. Makhdum, Z.M. Chaudhary, K.N. Baloch, G. Mustafa and M. McAllister. 2004. The accuracy and bias of visual assessments of fruit infestation by fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Crop Protection* 23(4): 293-296.
- Vargas, R.I. and T. Nishida. 1985. Life history and demographic parameters of *Dacus latifrons* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 78(6): 1242-1244
- Wingsanoi, A and N. Siri. 2011. Infestation of chili fruit fly, *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae) on eight chili fruit cultivars. *Khon Kaen Agriculture Journal* 39(1): 25-32.p (in Thai)
-

การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์ที่มีความแม่นยำสูง สำหรับประเมินสัดส่วนเพศของอสุจิในน้ำเชื้อพ่อโคนม

Development of High Accuracy Multiplex Real-time PCR Technique for Determining Sperm Sex Ratio in Dairy Bull Semen

ทฤษฎี คำหล่อ^{1*} กรวรรณ ศรีงาม¹ ศุภมิตร เมฆฉาย¹
วัชรพงศ์ นรพัลลภ¹ และ นิภา ไชคส์จจะวาที²
Trisadee Khamlor^{1*}, Korawan Sringam¹, Supamit Mekchay¹,
Watcharapong Naraballoh¹ and Nipa Chokesajjawatee²

¹ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹Department of Animal and Aquatic Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จ. ปทุมธานี 12120

²National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency,
Pathum Thani 12120, Thailand

*Corresponding author: Email: trisadee.kha@gmail.com

(Received: 29 September 2020; Accepted: 17 December 2020)

Abstract: Sperm sex ratio determination using PCR - based technique is widely validated on precise of X - and Y - chromosome purity in sex - sorted bovine semen. The aim of this study was to develop a technique for estimating sperm sex ratio by using a multiplex polymerase chain reaction (multiplex real - time PCR). The X and Y chromosome - specific markers, bovine proteolipid protein (PLP) gene and sex - determining region Y (SRY), were simultaneously quantified in a single tube. To quantify DNA products, Taqman probe - labeled fluorescence was used in the reaction i.e., PLP probe labeled HEX dye, and SRY probe labeled FAM dye. The reference DNA of male peripheral white blood cell (WBC) was used as a template for constructing the standard curve, which contained an equal ratio between X - chromosome and Y - chromosome. The standard curve of both PLP and SRY genes showed two linear equations for calculating the proportion of X - and Y - sperm ratio. The WBC standard curve indicated an average straight - line slope as -3.330, representing high - efficiency (99.66 %) of the reaction to synthesize new DNA amplicons. Nine samples of bull semen, Y - sorted semen (Y = 90 %), semen samples with Y ratio in 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, and X - sorted semen (Y = 10 %), were prepared and quantified by using the multiplex real - time PCR technique. Two standard techniques (singleplex real - time PCR technique and multiplex droplet digital PCR technique (ddPCR)) were amplified X - and Y - chromosome specific genes and compared with the developed technique. Each sample was run in triplicate and calculated in percentage of Y

sperm ratio. Results obtained from those three assays were not significantly different. Therefore, the multiplex real - time PCR assay in this study was cost - effective, reduce time - consuming, and providing an accurate estimation method.

Keywords: Dairy bull semen, sperm sex ratio, sex - sorted sperm, multiplex real - time PCR

บทคัดย่อ: การประเมินสัดส่วนเพศของอสุจิด้วยเทคนิคพีซีอาร์เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการประเมินความบริสุทธิ์ของสัดส่วนอสุจิ X และอสุจิ Y ในน้ำเชื้อพ่อโคที่ผ่านกระบวนการคัดแยกเพศ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการประมาณอัตราส่วนเพศของอสุจิ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์ (multiplex real - time PCR) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจพร้อมกันในหลอดเดียวด้วยชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน proteolipid protein (PLP) บนโครโมโซม X และไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน sex - determining region Y (SRY) บนโครโมโซม Y แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์เส้นใหม่ด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ติดที่โพรบ (Taqman) โดยโพรบของยีน PLP ติดสี HEX และโพรบของยีน SRY ติดสี FAM และใช้ดีเอ็นเออ้างอิงจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้ ซึ่งมีอัตราส่วนของโครโมโซม X และโครโมโซม Y ที่เท่ากัน สร้างเป็นกราฟเส้นตรงมาตรฐาน จากการศึกษาได้กราฟเส้นตรงมาตรฐานของยีน PLP และ ยีน SRY แสดงสมการเชิงเส้นสองสมการสำหรับคำนวณอัตราส่วนอสุจิ X และอสุจิ Y โดยมีค่าความชันเฉลี่ยของกราฟเส้นตรงทั้งสองเท่ากับ -3.330 แสดงถึงปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ (ร้อยละ 99.66) ทดสอบความแม่นยำของการประเมินสัดส่วนเพศอสุจิด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR ในตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อโคนมจำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำเชื้อคัดเพศผู้มีอสุจิ Y ร้อยละ 90 ตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีอสุจิ Y สัดส่วนร้อยละ 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 และตัวอย่างน้ำเชื้อคัดเพศเมียมีอสุจิ Y ร้อยละ 10 ตามลำดับ เปรียบเทียบผลการคำนวณสัดส่วนอสุจิด้วยเทคนิคมาตรฐานสองเทคนิคคือ ซิงเกิลเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์แบบแยกหลอด (singleplex real - time PCR) และเทคนิคมัลติเพล็กซ์ดรอปเล็ตดิจิทัลพีซีอาร์ (multiplex droplet digital PCR) ซึ่งแต่ละตัวอย่างถูกทดสอบจำนวนสามซ้ำ แสดงผลการคำนวณเป็นร้อยละของอสุจิ Y จากการเปรียบเทียบผลการประมาณอัตราส่วนเพศอสุจิ พบว่า ทั้งสามเทคนิคสามารถคำนวณสัดส่วนเพศได้ถูกต้องใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ทราบค่าที่เตรียมไว้และได้ผลการคำนวณสัดส่วนของอสุจิ Y ใกล้เคียงกันทั้งหมด โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังนั้น เทคนิค multiplex real - time PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้จึงคุ้มค่า ประหยัดเวลา และให้ผลการประเมินสัดส่วนเพศที่แม่นยำ

คำสำคัญ: น้ำเชื้อโคนม สัดส่วนเพศอสุจิ การคัดแยกเพศอสุจิ มัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์

คำนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมหรือธุรกิจฟาร์มโคนมต้องการลูกโคเพศเมีย เพื่อเลี้ยงเป็นโคสาวทดแทนฝูงและเป็นแม่โคสำหรับผลิตน้ำนม หากสามารถเพิ่มสัดส่วนลูกโคนมเพศเมียให้มีจำนวนมากกว่าลูกโคเพศผู้ได้ ถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มศักยภาพการผลิตและมีโอกาสผลิตน้ำนมดิบในฟาร์มได้มากขึ้นตามลำดับ น้ำเชื้อจากพ่อโคเป็นตัวกำหนดเพศของลูกสัตว์

เนื่องจากอสุจิ X (เพศเมีย) และอสุจิ Y (เพศผู้) รวมกันในสัดส่วนร้อยละ 50 : 50 ปัจจุบันการผลิตลูกโคเพศเมียสามารถทำได้ด้วยการใช้น้ำเชื้อคัดแยกเพศผสมเทียมในแม่โคนม น้ำเชื้อที่ผ่านการแยกเพศดังกล่าวสามารถเพิ่มโอกาสได้ลูกโคเพศเมียมากกว่าร้อยละ 90 ขณะที่น้ำเชื้อปกติไม่ผ่านการคัดแยกเพศให้สัดส่วนลูกโคเพศเมียต่อเพศผู้ในสัดส่วนเท่ากัน งานวิจัยหลายงานที่ผ่านมาศึกษาวิธีการแยกอสุจิ X และอสุจิ Y ออกจากกัน เช่น การคัดแยกเพศอสุจิโดยใช้ความแตกต่าง

ของแอนติเจนบนผิวเซลล์เพศผู้ (H - Y antigen) ใช้การทำงานของปฏิกิริยาไซโตทอกซิก (cytotoxic reaction) ทำลายเซลล์อสุจิ Y (Goldberg *et al.*, 1971) การเกาะกลุ่มกันตกตะกอนของเซลล์อสุจิ โดยอาศัยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์ (agglutination) (Blecher *et al.*, 1999) การใช้สารละลายโปรตีนอัลบูมิน (Ericsson *et al.*, 1973) และสาร percoll ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (Iwasaki *et al.*, 1988) การแยกเพศอสุจิโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักอสุจิทั้งสอง ซึ่งอสุจิ X มีน้ำหนักของดีเอ็นเอมากกว่าร้อยละ 3.8 ทำให้มีการเคลื่อนที่แตกต่างกัน สามารถแยกชั้นอสุจิที่เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าออกมาได้ (swim - up technique) (Claassens *et al.*, 1995; Machado *et al.*, 2009; Madrid-Bury *et al.*, 2003) รวมถึงการใช้เทคนิคโฟลไซโต-เมทรี (flow cytometry) เป็นเทคนิคการแยกอสุจิด้วยปริมาณดีเอ็นเอที่ต่างกัน ได้ความบริสุทธิ์ของเพศอสุจิสูงถึงร้อยละ 90 (Garner *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 1989; Maxwell *et al.*, 2004)

อย่างไรก็ตาม น้ำเชื้อพ่อโคที่ผ่านกระบวนการคัดเพศ มักถูกนำมาประเมินสัดส่วนเพศอสุจิที่เปลี่ยนไป การประเมินสัดส่วนเพศเป็นขั้นตอนที่สำคัญสามารถช่วยยืนยันความสำเร็จของการคัดแยกเพศก่อนนำน้ำเชื้อไปผสมเทียมในภาคสนาม โดยการศึกษาที่ผ่านมาได้พัฒนานิ่ววิธีการประเมินสัดส่วนเพศอสุจิในน้ำเชื้อคัดเพศด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การย้อมสีโครโมโซมเพศด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ หรือ fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เป็นวิธีการตรวจวัดที่มีความแม่นยำสูงสำหรับการระบุเพศของตัวอสุจิตัวเดียว (single spermatozoa) โดยอสุจิถูกย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ และนำไปตรวจทดสอบสัญญาณสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (Habermann *et al.*, 2005; Piume *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2006) ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำในการระบุเพศสูงมากกว่าร้อยละ 99 เมื่อใช้จำนวนอสุจิหลายหมื่นตัวในการทดสอบ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ใช้เวลาทดสอบนาน สิ้นเปลืองสารเคมีและแรงงาน จึงเป็นข้อจำกัดหากมีตัวอย่างในการวิเคราะห์เป็นจำนวนมาก

การประเมินสัดส่วนเพศด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) เป็นเทคนิคการตรวจดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศของอสุจิ โดยแยกอสุจิเป็นตัวเดียวเพียง 1 ตัว (single sperm) นำอสุจิแต่ละตัวมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเพศเมียที่อยู่บนโครโมโซม X และยีนที่จำเพาะต่อเพศผู้ที่อยู่บนโครโมโซม Y (Colley *et al.*, 2008, Welch *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตาม การประเมินสัดส่วนเพศด้วยวิธีการดังกล่าวต้องแยกอสุจิเดี่ยวเป็นจำนวนมากเพื่อเพิ่มความแม่นยำ และวิธีนี้ใช้เวลาทดสอบนาน 3 - 5 ชั่วโมง จึงทราบผล ทำให้เป็นข้อจำกัดของเทคนิค PCR หากมีตัวอย่างทดสอบจำนวนมาก

เทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเรียลไทม์ (real - time PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ขยายปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบและอ่านผลในเวลาเดียวกัน ใช้ทดสอบตัวอย่างในเชิงปริมาณ การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบจะใช้สัญญาณสีฟลูออเรสเซนต์ในการส่งสัญญาณออกมา ตัวส่งสัญญาณสีที่นิยมใช้มี 2 แบบ คือ (1) สีเรืองแสงที่ไม่เฉพาะเจาะจง เช่น สีเขียวของสาร SYBR green ที่จับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ และ (2) โพรบติดสีที่จำเพาะต่อลำดับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยโพรบถูกกระตุ้นทำให้เกิดการเรืองแสงและส่งสัญญาณแสงไปยังเครื่องรับสัญญาณที่สามารถจับสัญญาณดังกล่าวในแต่ละรอบได้ Joerg *et al.* (2004) ศึกษาการประเมินสัดส่วนเพศน้ำเชื้อโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อยีน sex - determining region Y (SRY) ในเพศผู้และยีนควบคุมปฏิกิริยา (MSHR) และการศึกษาของ Parati *et al.* (2006) ใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อเพศเมีย ซึ่งอยู่บนโปรตีน proteolipid (PLP) และยีนที่จำเพาะต่อเพศผู้คือ ยีน SRY ในการศึกษาทั้งสองแบ่งดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการสกัดอสุจิออกเป็นสองส่วนเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศผู้ 1 หลอด และเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอควบคุมเพื่อระบุความสำเร็จของปฏิกิริยา (หรือยีนที่จำเพาะต่อเพศเมีย) อีก 1 หลอด (singleplex real - time PCR) และใช้โพรบติดสีชนิดเดียวกันในการตรวจจับสัญญาณแสง ค่าที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้พลาสมิดเป็น

ค่าอ้างอิงมาตรฐาน ผลการทดสอบจากเทคนิค real-time PCR ไม่แตกต่างจากการตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometry วิธีการประเมินสัดส่วนเพศด้วยวิธีนี้มีความแม่นยำและให้ผลน่าเชื่อถือ และง่ายต่อการปฏิบัติ อย่างไรก็ตามการประเมินสัดส่วนเพศอสุจิด้วยวิธีดังกล่าวยังมีความเสี่ยงจากข้อผิดพลาดได้ เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากอสุจิมิมีปริมาณน้อย และตัวควบคุมไม่ได้อยู่ในปฏิกิริยาที่สนใจในหลอดเดียวกัน ดังนั้น เพื่อลดความผิดพลาด ลดความซับซ้อนของการทดสอบและลดค่าใช้จ่ายของสารเคมี ในการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการประเมินสัดส่วนเพศอสุจิในน้ำเชื้อพ่อโคนมที่ผ่านกระบวนการคัดแยกเพศ โดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์ (multiplex real-time PCR) รวมไพรเมอร์และโพรบของยีน *PLP* และยีน *SRY* อยู่ในหลอดเดียวกัน รวมถึงการใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้สร้างเป็นกราฟมาตรฐานทดแทนการใช้พลาสมิด

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้

เซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้ 50 มิลลิกรัม ถูกล้างด้วยสารละลาย 1xPBS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้ง นำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของชุดสกัด wizard® genomic DNA purification kit (Promega, USA) โดยเติม 5 % (w/v) Chelex® 100 (Biorad, USA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร, proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Inc., USA) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 14 -16 ชั่วโมง จากนั้นเติม protein precipitation solution จากชุดสกัดดีเอ็นเอปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำหลอดตัวอย่างแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน ใช้ปิเปตดูดเก็บเฉพาะ

สารละลายส่วนใสด้านบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ จนเริ่มเห็นตะกอนดีเอ็นเอเป็นสายสีขาวคล้ายวุ้น นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ล้างด้วยเอทานอล (70 %) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนที่เป็นเอทานอลทิ้ง นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปผึ่งให้แห้ง แล้วเติมสารละลาย TE buffer (pH 8.0, Sigma-Aldrich, Inc., USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และแช่เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR

การทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *PLP* บนโครโมโซม X และไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน *SRY* บนโครโมโซม Y ในโคนม (Parati *et al.*, 2006) โดยลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบแสดงใน Table 1 สารเคมีในการทำปฏิกิริยา (PCR mixture) ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1) SensiFAST™ Probe (Bioline, UK) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, 2) ไพรเมอร์จำเพาะต่อเพศเมีย (*PLP* - forward, *PLP* - reverse) อย่างละ 400 นาโนโมลาร์ และ โพรบ (*PLP* - probe) 200 นาโนโมลาร์ ติดสีฟลูออเรสเซนต์ชนิดสี HEX, 3) ไพรเมอร์จำเพาะต่อเพศผู้ (*SRY*-forward, *SRY*-reverse) อย่างละ 400 นาโนโมลาร์ และ โพรบ (*SRY* - probe) 200 นาโนโมลาร์ ติดสีฟลูออเรสเซนต์ชนิดสี FAM (Integrated DNA Technologies, Inc., USA), 4) ดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร และ 5) น้ำเปล่าเติมให้ครบปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง real-time PCR (MJ PTC-200 Chromo4, Bio-Rad, USA) ใช้โปรแกรม opticon monitor 3 ควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา โดยมีรายละเอียดการทำปฏิกิริยาดังนี้: ขั้นที่ 1 denaturation: 95 °C 5 นาที ขั้นที่ 2 denaturation: 95 °C 15 วินาที annealing: 60 °C 45 วินาที extension: 72 °C 30 วินาที วนซ้ำจำนวน 40 รอบ โดยตั้งค่าให้อ่านผลจากสัญญาณแสงทุกรอบ ขั้นที่ 3 final extension: 72 °C 5 นาที

Table 1. Primer and probe sequences used in this experiment

Primer / Probe	Sequence (5' → 3')	Product size (bp)
X chromosome - specific		96
PLP - forward	GTTGTGTTAGTTTCTGCTGTACAATAAAGTG	
PLP - reverse	GATGGCAGGTGAGGGTAGGA	
PLP - probe	HEX - TGTATACACATAGCCCCTCCCTCTTGGA CC	
Y chromosome - specific		66
SRY - forward	CCACGTCAAGCGACCCAT	
SRY - reverse	AGAGCCACCTTTCGTCTTCG	
SRY - probe	FAM - AACGCCTTCATTGTGTGGTCTCGTGA	

การสร้างกราฟมาตรฐานจากดีเอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวโคนมเพศผู้

ดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโคนมเพศผู้ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอในการทดลองข้างต้น ถูกวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop1000 spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA) เตรียมดีเอ็นเอเซลล์เม็ดเลือดขาวให้มีความเข้มข้น 1,000, 200, 40, 8, 1.6 และ 0.32 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างทั้ง 6 ตัวอย่างด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR รวมไพรเมอร์และไพร์มที่จำเพาะต่อยีน *PLP* และยีน *SRY* ในหลอดเดียว การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอผลลัพธ์เส้นใหม่ในแต่ละรอบปฏิกิริยาจะแสดงผลด้วยการวัดค่าจากสัญญาณสี HEX และ FAM เมื่อลากเส้นตรง threshold line ตัดกราฟสัญญาณสีฟลูออเรสเซนต์ ได้ค่าคงที่ของรอบการเกิดปฏิกิริยา (cycle threshold; CT) ต่อค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอซึ่งเปลี่ยนเป็นค่าลอการิทึมฐาน 10 ($\log C$) นำค่าคู่อันดับของ CT และ $\log C$ มากำหนดจุดได้ 6 จุดเรียงกันอยู่แนวเส้นตรง สร้างเป็นสมการเชิงเส้นสองตัวแปรคือ $Y = a + bX$ (เมื่อ Y คือค่า cycle threshold; CT, a คือค่าคงที่ของสมการเส้นตรง, b คือค่าความชันของกราฟเส้นตรง (slope), และ X คือค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอแสดงเป็นค่าลอการิทึมฐาน 10; $\log C$) โดยสมการที่ได้จากยีน *PLP* ใช้สำหรับคำนวณสัดส่วนอสุจิ X และสมการที่ได้จากยีน *SRY* ใช้คำนวณสัดส่วน

อสุจิ Y ในตัวอย่างน้ำเชื้อที่ยังไม่ทราบค่าในการทดลองต่อไป

การประเมินสัดส่วนเพศอสุจิในน้ำเชื้อโคนมด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR

ตัวอย่างน้ำเชื้อที่นำมาทดสอบในการศึกษานี้เป็นน้ำเชื้อพ่อโคนมที่ผ่านกระบวนการคัดแยกเพศอสุจิด้วยเทคนิค flow cytometry (Accelerated Genetics, Inc., WI, USA) โดยบริษัทผู้ผลิตระบุน้ำเชื้อคัดเพศเมีย (X - sorted semen) มีสัดส่วนของอสุจิ X มากกว่าร้อยละ 90 และน้ำเชื้อคัดเพศผู้ (Y - sorted semen) มีสัดส่วนของอสุจิ Y มากกว่าร้อยละ 90 ทำการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อคัดเพศเมียและน้ำเชื้อคัดเพศผู้ โดยละลายน้ำเชื้อใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์อสุจิ นับจำนวนอสุจิของน้ำเชื้อคัดเพศเมีย และน้ำเชื้อคัดเพศผู้ให้มีจำนวนอสุจิ 250,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยเติม 5 % (w/v) Chelex[®] 100 (Biorad, USA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร, proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ dithiothreitol (DTT; Sigma - Aldrich, Inc., USA) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 14 -16 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดนานประมาณ 10 นาที และปั่นเหวี่ยง 5 วินาที ดูดีเอ็นเอส่วนใสด้านบนมาวัด

ความเข้มข้นและปรับความเข้มข้นเป็น 10 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร และเตรียมให้มีสัดส่วน Y เท่ากับร้อยละ 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 และ 10 ตามลำดับ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR โดยแต่ละตัวอย่างถูกนำมาทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ ค่า CT ที่ได้จากรอบสัญญาณสี ฟลูออเรสเซนซ์ของยีน *PLP* และยีน *SRY* นำมาแทนค่า Y ในสมการที่สร้างจากกราฟมาตรฐาน ได้ค่าความเข้มข้น $\log C$ ของอสุจิ X จากยีน *PLP* และความเข้มข้นอสุจิ Y จากยีน *SRY* ซึ่งเป็นค่าลอการิทึมฐาน 10 เมื่อคำนวณถอดค่าลอการิทึมฐาน 10 ได้ค่าคงที่ของความเข้มข้นยีน *PLP* (X) ค่าความเข้มข้นยีน *SRY* (Y) และผลรวมความเข้มข้นของทั้งสองยีน (X + Y) โดยในการศึกษานี้แสดงผลการคำนวณเป็นสัดส่วนวาย (% Y) จากสมการ $\%Y = \frac{Y}{(X+Y)} \times 100$ เมื่อ $\%X + \%Y = 100\%$ ทั้งนี้ ดีเอ็นเอจาก 9 ตัวอย่างข้างต้นถูกนำมาทดสอบด้วยเทคนิคที่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ คือเทคนิค singleplex real - time PCR (ทดลอง 3 ซ้ำ) ตามวิธีการของ Parati *et al.* (2006) โดยการสร้างกราฟมาตรฐานจากพลาสมิด และเทคนิค multiplex droplet digital PCR (multiplex ddPCR) (ทดลอง 3 ซ้ำ) ดัดแปลงจากวิธีการของ Cray *et al.* (2020) เป็นวิธีการตรวจนับปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยตรงของแต่ละยีนโดยไม่ใช้กราฟมาตรฐาน จากนั้นนำผลที่คำนวณได้จาก 3 เทคนิค มาเปรียบเทียบความแม่นยำของสัดส่วนวาย (% Y)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนจากวิธีการประเมินสัดส่วนเพศทั้ง 3 วิธีการ ตามแผนการทดลองสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design; Gomez and Gomez, 1984) แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เปรียบเทียบความน่าเชื่อถือของแต่ละวิธีการที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการทดลองและวิจารณ์

การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการประเมินสัดส่วนเพศอสุจิ

กราฟมาตรฐานหรือค่าอ้างอิงมาตรฐานในเทคนิค real - time PCR เป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับใช้เปรียบเทียบและคำนวณค่าการแสดงผลของยีนเป้าหมายที่สนใจในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ในการศึกษานี้สร้างกราฟมาตรฐานจากดีเอ็นเอเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้ ซึ่งมียีน *PLP* และยีน *SRY* รวมกันอยู่ในสัดส่วนที่เท่ากันคือ 1 : 1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR (Figure 1A) และกราฟเส้นตรงมาตรฐานจากพลาสมิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค singleplex real - time PCR (Figure 1B) ตามการศึกษาของ Parati *et al.* (2006)

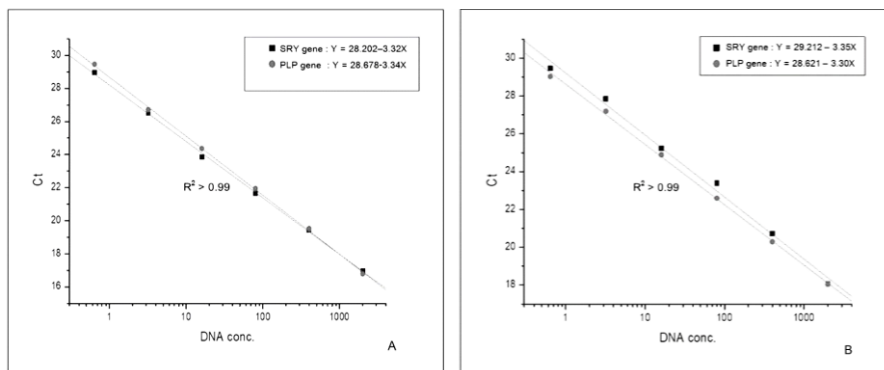


Figure 1. Standard curves and linear equations of *SRY* gene (■) and *PLP* gene (●) obtained from the multiplex real - time polymerase chain reaction assay (A) and the singleplex real - time polymerase chain reaction assay (B) showing relationship between cycle threshold (CT) and DNA copy number ($\log C$)

Figure 1A เป็นกราฟมาตรฐานเส้นตรง สร้างจากดีเอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวโคนมเพศผู้ โดยใช้ความเข้มข้นตั้งต้นที่เตรียมไว้ทั้งหมด 6 ความเข้มข้น คือ 1,000, 200, 40, 8, 1.6 และ 0.32 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี multiplex real - time PCR ได้ค่า CT และค่าความเข้มข้น log C สร้างกราฟเส้นตรงได้จำนวน 2 เส้น คือกราฟเส้นตรงของยีน SRY ในเพศผู้ (■) และ ยีน PLP ในเพศเมีย (●) จากการทดลองนี้ พบว่า ดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้นสูงสุดคือ 1,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และลดความเข้มข้นลง 5 เท่าไปถึงความเข้มข้น 0.32 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เป็นความเข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงการเกิดปฏิกิริยาของตัวอย่างดีเอ็นเอน้ำเชื้อคัดเพศที่นำมาทดสอบ (เกิดปฏิกิริยาช่วง CT = 15 - 30 รอบ) กราฟเส้นตรงของยีน SRY มีค่าความชัน เท่ากับ -3.32 และกราฟเส้นตรงของยีน PLP มีค่าความชัน เท่ากับ -3.34 (ได้ค่าความชันเฉลี่ยเท่ากับ -3.33) และเส้นตรงทั้งสองมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ระหว่างค่า CT และ log C คือ $R^2 > 0.99$

Figure 1B เป็นกราฟเส้นตรงที่สร้างจากพลาสมิด โดยผสมพลาสมิดที่มียีน PLP และยีน SRY แทรกอยู่ในอัตราส่วน 1 : 1 ใช้ความเข้มข้นของพลาสมิดจาก 1,000 ถึง 0.32 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค singleplex real - time PCR ในการศึกษานี้พบว่าเส้นตรงของยีน SRY มีค่าความชันเท่ากับ -3.35 ยีน PLP มีค่าความชันเท่ากับ -3.30 ได้ค่าความชันเฉลี่ยทั้งสองเส้นเท่ากับ -3.325 และเส้นตรงทั้งสองมีค่า $R^2 > 0.99$

ค่าความลาดชันเฉลี่ยของกราฟเส้นตรงจากเทคนิค multiplex real - time PCR มีค่าใกล้เคียงกับเทคนิค singleplex real - time PCR ซึ่งทั้ง 2 เทคนิคนี้มีค่าความชันใกล้เคียงกับค่าอุดมคติคือ -3.320 เป็นค่าบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของการเพิ่มดีเอ็นเอผลลัพธ์เส้นใหม่ 2 เส้นในแต่ละรอบปฏิกิริยา หรือมีประสิทธิภาพเท่ากับร้อยละ 100 สามารถคำนวณได้จากสมการ $E = (10^{(-\frac{1}{\text{slope}})} - 1) \times 100$ (Svec et al., 2015) เมื่อคำนวณด้วยสมการดังกล่าว พบว่า ค่าประสิทธิภาพเฉลี่ยของกราฟมาตรฐานจากเทคนิค multiplex real -

time PCR และ singleplex real - time PCR เท่ากับร้อยละ 99.66 และ 99.87 ตามลำดับ ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นค่าที่บ่งชี้ว่ากราฟมาตรฐานจากดีเอ็นเอเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้ที่ได้พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ มีความน่าเชื่อถือ สามารถใช้สมการจากกราฟเส้นตรงดังกล่าวคำนวณหาสัดส่วนเพศอสุจิได้อย่างแม่นยำ

การประเมินสัดส่วนเพศอสุจิจากตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อโคที่ต้องการทราบค่าด้วยเทคนิค real - time PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายไปพร้อม ๆ กับการอ่านผลการเกิดปฏิกิริยาจากแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ส่งสัญญาณออกมาถูกรอบปฏิกิริยา ใช้ตรวจสอบตัวอย่างในเชิงปริมาณ การศึกษาก่อนหน้านี้ประเมินสัดส่วนเพศน้ำเชื้อโคขาวลำพูน ด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR ใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน SRY สำหรับระบุเพศผู้ และไพรเมอร์ต่อยีน GAPDH เป็นยีนควบคุมระบุความสำเร็จของปฏิกิริยา คำนวณหาปริมาณของยีนเป้าหมายโดยนำค่า CT ของตัวอย่างที่ทดสอบลบออกด้วยค่า CT ของยีนควบคุมหรือยีนมาตรฐาน (delta - delta CT method; $2^{-\Delta\Delta CT}$) ไม่ใช้การคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟเส้นตรงมาตรฐาน ผลที่ได้แสดงสัดส่วนเพศของอสุจิ Y เป็นจำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นหรือค่าที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อปกติ ไม่สามารถระบุแยกเป็นสัดส่วนร้อยละของอสุจิ X และอสุจิ Y ในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบได้ (Dumrong Sri et al., 2016)

ดังนั้น เพื่อให้การประมาณสัดส่วนเพศอสุจิมีความละเอียดชัดเจน แยกเป็นร้อยละของอสุจิ X และอสุจิ Y ได้ การศึกษาของ Parati et al. (2006) ประเมินสัดส่วนเพศของอสุจิ X และอสุจิ Y โดยใช้กราฟมาตรฐานจากพลาสมิดที่มียีนเป้าหมาย PLP และยีน SRY แทรกอยู่ ผสมรวมกันในอัตรา 1 : 1 และใช้ไพรเมอร์ที่ติดสี FAM ชนิดเดียวกัน เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค singleplex real - time PCR (สำหรับยีน PLP 1 หลอด และยีน SRY 1 หลอด) ได้สมการเส้นตรงสำหรับคำนวณหาสัดส่วนเพศของอสุจิ อย่างไรก็ตาม อาจเกิดความผิดพลาดได้ง่ายหากผสมพลาสมิดในสัดส่วนที่ไม่เท่ากัน ทำให้กราฟเส้นตรงไม่ได้มาตรฐานและไม่เหมาะสมสำหรับใช้ประเมิน

สัดส่วนเพศ และการศึกษาของ Amadesi *et al.* (2015) ประเมินสัดส่วนเพศสุจิ X และสุจิ Y ในน้ำเชื้อพ่อโค ด้วยเทคนิค singleplex real - time PCR แบบแยกหลอดโดยใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้ทดแทนการใช้พลาสมิด ทั้งนี้ วิธีการประเมินจากทั้งสองการศึกษาข้างต้นอาจเกิดความเสี่ยงจากข้อผิดพลาด เนื่องจากทำปฏิกิริยาแบบแยกหลอด และตัวควบคุมไม่ได้อยู่ในปฏิกิริยาที่สนใจในหลอดเดียวกัน หากสูญเสียดีเอ็นเอตั้งแต่ต้นหรือการทำปฏิกิริยาล้มเหลวในหลอดใดหลอดหนึ่ง อาจทำให้การประเมินสัดส่วนเพศผิดพลาดได้

การประเมินสัดส่วนเพศสุจิด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR

การศึกษานี้ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน *PLP* และยีน *SRY* รวมถึงตัวอย่างที่ต้องการทดสอบรวมอยู่ภายในหลอดเดียว เทคนิคนี้ช่วยลดขั้นตอนการเตรียมน้ำยาทำปฏิกิริยา ประหยัดสารเคมี ลดความผิดพลาดในขั้นตอนการกระจายสารเคมีและไม่ต้องแบ่งดีเอ็นเอตั้งต้นซึ่งมีปริมาณน้อยเพื่อแยกทำปฏิกิริยาหลายหลอด โดยใน Figure 2 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก

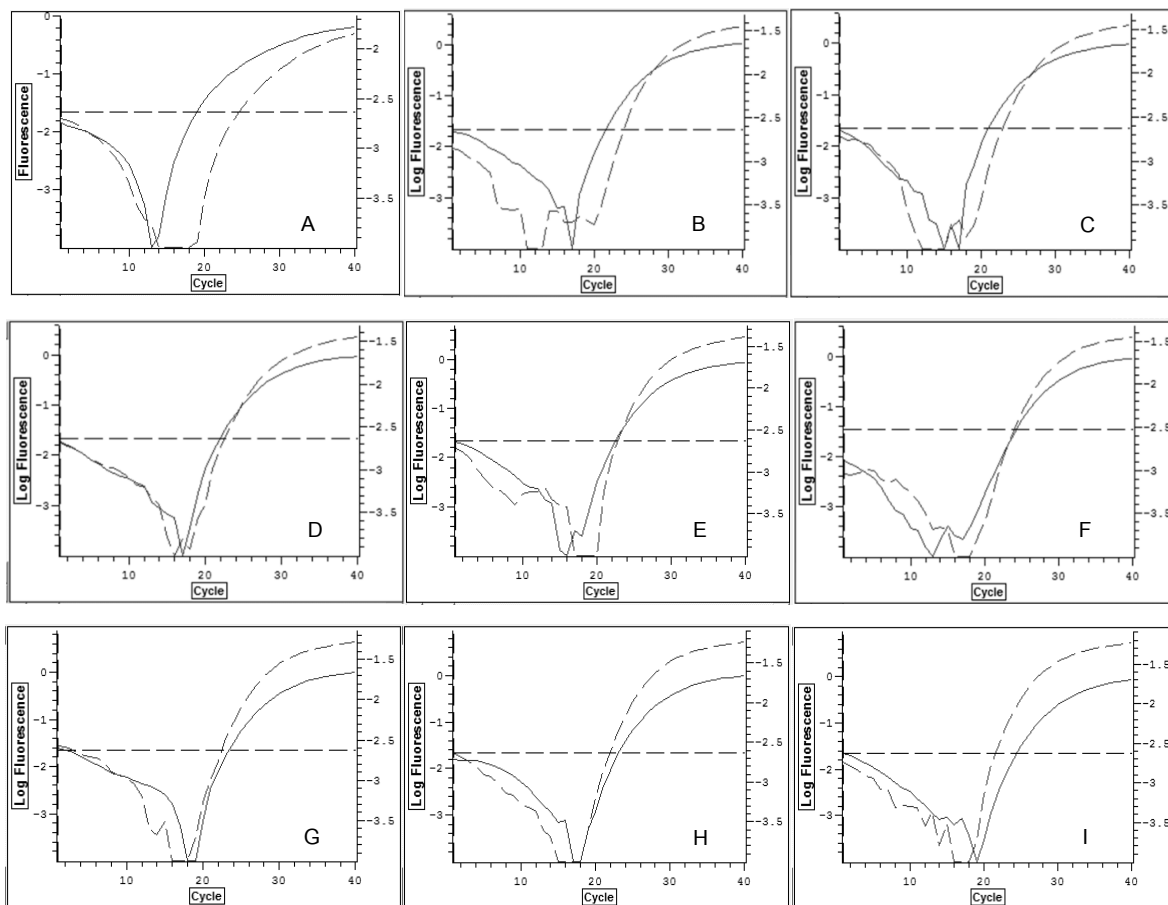


Figure 2. Log curve plot for both *SRY* and *PLP* genes expression in sex-sorted bovine semen samples quantified by multiplex real-time PCR technique. Taqman probe labeled FAM fluorophore (—) represent for *SRY* - specific gene in Y sperm and HEX fluorophore (- -) represent for *PLP*-specific gene in X sperm. A; Y = 90 %, B; Y = 80 %, C; Y = 70 %, D; Y = 60 %, E; Y = 50 %, F; Y = 40 %, G; Y = 30 %, H; Y = 20 %, and I; Y = 10 %, respectively.

น้ำเชื้อพ่อโคที่ผ่านการคัดแยกเพศ มีสัดส่วนของอสุจิ Y ตั้งแต่ร้อยละ 90 ลดลงถึงร้อยละ 10 (A = ร้อยละ 90, B = ร้อยละ 80, C = ร้อยละ 70, D = ร้อยละ 60, E = ร้อยละ 50, F = ร้อยละ 40, G = ร้อยละ 30, H = ร้อยละ 20, และ I = ร้อยละ 10) แต่ละตัวอย่างแสดงรอบการเกิดปฏิกิริยาจากสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ติดกับไพรเมอร์ โดยสัญญาณสี FAM (เส้นทึบ) แสดงการเพิ่มปริมาณยีน SRY ในเพศผู้ (มีค่าการดูดกลืนแสง 494 นาโนเมตร) และสัญญาณสี HEX (เส้นประ) แสดงการเพิ่มปริมาณยีน PLP ในเพศเมีย (ค่าการดูดกลืนแสง 535 นาโนเมตร) และเส้นตรงมาตรฐาน (threshold line) ที่ลากขนานกับแกน X ตัดกับเส้นสัญญาณสีทั้งสองในช่วงชัน (linear) ของกราฟ ที่ระดับ -1.5 ถึง -1.7 ได้ค่าคงที่ CT ของแต่ละยีนเพื่อนำไปแทนค่าในสมการ โดยช่วงสัญญาณแสงจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบ เริ่มแสดงสัญญาณสีในรอบที่ 15 - 30 ซึ่งเป็นช่วงที่กราฟมาตรฐานครอบคลุมการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมด

สัญญาณแสงใน Figure 2 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีความเข้มข้นอสุจิ Y ร้อยละ 90 - 60 (Figure 2; A - D) มีสัดส่วนของยีน SRY มากกว่ายีน PLP จึงเกิดเส้นสัญญาณสี FAM (เส้นทึบ) แสดงขึ้นมาก่อนเส้นสัญญาณสี HEX และเมื่อสัดส่วนอสุจิ Y น้อยลงหรือลดลง เส้นสัญญาณสี FAM เพิ่มจำนวนรอบมากขึ้นตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นที่น้อยลง ขณะที่ตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีสัดส่วนอสุจิ X และอสุจิ Y มีปริมาณเท่ากันร้อยละ 50 (Figure 2; E) เส้นสัญญาณของทั้งสองสีแสดงสัญญาณสีขึ้นพร้อม ๆ กัน ในทางตรงกันข้ามสำหรับตัวอย่างที่มีสัดส่วนอสุจิ Y ร้อยละ 40 - 10 (Figure 2; F - I) แสดงเส้นสัญญาณสี HEX ขึ้นมาก่อนสี FAM เนื่องจากมีดีเอ็นเอของอสุจิ X มากกว่าอสุจิ Y

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในระบบ multiplex ซึ่งมียีนเป้าหมาย 2 ชนิดในหลอดเดียว ใช้ไพรเมอร์ติดสีฟลูออเรสเซนซ์ต่างชนิด สามารถช่วยระบุยีนที่สนใจและทำปฏิกิริยาไปพร้อม ๆ กับการแสดงสัญญาณสี นำค่า CT เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานจากพลาสมิด เป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในขั้นตอนเดียว (Khamlor *et al.*, 2014) แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้า

นี้ของ Husna *et al.* (2017) และ Maleki *et al.* (2013) ศึกษาวิธีการประเมินสัดส่วนเพศของอสุจิในโคและกระบือ ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเพศผู้และเพศเมียทำปฏิกิริยาแบบ singleplex real - time PCR และใช้สารเรืองแสงชนิด SYBR green สำหรับแสดงสัญญาณการเพิ่มดีเอ็นเอผลลัพท์เส้นใหม่ การใช้สาร SYBR green อาจเกิดความผิดพลาดได้ หากสารเรืองแสงเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย (non - specific gene) จึงอาจเป็นข้อจำกัดของการใช้สารดังกล่าว ทั้งนี้การศึกษาของ Parati *et al.* (2006) ได้ปรับปรุงการใช้ไพรเมอร์ติดสีฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการระบุยีนเป้าหมาย ลดความคลาดเคลื่อนของผลวิเคราะห์ได้

ผลการประมาณอัตราส่วนร้อยละอสุจิ Y (% Y) ใน Table 2 จากเทคนิค multiplex real - time PCR ใช้การคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานจากเซลล์เม็ดขาวเพศผู้ และเทคนิค singleplex real - time PCR ประเมินสัดส่วนอสุจิ Y ด้วยการนำค่า CT ไปแทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐานจากพลาสมิด ได้ค่าความเข้มข้นของยีนที่สนใจ คำนวณเป็นสัดส่วน % Y ส่วนเทคนิค multiplex ddPCR เป็นเทคนิคการนับจำนวนของดีเอ็นเอผลลัพท์เส้นใหม่ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาโดยตรง ไม่ใช้กราฟมาตรฐานหรือค่าอ้างอิงมาตรฐาน (Cray *et al.*, 2020, Roti Roti *et al.*, 2017) ซึ่งใน Table 2 แสดงผลการวิเคราะห์เป็นค่าเฉลี่ย (% Y) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่านัยสำคัญทางสถิติ (*P*-value) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน CV (%) จากการประเมินสัดส่วนร้อยละอสุจิ Y จากทั้ง 3 วิธีการ พบว่า ผลการวิเคราะห์สัดส่วนเพศไม่มีความแตกต่างกัน (*P* > 0.05) มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนต่ำกว่าร้อยละ 10 มีสัดส่วนเพศอสุจิที่คำนวณได้ใกล้เคียงกับตัวอย่างที่เตรียมไว้ (ร้อยละ 90 - 10) ซึ่งผลจากเทคนิค multiplex real - time PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นใหม่นี้ ให้ค่าประมาณในช่วงร้อยละ 93.55 - 10.28 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่น้อยกว่า 3 เมื่อคิดเป็นช่วงความเชื่อมั่นของข้อมูล เป็นค่าประมาณร้อยละ 95 confidence interval (95 % CI) ค่าที่คำนวณได้มีความเบี่ยงเบนจากค่ากำหนดไม่เกินร้อยละ 5 ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้ ทั้งนี้ ตัวอย่างน้ำเชื้อที่ทราบค่าหรือ

Table 2. Results of %Y quantified by the multiplex real - time PCR assay, the singleplex real - time PCR assay and the multiplex droplet digital PCR assay

no	sample	Estimates		Calculated Values						P - value
		% Y	Multiplex real - time PCR assay		Singleplex real - time PCR assay		Multiplex droplet digital PCR assay			
			Mean (% Y) ± SD	CV (%)	Mean (% Y) ± SD	CV (%)	Mean (% Y) ± SD	CV (%)		
1	Y - sorted sperm	90	93.55 ± 0.64	1.68	93.39 ± 0.72	1.60	92.99 ± 0.97	1.04	0.468	
2	Y - sorted sperm	80	78.57 ± 1.41	1.79	79.85 ± 1.18	1.47	79.94 ± 1.24	1.55	0.149	
3	Y - sorted sperm	70	73.60 ± 0.69	4.07	72.95 ± 1.40	1.92	72.04 ± 1.70	2.69	0.159	
4	Y - sorted sperm	60	59.16 ± 2.20	3.72	60.57 ± 1.47	2.42	60.10 ± 1.07	1.79	0.344	
5	Normal sperm	50	52.65 ± 2.24	4.25	52.50 ± 3.44	6.55	50.80 ± 1.76	3.47	0.409	
6	X - sorted sperm	40	40.07 ± 2.21	5.51	40.59 ± 1.27	3.14	39.90 ± 1.18	2.95	0.747	
7	X - sorted sperm	30	32.45 ± 0.78	5.31	31.53 ± 0.87	2.77	31.72 ± 1.59	5.03	0.366	
8	X - sorted sperm	20	21.26 ± 2.53	6.38	22.73 ± 1.36	5.98	22.48 ± 1.02	4.17	0.204	
9	X - sorted sperm	10	10.28 ± 1.44	8.81	9.91 ± 0.39	7.30	10.59 ± 0.46	4.38	0.450	

PCR = polymerase chain reaction, SD = standard deviation, CV = coefficient of variation.

ค่า estimates (% Y) ใน Table 2 อาจมีความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากตัวอย่างน้ำเชื้อ X-sorted semen และ Y-sorted semen จากบริษัททางการค้าผ่านกระบวนการผลิตคัดแยกเพศด้วยวิธี flow cytometry ระบุสัดส่วนอสุจิ X หรือ อสุจิ Y มีค่ามากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งหมายถึงอาจมีร้อยละของอสุจิ X หรือ Y ในช่วงประมาณร้อยละ 90 - 99 ฉะนั้น ตัวอย่างดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อที่เตรียมไว้ในสัดส่วนต่าง ๆ ทั้งหมดอาจจะมีค่าเบี่ยงเบนจากค่าประมาณ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์จากทั้ง 3 เทคนิค พบว่า ให้ค่าการคำนวณที่ใกล้เคียงกัน มีประสิทธิภาพการวัดค่า หรือการประมาณสัดส่วนเพศอสุจิเทียบเท่ากัน

สรุป

งานวิจัยนี้ได้นำเสนอวิธีการประมาณอัตราส่วนเพศอสุจิแบบ multiplex real - time PCR ซึ่งสามารถทำได้สะดวก ประหยัดสารเคมี และรวมถึงที่ต้องการตรวจสอบอยู่ในหลอดเดียว โดยมีไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน PLP บนโครโมโซม X (โพรบติดสี HEX) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน SRY บนโครโมโซม Y (โพรบติดสี FAM) คำนวณสัดส่วนอสุจิจากกราฟมาตรฐานเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้ ที่มีโครโมโซม X และโครโมโซม Y ในสัดส่วน 1 : 1 ทดแทนการใช้พลาสมิดได้ อย่างไรก็ตามการสร้างสมการด้วยดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวจากโคเพศผู้ ควรเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์สูง เพื่อลดความผิดพลาดในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอผลลัพธ์ รวมถึงการประเมินสัดส่วนเพศอสุจิแบบแยกหลอดเดียว singleplex real - time PCR ให้ผลการคำนวณที่แม่นยำ ใช้โพรบติดสีฟลูออเรสเซนต์เพียงชนิดเดียว ช่วยลดต้นทุนการทำปฏิกิริยา และเทคนิค multiplex droplet digital PCR เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง ใช้สารเคมีและอุปกรณ์เครื่องมือที่มีราคาแพง เทคนิคต่าง ๆ ดังกล่าวทั้งหมดนี้ ผู้ปฏิบัติงานสามารถพิจารณาเลือกใช้ให้เหมาะสมกับงาน เวลา และงบประมาณ สามารถประยุกต์ใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการประมาณอัตราส่วนเพศอสุจิในน้ำเชื้อพ่อโคที่ผ่านกระบวนการคัดเพศในห้องปฏิบัติการ ก่อนนำน้ำเชื้อคัดเพศไปผสมเทียมกับแม่โคนมในภาคสนามได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยทุนพัฒนา
นักวิจัยรุ่นใหม่ คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
และองค์การ ส่งเสริมกิจกรรมการเลี้ยงโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อโค
และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
(สวทช.) ที่สนับสนุนเครื่องมือวิทยาศาสตร์และสถานที่
ดำเนินงานทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- Amadesi, A., A. Frana, L.M. Gandini, V. Bornaghi, K. Parati, G. Bongioni, R. Puglisi and A. Galli. 2015. Comparison between primary sex ratio in spermatozoa of bulls and secondary sex ratio in the deriving offspring. *Theriogenology* 83(2): 199-205.
- Blecher, S.R., R. Howie, S. Li, J. Detmar and L.M. Blahut. 1999. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology* 52(8): 1309-1321.
- Claassens, O.E., C.J.J. Oosthuizen, J. Brusnick, D.R. Franken and T.F. Kruger. 1995. Fluorescent in situ hybridization evaluation of human Y-bearing spermatozoa separated by albumin density gradients. *Fertility and Sterility* 63(2): 417-418.
- Colley, A., M. Buhr and S.P. Golovan. 2008. Single bovine sperm sex typing by amelogenin nested PCR. *Theriogenology* 70(6): 978-983.
- Cray, N., M. Wagner, J. Hauer and E. Roti Roti. 2020. Technical note: Droplet digital PCR precisely and accurately quantifies sex skew in bovine semen. *Journal of Dairy Science* 103(7): 6698-6705.

- Dumrongsri, S., T. Khamlor, P. Pongpiachan and K. Sringarm. 2016. Determination of male-specific gene expression of White Lamphun cattle semen treated by monoclonal antibodies. *Indian Journal of Animal Sciences* 86(8): 878-882.
- Ericsson, R.J., C.N. Langevin and M. Nishino. 1973. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* 246(5433): 421-424.
- Garner, D.L., B.L. Gledhill, D. Pinkel, S. Lake, D. Stephenson, M.A. van Dilla and L.A. Johnson. 1983. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 28(2): 312-321.
- Goldberg, E.H., E.A. Boyse, D. Bennett, M. Scheid and E.A. Carswell. 1971. Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. *Nature* 232(5311): 478-480.
- Gomez, K.A. and A.A. Gomez. 1984. *Statistical Procedures for Agricultural Research*. 2nd ed. John Wiley and Sons, NewYork. 680 p.
- Habermann, F.A., A. Winter, I. Olsaker, P. Reichert and R. Fries. 2005. Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos taurus*) by dual colour fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122(s1): 22-27.
- Husna, A.U., M.A. Awan, A. Mehmood, T. Sultana, Q. Shahzad, M.S. Ansari, B.A. Rakha, S.M. Saqlan Naqvi and S. Akhter. 2017. Sperm sexing in Nili-Ravi buffalo through modified swim up: Validation using SYBR[®] green real-time PCR. *Animal Reproduction Science* 182: 69-76.
- Iwasaki, S., Y. Shioya, H. Masuda, A. Hanada and T. Nakahara. 1988. Sex ratio of early embryos fertilized *in vitro* with spermatozoa separated by percoll. *Theriogenology* 30(6): 1191-1198.
- Joerg, H., M. Asai, D. Graphodatskaya, F. Janett and G. Stranzinger. 2004. Validating bovine sexed semen samples using quantitative PCR. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 121(3): 209-215.
- Johnson, L.A., J.P. Flook and H.W. Hawk. 1989. Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction* 41(2): 199-203.
- Khamlor, T., P. Pongpiachan, S. Sangsritavong and N. Chokesajjawatee. 2014. Determination of sperm sex ratio in bovine semen using multiplex real-time polymerase chain reaction. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 27(10): 1411-1416.
- Machado, G.M., J.O. Carvalho, E. Siqueira Filho, E.S. Caixeta, M.M. Franco, R. Rumpf and M.A.N. Dode. 2009. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 71(8): 1289-1297.
- Madrid-Bury, N., R. Fernández, A. Jiménez, S. Pérez-Garnelo, P. Nuno Moreira, B. Pintado, J. de la Fuente and A. Gutiérrez-Adán. 2003. Effect of ejaculate, bull, and a double swim-up sperm processing method on sperm sex ratio. *Zygote* 11(3): 229-235.
- Maleki, A.F., A.H. Moussavi, M.R. Nassiri, M. Tahmoorespur and S.A. Vakili. 2013. Introducing and validation of SYBR green real-time PCR method to determinate sex ratio in bovine semen. *Animal Reproduction Science* 140(1-2): 1-6.
- Maxwell, W.M.C., G. Evans, F.K. Hollinshead, R. Bathgate, S.P. de Graaf, B.M. Eriksson, L.

- Gillan, K.M. Morton and J.K. O'Brien. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal Reproduction Science* 82-83: 79-95.
- Parati, K., G. Bongioni, R. Aleandri and A. Galli. 2006. Sex ratio determination in bovine semen: A new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology* 66(9): 2202-2209.
- Piumi F., D. Vaiman, E.P. Cribiu, B. Guerin and P. Humblot. 2001. Specific cytogenetic labeling of bovine spermatozoa bearing X or Y chromosomes using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Genetics Selection Evolution* 33(1): 89-98.
- Roti Roti, E., N. Cray, M. Wagner and M.R. Botts. 2017. Inventor. Genus PLC (GB), Assignee. Methods and systems for assessing and/or quantifying sperm cell subpopulations bearing a specific genetic signature. U.S. Patent No.: US-2019071725-A1. Date of Patent: September 1, 2017.
- Svec, D., A. Tichopad, V. Novosadova, M.W. Pfaffl and M. Kubista. 2015. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification* 3: 9-16.
- Welch, G.R., G.C. Waldbieser, R.J. Wall and L.A. Johnson. 1995. Flow cytometric sperm sorting and PCR to confirm separation of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm. *Animal Biotechnology* 6(2): 131-139.
- Yan, J., H.L. Feng, Z. Chen, J. Hu, X. Gao and Y. Qin. 2006. Influence of swim-up time on ratio of X- and Y-bearing spermatozoa. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 129(2): 150-154.
-

ผลของระยะเวลาในการบ่มต่อองค์ประกอบทางเคมี และปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อโค

Effects of Aging Periods on Chemical Composition and Carnosine Content in Beef

ทิพย์ระวี รัศมีพงศ์¹ ศิริมา ทองรวาย¹ ทองสุข เจตนา¹ และ อัจฉรา ขยัน^{2*}
Tiprawee Rassamepong¹, Sirima Thongruay¹, Thongsuk Jetana¹ and Autchara Kayan^{2*}

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

¹Research and Development Center for Livestock Production Technology, Faculty of Veterinary Science,
Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

²Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

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

(Received: 1 October 2020; Accepted: 3 December 2020)

Abstract: The objective of this study was to evaluate effect of aging period on chemical composition and carnosine content of beef. Fifteen muscle samples were taken from 3 crossbred [Charolais x (Brahman x Native)] bulls. Beef cattle was slaughtered at 24 - 36 months and average body weight was 500 - 600 kilograms. They were slaughtered following the standard procedure. Longissimus thoracis muscles were sampled and aging at 4 °C for 7, 14, 21 and 28 days. Chemical composition and carnosine content were analyzed. The results showed that the moisture, protein and lipid content (%) were not significantly different between groups ($P > 0.05$). Moreover, aging period was not an effect on carnosine content ($P > 0.05$). Therefore, it might conclude that the aging period had no affected on chemical composition and carnosine content of beef. Beef aging technique can improve value - added of meat without nutritional deterioration.

Keywords: Beef, aging period, chemical composition, carnosine content

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่มต่อองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อโค โดยเนื้อโคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเนื้อโคขุนลูกผสม 3 สายพันธุ์ [Charolais x (Brahman x Native)] เพศผู้ จำนวน 15 ตัว โคเนื้อทั้งหมดถูกฆ่าที่อายุ 24 - 36 เดือน น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 500 - 600 กิโลกรัม ทำการชำตามแบบมาตรฐานสากล จากนั้นเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก (longissimus thoracis) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน แล้วจึงนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารคาร์โนซีน ผลการศึกษา พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อโค ทั้งร้อยละของความชื้น โปรตีน และไขมันของเนื้อโคที่ผ่านการบ่มเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบว่า ระยะเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อโคด้วยเช่นกัน ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่า ระยะเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อโค เทคนิคการบ่มเนื้อจึงสามารถเพิ่มมูลค่าของเนื้อโดยปราศจากการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ

คำสำคัญ: เนื้อโค ระยะเวลาในการบ่ม องค์ประกอบทางเคมี ปริมาณสารคาร์โนซีน

คำนำ

การเลี้ยงโคของประเทศไทยในอดีตนั้นเป็นการเลี้ยงเพื่อใช้แรงงานในการเกษตร แต่ในปัจจุบันการใช้แรงงานโคในการเกษตรลดลง เนื่องจากการนำเครื่องจักรและเทคโนโลยีใหม่ ๆ เข้ามาปรับใช้เพื่อลดแรงและเวลา ดังนั้น การเลี้ยงโคในปัจจุบันจึงเป็นการเลี้ยงเพื่อการค้าเนื้อและนมเป็นส่วนใหญ่ รูปแบบการเลี้ยงโคเนื้อในปัจจุบันจึงปรับเปลี่ยนมาเป็นการเลี้ยงเพื่อผลิตเนื้อโคเป็นหลัก และปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญต่อการบริโภคเนื้อที่มีคุณภาพดี โดยคุณภาพเนื้อคือลักษณะต่าง ๆ ของเนื้อสัตว์ที่แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติตามความต้องการของผู้บริโภค ซึ่งลักษณะของเนื้อที่สำคัญที่มีส่วนกำหนดคุณภาพเนื้อ ได้แก่ สี รสชาติ กลิ่น ความชุ่มฉ่ำ และความนุ่มของเนื้อ (Jaturasitha, 2008) อย่างไรก็ตาม เนื้อโคเป็นสัตว์ที่มีระยะเวลาในการเลี้ยงนาน จำนวนและขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อมีขนาดใหญ่ อีกทั้งหลังจากสัตว์ตายจะเกิดกระบวนการที่เรียกว่า rigor mortis หรือการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อที่ส่งผลให้เนื้อโคมีความเหนียว จึงได้นำวิธีการบ่มเนื้อ (aging) มาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพเนื้อให้ดีขึ้น โดยพบว่าการบ่มเนื้อโคเป็นกระบวนการที่ช่วยให้เนื้อมีกลิ่นรสที่ดีขึ้น รวมถึงมีความนุ่มมากขึ้น (Epley, 1992) วิธีการบ่มเนื้อที่นิยมวิธีหนึ่งคือ การบ่มแบบเปียก (wet aging) หรือ vacuum aging) เป็นการบ่มเนื้อโดยบรรจุเนื้อ

ลงในถุงสุญญากาศ ก่อนจะนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 0 - 4 °C ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและง่ายต่อการจัดการ (Smith *et al.*, 2008)

นอกจากนั้นแล้ว เนื้อโคเป็นแหล่งของโปรตีนที่มีความสำคัญสำหรับมนุษย์ เนื่องจากประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำเป็นที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสร้างเองได้ และยังประกอบไปด้วยสารประกอบไดเพปไทด์ ที่เรียกว่า คาร์โนซีน (carnosine, β -alanyl-L-histidine) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีความสามารถในการชะลอความชราของเซลล์ได้ (Hipkiss *et al.*, 2016) และมีรายงานว่า คาร์โนซีนยังสามารถป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) (Hobart *et al.*, 2004) การเกิดภาวะขาดเลือดในสมองและหัวใจ และยังช่วยให้การเต้นของหัวใจดีขึ้นอีกด้วย (Stvolinsky and Dobrota, 2000) คาร์โนซีนสังเคราะห์ขึ้นมาจากกรดอะมิโนจำเป็น 2 ชนิด ได้แก่ อะลานีน (alanine) และฮิสทิดีน (histidine) (Peiretti *et al.*, 2011) คาร์โนซีนเป็นองค์ประกอบในเนื้อเยื่อหลายชนิด ได้แก่ สมอง กล้ามเนื้อหัวใจ ไต กระเพาะอาหารและอวัยวะรับรู้ (olfactory bulb) และพบจำนวนมากในกล้ามเนื้อลาย (Gariballa and Sinclair, 2000) ปริมาณของคาร์โนซีนที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดของสัตว์ (Jones *et al.*, 2011), สายพันธุ์ (D'Astous-Pagé *et al.*, 2017), ชนิดของกล้ามเนื้อ (Maikhunthod and Intarapichet, 2005) และ

การใช้ความร้อนในการประกอบอาหาร (Bauchart *et al.*, 2006) เป็นต้น ถึงแม้ว่าการบ่มเนื้อจะเป็นกระบวนการที่ช่วยให้เนื้อโคมีความนุ่มขึ้น แต่ก็ยังเป็นกระบวนการที่ส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำออกจากเนื้อ รวมถึงโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในเนื้อ ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาในการบ่มต่อองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารคาร์โบโนซินในเนื้อโคในการใช้เป็นข้อมูลทางคุณค่าโภชนาการเบื้องต้นสำหรับผู้ประกอบการและผู้บริโภคที่สนใจทางด้านการบ่มเนื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่าง

โคเนื้อที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ เป็นโคขุนสายพันธุ์ลูกผสม 3 สายพันธุ์ [Charolais x (Brahman x Native)] เพศผู้ จำนวน 15 ตัว โคเนื้อทั้งหมดถูกฆ่าที่อายุ 24-36 เดือน น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 500-600 กิโลกรัม โดยทำการฆ่าตามแบบมาตรฐานสากล จากนั้นเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก (*longissimus thoracis*) เพื่อนำมาศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาในการบ่มต่อคุณภาพเนื้อโค โดยตัดเนื้อเป็นชิ้นให้มีความหนา 2.54 cm แล้วนำไปบรรจุถุงแบบสุญญากาศ (การบ่มแบบเปียก) ใช้ถุงสุญญากาศ (ผลิตจากพลาสติก PE (polyethylene) / PET (polyethylene terephthalate)) โดยแบ่งกลุ่มการศึกษาเป็นดังนี้ 1) กลุ่มเนื้อโคที่ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน 2) กลุ่มเนื้อโคที่ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 14 วัน 3) กลุ่มเนื้อโคที่ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 21 วัน และ 4) กลุ่มเนื้อโคที่ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 28 วัน โดยการบ่มเนื้อโคที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อครบระยะเวลาในการบ่มตามกำหนดแล้วทำการสุ่มชิ้นเนื้อจำนวนชิ้นเนื้อ 3 ชิ้นต่อกลุ่มการศึกษามาวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition)

นำกล้ามเนื้อสันนอก มาวิเคราะห์กลุ่มละ 6 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน และไขมัน โดยวิธี proximate analysis

ตามวิธีการของ AOAC (2000) โดยแสดงผลในรูปแบบของร้อยละ

การสกัดและการวัดปริมาณสารคาร์โบโนซินในตัวอย่างเนื้อโค

นำเนื้อโคส่วนกล้ามเนื้อสันนอกมาวิเคราะห์กลุ่มละ 4 ตัวอย่าง โดยสกัดหาปริมาณสารคาร์โบโนซินตามวิธีการของ Auh *et al.* (2010) นำตัวอย่างมาปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ในอัตราส่วน 1 : 2 (w/w) ด้วยเครื่องปั่น แล้วจึงนำไปเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการวัดปริมาณสารคาร์โบโนซินตามวิธีการของ Auh *et al.* (2010) และ Maikhunthod and Intarapichet (2005) โดยทำการเปิดสารละลายส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนการสกัดปริมาณสารคาร์โบโนซินจากกล้ามเนื้อสันนอกปริมาตร 300 µl ผสมกับเมทานอลปริมาตร 900 µl นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 16,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที กรองด้วยแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.45 µm แล้วทำการเจือจางสารละลายที่ได้ด้วยสารละลาย O-phthaldialdehyde (OPA) ในอัตราส่วน 1 : 5 ก่อนทำการฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารคาร์โบโนซินโดยใช้ HPLC Agilent 1100 และ fluorescence detector ที่ความยาวคลื่น excitation 310 nm และ emission 375 nm ร่วมกับการใช้ C18 column Hypersil 5 ODS 250 x 4.6 mm (PN 7992618-585; SN 481419) และ mobile phase ซึ่งประกอบด้วย phase A (50mM sodium acetate buffer, pH 4.37) และ phase B (acetonitrile : methanol : tetrahydrofuran = 70 % : 25 % : 5 % ตามลำดับ) โดยแสดงผลในรูปแบบของ mg/g

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ ANOVA การทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (SAS, 2003) โดยพิจารณาความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ระยะเวลาในการบ่มต่อองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อโค

จากผลการศึกษาระยะเวลาในการบ่มต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อโค พบว่า ระยะเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อร้อยละของความชื้นในเนื้อโค (Figure 1) โดยเนื้อโคที่ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน มีค่าร้อยละของความชื้นเท่ากับ 70.53 ± 0.93 , 71.36 ± 0.68 , 71.30 ± 0.57 และ 71.85 ± 0.70 ตามลำดับ ($P > 0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Li *et al.* (2013) ที่รายงานว่ เนื้อโคที่ผ่านการบ่มเป็นระยะเวลา 0 และ 14 วัน มีร้อยละของความชื้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยค่าร้อยละของความชื้นของเนื้อโคที่ 0 และ 14 วัน มีค่าเท่ากับ 74.6 และ 74.4 ตามลำดับ และการศึกษาของ Shi *et al.* (2020) ที่ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของการบ่มแบบเปียกต่อคุณภาพเนื้อโคลูกผสมสายพันธุ์ Luxi ในกล้ามเนื้อ พบว่า การบ่มเนื้อที่ระยะเวลา 0, 7 และ 14 วัน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของเนื้อโค โดยเนื้อโคที่ผ่านการบ่มแบบเปียกเป็นระยะเวลา 0, 7 และ 14 วัน มีร้อยละของความชื้นเท่ากับ 73.35, 73.92 และ 73.31 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ร้อยละของความชื้นของเนื้อโคที่ผ่านการบ่มแบบเปียกจากการศึกษาของ Li *et al.* (2013) และ Shi *et al.* (2020) มีค่ามากกว่า อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาของ Li *et al.* (2008) พบว่า ร้อยละของความชื้นของเนื้อโคในส่วนของเนื้อสะโพก (semimembranosus) ที่ผ่านการบ่มแบบเปียกเป็นระยะเวลา 14 และ 21 วัน มีค่าร้อยละของความชื้นมากกว่าเนื้อโคที่ผ่านการบ่มเป็นระยะเวลา 4 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับร้อยละของไขมัน พบว่า ระยะเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อร้อยละของไขมันในเนื้อโค โดยเนื้อโคที่ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน มีค่าร้อยละของไขมันเท่ากับ 7.90 ± 0.40 , 7.61 ± 0.53 , 7.61 ± 0.35 และ 7.72 ± 0.53 ตามลำดับ (Figure 2; $P > 0.05$) จากการศึกษาของ Li *et al.* (2008) พบว่า ค่าร้อยละของไขมันของเนื้อโคที่ผ่านการบ่มแบบเปียกเป็นระยะเวลา 4, 11, 14 และ 21 วัน มีค่าน้อยกว่าค่าร้อยละ

ของไขมันของเนื้อโคที่ผ่านการบ่มเป็นระยะเวลา 28 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของค่าร้อยละของไขมันนี้สัมพันธ์กับปริมาณของค่าร้อยละของความชื้นที่ลดลง อีกทั้งพบว่า เนื้อโคที่ผ่านการบ่มแบบแห้งจะมีค่าร้อยละของไขมันมากกว่าเนื้อโคที่ผ่านการบ่มแบบเปียก เนื่องจากการบ่มแบบแห้งจะเกิดการสูญเสียน้ำออกจากเนื้อมากกว่า อัตราส่วนของค่าร้อยละของไขมันที่วัดได้จึงมีค่ามากกว่าค่าร้อยละของความชื้น (Dikeman *et al.*, 2013) ส่วนค่าร้อยละของโปรตีน พบว่า ระยะเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อค่าร้อยละของโปรตีนในเนื้อโค โดยเนื้อโคที่ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน มีค่าร้อยละของโปรตีนเท่ากับ 23.02 ± 0.35 , 24.23 ± 0.45 , 23.63 ± 0.58 และ 24.10 ± 0.31 ตามลำดับ (Figure 3; $P > 0.05$) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kim *et al.* (2019) ที่พบว่า การบ่มเนื้อเป็นระยะเวลา 28 วัน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าร้อยละของโปรตีนในกล้ามเนื้อสันนอกของเนื้อโค จากผลการศึกษาของ Ripoll *et al.* (2008) ที่ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อโคที่ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า เนื้อโคมีค่าร้อยละของความชื้นเท่ากับ 75.47 ± 0.69 ร้อยละของไขมันเท่ากับ 1.07 ± 0.49 และร้อยละของโปรตีนเท่ากับ 21.67 ± 1.11 และจากการศึกษาของ Cho *et al.* (2016) ที่ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อโคที่ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่า เนื้อโคมีค่าร้อยละของความชื้นเท่ากับ 70.03 ± 0.42 ร้อยละของไขมันมีค่าเท่ากับ 6.16 ± 0.34 และร้อยละของโปรตีนมีค่าเท่ากับ 21.97 ± 0.30 สำหรับค่าร้อยละของไขมันและค่าร้อยละของโปรตีนของการศึกษาข้างต้นนี้มีค่ามากกว่ารายงานของ Cho *et al.* (2016) และ Ripoll *et al.* (2008) อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อโคอาจมีค่าแตกต่างกันไปในเนื้อแต่ละสายพันธุ์ โดยจากรายงาน พบว่า เนื้อโคสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง Limousin x Holstein - Friesian มีค่าร้อยละของความชื้น โปรตีน และไขมันเท่ากับ 76.01, 21.64 และ 1.48 ตามลำดับ ส่วนโคเนื้อสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง Hereford x Holstein - Friesian มีค่าร้อยละของความชื้น โปรตีน และไขมันเท่ากับ 75.76, 21.55 และ 1.79 ตามลำดับ Bogdanowicz *et al.* (2018)

และยังพบว่า กล้ามเนื้อในแต่ละส่วนที่ต่างกันก็มีองค์ประกอบทางเคมีต่างกัน โดยจากการศึกษาของ Kim *et al.* (2019) ที่ได้ทำการศึกษากลับขององค์ประกอบทางเคมีของเนื้อสัน (sirloin) และเนื้อสะโพก (rump) ที่ผ่านการบ่มแบบเปียกเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่า ค่าร้อยละของความชื้น โปรตีน และไขมันของเนื้อสัน มีค่าเท่ากับ 65.84, 20.95 และ 11.29 ตามลำดับ ส่วนค่าร้อยละของความชื้น โปรตีน และไขมันของเนื้อสะโพกมีค่าเท่ากับ 70.98, 22.08 และ 5.08 ตามลำดับ นอกจากนี้วิธีการในการบ่มก็มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีเช่นกัน โดยพบว่า เนื้อโคที่ผ่านการบ่มแบบเปียกเป็น

ระยะเวลา 0, 7 และ 14 วัน มีค่าร้อยละของความชื้นเท่ากับ 73.35, 73.92 และ 73.31 ตามลำดับ ส่วนเนื้อโคที่ผ่านการบ่มแบบแห้งเป็นระยะเวลา 0, 7 และ 14 วัน จะมีค่าร้อยละของความชื้นเท่ากับ 73.98, 72.49 และ 72.90 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละของความชื้นของเนื้อโคที่ผ่านการบ่มแบบเปียกและการบ่มแบบแห้ง พบว่า ค่าร้อยละของความชื้นของเนื้อโคที่ผ่านการบ่มเป็นระยะเวลา 0 วัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ค่าร้อยละของความชื้นของเนื้อโคที่ผ่านการบ่มเป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ (Shi *et al.*, 2020)

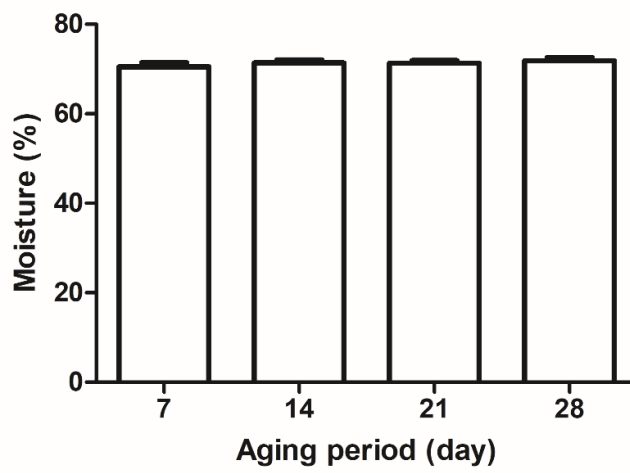


Figure 1. Effect of aging period on moisture in beef. Bars indicate standard error of measure.

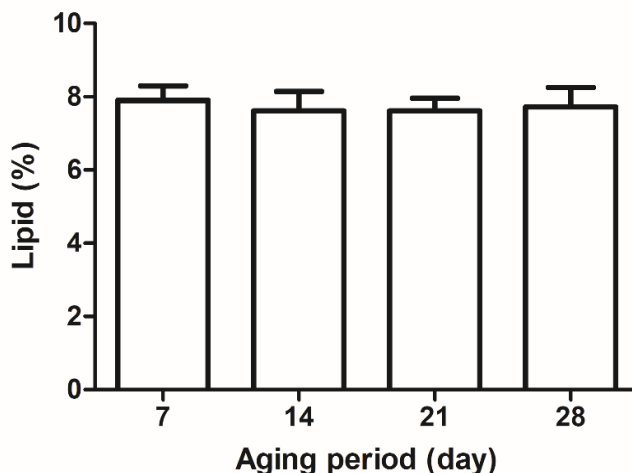


Figure 2. Effect of aging period on lipid in beef. Bars indicate standard error of measure.

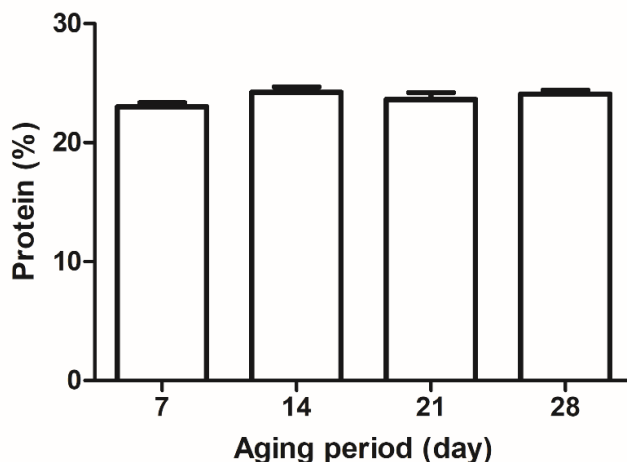


Figure 3. Effect of aging period on protein in beef. Bars indicate standard error of measure.

ระยะเวลาในการบ่มต่อปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อโค

จากผลการศึกษาระยะเวลาในการบ่มต่อปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อโคพบว่า ระยะเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อโค โดยเนื้อโคที่ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน มีปริมาณสารคาร์โนซีนเท่ากับ 3.22, 3.64, 2.81 และ 3.47 mg/g ตามลำดับ (Figure 4; $P > 0.05$) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Bauchart *et al.* (2006) ที่ได้ทำการศึกษากปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อโคสายพันธุ์ Charolais พบว่า ระยะเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อโค โดยเนื้อโคสดมีปริมาณสารคาร์โนซีน $22.43 \pm 1.02 \mu\text{mol/g}$ และเนื้อโคที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 14 วัน มีปริมาณสารคาร์โนซีน $22.73 \pm 0.83 \mu\text{mol/g}$ ในขณะที่การประกอบอาหารโดยการบรรจุแบบสุญญากาศ (vacuum packed) แล้วนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C เป็นระยะเวลา 90 นาทีนั้นไม่มีผลต่อปริมาณสารคาร์โนซีน โดยเนื้อโคที่ผ่านการบ่มเป็นระยะเวลา 14 วันและนำไปปรุงสุก พบว่า มีปริมาณสารคาร์โนซีน $18.52 \pm 0.59 \mu\text{mol/g}$ ซึ่งน้อยกว่าปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อโคสดและเนื้อโคที่ผ่านการบ่มเป็นระยะเวลา 14 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) และจากการศึกษาของ Maikhunthod and Intarapichet (2005) ที่ได้ทำการศึกษากปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อไก่

พบว่า เนื้ออกมีปริมาณสารคาร์โนซีนมากกว่าเนื้อสะโพกถึง 7 เท่า นั่นคือ กล้ามเนื้อในแต่ละส่วนมีสารคาร์โนซีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่ต่างกัน โดยเนื้ออกมีปริมาณสารคาร์โนซีน $718.7 \pm 54.0 \mu\text{g/g}$ ในขณะที่เนื้อสะโพกมีปริมาณสารคาร์โนซีน $104.2 \pm 15.3 \mu\text{g/g}$ และชนิดของสัตว์ก็มีผลต่อปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อด้วยเช่นกัน โดยสารคาร์โนซีนพบมากในเนื้อโค (70.4 mmol/kg) รองลงมาคือ เนื้อสุกร (55.4 mmol/kg) เนื้อไก่ (54.0 mmol/kg) เนื้อไก่ทรง (46.7 mmol/kg) และเนื้อแกะ (33.6 mmol/kg) ตามลำดับ (Jones *et al.*, 2011) นอกจากนี้พบว่า ปริมาณสารคาร์โนซีนที่เป็นองค์ประกอบภายในเนื้อมีความสัมพันธ์กับคุณภาพเนื้อที่ดี ซึ่งการศึกษาของ D'Astous-Pagé *et al.* (2017) รายงานว่า เนื้อสุกรที่มีคาร์โนซีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก มีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อค่า pH ที่ 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตาย โดยช่วยให้ค่า pH ที่ 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตายลดต่ำลง อีกทั้งพบว่า เนื้อสุกรที่มีสารคาร์โนซีนในปริมาณมาก มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อที่ดีขึ้น โดยเนื้อสุกรมีค่าการสูญเสียน้ำจากการเก็บรักษา (drip loss) และการสูญเสียน้ำจากการประกอบอาหาร (cooking loss) ลดลง และยังพบว่า เนื้อสุกรที่มีสารคาร์โนซีนในปริมาณมากช่วยลดค่าความสว่าง (L^*) และค่าสีเหลือง (b^*) ของเนื้อ อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อและคุณภาพเนื้อยังต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

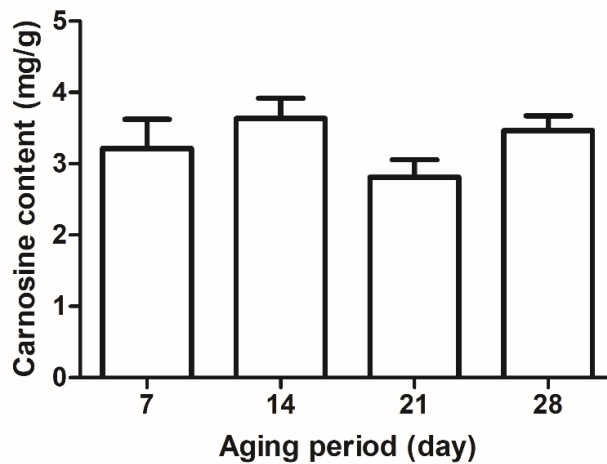


Figure 4. Effect of aging period on carnosine content in beef. Bars indicate standard error of measure.

สรุป

จากผลการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาในการบ่มต่อองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อโคที่ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่า ระยะเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารคาร์โนซีนในเนื้อโค ดังนั้นการบ่มเนื้อเพื่อเพิ่มมูลค่าและความนุ่มของเนื้อโคจึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโภชนะที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเนื้อโค

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินมหาดเงินอุดหนุน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

เอกสารอ้างอิง

- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17thed. The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.
- Auh, J.H., N. Namgung, K.S. Shin, S.W. Park and I.K. Paik. 2010. Effects of supplementary blood meal on the content of carnosine and anserine in broiler meat. *Journal of Poultry Science* 47(4): 302-309.
- Bogdanowicz, J., M. Cierach and T. Żmijewski. 2018. Effects of aging treatment and freezing/thawing methods on the quality attributes of beef from Limousin × Holstein-Friesian and Hereford × Holstein-Friesian crossbreeds. *Meat Science* 137: 71-76.
- Bauchart, C., D. Rémond, C. Chambon, P. Patureau Mirand, I. Savary- Auzeloux, C. Reynès and M. Morzel. 2006. Small peptides (< 5 kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Science* 74: 658-666.
- Cho, S., S.M. Kang, P. Seong, G. Kang, Y. Kim, J. Kim, S. Lee and S. Kim. 2016. Effect of aging time on physicochemical meat quality and sensory property of Hanwoo bull beef. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 36(1): 68-76.
- D'Astous-Pagé, J., C. Gariépy, R. Blouin, S. Cliché, B. Sullivan, F. Fortin and M.F. Palin. 2017.

- Carnosine content in the porcine *longissimus thoracis* muscle and its association with meat quality attributes and carnosine-related gene expression. *Meat Science* 124: 84-94.
- Dikeman, M.E., E. Obuz, V. Gök, L. Akkaya and S. Stroda. 2013. Effects of dry, vacuum, and special bag aging; USDA quality grade; and end-point temperature on yields and eating quality of beef *Longissimus lumborum* steaks. *Meat Science* 94(2): 228-233.
- Epley, R.J. 1992. Aging beef. Minnesota Extension Service. University of Minnesota, St. Paul, MN.
- Gariballa, S.E. and A.J. Sinclair. 2000. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age Ageing* 29(3): 207-210.
- Hipkiss, A.R., E. Baye and B. de Courten. 2016. Carnosine and the processes of ageing. *Maturitas* 93: 28-33.
- Hobart, L.J., I. Seibel, G.S. Yeargans and N.W. Seidler. 2004. Anti-crosslinking properties of carnosine: significance of histidine. *Life Sciences* 75(11): 1379-1389.
- Jaturasitha, S. 2008. *Meat Technology*. 2nd ed. Ming Muang Printing House, Chiang Mai. 335p. (in Thai)
- Jones, G., M. Smith and R. Harris. 2011. Imidazole dipeptide content of dietary sources commonly consumed within the British diet. *Proceedings of the Nutrition Society* 70 (OCE6): E363, doi: 10.1017/S0029665111004484.
- Kim, M., J. Choe, H.J. Lee, Y. Yoon, S. Yoon and C. Jo. 2019. Effects of aging and aging method on physicochemical and sensory traits of different beef cuts. *Food Science of Animal Resources* 39(1): 54-64.
- Li, C., G. Zhou and X. Xu. 2008. Changes of meat quality characteristics and intramuscular connective tissue of beef *semitendinosus* muscle during postmortem aging for Chinese Yellow bulls. *International Journal of Food Science and Technology* 43(5): 838-845.
- Li, X., J. Babol, A. Wallby and K. Lundström. 2013. Meat quality, microbiological status and consumer preference of beef *gluteus medius* aged in a dry ageing bag or vacuum. *Meat Science* 95(2): 229-234.
- Maikhunthod, B. and K. Intarapichet. 2005. Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. *Meat Science* 71(2): 364-374.
- Peiretti, P.G., C. Medana, S. Visentin, V. Giancotti, V. Zunino and G. Meineri. 2011. Determination of carnosine, anserine, homocarnosine, pentosidine and thiobarbituric acid reactive substances contents in meat from different animal species. *Food Chemistry* 126(4): 1939-1947.
- Ripoll, G., P. Albert, B. Panea, J.L. Olleta and C. Sanudo. 2008. Near-infrared reflectance spectroscopy for predicting chemical, instrumental and sensory quality of beef. *Meat Science* 80(3): 697-702.
- SAS. 2003. *SAS STAT User's Guide*. Version 9.1. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 5180p.
- Shi, Y., W. Zhang and G. Zhou. 2020. Effects of different moisture-permeable packaging on the quality of aging beef compared with wet aging and dry aging. *Foods* 9: 649. doi: 10.3390/foods9050649

Smith, R.D., K.L. Nicholson, J.D.W. Nicholson, K.B. Harris, R.K. Miller, D.B. Griffin and J.W. Savell. 2008. Dry versus wet aging of beef: Retail cutting yields and consumer palatability evaluations of steaks from US Choice and US Select short loins. Meat Science 79(4): 631-639.

Stvolinsky, S.L. and D. Dobrota. 2000. Anti-ischemic activity of carnosine. Biochemistry (Moscow) 65(7): 849-855.

ผลของสารทีทูทอกซินต่อความเป็นพิษและการตาย ของเซลล์ไฟโบบลาสจากเอมบริโอไก่พื้นเมือง

Effects of T - 2 Toxin on Cytotoxicity and Apoptosis of Embryonic Fibroblast Cells Obtained from Native Chicken

ชมพูนุช หล้าแสงกุล^{*} มานินพันธ์ ทองคำ กรวรรณ ศรีงาม
วรรณพร ทะพิงค์แก และ มนตรี ปัญญาทอง
Chompunut Lumsangkul^{*}, Marninphan Thongkham, Korawan Sringarm,
Wanaporn Tapingkae and Montri Punyatong

ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
Department of Animal and Aquatic Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^{*}Corresponding author: Email: chompunut.lum@cmu.ac.th

(Received: 8 October 2020; Accepted: 23 November 2020)

Abstract: The objective of this study was to determine the toxicity of T - 2 toxin in poultry. Chicken embryonic fibroblast (CEF) cells were derived from crossbred native chickens and used as a model for cytotoxicity evaluation of T - 2 toxins at various concentrations (0, 0.01, 0.1, 1, and 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) for 24 and 48 hours. Cytotoxicity of CEF was increased when exposed to increasing concentrations of T - 2 toxin. Cell viability of CEF was lower than 40 % and 20 % for all concentrations of T - 2 toxin at 24 and 48 hours, respectively. CEF cells were induced to death and mostly in the early apoptosis phase (62.27 %) by T - 2 toxin. The results indicated that crossbred native chickens were less resistant and more sensitive to T - 2 toxin. Therefore, the contamination caused by T - 2 toxin should be monitored in poultry feed as it may cause disease in chickens.

Keywords: T - 2 toxin, cytotoxicity, apoptosis, crossbred native chicken embryonic fibroblast cells (CEFs)

บทคัดย่อ: การศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารพิษที่หนูในสัตว์ปีก โดยใช้เซลล์ไฟโบรลาสต์จากตัวอ่อนของไก่พื้นเมืองลูกผสมเป็นต้นแบบจำลอง เพื่อวัดระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับ 0, 0.01, 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรลาสต์จากตัวอ่อนของไก่ที่ได้รับสารพิษที่หนูนั้น มีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารพิษที่หนู และอัตราการมีชีวิตของเซลล์ต่ำกว่า 40 และ 20 % ในทุกระดับของสารพิษที่หนูที่ใช้ทดสอบ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ เซลล์ไฟโบรลาสต์จากตัวอ่อนของไก่พื้นเมืองลูกผสมที่ถูกเหนี่ยวนำให้ตายโดยสารพิษที่หนู ส่วนใหญ่อยู่ในระยะอะพอพโทซิสที่มีการตายของเซลล์ในช่วงต้น (early apoptosis) เท่ากับ 62.27 % ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองลูกผสมมีความทนทานน้อยและตอบสนองไวมากต่อสารพิษที่หนู ดังนั้น ควรมีการเฝ้าระวังการปนเปื้อนสารพิษที่หนูในอาหารสัตว์ปีก เพราะอาจเป็นสาเหตุก่อโรคในไก่ได้

คำสำคัญ: สารพิษจากเชื้อราที่หนู ความเป็นพิษต่อเซลล์ การตายแบบอะพอพโทซิส เซลล์ไฟโบรลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม

คำนำ

ไก่พื้นเมืองลูกผสม คือ ไก่ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ทางการค้ากับสายพันธุ์พื้นเมือง เพื่อพัฒนาการเจริญเติบโตและความทนทานต่อสภาพแวดล้อมในท้องถิ่นนั้น ๆ จากสภาพอากาศที่ร้อนชื้นในหน้าฝนของประเทศไทยเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่อาจเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์ ซึ่งก่อให้เกิดสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) ซึ่งเป็นผลจากเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ของเชื้อราตามมาด้วย ไม่เพียงแต่ในประเทศไทยเท่านั้นในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกทั่วโลกยังคงประสบกับปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารที่นำมาประกอบเป็นอาหารสัตว์ จากการสำรวจ พบว่า มีการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในผลผลิตทางการเกษตรหลากหลายชนิด (Gruber-Dominger *et al.*, 2019; Mahdjoubi *et al.*, 2020) เช่น ข้าวโพด ถั่ว ข้าวสาลี และอื่น ๆ ที่นำมาประกอบเป็นวัตถุดิบหลักมากกว่า 50 % ของอาหารสัตว์ปศุสัตว์ โดยเฉพาะอาหารสัตว์ปีก สอดคล้องกับหลากหลายการศึกษาที่มีการตรวจพบการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราหลายชนิดอยู่ในอาหารสัตว์ปีกและส่วนผสมของวัตถุดิบอาหารต่าง ๆ (Ezekiel *et al.*, 2012; Kana *et al.*, 2013; Labuda *et al.*, 2005; Rodrigues and Naehrer 2012; Shareef, 2010; Streit *et al.*, 2013) ดังนั้น ความเสี่ยง

ที่สัตว์จะได้รับสารพิษจากเชื้อรา โดยผ่านทางกรกินอาหารที่ประกอบขึ้นจากวัตถุดิบที่มีการปนเปื้อนจากสารพิษจากเชื้อรานี้มีสูงมาก

สารพิษที่หนู (T-2 toxin) เป็นสารพิษจากเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มของ trichothecene (Bouaziz *et al.*, 2006; Desjardins *et al.*, 1993; Sudakin, 2003) โดยเกิดจากเชื้อราในสกุล *Fusarium* เช่น *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. equiseti* และ *F. acuminatum* (Desjardins *et al.*, 1993) ซึ่งมีการพบว่า สารพิษจากเชื้อราในกลุ่มนี้มีการปนเปื้อนอยู่ในอาหารสัตว์ปีกและอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของสัตว์ โดยสารพิษจากเชื้อราชนิดนี้ อาจเป็นพิษต่อเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและอาจเป็นสารก่อมะเร็ง อีกทั้งอาจตกค้างในผลิตภัณฑ์ของสัตว์ อาทิ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก จำพวกเนื้อและไข่ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้อีกด้วย สำหรับรายงานข้อมูลที่แสดงความเป็นพิษและกลไกของสารพิษที่หนูนั้นมีจำนวนน้อยมากและไม่เพียงพอต่อการนำมาอ้างอิงสำหรับการทดสอบและศึกษาในภาคสนาม อีกทั้งความทนทานของสัตว์ปีกสายพันธุ์พื้นเมืองของไทยต่อสารพิษที่หนูนั้นยังไม่มีข้อมูลปรากฏ เพื่อเป็นการทดสอบระดับของความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราที่อาจปนเปื้อนมากับอาหารสัตว์ ก่อนนำไปทดสอบในภาคสนามกับตัวสัตว์ จึงได้มีออกแบบการศึกษาขั้นต้นโดยการนำเซลล์ของสัตว์มาทดสอบภายในห้องปฏิบัติการ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารพิษที่ดูดซับในสัตว์ปีก โดยใช้เซลล์ไฟโบรลัสจากตัวอ่อนของไก่พื้นเมือง ลูกผสมเป็นต้นแบบจำลอง เพื่อวัดระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ และใช้เป็นฐานข้อมูลขั้นต้นด้านความเป็นพิษต่อสัตว์ปีก โดยเฉพาะไก่พื้นเมืองลูกผสมของไทย ก่อนทำการทดลองในภาคสนามที่ใช้สัตว์ทดลองในสิ่งแวดล้อมร่างกายปกติ (*in vivo* study) ในอนาคตต่อไปเพื่อได้ผลการศึกษาเบื้องต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบและการเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ไฟโบรลัสตัวอ่อนไก่ (chicken embryonic fibroblast; CEF) ได้มาจากการแยกเซลล์ผิวหนังของไก่พื้นเมืองลูกผสม 3 สายพันธุ์ (ประดู่หางดำ (Pradu Hang Dam) x สายพันธุ์ไฮฮับบาร์ด (Hubbard) x สายพันธุ์เนือฮับบาร์ด (Hubbard) และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum 10% และยาปฏิชีวนะ 1% (เพนนิซิลลิน (penicillin) 10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร + สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร + แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยบ่มในตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% ระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แบบวันเว้นวัน

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT colorimetric assay

นำเซลล์ไฟโบรลัสตัวอ่อนของไก่พื้นเมืองลูกผสม (เลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 passage) เลี้ยงในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม (96-well microplate) หลุมละ 5,000-10,000 เซลล์ บ่มในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์จนกว่าเซลล์จะเจริญในระดับ 80% จากนั้นเตรียมสารละลายจากสารพิษมาตรฐานที่ 7 (Dried Standard T-2 Toxin, Trilogy[®]) และเจือจาง (serial dilution) ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ ประกอบด้วย 0, 0.01, 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมทั้ง

และเติมสารละลายสารพิษมาตรฐานที่ 7 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มไมโครเพลทในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5% โดยกำหนดเวลาทดสอบที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาการบ่มทำการเติมสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) 100 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการบ่มไมโครเพลทในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ที่เติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยในแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 หลุม และทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ การคำนวณร้อยละของการมีชีวิต (% cell viability) ทำโดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในหลุมควบคุม ดังสมการ

$$\% \text{ cell viability} = (\text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ} / \text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม}) \times 100$$

การทดสอบผลของสารพิษที่ดูดซับต่อการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์ไฟโบรลัสตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม ด้วยเครื่อง Imaging flow cytometry

การตรวจสอบระยะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์ไฟโบรลัสตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม โดยใช้ชุดทดสอบ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (APT750, Millipore, Temecula, CA) เป็นวิธีการย้อมแอนติบอดีที่ติดสฟลูออเรสเซน (annexin V-FITC) และ propidium iodide (PI) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของพลาสมาเมมเบรน ของเซลล์ โดยใช้เครื่อง imaging flow cytometry ในการตรวจสอบ โดยทำการปั่นล้างเซลล์ไฟโบรลัสตัวอ่อนของไก่พื้นเมืองลูกผสมจำนวน 200,000 เซลล์ ด้วยสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) และทำการเติมสารละลาย 1X binding buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม annexin V-FITC 3 ไมโครลิตร และเติม propidium iodide 2 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร ทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 15 นาที

ที่อุณหภูมิห้อง และป้องกันจากแสง เมื่อครบเวลาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 RPM เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์และเติม PBS เย็น (ice-cold PBS) 40 ไมโครลิตร หลังจากการย้อมสีตัวอย่างเซลล์ไฟโบร بلاสต์ตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม ตัวอย่างเซลล์ได้รับการประเมินด้วยเครื่อง imaging flow cytometry (FlowSight, Seattle, WA, USA) โดยใช้กำลังของเลเซอร์ที่ 488 นาโนเมตรในการกระตุ้นการเปล่งแสงสีฟลูออเรสเซนต์ โดยที่ annexin V-FITC มีช่วงการเปล่งแสงอยู่ที่ 505 - 560 นาโนเมตร และ PI มีช่วงการเปล่งแสงอยู่ที่ 595 - 642 นาโนเมตร เครื่อง imaging flow cytometry ทำการตรวจวัดตัวอย่างอย่างน้อย 10,000 เซลล์ต่อตัวอย่าง จากนั้นมีการประมวลผลด้วยระบบคอมพิวเตอร์ IDEAS version 6.2 (Amnis, Seattle, WA, USA) โดยเริ่มจากการระบุเซลล์เดี่ยวของตัวอย่างที่มีความชัดเจนและทำการจำแนกเซลล์ตัวอย่างตามลักษณะการติดสี annexin V-FITC และ PI (Figure 3B) จากนั้นคำนวณร้อยละของจำนวนตัวอย่างเซลล์ในแต่ละระยะการตายอะพอพโทซิสตามการติดสี annexin V-FITC และ PI (Figure 3A)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบร้อยละของการมีชีวิตและการตายแบบอะพอพโทซิสแต่ละกลุ่มการทดลองทำโดยใช้ GLM procedure ของโปรแกรม SAS version 9.1 และทดสอบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (Steel and Torrie, 1980)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ความเป็นพิษของสารพิษที่หนูในเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม

ผลการทดลองใน Figure 1A และ 1B แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสมเมื่อได้รับสารพิษที่หนูในระดับที่ต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลพบว่า ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ตัวอ่อนไก่ เท่ากับ 32.3, 29.8, 24.8 และ 18.9 หลังจาก

ได้รับสารพิษที่หนูระดับ 0.01, 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (Figure 1A) และร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ตัวอ่อนไก่หลังจากได้รับสารพิษที่หนูเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 19.0, 15.9, 12.6 และ 12.1 เมื่อได้รับสารพิษที่หนูระดับ 0.01, 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Figure 1B) พบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบร بلاสต์ตัวอ่อนไก่มีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเซลล์ได้รับปริมาณสารพิษที่หนูมากขึ้น (dose-dependent) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wu *et al.* (2019) ที่พบว่าเซลล์ L02 (human fetal liver cell line) มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่มากขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของสารพิษที่หนูในการทดสอบ

นอกจากระดับความเข้มข้นของสารพิษระยะเวลาที่ได้รับสารพิษก็มีผลเช่นกัน จากการเปรียบเทียบผลของร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากตัวอ่อนไก่ต่อเวลาที่ได้รับสารพิษที่หนูพบว่า เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นจาก 24 ชั่วโมงเป็น 48 ชั่วโมง ทำให้อัตราการมีชีวิตของเซลล์ต่ำกว่า 20 % ในทุกระดับของสารพิษที่หนูที่ใช้ทดสอบ (Figure 1A และ 1B)

รูปร่างของเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากตัวอ่อนไก่ที่ได้รับสารพิษที่หนูในระดับที่แตกต่างกัน แสดงใน Figure 2A และ 2B ผลการศึกษาพบว่า รูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารพิษที่หนูมีลักษณะคล้ายกระสวย ยาวกลมหรือรูปแฉกและมีส่วนยื่นยาว แต่ในทางกลับกันพบว่า เมื่อเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากตัวอ่อนไก่ได้รับสารพิษที่หนูแล้วจะมีผลทำให้ปริมาณเซลล์ลดลง และรูปร่างของเซลล์มีลักษณะหดลีบและเล็กลง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า กลไกหลักความเป็นพิษของสารพิษที่หนูนั้น เป็นผลจากการเหนี่ยวนำภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ทำให้อนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น เข้าไปทำลายระบบต่าง ๆ ที่ควบคุมกลไกสำคัญภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ เช่น อนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) (Wu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014) ซึ่งเป็นผลทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงหรือเกิดการออกซิเดชันของไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเมมเบรนของเซลล์ได้ เป็นสารเพอร์ออกไซด์ (lipid peroxidation) ส่งผลให้เซลล์เมมเบรนเสียสภาพ (Ozguner *et al.*, 2005)

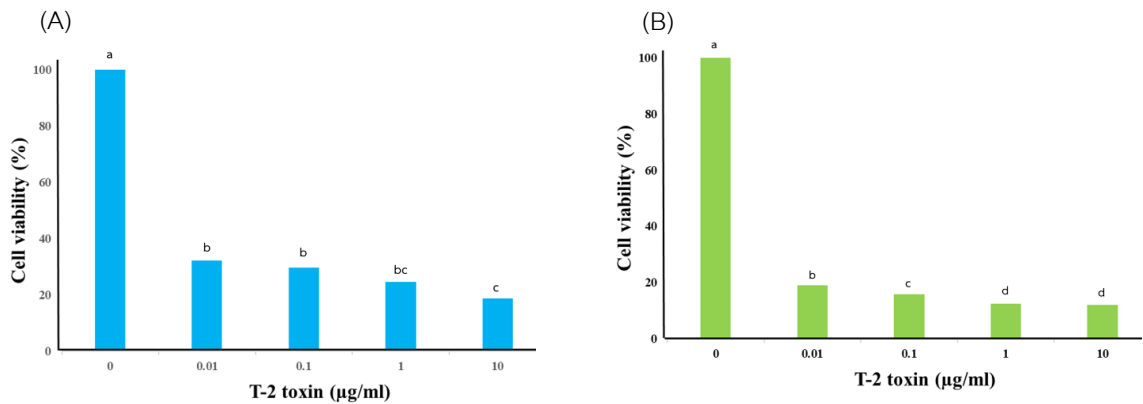


Figure 1. Cell viability in CEF after treatment with various concentrations (0, 0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$) of T-2 for 24 (A) or 48 h (B). The percentage of survival cells was relative to the control cells and by the mean ($n = 3$). * Significantly different from the control ($P < 0.05$)

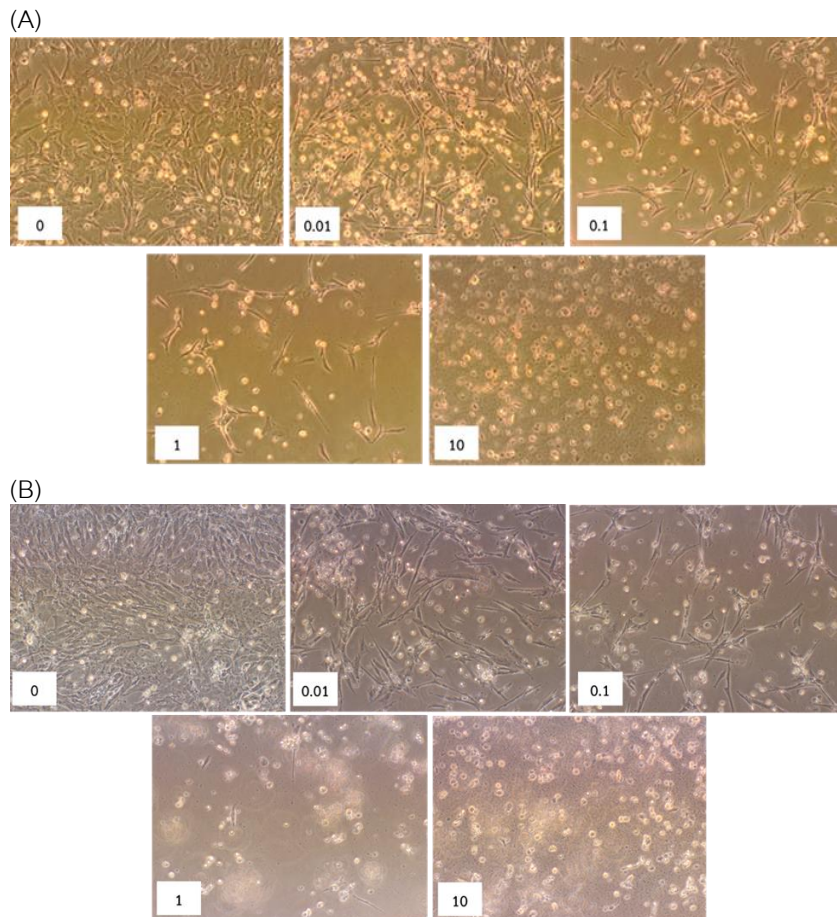


Figure 2. Cell morphology and growth characteristics of CEF at 24 h (A) and 48 h (B) after plating. CEF cells were treated with T-2 at 0 (control), 0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$

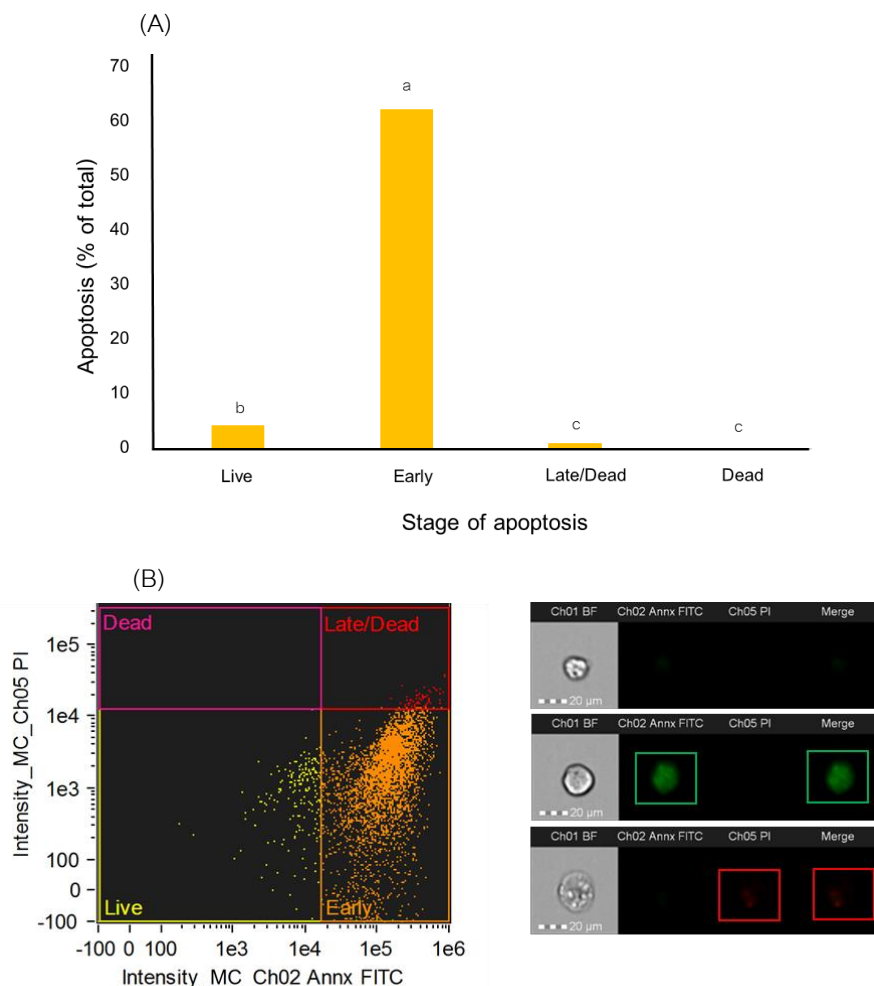


Figure 3. Apoptotic effects of CEF cells caused by T-2 toxin. Flow cytometry analysis of the apoptosis rate of CEF cells after T-2 toxin treatment. Cells stained with Annexin V - Propidium iodine (AV - PI) after exposure to 1 μg/ml T-2 toxin for 24 h (A) in addition to the quantification of the apoptotic cells, is shown in the right-hand side of the histogram (B). Results are the mean $\pm$ SD, n = 3

ระยะการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสมโดยสารพิษทีทู

การทดสอบระยะการตายหรือเสื่อมสลายของเซลล์รูปแบบหนึ่งที่เรียกว่า อะพอพโทซิสในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม หลังจากได้รับสารพิษทีทูในครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสมที่ได้รับสารพิษทีทูปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าสารพิษทีทูทำให้เกิด

การตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม เซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ตายโดยสารพิษทีทูมีสัดส่วนของระยะอะพอพโทซิสที่มีชีวิต (live) เฉลี่ย 4.24 % การตายของเซลล์ในช่วงต้น (early apoptosis) เฉลี่ย 62.27 % และการตายของเซลล์ในช่วงปลาย (late apoptosis) เฉลี่ย 1.04 % (Figure 3A)

การตรวจสอบระยะของเซลล์ที่ตายจากการถูกกระตุ้นให้ตายแบบอะพอพโทซิส โดยการทดสอบด้วยการย้อมสี แอนติบอดี annexin V - FITC และ PI โดยที่

เซลล์ระยะเริ่มเกิดอะพอพโทซิสจะมีการเปลี่ยนแปลงโดย phosphatidyl serine เคลื่อนที่ออกจากบนนอกพลาสมาเมมเบรน จากนั้น annexin V - FITC สามารถจับกับประจุลบของ phosphatidyl serine ได้ ซึ่งในขณะนี้ PI ยังไม่สามารถผ่านพลาสมาเมมเบรนได้ แต่เมื่อพลาสมาเมมเบรนเสียคุณสมบัติ PI เข้าไปจับดีเอ็นเอของเซลล์ ซึ่งสามารถบ่งบอกการตายของเซลล์ได้ (Khongthong *et al.*, 2019) โดย annexin V ทำปฏิกิริยากับ PI แทรกเข้าไปในเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถติดสี เมื่อ DNA เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยทำการแบ่งแยกเซลล์ที่ติดสีเขียวของ annexin V อยู่ในกลุ่การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ในช่วงต้น แต่เมื่อเซลล์มีการติดสีทั้ง 2 ชนิดคือ สีแดงที่เกิดจาก PI (PI - positive) และสีเขียวของ annexin V (FITC - positive) สามารถจำแนกให้อยู่ในระยะเซลล์กลุ่มที่มีการตายในช่วงปลาย (Figure 3B) ดังนั้นในการวัดอะพอพโทซิสเซลล์ (apoptotic cells) จะใช้การติดที่ทั้ง 2 ชนิดนี้เพื่อทำการแยกเค้าโครงของจุด (density dot plot) เซลล์ตายต่างชนิดสีและนำมาใช้ในการแบ่งแยกระยะต่าง ๆ ของการตายแบบอะพอพโทซิส โดยแบ่งออกเป็นสถานะที่มีชีวิต (FITC - negative / PI - negative) การตายของเซลล์ในช่วงต้น (FITC - positive / PI - negative) การตายของเซลล์ในช่วงปลาย (FITC-positive / PI-positive) และการตายของเซลล์แบบเฉียบพลัน (necrosis) (FITC - negative / PI - positive)

ผลกระทบจากการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสเป็นสัญญาณบ่งบอกถึงการฝ่อ การเจริญที่ผิดปกติ และการเสื่อมถอยของเซลล์ ที่ทำหน้าที่สำคัญในการเป็นส่วนประกอบของการควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาพยาธิและสรีรวิทยาในตัวสัตว์ จากการศึกษาพบว่า สารพิษที่หนูมีผลทำให้เซลล์ไฟโบบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสมเกิดความผิดปกติ โดยอาจทำให้เซลล์มี DNA เสียหายโดยการตายแบบอะพอพโทซิสเป็นการตายแบบเฉียบไม่ใช้การตายแบบเฉียบพลันแบบเนโครซิส (necrosis) เนื่องจากเซลล์ได้รับบาดเจ็บอย่างรุนแรง การตายแบบอะพอพโทซิสไม่มีลักษณะการบวมหรือพอง

แต่เป็นการตายในลักษณะที่มีการหดตัวลงส่งผลให้เซลล์มีขนาดเล็กลง ดังนั้น เมื่อมีการโจมตีของเชื้อโรคต่าง ๆ ทำให้เกิดโปรแกรมการสัง่ตายของเซลล์ได้และไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่สำคัญในร่างกายสัตว์ เช่น p53 ทำให้เกิดการทํางานที่ผิดปกติของระบบในร่างกายจนเป็นสาเหตุให้เกิดโรคร้ายแรงกับตัวสัตว์ได้ เช่น ก่อให้เกิดเซลล์มะเร็ง ดังนั้น ในร่างกายสัตว์ไม่ควรมีการเกิดโปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิสเกิดขึ้นมากในสัตว์เกินความจำเป็น (Duke *et al.*, 1996)

สารพิษที่หนูเหี่ยวน่าให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์ไฟโบบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสมโดยผ่านทางสภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชันซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์ชนิดอื่น ๆ ที่ได้รับสารพิษที่หนู เช่น เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนและเซลล์ส่วนของอัณฑะที่ทำหน้าที่เป็นต่อมไร้ท่อที่ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนเพศชาย (Leydig cell) ของหนู (Fang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2016) อีกทั้งยังมีการศึกษาเบื้องต้นของ Zhuang *et al.* (2013) พบว่า สารพิษที่หนูทำให้เกิดการตายและอะพอพโทซิสในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hela, Bel - 7402 และ Chang liver) โดยผ่านทางไมโทคอนเดรีย (mitochondria pathway) และภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress)

สรุป

จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า สารพิษที่หนูมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของไก่พื้นเมืองลูกผสมอย่างรุนแรง แม้ได้รับสารพิษในระดับต่ำเพียง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการคำนวณขนาดของการใช้สารพิษที่หนูเพื่อทดสอบกับตัวสัตว์ในภาคสนาม และเสนอแนะให้มีการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราชนิดนี้ในอาหารสัตว์ปีก เพราะอาจส่งผลกระทบต่อทำให้เกิดพิษเฉียบพลันต่อสัตว์ได้และส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีก

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับทุนสนับสนุนทุนวิจัยจาก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณ หน่วยงานฟาร์มสัตว์ปีก ภาควิชาสัตวศาสตร์ และสัตวน้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยเหลือโดยการสนับสนุนไข่ไก่พื้นเมืองลูกผสม 3 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bouaziz, C., S. Abid-Essefi, A. Bouslimi, E. El Golli and H. Bacha. 2006. Cytotoxicity and related effects of T-2 toxin on cultured Vero cells. *Toxicon* 48(3): 343-352.
- Desjardins, A.E., T.M. Hohn and S.P. McCormick. 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiology Reviews* 57(3): 595-604.
- Duke, R.C., D.M. Ojcius and J.D.-E. Young. 1996. Cell suicide in health and disease. *Scientific American* 275(6): 80-87.
- Ezekiel, C.N., R. Bandyopadhyay, M. Sulyok, B. Warth and R. Krska. 2012. Fungal and bacterial metabolites in commercial poultry feed from Nigeria. *Food Additives and Contaminants* 29(8): 1288-1299.
- Fang, H., Y. Wu, J. Guo, J. Rong, L. Ma, Z. Zhao, D. Zuo and S. Peng. 2012. T-2 toxin induces apoptosis in differentiated murine embryonic stem cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Apoptosis* 17(8): 895-907.
- Gruber-Dorninger, C., T. Jenkins and G. Schatzmayr. 2019. Global mycotoxin occurrence in feed: a ten-year survey. *Toxins* 11(7): 375, doi: 10.3390/toxins11070375.
- Kana, J.R., B.G.J. Gnonlonfin, J. Harvey, J. Wainaina, I. Wanjuki, R.A. Skilton and A. Tegua. 2013. Assessment of aflatoxin contamination of maize, peanut meal and poultry feed mixtures from different agroecological zones in Cameroon. *Toxins* 5(5): 884-894.
- Khongthong, S., W. Khongthong and Y. Theaparat. 2019. Effect of cepharanthine on the cytotoxicity of doxorubicin in human b-lymphoma cells. *Rajamangala University of Technology Srivijaya Research Journal* 11(3): 451-460. (in Thai)
- Labuda, R., A. Parich, E. Vekiru and D. Tancinova. 2005. Incidence of fumonisins, moniliformin and *Fusarium* species in poultry feed mixtures from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 12(1): 81-86.
- Mahdjoubi, C.K., N. Arroyo-Manzanares, N. Hamini-Kadar, A.M. García-Campaña, K. Mebrouk and L. Gámiz-Gracia. 2020. Multi-mycotoxin occurrence and exposure assessment approach in foodstuffs from Algeria. *Toxins* 12(3): 194, doi: 10.3390/toxins12030194.
- Ozguner, F., A. Koyu and G. Cesur. 2005. Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels. *Toxicology and Industrial Health* 21(1-2): 21-26.
- Rodrigues, I. and K. Naehrer. 2012. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins* 4(9): 663-675.
- Shareef, A.M. 2010. Molds and mycotoxins in poultry feeds from farms of potential mycotoxicosis. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 24(1): 17-25.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical*

- Approach. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York. 633 p.
- Streit, E., C. Schwab, M. Sulyok, K. Naehrer, R. Krska and G. Schatzmayr. 2013. Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins* 5(3): 504-523.
- Sudakin, D.L. 2003. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters* 143(2): 97-107.
- Wu, J., D. Tu, L.Y. Yuan, H. Yuan and L.X. Wen. 2013. T-2 toxin exposure induces apoptosis in rat ovarian granulosa cells through oxidative stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36(2): 493-500.
- Wu, J., W. Huang, H. Xiao, Y. Xie, Z. Yuan, J. Yi, J. Chen, D. Tu and Y. Tian. 2018. Procyanidins B2 reverses the T-2 toxin-induced mitochondrial apoptosis in TM3 Leydig cells. *Journal of Functional Foods* 45: 118-128.
- Wu, J., Y. Zhou, Z. Yuan, J. Yi, J. Chen, N. Wang and Y. Tian. 2019. Autophagy and apoptosis interact to modulate T-2 toxin-induced toxicity in liver cells. *Toxins* 11(1): 45, doi: 10.3390/toxins11010045.
- Wu, Q.H., X. Wang, W. Yang, A.K. Nüssler, L.Y. Xiong, K. Kuča, V. Dohnal, X.J. Zhang and Z.H. Yuan. 2014. Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: An update. *Archives of Toxicology* 88(7): 1309-1326.
- Yuan, Z., F.B. Matias, J.E. Yi and J. Wu. 2016. T-2 toxin-induced cytotoxicity and damage on TM3 Leydig cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 181-182: 47-54.
- Zhuang, Z., D. Yang, Y. Huang and S. Wang. 2013. Study on the apoptosis mechanism induced by T-2 Toxin. *PLoS ONE* 8(12): e83105, doi: 10.1371/journal.pone.0083105.
-

ผลของแหล่งน้ำตาลซูโครสต่อจลนศาสตร์การหมักไวน์ส้มเกลี้ยง

Effects of Sucrose Sources on Fermentation Kinetics of Sweet Orange Wine

มาลัยพร วงศ์แก้ว^{1*} คัทลียา ใจดี¹ ณัฐพล อินธา¹

นันทิยา บุญสุข¹ และ พศิน หน่อคำอ้าย²

Malaiporn Wongkaew^{1*}, Kattareeya Jaidee¹, Nattapon Intha¹,

Nantiya Boonsook¹ and Pasin Norkumai²

¹สาขาวิชาการผลิตและนวัตกรรมอาหาร วิทยาลัยเทคโนโลยีและสหวิทยาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จ. เชียงใหม่ 50220

¹Program of Food Production and Innovation, College of Integrated Science and Technology, Rajamangala University of Technology Lanna, Chiang Mai 50220, Thailand

²ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

²Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: malaiporn@mutl.ac.th

(Received: 28 September 2020; Accepted: 30 December 2020)

Abstract: Sweet orange is one of a major fruit produced in a northern part of Thailand. The fruits contain high vitamin C content (50 mg / 100 g orange fruit). However, their small shape covered with thin and dark skin are unappealing. Subsequently that leads to low market price. The main objective of this research is to create a value - added product, an orange wine. The effect of three sucrose sources (cane sugar, refined sugar and coconut sugar) on fermentation kinetics and qualities of sweet orange wine was investigated. The wine fermentation kinetics were determined from concentrations of yeast cell, reducing sugar and alcohol content. The optimal yeast cell growth and alcohol production was obtained from refined sugar. Nevertheless, the sensory evaluation suggested that orange wine with coconut sugar tasted better than cane sugar and refined sugar with the evaluation score of 14.5, 12.0 and 11.8, respectively. The chemical qualities (aldehyde and alcohol contents) of all wines were well within standard according to TISI 2089 - 2544. In conclusion, coconut sugar was the best sucrose sources for the sweet orange wine product.

Keywords: Fermentation kinetic, sucrose sources, sweet orange wine

บทคัดย่อ: ส้มเกลี้ยงเป็นผลไม้ที่ปลูกกันมากในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย มีปริมาณวิตามินซีสูงถึง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักส้ม 100 กรัม มีขนาดลูกเล็ก เปลือกบาง และมีสีคล้ำ ทำให้มีราคาขายที่ค่อนข้างถูก ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำมาเพิ่มมูลค่าโดยการผลิตไวน์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจนศาสตร์การหมักไวน์ส้มเกลี้ยงและเปรียบเทียบคุณภาพของไวน์ส้มเกลี้ยงโดยใช้แหล่งของน้ำตาลซูโครสที่แตกต่างกัน ในการศึกษาได้ใช้แหล่งน้ำตาลซูโครส 3 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลอ้อย น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลมะพร้าว ผลการศึกษาจนศาสตร์การหมักไวน์ส้มเกลี้ยงโดยพิจารณาจาก ปริมาณเชื้อยีสต์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแอลกอฮอล์ พบว่า น้ำตาลทรายขาวเป็นน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ และการผลิตแอลกอฮอล์ สำหรับคุณภาพทางกายภาพและเคมีของไวน์ส้มเกลี้ยงที่ใช้แหล่งน้ำตาลซูโครสชนิดต่าง ๆ พบว่า น้ำตาลมะพร้าว มีคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงที่สุด เท่ากับ 14.5 คะแนน (คุณภาพทางกายภาพ) รองลงมา คือ น้ำตาลอ้อย (12.0 คะแนน) และน้ำตาลทรายขาว (11.8 คะแนน) ตามลำดับ คุณภาพทางเคมี (ปริมาณแอลกอฮอล์ และแอลกอฮอล์) พบว่า ไวน์ส้มเกลี้ยงที่ใช้แหล่งน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด มีคุณภาพที่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน มอก. 2089-2544 จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า น้ำตาลมะพร้าว คือ แหล่งน้ำตาลซูโครสที่ส่งผลดีที่สุดต่อคุณภาพทางกายภาพและเคมีของผลิตภัณฑ์ไวน์ส้มเกลี้ยง

คำสำคัญ: จนศาสตร์การหมัก แหล่งน้ำตาลซูโครส ไวน์ส้มเกลี้ยง

คำนำ

ส้มเกลี้ยงเป็นผลไม้ที่ปลูกกันมากในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย จัดเป็นส้มประเภทเปลือกติดกับเนื้อไส้ตรงกลางแน่น ไม่กลวง เป็นผลไม้ที่มีรสหวานอมเปรี้ยวและมีกลิ่นหอม มีปริมาณวิตามินซีสูง (Bureau of Nutrition, 2001; Nampichai, 2017) ซึ่งวิตามินซี หรือกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) นอกจากจะเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้วยังสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้ โดยทั่วไปส้มเกลี้ยงในท้องตลาดมีขนาดลูกเล็ก เปลือกบาง และสีของเปลือกมีสีคล้ำ ทำให้มีราคาขายที่ค่อนข้างถูก (5-20 บาทต่อกิโลกรัม) ทางผู้วิจัยจึงได้เล็งเห็นว่าการนำส้มเกลี้ยงลักษณะดังกล่าวมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มจะส่งผลทำให้ส้มเกลี้ยงมีมูลค่าเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ซึ่งหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่น่าสนใจคือ ไวน์ เนื่องจากไวน์เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ มีส่วนช่วยในการเจริญอาหารและบำรุงร่างกาย แต่ไวน์มีส่วนของแอลกอฮอล์ที่เป็นองค์ประกอบ ควรดื่มในปริมาณที่พอเหมาะ คือ 1-2 แก้วต่อวัน (150-260 มิลลิลิตร) จึงจะช่วยบำรุงสุขภาพร่างกายได้ ในการผลิตไวน์มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ น้ำตาล เพราะเป็นแหล่งอาหารของเชื้อยีสต์ในการเจริญเติบโตและเปลี่ยน

น้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ งานวิจัยหรือผู้ผลิตไวน์ส่วนใหญ่นิยมใช้น้ำตาลทรายขาวซึ่งเป็นน้ำตาลซูโครส มีสีขาวที่ผ่านการฟอกสี อย่างไรก็ตามน้ำตาลซูโครสแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ทั้งในด้านของคุณภาพทางกายภาพและคุณภาพทางเคมี ซึ่งส่งผลต่อการผลิตไวน์แตกต่างกันไปด้วย น้ำตาลมะพร้าวและน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งของน้ำตาลซูโครสเช่นเดียวกับน้ำตาลทรายขาว โดยน้ำตาลมะพร้าวมีรสชาติคล้ายน้ำตาลทรายแดง แต่มีคุณค่าทางอาหารสูงกว่า ไม่ผ่านการฟอกสี ในขณะที่น้ำตาลอ้อย มีกลิ่นหอมของน้ำตาลอ้อย มีแคลเซียมและธาตุเหล็กจากอ้อยธรรมชาติ และไม่ผ่านการฟอกสี จากการที่งานวิจัยโดยส่วนใหญ่ใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งน้ำตาลสำหรับการผลิตไวน์ รวมทั้ง ศึกษากระบวนการหมักในรูปแบบต่าง ๆ แต่น้ำตาลมะพร้าวและน้ำตาลอ้อยยังไม่มีมีการนำมาผลิตไวน์ ตลอดจนศึกษากระบวนการและกลไกการหมัก

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำน้ำตาลซูโครสที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลอ้อย น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลมะพร้าว มาผลิตไวน์ส้มเกลี้ยงโดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือ เพื่อศึกษาจนศาสตร์การหมักไวน์ส้มเกลี้ยงโดยใช้แหล่งของน้ำตาลซูโครสต่างกัน และเพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของไวน์ส้มเกลี้ยงที่ผลิตโดยใช้แหล่งของน้ำตาลซูโครสต่างกัน ทั้งนี้

ข้อมูลที่ได้จากจุลนศาสตร์และคุณภาพของกระบวนการหมักไวน์ สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตไวน์ประเภทอื่น ๆ ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมน้ำส้มเกลี้ยง

ผสมน้ำส้มเกลี้ยงที่คั้นได้ 2,000 มิลลิลิตร กับน้ำสะอาด 2,000 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้น้ำส้มเกลี้ยงร้อยละ 50 โดยปริมาตร จำนวน 4,000 มิลลิลิตร เติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (diammoniumphosphate; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) 0.20 กรัม ปรับค่าของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเป็น 18.5 องศาบริกซ์ ด้วยการเติมน้ำตาลแต่ละชนิด (น้ำตาลอ้อย น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลมะพร้าว) ฆ่าเชื้อโดยการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นระยะเวลา 15 นาที แบ่งน้ำส้มเกลี้ยงเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก ปริมาตร 360 มิลลิลิตร ใช้สำหรับการเตรียมหัวเชื้อ และส่วนที่เหลือปริมาตร 3,600 มิลลิลิตร สำหรับใช้ในการหมัก

การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

ใส่เชื้อยีสต์ผงประมาณ 0.40 กรัม ลงในอาหารเหลว yeast extract malt extract นำไปต้มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น บีบเชื้อ 40 มิลลิลิตร ลงในน้ำส้มเกลี้ยงปริมาตร 360 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ข้างต้น แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ศึกษาการหมักไวน์ส้มเกลี้ยงโดยใช้แหล่งของน้ำตาลซูโครสชนิดต่าง ๆ

ในงานวิจัยได้เลือกใช้น้ำตาล 3 ชนิด คือ น้ำตาลอ้อย น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลมะพร้าว นำหัวเชื้อยีสต์ถ่ายลงในน้ำส้มเกลี้ยงปริมาตร 3,600 มิลลิลิตร ดำเนินการหมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 - 120 ชั่วโมงที่ 0 - 12 ทุก ๆ 2 ชั่วโมง ชั่วโมงที่ 16 - 36 ทุก ๆ 4 ชั่วโมง ชั่วโมงที่ 42 - 72 ทุก ๆ 6 ชั่วโมง และชั่วโมงที่ 84 - 120 ทุก ๆ 12 ชั่วโมง โดยวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอชแบบพกพา และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วยรีแฟรักโตมิเตอร์แบบพกพา

ปริมาณเชื้อยีสต์ด้วยวิธีการนับเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Wanichsan *et al.*, 2015) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Keayarsa, 2011) และวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ไวโนมิเตอร์ (A-kara *et al.*, 2015) นำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟระหว่างระยะเวลาในการหมัก (แกน X) กับปริมาณเชื้อยีสต์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแอลกอฮอล์ (แกน Y) เพื่อศึกษาจุลนศาสตร์การหมักแบบแบทช์ของไวน์ส้มเกลี้ยงที่ใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิด

การคำนวณค่าจุลนศาสตร์การหมักไวน์ส้มเกลี้ยงโดยใช้แหล่งของน้ำตาลซูโครสชนิดต่าง ๆ

ค่าจุลนศาสตร์การหมักจะใช้ข้อมูลในช่วง Log phase มาคำนวณ โดยใช้สูตรต่าง ๆ ดังนี้ (Siripoke, 2012)

$$(1) \text{ Specific growth rate } (\mu) \quad \ln x_t = \mu_t + \ln x_0 \quad (1)$$

Where; x = Cell concentration (g/L)

t = Time (hr)

μ = Specific growth rate (cell/mL.hr)

$$(2) \text{ Doubling time } (t_d) \quad t_d = \frac{0.693}{\mu} \quad (2)$$

$$(3) \text{ Growth yield coefficient } (Y_{XS}) \quad Y_{XS} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

Where; X_0 and S_0 = Initial concentration of cell and substrate (g/L)

X and S = Final concentration of cell and substrate (g/L)

$$(4) \text{ Product yield coefficient } (Y_{PS}) \quad Y_{PS} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (4)$$

Where; P_0 and S_0 = Initial concentration of product and substrate (g/L)

P and S = Final concentration of product and substrate (g/L)

เปรียบเทียบคุณภาพของไวน์ส้มเกลี้ยงโดยใช้แหล่งของน้ำตาลซูโครสชนิดต่าง ๆ

คุณภาพทางกายภาพ

นำไวน์ส้มเกลี้ยงที่ได้หลังจากการบ่มเป็นระยะเวลา 30 วัน มาทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคทางประสาทสัมผัสโดยวิธีดัดแปลงจาก American

Wine Society (2011) คุณลักษณะที่ประเมิน ได้แก่ สีของไวน์ ความสมดุลของกลิ่นหอมมวลของส้ม กลิ่นและรสชาติที่หลงเหลือคั่งในปาก ความพึงพอใจในคุณภาพ และรสชาติของไวน์ ใช้ผู้ทดสอบชิม วัยผู้ใหญ่ (อายุ 21 - 60 ปี) ที่ไม่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 30 คน นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยสถิติ t - test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

คุณภาพทางเคมี

การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยวิธีการไทเทรต

ทำการกลั่นตัวอย่างไวน์ส้มเกลี้ยง โดยนำไวน์ส้มเกลี้ยงปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำขวดกลั่นต่อเข้ากับชุดอุปกรณ์กลั่น โดยกลั่นที่อุณหภูมิไม่เกิน 78 °C นำตัวอย่างที่ได้จากการกลั่นไปวิเคราะห์แอลกอฮอล์โดยเติมน้ำกลั่น (แบบกลั่น) หรือตัวอย่างที่กลั่นได้ 25.0 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ 5.0 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน ปิดจุกแล้วเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ 12.5 มิลลิลิตร และน้ำแป้ง ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร จำนวน 3 หยด (อินดิเคเตอร์) ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตมาตรฐานความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ จนถึงจุดยุติ (สารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำตาลแดงเป็นไม่มีสี) (ดัดแปลงมาจาก Kenya Bureau of Standards, 2015) จากนั้นนำข้อมูลไปคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์ ดัง Equation 5

$$\text{Aldehyde content (g / L)} = \frac{0.0011 \times 2 \times (B - A) \times 1,000}{V_1} \quad (5)$$

Where; 1 mL of standard thiosulfate solution = 0.0011 g of acetaldehyde

A = Volume of standard thiosulfate solution used in titration (blank)

B = Volume of standard thiosulfate solution used in titration (sample)

V_1 = Concentration of alcohol in distilled sample (% v/v)

การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้ไวน์อมิเตอร์

นำตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในไวน์อมิเตอร์รอให้ตัวอย่างหยุดลง 2 หยด แล้วพลิกไวน์อมิเตอร์คว่ำลง แล้วอ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์เป็นร้อยละโดยปริมาตรจากขีดสีขาว ณ จุดที่หยุดไหล (A-kara *et al.*, 2015)

สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

ในงานวิจัยได้วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยโปรแกรม IBM SPSS 23 ช่วยในการคำนวณ

ผลการทดลองและวิจารณ์

จุลนาศาสตร์การหมักไวน์ส้มเกลี้ยงโดยใช้แหล่งของน้ำตาลซูโครสชนิดต่าง ๆ

การเปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลที่ส่งผลต่อการกลไกการหมักไวน์ส้มเกลี้ยง ด้วยการใช้น้ำตาลซูโครสที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลอ้อย น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลมะพร้าว โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อยีสต์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น แสดงได้ดัง Figure 1

จาก Figure 1 สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงค่าต่าง ๆ ในแต่ละช่วงระยะเวลาได้ดังนี้

ช่วงเวลาที่ 0 - 2 มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลเชื้อยีสต์ และแอลกอฮอล์ของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ที่ค่อนข้างน้อย เนื่องจากเป็นช่วงระยะเวลาที่เชื้อยังอยู่ในสภาวะปรับตัวกับอาหารใหม่ จึงยังไม่มี การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ ส่งผลให้มีการใช้น้ำตาลน้อย และมีการผลิตแอลกอฮอล์ที่น้อย (ระยะ lag phase) ช่วงเวลาที่ 2 - 32 (น้ำตาลอ้อย และน้ำตาลมะพร้าว) และ 2 - 36 (น้ำตาลทรายขาว) มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลเชื้อยีสต์ และแอลกอฮอล์เป็นอย่างมาก โดยที่น้ำตาลอ้อย และน้ำตาลมะพร้าว มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ค่อนข้างมากสำหรับนำไปผลิตเซลล์ยีสต์และแอลกอฮอล์ โดยน้ำตาลอ้อยมีแนวโน้มของการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่มากกว่าน้ำตาลมะพร้าว แต่มีแนวโน้มของการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่น้อยกว่า

ซึ่งน้ำตาลทั้งสองชนิดมีแนวโน้มการผลิตแอลกอฮอล์ที่ใกล้เคียงกัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิดจากการย่อยสลายน้ำตาลซูโครส (น้ำตาลโมเลกุลคู่ซึ่งไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทส (น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์) ด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ยีสต์ผลิตขึ้น ซึ่งในช่วงเริ่มต้นมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่น้อย เนื่องจากน้ำตาลซูโครสถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในปริมาณที่น้อย โดยที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงเริ่มต้นมีเพียงน้ำตาลฟรุกโทสที่อยู่ในน้ำส้ม และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เกิดจากขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ แต่เมื่อเวลาผ่านไปมีปริมาณเชื้อยีสต์เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้มีเอนไซม์อินเวอร์เทสเพิ่มมากขึ้น จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Horiuchi *et al.* (2002) ที่รายงานว่ ในช่วงการหมักไวน์เพื่อผลิตน้ำส้มสายชูจากหมักหัวใหญ่ด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* IR-2 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทส เพิ่มขึ้นในช่วงการหมัก 0 - 24 ชั่วโมง ก่อนลดลงตามระยะเวลาการหมัก เนื่องจากยีสต์ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทส หากดูแนวโน้มแล้วพบว่า น้ำตาลอ้อยใช้น้ำตาลเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ที่อัตราสูงกว่าน้ำตาลมะพร้าว จึงเป็นไปได้ว่าน้ำตาลอ้อยเหมาะสำหรับการใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์มากกว่าน้ำตาลมะพร้าว อาจเนื่องมาจาก น้ำตาลอ้อยมีแหล่งแร่ธาตุและวิตามินที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ จึงทำให้เชื้อยีสต์สามารถใช้สารอาหารในการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ ในขณะที่น้ำตาลมะพร้าวเหมาะสำหรับการใช้ในการผลิตเชลล์ยีสต์ สำหรับน้ำตาลทรายขาวมีแนวโน้มของการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่น้อยกว่าน้ำตาลอ้อยและน้ำตาลมะพร้าว แต่ผลิตมวลเชลล์ได้ใกล้เคียงกับน้ำตาลอ้อย (น้อยกว่าน้ำตาลมะพร้าว) รวมทั้ง มีแนวโน้มของการผลิตแอลกอฮอล์ที่สูงกว่าน้ำตาลอีกสองชนิด ดังนั้น หากดูความสัมพันธ์จาก Figure 1 น้ำตาลทรายขาวเป็นน้ำตาลที่มีอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่น้อย แต่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ค่อนข้างมาก

ช่วงโม่งที่ 32 - 96 (น้ำตาลอ้อยและน้ำตาลมะพร้าว) และ 36 - 72 (น้ำตาลทรายขาว) มีการลดลงของปริมาณเชื้อยีสต์และน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงมาก แต่ปริมาณแอลกอฮอล์คงที่ โดยที่น้ำตาลอ้อยและน้ำตาลมะพร้าวมีแนวโน้มของการลดลงของเชลล์ยีสต์มากกว่าน้ำตาลทรายขาว สัมพันธ์กับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงอย่างมากเช่นกัน สำหรับน้ำตาลทรายขาวยังคงมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่มากกว่า ส่งผลให้เชลล์ลดลงอย่างช้า ๆ การลดลงของเชลล์ยีสต์อาจเนื่องมาจาก ปริมาณแอลกอฮอล์และก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น โดยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์เกิดจากกระบวนการที่ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งโดยทั่วไปก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ ซึ่งถ้าหากมีน้ำตาลเหลืออยู่หลังกระบวนการหมัก ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะรวมตัวกับน้ำตาลกลายเป็นสารซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ ซึ่งเป็นสารคงตัว มีคุณสมบัติในเรื่องของการป้องกันแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่พึงประสงค์ในไวน์ และรักษาคุณภาพของไวน์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chandra *et al.* (2015) พบว่า ปริมาณก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในน้ำหมักส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการตายของเชลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* มากกว่าปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้น หากมีปริมาณก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่น้อย (< 8 มิลลิกรัมต่อลิตร) แต่มีปริมาณเอทานอลที่มาก (> 12 ร้อยละโดยปริมาตร) ไม่มีผลต่อการตายของเชลล์ยีสต์ แต่หากมีความเข้มข้นของก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่สูง (> 32 มิลลิกรัมต่อลิตร) เชื้อยีสต์จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโต

ช่วงโม่งที่ 96 - 120 (น้ำตาลอ้อยและน้ำตาลมะพร้าว) และ 72 - 120 (น้ำตาลทรายขาว) มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอลกอฮอล์เล็กน้อยแต่ส่งผลให้ปริมาณเชลล์ยีสต์ลดลงเพิ่มขึ้น โดยในน้ำตาลมะพร้าวและน้ำตาลทรายขาวยังคงมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในน้ำหมักที่ค่อนข้างมาก แต่น้ำตาลอ้อยไม่เหลือน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อยีสต์ในน้ำตาลอ้อยใช้แหล่งคาร์บอนจากการสลายของเชลล์ยีสต์ที่ตายไป มาเป็นขั้สเตรทในอาหารขึ้นมาใหม่อีกครั้งในการผลิตแอลกอฮอล์ (Kijjanapanich, 2006)

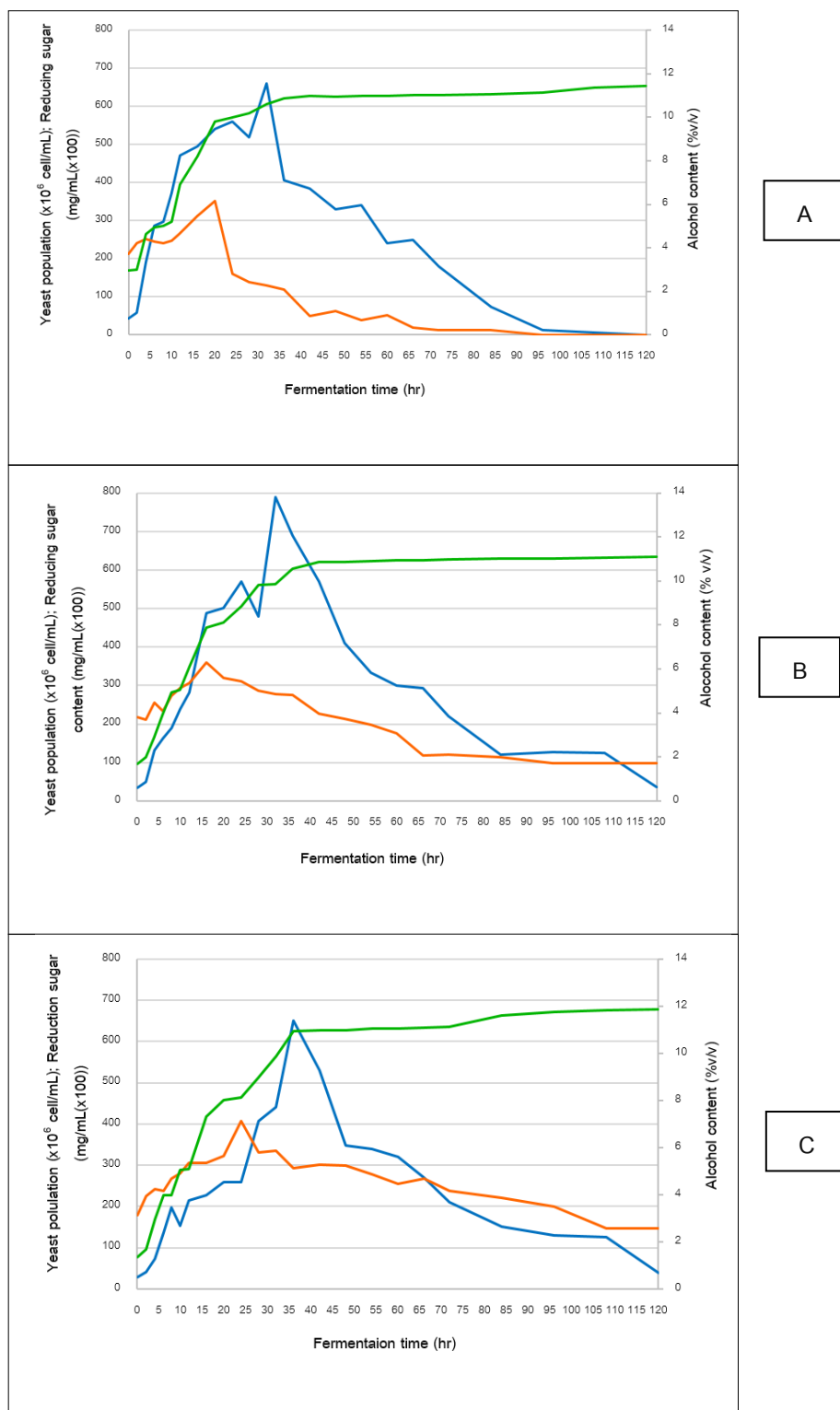


Figure 1. Kinetic curve of orange wine fermentation using various sucrose types
A. Cane sugar, B. Coconut sugar, C. Refined sugar

ค่าจุลนาศาสตร์การหมักแบบแบทช์ของไวน์ส้มเกลี้ยงโดยใช้แหล่งน้ำตาลซูโครสชนิดต่าง ๆ

จากผลการทดลองกลไกการหมักไวน์ส้มเกลี้ยงโดยใช้แหล่งซูโครสชนิดต่าง ๆ สามารถนำค่าปริมาณเซลล์ยีสต์ น้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแอลกอฮอล์ในช่วงระยะ Log phase ของน้ำตาลแต่ละชนิด มาคำนวณค่าจุลนาศาสตร์การหมักแบบแบทช์ได้ดัง Table 1 จากผลการทดลองข้างต้นสามารถอธิบายได้ดังนี้

อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ (μ) คือ ค่าที่แสดงถึงการเจริญของยีสต์ ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง เซลล์ยีสต์ในอาหาร 1 มิลลิเมตร จะสามารถเจริญเติบโตได้จำนวน 1 เซลล์ ซึ่งถ้าค่า μ มาก แสดงว่า เซลล์ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี และย่อมจะผลิตแอลกอฮอล์ที่สูงตามไปด้วย พบว่า น้ำตาลทรายขาวมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด เนื่องจาก มีค่า μ มากที่สุด เท่ากับ $0.9114 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ ลำดับต่อมาเป็นน้ำตาลมะพร้าว และน้ำตาลอ้อย มีค่าเท่ากับ 0.5928 และ $0.2382 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Wang *et al.* (2004) ได้ศึกษาจุลนาศาสตร์การหมักไวน์แอปเปิลของน้ำตาลที่แตกต่างกันโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ เท่ากับ $0.0887 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$

ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ (t_d) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงเวลาที่เซลล์ยีสต์ ใช้ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ ซึ่งถ้าค่า t_d น้อย แสดงว่าเซลล์ยีสต์ใช้ระยะเวลาที่น้อยในการเพิ่มจำนวน พบว่า น้ำตาลทรายขาว ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ น้อยที่สุดเท่ากับ 0.7604 ชั่วโมง ลำดับต่อมาเป็นน้ำตาล

มะพร้าว ใช้ระยะเวลา เท่ากับ 1.1690 และน้ำตาลอ้อย เท่ากับ 2.9096 ชั่วโมง ตามลำดับ

ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร ($Y_{x/s}$) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงการใช้สารอาหารโดยเซลล์ยีสต์แล้วผลิตมวลเซลล์ยีสต์ขึ้น ซึ่งถ้า $Y_{x/s}$ มีค่ามาก แสดงว่ายีสต์ใช้แหล่งอาหารเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มาก พบว่า น้ำตาลมะพร้าวมีค่า $Y_{x/s}$ มากที่สุด เท่ากับ 3.6123 กรัมของเซลล์ต่อกรัม น้ำตาล ลำดับต่อมาเป็นน้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลอ้อย เท่ากับ 3.4234 และ 0.5394 กรัมของเซลล์ต่อกรัม น้ำตาล ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Wang *et al.* (2004) ได้ศึกษา จุลนาศาสตร์การหมักไวน์แอปเปิลของน้ำตาลที่แตกต่างกันโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร เท่ากับ 0.2061 กรัมของเซลล์ต่อกรัม น้ำตาล

ผลได้ของผลิตภัณฑ์ ($Y_{p/s}$) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงการที่เซลล์ยีสต์ใช้น้ำตาลเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ (แอลกอฮอล์) ซึ่งถ้าค่า $Y_{p/s}$ มีค่ามาก แสดงว่า ได้แอลกอฮอล์ที่มาก พบว่า น้ำตาลทรายขาวมีค่า $Y_{p/s}$ มากที่สุด เท่ากับ 2.4492 กรัมเอทานอลต่อกรัม น้ำตาล ลำดับต่อมาเป็นน้ำตาลมะพร้าว และน้ำตาลอ้อย มีค่าเท่ากับ 2.3848 และ 0.3617 กรัมเอทานอลต่อกรัม น้ำตาลตามลำดับ จากงานวิจัยของ Wang *et al.* (2004) ได้ศึกษา จุลนาศาสตร์การหมักไวน์แอปเปิลของน้ำตาลที่แตกต่างกันโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า ผลได้ของผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 5.6637 กรัมเอทานอลต่อกรัม น้ำตาล และงานวิจัยของ Phowchinda and Dingsawat (2002) ได้ศึกษา จุลนาศาสตร์ของ

Table 1. Parameters of kinetic fermentation of sweet orange wine products using different sources of sugar

Kinetic and yield parameters	Units	Cane sugar	Coconut sugar	Refined sugar
Specific growth rate (μ)	h^{-1}	0.2382 ± 0.02^c	0.5928 ± 0.04^b	0.9114 ± 0.01^a
Doubling time (t_d)	h	2.9096 ± 0.12^a	1.1690 ± 0.15^b	0.7604 ± 0.09^c
Growth yield coefficient ($Y_{x/s}$)	g/g	0.5394 ± 0.07^b	3.6123 ± 0.10^a	3.4234 ± 0.05^a
Product yield coefficient ($Y_{p/s}$)	g/g	0.3617 ± 0.01^b	2.3848 ± 0.05^a	2.4492 ± 0.03^a

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$; Mean values with the same lowercase superscript letter of different sucrose types are not significantly different ($P > 0.05$)

การหมักไวน์กล้วยหอมโดยยีสต์ *Saccharomyces ellipsoideus* TISTR 5011 พบว่า ผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.44 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล

จากค่าจลนศาสตร์การหมัก สามารถสรุปได้ว่า น้ำตาลทรายขาวเป็นน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* และการผลิตแอลกอฮอล์ เนื่องจาก น้ำตาลทรายขาวมีอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ที่มากกว่าน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด โดยเทียบจากค่าของอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีค่ามากที่สุด ($0.9114 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$) และค่าระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีค่าน้อยสุด (0.7604 ชั่วโมง) ซึ่งค่าทั้ง 2 มีค่าสัมพันธ์กัน และการใช้สารอาหารในการผลิตแอลกอฮอล์ (ผลิตภัณฑ์) จะเห็นได้ว่า ยีสต์ใช้สารอาหารจากน้ำตาลทรายขาวได้ดีที่สุด เนื่องจากมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ที่มากที่สุด (2.4492 กรัม

เอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) จากข้อมูลสามารถนำไปใช้ประกอบการตัดสินใจการเลือกแหล่งของน้ำตาลซูโครสควบคู่กับคุณภาพของไวน์ส้มเกลี้ยงในขั้นตอนต่อไป

เปรียบเทียบคุณภาพของไวน์ส้มเกลี้ยงที่ผลิตโดยใช้แหล่งของน้ำตาลซูโครสชนิดต่างๆ

คุณภาพทางกายภาพของไวน์ส้มเกลี้ยง

จากการศึกษาคุณภาพของไวน์ส้มเกลี้ยงโดยใช้แหล่งของน้ำตาลซูโครสชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำตาลอ้อย น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลมะพร้าว (Figure 2) โดยทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสจากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน ประกอบด้วยเพศชาย 12 คน และเพศหญิง 18 คน อายุโดยเฉลี่ยเท่ากับ 43 ± 9 ปี ซึ่งผลการประเมินคุณภาพในด้านต่าง ๆ มีรายละเอียดดัง Table 2 และ Figure 3



Figure 2. Sweet orange wine products using various sources of sugar

A. Cane sugar, B. Coconut sugar, C. Refined sugar

Table 2. Sensory analysis of sweet orange wine products using different sources of sugar

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, $n = 30$; Mean values with the same lowercase superscript letter of the same sucrose types are not significantly different ($P > 0.05$)

Appearance: 0 = Objectionable, 1 = Poor, 2 = Good, 3 = Excellent

Sucrose sources	Wine evaluation chart					Total score (20 scores)
	Appearance	Aroma/Bouquet	Aftertaste	Overall impression	Taste / Texture	
	(3 scores)	(6 scores)	(3 scores)	(2 scores)	(6 scores)	
Cane sugar	1.6 ± 0.935^c	4.1 ± 1.668^a	1.5 ± 0.973^b	0.7 ± 0.739^b	4.1 ± 1.446^b	12.0 ± 3.991^b
Coconut sugar	2.3 ± 0.836^a	4.1 ± 1.436^a	2.2 ± 0.746^a	1.2 ± 0.592^a	4.8 ± 1.165^a	14.5 ± 2.933^a
Refined sugar	2.0 ± 0.850^b	3.6 ± 1.633^a	1.5 ± 0.937^b	0.7 ± 0.691^b	4.0 ± 1.438^b	11.8 ± 3.623^b

Aroma/Bouquet: 0 = Objectionable, 1 = Poor, 2 = Deficient, 3 = Acceptable, 4 = Good, 5 = Excellent, 6 = Extradiordinary

Aftertaste: 0 = Objectionable, 1 = Poor, 2 = Good, 3 = Excellent

Overall impression: 0 = Poor, 1 = Good, 2 = Excellent

Taste/Texture: 0 = Objectionable, 1 = Poor, 2 = Deficient, 3 = Acceptable, 4 = Good, 5 = Excellent, 6 = Extradiordinary

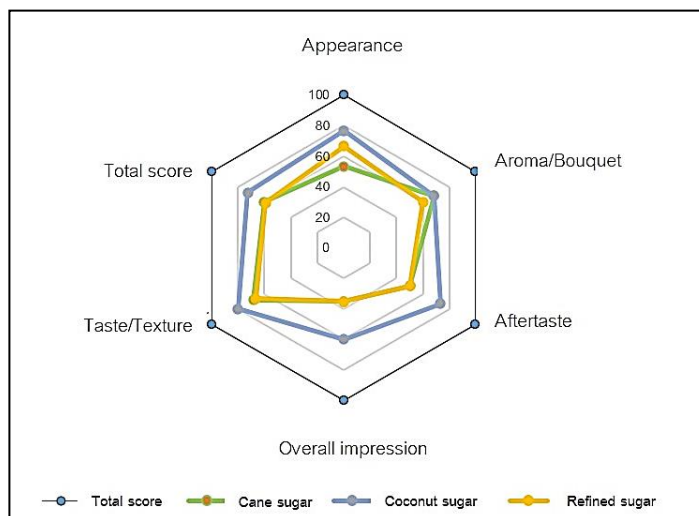


Figure 3. Sensory analysis of sweet orange wine products using 3 sucrose sources

จากข้อมูลใน Table 2 สามารถนำเสนอเป็นแผนภาพได้ดัง Figure 3 โดยคะแนนเฉลี่ยรวมของการทดสอบทางประสาทสัมผัสของไวน์ส้มเกลี้ยงเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ได้แก่ น้ำตาลมะพร้าว น้ำตาลอ้อย และน้ำตาลทรายขาว โดยมีค่าเท่ากับ 14.5, 12.0 และ 11.8 คะแนน ตามลำดับ โดยน้ำตาลมะพร้าวมีคะแนนเฉลี่ยรวมแตกต่างจากน้ำตาลอ้อยและน้ำตาลทรายขาว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่ น้ำตาลอ้อย และน้ำตาลทรายขาวมีคะแนนเฉลี่ยรวมไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) โดยเมื่อพิจารณารายละเอียดของการทดสอบทางประสาทสัมผัส ในแต่ละด้านสามารถอธิบายได้ดังนี้

สีของไวน์ส้มเกลี้ยง มีคะแนนเฉลี่ยรวมเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ได้แก่ น้ำตาลมะพร้าว น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลอ้อย โดยมีค่าเท่ากับ 2.3, 2.0 และ 1.6 คะแนน ตามลำดับ โดยน้ำตาลมะพร้าว น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลอ้อย มีคะแนนเฉลี่ยรวมแตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) ซึ่งน้ำตาลมะพร้าวมีคะแนนเฉลี่ยรวมสีของไวน์มากที่สุด คือ มีสีใสตามธรรมชาติของไวน์ สำหรับน้ำตาลอ้อยซึ่งมีคะแนนน้อยสุด คือ มีตะกอน สีไม่เป็นธรรมชาติ เนื่องจาก น้ำตาลอ้อยมีสีน้ำตาลเข้มทำให้ไวน์มีสีเข้มและไม่เป็นไปตามสีธรรมชาติของไวน์ส้มเกลี้ยง

ความสมดุลของกลิ่นหอมของส้ม น้ำตาลมะพร้าวและน้ำตาลอ้อยมีคะแนนเท่ากัน คือ 4.1 คะแนน ซึ่งมีกลิ่นหอมของส้มค่อนข้างมาก และน้ำตาลทรายขาว มีค่าเท่ากับ 3.6 คะแนน คือ กลิ่นหอมของส้มอยู่ระหว่างปานกลาง ถึงค่อนข้างมาก โดยน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด มีคะแนนเฉลี่ยรวมที่ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ดังนั้น ชนิดของน้ำตาลไม่ส่งผลต่อความสมดุลของกลิ่นหอมของไวน์ส้มเกลี้ยง

กลิ่นและรสชาติที่หลงเหลือค้างในปาก น้ำตาลมะพร้าว มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 2.2 คะแนน ซึ่งหมายถึงมีกลิ่นและรสชาติที่หลงเหลือค้างในปากเป็นที่น่าพึงพอใจ ส่วนน้ำตาลอ้อย และน้ำตาลทรายขาวมีคะแนนเท่ากัน คือ 1.5 คะแนน ซึ่งหมายถึง มีกลิ่นและรสชาติที่หลงเหลือค้างในปากค่อนข้างน้อย โดยน้ำตาลมะพร้าวมีคะแนนเฉลี่ยรวมแตกต่างจากน้ำตาลอ้อยและน้ำตาลทรายขาว ($P \leq 0.05$) แต่ น้ำตาลอ้อยและน้ำตาลทรายขาวมีคะแนนเฉลี่ยรวมไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) เนื่องจาก น้ำตาลมะพร้าวเป็นน้ำตาลที่ได้จากธรรมชาติ มีความหอมที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว ให้รสชาติกลมกล่อม ไม่หวานแหลมเหมือนน้ำตาลชนิดอื่น

ความพึงพอใจในคุณภาพ น้ำตาลมะพร้าว มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 1.2 คะแนน ซึ่งหมายถึง คุณภาพที่ยอมรับได้ น้ำตาลอ้อยและน้ำตาลทรายขาวมีคะแนนเท่ากัน คือ มีค่าเท่ากับ 0.7 คะแนน ซึ่งหมายถึง

อยู่ระหว่างไม่มีลักษณะของความเป็นไวน์กับคุณภาพที่ยอมรับได้ โดยค่อนไปทางคุณภาพที่ยอมรับได้ โดยน้ำตาลมะพร้าวมีคะแนนเฉลี่ยรวมแตกต่างจากน้ำตาลอ้อยและน้ำตาลทรายขาว ($P \leq 0.05$) แต่ น้ำตาลอ้อยและน้ำตาลทรายขาวมีคะแนนเฉลี่ยรวมไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) เนื่องจาก น้ำตาลมะพร้าว มีสีสวย รสชาติมีความละมุน กลมกล่อม มีความสมดุลของแรงแอลกอฮอล์และความหวาน

รสชาติของไวน์ มีคะแนนเฉลี่ยรวมเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ได้แก่ น้ำตาลมะพร้าว น้ำตาลอ้อย และน้ำตาลทรายขาว โดยมีค่าเท่ากับ 4.8, 4.1 และ 4.0 คะแนน ตามลำดับ โดยน้ำตาลมะพร้าวมีคะแนนเฉลี่ยรวมแตกต่างจากน้ำตาลอ้อยและน้ำตาลทรายขาว ($P \leq 0.05$) แต่ น้ำตาลอ้อยและน้ำตาลทรายขาวมีคะแนนเฉลี่ยรวมไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) รสชาติไวน์สัมผัสยั้งที่ใช้น้ำตาลมะพร้าว อยู่ระหว่างมีความสมดุลของรสชาติ แต่ไม่บ่งบอกถึงชนิดของไวน์ได้ กับมีความสมดุลของความเป็นกรด ความหวาน และปริมาณแอลกอฮอล์ และบ่งบอกชนิดของผลไม้ได้ โดยค่อนไปทางมีความสมดุลของความเป็นกรด ความหวาน และปริมาณแอลกอฮอล์ และบ่งบอกชนิดของผลไม้ได้ สำหรับน้ำตาลอ้อย และน้ำตาลทรายขาวมีความสมดุลของรสชาติแต่ไม่บ่งบอกถึงชนิดของไวน์ได้

คุณภาพทางเคมีของไวน์สัมผัสยั้ง

จากการนำไวน์สัมผัสยั้งที่ใช้แหล่งน้ำตาลชูโครสที่ต่างกัน 3 ชนิด มาวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ (ในที่นี้คือการวิเคราะห์ปริมาณเอซิทัลดีไฮด์) และแอลกอฮอล์ หลังจากการบ่ม 30 วัน เพื่อแสดงคุณภาพ

ทางเคมีตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมไวน์ (TISI 2089-2544) และมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนไวน์ผลไม้ (TCSP 2/2546) ได้ผลดัง Table 3

จากตารางข้างต้น พบว่า ปริมาณแอลดีไฮด์ของน้ำตาลอ้อย น้ำตาลมะพร้าว และน้ำตาลทรายขาว เท่ากับ 52.27, 82.68 และ 67.61 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแปรผกผันกับปริมาณแอลกอฮอล์ที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 9.33, 8.87 และ 9.87 โดยปริมาตรตามลำดับ จะเห็นได้ว่า น้ำตาลมะพร้าวมีปริมาณแอลดีไฮด์สูงสุด ในขณะที่มีปริมาณแอลกอฮอล์น้อยที่สุด และน้ำตาลอ้อยมีปริมาณแอลดีไฮด์น้อยที่สุดในขณะที่มีปริมาณแอลกอฮอล์สูง ซึ่งในกระบวนการผลิตเอทานอลโดยทั่วไป ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสหรือฟรุคโทสไปเป็นแอลกอฮอล์ โดยแอลกอฮอล์ถูกเปลี่ยนมาจากเอซิทัลดีไฮด์ (แอลดีไฮด์) ดังนั้น หากมีปริมาณแอลดีไฮด์ที่สูง แสดงว่าน้ำตาลถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้น้อย (Chamchaichaowiwat, 2015; Siripoke, 2012) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaewdang (1997) ที่ศึกษาปัจจัยที่มีผลในการหมักและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีระหว่างการผลิตไวน์หม่อน โดยใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet และ ยีสต์สายพันธุ์ Burgundy เป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่า ได้ปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับร้อยละ 8.1 และ 7.9 โดยปริมาตร และปริมาณแอลดีไฮด์เท่ากับ 25.52 และ 30.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และงานวิจัยของ Pongsayarm (2004) ที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของไวน์หม่อนที่หมักจากน้ำหม่อนเข้มข้นโดยการระเหยแบบสุญญากาศ การแช่เยือกแข็งแบบผลึกแขวนลอย

Table 3. Aldehyde and alcohol contents of sweet orange wine using different sucrose sources

Sucrose sources	Aldehyde (mg / L)	Alcohol (% v / v)
Cane sugar	52.27 ± 0.052 ^c	9.3 ± 0.101 ^a
Coconut sugar	82.68 ± 0.087 ^a	8.9 ± 0.111 ^b
Refined sugar	67.61 ± 0.102 ^b	9.9 ± 0.098 ^a

Data are expressed as mean ± standard deviation, n = 3; Mean values with the same lowercase superscript letter of different sucrose types are not significantly different ($P > 0.05$)

และไวน์หม่อนควบคุม พบว่า ได้ปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ ร้อยละ 10.42, 11.03 และ 11.27 โดยปริมาตร และปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 60.72, 40.48 และ 29.92 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากงานวิจัยทั้งสองสามารถยืนยันได้ว่า ปริมาณแอลกอฮอล์แปรผกผันกับปริมาณแอลกอฮอล์โดยทั่วไป แอลกอฮอล์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เป็นอันตรายต่อร่างกาย หากมีปริมาณแอลกอฮอล์ในปริมาณที่สูง จะส่งผลให้เกิดจากอาการเมาค้าง (คลื่นไส้ อาเจียน สับสน มึนงง และปวดหัว เป็นต้น) (Mello *et al.*, 2008) ทั้งนี้ ปริมาณแอลกอฮอล์ของไวน์ส้มเกลี้ยงที่หมักโดยใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิด เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน TISI. 2089 - 2544 ที่กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ไวน์ผลไม้มีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เกินร้อยละ 15 โดยปริมาตร

สรุป

ผลของจุลนาศาสตร์การหมักไวน์ส้มเกลี้ยงโดยใช้แหล่งของน้ำตาลซูโครสต่างกัน พบว่า เชื้อยีสต์ของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและลดลงในเวลาใกล้เคียงกัน แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะ lag phase ระยะ log phase และระยะ death phase น้ำตาลรีดิวซ์ มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในระยะ lag phase ถึง log phase และลดลงในช่วงระยะ death phase สำหรับแอลกอฮอล์สามารถตรวจวัดได้ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ log phase จากนั้น เริ่มคงที่ในระยะ death phase จากค่าจุลนาศาสตร์การหมักไวน์ส้มเกลี้ยงฯ พบว่า น้ำตาลทรายขาว เป็นน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* และการผลิตแอลกอฮอล์ เนื่องจากมีอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์มากที่สุด ผลของคุณภาพของไวน์ส้มเกลี้ยงที่ผลิตโดยใช้แหล่งของน้ำตาลซูโครสต่างกัน พบว่า คุณภาพทางกายภาพ ซึ่งทดสอบด้วยวิธีการยอมรับทางประสาทสัมผัส ค่าการยอมรับโดยเฉลี่ยของไวน์ที่ใช้น้ำตาลมะพร้าว ได้รับคะแนนสูงที่สุด (14.5 คะแนน)

จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า แหล่งน้ำตาลซูโครสที่ส่งผลให้คุณภาพทางกายภาพและเคมีของไวน์ส้มเกลี้ยงที่ดีที่สุด คือ น้ำตาลมะพร้าว

เอกสารอ้างอิง

- A-kara, N., N. Boonmak, and A. Pakdeeto. 2015. Palm juice mixed with Black Galingale Wine Fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049^T and Yeasts Isolated from Toddy. *Prawarun Agriculture Journal* 12(1): 41-48. (in Thai)
- American Wine Society. 2011. Wine evaluation chart. American Wine Society, Englewood, OH.
- Bureau of Nutrition. 2001. Orange nutrition compositions. Bureau of Nutrition Department of Health, Bangkok. (in Thai)
- Chandra, M., I. Oro, S. Ferreira-Dias and M. Malfeito-Ferreira. 2015. Effect of ethanol, sulfur dioxide and glucose on the growth of wine spoilage yeasts using response surface methodology. *PLoS ONE* 10(6): e0128702, doi: 10.1371/journal.pone.0128702.
- Chamchaichoawiwat, A. 2015. Yeast and Yeast Technology. Kao Thai Advertising and Printing, Bangkok. (in Thai)
- Horiuchi, J., M. Narumi, K. Tada, M. Kobayashi, T. Kanno and T. Suzuki. 2002. A shaking bioreactor equipped with twin ceramic membranes for acetic acid production using *Acetobacter pasteurianus*. *Biotechnology Letters* 24: 1987-1991.
- Kaewdang, S. 1997. Factors affecting fermentation and chemical change on mellowing mulberry *Morus alba* wine. M.S. Thesis. Chulalongkorn University, Bangkok. (in Thai)
- Keayarsa, S. 2011. Characterization of fructosyltransferase extracted from *Ierusalem*

- artichoke* for fructooligosaccharides production. M.S. Thesis. Silpakorn University, Nakhon Pathom. (in Thai)
- Kenya Bureau of Standards. 2015. Alcoholic beverages-Methods of sampling and test. Kenya Bureau of Standard, Nairobi.
- Kijjanapanich, P. 2006. Fermentation. 2nded. Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai. 56p. (in Thai)
- Mello, T., E. Ceni, C. Surrenti and A. Galli. 2008. Alcohol induced hepatic fibrosis: Role of acetaldehyde. *Molecular Aspects of Medicine* 29: 17-21.
- Nampichai, P. 2017. Study of sweet orange wine. Cooperative Education Research Project Report. Program of Food Engineering, Rajamangala University of Technology Lanna, Chiang Mai. 25p. (in Thai)
- Phowchinda, O. and U. Dingsawat. 2002. Fermentation kinetics of banana wine by *Saccharomyces ellipsoideus* TISTR 5011. King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Central Library, Bangkok. (in Thai)
- Pongsayarm, P. 2004. Application of concentration methods in mulberry (*Morus alba* L.) wine making. M.S. Thesis. Chulalongkorn University, Bangkok. (in Thai)
- Siripoke, S. 2012. Industrial Microbiology. Bangkok Auxiliary Media Center, Bangkok. 298p. (in Thai)
- Thai Industrial Standards Institute (TISI). 2001. Thai industrial product standard of wine (TISI 2089-2544). (in Thai)
- Thai Industrial Standards Institute (TISI). 2003. Thai community product standard of fruit wine (TCSP 2/2546). (in Thai)
- Wanichsan, D., N. Ninchawee, T. Rattanakom and P. Kongjuk. 2015. An algorithm for Hemocytometer Cell counting based on Image Processing Technique and DBSCAN. *Information Technology Journal* 11(2): 56-61. (in Thai)
- Wang, D., Y. Xu, J. Hu, and G. Zhao. 2004. Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing* 110(4): 340-346.
-

ผลของปริมาณสารไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลสและระยะเวลาในการอบแห้ง ต่อคุณภาพของว่านหางจระเข้ผงด้วยวิธีทำแห้งโฟม - แมท

Effects of Hydroxypropyl Methylcellulose Content and Drying Time on Qualities of *Aloe vera* Powder by Foam - mat Drying

สุภเวท มานิชยม*, วรางคณา เตมียะ นพพล เล็กสวัสดิ์ และ พัชรีย์ พัฒนากุล
Supavej Maniyom*, Warangkana Temeeya, Noppol Leksawasdi and Patcharee Pattanagul

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50100
Faculty of Agro - Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand
*Corresponding author: Email: mrsupavej@gmail.com

(Received: 3 August 2020; Accepted: 21 December 2020)

Abstract: The objective of this study was to find out the levels of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC: 1, 2, 3 and 4 %) and drying time (12, 16, 20 and 24 hrs) in order to develop the qualities of aloe vera powder by using foam - mat drying. The results showed that 1 % HPMC make the highest foaming overrun of aloe vera foam as 493.83 %. This foam was dried in trays and heat flowed easily to give the lowest moisture content as 4.91% and it provided the highest of antioxidant activity with 0.74 mg / g sample of trolox equivalent. The drying periods of 12 - 24 hrs were not significantly different to affect production yield in the range of 16.36 - 16.90 %. However, 16 - hr drying time was suitable for foam - mat drying process because it gave the moisture content under criteria of Thai Community Product Standard for dried mixed herbs as 6.69 %. Moreover, water solubility index (WSI) were not significantly different ($P > 0.05$) between 12 - and 16 - hr drying time drying time process and the values were 84.47 and 80.46 %, respectively.

Keywords: Aloe vera, hydroxypropyl methylcellulose, foam - mat drying

บทคัดย่อ: จุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของสารไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส (HPMC: 1, 2, 3 และ 4 %) และระยะเวลาในการอบแห้ง (12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง) ในการทำแห้งว่านหางจระเข้ผง ด้วยวิธีโฟม-แมท พบว่า การเติมสาร HPMC ความเข้มข้น 1 % ส่งผลมีค่าการเกิดโฟมสูงที่สุดเท่ากับ 493.83 % โดยความร้อนสามารถกระจายตัวผ่านโฟมว่านหางจระเข้ที่อยู่ในถาดอบได้ง่าย จึงส่งผลให้ได้ค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์ต่ำที่สุดเท่ากับ 4.91 % และค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 0.74 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง (trolox equivalent) สำหรับการศึกษาระยะเวลาในการอบแห้ง พบว่า การอบแห้งในช่วง 12 ถึง 24 ชั่วโมง ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณผลผลิตที่ได้ อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในช่วง 16.36 - 16.90 % อย่างไรก็ตามการทำแห้ง 16 ชั่วโมงจัดเป็นเวลาอบแห้งที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากทำให้ได้ค่าความชื้นเท่ากับ 6.69 % ซึ่งภายใต้เกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของสมุนไพรรวมอบแห้ง นอกจากนี้การทำแห้งที่ 12 และ 16 ชั่วโมงไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความสามารถในการละลายน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 84.47 และ 80.46 % ตามลำดับ

คำสำคัญ: ว่านหางจระเข้ ไฮดรอกซีโพรพิล เมทิลเซลลูโลส การทำแห้งแบบโฟมแมท

คำนำ

ว่านหางจระเข้ (aloe vera) เป็นพืชที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย ทั้งในด้านสมุนไพรรักษาโรค ผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องดื่ม รวมถึงเครื่องสำอาง (Puechkaset, 2014) ประเทศไทยสามารถเพาะปลูกว่านหางจระเข้ได้ประมาณ 1 หมื่นไร่ต่อปี รวมผลผลิตเท่ากับ 9 หมื่นถึง 1.4 แสนตัน ซึ่งนอกจากมีการส่งออกเนื้อว่านหางจระเข้แบบลูกเต๋า เนื้อเจลสด และผลิตภัณฑ์เจลว่านหางจระเข้แล้ว ยังมีการนำเข้าสู่สารสกัดยาดำ ซึ่งเป็นผลผลิตจากการเคี้ยวของว่านหางจระเข้อีกด้วย ซึ่งยาดำสามารถใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ยาอื่น ๆ หลายชนิด (Upanan, 2019)

คุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในว่านหางจระเข้โดยรวมมีทั้งหมด 75 ชนิด ได้แก่ กรดอะมิโนที่จำเป็น วิตามิน เอ็นไซม์ แอนทราควิโนน (anthraquinone) เกลลิแวน์ ลิกนิน (lignin) น้ำตาล กรดซาลิซิลิก (salicylic acid) กรดโฟลิก (folic acid) สเตอรอล (sterols) และกรดซาโปนิน (saponin) โดยสารเหล่านี้มีคุณสมบัติในทางบำบัดและรักษา ทั้งนี้ได้แก่ รักษาแผล ป้องกันการติดเชื้อ ปรับระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก ป้องกันการเกิดมะเร็ง รักษาเส้นเลือดขอด และกระเพาะอาหารอักเสบ ป้องกันการติดเชื้อ ลดเบาหวาน รวมถึงสามารถใช้ในผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องสำอางเพื่อชะลอริ้วรอยและเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิว (Amin *et al.*, 2018)

อย่างไรก็ตาม เจลจากว่านหางจระเข้มีน้ำเป็นส่วนประกอบถึง 99.19 % การขนส่งเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ นั้น จึงเป็นการสิ้นเปลืองพลังงานและค่าใช้จ่ายจำนวนมาก ปัจจุบันได้มีการใช้เทคโนโลยีเพื่อแปรรูปว่านหางจระเข้ให้เป็นผงด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) แบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) และแบบถาด (tray dry) โดยมีการเติมสารมอลโตเดกตริน (maltodextrin) เพื่อช่วยในกระบวนการทำแห้งและทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่คงตัวมากยิ่งขึ้น (Angsuphanit, 1993; Hendrawati, 2015; Vamshikrishna and Rahman, 2012)

ในกระบวนการทำแห้งแบบถาดด้วยวิธีโฟมแมท (foam-mat drying) เป็นเทคนิคแบบใหม่ที่นิยมใช้ทำแห้งผักและผลไม้ โดยนิยมใช้กับผลิตภัณฑ์บางชนิดที่มีคุณสมบัติไม่ทนความร้อนสูง และมีเนื้อสัมผัสเหนียวแข็งติดกันได้ง่ายเมื่อโดนความร้อน การใช้เทคนิคนี้จะช่วยลดเวลาและลดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของวัตถุดิบให้เสียหายน้อยลง การทำแห้งแบบโฟมแมทนั้นจำเป็นต้องใช้สารก่อเกิดโฟม ซึ่งได้แก่ โปรตีนอัลบูมิน โปรตีนถั่วเหลือง โซเดียม เลซิธิน คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose, CMC) และเพคติน เป็นต้น ซึ่งปริมาณที่ใช้แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของวัตถุดิบที่จะทำแห้ง สำหรับโฟมที่ได้จากการตีปั่นจะถูกนำมาอบในถาดโดยใช้ตู้อบลมร้อนแล้วจึงนำไปบดละเอียดให้เป็นผง (Iqbal *et al.*, 2018)

นอกจากสารก่อให้เกิดโฝมที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการอบแห้งแล้ว ยังอาจมีการเติมสารมอลโตเดกซ์ตรินเพื่อช่วยลดการจับตัวเป็นก้อนและทำให้เกิดการกระจายตัวของเนื้อสารได้ดียิ่งขึ้น โดย Ekpong *et al.* (2016) ได้ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสารมอลโตเดกซ์ตรินปริมาณ 0, 5, 10 และ 15 % ร่วมกับอุณหภูมิการอบแห้งในช่วง 55, 60 และ 70 °C ในการทำผลิตภัณฑ์มะขามผง พบว่า การเติมสารมอลโตเดกซ์ตรินที่ 15 % และทำแห้งที่อุณหภูมิ 70 °C ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีค่าคะแนนการยอมรับของผู้บริโภคสูงสุด

Ramadhia *et al.* (2012) ได้ศึกษาการทำแห้งแบบโฝมแมทโดยใช้สารมอลโตเดกซ์ตรินที่ปริมาณ 5, 10 และ 15 % เพื่อปรับความเข้มข้นของเจลวุ้นหางจระเข้ และใช้สาร Tween 80 ในปริมาณ 0.1, 0.2 และ 0.3 % ในการช่วยให้เกิดโฝม ทั้งนี้พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารมอลโตเดกซ์ตรินเท่ากับ 15 % และสาร Tween 80 เท่ากับ 0.3 % ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีปริมาณความชื้นเท่ากับ 10.28 % และผลผลิตสุดท้ายเท่ากับ 8.33 % นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอัตราส่วนของเนื้ออินทผลัมต่อน้ำในการทำแห้งแบบโฝมแมท โดยใช้สารไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส (hydroxypropyl methylcellulose, HPMC) ช่วยในการก่อโฝมในกระบวนการตีปั่น พบว่า การเติม HPMC ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ทำให้ได้โฝมของส่วนผสมอินทผลัมที่มีคุณภาพดีที่สุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อผลิตวุ้นหางจระเข้ผงด้วยวิธีทำแห้งแบบโฝมแมท โดยหาปริมาณสารก่อโฝม HPMC และอุณหภูมิการอบแห้งที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีคุณภาพดีที่สุด เพื่อให้สามารถเติมลงในผลิตภัณฑ์แปรรูปอื่น ๆ ได้ โดยเฉพาะเวชภัณฑ์เครื่องสำอางที่นิยมใช้วุ้นหางจระเข้ผสมอย่างแพร่หลาย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมน้ำวุ้นหางจระเข้เข้มข้น

วุ้นหางจระเข้ *Aloe vera* (L.) Burm.f. สายพันธุ์ *barbadensis* จากฟาร์มของเกษตรกร อำเภอนครไทย จังหวัดพิษณุโลก นำมาปอกเปลือกให้ได้วุ้นสีขาวใส

แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่น (Braun, K750, Germany) นำเจลละเอียดที่ได้กรองผ่านผ้าขาวบางจนได้น้ำเจลใสที่มีความชื้นเท่ากับ 99.34 % แล้วตวงเจลใสปริมาตร 30 ลิตรทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหย (evaporator) (50L rotary evaporator, NEC Technology, Hang Dong, Chiang Mai) ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 3 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ความชื้นสุดท้ายเท่ากับ 94 % แล้วจึงนำมาทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2. กระบวนการผลิตน้ำวุ้นหางจระเข้ผง

นำน้ำวุ้นหางจระเข้เข้มข้นปริมาณ 500 มิลลิลิตร เทใส่เครื่องตีผสม (Kitchen Aid, Artisan, St Joseph, Michigan, USA) แล้วใส่สารมอลโตเดกซ์ตริน (DE10, OV Chemical, Chiang Mai) ปริมาณ 10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตีปั่นด้วยความเร็วเบอร์ 8 นาน 1 นาที แล้วหยุดพัก 2 นาที ทำการผสมสารไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส (HPMC) (Northern Chemical, Chiang Mai) กับน้ำอุ่น (น้ำ 30 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 70 °C) ในอัตราส่วน 1, 2, 3 และ 4 % (น้ำหนักสารต่อปริมาตรน้ำวุ้นหางจระเข้เข้มข้น) จนได้สารละลายเจลใสแล้วเทสารละลาย HPMC ที่ได้ลงในส่วนผสมวุ้นหางจระเข้ในเครื่องปั่น ตีปั่นต่อด้วยความเร็วเบอร์ 10 นาน 7 นาที จนกระทั่งได้โฝมเนื้อละเอียด แล้วนำมาวัดปริมาตรเพื่อหาค่าการเกิดโฝม (overrun)

นำโฝมวุ้นหางจระเข้ที่ได้เทลงถาด แล้วนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อน (6 tray - hot air oven, FNB Machinery and Solution, Bangkok) อุณหภูมิ 65 °C นาน 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง นำแผ่นโฝมที่ได้ไปบดละเอียดด้วยเครื่องปั่น (Braun, K750, Germany) กรองด้วยตะแกรงขนาด 100 mesh จนได้ผงละเอียดนำไปบรรจุลงในถุงฟอยล์ แล้วซีลปิดผนึกเพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพด้านอื่น ๆ ต่อไป

3. การวางแผนการทดลอง

3.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารก่อโฝม (สารไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส: HPMC) ปริมาณ 1, 2, 3 และ 4 % (น้ำหนักสารต่อปริมาตรน้ำวุ้นหางจระเข้เข้มข้น) วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้วิธี analysis of variance (ANOVA)

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Tukey method โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการอบแห้ง นาน 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 65 °C วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้วิธี analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Tukey method โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

4. การวิเคราะห์ผล

4.1 วิเคราะห์ค่าทางกายภาพ ได้แก่ ค่าร้อยละผลผลิต (% yield) ค่าความหนาแน่น (bulk density) (Carneiro *et al.*, 2013), ค่าสี L^* , a^* และ b^* (Konica Minolta, CR400, Japan) ค่า water activity (Pre Aqua Lab Water Analyzer, USA) ค่าความหนืด (LVDV-II+, Brookfield, USA) ค่าความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility index: WSI) ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (water absorption index: WAI) และค่าร้อยละของก้อนโฟม (overrun)

- วิเคราะห์ค่า overrun (Raymundo *et al.*, 1998) โดยการวัดปริมาตรเริ่มต้นของส่วนผสม แล้วทำการตีปั่นโฟม หลังจากนั้นวัดปริมาตรสุดท้ายของโฟมที่ได้ นำมาคำนวณดังสมการที่ (1)

Overrun (%) = (ปริมาตรของโฟม - ปริมาตรของส่วนผสม) / (ปริมาตรของส่วนผสม) * 100 (1)

- วิเคราะห์ความสามารถในการละลายน้ำ (WSI) และความสามารถในการอุ้มน้ำ (WAI) (Sriroth and Piyachomkwan, 2003) โดยทำการชั่งตัวอย่างแห้งน้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยง (ที่ทราบน้ำหนักเริ่มต้นแล้ว) เติมน้ำกลั่นลงไป 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่ในเครื่องเขย่าแบบอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 °C เขย่าที่ความเร็วรอบ 174 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงแยกส่วนใสในจานระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ทำการระเหยแห้งบนอ่างน้ำเดือดจนแห้งแล้วจึงนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักเป็นส่วนใสหลังอบแห้งเพื่อใช้คำนวณหา WSI ในสมการที่ 2 ส่วน

ตะกอนที่ได้ติดกันหลอดปั่นเหวี่ยง ให้นำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักเป็นน้ำหนักตะกอนหลังปั่นเหวี่ยงเพื่อใช้คำนวณหา WAI ในสมการที่ 3

Water solubility index (WSI, %) = (น้ำหนักส่วนใสอบแห้ง) / (น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) * 100 (2)

Water absorption index (WAI, g / g dried sample) = (น้ำหนักตะกอนหลังปั่นเหวี่ยง) / (น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) (3)

4.2 วิเคราะห์ค่าทางเคมี ได้แก่ ค่า pH (Consort c830, multi - parameter analyzer, Thailand) ค่าความชื้น (AOAC, 2000) ค่า trolox equivalent

- วิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (trolox equivalent) (modified from Phongthai *et al.*, 2018) การเตรียมสารมาตรฐาน 6 hydroxy - 2,5,7,8 - tetramethylechroman - 2 - carboxylic acid (trolox) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการนำสาร trolox ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ปรับความเข้มข้นเป็น 0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025 และ 0.030 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงปิเปตสารปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแต่ละความเข้มข้น ผสมลงในสาร 2,2 - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl (DPPH reagent) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที หลังจากนั้นนำสารที่เตรียมได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละการยับยั้งตามสมการที่ 4 จากนั้นนำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละการยับยั้งกับความเข้มข้นของ trolox (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ดัง Figure 1

การยับยั้ง (ร้อยละ) = $(1 - (\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน} / \text{ค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่างควบคุม})) * 100$ (4)

ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน = ค่าดูดกลืนแสงสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับ DPPH reagent

ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม = ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลผสมกับ DPPH reagent

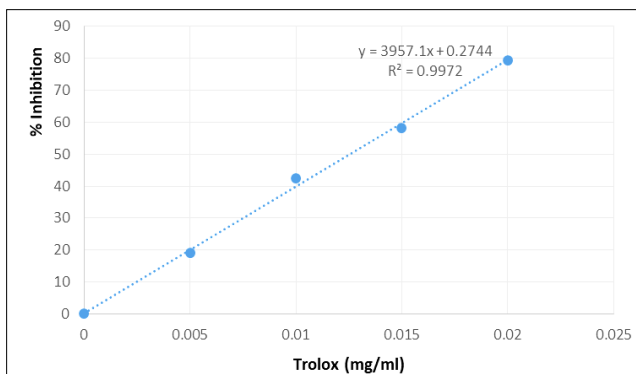


Figure 1. A representative calibration curve of % Inhibition by trolox standard (mg / ml)

การวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยการนำตัวอย่าง
ว่านหางจระเข้ผงมา 1 มิลลิกรัม ผสมกับ DPPH reagent
ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร
บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที แล้วจึงนำสารที่บ่มไว้ไปวัดค่า
การดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสง
ที่ได้นำไปคำนวณร้อยละการยับยั้งจากกราฟมาตรฐาน
และรายงานผลเป็นค่า trolox equivalent (mg/g sample)

4.3 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม
Excel 97 และ Minitab 16

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาปริมาณสารก่อให้เกิดโคม
HPMC ในปริมาณ 1, 2, 3 และ 4 % ที่เติมลงในว่านหาง
จระเข้เข้มข้น พบว่า ปริมาณ overrun ของโคมว่าน
หางจระเข้ที่เติม HPMC ในปริมาณ 1 และ 2 % ให้โคม
ปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 493.83 และ 477.30 %
ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณ HPMC ให้
สูงขึ้นทำให้ได้ปริมาณโคมที่ลดลง เนื่องจากเมื่อละลาย
HPMC ในน้ำได้สารละลายที่มีความหนืด สารละลาย
ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้มีค่าความหนืดมากขึ้นด้วย
อย่างไรก็ตามความหนืดสามารถเพิ่มขึ้นได้สูงถึงค่า
ที่เหมาะสมค่าหนึ่งเท่านั้น หากความหนืดสูงมากเกินไป
ส่งผลต่อการกักเก็บอากาศในขณะที่ตีโคมลดลง
ทำให้ได้ค่า overrun ที่ลดลงด้วย (Bikerman, 1973)
ในขณะที่ปริมาณผลผลิต (% yield) เพิ่มขึ้นเมื่อเติม
HPMC ในปริมาณมากขึ้น ทั้งนี้เกิดจากน้ำหนักของ

HPMC ที่ใส่ลงไปในส่วนผสมเริ่มต้นส่งผลให้น้ำหนัก
สุดท้ายของผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วยนั่นเอง
โดยตัวอย่างที่เติม HPMC 4 % ทำให้ได้ค่าผลผลิตสูง
สุดเท่ากับ 17.41 % (Table 1) อย่างไรก็ตามการเติม HPMC
ในช่วงปริมาณ 1 - 4 % ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง
ค่าความหนาแน่นของผลิตภัณฑ์ว่านหางจระเข้ผง ซึ่งค่า
ที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.39 - 0.41 กรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ
ค่า L^* , a^* และ b^* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี
นัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 75.89 -
78.08, 2.04 - 2.34 และ 19.95 - 21.90 ตามลำดับ

สำหรับค่าความหนืดของผลิตภัณฑ์ว่านหาง
จระเข้ผง เมื่อมีการละลายน้ำเพื่อปรับความชื้นของ
ว่านหางจระเข้ผงจาก 5 % ให้เท่ากับว่านหางจระเข้
เข้มข้นที่ 93 % โดยเติมน้ำในอัตราส่วน 0.5 กรัมต่อ 6
มิลลิลิตร (น้ำหนักว่านหางจระเข้ผงต่อปริมาตรน้ำ) พบว่า
ค่าความหนืดแปรผันตามปริมาณของ HPMC โดยค่า
ความหนืดสูงที่สุดเท่ากับ 353.33 cP ที่ความเข้มข้น
ของ HPMC เท่ากับ 4 % และความหนืดต่ำสุดเท่ากับ
55.03 cP (HPMC เท่ากับ 1 %) ทั้งนี้เนื่องจากสาร HPMC
ช่วยเพิ่มความหนืด เมื่อเติมสารในปริมาณมากขึ้น
ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีความหนืดสูงขึ้นนั่นเอง
(Inkaew *et al.*, 2015) การวัดค่า pH ในสารละลายว่าน
หางจระเข้ผงคั้นรูป พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี
นัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 5.29 - 5.50
และเมื่อวัดค่าความสามารถในการละลายน้ำ (WSI)
พบว่า การเติม HPMC ในปริมาณที่มากขึ้นส่งผลให้
ค่าความสามารถในการละลายน้ำของว่านหางจระเข้

ผงเพิ่มสูงขึ้น โดยค่า WSI เพิ่มขึ้นจาก 77.42 % เป็น 79.36 % ในขณะที่ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (WAI) ลดลงจาก 0.14 g/g dried sample เป็น 0.05 g/g dried sample อย่างไรก็ตามค่าที่วัดได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจมีปัจจัยอื่นๆ นอกเหนือจากการเติมสาร HPMC ที่ส่งผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงของค่า WSI และ WAI ในแต่ละตัวอย่าง (Table 2)

ปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ว่านหางจระเข้ที่มีการเติมสาร HPMC ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ทำให้ค่าความชื้นเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากการเติม HPMC ในปริมาณต่ำที่ 1 % ส่งผลให้ได้ค่า overrun สูงที่สุด ดังนั้น ในระหว่างกระบวนการอบแห้ง ความร้อนส่งผ่านได้ดีในก้อนโฟมที่กระจายตัวได้มากกว่า (overrun สูง) ทำให้ปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ว่านหางจระเข้ลดลงต่ำที่สุดเท่ากับ 4.91 % เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่เติม HPMC สูงและมีการกระจายตัวของโฟมที่น้อยกว่า (overrun ต่ำ) ความร้อนจึงผ่านเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ได้ไม่เต็มที่เท่าที่ควร ทำให้วัดความชื้นได้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 6.31% สำหรับค่า Aw ที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.28-0.30 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) เมื่อทำการวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในรูปของ trolox equivalent พบว่าการเติมสาร HPMC ในปริมาณต่ำที่ 1 % ทำให้ค่า trolox สูงที่สุดเท่ากับ 0.74 มิลลิกรัมต่อกรัม (ปริมาณ trolox ต่อน้ำหนักของว่านหางจระเข้ผง) ซึ่งทั้งนี้เกิดจากการเติม HPMC ในปริมาณน้อย ทำให้มีสารเจือปนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายอยู่น้อย การวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับน้ำหนักตัวอย่าง จึงทำให้ได้ค่าสูงขึ้นนั่นเอง และค่านี้จะลดลงเมื่อเติมสาร HPMC ในปริมาณที่สูงขึ้น ทำให้มีสารเจือปนมากขึ้นและปริมาณว่านหางจระเข้ลดลงตามน้ำหนักซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารสำคัญที่อยู่ในเนื้อว่านหางจระเข้และเมื่อผ่านกระบวนการอบแห้งแบบโฟมเมทสรดังกล่าวยังคงอยู่ในผลิตภัณฑ์ในรูปแบบผงอีกด้วยทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระที่พบโดยทั่วไปได้แก่ วิตามินซี วิตามินเอ เบต้าแคโรทีน วิตามินอี โคลโคปีน ลูทีน ซิลิเนียม และสังกะสี การตรวจวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในรูปของ trolox equivalent ซึ่งใช้วิตามินอีเป็นสารมาตรฐาน จึงสามารถบ่งบอกกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ว่านหางจระเข้ผงได้

Table 1. Overrun, yield, color (L^* , a^* , b^*), viscosity and bulk density of aloe vera powder added by HPMC (1 - 4 %)

HPMC (%)	Overrun (%)	Yield (%)	L^*	a^*	b^*	Viscosity (cP)	Bulk density (g / ml)
1	493.83 ± 8.90 ^a	14.99 ± 0.74 ^b	75.89 ± 2.18	2.34 ± 0.17	21.90 ± 0.34	55.03 ± 2.82 ^d	0.41 ± 0.05
2	477.30 ± 24.90 ^a	16.43 ± 0.70 ^{ab}	76.21 ± 3.53	2.04 ± 0.58	19.95 ± 0.94	130.97 ± 20.45 ^c	0.39 ± 0.04
3	439.50 ± 51.40 ^{ab}	16.52 ± 0.98 ^{ab}	78.08 ± 5.01	2.04 ± 0.57	19.99 ± 2.23	232.43 ± 28.05 ^b	0.40 ± 0.04
4	385.40 ± 11.08 ^b	17.41 ± 0.64 ^a	76.59 ± 4.41	2.15 ± 0.47	21.17 ± 1.61	353.33 ± 97.96 ^a	0.40 ± 0.05

Mean within column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$

Table 2. WSI, WAI, moisture content, Aw, trolox and pH of aloe vera powder added by HPMC (1 – 4 %)

HPMC (%)	WSI (%)	WAI (g / g)	Moisture content (%)	Aw	Trolox (mg / g)	pH
1	77.42 ± 1.68	0.14 ± 0.03	4.91 ± 0.39 ^b	0.30 ± 0.03	0.74 ± 0.25 ^a	5.50 ± 0.30
2	77.19 ± 3.69	0.12 ± 0.01	5.34 ± 0.44 ^{ab}	0.28 ± 0.01	0.50 ± 0.19 ^{ab}	5.28 ± 0.30
3	79.24 ± 8.61	0.07 ± 0.0	5.90 ± 0.56 ^{ab}	0.28 ± 0.05	0.35 ± 0.12 ^{ab}	5.29 ± 0.29
4	79.36 ± 10.62	0.05 ± 0.01	6.31 ± 0.48 ^a	0.30 ± 0.03	0.27 ± 0.08 ^b	5.29 ± 0.21

Mean within column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$

สำหรับการศึกษาระยะเวลาในการอบแห้งนาน 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมงในการทดลองที่ 2 พบว่า การอบแห้งผลิตภัณฑ์วุ้นนางจะเข้ที่อุณหภูมิ 65 °C พบว่า ปริมาณผลผลิตที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่าง มีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 16.36 - 16.90 % นอกจากนี้ระยะเวลาการอบแห้งที่ยาวนานขึ้น ไม่ส่งผลกระทบต่อค่าการเปลี่ยนแปลงค่าสีในผลิตภัณฑ์ สุดท้าย โดยค่าสี L^* , a^* และ b^* มีค่าดังต่อไปนี้ 72.89 - 76.29, 1.42 - 2.12 และ 17.78 - 19.04 ตามลำดับ ทั้งนี้ ระยะเวลาการอบแห้งก็ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า ความหนาแน่นของผลิตภัณฑ์สุดท้ายอย่างมีนัยสำคัญ เช่นกัน ซึ่งค่าที่ได้เท่ากับ 0.22 - 0.31 กรัมต่อมิลลิลิตร รวมถึงการอบแห้งในช่วง 12 - 24 ชั่วโมงไม่ส่งผลต่อ การเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดที่วัดได้จากการคั้นรูป วุ้นนางจะเข้ผงดด้วยน้ำอีกด้วย ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในช่วง 100.80 - 107.47 cP (Table 3)

เมื่อทำการวัดค่าความสามารถในการละลายน้ำ (WSI) พบว่า ระยะเวลาในการอบแห้งนาน 12 ชั่วโมงทำให้ได้ค่า WSI สูงที่สุดเท่ากับ 84.47 % ในขณะที่การ อบแห้งนาน 24 ชั่วโมงส่งผลให้ค่า WSI ต่ำที่สุดเท่ากับ 75.74 % ทั้งนี้ เนื่องจากการอบแห้งที่นานขึ้นทำให้

ความชื้นลดลง ปริมาณน้ำที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์สุด ท้ายจึงลดลงด้วย ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ที่เปียกชื้นมากกว่า จึงมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีกว่าผลิตภัณฑ์ ชนิดเดียวกันที่แห้งกว่า เนื่องจากคุณสมบัติของน้ำในตัว ทำละลายเป็นโมเลกุลที่มีขั้ว จึงจับกับพันธะไฮโดรเจน ของน้ำที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นสูงได้นั่นเอง (Wikipedia, 2020) โดยทั้งนี้พบการทำแห้งในระยะเวลา 12 ชั่วโมงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีความชื้นสูงที่ สุดเท่ากับ 7.77 % ในขณะที่การทำแห้งนาน 24 ชั่วโมง ทำให้ได้ความชื้นสุดท้ายต่ำที่สุดเท่ากับ 4.71 % ดังนั้น ค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์ลดลงตามระยะเวลาใน การอบแห้ง อย่างไรก็ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ของสมุนไพรรวมอบแห้ง (TISI, 2005) ได้กำหนดให้ สมุนไพรอบแห้งมีความชื้นได้ไม่เกิน 7% สำหรับการ อบแห้งเพียง 12 ชั่วโมงจึงเป็นระยะเวลาที่ไม่เหมาะสม เพราะทำให้ได้ค่าความชื้นที่สูงเกินเกณฑ์มาตรฐาน ในขณะที่ระยะเวลาการอบแห้งนาน 16 ชั่วโมงได้ ความชื้นเท่ากับ 6.69 % จึงเป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดใน กระบวนการอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 °C ส่วนการอบแห้งที่ นานกว่านั้นทำให้เป็นการสิ้นเปลืองพลังงาน และส่งผล ให้ค่าความสามารถในการละลายลดลง (Table 4)

Table 3. Yield, color (L^* , a^* , b^*), viscosity and bulk density of aloe vera powder dried for 12 - 24 hrs

Time (hrs)	Yield (%)	L^*	a^*	b^*	Viscosity (cP)	Bulk density (g / ml)
12	16.90 ± 0.53	75.69 ± 1.77	1.42 ± 0.13	17.98 ± 0.73	100.80 ± 12.53	0.31 ± 0.03 ^a
16	16.88 ± 0.07	73.71 ± 2.45	2.05 ± 0.64	19.04 ± 1.57	106.37 ± 7.15	0.22 ± 0.05 ^b
20	16.36 ± 0.47	76.29 ± 1.44	1.52 ± 0.32	17.78 ± 0.52	104.57 ± 9.73	0.27 ± 0.01 ^{ab}
24	16.47 ± 0.15	72.89 ± 2.00	2.12 ± 0.32	18.59 ± 1.67	107.47 ± 14.13	0.28 ± 0.02 ^{ab}

Mean within column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$

Table 4. WSI, WAI, moisture content, Aw, trolox and pH of aloe vera powder dried for 12 - 24 hrs

Time (hrs)	WSI (%)	WAI (g / g)	Moisture content (%)	Aw	Trolox (mg / g)	pH
12	84.47 ± 1.15 ^a	0.12 ± 0.03	7.77 ± 0.50 ^a	0.41 ± 0.01 ^a	0.82 ± 0.11	4.87 ± 0.02 ^a
16	80.46 ± 3.13 ^{ab}	0.14 ± 0.01	6.69 ± 0.31 ^b	0.39 ± 0.01 ^a	0.67 ± 0.08	4.85 ± 0.02 ^{ab}
20	77.90 ± 0.64 ^{bc}	0.15 ± 0.03	5.56 ± 0.39 ^c	0.35 ± 0.01 ^b	0.96 ± 0.06	4.81 ± 0.00 ^b
24	75.74 ± 1.07 ^c	0.11 ± 0.02	4.71 ± 0.06 ^c	0.34 ± 0.01 ^b	0.89 ± 0.20	4.80 ± 0.03 ^b

Mean within column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$

เมื่อวัดความสามารถในการอุ้มน้ำ (WAI) พบว่า การอบแห้งในช่วงเวลา 12-24 ชั่วโมงไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า WAI อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งค่าที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.11 - 0.15 g / g dried sample นอกจากนี้ระยะเวลาในการอบแห้งในช่วงดังกล่าวยังไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง ค่า Aw ซึ่งวัดได้อยู่ในช่วง 0.34 - 0.41 และค่า pH วัดได้อยู่ในช่วง 4.80 - 4.87 สำหรับค่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระก็ไม่มี การเปลี่ยนแปลง อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน โดยค่าที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.67 - 0.96 มิลลิกรัมต่อกรัม นั้นแสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาในการอบแห้งที่นานขึ้นถึง 24 ชั่วโมง ไม่สามารถทำลายสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในวุ้นหางจรเข้ได้ และสารดังกล่าวยังคงมีอยู่ในผลิตภัณฑ์ในรูปแบบผง ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ด้านยา และเครื่องสำอางได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ยังคงไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาการอบแห้ง นานขึ้น และค่า Aw ที่วัดได้อยู่ในช่วงที่จุลินทรีย์มีโอกา สเจริญได้น้อย (Jay, 1996) ส่งผลให้สามารถเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์ได้นานยิ่งขึ้นอีกด้วย

สรุป

จากการศึกษาปริมาณสารก่อให้เกิดโฟม HPMC ที่ 1, 2, 3 และ 4 % พบว่า การเติม HPMC ในปริมาณสูงขึ้นส่งผลให้เกิดโฟม (overrun) และ ปริมาณ trolox equivalent มีค่าลดลง ในขณะที่ ปริมาณผลผลิต ค่าความหนืด และปริมาณความชื้น มีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณ HPMC ที่มากขึ้น สำหรับค่า สี (L^* , a^* และ b^*) ค่าความหนาแน่น ความสามารถในการละลายน้ำ (WSI) และการอุ้มน้ำ (WAI) ค่า Aw และ ค่า pH ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) เมื่อศึกษาระยะเวลาในการอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง พบว่า การเพิ่ม ระยะเวลาในการอบแห้งให้นานขึ้นส่งผลให้ค่า ความสามารถในการละลายน้ำ (WSI) ปริมาณความชื้น ค่าความหนาแน่น ค่า Aw และค่า pH มีค่าลดลงอย่าง มีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่ปริมาณผลผลิต ค่าสี ค่าความหนืด ความสามารถในการอุ้มน้ำ (WAI) และ

ปริมาณ Trolox equivalent ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นการแปรรูปวุ้นหางจรเข้ให้เป็นผงด้วยวิธีโฟม แมท ควรใช้สาร HPMC ในปริมาณ 1 % และอบแห้งที่ 65 °C นาน 16 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณผลผลิต 16.88% ค่าสี L^* , a^* และ b^* เท่ากับ 73.71, 2.05 และ 19.04 ตามลำดับ ค่าความหนืดหลังจากการคืนรูป เท่ากับ 106.37 cP ค่าความสามารถในการละลายน้ำ และการอุ้มน้ำ เท่ากับ 80.46 และ 0.16 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ค่าความหนาแน่น เท่ากับ 0.22 กรัมต่อ มิลลิลิตร ค่าความชื้น เท่ากับ 6.69% ได้ตามเกณฑ์ มาตรฐาน มผช สมุนไพรรวมอบแห้ง ค่า Aw เท่ากับ 0.39 ค่า trolox equivalent เท่ากับ 0.67 มิลลิกรัมต่อกรัม และค่า pH เท่ากับ 4.85

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนวิจัยภายใต้ โครงการพัฒนา ซืดความสามารถทางเทคโนโลยีและวิจัยของภาคเอกชน ในพื้นที่ โดยการสนับสนุนตามกลไกอุทยานวิทยาศาสตร์ ภาคเหนือ ปีงบประมาณ 2562 และขอขอบคุณ บริษัท ภูษาปัญญาออกานิค จำกัด ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุน ด้านวัตถุดิบ อุปกรณ์ และให้ความร่วมมือในการวิจัย เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- Amin, K., S. Ozgen and Z. Selamoglu. 2018. *Aloe vera*: a miracle plant with its wide-ranging applications. Pharmacy and Pharmacology International Journal 6(1): 00144, doi: 10.15406/ppij.2018.06.00144.
- Angsuphanit, K. 1993. Food Processing. Kasetsart University Press, Bangkok. 138 p. (in Thai)
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.
- Bikerman, J.J. 1973. Foams. Springer-Verlag, New York. 337 p.

- Carneiro, H.C.F., R.V. Tonon, C.R.F. Grosso and M.D. Hubinger. 2013. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*. 115(4): 443-451.
- Ekpong, A., W. Phomkong and E. Onsaard. 2016. The effects of maltodextrin as a drying aid and drying temperature on production of tamarind powder and consumer acceptance of the powder. *International Food Research Journal* 23(1): 300-308.
- Hendrawati, T.Y. 2015. Aloe vera powder properties produced from *Aloe chinensis* Baker, Pontianak, Indonesia. *Journal of Engineering Science and Technology Special Issue 1*: 47-59.
- Inkaew, C., T. Keokamnerd, C. Rardniyom and K. Arkanit. 2015. Effects of date-to-water ratio and foaming agents on foam quality prior of foam mat drying. pp. 231-240. *In: Proceedings of Academic Conference. Maejo University, Chiang Mai. (in Thai)*
- Iqbal, J.M., A. Abbas, H. Rafique, F.M. Nawaz and A. Rasool. 2018. A review paper on foam-mat drying of fruits and vegetables to develop powders. *MOJ Food Processing and Technology* 6(6): 465-467.
- Jay, J.M. 1996. *Modern Food Microbiology*. 5th ed. Chapman & Hall, New York. 661 p.
- Phongthai, S., S. D'Amico, R. Schoenlechner, W. Homthawornchoo and S. Rawdkuen. 2018. Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food chemistry* 240: 156-164.
- Puechkaset. 2014. Properties of aloe vera and implantation (Online). Available: [http://puechkaset.com/aleo vera](http://puechkaset.com/aleo%20vera) (March 2, 2020).
- Ramadhia, M., S. Kumalaningsih and I. Santoso. 2012. The making of aloe vera powder (*Aloe vera* L.) with foam-mat drying method. *Jurnal Teknologi Pertanian* 13(2): 125-137.
- Raymundo, A., J. Empis and I. Sousa. 1998. Method to evaluate foaming performance. *Journal of Food Engineering* 36(4): 445-452.
- Sriroth, K., and K. Piyachomkwan. 2003. *Technology of Starch*. 3rded. Kasetsart University Press, Bangkok. 303 p. (in Thai)
- TISI. 2005. *Dried mixed herbs*. Thai Community Product Standard, TCPS 996/2005. Thai Industrial Standard Institute, Bangkok. 5 p.
- Upanan, S. 2019. Department of Agricultural Extension, District/Provincial Agricultural Extension Office, Growers. Information on February 28th, 2019. 65-66. (in Thai)
- Vamshikrishna and H. Rahman. 2012. Evaluating aloe vera powder as bioavailability enhancer. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability* 4(3): 191.
- Wikipedia. 2020. Water. (Online). Available: <http://th.m.wikipedia.org/wiki/water> (February 15, 2020).

คำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ (ต่อ)

2. การเขียนเอกสารอ้างอิง มีรูปแบบการเขียนมีดังนี้

วารสาร (Journals)

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

Muthita, W. and N. Kuanprasert. 2004. Cytogenetics and flower color inheritance of fuchsias. *Journal of Agriculture* 20(1): 10-18. (in Thai)

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.

ในกรณีที่เป็นการวารสารออนไลน์ไม่สามารถระบุเลขหน้าเริ่มต้นและเลขหน้าที่สิ้นสุดได้ ให้ระบุ doi แทน

Bukhari, T., W. Takken and C.J.M. Koenraadt. 2011. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasites & Vectors* 4: 23, doi: 10.1186/1756-3305-4-23.

หนังสือ และตำรา (Books & Textbooks)

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

Ek-amnuay, P. 2016. Diseases and Pests of Economic Importance. 5th ed. Amarin Printing and Publishing PCL, Bangkok. 704 p. (in Thai)

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

เรื่องย่อในตำราหรือหนังสือที่มีผู้เขียนแยกเรื่องเขียน และมีบรรณาธิการ

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

Krairiksh, S. and W. Namruangsi. 1997. Integrated pest control of mango. pp. 137-144. In: K. Jumroenma (ed.). Integrated Pest Control. The Agricultural Cooperative Federation of Thailand, Ltd., Bangkok. (in Thai)

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.

รายงานการประชุม สัมมนา (Reports and Proceedings)

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่องย่อ. หน้า เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าที่สิ้นสุด. ใน: รายงานการประชุม สัมมนา. สถานที่จัดประชุม.

Tantarawongsa, P. and D. Ketrot. 2017. Diuron residue in soils under pineapple cultivation. pp. 17-24. In: Proceedings of 55th Kasetsart University Annual Conference: Plants, Animals, Veterinary Medicine, Fisheries, Agricultural Extension and Home Economics, Bangkok. (in Thai)

Feigenbaum, S., A. Bar-Tal and D.L. Sparks. 1990. Dynamics of soil potassium in multicationic systems. pp. 145-161. In: Proceedings of the 22nd Colloquium of the International Potash Institute, Bern.

วิทยานิพนธ์ (Thesis)

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

Maneepong, A. 2004. Effects of ozone treatments on postharvest quality and pesticide residue of Mandarin cv. Sai Nam Pung. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 100 p. (in Thai)

Liquido, N.J. 1982. Population ecology of *Cyrtorhinus lividipennis* Reuter (Heteroptera: Miridae). Ph.D. Dissertation. University of Hawaii, Honolulu. 175 p.

เอกสารวิชาการอื่น ๆ

ชื่อผู้เขียน หรือหน่วยงาน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่องหรือชื่อหนังสือ. ประเภทของเอกสาร.

สถาบันหรือหน่วยงานที่จัดพิมพ์, เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

Shutsirung, A., C. Santasup and K. Kunasakdakul. 2010. Screening of bio-organic inputs for high quality tea production. Final Report. The Thailand Research Fund, Bangkok. 109 p. (in Thai)

Siriphontangmun, S., U. Nounart, S. Rourmchaiapikun and S. Srijuntra. 2016. Insect Pests of Vegetable, Mushroom and Cut Flower. Technical Document. Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok. 74 p. (in Thai)

สื่ออิเล็กทรอนิกส์

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: ที่อยู่ของไฟล์หรือเว็บไซต์ (URL) (เดือน วันที่, ปีที่ สืบค้นข้อมูล).

(ในกรณีที่ไม่มีข้อมูลปีที่ตีพิมพ์ ให้ระบุเป็นปีที่เข้าไปสืบค้นข้อมูล)

Department of Agricultural Extension. 2005. Hydroponics. (Online). Available: <http://www.doae.go.th/proster/nondin/htm> (April 21, 2005). (in Thai)

Marja, L.L. 2000. How Mycostop[®] acts in the control of fungal plant diseases. (Online). Available: http://www.shkagro.com/otros/efecto_fungicida.pdf (April 1, 2016).

การส่งต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์

ให้ส่งบทความทาง online เท่านั้น ได้ที่ <http://web.agri.cmu.ac.th/agjournal/submission/>

การพิจารณาบทความ

1) ต้นฉบับที่ไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับของวารสารเกษตร จะไม่ได้รับการพิจารณา

2) ทุกบทความที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารเกษตร ต้องผ่านการประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิ ไม่น้อยกว่า 2 ท่าน

3) กองบรรณาธิการขอสงวนสิทธิ์ในการตรวจและแก้ไขบทความทุกเรื่องที่เสนอเพื่อการตีพิมพ์ในวารสารเกษตร (The Editorial Board claims a right to review and correct all articles submitted for publishing in Journal of Agriculture)

สำนักงานและการติดต่อสอบถาม (Office and Inquiries)

กองบรรณาธิการวารสารเกษตร

งานบริหารงานวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 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, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Tel: 0 5394 4089-92 ext. 12 Fax: 0 5394 4089-92 ext. 12

Email: agjournal22@gmail.com

(ดูตัวอย่างต้นฉบับที่เป็นทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษที่ <http://journal.agri.cmu.ac.th/Document/49030001.pdf>)

JOURNAL OF AGRICULTURE

A Technical Journal of Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

Volume 37, Issue 1 January - April 2021

Fruit Quality and Leaf Nutrient Content of Pummelo cv.Thong Dee and Chandler Bearing Off - season and In - season	
Sawika Konsaeng and Pennapa Jaksomsak.....	1
Chromosome Doubling of <i>Habenaria erichmichellii</i> Christenson Using Colchicine <i>In Vitro</i>	
Nipon Kitidee, Weenun Bundithya and Nuttha Potapohn.....	15
Life Cycle and Crossabilities of <i>Eulophia flava</i> (Lindl.) Hook.f.	
Ekarat Vasupen, Chantalak Tiayon and Nuttha Potapohn.....	27
Characteristics of Biochar Derived from Cashew Nut Shell and Potential for Acid Soil Amelioration	
Podjanee Sangmanee.....	39
Effects of Water Management and Zinc Foliar Fertilizer on Grain Yield and Nutrient Accumulation of Five Glutinous Rice Varieties	
Jintana Songsriin, Suchada Jumrus, Supapohn Yamuangmorn, Jeeraporn Veeradittakit, Sithisavet Lordkaew and Chanakan Thebault Prom-u-thai.....	51
Species and Population Dynamics of Fruit Fly Genus <i>Bactrocera</i> infested on Some Chili Fruit Cultivars in Phitsanulok Province	
On-anong Phungkhaiv, Weerathep Pongprasert, Jiraporn Kulsarin and Yaowaluk Chanbang.....	65
Development of High Accuracy Multiplex Real - time PCR Technique for Determining Sperm Sex Ratio in Dairy Bull Semen	
Trisadee Khamlor, Korawan Sringam, Supamit Mekchay, Watcharapong Naraballobh and Nipa Chokesajjawatee.....	75
Effects of Aging Periods on Chemical Composition and Carnosine Content in Beef	
Tiprawee Rassamepong, Sirima Thongruay, Thongsuk Jetana and Autchara Kayan.....	89
Effects of T - 2 Toxin on Cytotoxicity and Apoptosis of Embryonic Fibroblast Cells Obtained from Native Chicken	
Chompunut Lumsangkul, Marninphan Thongkham, Korawan Sringarm, Wanaporn Tapingkae and Montri Punyatong	99
Effects of Sucrose Sources on Fermentation Kinetics of Sweet Orange Wine	
Malaiporn Wongkaew, Kattareeya Jaidee, Nattapon Intha, Nantiya Boonsook and Pasin Norkumai.....	109
Effects of Hydroxypropyl Methylcellulose Content and Drying Time on Qualities of <i>Aloe vera</i> Powder by Foam - mat Drying	
Supavej Maniyom, Warangkana Temeeya, Noppol Leksawasdi and Patcharee Pattanagul.....	121

