



วารสาร วิชาการเกษตร THAI AGRICULTURAL RESEARCH JOURNAL

ปีที่ 42 ฉบับที่ 2

พฤษภาคม - สิงหาคม 2567

ISSN : 3027-7264 (Print) ISSN : 3027-7272 (Online)

สารบัญ

บทบรรณาธิการ.....	115
นิชัย ไทพานิชย์ ผลงานวิจัย	
• ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสับปะรด โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR.....	116
สุภาวดี จ้อเหรียญ จีราพร แก่นทรัพย์ วิภาวี ชื่นโรจน์ มลลิกา นวลแก้ว	
• การเปรียบเทียบสายพันธุ์/พันธุ์มันสำปะหลังบริโภค และอายุเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม สำหรับการแปรรูปเป็นเฟรนช์ฟรายส์.....	131
กุสุมา รอดแผ้วพาล ชฎาพร อินเปลี่ยน สุวลักษณ์ ศันสนีย์ ธนาวดี คำชู	
• ลักษณะอาการและการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ <i>Columnea latent viroid</i> และ <i>Pepper chat fruit viroid</i> ในเมล็ดอ่อน.....	145
นพรัตน์ เลิศวิลาศานนท์ ชมากร สิงห์พันธุ์ คณินนิตย์ เจริญวรการ	
• การพัฒนาเทคนิคการทำนายค่าปริมาณไนโตรเจนในใบว่านหางจระเข้โดยเทคนิค สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้.....	156
สุวิทย์ บุตรเสน อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล อาทิตย์ พวงสมบัติ แก้วกานต์ พวงสมบัติ	
• สารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของถั่วเขียวงอกและทานตะวันงอก.....	166
บังอร ประจันบาล สายใจ ปอสูงเนิน สมคิด ใจตรง	
• การจำแนกเครื่องหมายเอสเอสอาร์ที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทาน โรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวาน.....	180
ธีรภูมิ วงศ์วรรณ์ ฉลอง เกิดศรี เขวณารถ พฤทธิเทพ	
• การกำจัดเชื้อไวรัสโรคที่ติดมากับเมล็ดพริก.....	192
ลักขิกา ศรีเกษม ชมากร สิงห์พันธุ์ คณินนิตย์ เจริญวรการ	
• ชนิดของไรศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติในกัญชา.....	203
พลอยชมพู กรวิภาสเรือง วัฒนวรรณ โชติวงศ์ อทิตยา แก้วประดิษฐ์ ณพชรกร ธัญชัย วีระชัย สมศรี	
• Development of Tetra-primer ARMS-PCR for Selection and Discrimination of CMD-Resistant Cassava Varieties Used in Thailand.....	217
Jeeraporn Kansup Suwaluk Sansanee Adcharapun Chaicharoen	

วารสารวิชาการเกษตร

เจ้าของ : กรมวิชาการเกษตร
สำนักงาน : กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
วัตถุประสงค์ : เพื่อเป็นสื่อกลางในการเผยแพร่ความรู้ผลงานวิจัย และนวัตกรรมวิชาการเกษตรด้านพืช

ที่ปรึกษา

อธิบดีกรมวิชาการเกษตร รองอธิบดีกรมวิชาการเกษตร ที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตร
ผู้เชี่ยวชาญกรมวิชาการเกษตร เลขาธิการกรม ผู้อำนวยการสถาบันวิจัย ผู้อำนวยการกอง
ผู้อำนวยการสำนัก ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 – 8

บรรณาธิการ

ดร.อมรา ชินภูติ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

วลัยพร ศรีศิริประภา ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมวิชาการเกษตร
อำนาจ อรรถลิ่งรอง สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร
ดร.กาญจนา พฤษพันธ์ สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

กองบรรณาธิการ

วรรณรัตน์ ชุตินุตร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
ดร.ศุภกาญจน์ ส่วนมณี	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
ดร.ปิยานุช ศรีชัย	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
ดร.เนตรา สมบูรณ์แก้ว	กลุ่มงานวิจัยพืชสวนหลังการเก็บเกี่ยว กวป. กรมวิชาการเกษตร
ดร.บุญญวดี จีระวุฒิ	กลุ่มงานวิจัยโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว กวป. วิชาการเกษตร
ศุภมาศ กลิ่นขจร	กลุ่มงานวิจัยการแปรรูปผลิตภัณฑ์เกษตร กวป. กรมวิชาการเกษตร
วิชณีย์ ออมทรัพย์สิน	ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร
ดร.ชนินทร์ ดวงสะอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
ดร.พัชรวิวรรณ จงจิตเมตต์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
สุภามิต เสริมพงศ์	ข้าราชการเกษียณอายุ
ดร.พรพิมล อธิปัญญาคม	ข้าราชการเกษียณอายุ
ดร.สุภรดา สุนทราภิรมย์ ณ พัทลุง	ข้าราชการเกษียณอายุ
สุรภี กิตติยะอังกูร	สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (สวก)
ดร.ลัดชัย ตันตยาภรณ์	สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช)
ดร.ทศวรรษ อนุโรจน์	คณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต
รศ.ดร.วิชัย ไชยมิตรตัน	คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
รศ.ดร.เพ็ญขวัญ ชุมปรีดา	คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
รศ.ดร.อรพิน เกิดชูชื่น	คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
รศ.ดร.คำรณวิทย์ ทิพย์มณี	คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผศ.ดร.ปิยาภรณ์ เชื้อมชัยตระกูล	สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ผศ.ดร.จิราพร เพกกะ	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผศ.ดร.บุญสม บุษบรณ	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ดร.วันพร เข้มมุกด์	สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาข้าว กรมการข้าว
ดร.เกรียงศักดิ์ เลิศประภามงคล	สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

ผู้จัดการ

ผู้อำนวยการกลุ่มระบบวิจัย กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ช่วยผู้จัดการ

ดนยา คล้ายมาลา กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร



วารสาร วิชาการเกษตร

THAI AGRICULTURAL RESEARCH JOURNAL ISSN : 3027-7264

ปีที่ 42 ฉบับที่ 2

พฤษภาคม - สิงหาคม 2567



วารสารวิชาการเกษตร ตีพิมพ์เผยแพร่ความรู้ผลงานวิจัย และนวัตกรรมวิชาการเกษตรด้านพืช มีกำหนดออกปีละ 3 ฉบับ ฉบับที่ 1 ตั้งแต่เดือนมกราคม-เมษายน ฉบับที่ 2 เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม ฉบับที่ 3 เดือนกันยายน-ธันวาคม ของทุกปี โดยผลงานวิจัยทุกเรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการเกษตร ได้ผ่านการพิจารณาแบบ double blind system จากผู้ทรงคุณวุฒิทั้งภายในและภายนอกหน่วยงานอย่างน้อย 2 ท่าน วารสารมีระบบการจัดการวารสารแบบออนไลน์ โดยไม่มีค่าธรรมเนียมการตีพิมพ์ และทำการจัดพิมพ์เผยแพร่แก่ห้องสมุดของหน่วยงานราชการ รวมทั้งองค์กรต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง

บทบรรณาธิการ

หลายท่านคงสงสัยว่าผลงานวิจัยทางด้านการเกษตรของหน่วยงานไปถึงมือเกษตรกรได้อย่างไร ช่องทางหนึ่งที่สามารถทำได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ คือ ให้เกษตรกรเข้ามามีส่วนร่วมในการวิจัยนั้น โดยกระบวนการวิจัยที่เรียกว่า งานวิจัยระบบการทำฟาร์ม (farming systems research) ซึ่งมีนักวิชาการหลายท่านได้ให้ความเห็นไว้ว่าเป็นงานวิจัยที่มีปรัชญาและวิธีดำเนินการเฉพาะของตนเอง มีเป้าหมายเพื่อหาเทคโนโลยีการผลิตให้เหมาะสมกับสภาพพื้นที่และตรงกับความต้องการของเกษตรกร ทำงานวิจัยแบบมีส่วนร่วมของนักวิจัยเฉพาะทางจากหลายสาขาวิชา นักวิจัยระบบการทำฟาร์ม นักส่งเสริมการเกษตร และเกษตรกร ใช้กระบวนการวิจัยระบบการทำฟาร์มเป็นแกนกลางในการขับเคลื่อน จากผลงานวิจัยเฉพาะทางของหน่วยงานวิจัย/ศูนย์วิจัยฯ นำไปปรับใช้เพื่อแก้ปัญหาให้ตรงตามความต้องการของพื้นที่ เกษตรกรเป็นผู้ปฏิบัติ นักวิจัยเป็นผู้ให้คำแนะนำ เมื่อได้ผลแล้วนักส่งเสริมจะนำผลงานไปเผยแพร่

งานวิจัยระบบการทำฟาร์ม เริ่มจากการเลือกพื้นที่เป้าหมาย ให้ตรงกับวัตถุประสงค์ โดยหวังว่าเมื่อได้เทคโนโลยีแล้ว จะสามารถขยายผลไปในพื้นที่ที่มีระบบนิเวศคล้ายคลึงกันได้ แล้วทำการวินิจฉัยปัญหา ซึ่งเป็นหัวใจของการนำไปสู่ความสำเร็จหรือล้มเหลว ขึ้นอยู่กับว่านักวิจัยเข้าใจปัญหาเงื่อนไข และโอกาสที่แท้จริงของเกษตรกรมากน้อยเพียงไร จำเป็นต้องทำงานร่วมกันหลายฝ่าย และทำงานเป็นทีม ทั้งยังต้องใช้ข้อมูลทุติยภูมิและปฐมภูมิมาช่วยวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ขององค์ประกอบต่าง ๆ ของพื้นที่ วิเคราะห์ปัญหาให้ชัดเจน จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการวางแผน โดยใช้ทีมงานจากหลายสาขาวิชา และให้เกษตรกรมีส่วนร่วมในการเลือกเทคโนโลยี ดำเนินการทดลอง โดยเกษตรกรเป็นผู้ปฏิบัติทุกขั้นตอน ส่วนนักวิชาการเป็นผู้ให้คำแนะนำ สนับสนุนปัจจัยการผลิต ผลผลิตหลังเก็บเกี่ยวและบันทึกข้อมูลแล้วเป็นของเกษตรกร นักวิจัยและเกษตรกรร่วมกันประเมินผล หากผลผลิต และรายได้สุทธิไม่สูงกว่าวิธีของเกษตรกรที่ปฏิบัติอยู่ นักวิจัยและเกษตรกรจะปรึกษาร่วมกันเพื่อปรับเทคโนโลยีการผลิตแล้วนำไปทดสอบใหม่ จนได้เทคโนโลยีที่เกษตรกรพึงพอใจ ขั้นตอนสุดท้ายคือ การแนะนำเผยแพร่ โดยจัดงานวันถ่ายทอดเทคโนโลยีที่แปลงเกษตรกร ต้องเขียนเอกสารคำแนะนำชุดเทคโนโลยีการผลิต และมีแปลงของจริงที่เกษตรกรเป็นผู้ดำเนินการตามคำแนะนำเพื่อให้เกษตรกรที่มาร่วมงานได้เห็นของจริง สำหรับนำไปปฏิบัติ ใช้ประโยชน์และขยายผลให้เกษตรกรในวงกว้างต่อไป แม้งานวิจัยระบบการทำฟาร์มได้ผ่านการใช้งานมาเป็นเวลานานแล้ว แต่ก็ยังเป็นกลไกสำคัญในการพัฒนาเทคโนโลยีให้สามารถแก้ไขปัญหาที่แท้จริงของเกษตรกร เหมาะสมกับเงื่อนไขของสภาพพื้นที่ ทั้งยังใช้เป็นแนวคิดพื้นฐานสำหรับการนำวิทยาการสมัยใหม่มาต่อยอดเพื่อให้มีการพัฒนางานด้านการเกษตรของประเทศไทยให้มีความทันสมัยยิ่ง ๆ ขึ้นไปได้



(นายนิชัย ไทพานิชย์)

ที่ปรึกษามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ระบบการปลูกพืช

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสับปะรด
โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR
Genetic Diversity and DNA Fingerprint of Pineapple (*Ananas comosus*)
Using SSR Markers

สุภาวดี จ้อเหรียญ^{1/*} จีราพร แก่นทรัพย์^{1/} วิภาวี ชันโรจน์^{1/} มัลลิกา นวลแก้ว^{2/}
Suphawadee Ngorian^{1/*} Jeeraporn Kansup^{1/} Vipavee Chanroj^{1/} Mallika Nuankaew^{2/}

Received 22 Feb. 2024/Revised 28 Mar. 2024/Accepted 3 Apr. 2024

ABSTRACT

The research and development of pineapple varieties in order to obtain good yield and quality, resistance to disease and insects, breeders need to have sufficient information about breed varieties and their genetic diversity to make a decision on selecting appropriate parents. This research aimed to assess the genetic diversity and analyse a cluster of 57 pineapple cultivars/lines from DOA germplasm collection using 20 fluorescent-labeled SSR markers, was conducted from October 2021 to September 2023. Results showed that all 20 SSR markers were able to differentiate genetically among pineapple cultivars/lines used in this experiment, generating a polymorphic allele in total of 105 alleles varying from 3 to 9 alleles per locus, with an average of 5.3 alleles per locus. All of 105 alleles showed that the polymorphic bands accounted for 100%. The sizes of DNA fragments ranged from 94 to 400 base pairs. The Polymorphism Information Content (PIC) value ranged from 0.44 to 0.67, with an average of 0.59. Cluster analysis based on UPGMA and genetic relationships using NTSYSpc version 2.10e showed similarity coefficient value in range of 0.50 to 1.00, and revealed 5 distinct groups, consistent with pedigree and the grouping of cultivars/lines based on morphological characteristics, with a cophenetic correlation (r) of 0.85. Therefore, SSR markers used in this study were appropriate to identify the genetic differences between pineapple cultivars/lines and the uniqueness of the cultivars in this experiment. Besides, the genetic diversity database of pineapples is useful for parental selection in pineapple breeding programs.

Keywords: *Ananas comosus*; genetic diversity; SSR marker; DNA fingerprint

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

^{1/} Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

^{2/} ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี กรมวิชาการเกษตร อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี 76120

^{2/} Phetchaburi Agricultural Research and Development Center, Department of Agriculture, Cha-am, Phetchaburi 76120, Thailand

* Corresponding author: fringer_1234@yahoo.com

บทคัดย่อ

การวิจัยและพัฒนาพันธุ์สับปะรดเพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีผลผลิตและคุณภาพที่ดี ทนทานต่อโรคและแมลงนักปรับปรุงพันธุ์จำเป็นต้องทราบข้อมูลด้านพันธุ์ และข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ เพื่อการตัดสินใจคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรดของกรมวิชาการเกษตร จำนวน 57 สายพันธุ์/พันธุ์ ดำเนินการวิจัยระหว่างเดือน ต.ค. 2564 – ก.ย. 2566 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR (simple sequence repeat) ที่ติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ จำนวน 20 คู่ไพรเมอร์ ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 20 คู่ไพรเมอร์ สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรดได้ดี พบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด 105 อัลลีล มีอัลลีลต่อตำแหน่ง 3 – 9 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 5.3 อัลลีล/ตำแหน่ง อัลลีลที่พบทั้งหมดแสดงความแตกต่างกันคิดเป็น 100% แถบดีเอ็นเอ มีขนาดตั้งแต่ 94 – 400 คู่เบส มีค่า PIC (polymorphism information content) อยู่ระหว่าง 0.44 – 0.67 หรือเฉลี่ย 0.59 เมื่อนำข้อมูลที่ได้อาจจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.10e พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.50 – 1.00 สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสับปะรดได้เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับประวัติพันธุ์และการจัดกลุ่มพันธุ์ตามลักษณะสัณฐานวิทยา โดยมีค่า cophenetic correlation (r) 0.85 แสดงว่า มีการจัดกลุ่มได้ในระดับที่ดีและมีความแตกต่างอย่างชัดเจน จากการศึกษาแสดงให้เห็น

เห็นว่า เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์สับปะรด เพื่อระบุเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์สับปะรดต่อไป

คำสำคัญ: สับปะรด; ความหลากหลายทางพันธุกรรม; เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR; ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

บทนำ

สับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) เป็นพืชอุตสาหกรรมที่สำคัญของประเทศไทย แหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญ ได้แก่ จ. ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ราชบุรี หนองบัวลำภู จันทบุรี ตรัง สุราษฎร์ธานี และชุมพร ปี พ.ศ. 2565 มีพื้นที่เก็บเกี่ยวสับปะรด 457,255 ไร่ ผลผลิต 1.17 ล้านตัน ผลผลิตเฉลี่ย 3,875 กก./ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2565) ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกสับปะรดรายใหญ่ของโลก ผลิตภัณฑ์สับปะรดส่งออกที่สำคัญ คือ สับปะรดกระป๋อง น้ำสับปะรดเข้มข้น และสับปะรดกวน ปี พ.ศ. 2565 มีมูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์สับปะรด 23,700 ล้านบาท การส่งออกในรูปแบบสับปะรดผลสดน้อย ส่วนใหญ่เกษตรกรจะปลูกพันธุ์ปัตตาเวียสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูป และใช้กันมานาน จึงจำเป็นต้องมีการวิจัยและพัฒนาพันธุ์สับปะรดใหม่ ๆ ทั้งพันธุ์ที่เหมาะสมต่ออุตสาหกรรมแปรรูป และพันธุ์สำหรับการบริโภคผลสด เพื่อให้มีทางเลือกด้านพันธุ์เพิ่มขึ้น แต่การปรับปรุงพันธุ์สับปะรดเพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีคุณภาพดีนั้น การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เป็นขั้นตอนแรกที่มีความสำคัญ การคัดเลือกจากลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถจำแนกชนิด

หรือระบุพันธุ์ของสับปะรดออกจากกันได้อย่างชัดเจน เนื่องจากลักษณะภายนอกมักขึ้นกับสภาพแวดล้อม ทำให้ไม่สามารถบ่งบอกลักษณะทางพันธุกรรมที่ถูกต้องแม่นยำได้ จึงจำเป็นต้องมีข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ทั้งลักษณะภายนอกที่ปรากฏ (phenotype) และลักษณะทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ (genotype) เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจคัดเลือกพันธุ์ที่ถูกต้อง นอกจากนี้ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรดยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์เช่นกัน เนื่องจากสามารถบ่งบอกถึงความห่างหรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์มีข้อมูลในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม มีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพโดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม

การนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR (simple sequence repeat) เข้ามาช่วยในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ สามารถจำแนกความแตกต่างแบบข่มร่วม (co-dominant) ได้ ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของพืชได้เป็นอย่างดี (Hokanson et al., 1998) อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิด เช่น มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) (Costa et al., 2013) และมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) (Yanfeng et al., 2019) สำหรับในสับปะรดมีรายงานวิจัยของ Abdalah et al. (2018) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกความแตกต่าง

ทางพันธุกรรมในสับปะรดที่ปลูกในแทนซาเนีย 7 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 18 เครื่องหมาย พบว่า มี 10 เครื่องหมาย ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ดี สามารถให้แถบดีเอ็นเอ 22 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 2.2 อัลลีล/ไพรเมอร์ มีค่า polymorphism information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.17 – 0.79 เฉลี่ย 0.41 โดยไพรเมอร์ที่ให้ค่า PIC สูงสุด คือ TsuAC010 และสามารถแบ่งกลุ่มพันธุกรรมสับปะรดออกได้เป็น 4 กลุ่มหลัก

กรมวิชาการเกษตร โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี ได้เก็บรวบรวมพันธุ์สับปะรดจากภายในประเทศและพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ แต่ยังขาดข้อมูลด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังนั้น จึงดำเนินการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์สับปะรดที่เก็บรวบรวมไว้ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR สำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ การบ่งชี้ลักษณะประจำพันธุ์ สร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรด และพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์สับปะรดของประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอจากสับปะรด

เก็บตัวอย่างใบสับปะรดจากแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี จำนวน 57 สายต้น/พันธุ์ ประกอบด้วย กลุ่มพันธุ์ queen กลุ่มพันธุ์ smooth cayenne กลุ่มพันธุ์ Spanish กลุ่มพันธุ์ maipure หรือ perolera กลุ่มพันธุ์ไม่ระบุชนิด และกลุ่มพันธุ์ลูกผสม (Table 1) นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก

Dellaporta et al. (1983) ตรวจสอบคุณภาพของ ดีเอ็นเอที่ได้ โดยวัดค่าความเข้มข้น (optical density, O.D.) ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร และนำมา เจือจาง ด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือ น้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 40 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสับปะรดด้วย เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสับปะรด จำนวน 57 ตัวอย่างพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ชนิด SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 4 ชนิดสี ได้แก่ FAM (blue), HEX (green), TAMRA (yellow) และ ROX (red) จำนวน 20 คู่ไพรเมอร์ (Table 2)

โดยใช้ชุด GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 60 – 100 นาโนกรัม, 1X GoTaq® Green Master Mix, 0.5 µM upstream primer, 0.5 µM downstream primer ปรับปริมาตรให้ครบ ด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ pre-denature 95° ซ. 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่อง ทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ denature 94° ซ. 30 วินาที annealing 52 – 60° ซ. 45 วินาที extension 70° ซ. 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Extension 72° ซ. 10 นาที อีก 1 รอบ และตรวจวิเคราะห์ผล ด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis เทียบ ขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp DNA ladder marker (Fermentas, USA) พร้อม บันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

Table 1 Pineapple accessions (*Ananas* sp.) used in this study

Accession number	Cultivar	Group	Scientific name	Source
PA1	Tradsithong	Queen	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	PB ARDC*
PA2	Homsuwan	Smooth Cayenne (Hybrid)	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	PB ARDC
PA3	Pattavia	Smooth Cayenne	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	PB ARDC
PA4	Sawi	Queen	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	PB ARDC
PA5	Phuket	Queen	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	PB ARDC
PA6	Intrachit Khaw	Spanish	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	PB ARDC
PA7	Intrachit Dang	Spanish	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	PB ARDC
PA8	Nanglae	Smooth Cayenne	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	PB ARDC
PA9	Phetchaburi	Queen 'Tainan 41'	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	PB ARDC
PA10	Phetchaburi2	Smooth Cayenne	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	PB ARDC
PA11	Australia	Smooth Cayenne	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Australia
PA12	Brazil	<i>Ananas</i> sp.	<i>A. comosus</i> var. <i>lucidus</i>	Brazil
PA13	Clone13	Smooth Cayenne	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Australia
PA14	Clone30	Smooth Cayenne	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Australia
PA15	F 180	Smooth Cayenne 'Abacaxi'	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Australia
PA16	HANA17	Queen	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Hawaii
PA17	HANA119	Smooth Cayenne	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Hawaii
PA18	HANA25	Queen	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Hawaii
PA19	HANA58	Intra-specific hybrid	<i>A. hybrids</i> wild Brazil × Lot520	Hawaii
PA20	HANA64	<i>Ananas</i> sp.	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i> 'CB 5'	Hawaii
PA21	HANA100	Smooth cayenne	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> 'Cayenne #59 4N'	Hawaii

Table 1 (continued)

Accession number	Cultivar	Group	Scientific name	Source
PA22	HANA114	Smooth cayenne	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> 'Cayenne Bottleneck'	Hawaii
PA23	HANA133	Smooth cayenne	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> 'Kew'	Hawaii
PA24	MD2-1	Smooth Cayenne (Hybrid)	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Hawaii
PA25	White Jewel	Maipure / Perolera	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Hawaii
PA26	MD2-2	Smooth Cayenne (Hybrid)	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Fair Trade Group
PA27	MG3	Smooth Cayenne (Hybrid)	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Fair Trade Group
PA28	Sawi6	Queen	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection Year 59-63
PA29	Sawi18	Queen	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection Year 59-63
PA30	SWPV#34	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection Year 59-63
PA31	SWPV#35	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection Year 59-63
PA32	PVIR#70	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection Year 59-63
PA32	PVIR#70	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection Year 59-63
PA33	SPPV#51	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection Year 59-63
PA34	PNPV#61	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection Year 59-63
PA35	Amornchan1	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA36	Amornchan3	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA37	Amornchan5	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA38	Amornchan13	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA39	Amornchan15	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA40	Amornchan17	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA41	Amornchan19	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA42	Phuchawa	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA43	Tubtim Siam	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA44	Thainan17	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA45	Thong Rayong	Queen	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA46	Pattavia-2	Smooth Cayenne	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA47	MD2-3	Smooth Cayenne (Hybrid)	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Amornchan Farm
PA48	PB49-07-024	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection T1/6.1
PA49	PB49-07-037	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection T2/6.1
PA50	PB49-07-224	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection T5/6.1
PA51	PB49-13-186	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection T14/6.1
PA52	PB49-13-251	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection T16/6.1
PA53	PB49-14-046	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection T18/6.1
PA54	PB49-14-168	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection T21/6.1
PA55	PB49-12-041	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection T10/6.1
PA56	PB49-07-045	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Clone Selection T3/6.1
PA57	Srivichai	Hybrid	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Rajamangala University of Technology Srivijaya

*PB ARDC : Petchaburi Agricultural Research and Development Center

Table 2 List of 20 fluorescent-labeled SSR primers used in the study of genetic diversity of 57 pineapple cultivars

Primer name	Sequence (5' → 3')		Size of alleles (bp)	Temperature (°C)
	Forward primer	Reverse primer		
Acom_9.9	HEX-TTTAATCGGGTGGAGTAAGGA	GCCAATATGAACAGGGGAAA	144 – 186	60
Acom_78.4	HEX-GCAAATGAGGCCACAACTT	GGGTGGTGTGGACTTCTCT	188 – 215	55
AJ845033	FAM-TCCACAGTGGGCGCAAAC	AAAGGACATGAGGTAGGCC	134 – 170	58
AJ845038	ROX-TGATCATGGCGACGACCCAG	TCATTGTCGCGGCACCATG	340 – 389	55
AJ845039	FAM-TTGGAGCCGATATTATCGTCC	ACGATCTCACAAATGCTCCTCG	141 – 168	58
AJ845048	TAMRA-TCATCACCCCGCGCCTTTGC	TGCCAAGCCATCCTCAGACG	206 – 224	52
AJ845052	FAM-CAGTGGTGATTGAAGCCATGC	TTCACACCGAGAAGCCCGG	96 – 131	52
AJ845056	ROX-TGCTGGCTCTGTGGGATG	TTAGGTTTTTCACTGGAGAGAG	294 – 316	52
AJ845069	ROX-TCCCCCTAATCATCGGAAGCC	GGATGATGATGGTCACCTCTG	257 – 277	52
AJ845076	ROX-ACCCAGCCATTGCTGCTGCTG	AGTTTACAAGGCGCATAGG	361 – 403	52
AJ845081	HEX-ACATTCTCTCAGAGTGACCAGC	CACTAATCCTTGACCCAGACC	202 – 236	52
EP-05	TAMRA-CAGCCAATAACAACCTCAAG	TCCATACACACAGTACGTCG	254 – 301	58
EP-11	FAM-AGCGAGATAGCAGAGATAGG	TAGAGCGATGTTCCGATG	173 – 184	52
EP-12	TAMRA-TTAACACATGCACGGAGTAC	CTAAGAGACAACCCAGGAAG	232 – 239	54
EP-13	TAMRA-GCCAATAACAACCTCAAGC	TCCATACACACAGTACGTCG	251 – 341	58
EP-16	HEX-TAGTGAGTCAGGAGGAGAATG	CAAATAAACGGAGCGGAT	205 – 228	52
EP-20	HEX-TAATCGGGTGGAGTAAGG	GCTCACATAGGCCAATATG	152 – 195	55
EP-23	FAM-ATGGTGGTTCACTTATCAGC	AGACATTCAAAGCGGAGAG	102 – 126	55
EP-24	ROX-GCTGCTCTTGCTGCCAT	AAGCCATAGACCACCAC	168 – 262	55
TsuAC010	TAMRA-TGAGTTGTGTCATTGTGTGTCA	GGGGGTCTCCATACATTTTT	211 – 236	52

3. การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ (fragment analysis) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้จาก ดีเอ็นเอของสับปะรด (ข้อ 2) ไปเข้าเครื่องวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอแบบอัตโนมัติ (Applied Biosystems™ 3730XL DNA analyzer, Foster City, CA) โดยการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค capillary electrophoresis ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ในระดับความห่างไม่น้อยกว่า 2 – 3 คู่เบส แสดงผลในรูปแบบของกราฟ (electropherograms) และขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้ เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของตัวอย่างสับปะรดต่อไป

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกข้อมูลขนาดแถบดีเอ็นเอของแต่ละ พันธุ์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่ ลงในตาราง ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่า 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่า 0 แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า polymorphic information content (PIC) จากข้อมูล genotype เป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่ได้จากแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอในการแสดงพอลิเมอร์พีซีเอ็ม ซึ่งเป็นฟังก์ชันของทั้งจำนวนและความถี่อัลลีล เป็นค่าที่อธิบายถึงโอกาสที่จีโนไทป์เฮเทอโรไซกัส ซึ่งมีสองอัลลีลที่แสดงความหลากหลายของอัลลีลที่แตกต่างกันจะสามารถถ่ายทอดอัลลีลให้แก่รุ่นลูก (transmission informativeness) (กิตติพัฒน์, 2564)

จากสูตร

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

กำหนดให้ค่า p_i , p_j เป็นความถี่ของอัลลีล i และ j ตามลำดับ และ n เป็นจำนวนอัลลีล (Botstein et al., 1980) ซึ่งสูตรนี้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อลดข้อบกพร่องในกรณีที่มีความเป็นไปได้ที่เฮเทอโรไซโกตจะไม่ให้ข้อมูลเนื่องจากมีพ่อแม่ที่มีจีโนไทป์เฮเทอโรไซโกตที่เหมือนกัน

ทำการคำนวณค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกต (observed heterozygosity: H_o) และค่าคาดหวัง (expected heterozygosity: H_e) ด้วยวิธีของ Nei (1978) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc 2.01e โดยอาศัยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ด้วยวิธี Jaccard's similarity coefficients และการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (cluster analysis) ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) การวิเคราะห์ข้อมูลและแสดงผลในรูปแบบ dendrogram และการวิเคราะห์ความถูกต้องของการจัดกลุ่ม โดยการวิเคราะห์ cophenetic correlation (r) (Rohlf, 2000)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์สับปะรด

ไพรเมอร์ SSR ทุกคู่ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์สับปะรดได้ดี ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และมีแถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบหรือหลายอัลลีล (3 – 9 อัลลีล/เครื่องหมาย) (Figure 1)

แต่การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอของพันธุ์สับปะรดที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้ จึงนำผลผลิตพีซีอาร์ไปวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ABI3730XL สามารถจำแนกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในสับปะรดแต่ละพันธุ์ได้ในระดับที่แตกต่างกันเพียง 2 – 3 คู่เบส ซึ่งแสดงค่าขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์คู่ต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน และมีความจำเพาะกับพันธุ์สับปะรด มีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ โดยข้อมูลขนาดดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนทั้งสิ้น 1,140 ข้อมูล ทั้งนี้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้สามารถนำไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์เพื่อการตรวจสอบพันธุ์การรับรองพันธุ์ การคุ้มครองพันธุ์ให้มีความถูกต้องตรงตามพันธุ์ได้

2. การวิเคราะห์ข้อมูลและการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรด

การวิเคราะห์ข้อมูลขนาดดีเอ็นเอของสับปะรดที่ได้จากไพรเมอร์แต่ละคู่ พบว่า อัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด จำนวน 105 อัลลีล มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งตั้งแต่ 3 – 9 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 5.3 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกัน (polymorphic) จำนวน 105 อัลลีล คิดเป็น 100% โดยไพรเมอร์ที่พบอัลลีลมากที่สุด จำนวน 9 อัลลีล คือ EP-24 ส่วนไพรเมอร์ที่พบอัลลีลน้อยที่สุด จำนวน 3 อัลลีล คือ AJ845039 EP-11 และ EP-12 ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 94 – 400 คู่เบส ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกต (H_o) อยู่ระหว่าง 0.40 – 0.89 มีค่าเฉลี่ย 0.70 ค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกต หรือ ค่าความหลากหลายของยีน (gene diversity, H_e) อยู่ระหว่าง 0.51 – 0.72 เฉลี่ย 0.65 การวิเคราะห์ค่า PIC พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.44 – 0.67

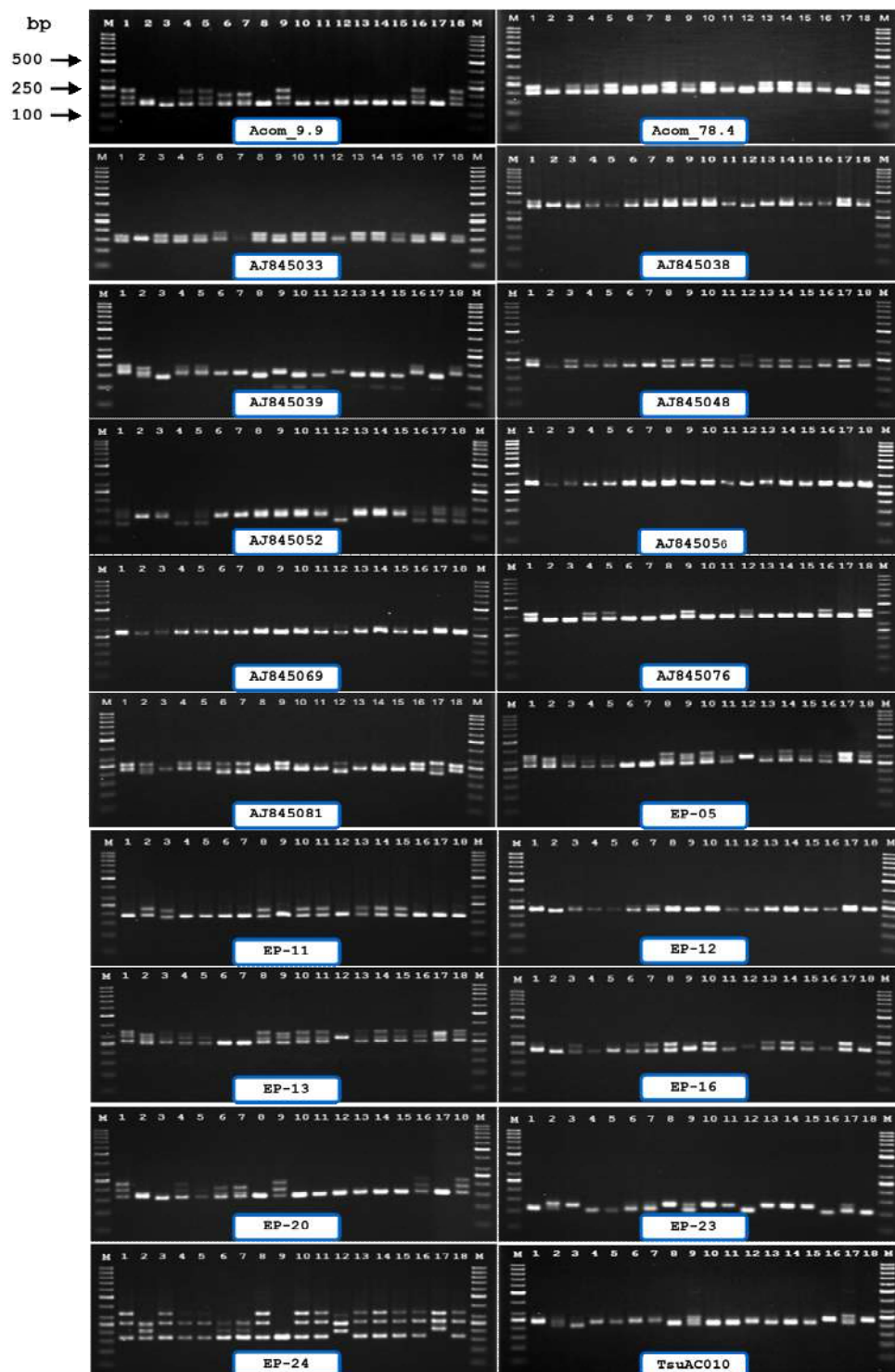


Figure 1 PCR amplification profiles of 18 pineapple cultivars using 20 fluorescent-labeled SSR primers separated by 2% agarose gel electrophoresis, Lane M = 50 bp DNA Ladder, Lane 1 = Trad Sithong, Lane 2 = Homsuwan, Lane 3 = Pattavia, Lane 4 = Sawi, Lane 5 = Phuket, Lane 6 = Intrachit Khaw, Lane 7 = Intrachit Dang, Lane 8 = Nanglae, Lane 9 = Phetchaburi, Lane 10 = Phetchaburi2, Lane 11 = Australia, Lane 12 = Brazil, Lane 13 = Clone13, Lane 14 = Clone30, Lane 15 = F180, Lane 16 = HANA17, Lane 17 = HANA119, Lane 18 = HANA25

Table 3 Results of genetic diversity analysis of 57 pineapple cultivars using 20 SSR markers

Primer/ (Locus)	Number of alleles	Number of polymorphic	% Polymorphic	Size of alleles (bp)	Mean of alleles (bp)	Observed heterozygosity (Ho)	Expected heterozygosity (He)	Polymorphic information content (PIC)
Acom_9.9	7	7	100	144-184	155	0.65	0.68	0.63
Acom_78.4	5	5	100	184-201	193	0.77	0.67	0.60
AJ845033	7	7	100	130-164	146	0.81	0.71	0.66
AJ845038	7	7	100	338-400	359	0.67	0.68	0.63
AJ845039	3	3	100	137-161	148	0.49	0.65	0.57
AJ845048	5	5	100	207-235	213	0.81	0.67	0.60
AJ845052	4	4	100	94-122	115	0.79	0.63	0.57
AJ845056	5	5	100	300-325	306	0.74	0.62	0.56
AJ845069	6	6	100	250-285	271	0.81	0.67	0.60
AJ845076	4	4	100	365-392	374	0.68	0.60	0.54
AJ845081	5	5	100	196-230	220	0.63	0.58	0.53
EP-05	5	5	100	253-297	273	0.81	0.72	0.67
EP-11	3	3	100	173-184	178	0.51	0.51	0.44
EP-12	3	3	100	232-239	235	0.70	0.66	0.58
EP-13	5	5	100	251-295	271	0.81	0.72	0.67
EP-16	4	4	100	205-228	210	0.40	0.53	0.44
EP-20	8	8	100	146-192	164	0.70	0.68	0.63
EP-23	5	5	100	104-135	114	0.74	0.67	0.61
EP-24	9	9	100	168-262	208	0.89	0.64	0.58
TsuAC010	5	5	100	206-234	218	0.56	0.66	0.59
Mean	5.35		100		218.60	0.70	0.65	0.59

เฉลี่ย 0.59 โดยไพรเมอร์ที่มีค่า PIC สูงสุดคือ EP-05 และ EP-13 และไพรเมอร์ที่มีค่า PIC ต่ำสุด คือ EP-11 และ EP-16 ตามรายงานของ Yu et al. (2012) ระบุว่าค่า $PIC > 0.50$ แสดงถึงความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับสูง ถ้ามีค่าอยู่ระหว่าง $0.25 < PIC < 0.50$ ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างระดับปานกลาง และค่า $PIC < 0.25$ ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับที่ต่ำ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ค่า PIC ของไพรเมอร์ที่คัดเลือกและนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรดมีค่าอยู่ระหว่าง 0.44 – 0.67 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกให้ความสามารถในการจำแนก

ความแตกต่างระหว่างพันธุ์สับปะรดได้อยู่ในระดับปานกลางจนถึงระดับสูง (Table 3)

การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม พบว่า มีค่าตั้งแต่ 0.50 – 1.00 โดยพันธุ์ที่มีค่า similarity coefficient สูงสุด 1.00 คือ 1) กลุ่มพันธุ์ตราดสีทอง สวี สวี6 สวี18 ภูเก็ต HANA17 HANA25 ทองระยง และ PNPV#61 2) กลุ่มพันธุ์ SWPV#34 และ SWPV#35 3) กลุ่มพันธุ์หอมสุวรรณ MD2-1 MD2-2 MD2-3 และ MG3 4) กลุ่มพันธุ์ปัตตาเวีย นางแล เพชรบุรี2 Australia Clone13 Clone30 F180 HANA133 และ ปัตตาเวีย-2 และพันธุ์ที่มีค่า similarity coefficient ต่ำสุด 0.50 คือ 1) PB49-07-224 กับ HANA58 2) HANA64 กับ Brazil และ 3) White

Jewel กับ HANA64 เมื่อนำค่า similarity matrix ที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (cluster analysis) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) พบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสับปะรดทั้ง 57 สายพันธุ์/พันธุ์ แบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม (Figure 2) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ queen ประกอบด้วย พันธุ์ตราดสีทอง สวี สวี6 สวี18 ภูเก็ต HANA17 HANA25 ทองระยง เพชรบุรี และกลุ่มพันธุ์ลูกผสมซึ่งมีฐานพันธุกรรมมาจากประชากรพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ที่อยู่ภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน ประกอบด้วย ภูเขา (ปัตตาเวีย x ภูเก็ต) อมรจันทร์15 (ปัตตาเวีย x MD2) อมรจันทร์19 (MD2 x ภูเขา) PB49-07-024 PB49-07-037 PB49-07-045 PB49-07-224 (ปัตตาเวีย x สวี) PB49-13-251 SWPV#34 SWPV#35 (สวี x ปัตตาเวีย) และ PNPV#61 (ปัตตานี (Queen) x ปัตตาเวีย)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อยที่ 1 จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ smooth cayenne ประกอบด้วย พันธุ์ปัตตาเวีย ปัตตาเวีย-2 นางแล เพชรบุรี2 ออสเตรเลีย Clone13 Clone30 F180 HANA100 HANA114 HANA119 HANA133 และกลุ่มพันธุ์ลูกผสมซึ่งมีฐานพันธุกรรมมาจากประชากรพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ที่อยู่ภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน ประกอบด้วย อมรจันทร์1 อมรจันทร์3 (ปัตตาเวีย x MD2) SPPV#51 (สิงคโปร์ปัตตาเวีย x ปัตตาเวีย) PVIR#70 (ปัตตาเวีย x อินทรชิต) PB49-13-186 (สวี x ปัตตาเวีย) PB49-14-046 PB49-14-168 (ตราดสีทอง x ปัตตาเวีย) PB49-12-041

(ภูเก็ต x ปัตตาเวีย) ในขณะที่พันธุ์ White jewel ซึ่งเป็นกลุ่มพันธุ์ maipure หรือ perolera ก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย และกลุ่มย่อยที่ 2 เป็นกลุ่มพันธุ์ลูกผสมระหว่าง smooth cayenne กับ smooth cayenne ได้แก่ พันธุ์หอมสุวรรณ MD2-1 MD2-2 MD2-3 MG3 (58-1184 x 59-443) ไทนาน17 อมรจันทร์5 อมรจันทร์13 (ปัตตาเวีย x MD2) และ smooth cayenne กับ queen คือ พันธุ์อมรจันทร์17 (สิงคโปร์ปัตตาเวีย x MD2)

กลุ่มที่ 3 สำหรับประชากรในกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นกลุ่มขนาดเล็ก ประกอบด้วย พันธุ์ทับทิมสยาม ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างกลุ่มพันธุ์ queen กับ พันธุ์ป่า (wild) และ พันธุ์ Brazil เป็นกลุ่มพันธุ์ *Ananas* sp. ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นำเข้าจากบราซิล มีชื่อพันธุ์ทางพฤกษศาสตร์ (variety) เป็น *A. comosus* var. *lucidus*

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์อินทรชิตขาว อินทรชิตแดง ศรีวิชัย และ HANA64 สำหรับ พันธุ์อินทรชิตขาว และ อินทรชิตแดง จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ Spanish สำหรับพันธุ์ศรีวิชัย เป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ภูเก็ต และ ปัตตาเวีย และ พันธุ์ HANA64 เป็นกลุ่มพันธุ์ *Ananas* sp. ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นำเข้าจากฮาวาย โดยพันธุ์ HANA64 มีชื่อพันธุ์ทางพฤกษศาสตร์เป็น *A. comosus* var. *bracteatus* ในขณะที่สับปะรดทั้ง 3 พันธุ์ที่กล่าวมาข้างต้น เป็น *A. comosus* var. *comosus*

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย พันธุ์ HANA58 จัดเป็น outgroup ได้แก่ พันธุ์ HANA58 (*Ananas* hybrid, wild Brazil x Lot 520) เป็นกลุ่มพันธุ์ intra-specific hybrid

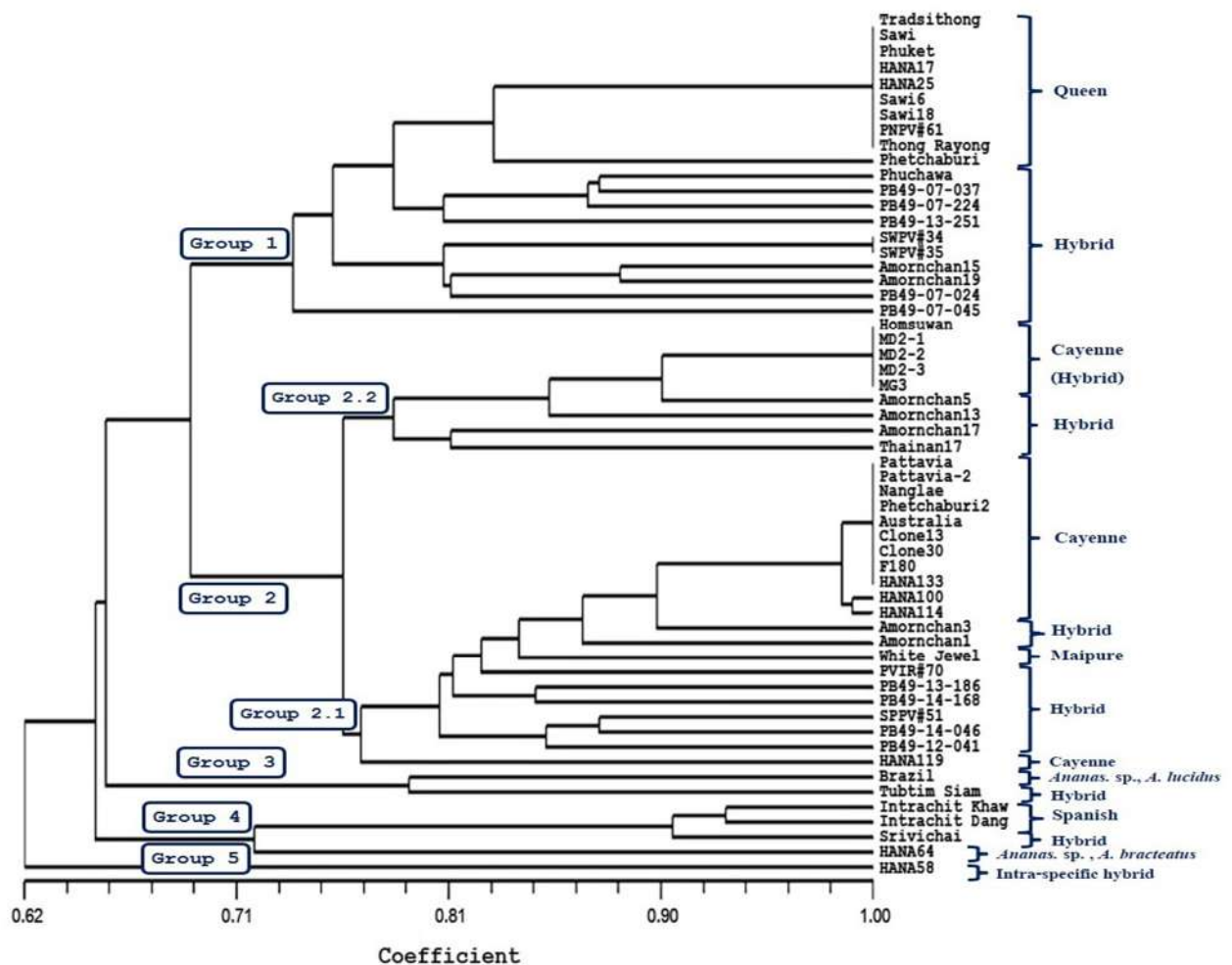


Figure 2 Dendrogram of 57 pineapple cultivars generated by UPGMA clustering using 20 SSR markers

เมื่อวิเคราะห์ความถูกต้องของการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation พบว่า มีค่า 0.85 ซึ่งเป็นค่าบวก หมายความว่า ค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์ มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับดี (Sirithunya et al., 2001) จากผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ทั้ง 20 คู่ไพรเมอร์สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรดได้ดี แต่มีบางพันธุ์ที่ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากกันได้ เนื่องจากผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมมีค่า 1 ซึ่งอาจแปลผลได้ว่า พันธุ์สับปะรดดังกล่าว

อาจจะเป็นพันธุ์เดียวกัน แต่มีการกระจายพันธุ์ไปยังพื้นที่ต่าง ๆ อาจมีการปรับตัวและกลายลักษณะโดยธรรมชาติทำให้ลักษณะฟีโนไทป์แตกต่างกันไปบ้าง และมีการเรียกชื่อพันธุ์แตกต่างกันตามพื้นที่ปลูก เช่น พันธุ์ปัตตาเวีย มีการนำเข้ามานาน เมื่อนำไปปลูกในพื้นที่ อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี เรียกว่า พันธุ์ศรีราชา หรือปลูกใน ต. ห้วยมุ่น อ. น้ำปาด จ. อุตรดิตถ์ เรียกว่า พันธุ์ห้วยมุ่น (สาวบางแค 22, 2565) สำหรับพันธุ์หอมสุวรรณ พบว่า เป็นพันธุ์เดียวกับพันธุ์ MD2 ซึ่งเป็นสับปะรดลูกผสมจากฮาวาย สหรัฐอเมริกา (มนตรี, 2560) และพันธุ์ MG3 พบว่า เป็นพันธุ์ที่ได้มาจากคู่ผสมพ่อแม่เดียวกันกับพันธุ์ MD2 นำเข้ามาจากประเทศฟิลิปปินส์ โดยบริษัท

โดล ประเทศไทย จำกัด (มนตรี, 2563) หรือเป็นพันธุ์ที่มีพันธุ์กรรมใกล้เคียงกันสูงมาก เช่น พันธุ์ SWPV#34 และ SWPV#35 เป็นลูกผสมชุดเดียวกันที่มาจากคู่ผสมระหว่างพันธุ์สวีกับปัตตาเวีย

อย่างไรก็ตาม ผลการจัดกลุ่มดังกล่าว นอกจากจะมีความสอดคล้องกับประวัติพันธุ์แล้วยังสอดคล้องกับวิธีการจัดจำแนกกลุ่มพันธุ์สับปะรด โดย Py et al. (1987) ที่ใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์เบื้องต้น ได้แก่ ทรงต้น การมีหนามบริเวณขอบใบ ทรงผล และเนื้อผล สามารถจัดกลุ่มสับปะรดที่พบปลูกในประเทศไทย ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่ม smooth cayenne มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มขนาดใหญ่ ขอบใบเรียบมีหนามเฉพาะปลายใบ หน่อมีน้อย ผลขนาดใหญ่ทรงกระบอกตาแบนกว้าง ผลสุกสีเหลืองปนส้ม เนื้อสีเหลืองอ่อน รสหวาน-อมเปรี้ยว เยื่อใยน้อย 2) กลุ่ม queen มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มขนาดปานกลาง ขอบใบมีหนาม หน่อมีมาก ผลขนาดเล็ก ทรงกรวยกระบอกตาพองนูน ผลสุกสีเหลือง เนื้อสีเหลืองใส รสหวานกรอบ เยื่อใยน้อย และ 3) กลุ่ม spanish มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มขนาดใหญ่ ขอบใบมีหนาม หน่อมีน้อย ผลขนาดปานกลาง ทรงกลม ตาแบนกว้าง ผลสุกสีเหลืองปนแดง เนื้อสีเหลืองอ่อน-ขาว รสหวานอ่อน เยื่อใยมก ทั้งนี้ยังพบกลุ่มพันธุ์อีก 1 กลุ่ม ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ได้แก่ พันธุ์ White Jewel จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ maipure หรือ perolera เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากฮาวาย มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มขนาดใหญ่ ขอบใบเรียบไม่มีหนาม เป็นแบบ piping หน่อมีน้อย ผลขนาดใหญ่ ทรงกระบอกตาแบนกว้างไม่สม่ำเสมอ ผลสุกสีเหลืองปนแดง เนื้อสีเหลืองใส-เหลืองซีด รสหวาน-อมเปรี้ยว มีกลิ่นเฉพาะตัว เยื่อใยน้อย และยังมีกลุ่มพันธุ์ที่ไม่ระบุชนิด ได้แก่ พันธุ์ Brazil เป็นกลุ่มพันธุ์ *Ananas* sp. มีชื่อ

วิทยาศาสตร์ *A. comosus* var. *lucidus* เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากประเทศบราซิล มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มขนาดเล็ก ใบเล็กแคบตั้งตรง ขอบใบไม่มีหนาม ใบเป็นมันเงาสีม่วงปนแดง ผลขนาดเล็ก ทรงกระบอก ผลสุกสีชมพูปนแดง เนื้อสีเหลืองขาว-ขาวครีม และ พันธุ์ HANA64 เป็นกลุ่มพันธุ์ *Ananas* sp. มีชื่อวิทยาศาสตร์ *A. comosus* var. *bracteatus* มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มขนาดค่อนข้างใหญ่ ใบใหญ่ มีลักษณะอ่อนสีเขียวสด ขอบใบมีหนามแข็งขนาดใหญ่โค้งงอไปหาปลายใบ ผลมีขนาดเล็กทรงกระบอก เนื้อสีขาว-ขาวครีม (Figure 3) โดยทั้ง 2 กลุ่มพันธุ์นี้มีลักษณะเนื้อแข็ง รสชาติไม่ดี ไม่เหมาะกับการนำมาบริโภค มักจะใช้เป็นไม้ประดับหรือไม้ตัดดอก หรืออาจนำมาใช้ประโยชน์เป็นเชื้อพันธุ์กรรมในการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากสับปะรดกลุ่มพันธุ์ดังกล่าวมีลักษณะความต้านทานต่อโรคเหี่ยวได้ดี (ทวีศักดิ์, 2560)

ข้อมูลที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุ์กรรมของสับปะรดทั้ง 57 สายพันธุ์/พันธุ์ นับเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญต่องานด้านการปรับปรุงพันธุ์อย่างมาก เนื่องจาก สามารถบ่งบอกถึงความห่างหรือความใกล้ชิดทางพันธุ์กรรม เพื่อให้ นักปรับปรุงพันธุ์มีข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ และสามารถจับคู่ผสมในโครงการปรับปรุงพันธุ์สับปะรดได้อย่างเหมาะสม โดยการจับคู่ผสมระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุ์กรรมมาผสมพันธุ์กัน ทำให้สามารถเพิ่มโอกาสที่จะได้พันธุ์ที่มีลักษณะดีเด่น และลูกผสมที่มีความหลากหลายทางพันธุ์กรรมมากยิ่งขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการทรัพยากรเชื้อพันธุ์กรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์สับปะรดในอนาคต

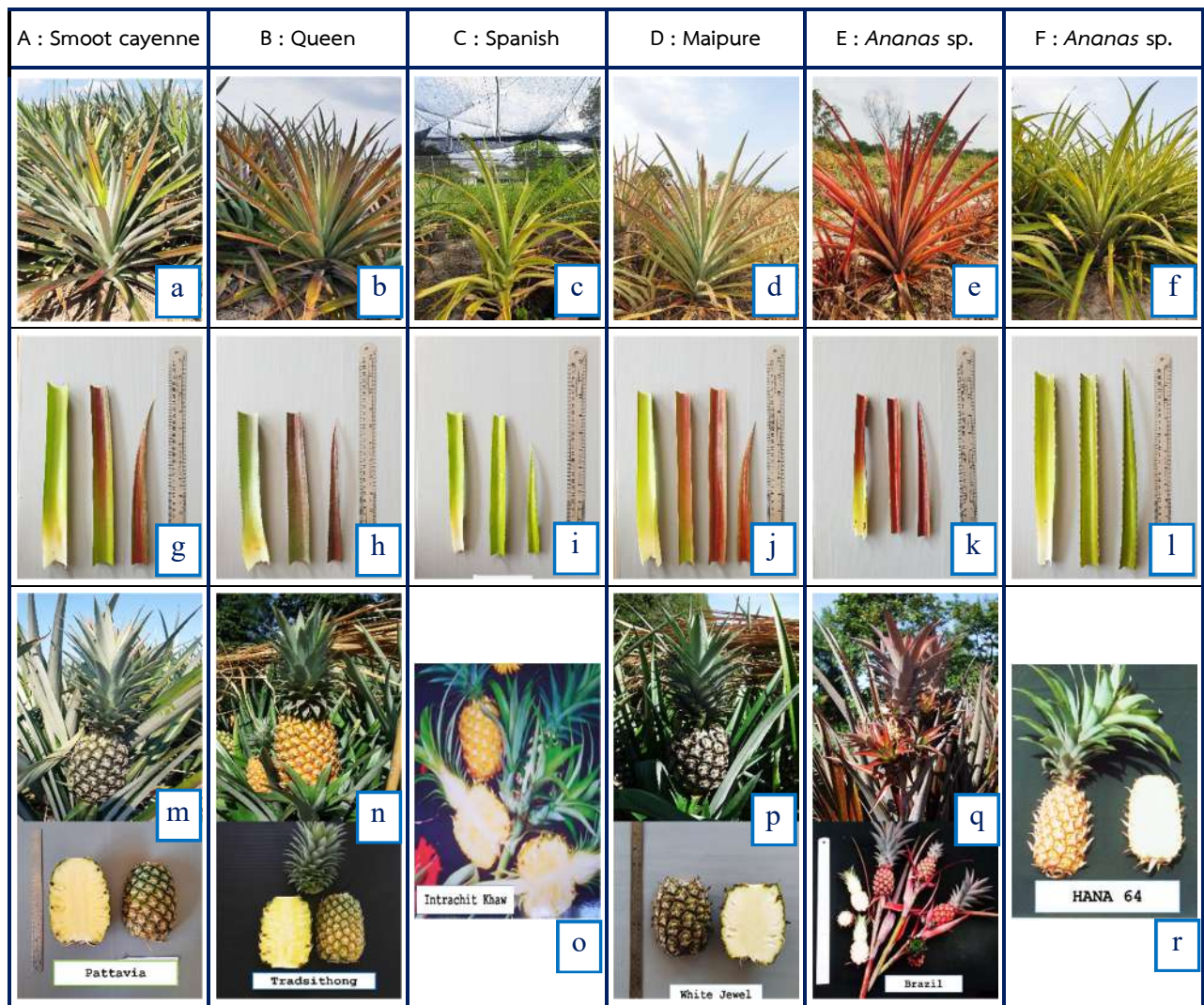


Figure 3 Morphological characteristics of pineapple cultivars representative of each group and *Ananas* sp. used in this study. The cultivars include Pattavia (smoot cayenne), Tradsihong (queen), Intrachit Khaw (spanish), White Jewel (maipure), Brazil (*Ananas* sp., *A. comosus* var. *lucidus*) and HANA64 (*Ananas* sp., *A. comosus* var. *bracteatus*), as shown in column A, B, C, D, E and F respectively, a - f, rosette shape; g - l, leaf shape; m - r, fruit shape and color

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอและการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์สับปะรดที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร ประกอบด้วย กลุ่มพันธุ์ที่รวบรวมภายในประเทศ กลุ่มพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ และกลุ่มพันธุ์ลูกผสม จำนวน 57 สายพันธุ์/พันธุ์ โดยใช้

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 20 คู่ไพรเมอร์ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับปะรดกลุ่มพันธุ์ต่าง ๆ และเป็นวิธีการที่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรดได้เป็นอย่างดี รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์สับปะรด

ทั้งสิ้น 1,140 ข้อมูล พบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด 105 อัลลีล มีอัลลีลต่อตำแหน่ง 3 – 9 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 5.3 อัลลีล/ตำแหน่ง อัลลีลที่พบทั้งหมดแสดงความแตกต่างกันคิดเป็น 100% แถบดีเอ็นเอมีขนาดตั้งแต่ 94 – 400 คู่เบส มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.44 – 0.67 หรือเฉลี่ย 0.59 เมื่อนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถแบ่งกลุ่มออกได้เป็น 5 กลุ่ม ที่แสดงความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับประวัติพันธุ์และการจัดจำแนกกลุ่มพันธุ์สับปรดตามลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการบ่งชี้ และสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปรด เพื่อการระบุ ตรวจสอบ และจำแนกพันธุ์ รวมทั้งยังใช้เป็นข้อมูลสำหรับการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในงานปรับปรุงพันธุ์สับปรด เพื่อสร้างลูกผสมให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2564. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี. 393 หน้า.
- ทวีศักดิ์ แสงอุดม. 2560. การจัดการการผลิตสับปรดคุณภาพ. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 184 หน้า.
- มนตรี กล้าขาย. 2560. MD-2: สับปรดผลสดพันธุ์ใหม่ที่ครองใจคนทั้งโลก. แหล่งข้อมูล: https://www.technologychaoban.com/agricultural-technology/article_33935. สืบค้น: 23 พฤษภาคม 2567.
- มนตรี กล้าขาย. 2563. MG-3: สับปรดพันธุ์ใหม่ รสหวาน ได้ใจ ผลใหญ่จากฟิลิปปินส์. แหล่งข้อมูล: <https://www.technologychaoban.com/agricultural-technology/article136154>. สืบค้น: 19 มีนาคม 2567.
- สาวบางแค 22. 2565. ชื่อสับปรดปัตตาเวียเหมือนกัน แต่รสชาติความอร่อยต่างกัน. แหล่งข้อมูล: <https://www.Technologychaoban.com/agricultural-technology/article205445>. สืบค้น: 23 พฤษภาคม 2567.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2565. ภาพรวมสถานการณ์สินค้าเกษตรปี 2565 และแนวโน้มปี 2565. แหล่งข้อมูล: <http://www.oae.go.th>. สืบค้น: 2 ธันวาคม 2566.
- Abdalah, M., M.S. Seth, A. Ndee, E.E. Mneney, G. Mbawambo, K. Lema, A. Godfrey, L. Mrema, A. Kachiwile, E. Mrema and T.J. Msogoya. 2018. Diversity and genetic identity of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] in Tanzania based on microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*. 17(26): 811 – 817.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32(3): 314 – 331.
- Costa, T.R.D., P.S.V. Filho, M.C. Gonçalves-Vidigal, M.Z. Galván, G.F. Lacanallo, L.I. da Silva and M.V. Kvitschal. 2013. Genetic diversity and population structure of sweet cassava using simple sequence repeat (SSR) molecular markers. *African Journal of Biotechnology*. 12(10): 1040 – 1048.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II, *Plant Molecular Biology Reporter*. 1(4): 19 – 21.
- Hokanson, S.C., A.K. Szewc-McFadden, W.F. Lamboy and J.R. McFerson. 1998. Microsatellite (SRR) markers reveal genetic identities,

- genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* borkh. core subset collection. Theoretical and Applied Genetics. 97(5): 671 – 683.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89(3): 583 – 590.
- Py, C., J.J. Lacoëuilhe and C. Teisson. 1987. The Pineapple Cultivation and Uses. G.P. Maisonneuve et Larose Publisher, Paris. 568 p.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Exeter Publishing Setauket, New York.
- Sirithunya, P., E. Roumen, S. Mongkolsomrit, S. Sriprakhon, P. Hutamekalin and T. Sreewongchai. 2001. Instruction Manual Workshop on Molecular Genetic Analysis on Diversity of Blast Pathogen in Thailand. Yothee laboratory Unit Bangkok, Thailand.
- Yanfeng, D., J. Liu, J. Xu, C. Bian, S. Duan, W. Pang, J. Hu, G. Li and L. Jin. 2019. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis with simple sequence repeat markers of 217 potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) in China. American Journal of Potato Research. 96: 21 – 32.
- Yu, J.Z., D.D. Fang, R.J. Kohel, M. Ulloa, L.L. Hinze, R.G. Percy, J. Zhang, P.W. Chee, B.E. Scheffler and D.C. Jones. 2012. Development of a core set of SSR markers for the characterization of *Gossypium* germplasm. Euphytica. 187(2): 203 – 213.

การเปรียบเทียบสายพันธุ์/พันธุ์มันสำปะหลังบริโภค และอายุเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม
สำหรับการแปรรูปเป็นเฟรนช์ฟรายส์
Comparison of Cassava Lines/Varieties and Proper Harvesting Period for
Processing to French Fries

กุสุมา รอดแผ้วพาล^{1/*} ขฎาพร อินเปลี่ยน^{1/} สุวลักษณ์ ศันสนีย์^{1/} ธนาวดี คำชู^{1/}
Kusuma Readpeawpan^{1/*} Chadaporn Inplean^{1/} Suwaluk Sansanee^{1/} Tanavadee Kumchoo^{1/}

Received 11 Oct. 2023/Revised 19 Jan. 2024/Accepted 19 Jan. 2024

ABSTRACT

French fries are a popular snack in Thailand. Generally, French fries are made from potatoes. The price of potatoes in Thailand is quite high. Replacing potatoes with cheaper cassava to produce French fries could promote and increase the use of cassava in Thailand. Six cassava lines/varieties CMRE60-03-02, CMRE60-03-13, OMRE60-02-61, OMRE60-03-09, Hanatee and Rayong2 at harvesting periods of 8, 10 and 12 months were compared on yield, texture and taste after processing to French fries. The experiments were conducted in three fields. In each field, a randomized complete block design was used. The treatments in each field were the planting of six cassava lines/varieties with four replications. Cassava lines/varieties in all fields were planted on the same date and harvested at 8, 10 and 12 months after planting, respectively. Results showed that at a harvesting period of 8 months, the OMRE60-02-61 line gave a fresh root yield of 2,877 kg/rai, close to Hanatee. Cassava French fries from the OMRE60-02-61 line had a slightly higher quality of texture hardness than that of the Hanatee variety and had a better score of consumer acceptance in terms of appearance, color, taste, texture and overall acceptability than those of the Hanatee variety. At a harvesting period of 10 months, the CMRE60-03-13 line gave a fresh root yield of 2,929 kg/rai, which was 31% higher than that of the Hanatee variety. Cassava French fries from the CMRE60-03-13 line had an equal score of consumer acceptance compared to those of the Hanatee variety but had a lower quality of texture hardness than that of the Hanatee variety. At a harvesting period of 12 months, the OMRE60-02-61 line gave a fresh root yield of 2,650 kg/rai, close to the Hanatee. Cassava French fries from the OMRE60-02-61 line had near quality of

Keywords: edible cassava; cassava French fries; sensory test

^{1/} ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง อำเภอมือง จ.ระยอง 21150

^{1/} Rayong Field Crops Research Center, Mueang Rayong, Rayong 21150, Thailand

* Corresponding author: kusuma357@gmail.com

texture hardness compared to that of the Hanatee variety and had a close score of consumer acceptance compared to those of the Hanatee variety, however, the acceptance of the Hanatee variety was higher. It is recommended that the OMRE60-02-61 line harvested at 8 months be the most appropriate cassava to produce French fries because it has better consumer acceptance than the Hanatee variety.

บทคัดย่อ

เฟรนช์ฟรายส์โดยทั่วไปทำจากมันฝรั่ง เป็นอาหารว่างที่ได้รับความนิยม การนำมันสำปะหลังซึ่งประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตสูง และมีราคาถูกกว่ามันฝรั่งมาผลิตเฟรนช์ฟรายส์ จะเป็นการส่งเสริมการใช้มันสำปะหลังเพื่อการบริโภคเพิ่มขึ้น จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบมันสำปะหลังจำนวน 6 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้แก่ CMRE60-03-02 CMRE60-03-13 OMRE60-02-61 OMRE60-03-09 ห้านาที่ และ ระยะเวลา 2 ที่อายุเก็บเกี่ยว 8 10 และ 12 เดือน ต่อผลผลิต เนื้อสัมผัส และรสชาติเมื่อนำมาผลิตเป็นเฟรนช์ฟรายส์ โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 แปลงทดลอง ในแต่ละแปลงวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ จำนวน 4 ซ้ำ ดำเนินการปลูกพร้อมกัน ผลการทดลองพบว่า การเก็บเกี่ยวที่อายุ 8 เดือน สายพันธุ์ OMRE60-02-61 ให้ผลผลิตหัวสด 2,877 กก./ไร่ ใกล้เคียงกับพันธุ์ห้านาที่ เฟรนช์ฟรายส์ที่ทำจากสายพันธุ์ OMRE60-02-61 มีคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสค่อนข้างสูงกว่าพันธุ์ห้านาที่ และคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านสี รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมสูงกว่าพันธุ์ห้านาที่ทุกด้าน ที่อายุ

10 เดือน สายพันธุ์ CMRE60-03-13 ให้ผลผลิตหัวสด 2,929 กก./ไร่ สูงกว่าพันธุ์ห้านาที่ 31% เฟรนช์ฟรายส์ที่ทำจากสายพันธุ์ CMRE60-03-13 คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสทุกด้านเทียบเท่าพันธุ์ห้านาที่ แต่มีคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสน้อยกว่า และการเก็บเกี่ยวที่อายุ 12 เดือน สายพันธุ์ OMRE60-02-61 ให้ผลผลิตหัวสด 2,650 กก./ไร่ ใกล้เคียงกับพันธุ์ห้านาที่ เฟรนช์ฟรายส์ที่ทำจากสายพันธุ์ OMRE60-02-61 มีคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส และได้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสใกล้เคียงกับพันธุ์ห้านาที่ แต่ผู้ทดสอบชิมให้การยอมรับเฟรนช์ฟรายส์จากมันสำปะหลังพันธุ์ห้านาที่มากกว่า ดังนั้น ในภาพรวม มันสำปะหลังสายพันธุ์ OMRE60-02-61 ที่อายุเก็บเกี่ยว 8 เดือน เหมาะสำหรับการผลิตเฟรนช์ฟรายส์มากที่สุด เนื่องจากให้ผลผลิตสูงและได้คะแนนการยอมรับจากผู้บริโภคสูงกว่าพันธุ์ห้านาที่

คำสำคัญ: มันสำปะหลังบริโภค; เฟรนช์ฟรายส์ มันสำปะหลัง; การทดสอบทางประสาทสัมผัส

บทนำ

เฟรนช์ฟรายส์จัดเป็นอาหารว่างที่ได้รับความนิยม โดยทั่วไปแปรรูปมาจากมันฝรั่งซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับมันสำปะหลังที่ประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิต ราคาไม่แพง และมีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับมันฝรั่ง (เมตไทย, 2563) นอกจากนี้ เฟรนช์ฟรายส์จากมันฝรั่งยังมีสารอะคริลาไมด์ (acrylamide) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (โอภาษ, 2549) ถ้าสามารถนำมันสำปะหลังมาผลิตหรือแปรรูปเป็นเฟรนช์ฟรายส์ที่มีคุณภาพได้จะเป็นการส่งเสริมให้มีการปลูก

มันสำปะหลังเพื่อการบริโภคมากขึ้น และเพิ่มมูลค่าให้กับมันสำปะหลังบริโภค

มันสำปะหลังแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ (1) มันสำปะหลังชนิดหวาน มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิก (HCN) ต่ำ หัวสดใช้ในการบริโภคได้ รสไม่ขม มีทั้งชนิดเนื้อร่วน นุ่ม และชนิดเนื้อเหนียว แน่น นิยมทำเป็นอาหาร เช่น มันเชื่อม มันปิ้ง มันเผา และสามารถนำมาทอดเป็นเฟรนช์ฟรายส์ได้ (โอภาส, 2549) ส่วนใหญ่ปลูกตามบริเวณบ้าน ร่องสวน เพื่อบริโภคในครัวเรือน หรือจำหน่ายตามตลาดสดในท้องถิ่น พันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ พันธุ์ห่านาที่ และระยอง 2 เป็นต้น และ (2) มันสำปะหลังชนิดขม มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกสูงกว่า มีรสขม เนื้อหยาบ ไม่เหมาะสำหรับการบริโภค หรือใช้หัวสดเลี้ยงสัตว์โดยตรง แต่เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งสูง จึงนิยมปลูกเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรมนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์มันเส้น มันอัดเม็ด แป้งมันสำปะหลัง และเอทานอล ได้แก่ พันธุ์ระยอง 9 ระยอง 11 และระยอง 72 เป็นต้น (อัจฉรา และ จรุงสิทธิ์, 2537)

สารไซยาไนด์ในมันสำปะหลังอยู่ในรูปของกรดไฮโดรไซยานิก ซึ่งเกิดจากการที่เซลล์มันสำปะหลังถูกทำลายจะปล่อยสารไซยาโนจินิกกลูโคไซด์ออกมา หลังจากนั้นเอนไซม์ลินามาเรสที่อยู่ในเซลล์จะเข้าทำปฏิกิริยากับสารไซยาโนจินิกกลูโคไซด์ที่ถูกปล่อยออกมา ทำให้ได้กรดไฮโดรไซยานิกซึ่งเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ แต่สลายตัวได้ง่ายเมื่อนำหัวมันสำปะหลังมาทำให้ร้อนด้วยวิธีอบ นึ่ง ต้ม เผา ความร้อนจะทำให้ความเป็นพิษจากกรดไฮโดรไซยานิกหมดไป (สุรินทร์, 2544) หัวมันสำปะหลังมีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ (จิณณจาร์, 2552) นอกจากนี้ยังแตกต่างกันตามช่วงอายุพืช สภาพแวดล้อม และ

การปฏิบัติดูแลในแปลง Bruijin (1971) พบว่า มันสำปะหลังที่ปลูกในสภาพแล้ง มีกรดไฮโดรไซยานิกสูงกว่าการปลูกในสภาพที่มีความชื้น กรดไฮโดรไซยานิกพบมากในส่วนเปลือกหัว (peel) ใบ (leaf) และยอดอ่อน (apical leaves) Padmaja (1995) รายงานว่า หัวมันสำปะหลังส่วนใหญ่มีปริมาณไซยาไนด์ 15 - 400 มก./กก. หัวสด แต่บางสายพันธุ์มีปริมาณไซยาไนด์สูง 1,300 ถึง 2,000 มก./กก. หัวสด และ Ogunsua (1989) รายงานว่า หัวมันสำปะหลังชนิดหวานมีระดับไซยาไนด์ 10 - 20 มก./กก. หัวสด และหัวมันสำปะหลังชนิดขม มีระดับไซยาไนด์สูงกว่า 60 - 200 มก./กก. หัวสด ซึ่งมาตรฐานความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ กำหนดให้มีปริมาณไซยาไนด์ ในผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 10 มก./กก. น้ำหนักแห้ง (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2557)

ปัจจัยสำคัญในการผลิตมันสำปะหลังเพื่อการบริโภค คือ อายุการเก็บเกี่ยว โดยทั่วไปการเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังควรเก็บเกี่ยวตั้งแต่อายุ 8 - 18 เดือน ขึ้นอยู่กับพันธุ์ ผลผลิตจะสูงขึ้นเมื่อเก็บเกี่ยวที่อายุมากขึ้น (สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน, 2558ก.) หากจำแนกตามอายุการเก็บเกี่ยว สามารถแบ่งมันสำปะหลัง ได้เป็น 2 ประเภท คือ (1) พันธุ์เบา เป็นมันสำปะหลังที่มีหัวแก่พร้อมเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 6 เดือน และไม่สามารถทิ้งไว้เกิน 9 - 11 เดือน ส่วนใหญ่เป็นมันสำปะหลังชนิดหวาน และ (2) พันธุ์หนัก เป็นมันสำปะหลังที่แก่เมื่อมีอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป ส่วนใหญ่เป็นมันสำปะหลังชนิดขม (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2558) ในมันสำปะหลังประเภทพันธุ์เบา เช่น พันธุ์ห่านาที่ เมื่อปลูกในสภาพไร่ ควรเก็บเกี่ยวเมื่ออายุประมาณ 6 - 8 เดือน ไม่ควรเกิน 10 เดือน หากเกินกว่านั้น เนื้อจะมีปริมาณเส้นใยหรือเสี้ยนมากไม่

เหมาะสำหรับการบริโภค (อัจฉรา และจรุงสิทธิ์, 2537) ส่วนมันสำปะหลังประเภทพันธุ์หนักที่อายุมากกว่า 12 เดือน ผลผลิตยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่ถ้าเก็บเกี่ยวที่อายุเกิน 18 เดือน จะมีปริมาณแป้งในหัวสดต่ำ คุณภาพของแป้งไม่ได้มาตรฐาน และมีปริมาณเส้นใยมาก ไม่เป็นที่ต้องการของโรงงานรับซื้อ (อนุชิต และคณะ, 2518)

มันสำปะหลังพันธุ์ห่านาที เป็นพันธุ์ที่นิยมนำมาบริโภคเนื่องจากมีลักษณะเด่น คือ เนื้อร่วนเหมาะสำหรับทำขนม เช่น เชื่อม ย่าง และเมื่อนำไปแปรรูปเป็นเฟรนช์ฟรายส์จะให้เนื้อสัมผัสที่กรอบนอกนุ่มใน ไม่แข็งกระด้าง แต่มีข้อด้อยคือให้ผลผลิตต่ำ (อัจฉรา และจรุงสิทธิ์, 2537) ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร ได้ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังบริโภคในโครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและโครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อบริโภคสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร ตั้งแต่ขั้นตอนการผสมพันธุ์ การคัดเลือกพันธุ์ (การคัดเลือกครั้งที่ 1 และ 2) และการประเมินผลผลิต (การเปรียบเทียบเบื้องต้น การเปรียบเทียบมาตรฐาน การเปรียบเทียบในท้องถิ่น และการเปรียบเทียบในไร่เกษตรกร) จนกระทั่งได้มันสำปะหลังบริโภคสายพันธุ์ก้าวหน้าที่ให้ผลผลิตสูง และมีคุณสมบัติเหมาะสำหรับการบริโภคจากการดำเนินงานในขั้นตอนการเปรียบเทียบในท้องถิ่น จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ CMRE60-03-02 CMRE60-03-13 OMRE60-02-61 และ OMRE60-03-09 (สุวลักษณ์, 2564) และมีแนวโน้มว่าสามารถยืดอายุการเก็บเกี่ยวในสภาพไร่ได้ แต่ยังไม่มียังข้อมูลอายุเก็บเกี่ยว คุณภาพด้านเนื้อสัมผัส และคุณภาพทางประสาทสัมผัส จึงทำการศึกษาผลของสายพันธุ์/พันธุ์มันสำปะหลังเพื่อการบริโภค

ที่ปลูกในสภาพไร่ จำนวน 6 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้แก่ (1) CMRE60-03-02 (2) CMRE60-03-13 (3) OMRE60-02-61 (4) OMRE60-03-09 (5) ห่านาที และ (6) ระยอง2 ที่อายุเก็บเกี่ยว 8 10 และ 12 เดือนต่อผลผลิต เนื้อสัมผัส และรสชาติ เมื่อนำมาผลิตเป็นเฟรนช์ฟรายส์ ซึ่งจะทำให้ได้พันธุ์มันสำปะหลังชนิดหวานเพื่อใช้ในการบริโภคพันธุ์ใหม่ ๆ เพิ่มขึ้น และได้พันธุ์ที่มีความเหมาะสม มีคุณภาพมากที่สุดเพื่อนำมาผลิตเป็นเฟรนช์ฟรายส์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสายพันธุ์/พันธุ์มันสำปะหลังที่อายุเก็บเกี่ยวแตกต่างกัน

การวัดผลผลิตหัวสดและองค์ประกอบผลผลิตสายพันธุ์/พันธุ์มันสำปะหลังที่อายุเก็บเกี่ยวแตกต่างกัน ดำเนินการโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 แปลงทดลอง (experimental fields) ตามระยะเวลาเก็บเกี่ยว 8 10 และ 12 เดือนหลังปลูก โดยแต่ละแปลงทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ จำนวน 4 ซ้ำ มี 6 กรรมวิธี คือ มันสำปะหลัง 6 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้แก่ (1) CMRE60-03-02 (2) CMRE60-03-13 (3) OMRE60-02-61 (4) OMRE60-03-09 (5) ห่านาทีเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ และ (6) ระยอง2 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง อ. เมือง จ. ระยอง ใช้ขนาดแปลงทดลองย่อย (experimental plots) 5 x 8 ม. ปลูก 16 พ.ค. 2565 พร้อมกัน ระยะปลูกระหว่างแถว 100 ซม. ระหว่างต้น 80 ซม. แต่ละแปลงทดลองย่อยปลูก 5 แถว ๆ ละ 10 ต้น ปักท่อนพันธุ์แบบตั้งตรง พื้นที่เก็บเกี่ยว 3 x 6.4 ม. ของ 3 แถวกลาง เว้นแถวริมโดยรอบ กำจัดวัชพืชโดยใช้แรงงานคน และใช้สารกำจัดวัชพืชตามความจำเป็น การใส่ปุ๋ย แบ่งใส่ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยเกรด 18-46-0 และ 0-0-60

โดยใส่รองพื้นก่อนปลูก ครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยเกรด 46-0-0 และ 0-0-60 ในช่วง 3 เดือนหลังปลูก โดยใส่ 2 ข้าง ลำต้นบริเวณชายพุ่มใบแล้วพรวนดินกลับ เก็บเกี่ยว ผลผลิตเมื่ออายุครบ 8 10 และ 12 เดือน ตามลำดับ

2. การวัดผลผลิตหัวสดและองค์ประกอบผลผลิต

- น้ำหนักสดของใบ ตัน และเหง้า โดยชั่ง น้ำหนักสดของใบ ตัน และเหง้า รวมกัน เพื่อนำไป คำนวณดัชนีเก็บเกี่ยวจากสูตร

$$\text{ดัชนีเก็บเกี่ยว (HI)} = \frac{\text{น้ำหนักหัวสด}}{\text{น้ำหนักต้นใบเหง้า} + \text{น้ำหนักหัวสด}}$$

ดัชนีเก็บเกี่ยว เป็นตัวชี้ศักยภาพการให้ผลผลิตในสัดส่วนที่เหมาะสม (สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน, 2558ข.) พันธุ์ที่มีค่าดัชนีเก็บเกี่ยวมากกว่า 0.50 แสดงว่าสามารถสร้างผลผลิตหัวสดได้มากกว่า 50% ของผลผลิตทั้งหมด (ศุภชัย และคณะ, 2546)

- ความสูงทรงต้น แสดงถึงการเจริญเติบโต และปริมาณของท่อนพันธุ์ที่จะขยายได้ เป็นสิ่งสำคัญของพืชที่ขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนของลำต้น (สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน, 2558ข.; ศุภชัย และคณะ, 2546) โดยสุ่มวัดในแนวตั้งฉากจากโคนต้นระดับผิวดินถึงยอดใบบนสุดที่คลี่จำนวน 10 ต้น

- ผลผลิตหัวสด ชั่งน้ำหนักหัวสดในพื้นที่เก็บเกี่ยว 3 x 6.4 ม. หลังจากการขุด และสับหัวมันสำปะหลังออกจากเหง้าแล้ว และคำนวณเป็นน้ำหนักผลผลิตต่อไร่

- ปริมาณแป้งในหัวสด โดยสุ่มหัวสดมันสำปะหลังในพื้นที่เก็บเกี่ยว สับหัวมันสำปะหลังเป็นท่อนยาวประมาณ 7 ซม. ใช้ตัวอย่างหัวสด 5 กก./แปลงย่อย วัดด้วยเครื่องชั่ง Reimann scale

- ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solid, TSS) วัดโดยใช้เครื่อง pocket

refractometer ยี่ห้อ ATAGO รุ่น PAL-1 เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดค่าความเข้มข้นของน้ำตาลในสารต่าง ๆ อ่านค่าเป็นองศาบริกซ์ (°Bx)

- ปริมาณไซยาไนด์ วัดโดยวิธี rapid evaluation ของ Williams and Edwards (1980) โดยตัดขวางที่ตำแหน่งกลางหัวมันสำปะหลัง จากนั้นตัดตรงส่วนระหว่างเปลือกกับจุดกึ่งกลางชั้นพาเรนไคมาให้เป็น ทรงสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาดประมาณ 1 x 1 x 2.5 ซม. ใส่ในหลอดทดลอง ตัดกระดาษ Whatman เบอร์ 1 ขนาด 1 x 6 ซม. นำกระดาษ Whatman แขนในสารละลาย alkaline picrate จากนั้นผึ่งให้หมาด หยดสารทูลอิน 5 หยดลงในหลอดทดลอง นำกระดาษ Whatman ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ 24 ชม. จากนั้นเทียบสีกระดาษ Whatman กับแผ่นเทียบสี

3. การเตรียมตัวอย่างเฟรนช์ฟรายส์มันสำปะหลัง

นำหัวมันสำปะหลังบริโภคทั้ง 6 สายพันธุ์/พันธุ์ ที่อายุเก็บเกี่ยว 8 10 และ 12 เดือน มาปอกเปลือก ล้างน้ำให้สะอาด หั่นเป็นแท่งยาว 10 ซม.หนา 1.5 ซม. ล้างแป้งที่เคลือบอยู่ด้านนอกออกด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง พักให้สะเด็ดน้ำพอหมาดทอดในน้ำมันปาล์มด้วยหม้อทอดไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 160° ซ. เป็นเวลา 5 นาที นำเฟรนช์ฟรายส์มันสำปะหลังที่ทอดแล้ว ซับน้ำมันให้แห้งและพักให้เย็น และนำไปแช่ที่ตู้แช่แข็งนาน 24 ชม. ทอดซ้ำอีกครั้งในน้ำมันปาล์มด้วยหม้อทอดไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 160° ซ. เป็นเวลา 5 นาที นำขึ้นมาสะเด็ดน้ำมัน

4. การวัดคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสของเฟรนช์ฟรายส์มันสำปะหลัง

คุณภาพทางกายภาพของเฟรนช์ฟรายส์มันสำปะหลัง ได้แก่ ความแข็ง (hardness) วัดด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (texture analyzer) ยี่ห้อ Stable

Micro Systems รุ่น TA. XT PlusC ทำการทดสอบ ลักษณะของแรงกด (compression) ใช้หัว P/2 (2 mm diameter cylinder probe) โดยใช้ pre-test speed, test speed และ post-test speed ที่ 1 2 และ 10 มม./วินาที ตามลำดับ และ distance 15 มม. บันทึกค่าแรงสูงสุดในแต่ละซ้ำของตัวอย่าง คำนวณหาค่าเฉลี่ย วางแผนการทดลองแบบสุ่มใน บล็อกสมบูรณ์ จำนวน 3 ซ้ำ

5. การวัดคุณภาพทางประสาทสัมผัสของ เฟรนช์ฟรายส์มันสำปะหลัง

คุณภาพทางประสาทสัมผัสของเฟรนช์ฟรายส์ มันสำปะหลัง (คุณภาพการชิม) ทดสอบคุณภาพ การชิมโดยบุคคลากรที่ไม่ผ่านการฝึกฝนของศูนย์วิจัย พืชไร่ระยอง จำนวน 25 คน ในด้านลักษณะที่ปรากฏ สี รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยใช้ วิธี 5-points hedonic scale เป็นการให้คะแนน ความชอบต่อผลิตภัณฑ์แต่ละด้าน โดย 1 คะแนน หมายถึง ชอบน้อยที่สุด 2 คะแนน หมายถึง ชอบ น้อย 3 คะแนน หมายถึง ชอบปานกลาง 4 คะแนน หมายถึง ชอบมาก และ 5 คะแนน หมายถึง ชอบ มากที่สุด คำนวณหาค่าเฉลี่ย วางแผนการทดลอง แบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ จำนวน 25 ซ้ำ

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดโดยใช้วิธี analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่าง ของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ที่อายุเก็บเกี่ยว 8 เดือน

ผลผลิตหัวสดและองค์ประกอบผลผลิต
ผลผลิตหัวสด พบว่า สายพันธุ์/พันธุ์ที่นำมาทดสอบ

ให้ผลผลิตหัวสดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอยู่ในช่วง 2,052 - 3,150 กก./ไร่ (Table 1)

ปริมาณแป้งในหัวสด พบว่า สายพันธุ์ OMRE60-03-09 มีปริมาณแป้งในหัวสดสูงสุด 29.6% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกสายพันธุ์ /พันธุ์ที่นำมาทดสอบ รองลงมาคือ สายพันธุ์ OMRE60-02-61 พันธุ์ห่านาที่ และสายพันธุ์ CMRE60-03-02 ในขณะที่พันธุ์ระยอง 2 มี ปริมาณแป้งในหัวสดต่ำสุด 17.1% (Table 1)

ดัชนีเก็บเกี่ยว พบว่า พันธุ์ระยอง 2 และ สายพันธุ์ CMRE60-03-13 มีดัชนีเก็บเกี่ยวสูงสุด 0.63 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกสายพันธุ์/พันธุ์ที่นำมาทดสอบ รองลงมาคือ สายพันธุ์ OMRE60-02-61 และ CMRE60-03-02 ในขณะที่ พันธุ์ห่านาที่มีดัชนีเก็บเกี่ยวต่ำสุด (Table 1)

ความสูงทรงต้น พบว่า พันธุ์ห่านาที่มีความสูง ทรงต้นสูงสุด 220 ซม. ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติกับสายพันธุ์ OMRE60-03-09 และ OMRE60-02-61 (Table 1)

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ พบว่า สายพันธุ์/พันธุ์ที่นำมาทดสอบมีปริมาณของแข็งที่ ละลายน้ำได้ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอยู่ในช่วง 6.43 - 7.40° Bx (Table 2)

ปริมาณโซยาไนต์ พบว่า พันธุ์ห่านาที่มี ปริมาณโซยาไนต์น้อยที่สุด 70 ไมโครกรัม/ก. แต่ไม่ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสายพันธุ์ OMRE60-03-09 ที่มีปริมาณโซยาไนต์ 100 ไมโครกรัม/ก. ส่วนสายพันธุ์ OMRE60-02-61 มี ปริมาณโซยาไนต์สูงที่สุดถึง 500 ไมโครกรัม/ก. (Table 2)

คุณภาพด้านเนื้อสัมผัส พิจารณา ด้าน ความแข็ง โดยผลิตภัณฑ์ที่มีความกรอบและความ นุ่มมากจะมีค่าความแข็งน้อย พบว่า สายพันธุ์

OMRE60-02-61 มีความแข็งแรงน้อยสุด 388.60 ก. ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสายพันธุ์ CMRE60-03-13 และพันธุ์ห่านาที่ ที่มีค่าความแข็งแรง 420.58 และ 458.69 ก. ตามลำดับ (Table 2)

คุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้านลักษณะที่ปรากฏ พันธุ์ระยอง2 ได้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสายพันธุ์ OMRE60-02-61

ด้านสี พบว่า พันธุ์ระยอง2 ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุดแตกต่างทางสถิติกับทุกสายพันธุ์/พันธุ์ที่นำมาทดสอบ รองลงมาคือ สายพันธุ์ OMRE60-02-61 ด้านรสชาติ พบว่าสายพันธุ์ OMRE60-02-61 ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสายพันธุ์ CMRE60-03-13 ด้านเนื้อสัมผัส พบว่า สายพันธุ์ OMRE60-02-61

Table 1 Fresh root yield, starch content, harvesting index (HI) and plant height of cassava (2017 Hybrids) harvested at 8, 10 and 12 months after planting at Rayong Field Crops Research Center in year 2022/2023

Months after planting	Varieties/ Lines	Fresh root yield (kg/rai)	Starch content (%)	HI	Plant height (cm)	Relative to check (Yield)	
						HANATEE (%)	Rayong2 (%)
8	CMRE60-03-02	2,998	24.0 b	0.55 b	197 b	105	146
	CMRE60-03-13	2,688	20.2 c	0.63 a	201 b	94	131
	OMRE60-02-61	2,877	25.0 b	0.57 b	204 ab	101	140
	OMRE60-03-09	3,150	29.6 a	0.55 bc	206 ab	110	154
	HANATEE	2,858	24.5 b	0.51 c	220 a	100	139
	Rayong2	2,052	17.1 d	0.63 a	187 b	72	100
	Mean	2,771	23.4	0.57	202	-	-
	CV (%)	17.0	8.7	4.3	5.8	-	-
10	CMRE60-03-02	2,433 ab	20.4 b	0.53 abc	241 a	109	177
	CMRE60-03-13	2,929 ab	20.3 b	0.59 a	251 a	131	213
	OMRE60-02-61	2,373 b	19.1 b	0.48 c	239 a	106	173
	OMRE60-03-09	3,140 a	26.8 a	0.53 abc	263 a	141	228
	HANATEE	2,229 b	22.0 b	0.51 bc	238 a	100	162
	Rayong2	1,375 c	14.9 c	0.56 ab	195 b	62	100
	Mean	2,413	20.6	0.53	238	-	-
	CV (%)	19.3	10.0	6.7	9.2	-	-
12	CMRE60-03-02	2,250 b	11.7 c	0.53 abc	229 b	87	164
	CMRE60-03-13	2,117 b	12.9 bc	0.54 ab	228 b	82	154
	OMRE60-02-61	2,650 b	12.4 bc	0.57 a	187 c	102	193
	OMRE60-03-09	3,654 a	19.8 a	0.49 bc	273 a	141	266
	HANATEE	2,590 b	14.5 b	0.46 c	278 a	100	189
	Rayong2	1,373 c	7.7 d	0.57 a	161 c	53	100
	Mean	2,451	13.1	0.52	226	-	-
	CV (%)	13.8	11.9	8.2	10.6	-	-

Means in the same column followed by a common type of letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Table 2 Total soluble solid (TSS), hydrocyanic acid (HCN) and hardness of cassava for processing to French fries harvested at 8, 10 and 12 months after planting at Rayong Field Crops Research Center in year 2022/2023

Varieties/Lines	TSS (°Bx)			HCN (ppm)			Hardness (g)		
	8 MAP	10 MAP	12 MAP	8 MAP	10 MAP	12 MAP	8 MAP	10 MAP	12 MAP
CMRE60-03-02	6.75	7.23	4.80 c	275 b	133 a	100	704.22 d	669.97 d	611.82 d
CMRE60-03-13	6.90	7.23	5.55 abc	375 bc	100 a	58	420.85 ab	419.50 bc	440.94 ab
OMRE60-02-61	7.35	7.80	5.88 a	500 c	267 b	150	388.60 a	379.97 ab	489.84 abc
OMRE60-03-09	7.40	7.30	5.67 ab	100 a	167 a	58	618.08 c	400.24 bc	524.79 bcd
HANATEE	6.75	7.68	4.95 bc	70 a	117 a	50	458.69 ab	296.62 a	402.26 a
Rayong2	6.43	6.80	4.85 bc	375 bc	267 b	200	483.35 b	484.27 c	565.15 cd
Mean	6.93	7.34	5.28	283	175	-	512.30	441.27	505.80
CV (%)	12.1	11.5	9.8	30.1	23.5	-	11.3	13.1	14.5

Means in the same column followed by a common type of letter are not significantly different at the 5% level by DMRT;
MAP= months after planting

Table 3 Hedonic score of sensory tests of cassava for processing to French fries harvested at 8, 10 and 12 months after planting at Rayong Field Crops Research Center in year 2022/2023

Months after planting	Varieties/Lines	Appearance	Color	Taste	Texture	Overall acceptability
8	CMRE60-03-02	3.08 c	2.80 d	2.32 c	2.12 c	2.68 c
	CMRE60-03-13	3.32 bc	3.04 cd	3.72 a	3.56 ab	3.60 b
	OMRE60-02-61	3.68 ab	3.60 b	3.92 a	3.88 a	4.08 a
	OMRE60-03-09	3.29 bc	3.25 bc	2.50 c	2.41 c	2.76 c
	HANATEE	3.40 bc	2.96 cd	3.12 b	3.32 b	3.24 b
	Rayong2	4.08 a	4.32 a	3.08 b	3.12 b	3.32 b
	Mean	3.48	3.33	3.11	3.07	3.28
	CV (%)	23.6	20.3	25.3	29.9	23.0
10	CMRE60-03-02	3.00	3.00 b	2.64 bc	2.52 b	2.68 bc
	CMRE60-03-13	3.40	3.36 ab	3.44 a	3.36 a	3.36 a
	OMRE60-02-61	3.04	3.04 b	2.80 b	2.56 b	2.80 b
	OMRE60-03-09	3.20	3.20 b	2.64 bc	2.36 b	2.72 bc
	HANATEE	3.24	3.08 b	3.32 a	3.24 a	3.48 a
	Rayong2	3.16	3.72 a	2.32 c	2.28 b	2.36 c
	Mean	3.17	3.23	2.86	2.72	2.90
	CV (%)	23.6	22.8	27.8	28.8	23.6
12	CMRE60-03-02	2.92 b	3.04	2.76 b	2.60 d	2.64 b
	CMRE60-03-13	3.28 ab	3.40	3.40 a	3.28 ab	3.40 a
	OMRE60-02-61	3.24 b	3.16	3.08 ab	3.08 abc	3.08 ab
	OMRE60-03-09	3.32 ab	3.28	2.76 b	2.84 bcd	2.96 b
	HANATEE	3.68 a	3.56	3.28 a	3.36 a	3.48 a
	Rayong2	3.04 b	3.12	2.80 b	2.68 cd	2.84 b
	Mean	3.25	3.26	3.01	2.97	3.07
	CV (%)	22.1	21.1	24.1	25.5	24.3

Means in the same column followed by a common type of letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด และด้านความชอบโดยรวม พบว่า สายพันธุ์ OMRE60-02-61 ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด แตกต่างทางสถิติกับทุกสายพันธุ์/พันธุ์ที่นำมาทดสอบ (Table 3)

2. ที่อายุเก็บเกี่ยว 10 เดือน

ผลผลิตหัวสดและองค์ประกอบผลผลิต
ผลผลิตหัวสด พบว่า สายพันธุ์ OMRE60-03-09 ให้ผลผลิตหัวสดสูงสุด 3,140 กก./ไร่ รองลงมา คือ CMRE60-03-13 และ CMRE60-03-02 ในขณะที่พันธุ์ห่านาที่ และพันธุ์ระยอง2 ที่ให้ผลผลิตหัวสดน้อยกว่า คือ 2,229 และ 1,375 กก./ไร่ ตามลำดับ (Table 1)

ปริมาณแป้งในหัวสด พบว่า สายพันธุ์ OMRE60-03-09 มีปริมาณแป้งในหัวสดสูงสุด 26.8% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกสายพันธุ์/พันธุ์ที่นำมาทดสอบ รองลงมาคือพันธุ์ห่านาที่ CMRE60-03-02 CMRE60-03-13 และ OMRE60-02-61 มีปริมาณแป้งในหัวสด 22.0 20.4 20.3 และ 19.1% ตามลำดับ (Table 1)

ดัชนีเก็บเกี่ยว พบว่า สายพันธุ์ CMRE60-03-13 มีดัชนีเก็บเกี่ยวสูงสุด 0.59 ในขณะที่พันธุ์ห่านาที่มีดัชนีเก็บเกี่ยวค่อนข้างต่ำ ส่วนสายพันธุ์ OMRE60-02-61 มีดัชนีเก็บเกี่ยวต่ำสุด 0.48 (Table 1)

ความสูงทรงต้น พันธุ์ระยอง2 มีความสูงทรงต้นต่ำสุด 195 ซม. ส่วนพันธุ์/สายพันธุ์อื่น ๆ มีความสูงทรงต้นไม่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 238 - 263 ซม. (Table 1)

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ พบว่า สายพันธุ์/พันธุ์ที่นำมาทดสอบมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอยู่ในช่วง 6.80 - 7.80° Bx (Table 2)

ปริมาณโซลานินด์ พันธุ์/สายพันธุ์ CMRE60-03-13 ห่านาที่ CMRE60-03-02 และ OMRE60-03-09 มีปริมาณโซลานินด์น้อยไม่แตกต่างกันคือ 100 117 133 และ 167 ไมโครกรัม/ก. ตามลำดับ โดยพันธุ์ระยอง2 มีปริมาณโซลานินด์มากที่สุด 267 ไมโครกรัม/ก. (Table 2)

คุณภาพด้านเนื้อสัมผัส พบว่า พันธุ์ห่านาที่มีความแข็งน้อยที่สุด 296.62 ก. แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสายพันธุ์ OMRE60-02-61 ที่มีความแข็ง 379.97 ก. ส่วนสายพันธุ์ OMRE60-03-09 และ CMRE60-03-13 มีความแข็งมากกว่า คือ 400.24 และ 419.50 ก. ตามลำดับ (Table 2)

คุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้านลักษณะที่ปรากฏ พบว่า สายพันธุ์/พันธุ์ที่นำมาทดสอบได้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้านสี พบว่า ระยอง2 ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ CMRE60-03-13 ด้านรสชาติ พบว่า สายพันธุ์ CMRE60-03-13 ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับพันธุ์ห่านาที่ ด้านเนื้อสัมผัส พบว่า สายพันธุ์ CMRE60-03-13 ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับพันธุ์ห่านาที่ และด้านความชอบโดยรวม พบว่า พันธุ์ห่านาที่ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสายพันธุ์ CMRE60-03-13 (Table 3)

3. ที่อายุเก็บเกี่ยว 12 เดือน

ผลผลิตหัวสดและองค์ประกอบผลผลิต
ผลผลิตหัวสด พบว่า สายพันธุ์ OMRE60-03-09 ให้

ผลผลิตหัวสดสูงสุด 3,654 กก./ไร่ รองลงมา คือ OMRE60-02-61 ให้ผลผลิตหัวสด 2,650 กก./ไร่ ในขณะที่พันธุ์ห่านาที่ให้ผลผลิตหัวสด 2,590 กก./ไร่ ตามลำดับ (Table 1)

ปริมาณแป้งในหัวสด พบว่า สายพันธุ์ OMRE60-03-09 มีปริมาณแป้งในหัวสดสูงสุด 19.8% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกสายพันธุ์/พันธุ์ที่นำมาทดสอบ รองลงมาคือ ห่านาที่ CMRE60-03-13 และ OMRE60-02-61 มีปริมาณแป้งในหัวสด 14.5 12.9 และ 12.4% ตามลำดับ (Table 1)

ดัชนีเก็บเกี่ยว พบว่า สายพันธุ์ OMRE60-02-61 และระยอง2 มีดัชนีเก็บเกี่ยวสูงสุด 0.57 ในขณะที่พันธุ์ห่านาที่มีดัชนีเก็บเกี่ยวต่ำสุด 0.46 (Table 1)

ความสูงทรงต้น พบว่า พันธุ์ห่านาที่ และสายพันธุ์ OMRE60-03-09 มีความสูงทรงต้นสูงสุด 278 และ 273 ซม. ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์ระยอง 2 และ สายพันธุ์ OMRE60-02-61 มีความสูงทรงต้นต่ำสุด 161 และ 187 ซม. ตามลำดับ (Table 1)

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ พบว่า สายพันธุ์ OMRE60-02-61 มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้สูงสุด 5.88° Bx ในขณะที่พันธุ์ห่านาที่และระยอง2 มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 4.95 และ 4.85° Bx ตามลำดับ (Table 2)

ปริมาณโซลานิน พบว่า สายพันธุ์/พันธุ์ที่นำมาทดสอบมีปริมาณโซลานินไม่แตกต่างทางสถิติ โดยอยู่ในช่วง 50 – 200 ไมโครกรัม/ก. โดยพันธุ์ห่านาที่ มีปริมาณโซลานินน้อยที่สุด 50 ไมโครกรัม/ก. ในขณะที่ระยอง2 ที่มีปริมาณโซลานิน 200 ไมโครกรัม/ก. (Table 2)

คุณภาพด้านเนื้อสัมผัส พบว่า พันธุ์ห่านาที่มีความแข็งน้อยที่สุด 402.26 ก. ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสายพันธุ์ CMRE60-03-13

และ OMRE60-02-61 ที่มีความแข็ง 440.94 และ 489.84 ก. ตามลำดับ (Table 2)

คุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้านลักษณะที่ปรากฏ พบว่า พันธุ์ห่านาที่ ได้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ OMRE60-03-09 และ CMRE60-03-13 ด้านสี พบว่า สายพันธุ์/พันธุ์ที่นำมาทดสอบได้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้านรสชาติ พบว่า สายพันธุ์ CMRE60-03-13 ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับพันธุ์ห่านาที่ และสายพันธุ์ OMRE60-02-61 ด้านเนื้อสัมผัส พบว่า พันธุ์ห่านาที่ ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสายพันธุ์ CMRE60-03-13 และ OMRE60-02-61 และด้านความชอบโดยรวม พบว่า พันธุ์ห่านาที่ ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสายพันธุ์ CMRE60-03-13 และ OMRE60-02-61 (Table 3)

4. มั่นสำปะหลังที่เหมาะสมในการผลิตเฟรนช์ฟรายส์

อายุเก็บเกี่ยวมีผลต่อผลผลิตและคุณภาพเนื้อสัมผัส และรสชาติของเฟรนช์ฟรายส์ มั่นสำปะหลัง โดยพันธุ์ และระยะเวลาการเก็บเกี่ยวเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการให้ผลผลิตมั่นสำปะหลัง มั่นสำปะหลังบริโภคแต่ละสายพันธุ์/พันธุ์ให้ผลผลิตสูงที่อายุเก็บเกี่ยวต่างกัน และเมื่อพิจารณาที่อายุเก็บเกี่ยว 8 10 และ 12 เดือน พบว่า มั่นสำปะหลังให้ผลผลิตต่างกัน สอดคล้องกับไชยรัตน์ และคณะ (2539) ที่รายงานว่า พันธุ์และอายุการเก็บเกี่ยวมีผลต่อผลผลิต ส่วนปริมาณน้ำฝนที่มั่นสำปะหลังได้รับ ถ้าได้รับมากผลผลิตจะเพิ่มมากขึ้นแต่ถ้าได้รับน้อย

ผลผลิตจะน้อย (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2564) จากข้อมูลปริมาณน้ำฝนของพื้นที่ทดลอง พบว่า ที่อายุเก็บเกี่ยว 8 10 และ 12 เดือน มีปริมาณน้ำฝนรวม 1,703 1,755 และ 1,933 มม. ตามลำดับ การกระจายน้ำฝนยังมีความสำคัญต่อผลผลิตมากกว่าปริมาณน้ำฝนรวม (วัณนะ และคณะ, 2528) การเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังบริเวณทั้ง 3 ช่วงอายุ พบว่า ได้รับปริมาณน้ำฝนใกล้เคียงกัน และได้รับปริมาณฝนมากช่วงอายุ 1 - 6 เดือนหลังปลูก (เดือน มิ.ย. ถึง พ.ย.) ซึ่งเป็นช่วงที่มันสำปะหลังมีการเจริญเติบโตทางลำต้น มีการพัฒนารากส่วนหนึ่งไปเป็นรากสะสมอาหาร และขยายขนาดรากสะสมอาหาร (สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน, 2558ก.) แต่หลังจากนั้นในช่วงเดือน ธ.ค. ถึง พ.ค. พบว่า มีปริมาณฝนน้อย ทำให้ผลผลิตที่เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 10 และ 12 เดือน ใกล้เคียงกับการเก็บเกี่ยวที่อายุ 8 เดือน นอกจากนี้ปริมาณน้ำฝนยังมีผลกับปริมาณแป้งในหัวสดของมันสำปะหลังทั้ง 6 สายพันธุ์/พันธุ์ที่นำมาทดสอบอีกด้วย โดยพบว่า เมื่อเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังที่อายุ 8 และ 10 เดือน ตรงกับเดือน ม.ค. และ มี.ค. 2566 ซึ่งเป็นช่วงฤดูแล้ง มันสำปะหลังทั้ง 6 สายพันธุ์/พันธุ์ มีปริมาณแป้งในหัวสดสูงกว่าการเก็บเกี่ยวที่อายุ 12 เดือน ตรงกับเดือน พ.ค. 2566 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน สอดคล้องกับมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2564) ที่รายงานว่า ปริมาณแป้งในหัวมันสำปะหลังจะสูงสุดเมื่อเก็บเกี่ยวเดือน พ.ย. ถึง มี.ค. และหลังจากเดือน เม.ย. ปริมาณแป้งในหัวสดจะลดลงเรื่อย ๆ และต่ำสุดในเดือน ส.ค. ถึง ก.ย. ซึ่งเป็นช่วงที่ฝนตกหนัก

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ในหัวมันสำปะหลังทั้ง 6 สายพันธุ์/พันธุ์ ที่นำมาทดสอบก็ขึ้นอยู่กับอายุเก็บเกี่ยวโดย เมื่อเก็บเกี่ยว

มันสำปะหลังที่อายุ 8 เดือน มันสำปะหลังทั้ง 6 สายพันธุ์/พันธุ์ มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เฉลี่ย 6.93°Bx เมื่อเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังที่อายุ 10 เดือน มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เฉลี่ยสูงสุด 7.34°Bx และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้จะลดลง เมื่อเก็บเกี่ยวที่อายุ 12 เดือน สอดคล้องกับ Reis et al. (2021) ที่รายงานว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด มีค่าสูงสุดเมื่อเก็บเกี่ยวที่ 9 เดือน และจะลดลงเมื่ออายุเก็บเกี่ยวเพิ่มขึ้น ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญที่บ่งชี้การเกิดสีและรสชาติเมื่อได้รับความร้อน ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของเฟรนช์ฟรายส์ ทำให้มีรสชาติดีและสีสนับรับประทาน

ปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลังทั้ง 6 สายพันธุ์/พันธุ์ ที่นำมาทดสอบจะลดลงเมื่ออายุมันสำปะหลังเพิ่มขึ้น ซึ่งพบว่า เมื่อเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังที่อายุ 8 10 และ 12 เดือน มันสำปะหลังทั้ง 6 พันธุ์/สายพันธุ์ มีปริมาณไซยาไนด์เฉลี่ย 283 175 และ 103 ไมโครกรัม/ก. ตามลำดับ สอดคล้องกับ Reis et al. (2021) ที่พบว่า ปริมาณไซยาไนด์ที่อายุเก็บเกี่ยว 15 เดือน ต่ำกว่าที่อายุเก็บเกี่ยว 9 และ 12 เดือน และเมื่อพิจารณาร่วมกับฤดูเก็บเกี่ยว พบว่า การเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังที่อายุ 8 และ 10 เดือน ตรงกับเดือน ม.ค. และ มี.ค. 2566 ซึ่งเป็นช่วงฤดูแล้ง มันสำปะหลังทั้ง 6 พันธุ์/สายพันธุ์ มีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่าการเก็บเกี่ยวที่อายุ 12 เดือน ตรงกับเดือนพฤษภาคม 2566 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน สอดคล้องกับจิณณจาร์ (2552) พบว่า ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลังจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ช่วงอายุของมันสำปะหลัง การปฏิบัติดูแลในแปลง และสภาพแวดล้อม โดยมันสำปะหลังที่ปลูกในสภาพแล้งมีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่า

ปรารธนา และคณะ (2564) ได้ศึกษาปริมาณไฮยาไนด์ในมันสำปะหลังพันธุ์พิจิตร 2 ที่นำมาผลิตเฟรนช์ฟรายส์ พบไฮยาไนด์ในเฟรนช์ฟรายส์แบบสด แต่ไม่พบในเฟรนช์ฟรายส์แบบอบและแบบทอด เนื่องจากความร้อนจะทำลายเอนไซม์ลินามาเรส ทำให้ไม่เกิดกรดไฮโดรไลติกซึ่งเป็นพิษ ดังนั้นการให้ความร้อนกับหัวมันสำปะหลังเป็นสิ่งสำคัญในการทำลายพิษที่เกิดจากไฮยาไนด์ในหัวมันสด โดยความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 72° ซ. จะทำให้เอนไซม์ลินามาเรสเสียสภาพ นอกจากนี้กรดไฮโดรไลติกที่เกิดขึ้นจะระเหยออกไปที่ความร้อนสูง ส่วนสารไฮยาโนจินิกกลูโคไซด์จะสลายตัวได้ดีมากที่อุณหภูมิ 150° ซ. ฉะนั้นเมื่อนำหัวมันสำปะหลังมาทำให้ร้อนที่อุณหภูมิเหมาะสมความเป็นพิษของไฮยาไนด์จะหมดไป (สุรินทร์, 2544)

ด้านเนื้อสัมผัสเฟรนช์ฟรายส์จากมันสำปะหลังทั้ง 6 สายพันธุ์/พันธุ์ ที่นำมาทดสอบมีความแข็งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยเมื่อพิจารณาที่อายุเก็บเกี่ยวอายุ 8 10 และ 12 เดือน พบว่าเฟรนช์ฟรายส์จากมันสำปะหลังทั้ง 6 พันธุ์/สายพันธุ์มีความแข็งแรง 414.27 - 512.30 ก. ไกล่เคียงกับการทดลองของ Herawati and Kamsiati (2019) ที่พบว่า เฟรนช์ฟรายส์จากมันสำปะหลังมีค่าความแข็ง 511.83 ก.

ดังนั้น เมื่อพิจารณาผลผลิต องค์ประกอบผลผลิต เนื้อสัมผัส รสชาติ และคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี ของมันสำปะหลังทั้ง 6 พันธุ์/สายพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวอายุ 8 10 และ 12 เดือน สามารถสรุปได้ว่า สายพันธุ์ OMRE60-02-61 ที่อายุการเก็บเกี่ยว 8 เดือน เหมาะสำหรับแปรรูปเป็นเฟรนช์ฟรายส์มากที่สุด เนื่องจากมีคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสค่อนข้างสูงกว่าพันธุ์ห่านาที่ และได้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะที่

ปรากฏ สี รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมสูงกว่าพันธุ์ห่านาที่ทุกด้าน จึงดีกว่าพันธุ์ห่านาที่ แต่มีข้อเสียตรงที่มีปริมาณไฮยาไนด์ในหัวสดค่อนข้างสูง ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการใช้ความร้อนอุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิตเป็นเฟรนช์ฟรายส์เพื่อทำลายกลไกการสร้างสารไฮยาไนด์ ทำให้เฟรนช์ฟรายส์ที่ได้ปราศจากสารไฮยาไนด์ ส่วนสายพันธุ์ CMRE60-03-13 และ OMRE60-02-61 ที่เก็บเกี่ยวที่อายุ 10 และ 12 เดือน ตามลำดับ สามารถใช้ผลิตเฟรนช์ฟรายส์ได้ แต่มีคุณภาพน้อยกว่าหรือเท่ากับพันธุ์ห่านาที่

สรุปผลการทดลอง

การเปรียบเทียบผลผลิต เนื้อสัมผัส รสชาติ และคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของมันสำปะหลัง 6 สายพันธุ์/พันธุ์ ที่อายุเก็บเกี่ยวที่ต่างกันเพื่อนำไปแปรรูปเป็นเฟรนช์ฟรายส์ พบว่า สายพันธุ์ OMRE60-02-61 เหมาะสำหรับเก็บเกี่ยวที่อายุ 8 และ 12 เดือน โดยให้ผลผลิตหัวสด 2,877 และ 2,650 กก./ไร่ ตามลำดับ ไกล่เคียงกับพันธุ์ห่านาที่ โดยเฉพาะที่อายุ 8 เดือนมีคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสค่อนข้างสูงกว่าพันธุ์ห่านาที่ และได้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้าน สี รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมสูงกว่าพันธุ์ห่านาที่ทุกด้าน ส่วนสายพันธุ์ CMRE60-03-13 เหมาะสำหรับเก็บเกี่ยวที่อายุ 10 เดือน ให้ผลผลิตหัวสด 2,929 กก./ไร่ สูงกว่าพันธุ์ห่านาที่ 31% ได้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสทุกด้านเทียบเท่าพันธุ์ห่านาที่ แต่มีคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสคือความกรอบและความนุ่มน้อยกว่าพันธุ์ห่านาที่ ดังนั้น มันสำปะหลังสายพันธุ์ OMRE60-02-61 ที่เก็บเกี่ยวอายุ 8 เดือน จึงเหมาะในการผลิตเป็นเฟรนช์ฟรายส์มากที่สุดเนื่องจากมีคุณภาพหลายด้านสูงกว่าพันธุ์ห่านาที่

เอกสารอ้างอิง

- จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข. 2552. คุณสมบัติและประโยชน์ของหัวและแป้งมันสำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร. 80 หน้า.
- ไชยรัตน์ เพ็ชรลาณวัฒน์ กล้านรงค์ ศรีรอด วิจารย์ วิชุกิจเจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์ วุฒิสักดิ์ พรพรหมประทาน และวัฒนะ วัฒนานนท์. 2539. ผลของพันธุ์และอายุการเก็บเกี่ยวที่มีต่อผลผลิต ความหนืด และลักษณะของสารละลายแป้ง. วารสารวิชาการเกษตร. 14(1): 11-17.
- ปรารถนา เงินลาด อริสา นนทะโคตร และมณฑา หมีไพรพุกฤษ. 2564. ปริมาณไซยาไนด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเฟรนช์ฟรายส์มันสำปะหลังพันธุ์พิจิตร 2. หน้า 889-895. ใน: รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติสำหรับนักศึกษา ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร. 22 กุมภาพันธ์ 2564.
- มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2564. การเก็บเกี่ยวมันสำปะหลัง. แหล่งข้อมูล: https://cassava.engku.ac.th/wiki/index.php?title=การเก็บเกี่ยวมันสำปะหลัง & mobileaction=toggle_view_desktop. สืบค้น : 31 ตุลาคม 2566.
- เมดไทย. 2563. มันสำปะหลัง สรรพคุณและประโยชน์ของมันสำปะหลัง 12 ข้อ !. แหล่งข้อมูล: <https://medthai.com/มันสำปะหลัง/>. สืบค้น: 27 กันยายน 2566.
- วัฒนะ วัฒนานนท์ ชาญ ธิพร โสภณ สีนุประมา และ Kazuo Kawano. 2528. ผลผลิตของมันสำปะหลังที่เก็บเกี่ยวอายุสั้นในสภาพปริมาณน้ำฝนต่างกัน. วารสารวิชาการเกษตร. 3: 139-148.
- ศุภชัย สารกาญจน์ อัจฉรา ลีเมศิลา และวัฒนะ วัฒนานนท์. 2546. เปรียบเทียบแป้งมันสำปะหลัง (ปลายฝน) ใน ผลงานฉบับเต็มขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิชาการเกษตร 7ว.. สถาบันวิจัยพืชไร่. 45 หน้า.
- สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน. 2558ก. การเพิ่มประสิทธิภาพมันสำปะหลัง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 82 หน้า.
- สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน. 2558ข. การบันทึกข้อมูลมันสำปะหลัง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 48 หน้า.
- สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2558. มันสำปะหลัง: การจำแนกชนิดและสายพันธุ์มันสำปะหลัง. แหล่งข้อมูล: <https://www3.rdi.ku.ac.th/?p=18052>. สืบค้น: 24 กันยายน 2566.
- สุรินทร์ ตั้งมั่นคงวรกุล. 2544. การศึกษาการสลายตัวของไซยาไนด์จากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- สุวลักษณ์ อะมะวัลย์. 2564. โครงการวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต. รายงานโครงการวิจัย. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 250-300.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2557. มาตรฐานโคเด็กซ์. แหล่งข้อมูล: <https://www.foodfiti.com/มาตรฐานโคเด็กซ์/5492b062fc1a14a01d0004ed>. สืบค้น: 10 มกราคม 2567.
- อนุชิต ทองกล้า นเรศ สอนหลักทรัพย์ ชาญ ธิพร และ โสภณ สีนุประมา. 2518. ถอดปลุกและอายุเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมของมันสำปะหลัง. ใน: รายงานผลการทดลองมันสำปะหลัง พ.ศ. 2518. สาขาพืชหัว กรมวิชาการเกษตร.
- อัจฉรา ลีเมศิลา และจรัสฤทธิ์ ลีเมศิลา. 2537. ชนิดและพันธุ์มันสำปะหลัง. ใน: เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.
- โอภาส บุญเส็ง. 2549. มันสำปะหลังทำเฟรนช์ฟราย. กสิกร. 79(1): 24-28.
- Bruijij, G.H. 1971. Etude du character cyanoglucosides, linamarin and lotaustralin in higher plants. Phytochemistry. 4: 127-1 31.
- Herawati, H. and E. Kamsiati. 2019. Effect of process technology and coating material on the cassava stick characteristics. Journal of Physics. 1295(1): 012071.

- Ogunsua, A. O. 1989. Total cyanide levels in bread made from wheat/cassava composite flours. *International Journal of Food Science and Technology*. 24: 361-365.
- Padmaja, G. 1995. Cyanide detoxification in cassava for food and feed uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 35(4): 299-339.
- Reis, R. C., L. A. de Oliveira, J. M. Almeida, P. de J. Neta, F. D. Santos, V. da S. Santos and R. S. Cruz. 2021. Culinary quality and sensory profile of cassava varieties harvested at different ages. *Ciências Agrárias*. 42 (2): 657-678.
- Williams, H.J. and T.G. Edwards. 1980. Estimation of cyanide with alkaline picrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 31(1): 15-22.

ลักษณะอาการและการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ *Cumene latent viroid*
และ *Pepper chat fruit viroid* ในเมล่อน

Symptomatology and Seed Transmission of *Cumene latent viroid*
and *Pepper chat fruit viroid* in Melon

นพรัตน์ เลิศวิลาศานนท์^{1/} ชมากร สิงห์พันธุ์^{1/} คณินันต์ เจริญวรารักษ์^{1/*}
Nopparat Leartvirasanon^{1/} Samabhorn Sinhabandhu^{1/} Kanungnit Reanwarakorn^{1/*}

Received 25 Oct. 2023/Revised 2 Dec. 2023/Accepted 4 Dec. 2023

ABSTRACT

Cumene latent viroid (CLVd) and *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) are important quarantine pests, causing damage to agricultural products, especially tomato, potato, pepper, and some cucurbits. This work was to study the symptoms and seed transmission of CLVd and PCFVd in melon to provide information for observing abnormal symptoms that might occur in melon growing fields. Melon cultivars were mechanically inoculated at the seedling stage, self-pollinated and seeds harvested for seed transmission investigation. It was found that CLVd and PCFVd could cause disease in melons with 25 – 86 and 0 – 100% infection rates, respectively. All four cultivars of CLVd-infected melon displayed symptoms at 8 weeks post inoculation (wpi) with stunting, shorten internodes, small and stacked leaves, small male flowers with abnormal petals, and abundance of non-developed male and female flowers. While two of three tested cultivars of PCFVd-inoculated melon expressed symptoms at 6 wpi with apical shoot stunting, and fully clustering flowers without of fruit setting. For grow out test in a greenhouse, seed transmission rate of CLVd-infected melon was 0.5% in Melon-2 cultivar only. However, PCFVd seed transmission was not found in all the PCFVd-infected melon cultivars in this study. The current findings of viroid melon diseases could be useful for routine disease observation and immediate eradication of CLVd and PCFVd infected plants to reduce disease dissemination and viroid seed contamination especially in CLVd.

Keywords: *Cumene latent viroid*; *Pepper chat fruit viroid*; seed transmission; cucurbit; melon

^{1/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

^{1/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

* Corresponding author: agrknr@ku.ac.th

บทคัดย่อ

เชื้อ *Cummea latent viroid* (CLVd) และ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) จัดเป็นเชื้อศัตรูพืชที่กักกันที่สำคัญ ที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับผลผลิตทางการเกษตรโดยเฉพาะในมะเขือเทศ มันฝรั่ง พริก และพืชวงศ์แตงบางชนิด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะอาการและการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ CLVd และ PCFVd ในเมล่อน สำหรับเป็นข้อมูลในการสังเกตอาการผิดปกติที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวในแปลง โดยการปลูกเชื้อ CLVd และ PCFVd ลงบนต้นกล้าเมล่อนด้วยวิธีกล และผสมเกสรภายในต้นเดียวกันเพื่อนำเมล็ดมาทดสอบการถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ด จากการศึกษาพบว่า เมล่อนติดเชื้อ CLVd และ PCFVd ที่อัตรา 25 – 86 และ 0 – 100% ตามลำดับ โดยเชื้อ CLVd สามารถก่อโรคให้กับเมล่อนได้ทั้ง 4 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อที่ 8 สัปดาห์ แสดงอาการต้นแคระแกร็น ขั้วสั้น ใบมีขนาดเล็กเรียงซ้อนกัน ดอกตัวผู้มีขนาดเล็ก และกลีบดอกบิดเบี้ยว มีดอกตัวผู้ และดอกตัวเมียจำนวนมาก แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นผลที่สมบูรณ์ ในขณะที่เชื้อ PCFVd สามารถก่อโรคให้กับเมล่อนได้ 2 พันธุ์จากเมล่อน 3 พันธุ์ที่ทดสอบ แสดงอาการของโรคหลังการปลูกเชื้อที่ 6 สัปดาห์ โดยมีอาการยอดเหี่ยว ออกดอกเป็นกระจุกจำนวนมากแต่ไม่ติดผล สำหรับการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดผ่านทางเมล็ดด้วยการปลูกทดสอบในสภาพโรงเรือน พบการถ่ายทอดของเชื้อ CLVd ผ่านทางเมล็ดเพียงพันธุ์เดียว คือ Melon-2 ในอัตรา 0.5% อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้ยังไม่พบการถ่ายทอดเชื้อ PCFVd ผ่านทางเมล็ดในต้นเมล่อนที่ติดเชื้อ ผลจากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสำรวจเมล่อนอย่างสม่ำเสมอ และสามารถทำลายต้นเมล่อนที่เป็นโรคจากเชื้อ CLVd

และ PCFVd ได้ทันที เพื่อลดการแพร่ระบาดของโรคและลดการปนเปื้อนของเชื้อที่ติดไปกับเมล็ดพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ CLVd

คำสำคัญ: *Cummea latent viroid*; *Pepper chat fruit viroid*; การถ่ายทอดทางเมล็ด; พืชวงศ์แตง; เมล่อน

บทนำ

เมล่อน (melon) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Cucumis melo* L. จัดอยู่ในวงศ์ *Cucurbitaceae* เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีราคาต่อผลสูง ให้ผลผลิตสูงต่อพื้นที่ การปลูกใช้น้ำน้อยมีระยะเวลาปลูกและเก็บเกี่ยวสั้น โดยในปี พ.ศ. 2562 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 2,332 ไร่ ผลผลิตรวม 44,587 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2562) ในปี พ.ศ. 2565 มีการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์เมล่อนควบคุมเพื่อการค้า มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เมล่อนมูลค่ารวม 15.5 ล้านบาท ในขณะที่การส่งออกเมล็ดพันธุ์เมล่อนมูลค่ารวม 261 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2565) เมล่อนเป็นพืชที่อ่อนแอต่อเชื้อโรคพืชหลายชนิดที่สามารถเข้าทำลายได้ตลอดระยะเวลาการปลูก ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคพืชที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิตจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างมาก เนื่องจากเป็นปัญหาหลักที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต อีกทั้งสภาพภูมิอากาศของโลกมีความแปรปรวนทำให้เกิดความเครียดต่อพืช และพบเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิดมีความรุนแรงในการก่อโรคและสร้างความเสียหายให้กับพืชได้มากขึ้น โดยผลกระทบที่เป็นปัจจัยหลักต่อการผลิตเมล่อนหรือในพืชวงศ์แตง ได้แก่ แมลงศัตรูพืช และเชื้อสาเหตุโรคพืช ตัวอย่างเชื้อไวรัสที่มีรายงานการเข้าทำลายในพืชวงศ์แตง ได้แก่ *Cucumber pale fruit viroid* (CPFVd) (Van Dorst and

Peters, 1974) *Hop stunt viroid* (HSVd) (Lemmetty et al., 2011) และ *Columnea latent viroid* (CLVd) (กนกมณี และคณิงนิตย์, 2561) เป็นต้น

ไวรอยด์จัดเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุด (Flores et al., 2022) สามารถเข้าทำลายพืชอาศัยได้กว้างทั้งพืชผัก ไม้ผล ไม้ดอก และไม้ประดับ โดยเชื้อ CLVd และ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) เป็นเชื้อไวรอยด์ที่เป็นสมาชิกในวงศ์ (family) *Pospiviroidae* สกุล (genus) *Pospiviroid* เชื้อทั้งสองชนิดนี้มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทย (ปริเชษฐ์, 2548; Reanwarakorn et al., 2011) และจัดเป็นเชื้อศัตรูพืชกักกันที่สำคัญในการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ และสามารถถ่ายทอดด้วยวิธีกล และทางเมล็ดพันธุ์ได้ (Constable et al., 2019) ในประเทศไทย มีรายงานการพบเชื้อ CLVd ในมะเขือเทศ (ปริเชษฐ์, 2548) และมะเขือ (*Solanum stramonifolium*) (ปริเชษฐ์ และคณะ, 2556ก.) มีรายงานการก่อโรคและการถ่ายทอดทางเมล็ดในแตงกวา และแตงร้าน (กนกมณี และคณิงนิตย์, 2561) พริก (ขมากร และคณะ, 2562) และมะเขือ (Bhuvitarkorn and Reanwarakorn, 2019) สำหรับเชื้อ PCFVd ในประเทศไทยมีรายงานตรวจพบครั้งแรกในแปลงปลูกมะเขือเทศที่ จ. ลำปาง (Reanwarakorn et al., 2011) ปัจจุบันยังไม่พบการระบาดในพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น ถึงแม้จะมีรายงานในต่างประเทศว่าเชื้อ PCFVd ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด (Zhang and Groth-Helms, 2024)

เนื่องจาก เชื้อไวรอยด์สามารถถ่ายทอดโรคโดยวิธีกลและทางเมล็ดได้ (Verhoeven et al., 2009) จึงทำให้เกิดการแพร่ระบาดได้ง่าย ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต มีการตรวจพบเชื้อ PCFVd ในเมล็ดมะเขือเทศที่ส่งจาก

ประเทศไทยไปยังออสเตรเลีย (Chambers et al., 2013) รายงานของ Dall et al. (2019) พบการติดเชื้อไปกับเมล็ดมะเขือเทศ 8% และเมล็ดพริกมากถึง 36% ตามลำดับ ดังนั้น เชื้อ CLVd และ PCFVd จึงถูกกำหนดให้เป็นศัตรูพืชกักกันทั้งการนำเข้าและส่งออกของหลายประเทศ (EPPO, 2023) และเชื้อไวรอยด์ทั้งสองชนิดนี้มีรายงานการเข้าทำลายในพืชวงศ์แตงดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น แต่ยังไม่พบรายงานในเมล่อน ดังนั้น การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะอาการโรคและการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ CLVd และ PCFVd ในเมล่อน เพื่อให้หน่วยงานภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเมล่อน ใช้เป็นแนวทางในการเปรียบเทียบลักษณะอาการผิดปกติที่พบในเมล่อน และมีวิธีตรวจวินิจฉัยไวรอยด์ในระดับห้องปฏิบัติการที่มีความแม่นยำและเชื่อถือได้ นำไปสู่การหามาตรการป้องกัน การระบาดของโรคในแปลงปลูกและวิธีลดการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อไวรอยด์ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อสนับสนุนให้มีการผลิตเมล็ดพันธุ์เมล่อนที่มีคุณภาพสูงและปลอดเชื้อไวรอยด์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อ CLVd และ PCFVd สำหรับใช้ในงานทดลอง

เชื้อ CLVd ไอโซเลท NK-KUKPS1 (accession no. KY235369) และเชื้อ PCFVd ไอโซเลท TS05 (accession no. MF770200) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. คณิงนิตย์ เจริญวรการ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นำมาเพิ่มปริมาณบนต้นมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers (*Solanum lycopersicum* cv. Rutgers) โดยนำใบมะเขือเทศที่ติดเชื้อมาบดให้ละเอียดใน 0.1 โมลาร์ (M) phosphate buffer pH 9.0 (เติม 2%

w/v Na₂SO₃ ก่อนใช้) ในอัตราส่วนใบพืช 1 ก. ต่อ phosphate buffer 20 มล. และผสมด้วยผงคาร์โบรันทัม ปริมาณ 0.1% น้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ปลุกเชื้อด้วยวิธีกลโดยการป้ายน้ำคั้นพืชติดเชื้อลงบนใบของต้นกล้ามะเขือเทศ Rutgers ที่อยู่ในระยะมีใบจริง 4 - 5 ใบ จากนั้นนำตัวอย่างใบมะเขือเทศจากต้นที่ได้รับการปลุกเชื้อนาน 4 สัปดาห์ มาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB (ปรีเชษฐ์, 2548) และตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อยืนยันการติดเชื้อและใช้ใบมะเขือเทศ Rutgers ติดเชื้อในขั้นตอนต่อไป

2. การปลุกเชื้อ CLVd และ PCFVd บนพืชทดสอบและการศึกษาลักษณะอาการของโรค

ปลุกเชื้อ CLVd และ PCFVd บนเมล็ดที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ Melon-1 Melon-2 Melon-3 และ Melon-4 ตามลำดับ (Table 1) โดยใช้เชื้อไวรัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในข้อ 1 ปลุกเชื้อด้วยวิธีกลให้กับต้นกล้าเมล็ดที่มีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ ที่มีใบจริง 2 - 3 ใบ พันธุ์ละ 3 - 10 ต้น และปลุกเชื้อครั้งที่สองห่างกันนาน 1 สัปดาห์หลังจากปลุกเชื้อครั้งแรก จากนั้นทำการผสมเกสรเมล็ดทุกต้นที่ใช้ในการทดสอบซึ่งมีดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่ในระยะดอกบานเต็มที่พร้อมได้รับการผสม หรือพืชทดสอบมีอายุประมาณ 35 - 40 วันหลังจาก ทำการช่วยผสมเกสรโดยใช้ดอกตัวผู้ผสมกับดอกตัวเมียในต้นเดียวกัน (hand-pollination) เพื่อเก็บผลผลิตสำหรับนำมาใช้ในการทดสอบการถ่ายทอดทางเมล็ดในขั้นตอนต่อไปสังเกตอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นบนเมล็ดที่ทำการปลุกเชื้อโดยเปรียบเทียบกับต้นปกติที่ไม่ได้รับการปลุกเชื้อ และตรวจสอบการติดเชื้อ CLVd และ

PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR ในสัปดาห์ที่ 4 - 12 หลังจากการปลุกเชื้อ

3. การทดสอบการถ่ายทอดเชื้อ CLVd และ PCFVd ผ่านทางเมล็ด

สุ่มเมล็ดที่ได้จากต้นเมล็ดติดเชื้อไวรัสแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ทำการเพาะด้วยวิธี top of paper (TP) (Chen et al., 2001) ในกล่องพลาสติกเป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างโดยแยกเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) กับต้นกล้า (seedling) โดยรวม 5 ตัวอย่าง ของเปลือกหุ้มเมล็ดหรือต้นกล้า เป็น 1 ตัวอย่าง เพื่อนำทั้ง 2 ส่วนไปแยกสกัดอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบหาเชื้อ CLVd หรือ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อศึกษาตำแหน่งและอัตราการพบเชื้อในระยะต้นกล้า และเมล็ด ส่วนที่ 2 ทำการปลูกทดสอบในสภาพโรงเรือน (grow-out test, GOT) (กนกมณี และคณินันต์, 2561) และตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ภายหลังเพาะกล้าในสัปดาห์ที่ 4 - 12 เพื่อศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ดไปสู่ต้นกล้ารุ่นต่อไป

4. การตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ CLVd และ PCFVd และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบเชื้อไวรัสจากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากใบและเมล็ดโดยใช้เทคนิค RT-PCR สังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ของเชื้อไวรัสด้วย Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase (RT) (Thermo Scientific™) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วย GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation) ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิต ตรวจหาเชื้อ CLVd ด้วยคู่ไพรเมอร์ cCL-P2 (5' CTGCAGCCATG CAAAGA 3') และ hCL-P2 (5' GGTCAGGTGTGAACCAC 3') (ศศิประภา, 2551) และตรวจหาเชื้อ PCFVd ด้วยคู่

ไพรเมอร์ PCF-seq-R (5' ACCCGC ACGGCGCTTCTC 3') และ PCF-seq-F (5' CCGTCTTCTG ACAGGAGT AATCCC 3') (Yanagisawa and Matsushita, 2017) ตามลำดับ

ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 340 - 370 นิวคลีโอไทด์ และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep™ GEL/PCR purification kit ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต แล้วส่งตัวอย่างดีเอ็นเอวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อไวรัส

5. การตรวจสอบเชื้อ CLVd และ PCFVd บนพืชทดสอบ (bioassay)

ตรวจสอบยืนยันความสามารถในการก่อโรค

ของเชื้อบนมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ที่เป็นพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด (Legrand, 2015) โดยใช้อาร์เอ็นเอของเมล่อนที่ได้รับการปลูกเชื้อทุกสายพันธุ์ ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ phosphate buffer (pH 9.0) 40 ไมโครลิตร นำไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบดินในมะเขือเทศที่มีใบจริง 1 - 2 ใบ และตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบที่ได้รับการปลูกเชื้อในขั้นตอนนี้ด้วยเทคนิค RT-PCR ในสัปดาห์ที่ 4 8 และ 12 หลังการปลูกเชื้อ ตามวิธีการที่กล่าวไว้แล้วในข้างต้น

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะอาการของเมล่อนที่ได้รับการปลูกเชื้อ CLVd และ PCFVd

อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ CLVd บนเมล่อนแสดงออกชัดเจนที่ 8 สัปดาห์หลังได้รับการปลูกเชื้อ ได้แก่ ต้นแคระแกร็น ข้อสั้น ใบพับงอลง ยอดที่เกิดใหม่มีข้อสั้น ใบมีขนาดเล็ก ลดรูป เรียงซ้อนกัน ดอกตัวผู้มีขนาดเล็ก กลีบดอกบิดเบี้ยว มีดอกตัวผู้



Figure 1 Symptoms of CLVd-infected melon (*C. melo* L.) at 8 weeks post inoculation; plant showing stunted growth, short internodes, bent leaves and new shoots with short internodes, small and stacked leaves (D-E), clustering of non-developed female flowers (F), small male flowers with abnormal petals (G); compared to healthy plant and flowers (A-C)

และดอกตัวเมียจำนวนมาก แต่ไม่เจริญเป็นผลที่สมบูรณ์ (Figure 1) และไม่ติดเมล็ดในบางพันธุ์ เนื่องจากอาการของโรครุนแรงมาก เมล่อนหยุดการเจริญเติบโตและตายเมื่ออายุครบ 12 สัปดาห์หลังได้รับการปลูกเชื้อ เมื่อตรวจยืนยันผลการติดเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า เชื้อ CLVd สามารถเข้าทำลายเมล่อนทั้ง 4 พันธุ์ และมีอัตราการติดเชื้อ 25 - 86% (Table 1 และ 2)

2. การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันชนิดของไวรัส

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อ CLVd จากต้นเมล่อน 4 พันธุ์ และ

ต้นกล้าในการทดสอบ GOT พันธุ์ Melon-2 ที่พบการติดเชื้อ CLVd พบว่า มีความเหมือนกับเชื้อ CLVd ไอโซเลต NK-KUKPS1, partial genome (accession No. KY235369) ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ใช้ในการปลูกเชื้อให้กับเมล่อนในงานวิจัยนี้ ที่ 99% ซึ่งค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไวรอยด์มากกว่า 90% จะถือว่าเป็นไวรอยด์ชนิดเดียวกัน (Flores et al., 1998) และดีเอ็นเอของเชื้อ PCFVd ที่ได้จากต้นเมล่อนพันธุ์ Melon-1 และ Melon-4 ที่ติดเชื้อ PCFVd มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับไอโซเลต TS05, partial genome (accession No. MF770200) ที่ 98% จึงจัดเป็นไวรอยด์ชนิดเดียวกัน ตามลำดับ (Table 2)

Table 1 Infection percentage of CLVd and PCFVd inoculated melon plants as detected by RT-PCR technique

Cultivars	Fruit characteristics (fresh color/shape/skin)	Viroid infection (%) ^{1/}	
		CLVd	PCFVd
Melon-1	green/round/netted green	67 (4/6)	100 (3/3)
Melon-2	orange/round/netted green	60 (6/10)	NT
Melon-3	orange/round/netted green	86 (6/7)	0 (0/3)
Melon-4	green/round/netted green	25 (2/8)	100 (3/3)

^{1/} = percentage of viroid infection (no. of infected plant/total no. of test plant x 100),

NT = no test

Table 2 Results of RT-PCR, bioassay and sequence similarity of CLVd and PCFVd in the inoculated melon plants

Cultivars	CLVd			PCFVd		
	RT-PCR	Bioassay	Sequence	RT-PCR	Bioassay	Sequence
Melon-1	+	+	+	+	+	+
Melon-2	+	+	+	NT	NT	NT
Melon-3	+	+	+	-	-	-
Melon-4	+	+	+	+	+	+

+ = positive result, - = no test because of no infection, NT = no test

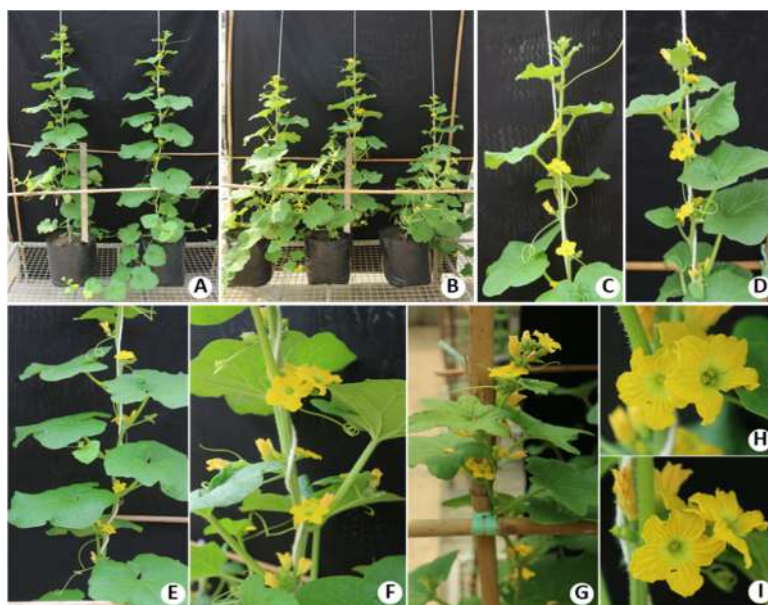


Figure 2 Symptoms of PCFVd-infected melon at 6 weeks post inoculation; plant displaying short internode and numerous lateral branches (B), abnormal apical shoots with short internode (D), many flowerings but not setting fruit (F) and abnormal clustering flowers (G-I) compared to stem, shoots and flowering of healthy plant (A, C and E)

สำหรับเชื้อ PCFVd พบว่า สามารถเข้าทำลาย เมล่อน 2 พันธุ์ ได้แก่ Melon-1 และ Melon-4 จากการทดสอบ 3 พันธุ์ (Melon-1 Melon-3 และ Melon-4) อัตราการติดเชื้อมีค่า 0 – 100% (Table 1 และ 2) โดยอาการของโรคบนเมล่อนที่เกิดจากเชื้อ PCFVd เริ่มแสดงอาการเด่นชัดหลังจากปลูกเชื้อ นาน 6 สัปดาห์ โดยมีอาการยอดหดสั้น ดอกเป็น กระจุกตามบริเวณกิ่งแขนงและลำต้น เมื่อเทียบกับ ต้นปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (Figure 2)

จากการสังเกตอาการในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เมล่อนที่ติดเชื้อ PCFVd แสดงอาการให้เห็น ได้เร็วกว่าเชื้อ CLVd ทั้งนี้การติดเชื้อไวรัสต่าง ชนิดในพืชอาศัยชนิดเดียวกัน อาจแสดงอาการ เหมือนหรือแตกต่างกันได้ (Navarro et al., 2021) อาการและความรุนแรงของโรคขึ้นกับชนิดและ ปริมาณของเชื้อที่พืชได้รับที่ทำให้มีผลต่อการเพิ่ม ปริมาณในพืชอาศัย (Škorić, 2017) ซึ่งลักษณะ อาการผิดปกติที่เกิดขึ้นในเมล่อนจากการเข้าทำลาย

ของไวรัสทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะอาการที่ดอก เช่นเดียวกับรายงานของ Lemmetty et al. (2011) ที่พบว่า แตนกวาดิตเชื้อ HSVd มีอาการดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกผิดปกติและมีรอยย่น และผลผลิตลดลง ประมาณ 2 – 3% และจากรายงานของ Yaguchi and Takahashi (1984) ได้ยืนยันว่า ความสามารถในการก่อโรคของ HSVd ขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์พืช และความรุนแรงของโรคขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ ไวรัส ทั้งนี้เชื้อ HSVd จัดอยู่ในวงศ์ *Pospiviroidae* เช่นเดียวกับเชื้อ CLVd และ PCFVd แต่อยู่ต่าง สกุลกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสทั้งสามชนิด ก่อให้เกิดอาการผิดปกติที่ดอกเช่นเดียวกัน

3. การทดสอบการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ CLVd และ PCFVd ในเมล่อน

การทดสอบไม่พบตัวอย่างเมล่อนติดเชื้อ CLVd และ PCFVd จากทั้งเปลือกหุ้มเมล็ด และ ต้นกล้าในทุกพันธุ์ (Table 3) เมื่อทดสอบด้วยการ

เพาะเมล็ดด้วยวิธี TP ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ กนกมณี และคณินันต์ (2561) ที่ตรวจพบเชื้อ CLVd ในต้นกล้าของแตงกวาจากการเพาะเมล็ดด้วยวิธีเดียวกันนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชนิดของพืชทดสอบที่ต่างกัน ดังเช่น การศึกษาของ Matsushita and Tsuda (2016) ทดสอบการถ่ายทอดของเชื้อ CLVd ในพืชหลายชนิด แต่พบการถ่ายทอดเฉพาะใน มะเขือเทศเพียงบางสายพันธุ์จากมะเขือเทศหลายสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ

การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรอยด์ด้วยวิธีการปลูกทดสอบในสภาพโรงเรือน พบการติดเชื้อ CLVd ในต้นกล้าเมลอนพันธุ์ Melon-2 ที่ได้เมล็ดจากต้นแม่ติดเชื้อ จำนวน 1 ต้น จากทั้งหมด 200 ต้น คิดเป็น 0.5% อย่างไรก็ตาม ไม่พบการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดของเชื้อ PCFVd ในเมลอนพันธุ์ Melon-1 และ Melon-4 (Table 3) จากผลการทดลองข้างต้นอาจอธิบายได้ว่าการถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ดของเชื้อ CLVd ในเมลอนอาจแบ่งได้สองแบบ

คือ 1) การถ่ายทอดของเชื้อไวรอยด์จากการทดลองนี้เป็นการติดเชื้อ CLVd ของต้นกล้าที่มาจากละอองเกสรที่มีการติดเชื้อ (ตรวจยืนยันการติดเชื้อของละอองเกสรแต่ไม่ได้แสดงผล) เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ CLVd ผ่านทางเมล็ดมะเขือเทศเนื่องจากละอองเกสรมีการติดเชื้อไวรอยด์ของ Bhuvitarkorn and Reanwarakorn (2019) และ 2) การถ่ายทอดเชื้อ CLVd ผ่านเนื้อเยื่อรังไข่ของต้นแม่ที่ติดเชื้อแบบ cell-to-cell ไปสู่เอ็มบริโอหลังเกิดการปฏิสนธิ โดยตรวจพบไวรอยด์ที่รังไข่ของดอกตัวเมียที่ยังไม่ได้รับการผสมเกสร ที่ได้จากต้นแม่ที่ติดเชื้อ CLVd ในงานทดสอบนี้ด้วย (ไม่ได้แสดงผล) อย่างไรก็ตาม มีความเป็นไปได้ของการถ่ายทอดเชื้อ CLVd ผ่านทางเมล็ดอาจเป็นในแบบที่หนึ่งได้ เนื่องจากตรวจไม่พบเชื้อที่ส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดซึ่งจะถูกพัฒนาขึ้นก่อนเอ็มบริโอ (Matsushita et al., 2018)

Table 3 Evaluation of seed transmission of CLVd and PCFVd infected melon plants through top of paper and grow-out tests followed by viroid detection by using RT-PCR technique

Variety	No. of test seed	CLVd			No. of test seed	PCFVd		
		Top of paper test ^{1/}		Grow-out test		Top of paper test ^{1/}		Grow-out test
		Seed coat	Seedling			Seed coat	Seedling	
Melon-1	NS	NT	NT	NT	1480	0% (0/148 ^{2/})	0% (0/148)	0% (0/740 ^{3/})
Melon-2	391	0% (0/20 ^{2/})	0% (0/20)	0.5% (1/200 ^{3/})	NS	NT	NT	NT
Melon-3	NS	NT	NT	NT	NS	NT	NT	NT
Melon-4	NS	NT	NT	NT	1700	0% (0/81)	0% (0/81)	0% (0/820)

^{1/} 5 bulked /sample,

^{2/} number of test samples infected with CLVd or PCFVd/total tested samples

^{3/} number of test plants infected with CLVd or PCFVd/total tested plants

NT = no test

NS = no seed

4. การตรวจสอบเชื้อ CLVd และ PCFVd บนพืชทดสอบ (Bioassay)

ผลการปลูกเชื้อ CLVd และ PCFVd บนต้นมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers พบว่า อาร์เอ็นเอจากเมล่อนที่ติดเชื้อ สามารถก่อโรคบนต้นมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ได้ (Table 2) และแสดงอาการหลังการปลูกเชื้อ 4 สัปดาห์ และมีอาการโรคที่เด่นชัดที่

8 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อ คือ ก้านใบและยอดหดสั้น ใบหย่นและบิดม้วน และอาการเนื้อเยื่อตายที่บริเวณเส้นใบ กิ่ง และลำต้น (Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ปรีเชษฐ์ และคณะ (2556ข.) ซึ่งปัจจัยทางสภาพแวดล้อม สายพันธุ์ไวรอยด์ และชนิดของพืชอาศัย ส่งผลต่อการทดสอบทางชีวภาพ (Nie and Singh, 2017)

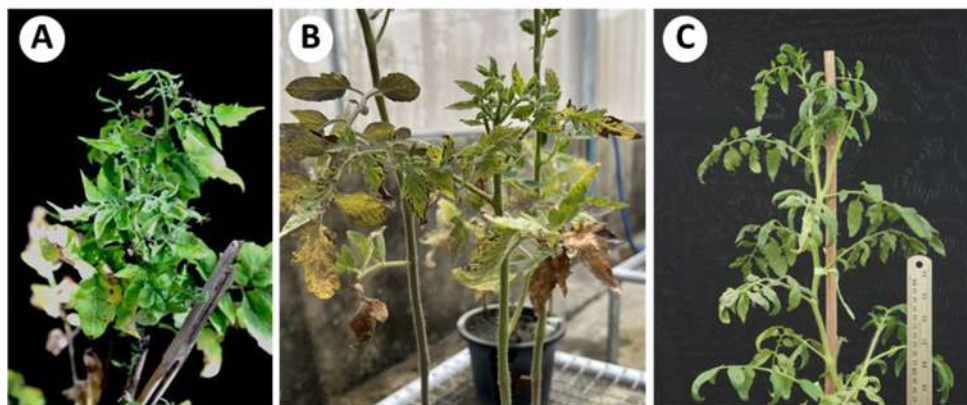


Figure 3 Symptoms of viroid on Rutgers tomato at 8 weeks post inoculation of *Columnnea latent viroid* (A) and *Pepper chat fruit viroid* (B) compared to healthy tomato plant (C)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะอาการและการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อไวรอยด์ CLVd และ PCFVd ในเมล่อน พบว่าเชื้อไวรอยด์ CLVd สามารถก่อโรคในเมล่อนทั้ง 4 พันธุ์ที่ทดสอบ ได้ 25 – 86% และแสดงอาการของโรคหลังการปลูกเชื้อ 8 สัปดาห์ โดยมีอาการต้นแคระแกร็น ขั้วสั้น ใบพับงอลง ยอดที่เกิดใหม่มีข้อสั้น ใบมีขนาดเล็ก อดรูป เรียงซ้อนกัน ดอกตัวผู้มีขนาดเล็ก กลีบดอกบิดเบี้ยว มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียจำนวนมากแต่ไม่เจริญเป็นผลที่สมบูรณ์ และพบว่า เชื้อไวรอยด์ CLVd สามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดเมล่อนในพันธุ์ Melon-2 ได้ในอัตรา 0.5% ส่วนเชื้อ PCFVd พบว่า สามารถก่อโรค 100% ในเมล่อน 2 พันธุ์ และแสดงอาการของโรคหลังการปลูกเชื้อ 6 สัปดาห์ โดยมีอาการยอดหดสั้น ออกดอกจำนวนมากมีลักษณะเป็น

กระจุกตามบริเวณกิ่งแขนงและลำต้น จึงสรุปได้ว่า เชื้อ CLVd และ PCFVd สามารถก่อโรคบนเมล่อน และเชื้อ CLVd สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการสำรวจอาการโรคที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์ทั้งสองชนิด เพื่อลดการแพร่ระบาดของโรคและลดการปนเปื้อนของเชื้อที่จะติดไปกับเมล็ดพันธุ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ CLVd

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์ สนับสนุนสถานที่และเครื่องมือเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กนกมณี ต้นสุวรรณ และคณินนิตย เจริญวรารกร. 2561 การถ่ายทอดเชื้อ *Columnnea latent viroid* ผ่านทางเมล็ดของแตงกวา. วารสารวิชาการเกษตร. 36(2): 130-140.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2562. เมล่อนญี่ปุ่น สารสนเทศส่งเสริมการเกษตร. แหล่งที่มา: <https://www.http://www.agriinfo.doe.go.th/year63/plant/ortor/veget/.pdf/> สืบค้น: 10 กรกฎาคม 2566.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. การตรวจสอบเชื้อไวรัสในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 85 หน้า.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ คณินนิตย เจริญวรารกร และวิภา เกิดพิพัฒน์. 2556ก. เชื้อ *Columnnea latent viroid* (CLVd) สายพันธุ์ใหม่ที่ก่อให้เกิดอาการรุนแรงในมะเขือ (*Solanum stramonifolium* Jacq.). วารสารวิชาการเกษตร. 31(1): 53-68.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ คณินนิตย เจริญวรารกร และวิภา เกิดพิพัฒน์. 2556ข. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Columnnea latent viroid* (CLVd) และ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในพืชตระกูล *Solanaceae*. วารสารวิชาการเกษตร. 31(2): 108-122.
- ศศิประภา มาราช. 2551. โคลนก่อโรคของเชื้อ *Columnnea latent viroid* และผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์การค้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 86 หน้า.
- ชมภาร ภูวิชกรณ จีราพร ปอสูงเนิน สุภาพร กลิ่นคง และคณินนิตย เจริญวรารกร. 2562. การเข้าทำลายและการถ่ายทอดทางเมล็ดของ *Columnnea latent viroid* ในพริก. วารสารเกษตร. 35(1): 101-111.
- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2565. ข้อมูลการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุมเพื่อการค้าปี 2565. แหล่งที่มา: https://www.doa.go.th/ard/?page_id=1443. สืบค้น: 23 มีนาคม 2566.
- Bhuvitarkorn, S and K. Reanwarakorn. 2019. Pollen and seed transmission of *Columnnea latent viroid* in eggplants. European Journal of Plant Pathology. 154(4): 1067-1075.
- Chambers, G.A., A.M. Seyb, J. Mackie, F.E. Constable, B.C. Rodoni, D. Letham, K. Davis and M.J. Gibbs. 2013. First report of *Pepper chat fruit viroid* in traded tomato seed, an interception by Australian Biosecurity. Plant Disease. 97(10): 1386.
- Chen, F., P. Dahal and K. J. Bradford. 2001. Two tomato expansion genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. Plant Physiology. 127(3): 928-936.
- Constable, F., G. Chambers, L. Penrose, A. Daly, J. Mackie, K. Davis, B. Rodoni and M. Gibbs. 2019. Viroid-infected tomato and capsicum seed shipments to Australia. Viruses. 11(2): 98.
- Dall, D., L. Penrose, A. Daly, F. Constable and M. Gibbs. 2019. Prevalences of *pospiviroid* contamination in large seed lots of tomato and capsicum, and related seed testing considerations. Viruses. 11: 1034.
- EPPO. 2023. EPPO Global Database. Available at: <https://gd.eppo.int>. Accessed: July 10, 2023.
- Flores, R., B. Navarro, P. Serra and F. Di Serio. 2022. A scenario for the emergence of protoviroids in the RNA world and for their further evolution into viroids and viroid-like RNAs by modular recombinations and mutations. Virus Evolution. 8(1): veab107.
- Flores, R., J.W. Randles, M. Bar-Joseph and T.O. Diener. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. Archives of Virology. 143: 623-629.

- Legrand, P. 2015. Biological assays for plant viruses and other graft-transmissible pathogens diagnoses: A review. EPPO Bulletin. 45: 240-251.
- Lemmetty, A., A. W. Werkman and M. Soukainen. 2011. First report of *Hop stunt viroid* in greenhouse cucumber in Finland. Plant Disease. 95(5): 615.
- Matsushita, Y., H. Yanagisawa and T. Sano. 2018. Vertical and horizontal transmission of pospiviroids. Viruses. 10(12): 706.
- Matsushita, Y. and S. Tsuda. 2016. Seed transmission of *Potato spindle tuber viroid*, *Tomato chlorotic dwarf viroid*, *Tomato apical stunt viroid* and *Columnea latent viroid* in horticultural plants. European Journal of Plant Pathology. 145: 1007-1011.
- Navarro, B., R. Flores and F. Di Serio. 2021. Advances in viroid-host interactions. Annual Review of Virology. 8(1): 305-325.
- Nie, X and R.P. Singh. 2017. Viroid detection and identification by bioassay. pp. 347-356. In: Viroids and Satellites. Academic Press.
- Rearwarakorn, K., S. Klinkong and J. Porsoongnum. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. New Disease Reports. 24(6): 2044-0588.
- Škorić, D. 2017. Viroid biology. pp. 53-61. In: Viroids and Satellites. Academic Press.
- Van Dorst, H.J.M and D. Peters. 1974. Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. Netherlands Journal of Plant Pathology. 80: 85-96.
- Verhoeven, J. T., C.C. Jansen, J. W. Roenhorst, R. Flores and M. de la Peña. 2009. *Pepper chat fruit viroid*: biological and molecular properties of a proposed new species of the genus *Pospiviroid*. Virus Research. 144(1-2): 209-214.
- Yaguchi, S and T. Takahashi. 1984. Response of cucumber cultivars and other cucurbitaceous species to Infection by *Hop Stunt Viroid*. Journal of Phytopathology. 109(1): 21-31.
- Yanagisawa, H. and Y. Matsushita. 2017. Host ranges and seed transmission of *Tomato planta macho viroid* and *Pepper chat fruit viroid*. European Journal of Plant Pathology. 149: 211-217.
- Zhang, S and D. Groth-Helms. 2024. Viroid diseases of tomato. pp. 379-385. In: Viral Diseases of Field and Horticultural Crops. Academic Press.

การพัฒนาเทคนิคการทำนายค่าปริมาณไนเตรทในใบว่านทางจระเข้
โดยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้
Development of Nitrate Content Prediction Technique of Aloe Vera Leaves
using Nondestructive Technique by Near Infrared Spectroscopy

สุวิทย์ บุตรเสน^{1/} อนุปันท์ เทอดวงศ์วรกุล^{1/} อาทิตย์ พวงสมบัติ^{1/} แก้วกานต์ พวงสมบัติ^{1/*}
Suwit Bootsens^{1/} Anupun Terdwongworakul^{1/} Arthit Phuangsombut^{1/} Kaewkarn Phuangsombut^{1/*}

Received 28 Feb. 2024/Revised 25 Mar. 2024/Accepted 9 Apr. 2024

ABSTRACT

This study examined the use of near-infrared spectroscopy to assess nitrate concentration of freshly harvested aloe vera leaves. Equations for predicting nitrate concentration of aloe vera leaves were developed in this work, based on the analysis of 80 samples. The NIR spectra were collected from different positions on the outer rind, specifically the apex, center, and base. Subsequently, the outer layer of the corresponding sites was removed and the concentration of nitrate in the aloe vera gel was examined by nitrate ion meter. The partial least squares regression (PLSR) method was employed to create a prediction equation for the nitrate content. The equation derived from the spectra obtained at the central position demonstrated the highest accuracy, as indicated by a correlation coefficient of prediction of 0.98 and root mean squared error of prediction of 3.50 ppm. The regression coefficients of the nitrate prediction equations were dominated at the wavelengths of 957, 1104 and 1154 nm. Therefore, it is possible to use the NIRS technique to predict the nitrate content of aloe vera leaves without destroying the sample. This technique will allow a quick and accurate measurement of the nitrate content in aloe vera leaves.

Keywords: nitrate; aloe vera; near infrared spectroscopy

^{1/} ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, จ.นครปฐม 73140

^{1/} Department of Agricultural Engineering, Faculty of Engineering at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

* Corresponding author: fengkkb@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ใบว่านหางจระเข้ที่มีคุณภาพต้องมีปริมาณสารไนเตรทต่ำ และจำเป็นต้องมีการตรวจสอบก่อนนำเข้าสู่กระบวนการแปรรูป เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) สามารถวัดองค์ประกอบทางเคมีภายในของผลผลิตเกษตรโดยไม่ทำลายตัวอย่าง งานวิจัยนี้จึงพัฒนาเทคนิค NIRS เพื่อนำมาใช้ในการทำนายปริมาณไนเตรทในใบว่านหางจระเข้สดแบบไม่ทำลายตัวอย่าง โดยทำการทดลองเพื่อสร้างสมการทำนายปริมาณไนเตรทจากตัวอย่างใบว่านหางจระเข้ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่บริเวณผิวเปลือกตรงตำแหน่งหลังใบทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ได้แก่ โคนใบ กลางใบ และปลายใบ แล้วนำมาปอกเปลือกตัดเอาส่วนที่เป็นเนื้อเจลบริเวณที่ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงแต่ละตำแหน่งมาหาค่าปริมาณไนเตรท และสร้างสมการทำนายค่าปริมาณไนเตรท ด้วยวิธี partial least squares regression พบว่า สมการที่สร้างจากข้อมูลสเปกตรัมของตำแหน่งกลางใบให้ความแม่นยำในการทำนายสูงที่สุด โดยสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของการทำนายมีค่า 0.98 ค่ารากที่สองของค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย 3.50 พีพีเอ็ม และสัมประสิทธิ์การถดถอยของสมการทำนายที่มีความสัมพันธ์กับค่าไนเตรต ได้แก่ ความยาวคลื่น 957 1,104 และ 1,154 นาโนเมตร ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเทคนิค NIRS มาใช้ในการทำนายค่าปริมาณไนเตรทของใบว่านหางจระเข้แบบไม่ทำลายตัวอย่าง ซึ่งจะช่วยให้การวัดปริมาณสารไนเตรทในใบว่านหางจระเข้สามารถทำได้แม่นยำและรวดเร็วขึ้น

คำสำคัญ: ไนเตรท; ว่านหางจระเข้; สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

บทนำ

ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera* (L.) Burm.f.) เป็นพืชสมุนไพรที่นิยมปลูกไว้ใช้ประโยชน์ในครัวเรือน มีลักษณะใบหนาอวบน้ำ เมื่อผ่าใบออกจะพบส่วนที่เป็นเนื้อวุ้นใส อุดมไปด้วยสารสำคัญต่าง ๆ มีสรรพคุณทางยาที่ทำหน้าที่ฆ่าเชื้อและสมานแผล และเป็นตัวกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อให้เจริญเติบโต ทำให้แผลหายเร็วขึ้น (วิวัฒน์และคณะ, 2538) ว่านหางจระเข้ยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีศักยภาพสูงจากการศึกษาฐานข้อมูลผลิตภัณฑ์เปิดตัวใหม่ทั่วโลก GNPD (global new products database) พบว่า ในช่วงปี พ.ศ. 2561 – 2566 มีผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของว่านหางจระเข้เฉพาะที่รับประทานได้จำนวน 2,581 รายการ กลุ่มผลิตภัณฑ์ที่มีว่านหางจระเข้เป็นส่วนผสมมากที่สุด 3 อันดับแรก คือน้ำผลไม้ ผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพ และผลิตภัณฑ์นมตามลำดับ สำหรับกลุ่มเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ดูแลร่างกาย มีการรายงานผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของว่านหางจระเข้จำนวน 127,866 รายการ โดยผลิตภัณฑ์กลุ่มเครื่องสำอางที่มีว่านหางจระเข้เป็นส่วนผสมมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ ผลิตภัณฑ์ดูแลผิว ผลิตภัณฑ์สำหรับอาบน้ำและสบู และผลิตภัณฑ์สำหรับเส้นผม ตามลำดับ (สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์การค้า, 2566) อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารสำคัญในใบว่านหางจระเข้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาพภูมิอากาศ อุณหภูมิ ความชื้น แสง และแร่ธาตุในดิน (Suga and Hirata, 1983) ซึ่งอาจรวมไปถึงพื้นที่เพาะปลูก ฤดูกาลเก็บเกี่ยว และอายุของใบด้วย

ว่านหางจระเข้ปลูกมากใน จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีพื้นที่ปลูก 4,923 ไร่ จากสถิติการผลิตปี พ.ศ. 2565 มีจำนวนเกษตรกรผู้ปลูกว่านหางจระเข้ ทั่วประเทศ 610 ราย พื้นที่ปลูก 5,248 ไร่ ผลผลิตรวม 186,120 ตัน

ตลาดส่งออกที่สำคัญ ได้แก่ จีน พม่า สิงคโปร์ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา เวียดนาม กัมพูชา ตะวันออกกลาง ฮองกง ไต้หวัน เกาหลี และอังกฤษ ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาเกษตรกรพบกับปัญหายากแรงแ้งทำให้ผลผลิตที่ได้มีปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาด เกษตรกรจึงใช้วิธีการให้ปุ๋ยเคมีเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของว่านหางจระเข้ ทำให้ผลผลิตไม่ได้มาตรฐานสำหรับภาคอุตสาหกรรม (สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร, 2566) เนื่องจากว่านหางจระเข้มีการเจริญเติบโตทางใบอย่างรวดเร็วทำให้ผลผลิตที่ได้มีอายุไม่ถึงเกณฑ์ในการเก็บเกี่ยว และมีการสะสมของปริมาณไนเตรทที่ใบว่านหางจระเข้ในปริมาณสูง หากมีการบริโภคในปริมาณมาก อาจเกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ เนื่องจากสารไนเตรทเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกกรดในกระเพาะอาหารเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ และเมื่อทำปฏิกิริยากับเอมีนหรือเอไมด์ทำให้เกิดสารประกอบเอ็นไนโตรโซซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่ง (Santamaria, 2006) ปัจจุบันยังไม่ทราบปริมาณไนเตรทที่มีผลกระทบต่อร่างกายที่แน่ชัด อย่างไรก็ตาม องค์การอนามัยโลกได้กำหนดปริมาณไนเตรทที่ยอมรับได้ต่อวัน (acceptable daily intake, ADI) ไว้ที่ 3.7 มก./น้ำหนักตัว 1 กก.ของผู้บริโภค (WHO, 2002) ใบว่านหางจระเข้ที่มีคุณภาพจะต้องมีปริมาณสารไนเตรทต่ำเป็นสิ่งสำคัญ ดังนั้นจำเป็นต้องมีการตรวจสอบปริมาณสารไนเตรทก่อนนำเข้าสู่กระบวนการแปรรูปในโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งการตรวจสอบปริมาณไนเตรทส่วนใหญ่ใช้วิธีการตรวจสอบโดยใช้ nitrate test strip เนื่องจากสามารถใช้งานได้สะดวกและรวดเร็ว แต่การตรวจสอบด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องทำลายตัวอย่างใบว่านหางจระเข้ทำให้เกิดความสูญเสีย ทั้งผลตรวจสอบยังมีความละเอียดต่ำ และมีค่าใช้จ่ายสูง

ปัจจุบันเทคนิคการตรวจสอบผลผลิตทางการเกษตรแบบไม่ทำลายตัวอย่างด้วยวิธีสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (near infrared spectroscopy, NIRS) ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลาย โดย NIRS เป็นวิธีที่รวดเร็ว มีความแม่นยำในการวัดองค์ประกอบทางเคมีภายในของผลผลิตเกษตรและอาหาร (Fu et al., 2007; Terdwongworakul et al., 2012) ใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบสั้น ประหยัดแรงงาน ลดการใช้สารเคมีในการตรวจวิเคราะห์ และต้นทุนต่ำ (Osborne et al., 1993; Williams and Norris, 1987) ประเทศไทยมีการใช้เทคนิค NIRS ในการวัดปริมาณไนเตรทของผลผลิตเกษตร เช่น สับปะรด (Srivichien et al., 2015) แต่ยังไม่พบการใช้เทคนิค NIRS ในการวัดปริมาณไนเตรทของใบว่านหางจระเข้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการทำนายค่าปริมาณไนเตรทในใบว่านหางจระเข้แบบไม่ทำลายตัวอย่าง ที่ทำได้เร็วกว่า และมีความแม่นยำสูง

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างใบว่านหางจระเข้ จากไร่ซัพพลายเออร์ของห้างหุ้นส่วนจำกัด บางกอกโกลที่ได้จากแหล่งเพาะปลูกในพื้นที่ จ. กาญจนบุรี จำนวน 4 ราย รายละ 20 ใบ รวมทั้งหมด 80 ใบ นำตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เกษตร ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จากนั้น ทำความสะอาดตัวอย่างโดยการล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำมาวางผึ่งให้แห้งในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อปรับอุณหภูมิ

ใบว่านหางจระเข้ก่อนการวัดค่าการดูดกลืนแสง การวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำใบว่านหางจระเข้ทั้งหมดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงย่านใกล้อินฟราเรด บริเวณผิวเปลือกตรงตำแหน่งหลังใบ 3 ตำแหน่ง คือ โคนใบ กลางใบ และปลายใบ โดยแต่ละส่วนวัดมีขนาดพื้นที่กว้างxยาว 3x3 ซม. (Figure 1) ด้วยเครื่อง NIRS (DLP NIR scan Nano, Texas Instruments, Dallas, Texas,

USA) ใช้โหมดการวัดแบบสะท้อนกลับ (reflectance mode) ที่ช่วงความยาวคลื่น 900 - 1700 นาโนเมตร เก็บความยาวคลื่นทุก ๆ 3 นาโนเมตร ด้วยโปรแกรม DLP NIR scan Nano GUI (Texas Instruments, Dallas, Texas, USA) สอบเทียบเครื่อง NIRS โดยการสแกน Spectralon® white reference ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงของใบว่านหางจระเข้

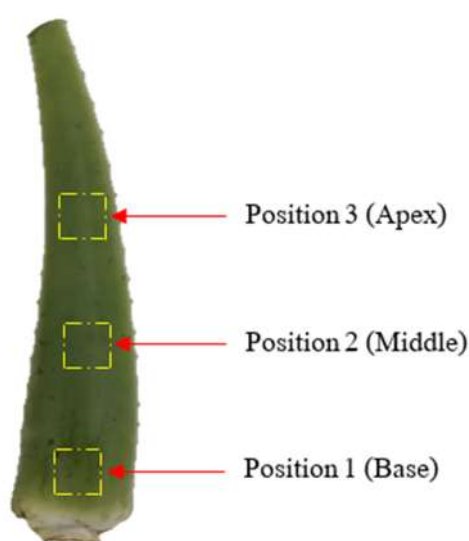


Figure 1 Positions made on the outer rind of an aloe vera leaf for acquiring near infrared spectra

การวิเคราะห์ค่าปริมาณไนเตรท

นำตัวอย่างที่ผ่านการวัดค่าการดูดกลืนแสง มาวิเคราะห์ปริมาณไนเตรท โดยปอกเปลือกตัดเอาส่วนที่เป็นเนื้อเจลบริเวณที่ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงแต่ละตำแหน่งมาบดละเอียดด้วยเครื่อง crusher (Wonder Blender, WB-1, Osaka Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan) เพื่อให้ได้ตัวอย่างเนื้อว่านหางจระเข้ขนาดประมาณ 1 x 1 มม. จากนั้นนำตัวอย่างที่เป็นส่วนผสมทั้งน้ำและเนื้อว่านหางจระเข้มาวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทด้วยเครื่อง nitrate ion meter (LAQUAtwin, N03-11, HORIBA

Advanced Techno Co., Ltd., Kyoto, Japan) ที่มีช่วงการวัดตั้งแต่ 6 – 9,900 ไมโครกรัม/ก. ตำแหน่งละ 2 ซ้ำ ก่อนนำไปคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยปริมาณไนเตรทของแต่ละตำแหน่ง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าปริมาณไนเตรท โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มสร้างสมการทำนาย (calibration set) จำนวน 60 ตัวอย่าง และกลุ่มทดสอบสมการทำนาย (prediction set) จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยให้ตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมีการกระจายตัวค่าปริมาณ

ไนเตรทใกล้เคียงกัน และค่าปริมาณไนเตรทต่ำสุดและสูงสุดอยู่ในกลุ่มสร้างสมการทำนาย นำข้อมูลสเปกตรัมของการดูดกลืนค่าแสงที่ได้ (raw data) มาตรวจสอบตัดข้อมูลที่มีผิดปกติ (outlier) โดยใช้วิธีทางคณิตศาสตร์ ได้แก่ univariate analysis และ multivariate analysis (Leys et al., 2019) และปรับแต่งสเปกตรัมเพื่อลดสัญญาณรบกวน (noise) ด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ ได้แก่ smoothing แบบ Savitzky-Golay, first derivative (1D), second derivative (2D) แบบ Savitzky-Golay, standard normal variate (SNV) และการรวมเทคนิคปรับแต่งสเปกตรัมผสมตั้งแต่สองเทคนิคขึ้นไป แล้วนำไปสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นด้วยเทคนิค partial least squares regression (PLSR) โดยใช้โปรแกรม the Unscambler version 9.8 (Camo, Oslo, Norway) สร้างโมเดลเพื่อทำนายค่าปริมาณไนเตรทของตัวอย่างในกลุ่มทดสอบ สมการทำนายความแม่นยำของโมเดลพิจารณาจากค่าตัวแปรทางสถิติที่ได้จากสมการ คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของการทำนาย (correlation coefficient of prediction, R) ค่ารากที่สองของค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย (root mean squared error of prediction, RMSEP) โดยโมเดลที่เหมาะสมที่สุดควรมีค่า R สูง และ ค่า RMSEP ต่ำ (ประสาน, 2552)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากข้อมูลการดูดกลืนแสงที่ได้จากตัวอย่างที่ยังไม่ผ่านการปรับแต่งในช่วงความยาวคลื่น 900–1,700 นาโนเมตร (Figure 2A) พบว่า มีพีคสำคัญในช่วงความยาวคลื่น 1,400–1,500 นาโนเมตร เป็นโอเวอร์โทนอันดับที่หนึ่งของพันธะ O-H ของกรดคลอโรจีนิก น้ำ แอลกอฮอล์ และคาร์โบไฮเดรต (Correia et al., 2018) แต่หลังการปรับแต่งเพื่อลดสัญญาณรบกวนด้วยวิธี second derivative แบบ Savitzky-Golay ทำให้ตำแหน่งของพีคชัดเจนขึ้น (Figure 2B) ที่ความยาวคลื่น 957 1,154 1,408 และ 1,660 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยที่ความยาวคลื่น 1,408 นาโนเมตร เป็นช่วงการดูดกลืนของน้ำ (Mainali et al., 2014) และที่ความยาวคลื่น 1,660 นาโนเมตร เป็นโอเวอร์โทนอันดับที่หนึ่งของพันธะ C-H ของกลีซีน สตารซ์ โปรตีน และไนโตรเจน (Fourty et al., 1996) โดยทั่วไป องค์ประกอบทางเคมีของเจลจากใบว่านหางจระเข้ประกอบด้วยน้ำ 99.19% (ก่องกาญจน์, 2536) ซึ่งอาจจะไปบดบังหรือลดบทบาทการดูดกลืนแสงขององค์ประกอบอื่นๆ ได้เนื่องจากน้ำมีความสามารถในการดูดกลืนแสงย่านใกล้อินฟราเรดได้ดี (วารุณี และคณะ, 2555)

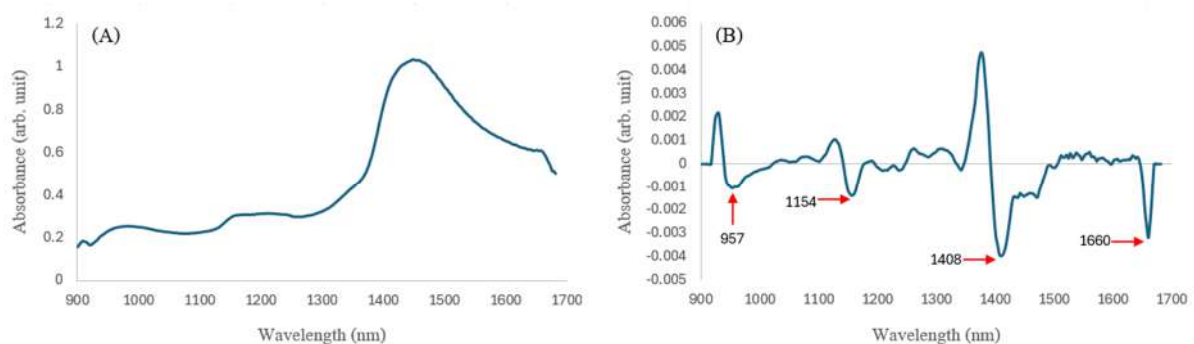


Figure 2 Original (A) and second derivative (B) spectra of aloe vera leaves

การสร้างสมการทำนายค่าปริมาณไนเตรทด้วยเทคนิค NIRS จากการวัดแบบสะท้อนกลับพบว่า การใช้ตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสงตรงตำแหน่งที่ 2 (กลางใบ) ให้ผลดีที่สุด โดยมีความหนาเปลือกเฉลี่ยที่ตำแหน่งโคนใบ กลางใบ และปลายใบ 2.10 1.80 และ 1.59 มม. ตามลำดับ และมีความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความหนาเปลือก 0.15 0.12 และ 0.13 ตามลำดับ ซึ่งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่บริเวณกลางใบมีค่าน้อยกว่าบริเวณอื่น สอดคล้องกับเหตุผลที่ว่า ส่วนกลางใบมีความหนาสม่เสมอมากกว่า จากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความหนาของเปลือกแต่ละตำแหน่งไม่เท่ากัน โครงสร้างของใบว่านทางจะเข้าบริเวณกลางใบมีความหนาที่

สม่เสมอมากกว่าเมื่อเทียบกับตำแหน่งโคนใบและปลายใบ ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงจากตำแหน่งกลางใบให้ผลดีที่สุด โดย R ของค่าจริงและค่าที่ทำนายได้มีค่า 0.75 RMSEP มีค่า 14.10 ไมโครกรัม/ก. และ bias มีค่า -0.46 ไมโครกรัม/ก. ส่วนการใช้ตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสงจากตำแหน่งที่ 3 (ปลายใบ) ให้ผลน้อยที่สุด R มีค่า 0.49 RMSEP มีค่า 17.71 ไมโครกรัม/ก. และ bias มีค่า -0.27 ไมโครกรัม/ก. (Table1) ดังนั้น จึงเลือกใช้ค่าการดูดกลืนแสงจากตำแหน่งกลางใบ เพื่อนำไปปรับแต่งสเปกตรัมในการสร้างโมเดลทำนายค่าปริมาณไนเตรท เนื่องจากให้ค่า R สูงที่สุด และ RMSEP bias ต่ำที่สุด

Table 1 Calibration and validation results of PLSR based on preprocessed spectra for predicting nitrate content in different positions of aloe vera leaf

Position	Factors	Calibration		Validation		
		R	RMSEC ($\mu\text{g/g}$)	R	RMSEP ($\mu\text{g/g}$)	Bias ($\mu\text{g/g}$)
Base	9	0.95	6.66	0.57	20.14	-2.43
Middle	11	0.98	3.71	0.75	14.10	-0.46
Apex	3	0.63	15.54	0.49	17.71	-0.27
Average	17	0.98	3.68	0.72	15.68	-0.81

RMSEC = Root mean squared error of calibration

RMSEP = Root mean squared error of prediction

สำหรับโมเดลที่ทำนายค่าปริมาณไนเตรทได้ดีที่สุด คือ สมการที่ปรับแต่งสเปกตรัมโดยใช้วิธีทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธี smoothing แบบ Savitzky-Golay ร่วมกับวิธี second derivative แบบ Savitzky-Golay สมการให้ค่า R สูงสุด 0.98 ค่า RMSEP 3.50 ไมโครกรัม/ก. มีค่าแฟกเตอร์ 16 (Table 2) ซึ่งเป็นจำนวนแฟกเตอร์ที่มีค่าสูง แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างของตัวอย่างใบว่านทางจะเข้ามีความซับซ้อนและ

ตัวอย่างมีความหลากหลาย มาจากแหล่งเพาะปลูกหลายแหล่ง จึงต้องใช้ข้อมูลสเปกตรัมจากแฟกเตอร์จำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย ของแก้วกานต์ และคณะ (2560) ในการวิเคราะห์ภาพสเปกตรัมอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR-HSI) สำหรับการคัดแยกเมล็ดถั่วเขียวโดยมีค่าแฟกเตอร์ 20 ซึ่งให้ค่า R สูงสุด และ RMSEP ต่ำสุด

Table 2 Statistical results for predicting nitrate content from PLSR models using various pretreatments

Pretreatment	Factors	Calibration (n = 60)				Prediction (n = 20)	
		R	RMSEC ($\mu\text{g/g}$)	R	RMSECV ($\mu\text{g/g}$)	R	RMSEP ($\mu\text{g/g}$)
Original	4	0.66	15.93	0.53	18.19	0.67	15.77
SMT	17	0.98	3.39	0.73	15.42	-0.07	53.68
1D	13	0.98	3.02	0.76	14.00	0.47	41,821.04
2D	11	0.98	3.71	0.75	14.10	0.58	9,236.74
SNV	2	0.64	16.38	0.56	17.73	0.62	17.32
1D + SNV	11	0.98	4.18	0.74	14.36	0.09	1,259.93
2D + SNV	8	0.96	5.35	0.72	14.85	-0.33	874.70
SMT + 1D	12	0.97	5.11	0.79	13.42	-0.01	64,004.13
SMT + 2D	16	0.98	3.50	0.95	5.99	0.98	3.50
SMT + SNV	14	0.97	4.63	0.72	15.75	0.11	598.23
SMT + 1D + SNV	11	0.96	5.35	0.78	13.73	0.09	651.55
SMT + 2D + SNV	12	0.97	4.73	0.79	13.24	0.03	193.43

SMT = Savitzky-Golay smoothing

1D = Savitzky-Golay first derivative

2D = Savitzky-Golay second derivative

SNV = Standard normal variate

การกระจายตัวของข้อมูลในการสร้างสมการทำนายค่าระหว่างปริมาณไนเตรทที่วัดได้จริง

เปรียบเทียบกับปริมาณไนเตรทที่ทำนายแสดงใน Figure 3

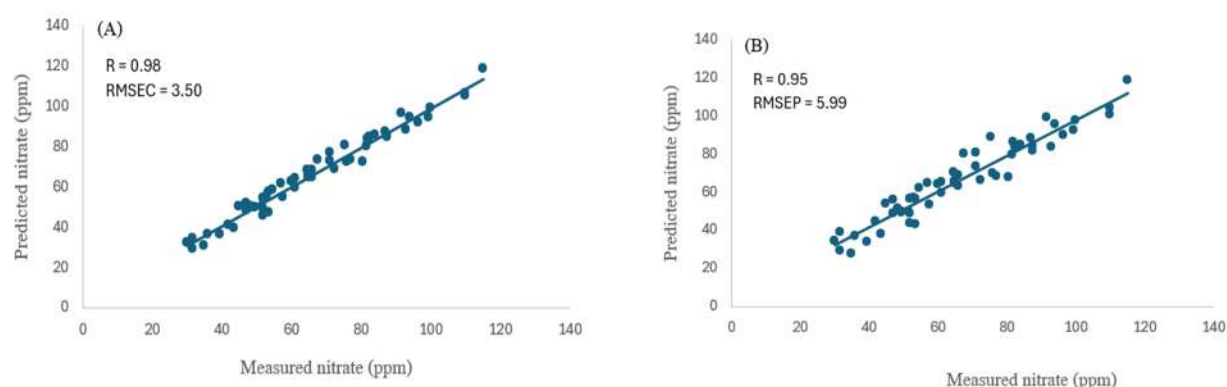


Figure 3 Scatter plots of measured nitrate content versus predicted nitrate content of aloe vera leaves in the calibration model (A) and validation model (B)

สัมประสิทธิ์การถดถอยของสมการทำนายที่มีอิทธิพล ได้แก่ ความยาวคลื่น 957 1,104 และ 1,154 นาโนเมตร (Figure 4) ผลการศึกษาที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Srivichien

et al. (2015) ที่ได้ทำการวัดค่าสเปกตรัมตัวอย่างโพแทสเซียมไนเตรท (Merck-99%) แล้วพบว่า พีคของไนเตรทอยู่ที่ความยาวคลื่น 963 1,096 และ 1,160 นาโนเมตร สัมประสิทธิ์การถดถอยของ

สมการทำนายที่มีอิทธิพลอื่น ๆ ได้แก่ความยาวคลื่น 976 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งการดูดกลืนของน้ำ และความยาวคลื่น 1,430 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งการดูดกลืนของพันธะ N-H จากเอไมด์ปฐมภูมิ (Workman and Weyer, 2012)

ในการเพิ่มประสิทธิภาพ และความเสถียรของสมการในการทำนายค่าปริมาณไนเตรทในใบว่านหางจระเข้แบบไม่ทำลายตัวอย่างโดยใช้

เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ อาจทำได้ โดยการใช้ตัวอย่างใบว่านหางจระเข้ที่มีความหลากหลายและมีความแตกต่างในด้านต่าง ๆ ได้แก่ พื้นที่ปลูก ฤดูกาลเก็บเกี่ยว อายุของใบ และจำนวนตัวอย่างที่นำมาทดสอบ (Phuangsoambut et al., 2023) เพื่อให้ข้อมูลครอบคลุมการเปลี่ยนแปลงที่กว้างขึ้น

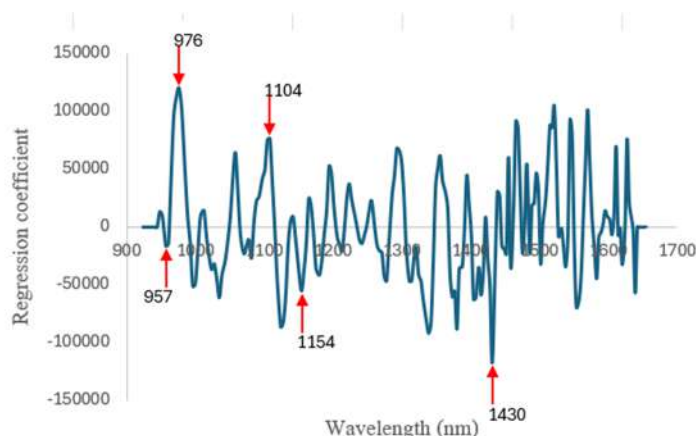


Figure 4 Regression coefficient of the calibration model for nitrate prediction

สรุปผลการทดลอง

การใช้เทคนิค NIRS ทำนายปริมาณไนเตรทในใบว่านหางจระเข้สดแบบไม่ทำลายตัวอย่างพบว่า การทำนายค่าปริมาณไนเตรทในใบว่านหางจระเข้ที่มีการวัดแบบสะท้อนกลับได้สมการทำนายที่ดีที่สุด โดยใช้วิธีปรับแต่งสเปกตรัมแบบวิธี smoothing แบบ Savitzky-Golay ร่วมกับวิธี second derivative แบบ Savitzky-Golay ได้ค่า R สูงสุด 0.98 และ ค่า RMSEP 3.50 ไมโครกรัม/ก. แสดงให้เห็นว่าเทคนิค NIRS มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ในการทำนายค่าปริมาณไนเตรทของใบว่านหางจระเข้แบบไม่ทำลายตัวอย่าง การเพิ่มประสิทธิภาพและ

ความเสถียรของสมการทำนายควรใช้ตัวอย่างใบว่านหางจระเข้ที่มีความหลากหลาย จากพื้นที่เพาะปลูกที่แตกต่างกัน ฤดูกาลเก็บเกี่ยว อายุของใบ รวมทั้งจำนวนตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ห้างหุ้นส่วนจำกัด บางกอก อโโล ที่ให้การสนับสนุนตัวอย่างใบว่านหางจระเข้ และงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์กำแพงแสนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

เอกสารอ้างอิง

- แก้วกานต์ พวงสมบัติ อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล อนุรักษ์
สุทธิวิจิตรภักดี อาทิตย์ พวงสมบัติ Satoru
Tsuchikawa Tetsuya Inagaki และ Te Ma. 2560.
การจำแนกเมล็ดถั่วเขียวสำหรับการเพาะงอก
ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีและการวิเคราะห์ภาพ
สเปกตรัมอินฟราเรดย่านใกล้. วารสารสมาคม
วิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย. 23(1): 23-29.
- กองกัญจน์ อังสุภาณิช. 2536. การศึกษากรรมวิธีการผลิต
ว่านหางจระเข้ผง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 152 หน้า.
- ประสาน เหล่าทรัพย์เจริญ. 2552. การศึกษาเชิงทดลอง
การใช้ข้อมูลสเปกตรัมเพื่อปรับปรุงการวัด
คุณภาพภายในของส้มและมะม่วงด้วยเทคนิค
สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 168 หน้า.
- วารุณี ณะแพสย์ คุมพร เกษมสำราญ ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์
อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล ปิธิพร ฤทธิเรืองเดช
ธงชัย สุวรรณสินธุ์ และรณฤทธิ์ ฤทธิธิน. 2555.
เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้
ในอุตสาหกรรม (Near-Infrared technology
and applications in industries). สถาบันค้นคว้า
และพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและ
อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
กรุงเทพฯ. 270 หน้า.
- วิวัฒน์ วิสุทธิโกศล บวรศิลป์ เขวซัน เสาวภา สุขวรรณรัตน์
ศิริพร ศรีอุไรรัตน์ และวิจิตร บุญพรคนาวิก.
2538. รายงานการศึกษาวานหางจระเข้ต่อบาดแผล
ไฟไหม้น้ำร้อนลวก. วารสารจดหมายเหตุทาง
แพทย์ แพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรม
ราชูปถัมภ์. 78(8): 403-409.
- สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์การค้า. 2566. ว่านหาง
จระเข้สมุนไพรศักยภาพของไทย. แหล่งข้อมูล:
<https://tpso.go.th/news/2310000000075>.
สืบค้น: 11 พฤศจิกายน 2566.
- สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร. 2566. สถานการณ์
การผลิตว่านหางจระเข้. แหล่งข้อมูล: <http://www.>
- [agriman.doae.go.th/home/news/year2566.html](http://www.agriman.doae.go.th/home/news/year2566.html). สืบค้น: 13 พฤศจิกายน 2566.
- Correia, R.M., F. Tosato, E. Domingos, R.R.T.
Rodrigues, L.F.M. Aquino, P.R. Filgueiras, V.
Lacerda Jr. and W. Romão. 2018. Portable
near infrared spectroscopy applied to
quality control of Brazilian coffee. Talanta.
176: 59-68.
- Fourty, T., F. Baret, S. Jacquemoud, G. Schmuck
and J. Verdebout. 1996. Leaf optical
properties with explicit description of
its biochemical composition: Direct and
inverse problems. Remote Sensing of
Environment. 56(2): 104-117.
- Fu, X., Y. Ying, H. Lu and H. Xu. 2007. Comparison of
diffuse reflectance and transmission mode
of visible-near infrared spectroscopy for
detecting brown heart of pear. Journal of
Food Engineering. 83(3): 317-323.
- Leys, C., M. Delacre, Y. L. Mora, D. Lakens and C.
Ley. 2019. How to classify, detect, and
manage univariate and multivariate
outliers, with emphasis on pre-registration.
International Review of Social Psychology.
32(1): 1-10.
- Mainali, D., J. Li, P. Yehl and N. Chetwyn. 2014.
Development of a comprehensive near
infrared spectroscopy calibration model for
rapid measurements of moisture content in
multiple pharmaceutical products. Journal
of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.
95: 169-175.
- Osborne, B.G., T. Fearn and P.H. Hindle. 1993. Practical
NIR Spectroscopy with Applications in Food
and Beverage Analysis. Longman Scientific
and Technical, Harlow. 227 p.
- Phuangsombut, A., K. Phuangsombut, J. Meetim and
A. Terdwongworakul. 2023. Application of

- miniaturized near-infrared spectrometer for indirectly determining flesh thickness of intact polished coconut. *Postharvest Biology and Technology*. 198(5): 112224.
- Santamaria, P. 2006. Nitrate in vegetables: Toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86(1): 10-17.
- Srivichien, S., A. Terdwongworakul and S. Teerachaichayut. 2015. Quantitative prediction of nitrate level in intact pineapple using Vis-NIRS. *Journal of Food Engineering*. 150: 29-34.
- Suga, T. and T. Hirata. 1983. The efficacy of the aloe plants chemical constituents and biological activities. *Cosmetics and Toiletries*. 98(6): 105-108.
- Terdwongworakul, A., N. Nakawajana, S. Teerachaichayut and A. Janhiran. 2012. Determination of translucent content in mangosteen by means of near infrared transmittance. *Journal of Food Engineering*. 109(1): 114-119.
- Williams, P. and K. Norris. 1987. *Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota. 330 p.
- Workman Jr., J. and L. Weyer. 2012. *Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-infrared Spectroscopy*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. 326 p.
- World Health Organization (WHO). 2002. *Evaluation of Certain Food Additives: Fifty-ninth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*. Geneva. 161 p.

สารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของถั่วเขียวงอกและทานตะวันงอก
Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Sprouted Mung Bean
and Sprouted Sunflower Seeds

บังอร ประจันบาล^{1/} สายใจ ปอสูงเนิน^{2/} สมคิด ใจตรง^{1/*}
Bung-on Prajanban^{1/} Saijai Posoongnoen^{2/} Somkit Jaitrong^{1/*}

Received 8 Jan. 2024/Revised 25 Feb. 2024/Accepted 6 Mar. 2024

ABSTRACT

Mung beans and sunflowers are widely consumed as vegetables during their early stages of germination. Mung bean and sunflower sprouts contain beneficial substances suitable for the development of healthy food products. The purpose of this study was to compare the effects of germination on the phytochemical profiles and antioxidant activity of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) cultivar Chainat84-1 and sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivar Aquara6 hybrid sprouts, as well as to determine the optimal germination period for use as raw materials in the production of nutritious foods. The germinating seeds were evaluated at 0 – 6 days after imbibition (DAI). Moisture content, dry matter, ascorbic acid content, water-soluble protein content, and total phenolic content (TPC) were measured. Antioxidant activities were determined by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. Results showed that sprouting mung bean and sprouting sunflower seeds' moisture content gradually increased, while dry matter decreased with time. Sprouting mung bean had the highest ascorbic acid content at 1 DAI (1.46 mg/100 g FW), whereas sprouting sunflower seeds had the highest ascorbic acid content at 3 DAI (0.58 mg/100 g FW). Water-soluble protein was highest in sprouting mung bean and sprouting sunflower seeds at 0 DAI of 9.81 and 5.16 mg/g FW, respectively. The highest TPC was found in sprouting mung bean at 4 DAI (46.82 mg GAE/g DW) and sprouting sunflower seeds at 0 DAI (134.70 mg GAE/g DW). Sprouting mung bean had the highest antioxidant activities in the DPPH assay at 4 DAI (IC₅₀ of 2.07 mg/mL) and FRAP at 6 DAI was 2.93 mg GAE/g DW while sprouting sunflower seeds had

Keywords: mung bean sprouts; sunflower sprouts; phytochemical; antioxidant activity

^{1/} คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว จ. สระแก้ว 27160

^{1/} Faculty of Agricultural Technology, Burapha University, Sakaeo Campus, Sakaeo 27160, Thailand

^{2/} สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา จ. นครราชสีมา 30000

^{2/} Division of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

* Corresponding author: somkit@buu.ac.th

the highest DPPH assay value at 0 DAI IC_{50} of 0.19, whereas at 1 and 2 DAI of 0.18 and 0.30 mg/mL, respectively while the highest FRAP value at 0 DAI was 11.62 mg GAE/g DW. The overall results indicated that mung beans and sunflower seeds at 0 DAI had the highest water-soluble protein, suitable for use as raw materials for the protein-based food products. Mung beans at 4 DAI and sunflower seeds at 0 DAI had the highest phenolic compounds and antioxidant activities that are suitable for producing health food products.

บทคัดย่อ

ถั่วเขียวและทานตะวันเป็นพืชที่นิยมรับประทานเป็นผักในระยะต้นกำลังงอก ทั้งถั่วเขียว และทานตะวันงอกมีสารที่มีประโยชน์เหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของการงอกต่อสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของถั่วเขียวงอก (*Vigna radiate* (L.) Wilczek) พันธุ์ชัยนาท84-1 และทานตะวันงอก (*Helianthus annuus* L.) พันธุ์ลูกผสมอะควอรา6 เพื่อหาระยะเวลาการงอกที่เหมาะสมในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ ทำการทดลองโดยให้เมล็ดถั่วเขียวและทานตะวันดูดซับน้ำแล้ว นำมาเพาะเมล็ด 0 - 6 วัน เพื่อทำการวิเคราะห์ความชื้น วัตถุแห้ง กรดแอสคอร์บิก โปรตีนละลายน้ำ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และวิธี ferric reducing antioxidant power ผลการทดลองพบว่า เมื่อ

ระยะเวลาการงอกมากขึ้นทั้งถั่วเขียวงอกและทานตะวันงอกมีความชื้นเพิ่มขึ้น ขณะที่น้ำหนักแห้งลดลง โดยถั่วเขียวงอกและทานตะวันงอก มีกรดแอสคอร์บิกสูงสุดที่ 1 วัน (1.46 มก./100 ก. น้ำหนักสด) และ 3 วัน (0.58 มก./100 ก. น้ำหนักสด) ตามลำดับ โปรตีนละลายน้ำของถั่วเขียวงอกและทานตะวันงอก สูงสุดที่ 0 วัน คือ 9.81 และ 5.16 มก./ก. น้ำหนักสด ตามลำดับ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของถั่วเขียวงอกสูงสุดที่ 4 วัน (46.82 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง) ส่วนทานตะวันงอก สูงสุดที่ 0 วัน (134.70 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ของถั่วเขียวงอก สูงสุดที่ 4 วัน IC_{50} มีค่า 2.07 มก./มล. และวิธี FRAP สูงสุดที่ 6 วัน มีค่า 2.93 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง ขณะที่ทานตะวันงอก ที่ 0 วัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH สูง IC_{50} มีค่า 0.19 โดยที่ 1 และ 2 วัน มีค่า 0.18 และ 0.30 มก./มล. ตามลำดับ วิธี FRAP ที่ 0 วัน มีค่าสูงสุด 11.62 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง ผลการทดลองในภาพรวมแสดงให้เห็นว่า ถั่วเขียวงอกและทานตะวันงอกที่ 0 วัน มีโปรตีนละลายน้ำมากที่สุด เหมาะที่จะนำไปเป็นวัตถุดิบเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีน ส่วนถั่วเขียวระยะเวลาการงอกที่ 4 วัน และทานตะวันที่ 0 วัน มีสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เหมาะที่จะนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

คำสำคัญ: ถั่วเขียวงอก; ทานตะวันงอก; สารพฤกษเคมี; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

บทนำ

ถั่วเขียว (*Vigna radiate* (L.) Wilczek) และทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชที่คนไทยนิยมรับประทานเป็นผักในช่วงระยะต้น

กำลังงอก (มยุรา และคณะ, 2562) ถั่วเขียวงอก และทานตะวันงอกอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์สูง เช่น กรดแอสคอร์บิก วิตามินอี โปรตีน สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (Guo et al., 2012) โปรตีนที่พบในเมล็ดพืชที่กำลังงอกเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนในเมล็ดจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนแล้วเปลี่ยนสภาพเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (water-soluble protein) เพื่อใช้สำหรับการงอก (Xue et al., 2016) ซึ่งโปรตีนที่ละลายน้ำได้เป็นปัจจัยสำคัญทั้งต่อคุณภาพของอาหารและผลผลิตโปรตีนที่แยกได้ โดยพบว่า เมื่อเริ่มต้นการงอกถั่วเขียวมีโปรตีนละลายน้ำ (0.76 มก./ก. น้ำหนักสด) น้อยกว่าถั่วเหลือง (1.74 มก./ก. น้ำหนักสด) และถั่วดำ (1.58 มก./ก. น้ำหนักสด) โดยโปรตีนละลายน้ำของถั่วเขียวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 0 - 2 วัน ของการงอก มีค่าสูงสุด 1.89 มก./ก. น้ำหนักสด ซึ่งมากกว่าในเมล็ด 2.49 เท่า ในขณะที่โปรตีนละลายน้ำของถั่วเหลืองและถั่วดำมีค่าผันผวนระหว่าง 1.5 และ 2.0 มก./ก. น้ำหนักสด หลังการงอก 6 วัน โปรตีนละลายน้ำมีแนวโน้มเพิ่มตามการเจริญเติบโต (Xue et al., 2016) กรดแอสคอร์บิกมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นขณะงอก (Guo et al., 2012; Xue et al., 2016) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการงอกของเมล็ด 13 ชนิด โดยทั่วไปพบว่า เมล็ดที่งอกอายุ 7 วัน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเมล็ดปกติ และเมล็ดที่ชุ่มน้ำ โดยทานตะวันงอกที่ 7 วัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเมล็ดชนิดอื่น ๆ ที่ทำการเพาะงอกที่ระยะเวลาเดียวกัน (Cevallos-Casals and Cisneros-Zevallos, 2010) ซึ่งกรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซีนี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ในร่างกาย ได้แก่

การช่วยรักษาสภาพของเส้นเลือดไม่ให้เปราะแตกง่าย ช่วยสมานเนื้อเยื่อ จำเป็นต่อการสังเคราะห์ และการรักษาสภาพของคอลลาเจน สเตรอยด์ ฮอร์โมน และเปปไทด์ฮอร์โมน (Hulmes, 1992) มีรายงานว่า กระบวนการงอกช่วยเพิ่มความเข้มข้นของวิตามินและความสามารถเชิงชีวภาพของแร่ธาตุต่าง ๆ ในเมล็ด (El-Adawy et al., 2004) ซึ่งปริมาณกรดแอสคอร์บิกของถั่วเขียวเพิ่มขึ้น 4.5 เท่า หลังจากแช่น้ำเป็นเวลา 16 ชม. เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดถั่วเขียวแห้งที่ไม่ได้แช่น้ำ (6.5 มก./100 ก. ของเมล็ด) (Moriyama and Oba, 2008) การศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกจากทานตะวันงอก 7 วัน พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าเมล็ดที่ดูดซับน้ำที่ 18 ° ซ. นาน 17 ชม. และเมล็ดแห้ง ซึ่งทานตะวันงอกที่ 7 วัน มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ 40.20 มก. Trolox equivalents/ก. ความเข้มข้นแห้งมากกว่าเมล็ดทานตะวันที่ดูดซับน้ำ คือ 25.57 มก. Trolox equivalents/ก. ความเข้มข้นแห้ง (Cevallos-Casals and Cisneros Zevallos, 2010) นอกจากนี้ต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์แปซิฟิกอายุ 5 วัน มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 14.38 มก. สมมูลของกรดแอสคอร์บิก/100 ก. น้ำหนักสด และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 73.09 มก. สมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อ 100 ก. น้ำหนักสด (มยุรา และคณะ, 2562)

จากข้อมูลข้างต้น จะเห็นได้ว่าในช่วงการงอกของเมล็ดถั่วเขียวและทานตะวันมีสารอาหารต่าง ๆ ที่มีคุณประโยชน์สูง เมล็ดถั่วเขียวงอกมี quercetin-3-O-glucoside สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ วิตามินซี และสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามระยะเวลาการงอก (Guo et al., 2012) ส่วนทานตะวันงอกอุดมไปด้วยไซนาริน (cynarin: 1,5-dicaffeoylquinic acid) สูง

ซึ่งเป็นสารพฤษเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นส่วนประกอบอาหารเชิงฟังก์ชัน (functional food components) ที่ช่วยลดคอเลสเตอรอล ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Gezer, 2017) อีกทั้งยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้ง AGEs (advanced glycation end products) ที่อาจเป็นอาหารทางเลือกที่เป็นประโยชน์สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Sun et al., 2012)

การนำถั่วเขียวงอกและทานตะวันงอกไปพัฒนาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพจึงมีความเป็นไปได้ในอนาคต อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารอาหาร หรือสารพฤษเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของถั่วเขียวและทานตะวันแต่ละพันธุ์ในระหว่างกระบวนการงอกอาจแตกต่างกัน ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาของการงอกต่อการเปลี่ยนแปลงของสารพฤษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของถั่วเขียวงอกและทานตะวันงอก โดยใช้ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท84-1 และทานตะวันพันธุ์ลูกผสมอะควอรา6 เพื่อหาระยะการงอกของเมล็ดที่เหมาะสมในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท84-1 ตรารศแดง (บริษัท อีสท์ เวสต์ซีด จำกัด) และเมล็ดทานตะวันพันธุ์ลูกผสมอะควอรา6 (บริษัท แปซิฟิกเมล็ดพันธุ์ จำกัด) ล้างด้วยน้ำสะอาด นำมาแช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 6 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาวางบนกระดาษทิชชูชุ่มน้ำ พ่นน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มล./วัน ทุก 12 ชม. เก็บไว้ในที่มืดโดยคลุมด้วยผ้าใบทึบแสง ที่อุณหภูมิห้อง $28 \pm 3^{\circ}$ ซ. เป็นเวลา 1 – 6 วัน

(ตัวอย่างควบคุม 0 ชม.) ตามกรรมวิธีเพาะงอกเมล็ดถั่วเขียวและเมล็ดทานตะวันในระยะเวลาต่าง ๆ ที่ 0 1 2 3 4 5 และ 6 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 7 กรรมวิธี 3 ซ้ำ วัดขนาดความยาวของเมล็ดถั่วเขียวและทานตะวัน ภายหลังจากการเพาะงอก 1 วัน จนถึง 6 วัน

2. การหาความชื้นและวัตถุแห้ง

นำถั่วเขียวและทานตะวันที่เพาะงอกระยะเวลาต่าง ๆ น้ำหนัก 10 ก. ทำการทดลองตัวอย่างละ 5 ซ้ำ เพื่อหาความชื้นและวัตถุแห้ง โดยดัดแปลงจากวิธี AOAC (1990) ดังนี้ อบตัวอย่างด้วยตู้อบลมร้อนสุญญากาศ (Mettler, Germany) ที่อุณหภูมิ 60° ซ. ความดัน 15 มิลลิบาร์ นาน 72 ชม. จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักหลังอบ และคำนวณปริมาณความชื้นและวัตถุแห้ง

3. การวัดปริมาณกรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี)

นำถั่วเขียวและทานตะวันที่เพาะงอกระยะเวลาต่าง ๆ มาบดละเอียด ชั่งน้ำหนัก 10 ก. แล้วสกัดและปรับปริมาตรด้วยกรดออกซาลิก (Merck, Germany) ความเข้มข้น 0.4% ให้ครบ 100 มล. เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิ $5 \pm 2^{\circ}$ ซ. แล้วนำมารองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นปิเปตสารสกัด ปริมาตร 10 มล. มาวัดปริมาณกรดแอสคอร์บิก ด้วยวิธีการไทเทรตกับสารละลายอินโดฟีนอล (Ajax FineChem, New Zealand) ความเข้มข้น 0.04% จนถึงจุดยุติ โดยคำนวณเทียบกับกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน (Fisher Scientific, UK) (AOAC, 1995) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ไทเทรตซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยและนำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณวิตามินซี รายงานเป็นมก./100 ก. น้ำหนักสด

4. การวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ

นำตัวอย่างถั่วเขียวและทานตะวันทีเพาะงอก น้ำหนัก 1 ก. มาบดให้ละเอียดด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 5 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ. จากนั้นนำส่วนใสมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976)

5. การสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

นำถั่วเขียวและทานตะวันทีเพาะงอก ระยะเวลาต่าง ๆ ที่บดละเอียดแล้ว น้ำหนัก 10 ก. สกัดด้วยอะซิโตน 80% เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 4° ซ. โดยทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง จากนั้น นำสารสกัดมาระเหยแยกอะซิโตนออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50° ซ. จากนั้นนำสารสกัดมาทำให้แห้งก่อนนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดวิเคราะห์โดยวิธี Folin-Ciocalteu method ดัดแปลงจากวิธีของ Singleton et al (1999) และ Guo et al. (2012) เติมน้ำสกัดความเข้มข้น 2 มก./มล. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มี deionized water ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมน้ำละลาย Folin-Ciocalteu เข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้น เติมน้ำละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 7% ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และ deionized water ปริมาตร

800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที โดยเปิดแต่ละตัวอย่างมา 200 ไมโครลิตร เติมน้ำลงใน 96-well plate นำมาวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate readers (TECAN Infinite M200Pro, Austria) ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid, GAE) หน่วยของสารฟีนอลิก คือ มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง

6. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

6.1 วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

ทำการวิเคราะห์ดัดแปลงจากวิธีของนิรามัย และบังอร (2563) โดยนำสารสกัดของถั่วเขียวและทานตะวันเพาะงอกที่ระยะเวลาต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 0.25 – 4 มก./มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate readers (TECAN Infinite M200Pro, Austria) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก นำค่าที่ได้มาคำนวณหา % DPPH radical scavenging และคำนวณหาค่า % การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC₅₀) จากผลการทดลองที่ได้จากการคำนวณหาค่า % DPPH radical scavenging ตามสูตรคำนวณดังนี้

$$\% \text{ DPPH radical scavenging} = [(\text{Control A517nm} - \text{Sample A517nm}) / \text{Control A517nm}] \times 100$$

Control A517nm = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของชุดควบคุม

Sample A517nm = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของตัวอย่างทดสอบ

6.2 วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ทำการวิเคราะห์โดยดัดแปลงจากวิธีของ นิรามัย และบังอร (2563) โดยทำการเตรียม สารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 300 มิลลิโมลาร์ acetate buffer (pH 3.6) สารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ FeCl_3 และสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl นำสารที่ได้มาผสม กันในอัตราส่วน 10:1:1 โดยสารสกัดแต่ละชนิด ละลายด้วย DMSO แล้วปิเปตจำนวน 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate แล้วเติม FRAP reagent จำนวน 180 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่ มืด เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ซึ่งผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิกในหน่วย มก. สมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อ กรัมของสารสกัด (มก.กรดแอสคอร์บิก/ก. น้ำหนักแห้ง)

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทดสอบค่าความแตกต่างของความขึ้นวัตถุ แห้ง กรดแอสคอร์บิก ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมด และการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก

ถั่วเขียวเพาะงอกและทานตะวันที่เพาะงอก โดยการ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ของข้อมูลหากผลมี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ least significant difference method (LSD) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistix8

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ขนาดความยาว

เมล็ดถั่วเขียวและทานตะวัน เริ่มงอกภาย หลังจากการเพาะงอก 1 วัน จากนั้นค่อย ๆ เพิ่ม ขนาดและความยาวในช่วงระยะเวลาที่ทำการเพาะ งอก โดยในวันที่ 6 ของการเพาะงอกมีความยาว 24.23 และ 16.88 ซม. ตามลำดับ (Figure 1) ซึ่ง ระยะการเพาะงอกในวันที่ 6 ถั่วเขียวงอกมีความ ยาวใกล้เคียงกับการศึกษาของ Xue et al. (2016) ที่เพาะถั่วเขียวงอกที่ 6 วันมีความยาว 24.77 ซม. นอกจากนี้ ยังพบว่า ขนาดและความ ยาวของถั่วเขียวและทานตะวันมีความสัมพันธ์กับ ปริมาณความชื้น โดยปริมาณความชื้นของต้นอ่อน ถั่วเขียวและทานตะวันเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการ เพาะงอกที่นานขึ้น

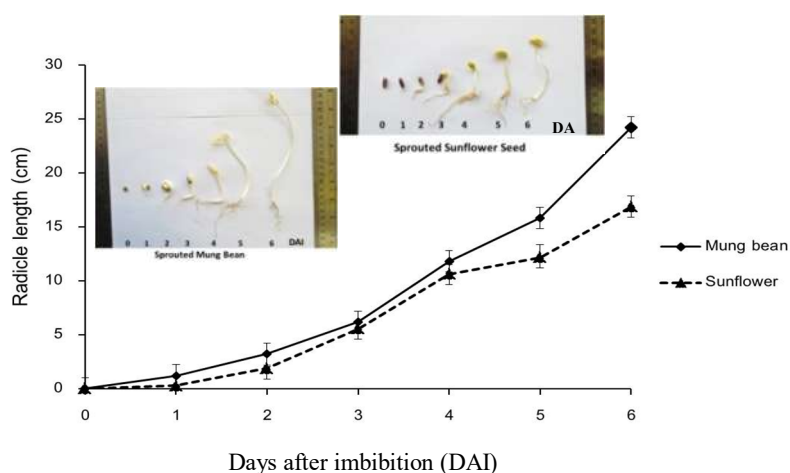


Figure 1 Radicle length of sprouted mung bean and sprouted sunflower seeds at different germination times

2. ความชื้นและวัตถุแห้ง

ปริมาณความชื้นของต้นอ่อนถั่วเขียวและทานตะวันงอกค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามระยะเวลาในการเพาะงอก โดยปริมาณความชื้นในถั่วเขียว ในวันที่ 0 คือ 33.16% และเพิ่มเป็น 91.84% ในวันที่ 6 ของการเพาะงอก ขณะที่ทานตะวัน เพิ่มขึ้นจาก 21.95 เป็น 91.58% (Figure 2) สอดคล้องกับ Shah et al. (2011) พบการเพิ่มขึ้นของระดับความชื้นในเมล็ดถั่วเขียว หลังจากการงอก 96 ชม. ซึ่งปริมาณความชื้นใน

เมล็ดที่เพิ่มขึ้น เป็นผลเนื่องมาจากปริมาณการดูดน้ำของเมล็ด ระยะเวลาในการดูดน้ำ และจำนวนเซลล์ที่ขาดน้ำในเมล็ดพืช (Nonogaki et al., 2010) ในทางตรงกันข้ามวัตถุแห้งค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลาการเพาะงอกที่เพิ่มขึ้น ซึ่งวัตถุแห้งในต้นอ่อนทานตะวันและถั่วเขียว มีค่าสูงที่สุดในวันที่ 0 คือ 78.05 และ 66.84% จากนั้นลดลงเป็น 8.42 และ 8.16% ในวันที่ 6 ของการเพาะงอก ตามลำดับ (Figure 2)

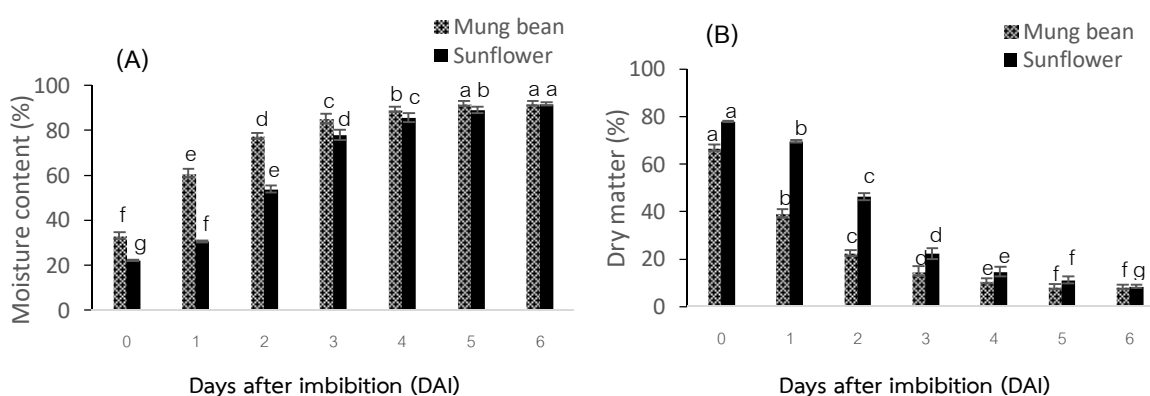


Figure 2 Moisture content (A) and dry matter (B) of sprouted mung bean and sprouted sunflower seeds at different germination times

3. ปริมาณกรดแอสคอร์บิก

ปริมาณกรดแอสคอร์บิกในถั่วเขียวงอกมีมากกว่าทานตะวันงอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดย ปริมาณกรดแอสคอร์บิกในถั่วเขียวเพิ่มสูงขึ้นเร็วกว่าทานตะวัน ประมาณ 1 - 2 วัน และสอดคล้องกับการเพิ่มขนาดและความยาวของต้นอ่อน โดยถั่วเขียวงอกมีกรดแอสคอร์บิกสูงสุดที่ 1 วัน (1.46 มก./100 ก. น้ำหนักสด) ขณะที่ทานตะวันงอกพบสูงสุดที่ 3 วัน (0.58 มก./100 ก. น้ำหนักสด) และกรดแอสคอร์บิกค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลาการเพาะงอกที่เพิ่มขึ้น (Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shah et al. (2011)

ที่พบปริมาณวิตามินซีในถั่วเขียวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากการงอก 24 ชม. นอกจากนี้ Maneemegalai and Nandkumar (2011) พบว่า เมล็ดถั่วเขียวแห้งมีปริมาณกรดแอสคอร์บิก 8.8 มก. เพิ่มเป็น 11.8 7.6 และ 20.6 มก./100 ก. ของเมล็ด หลังจากการงอก 24 48 และ 72 ชม. ตามลำดับ ประกอบกับ Moriyama and Oba (2008) รายงานว่า ปริมาณกรดแอสคอร์บิกของถั่วเขียวเพิ่มขึ้น 4.5 เท่า หลังจากแช่น้ำเป็นเวลา 16 ชม. (29.2 มก./100 ก. ของเมล็ด) เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดถั่วเขียวแห้งที่ไม่ได้แช่น้ำ (6.5 มก./100 ก. ของเมล็ด) สอดคล้องกับ Thippeswamy et al. (2015) พบว่า ในเมล็ด

ถั่วเขียวระยะเมล็ดแห้งมีปริมาณกรดแอสคอร์บิก 27 มก. หลังแช่น้ำ 12 ชม. เพิ่มขึ้น 79.06 มก. และเพิ่มสูงสุดเป็น 4.2 เท่า ในวันที่ 4 ของการงอก คือ 114 มก./100 ก. ของเมล็ด จากนั้น คงที่ถึง วันที่ 6 และลดลงเป็น 87 มก./100 ก. ของเมล็ด ในวันที่ 7 ซึ่งการสังเคราะห์กรดแอสคอร์บิกที่เกิดขึ้น ในระหว่างการงอกมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ L-galactono- γ -lactone dehydrogenase ทำให้ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ L-galactono-1,4-

lactone เปลี่ยนไปเป็นกรดแอสคอร์บิก แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์นี้ช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์กรดแอสคอร์บิกในระหว่างการงอก (Xu et al., 2005) อย่างไรก็ตาม ปริมาณการสังเคราะห์กรดแอสคอร์บิกที่เกิดขึ้นในระหว่างการงอก ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ระยะบริบูรณ์ของเมล็ด สภาพที่งอก แสง วิธีการเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษา เป็นต้น (Davey et al., 2000)

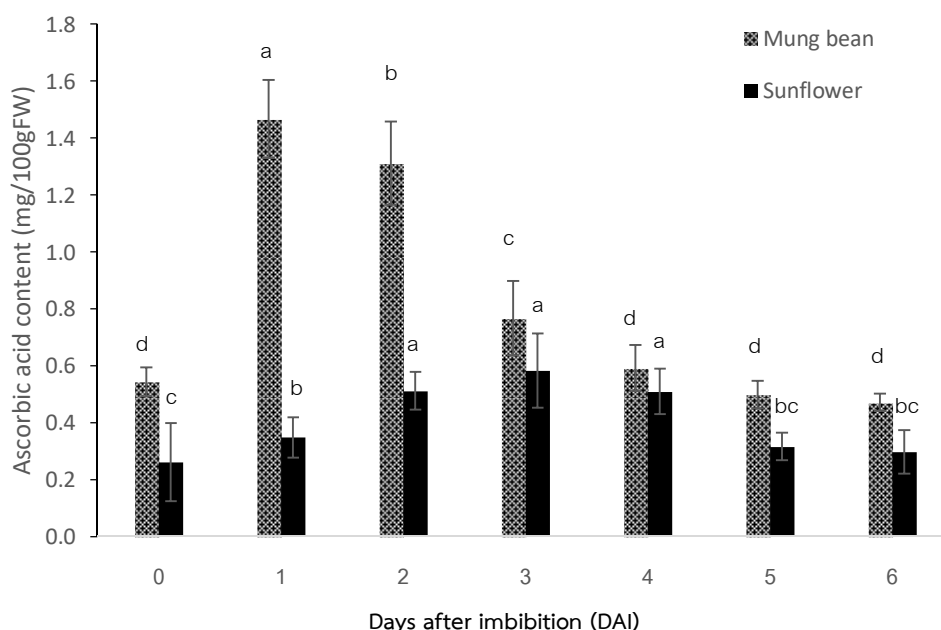


Figure 3 Ascorbic acid content of sprouted mung bean and sprouted sunflower seeds at different germination times

4. ปริมาณโปรตีนละลายน้ำ

ที่ 0 วัน มีปริมาณโปรตีนละลายน้ำสูงที่สุด โดยถั่วเขียวพบโปรตีนที่ละลายน้ำ 9.81 มก./ก. น้ำหนักสด มากกว่าทานตะวันที่พบโปรตีนละลายน้ำ 5.16 มก./ก. น้ำหนักสด ในการเพาะงอกที่ 1 และ 2 วัน ถั่วเขียวพบโปรตีนที่ละลายน้ำ 4.04 และ 3.71 มก./ก. น้ำหนักสด ตามลำดับ น้อยกว่า ทานตะวัน 4.37 และ 4.44 มก./ก. น้ำหนักสด ตามลำดับ จากนั้นปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำ

ของถั่วเขียวและทานตะวันเพาะงอกเริ่มลดลงตามระยะเวลาการเพาะงอกที่เพิ่มขึ้น (Figure 4) อาจเนื่องจากโปรตีนที่เก็บสะสมไว้ในเมล็ด ได้นำมาใช้ในรูปแบบของกรดอะมิโน และต้องการพลังงานที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน เพื่อการเจริญเติบโตในระหว่างการงอกและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของพืชตระกูลถั่ว โดยสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของโปรตีนในเมล็ดและการงอกของเมล็ด (Ohanenye et al., 2020) ซึ่งมีการรายงานปริมาณ

ของโปรตีนที่พบในเมล็ดถั่วเขียว คือ 20.97 - 31.32% (Anwar et al., 2007) ใกล้เคียงกับโปรตีนที่พบในเมล็ดทานตะวัน คือ 33.85% (Petraru et al., 2021) โปรตีนที่ละลายน้ำได้น้อย ทำให้ได้ผลผลิตอาหารน้อย ส่งผลให้โปรตีนเกิดการแยกตัวและตกตะกอน ก่อให้เกิดการกระจายตัวในผลิตภัณฑ์อาหารไม่สม่ำเสมอ โดยโปรตีนที่ละลายน้ำได้มากมีผลต่อคุณภาพของอาหารในด้านคุณสมบัติอิมัลชันและการเกิดฟองที่ดีกว่าโปรตีนที่ละลายน้ำได้น้อย (Lu et al., 2013) ในการศึกษาครั้งนี้พบโปรตีนละลายน้ำตรงกันข้ามกับการรายงานของ Xue et al. (2016) ที่พบว่า ในถั่วเขียวมีโปรตีนละลายน้ำมีนัยสำคัญเพิ่มขึ้นในวันที่เพาะงอก 0 - 2 วัน ซึ่งมีโปรตีน

ละลายน้ำที่เป็นองค์ประกอบสูงสุด 1.89 มก./ก. น้ำหนักสด แต่ในการทดลองนี้พบว่า ถั่วเขียวและทานตะวันเพาะงอกมีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำลดลงตามระยะเวลาการงอก ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของสภาวะการงอก และความหลากหลายทางสายพันธุ์ (Xue et al., 2016) ดังนั้น ถ้านำโปรตีนละลายน้ำจากถั่วเขียวและเมล็ดทานตะวันเพาะงอกไปต่อยอดเป็นวัตถุดิบผลิตอาหารโปรตีนเพื่อสุขภาพ ควรนำโปรตีนละลายน้ำในระยะ 0 วัน ภายหลังจากการแช่น้ำกลั่น 6 ชม. ดีที่สุด รองลงมา คือ ระยะเวลาการงอก 1 - 2 วัน ตามลำดับ

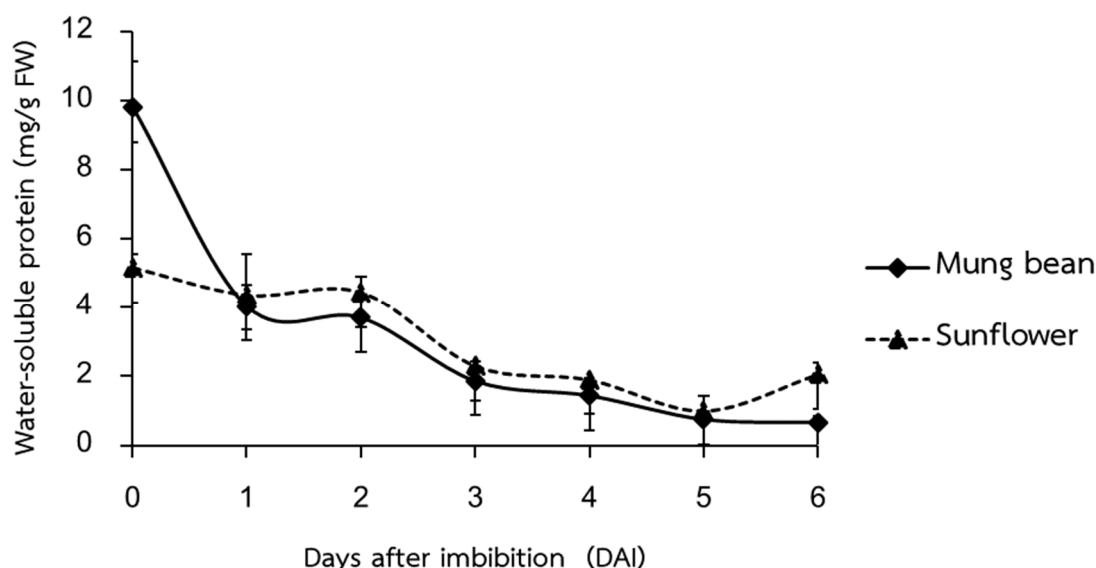


Figure 4 Water-soluble protein content of sprouted mung bean and sprouted sunflower seeds during germination periods

5. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ที่พบในถั่วเขียวสูงสุดที่ระยะเวลาเพาะงอก 4 วัน คือ 46.82 ± 3.27 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง จากนั้นค่อย ๆ ลดลงเมื่อเพาะงอกวันที่ 5 - 6 (Figure 5) อย่างไรก็ตาม ในระหว่างกระบวนการงอก สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของทานตะวันมีปริมาณมากกว่าถั่วเขียว

เพาะงอก โดยพบมากที่สุด 134.70 ± 4.35 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง ที่ 0 วัน และค่อย ๆ ลดลงเมื่อระยะเวลาการงอกเพิ่มขึ้นโดย Guo et al. (2012) รายงานว่า สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในถั่วเขียวที่เพาะงอกจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น เป็น 996.4 มก. กรดแกลลิก/100 ก. น้ำหนักแห้ง ในวันที่ 9 ของการเพาะงอก แต่ในขณะที่ Xue et al. (2016) รายงานว่า

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในถั่วเขียวมากที่สุด คือ 5.79 มก. กรดแกลลิก/ก. ที่ระยะเวลาเพาะงอก 5 วัน ซึ่งปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ของถั่วเขียวและวิธีการ สกัด ในระหว่างกระบวนการงอก สารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมดของทานตะวันมีปริมาณมากกว่า ถั่วเขียวเพาะงอก และสารประกอบฟีนอลิกของ ทานตะวันงอกค่อย ๆ ลดลงเมื่อระยะเวลาการเพาะ งอกที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยต้นอ่อน ทานตะวัน 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์จัมโบ้ แปซิฟิก และอาตุเอล เมื่อต้นอ่อนมีอายุเพิ่มขึ้น ปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มลดลง (มยุรา และคณะ, 2562) และสอดคล้องกับรายงานการงอกจากเมล็ด

ที่รับประทานได้หรือการเจริญของต้นอ่อน เช่น ทานตะวัน ข้าวสาลี ถั่วเลนทิล และบรอกโคลี มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลงเมื่อคำนวณในฐาน น้ำหนักสดเมื่อต้นอ่อนมีอายุเพิ่มขึ้น เนื่องจาก การ ดูดน้ำของเมล็ด (imbibition) การเจริญของต้นอ่อน และการดูดซึมน้ำ (water absorption) ที่เพิ่มขึ้น มีผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดถูกเจือจางลง (Cevallos-Casals and Cisneros-Zevallos, 2010) เช่นเดียวกับผลการทดลองของผู้วิจัยที่พบว่า เมล็ดมี การดูดน้ำเพิ่มขึ้นทำให้ความชื้นของทานตะวันงอก เพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 6 วัน (Figure 2A) โดยปริมาณน้ำ ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการงอกของทานตะวัน ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเจือจางลง

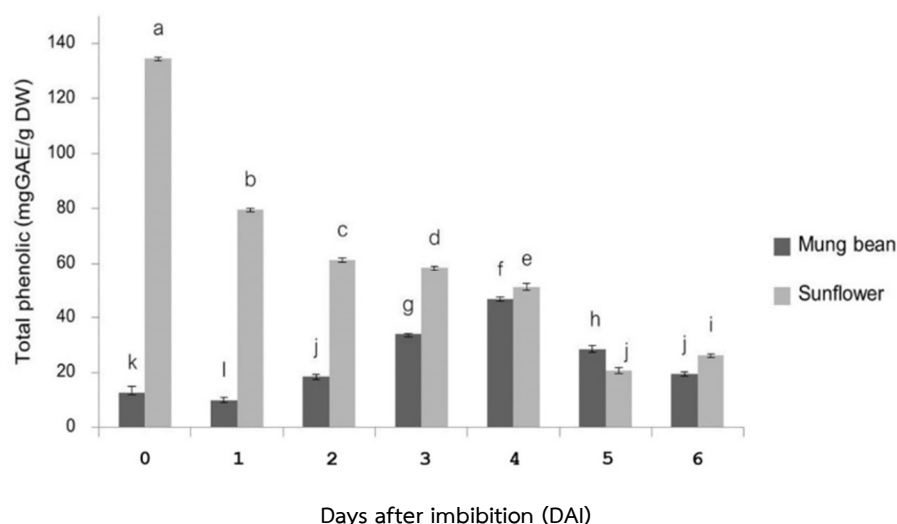


Figure 5 Total phenolic content of sprouted mung bean and sprouted sunflower seeds during germination periods

6.ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัดที่ได้จากถั่วเขียวงอกมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH สูงสุด ที่ระยะเพาะงอก 4 วัน มีค่า IC_{50} 2.07 ± 0.17 มก./มล. ส่วนสารสกัดจากทานตะวันงอก ที่ 0 - 2 วัน มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า IC_{50} 0.19 ± 0.14 มก./มล. 0.18 ± 0.12 มก./มล. และ 0.30 ± 0.07 มก./มล. ตามลำดับ (Table 1) นอกจากนี้

สารสกัดถั่วเขียวมี FRAP ได้ดีที่สุด ที่การเพาะงอก 6 วัน (2.93 ± 0.19 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง) ส่วนสารสกัดทานตะวันเพาะงอกที่ 0 วัน มี FRAP ดีที่สุด (11.62 ± 0.26 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง) รองลงมา คือ สารสกัดทานตะวันเพาะงอกที่ 1 วัน (11.10 ± 0.53 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง) และ 2 วัน (8.66 ± 0.10 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Radical scavenging capacity of sprouted mung bean and sprouted sunflower seeds during germination periods

Plant	Days after imbibition (DAI)	DPPH assay ^{1/} (IC ₅₀ , mg/mL)	FRAP ^{1/} (mg GAE/g)
Mung bean	0	4.84±0.10 a	1.04±0.07 i
	1	4.26±0.21 b	1.23±0.08 i
	2	3.85±0.10 c	1.36±0.05 i
	3	2.86±0.05 d	2.65±0.07 fg
	4	2.07±0.17 f	2.15±0.03 h
	5	2.34±0.01 e	2.38±0.03 gh
	6	2.40±0.03 e	2.93±0.19 ef
Sunflower	0	0.19±0.14 i	11.62±0.26 a
	1	0.18±0.12 i	11.10±0.53 b
	2	0.30±0.07 i	8.66±0.10 c
	3	1.29±0.10 h	5.95±0.19 d
	4	1.67±0.05 g	2.73±0.03 fg
	5	1.73±0.14 g	2.60±0.01 fg
	6	1.86±0.11 fg	3.26±0.09 e
Ascorbic acid	-	0.31±0.18	ND

^{1/} Means in the same column followed by a common letter are not significantly difference at the 5% level by LSD

ND = No determination

การงอกของผักและพืชอื่น ๆ เป็นแหล่งของอาหารที่อุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Baczek-Kwinta and Sala, 2012) จากการนำสารสกัดที่ได้จากถั่วเขียวงอกพันธุ์ชัยนาท84-1 และทานตะวันงอกพันธุ์ลูกผสมอะควอรา6 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาการเพาะงอก พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงขึ้นตามความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นทั้งในถั่วเขียวและทานตะวันเพาะงอก ทานตะวันเพาะงอกมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ซึ่ง Cevallos-Casals and Cisneros-

Zevallos (2010) พบว่า เมล็ดทานตะวันมีสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบที่มีโครงสร้างของโมเลกุลหลายตำแหน่งที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของ DPPH ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เมล็ดทานตะวันจะมีการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก เพื่อเป็นการป้องกันการเจริญเติบโตของไฮโฟคอทิล เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่จะถูกกระตุ้นโดยปัจจัยของสิ่งแวดล้อมในระยะแรกของการงอกซึ่งมากกว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั่วไป โดยต้นอ่อนทานตะวันภายหลังจากการเพาะงอกวันที่ 6 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลงทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ลดลงด้วย

สรุปผลการทดลอง

การเปรียบเทียบผลของการงอกต่อการเปลี่ยนแปลงของสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ถั่วเขียวงอกพันธุ์ชัยนาท84-1 มีกรดแอสคอร์บิกสูงสุดที่ 1 วัน (1.46 มก./100 ก. น้ำหนักสด) ขณะที่ทานตะวันงอกพันธุ์ลูกผสมอะควอรา6 พบสูงสุดที่ 3 วัน (0.58 มก./100 ก. น้ำหนักสด) แล้วค่อย ๆ ลดลง ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำของถั่วเขียว และทานตะวัน ที่ 0 วัน คือ 9.81 และ 5.16 มก./ก. น้ำหนักสด ตามลำดับ จากนั้นโปรตีนก็ค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลาการเพาะงอกที่เพิ่มขึ้น ถั่วเขียวงอกมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดที่ 4 วัน (46.82 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง) ส่วนทานตะวันงอกสูงสุดที่ 0 วัน (134.70 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง) หลังจากนั้นสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดค่อย ๆ ลดลง โดยถั่วเขียวมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ที่การเพาะงอก 4 วัน โดย IC_{50} มีค่า 2.07 ± 0.17 มก./มล. และมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกได้สูงสุดที่การเพาะงอก 6 วัน (2.93 ± 0.19 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง) ในขณะที่ทานตะวันมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงตามระยะเวลาการเพาะงอกที่เพิ่มขึ้น โดยสารสกัดจากทานตะวันงอกที่ 0 - 2 วัน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดที่ IC_{50} มีค่า 0.19 ± 0.14 0.18 ± 0.12 และ 0.30 ± 0.07 มก./มล. ตามลำดับ และมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก 11.62 ± 0.26 11.10 ± 0.53 และ 8.66 ± 0.10 มก. กรดแกลลิก/ก. น้ำหนักแห้ง ตามลำดับผลการทดลองสรุปได้ว่า ถั่วเขียวงอกและทานตะวันงอกที่ 0 วัน มีโปรตีนละลายน้ำมากที่สุด เหมาะที่จะนำไปเป็นวัตถุดิบเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีน ส่วนถั่วเขียวงอกที่ระยะเวลา 4 วัน และทานตะวันที่

0 วัน มีสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เหมาะที่จะนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- นิราภัย ผางกระโทก และบังอร ประจันบาล. 2563. ผลของสารสกัดเอทานอลใบชาต่อการเกิดโฟมเซลล์และผลของอายุใบและฤดูกาลเก็บเกี่ยวต่อปริมาณสารพฤกษเคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระความเป็นพิษต่อเซลล์และการสร้างไนตริกออกไซด์. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 16(3): 67-77.
- มยุรา ทองช่วง ฉัตรกมล คุณสมบัติ รุ่งนภา ไช้ทองวรรณ นาคนาวา กิตติศาสตร์ กระบวน วชิราภรณ์ อาชวาคม และนุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล. 2562. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ต่าง ๆ และอายุที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยว. วารสารวิทยาศาสตร์ประยุกต์. 18(2): 79-96.
- Anwar, F., S. Latif, R. Przybylski, B. Sultana and M. Ashraf. 2007. Chemical composition and antioxidant activity of seeds of different cultivars of mungbean. Journal of Food Science. 72: 503-510.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, V. A. USA.
- Baczek-Kwinta R. and A. Sala. 2012. What the antioxidant activity of sprouts depends on?. Oxidation Communications. 35: 990-1000.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

- Cevallos-Casals, B.A. and L. Cisneros-Zevallos. 2010. Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry*. 119: 1485-1490.
- Davey, M.W., M.U. Montagu, D. Inze, M. Sanmartin, A. Kanellis and N. Smirnoff. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 825-850.
- El-Adawy, T.A., E.H. Rahma, A.A. El-Bedawey and A.E. El-Beltagy. 2004. Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea and lentil seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*. 58(3): 1-13.
- Gezer, C. 2017. Potential health effects of the popular compound of artichoke: Cynarin. *Progress in Nutrition*. 19(1): 5-9.
- Guo, X., T. Li, K. Tang and R.H. Liu. 2012. Effect of germination on phytochemical profiles and antioxidant activity of mung bean sprouts (*Vigna radiata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 11050-11055.
- Hulmes, D.J. 1992. The collagen super family-diverse structures and assemblies. *Essays in Biochemistry*. 27: 49-67.
- Lu, W., Z. Wen, H. Li, D. Yuan, J. Li, H. Zhang, Z. Huang, S. Cui and W. Du. 2013. Identification of the quantitative trait loci (QTL) underlying water-soluble protein content in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*. 126(2): 425-433.
- Maneemegalai, S. and S. Nandakumar. 2011. Biochemical studies on the germinated seeds of *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek, *Vigna mungo* (L.) Hepper and *Pennisetum typhoides* (Burm f.) Stapf and CE Hubb. *International Journal of Agricultural Research*. 6(7): 601-606.
- Moriyama, M. and K. Oba. 2008. Comparative study on vitamin C contents of food legume seeds. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 54(1): 1-6.
- Nonogaki, H., G.W. Bassel and J.W. Bewley. 2010. Germination-still a mystery. *Plant Science*. 179: 574-581.
- Ohanenye, I.C., A. Tsopmo, C.E. Ejike and C.C. Udenigwe. 2020. Germination as a bioprocess for enhancing the quality and nutritional prospects of legume proteins. *Trends in Food Science and Technology*. 101: 213-222.
- Petraru, A., F. Ursachi and S. Amariei. 2021. Nutritional characteristics assessment of sunflower seeds, oil and cake: Perspective of using sunflower oilcakes as a functional ingredient. *Plants*. 10(11): 2487.
- Shah, S.A., A. Zeb, T. Masood, N. Noreen, S.J. Abbas, M. Samiullah, M.A. Alim and A. Muhammad. 2011. Effect of sprouting time on biochemical and nutritional qualities of mung bean varieties. *African Journal of Agricultural Research*. 6: 5091-5098.
- Singleton, V.L., R. Orthofer and R.M. Lamuela-Raventós. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.
- Sun, Z., J. Chen, J. Ma, Y. Jiang, M. Wang, G. Ren and F. Chen. 2012. Cynarin-rich sunflower (*Helianthus annuus*) sprouts possess both antiglycative and antioxidant activities.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60: 3260-3265.
- Thippeswamy, T.G, J. Lalitha and M. Shinde. 2015. Enhancement of ascorbic acid in processed yellow cultivar mung bean seeds. International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics. 4(7): 253-257.
- Xu, M. J., J. D. Dong and M.Y. Zhu. 2005. Effects of germination conditions on ascorbic acid level and yield of soybean sprouts. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85: 943-947.
- Xue, Z., C. Wang, L. Zhai, W. Yu, H. Chang, X. Kou and F. Zhou. 2016. Bioactive compounds and antioxidant activity of mung bean (*Vigna radiata* L.), soybean (*Glycine max* L.) and black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the germination process. Czech Journal of Food Sciences. 34: 68–78.

การจำแนกเครื่องหมายเอสเอสอาร์ที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทาน
โรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวาน
Identification of SSR Markers Associated with Northern Corn Leaf Blight
Resistance in Sweet Corns

ธีรวุฒิ วงศ์วรรตน์^{1/*} ฉลอง เกิดศรี^{2/} เซาวนารท พฤทธิเทพ^{3/}
Theerawut Wongwarat^{1/*} Chalong Kerdtri^{2/} Chaowanart Phruetthitthep^{3/}

Received 21 Aug. 2023/Revised 6 Dec. 2023/Accepted 16 Feb. 2024

ABSTRACT

Northern corn leaf blight (NCLB) caused by *Exserohilum turcicum*, is one of the most serious diseases of sweet corn. Resistant variety is often considered the most effective method for controlling NCLB. Conventional breeding for developing sweet corn resistant to NCLB is time-consuming and the evaluation of NCLB resistance in sweet corn is influenced by environmental conditions. Utilising DNA markers to screen for resistance to NCLB in sweet corn is less time consuming and more effective. This research focused on identifying 16 SSR markers that could be associated with polymorphisms related to NCLB disease reaction. Twenty-six commercial sweet corn cultivars/hybrids were used in this study. Results indicated that SSR marker, bnlgl182, located on chromosome 1 (bin no. 1.03), exhibited different particular alleles between moderately resistant and moderately susceptible to NCLB disease. Then the bnlgl182 marker was used as the template for amplification of the DNA of 158 S₆ lines of sweet corn. The presence of particular alleles related to resistance to NCLB from 10 S₆ lines of sweet corn. These sweet corn lines were planted to evaluate their resistance to NCLB disease. The results indicated that the 10 S₆ lines of sweet corn exhibited a moderate resistance (19 -30%) to NCLB disease. The utilisation of the bnlgl182 marker as a screening tool in resistance sweet corn breeding programs offers the advantages of being simple and fast.

Keywords: northern corn leaf blight (NCLB); SSR markers; *Exserohilum turcicum*

^{1/} ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น 180 ต. สีลา อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40000

^{1/} Khon Kaen Field Crops Research Center, 180 Sila, Mueang, Khon Kaen 40000, Thailand

^{2/} ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท 522 ต.บางหลวง อ. สรรพยา จ. ชัยนาท 17150

^{2/} Chai Nat Field Crops Research Center, 522 Bang Luang, Sapphaya, Chai Nat 17150, Thailand

^{3/} สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน 50 ถ.พหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{3/} Field and Renewable Energy Crops Research Institute, 50 Phahonyothin Rd., Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding author: theerawut6949@gmail.com

บทคัดย่อ

โรคใบไหม้แผลใหญ่ มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตข้าวโพดหวาน การปลูกข้าวโพดหวานสายพันธุ์ต้านทานโรคเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุด แต่การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีมาตรฐานใช้ระยะเวลานาน และอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการประเมินการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ งานวิจัยนี้จึงนำเทคโนโลยีชีวภาพระดับโมเลกุลทางด้านเครื่องหมายดีเอ็นเอ มาใช้ในการคัดเลือกข้าวโพดหวานต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ โดยนำเครื่องหมายเอสเอสอาร์จำนวน 16 เครื่องหมายมาทดสอบความสามารถในการแยกความแตกต่างของการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวาน 26 พันธุ์/พันธุ์ลูกผสม ผลการทดสอบ พบว่า เครื่องหมาย bnlg182 บนโครโมโซมที่ 1 ตำแหน่ง 1.03 ปรากฏอัลลีลที่สามารถแยกความแตกต่างกันระหว่างข้าวโพดหวานที่มีระดับต้านทานปานกลางต่อโรคกับข้าวโพดหวานที่มีระดับอ่อนแอปานกลางต่อโรคได้ เมื่อนำ bnlg182 มาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอข้าวโพดหวานลูกผสมรุ่นซัวที่ 6 จำนวน 158 สายพันธุ์ พบอัลลีลที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคปานกลางในข้าวโพดหวานลูกผสมจำนวน 10 สายพันธุ์ เมื่อนำไปปลูกเพื่อประเมินการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ พบว่า ข้าวโพดหวานทั้ง 10 สายพันธุ์นี้มีระดับต้านทานปานกลางต่อโรค (19 - 30%) การประยุกต์ใช้เครื่องหมาย bnlg182 มาเป็นเครื่องมือในการช่วยคัดเลือกข้าวโพดหวานต้านทานใบไหม้แผลใหญ่ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานทำให้การปฏิบัติงานง่าย และรวดเร็วขึ้น

คำสำคัญ: โรคใบไหม้แผลใหญ่; เครื่องหมายเอสเอสอาร์; ความต้านทานโรคพืช; *Exserohilum turcicum*

บทนำ

ข้าวโพดหวานเป็นพืชในอุตสาหกรรมอาหารไทย มีภาพรวมการส่งออกในรูปข้าวโพดกระป๋องในเดือนมกราคม ถึง พฤศจิกายน 2566 ทั้งปริมาณและมูลค่าขยายตัว 20.4 และ 28.0% ตามลำดับ (องอาจ, 2567) แต่การผลิตข้าวโพดหวานยังคงต้องเผชิญกับปัญหาการระบาดของโรคพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวาน (northern corn leaf blight, NCLB) ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* อาการเริ่มแรกพบแผลขนาดเล็กกระจายบนใบข้าวโพดหวาน แผลจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นจนรวมเป็นแผลเดียวกันตามความยาวของใบ ลักษณะคล้ายรูปกระสวย เชื้อราชนิดนี้สร้างสปอร์จำนวนมากในสภาพความชื้นสูง ที่อุณหภูมิระหว่าง 18 – 27 °C. จึงพบเชื้อนี้ระบาดในช่วงฤดูหนาวในประเทศไทย สปอร์สามารถแพร่กระจายได้โดยลม เมื่อมีความชื้น สปอร์จะงอกเข้าทำลายใบข้าวโพด ลักษณะอาการระยะแรกจะเกิดแผลขนาดใหญ่ 2 - 20 ซม. สีเทาหรือสีน้ำตาลยาวไปตามใบ หัวท้ายเรียวยาวคล้ายรูปกระสวย มักจะเกิดที่ใบล่าง ๆ แล้วลุกลามไปยังใบบนทั่วต้น เมื่ออาการรุนแรงแผลจะขยายตัวรวมกันจนในที่สุดทำให้ใบข้าวโพดแห้งตาย (พีระวรรณ, 2551) นอกจากนี้ Raymundo and Hooker (1981) และ Rajeshwar et al. (2014) ได้รายงานว่า ต้นข้าวโพดหวานที่ติดเชื้อนี้รุนแรง โดยเฉพาะในช่วงการออกดอกจะทำให้ฝักไม่สมบูรณ์ เกิดความเสียหายของผลผลิตประมาณ 16 – 98%

การป้องกันความเสียหายจากโรคพืชที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ การใช้พันธุ์ต้านทาน ซึ่งเป็นความท้าทายของนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวาน เนื่องจากการประเมินระดับความรุนแรงของการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่มักดำเนินการได้เฉพาะ

ในช่วงฤดูหนาวเท่านั้น อันเป็นอุปสรรคสำคัญ การนำเครื่องหมาย ดีเอ็นเอมาช่วยในการคัดเลือก พันธุ์ข้าวโพดหวานด้านทานใบไหม้แผลใหญ่ จะช่วยให้การคัดเลือกพันธุ์สามารถทำได้ตลอดทั้งปี จึงช่วยลดทั้งระยะเวลา แรงงาน และพื้นที่ปลูก ทดสอบได้ และเป็นการคัดเลือกข้าวโพดหวานในระดับดีเอ็นเอ จึงไม่มีอิทธิพลของสภาวะแวดล้อมมาเกี่ยวข้อง ในต่างประเทศมีรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอสเอสอาร์ในงานปรับปรุง พันธุ์ข้าวโพดหวานด้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ โดย Osman et al. (2015) นำมาใช้กับข้าวโพดหวาน จำนวน 8 พันธุ์ และลูกผสมจำนวน 28 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ จำนวน 20 เครื่องหมาย สามารถจัดกลุ่มข้าวโพดหวานที่มีระดับด้านทานโรค (แสดงอาการเป็นโรคเฉื่อย 16%) กลุ่มที่มีระดับด้านทานโรคปานกลาง (แสดงอาการเป็นโรคเฉื่อย 48%) และกลุ่มที่อ่อนแอต่อโรค (แสดงอาการเป็นโรคเฉื่อย 64%) ต่อมา Wende et al. (2018) พบว่า ระดับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ใน ข้าวโพดหวานมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ จำนวน 20 เครื่องหมาย สามารถแบ่งกลุ่มข้าวโพดหวานที่มีความต้านทานด้านทานปานกลาง และที่มีความอ่อนแอได้

ในประเทศไทยมีการนำเครื่องหมาย ดีเอ็นเอชนิดเอสเอสอาร์มาใช้ในการช่วยคัดเลือก พันธุ์ข้าวโพดด้านทานของโรคใบไหม้แผลใหญ่ โดย Puttarach et al. (2016) นำเครื่องหมายเอสเอสอาร์ 3 เครื่องหมาย ได้แก่ bnlg1721, umc1042 และ umc1149 มาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ประชากรลูกผสมรุ่นชั่วที่ 2 ระหว่างพันธุ์แม่ที่มีระดับอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ และพันธุ์พ่อที่มีระดับด้านทานใบไหม้แผลใหญ่ พบว่า

เครื่องหมาย bnlg1721 และ umc1042 มีความเชื่อมโยงกันระหว่างระดับการเป็นโรค และอัลลีลของเครื่องหมายเอสเอสอาร์ทั้งสองเครื่องหมาย อยู่บนโครโมโซมที่ 2 มีความเชื่อมโยงกับยีน *Ht1* มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R^2) 0.2616 และ 0.2948 และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$)

เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด เอสเอสอาร์สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดหวานด้านทานใบไหม้แผลใหญ่ได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาและ จำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอสเอสอาร์ที่ สัมพันธ์กับระดับความต้านทานของข้าวโพดหวาน ต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ที่ระบาดในประเทศไทย สำหรับใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการช่วยคัดเลือก พันธุ์ข้าวโพดหวานด้านทานใบไหม้แผลใหญ่อย่างมี ประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การประเมินระดับการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ ในข้าวโพดหวาน

1.1 ข้าวโพดหวาน จำนวน 26 พันธุ์/สายพันธุ์ ดังนี้

ข้าวโพดหวานสายพันธุ์แท้ จาก ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท จำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่ 6622104-24 6622104-53 6622104-56 6622104-67 6622104-97 6622104-118 6622104-157 6622104-183 6622104-196 7522104-224 7522104-241 7522104-261 7522104-268 7522104-282 7522104-330 7522104-332 7522104-354 7522104-357 7522104359 และ 7522104-363

ข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์การค้า จำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์สงขลา84-1 (Songkla84-1) หวาน54 (Wan54) หวาน1351 (Wan1351) อินทรี2 (Insee2) ไฮบริกซ์3 (Hibrix3) และไฮบริกซ์59 (Hibrix59) ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

1.2 ปลุกข้าวโพดหวานทั้ง 26 สายพันธุ์ ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ เดือน ธ.ค. 2564 วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ จำนวน 2 ซ้ำ ขนาดแปลงทดลอง 24x50 ม. ปลุกแถวคู่ แถวยาว 2.5 ม. ระยะห่างระหว่างแถว 75 ซม. ระยะห่างระหว่างต้น 20 ซม. จำนวน 1 ต้น/หลุม ปลุกข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์3 (มีระดับอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่) เป็นแถวแพร่กระจายโรค (spread row) เมื่ออายุครบ 10 วัน ปลุกเชื้อรา *E. turcicum* สาเหตุของโรคใบไหม้แผลใหญ่ หลังจากปลุกเชื้อราบนข้าวโพดหวานแถว spread row แล้ว 14 วัน จึงปลุกข้าวโพดหวาน 26 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อข้าวโพดหวานอายุครบ 55 วันหลังปลุก ประเมินระดับการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ตามวิธีของ Min et al. (2012) โดยจัดระดับความการเกิดโรคเป็น 5 ระดับ ตามเปอร์เซ็นต์ลักษณะอาการแผลบนพื้นที่ใบ ดังนี้ ระดับต้านทานสูง (highly resistant: HR) = 0 - 3% ระดับต้านทาน (resistant: R) = 4 - 10% ระดับต้านทานปานกลาง (moderately resistant: MR) = 11 - 30% ระดับอ่อนแอปานกลาง (moderately susceptible: MS) = 31 - 70% ระดับอ่อนแอมาก (highly susceptible: HR) = >70%

2. การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ โดยคัดเลือกเมล็ดข้าวโพดหวานที่สมบูรณ์ พันธุ์/สายพันธุ์ละ 20 เมล็ด

นำมาเพาะให้งอกเป็นต้นกล้า ตัดใบอ่อนเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 100 มก. ใส่ลงในโถงที่มีไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผงแล้วใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNeasy Plant Kit, QIAGEN) เพื่อสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งต้องมีค่าระหว่าง 1.65 - 1.85 จากนั้นแบ่งสารสกัดดีเอ็นเอ นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSR marker, simple sequence repeat marker) จำนวน 16 เครื่องหมาย (Table 1) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ปริมาตรสุทธิ 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารสกัดดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์และอาร์เอ็นเอ ปริมาตร 3.98 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ AllTaq PCR 5x ปริมาตร 3 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ 5xQ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เครื่องหมายเอสเอสอาร์ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.7 ไมโครลิตร สารละลาย MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร สารละลาย master mix tracer 125 x ปริมาตร 0.12 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (AllTaq PCR Core and Master Mix Kit, QIAGEN) ความเข้มข้น 0.1 หน่วยต่อหนึ่งหน่วยปฏิกิริยา ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร จากนั้น นำหลอดปฏิกิริยาใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

Table 1 List of SSR markers used in this study and their sequences

SSR markers	Chrom. position	Forward primer	Reverse primer	Citation
bnlg176	1	AGTTCACGTCCAGCTGAATGACAG	CGCGCATCGCATGCTTATCCTA	Wende et al. (2018)
bnlg182	1	AGACCATATTCCAGGCTTTACAG	ACAAC TAGCAGCAGCACAAGG	Wende et al. (2018)
phi037	1	CCCAGCTCCTGTTGTCGGCTCAGAC	TCCAGATCCGCCGACCTCACGTCA	Wende et al. (2018)
umc1568	1	AAGTCCAGCCAAGTTCATCAAGA	ACTGTAAC TAACTGGGTGTGCC	Wende et al. (2018)
bnlg108	2	GCACTCAGCGCAGGTCATCA	CGCCTGCCAAGGTACATCAC	Wende et al. (2018)
umc1042	2	AAGGCACTGCTACTCCTATGGCTA	CTGACCTTTGAATTCTGTGCTCCT	Puttarach et al. (2016)
umc1644	3	CCATAAACTGTTCTTTGGCACAC	CTTTCACGTGTTAAGGGAGACACC	Osman et al. (2015)
bnlg490	4	GCCCTAGCTTGCTAATTAACA	ACTGTAAGGGCAGTGGACCTATA	Osman et al. (2015)
umc2038	4	ACAGAAACCAATGCATGTGATGAG	TGCATGGTTGCTTCAGCAGT	Wende et al. (2018)
bnlg238	6	CTTATTGCTTCGTCATACACACATTCAT	GAGCATGAGCTTGATATTTCTTGTTGG	Wende et al. (2018)
umc1296	6	GCTGGAGATAGGCATCCAGACAC	CTCTCCCGGCTCTGACCTAGC	Wende et al. (2018)
phi054	8	AGAAAAGAGAGTGTGCAATTGTGATAGAG	AATGGGTGCCTCGCACCAAG	Wende et al. (2018)
bnlg240	8	AAGAACAGAAAGCATTGATACATAA	TGCAGGTGTATGGGCAGCTA	Min et al. (2012)
MAC216826-4	8	CGGAGGAGCATATTTTCCAA	CGGGAAATGGTTATGCAACTT	Osman et al. (2015)
umc1149	8	TACAGTAGGGATTCTTGAGCCTC	GTGGGACCTTGTGCTTCCTTT	Puttarach et al. (2016)
umc1367	10	TGGACGATCTGCTTCTTCAGG	GAAGGCTTCTTCCTCGAGTAGGTC	Kumar et al. (2022)

Chrom. position = Chromosome position

pre-denature 94° ซ. นาน 3 นาที denature 94° ซ. นาน 30 วินาที Annealing 48° ซ. นาน 30 วินาที extension 72° ซ. นาน 1 นาที ทำซ้ำ denature ถึง extension จำนวน 35 รอบ และ final extension 72° ซ. นาน 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคอะการโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ใช้ 5% อะการโรส ที่มีสีเขียว ดีเอ็นเอ (ViSafe Green Gel Stain, Vivantis) ใช้ กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 2 ชม. จากนั้นนำ แผ่นเจลอะการโรสมาผ่านแสง LED แล้วบันทึกภาพ แถบดีเอ็นเอ

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 จัดรูปแบบอัลลีลของแต่ละเครื่องหมาย เอสเอสอาร์ด้วยการกำหนดให้ตัวอักษรภาษาอังกฤษ โดยให้ตัวอักษรตัวเล็ก เป็นตำแหน่งของ แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ และตัวอักษรตัวใหญ่ เป็นอัลลีล (แถบดีเอ็นเอ) ที่ปรากฏ โดยกำหนดให้ตัวอักษร เดียวกัน แสดงถึงการปรากฏของอัลลีลที่ตำแหน่ง เดียวกัน

3.2 ประเมินค่า polymorphism information content (PIC) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงโอกาสที่จะ พบตัวอย่างที่เลือกแบบสุ่ม 2 ตัวอย่างที่เกิดพอลิมอร์ ฟิซึม สำหรับเครื่องหมายร่วม (co-dominant markers) $PIC = 1 - \sum P_i^2$ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.01 - 1.00

4. การคัดเลือกข้าวโพดหวานลูกผสมรุ่นชั่วที่ 6 ด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ที่ผ่านการคัดเลือก

ทำการทดสอบเครื่องหมายเอสเอสอาร์ที่ ผ่านการคัดเลือก เพื่อคัดเลือกข้าวโพดลูกผสมชั่วรุ่น ที่ 6 จำนวน 158 สายพันธุ์ ที่พัฒนาโดยศูนย์วิจัย พืชไร่ชัยนาท ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ เดือน ธ.ค. 2565 วางแผนการทดสอบ และประเมิน ผลการเกิดโรค เช่นเดียวกับการทดสอบ ในข้อ 1.2

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การประเมินระดับการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ ในข้าวโพดหวาน

การประเมินการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ใน ข้าวโพดหวาน จำนวน 26 พันธุ์/สายพันธุ์ พบว่า มี

ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) สามารถแบ่งระดับการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ได้ 2 ระดับ (Table 2) ดังนี้

ระดับต้านทานปานกลางต่อโรค (MR) จำนวน 8 พันธุ์/สายพันธุ์ มีการแสดงอาการแผลบนใบ 23.20 – 29.85% ได้แก่ 6622104-53 (29.05%) 6622104-67 (29.15%) 7522104-241 (29.85%) 7522104-268 (25.25%) 7522104-282 (27.65%) 7522104-332 (29.35%) 7522104-363 (27.45%) และพันธุ์เปรียบเทียบกับ หวาน54 (23.20%)

ระดับอ่อนแอปานกลางต่อโรค (MS) จำนวน 18 พันธุ์/ลูกผสม มีการแสดงอาการแผลบนใบ 30.20 – 64.70% ได้แก่ 6622104-24 (61.75%) 6622104-56 (30.35%) 6622104-97 (30.50%) 6622104-118 (55.90%) 6622104-157 (55.35%)

6622104-183 (49.25%) 6622104-196 (57.40%) 7522104-224 (54.85%) 7522104-261 (49.05%) 7522104-330 (54.95%) 7522104-354 (50.85%) 7522104-357 (30.20%) 7522104-359 (48.60%) และพันธุ์เปรียบเทียบกับ สงขลา84-1 (64.55%) หวาน 1351 (59.65%) อินทรี2 (44.80%) ไฮบริกซ์3 (64.70%) และ ไฮบริกซ์59 (59.90%)

2. การใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ จำนวน 16 เครื่องหมาย พบว่า มีแถบดีเอ็นเอหรืออัลลีลจำนวนทั้งหมด 108 อัลลีล มีขนาด 50 - 300 คู่เบส เครื่องหมาย umc1568 และ umc1644 มีอัลลีลน้อยที่สุด คือ

Table 2 Comparison the percentage of leaf area infection by northern corn leaf blight (NCLB) on sweet corn cultivars/hybrid varieties and their resistance reaction level

Cultivars/hybrid varieties	Leaf area infection (%)	Level of disease resistance	Cultivars/hybrid varieties	Leaf area infection (%)	Level of disease resistance
6622104-53	29.05 abc	MR	6622104-24	61.75 e	MS
6622104-67	29.15 abc	MR	6622104-56	30.35 a-d	MS
7522104-241	29.85 abc	MR	6622104-97	30.50 a-d	MS
7522104-268	25.25 ab	MR	6622104-118	55.90 e	MS
7522104-282	27.65 abc	MR	6622104-157	55.35 e	MS
7522104-332	29.35 abc	MR	6622104-183	49.25 b-e	MS
7522104-363	27.45 abc	MR	6622104-196	57.40 e	MS
Wan54	23.20 a	MR	7522104-224	54.85 d-e	MS
			7522104-261	49.05 b-e	MS
			7522104-330	54.95 d-e	MS
			7522104-354	50.85 c-e	MS
			7522104-357	30.20 a-c	MS
			7522104-359	48.60 b-e	MS
			Hibrix3	64.70 e	MS
			Hibrix59	59.90 e	MS
			Insee2	44.80 a-e	MS
			Songkla84-1	64.55 e	MS
			Wan1351	59.65 e	MS

MR = Moderately resistant, MS = Moderately susceptible

Means in the same column followed by common letters are not significantly different at the 5% level by DMRT

มีอยู่ 2 อัลลีล/เครื่องหมาย (Table 3) ในขณะที่เครื่องหมาย bnlg182 และ umc1149 มีอัลลีลมากที่สุด คือ มีอยู่ 6 อัลลีล/เครื่องหมาย เมื่อวิเคราะห์ค่าความหลากหลายของยีน (gene diversity, He) อยู่ระหว่าง 0.3900 – 0.7900 มีค่าเฉลี่ย 0.5936 การวิเคราะห์ค่า PIC พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.3500 – 0.7596 โดยที่เครื่องหมาย bnlg182 และ umc1367 มีค่า PIC สูงสุด 0.7596 ซึ่ง Wende et al. (2018) รายงานว่า ค่า PIC > 0.6 บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แท้ของข้าวโพด สำหรับงานวิจัยนี้ มีเครื่องหมายที่มีค่า PIC > 0.6 จำนวน 10 เครื่องหมาย ได้แก่ bnlg176 (0.6559) bnlg182 (0.7596) bnlg108 (0.7200) bnlg490 (0.6894) umc2038 (0.7341) bnlg238 (0.7221) umc1296 (0.6319) bnlg240 (0.6038) phi054 (0.7345) และ umc1357 (0.7596) แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายเหล่านี้มีประสิทธิภาพเป็น

เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกความแตกต่างระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์อยู่ในระดับสูง เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ (ข้อมูลอัลลีลของเครื่องหมายเอสเอสอาร์) และฟีโนไทป์ (ระดับการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่) พบว่า เครื่องหมาย bnlg176 bnlg182 phi037 umc1644 และ umc2038 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาค่า PIC ร่วมกับค่า p-value พบว่า มีเพียงเครื่องหมาย bnlg176 bnlg182 และ umc2038 เท่านั้นที่ค่า p-value ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและ PIC > 0.6 ดังนั้น เครื่องหมาย bnlg176 bnlg182 และ umc2038 จึงเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่มีความต้านทานระดับปานกลาง ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการใช้เครื่องหมายทั้งสามนี้ในการคัดเลือกข้าวโพดหวานต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประเทศไทย

Table 3 Information based on SSR loci and differences among sweet corns

SSR locus	Bin number	Number alleles	He	PIC value	p-value (chi-square test)
umc1568	1.02	2	0.4885	0.3692	0.326
bnlg176	1.03	3	0.6337	0.6559	0.003
bnlg182	1.03	6	0.7900	0.7596	0.009
phi037	1.08	3	0.3900	0.3500	0.022
bnlg108	2.04	5	0.7557	0.7200	0.295
umc1042	2.07	4	0.5277	0.4925	0.198
umc1644	3.06	2	0.5000	0.3747	0.001
bnlg490	4.04	4	0.7372	0.6894	0.199
umc2038	4.07	5	0.7723	0.7341	0.017
bnlg238	6.00	5	0.7611	0.7221	0.149
umc1296	6.07	4	0.6897	0.6319	0.159
bnlg240	8.06	4	0.6557	0.6038	0.304
umc1149	8.06	6	0.3900	0.3500	0.267
MAC216826-4	8.07	4	0.6173	0.5413	0.118
phi054	10.03	5	0.7711	0.7345	0.241
umc1367	10.30	3	0.7900	0.7596	0.802

He = heterozygosity, PIC = polymorphism information content

เครื่องหมาย bnlg176 อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ที่ตำแหน่ง (Bin No.) 1.03 เป็นตำแหน่ง QTLs ที่เกี่ยวข้องกับความยาวของรากแก้ว ใช้บ่งชี้ความทนแล้ง (drought tolerance index) ในการปลูกสภาพไร่ ดังนั้นเครื่องหมาย bnlg176 เป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการใช้คัดเลือกลักษณะ (marker assisted selection, MAS) และสร้างสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่มีลักษณะทนทานต่อสภาพแห้งในข้าวโพด (Tuberosa et al., 2002) เช่นเดียวกับรายงานของ Hao et al. (2008) ที่พบว่า มีเฉพาะเครื่องหมาย bnlg176 เท่านั้นที่สามารถตรวจสอบต้นข้าวโพดลูกผสมชั่วรุ่นที่ 2:3 (F2:3) ที่มีลักษณะทนแล้งได้ แสดงให้เห็นว่าต้นข้าวโพดที่คัดเลือกได้ มีแนวโน้มที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแล้ง

เครื่องหมาย bnlg182 อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ที่ตำแหน่ง (Bin No.) 1.03 ถูกนำมาใช้ในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมในข้าวโพดที่ต้านทานใบไหม้แผลใหญ่ ซึ่งพบมีค่า PIC 0.5510 (Wende et al., 2018) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้พบเครื่องหมาย bnlg182 มีค่า PIC 0.7596 แสดงให้เห็นว่าสามารถนำมาใช้ในการดำเนินงานในขั้นตอนต่อไปได้

เครื่องหมาย umc2038 มีตำแหน่งอยู่บนยีน C2C2-GATA-transcription factor 4 (GATA4) อยู่บนโครโมโซมที่ 4 ที่ตำแหน่ง (Bin No.) 4.07 ของจีโนมข้าวโพด บทบาทหน้าที่ของยีนนี้ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในพืชทดลองชนิดอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis thaliana*) และข้าว พบว่า เมื่อถอดรหัสเป็นโปรตีน จะมีบทบาทหน้าที่กระตุ้นกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Teakle et al., 2002) ในส่วนของบทบาททางด้านความต้านทานโรคพืชยังคงมีการศึกษาน้อย และยังไม่มีการศึกษา

ในข้าวโพด งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของยีน GATA ในด้านความต้านทานโรคพืชที่มีเชื้อราเป็นสาเหตุ มีการศึกษาของ Zhang et al. (2018) ได้รายงานว่ายีน GATA ในแตงกวาเป็นยีนที่มีบทบาทในการต้านทานการเกิดโรคราแป้ง และโรคน้ำค้ำ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อรา *Erysiphe cichoracearum* และ *Pseudoperonospora cubensis* ตามลำดับ มีรายงานการแสดงออกของยีน VdGATA2 ทำหน้าที่กระตุ้นบทบาทของ oxygen species pathway ให้เพิ่มขึ้นเพื่อต้านทานโรคราแป้งองุ่น (Yu et al., 2020) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าในระหว่างที่ข้าวสาลีถูกเชื้อรา *Rhizoctonia cerealis* เข้าทำลาย ข้าวสาลีมีการตอบสนองเพื่อต้านทานเชื้อราไม่ให้ก่อโรค sharp eyespot โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีน TaGATA1 ให้เพิ่มสูงขึ้น (Liu et al., 2020)

3. วิเคราะห์รูปแบบของอัลลีล

เครื่องหมาย bnlg176 มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ a b และ c จึงกำหนดให้มีรูปแบบอัลลีลเป็น A B และ C ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มข้าวโพดหวานที่มีระดับความต้านทานปานกลางกับกลุ่มที่อ่อนแอปานกลาง พบมี 3 รูปแบบอัลลีลในทั้ง 2 กลุ่ม ดังนั้น bnlg176 จึงไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มข้าวโพดหวานที่มีระดับความต้านทานแตกต่างกันได้ (Table 4)

เครื่องหมาย bnlg182 มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ 6 ตำแหน่ง ได้แก่ d e f g h และ i กำหนดให้รูปแบบอัลลีล A มีมีแถบดีเอ็นเอ h และ i ปรากฏ รูปแบบอัลลีล B มีแถบดีเอ็นเอ g ปรากฏ รูปแบบอัลลีล C มีแถบดีเอ็นเอ g และ i ปรากฏ รูปแบบอัลลีล D มีแถบดีเอ็นเอ d g และ i ปรากฏ รูปแบบอัลลีล E มีแถบดีเอ็นเอ f g และ i ปรากฏ

รูปแบบอัลลีล F มีแถบดีเอ็นเอ e และ g ปรากฏ
รูปแบบอัลลีล G มีแถบดีเอ็นเอ g และ h ปรากฏ
รูปแบบอัลลีล H มีแถบดีเอ็นเอ d e และ g ปรากฏ
รูปแบบอัลลีล I มีแถบดีเอ็นเอ e และ h ปรากฏ

รูปแบบอัลลีล J มีแถบดีเอ็นเอ d h และ i ปรากฏ
รูปแบบอัลลีล K มีแถบดีเอ็นเอ e และ h ปรากฏ
รูปแบบอัลลีล L มีแถบดีเอ็นเอ d และ g ปรากฏ
เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มข้าวโพดหวานที่มี

Table 4 Present, absent allele and allele variation using SSR markers; bnlgl76, bnlgl82 and umc2038; in 26 cultivars/hybrid varieties of sweet corns infected by northern corn leaf blight (NCLB)

Cultivars/hybrid variety	Level of disease resistance	bnlg176				bnlg182								umc2038						
		a	b	c	al	d	e	f	g	h	i	al	j	k	l	m	n	al		
6622104-53	MR				A							A						A		
6622104-67	MR				B							B						B		
7522104-241	MR				B							A						A		
7522104-268	MR				C							C						A		
7522104-282	MR				B							C						B		
7522104-332	MR				C							D						A		
7522104-363	MR				A							A						C		
Wan54	MR				B							E						C		
6622104-24	MS				C							F						D		
6622104-56	MS				A							G						A		
6622104-97	MS				A							G						A		
6622104-118	MS				C							F						B		
6622104-157	MS				B							F						B		
6622104-183	MS				B							H						D		
6622104-196	MS				B							H						D		
7522104-224	MS				B							H						D		
7522104-261	MS				B							I						D		
7522104-330	MS				C							H						D		
7522104-354	MS				B							J						E		
7522104-357	MS				B							J						A		
7522104-359	MS				C							K						B		
Hibrix3	MS				C							L						B		
Hibrix59	MS				C							L						C		
Insee2	MS				B							G						F		
Songkla84-1	MS				B							L						G		
Wan1351	MS				C							L						H		

a-n letters = DNA band or allele position; al = allele variation; MR = Moderately resistant; MS = Moderately susceptible

■ = present allele □ = absent allele

ระดับต้านทานปานกลางกับกลุ่มที่อ่อนแอปานกลางพบว่า กลุ่มข้าวโพดหวานที่มีข้าวโพดหวานที่มีระดับต้านทานปานกลางมีรูปแบบอัลลีล A B C D และ E ในขณะที่กลุ่มที่อ่อนแอปานกลางมีรูปแบบอัลลีล F G H I J K และ L จึงเป็นเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มข้าวโพดหวานที่มีระดับต้านทานปานกลางและอ่อนแอปานกลางออกจากกันได้

เครื่องหมาย umc2038 มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ j k l m และ n กำหนดให้รูปแบบอัลลีล A มีแถบดีเอ็นเอ j และ l ปรากฏ รูปแบบอัลลีล B มีแถบดีเอ็นเอ m ปรากฏ รูปแบบอัลลีล C มีแถบดีเอ็นเอ k m และ n ปรากฏ รูปแบบอัลลีล D มีแถบดีเอ็นเอ k ปรากฏ รูปแบบอัลลีล E มีแถบดีเอ็นเอ j ปรากฏ รูปแบบอัลลีล F มีแถบดีเอ็นเอ k l m และ n ปรากฏ รูปแบบอัลลีล G มีแถบดีเอ็นเอ k l และ m ปรากฏ รูปแบบอัลลีล H มีแถบดีเอ็นเอ k และ m ปรากฏ เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มข้าวโพดหวานที่มีข้าวโพดหวานที่มีระดับต้านทานปานกลางกับกลุ่มที่อ่อนแอปานกลาง พบว่ากลุ่มข้าวโพดหวานที่มีข้าวโพดหวานที่มีระดับต้านทานปานกลางมีรูปแบบอัลลีล A B C ส่วนกลุ่มอ่อนแอปานกลางมีรูปแบบอัลลีล A B C D E F G และ H ดังนั้นเครื่องหมายนี้จึงไม่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้

ดังนั้นในการงานวิจัยนี้จึงพบเพียงเครื่องหมาย bnlg182 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพดหวานที่มีระดับต้านทานปานกลางและอ่อนแอปานกลางได้ ซึ่งรายงานของ Wende et al. (2018) ได้ใช้ bnlg182 เป็นเครื่องหมายเอสเอสอาร์ตัวหนึ่งในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ เช่นกัน

4. การคัดเลือกข้าวโพดหวานลูกผสมรุ่นชั่วที่ 6 ด้วยเครื่องหมาย bnlg182

ดีเอ็นเอของข้าวโพดหวานลูกผสมรุ่นชั่วที่ 6 จำนวน 158 สายพันธุ์ ที่นำมาใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย bnlg182 เมื่อตรวจสอบอัลลีลที่ปรากฏ พบว่า มีข้าวโพดหวานลูกผสมรุ่นชั่วที่ 6 จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่มีอัลลีล B C และ D ซึ่งเป็นอัลลีลที่พบในข้าวโพดหวานที่มีระดับต้านทานปานกลางต่อโรค สายพันธุ์ดังกล่าวถูกนำมาปลูกในเดือน ธันวาคม 2565 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ และบันทึกข้อมูลการประเมินการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ เมื่ออายุครบ 55 วัน พบว่า สายพันธุ์ 6622102-55-1 6622102-56-1 6622102-57-1 6622102-60-1 6622102-61-1 6622102-95-1 6622102-96-1 6622102-97-1 6622102-239-1 และ 6622102-240-1 การแสดงอาการแผลบนพื้นที่ใบ 19 - 30% จัดอยู่ในระดับความต้านทานโรคปานกลาง แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์เหล่านี้มีขีดความสามารถในการป้องกันตนเองด้วยการต่อต้านโรคใบไหม้แผลใหญ่ และควรนำไปทดสอบเบื้องต้นตามขั้นตอนของสายพันธุ์ก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การจำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอสเอสอาร์ ที่สัมพันธ์กับระดับความต้านทานของโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวาน พบว่าสามารถคัดเลือกเครื่องหมายเอสเอสอาร์ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ระดับปานกลางในข้าวโพดหวานได้ 3 จาก 16 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย bnlg176 bnlg182 และ umc2038 และจากการวิเคราะห์รูปแบบของอัลลีล พบว่า

เครื่องหมาย bnlg182 แสดงผลของอัลลีลแตกต่างกันระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวโพดหวานต้านทานปานกลาง กับพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวโพดหวานอ่อนแอปานกลางได้ชัดเจน จึงเลือกเพียงเครื่องหมาย bnlg182 ไปทดสอบในการคัดเลือกข้าวโพดหวานลูกผสมรุ่นชั่วที่ 6 และพบว่า สามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นเครื่องหมายเอสเอสอาร์ bnlg182 สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกข้าวโพดหวานที่มีความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ระดับปานกลางได้ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์

คำขอบคุณ

ผลงานวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
วิจัยจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และ
นวัตกรรม (ววน.)

เอกสารอ้างอิง

- พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2551. โรคข้าวโพดฝักสด. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. แหล่งข้อมูล: <http://lib.doa.go.th/multimedia/e-book/EB00572.pdf>. สืบค้น: 15 สิงหาคม 2566.
- องอาจ กิตติคุณชัย. 2567. สถานการณ์ปัจจุบันของอุตสาหกรรมข้าวโพดหวานไทย. แหล่งข้อมูล: <https://thaifood.org/main/revealed-the-current-situation-of-thai-sweet-corn>. สืบค้น: 23 พฤษภาคม 2567.
- Hao, Z.F., X.H. Li, C.X. Xie, M.S. Li, D.G. Zhang, L. Bai and S.H. Zhang. 2008. Two consensus quantitative trait loci clusters controlling anthesis-silking interval, ear setting and grain yield might be related with drought tolerance in maize. *Annals of Applied Biology*. 153: 73-83.
- Kumar, B., M. Choudhary, P. Kumar, K. Kumar, S. Kumar, B.K. Singh, C. Lahkar, Meenakshi, P. Kumar, Z.A. Dar, R. Devlash, K.S. Hooda, S.K. Guleria and S. Rakshit. 2022. Population structure analysis and association mapping for turicum leaf blight resistance in tropical maize using SSR markers. *Genes*. 13(4): 618.
- Liu, X., X. Zhu, X. Wei, C. Lu, F. Shen, X. Zhang and Z. Zhang. 2020. The wheat LLM domain-containing transcription factor TaGATA1 positively modulates host immune response to *Rhizoctonia cerealis*. *Journal of Experimental Botany*. 71(1): 344-355.
- Min, J., Z. Chunyu, H. Khalid, W. Suwen and L. Feng. 2012. Pyramiding resistance genes to northern leaf blight and head smut in maize. *International Journal of Agriculture & Biology*. 14: 430-434.
- Osman, H.T., M.G. Balbaa, A.E. Khalied and N.R. Abdelsalam. 2015. Marker assisted selection for leaf blight in maize (*Zea mays* L.). *Middle East Journal of Agricultural Research*. 4(3): 417-426.
- Puttarach, J., P. Puddhanon, S. Siripin, S. Sangtong and S. Songchantuek. 2016. Marker assisted selection for resistance to northern corn leaf blight in sweet corn. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*. 48(1): 72-79.
- Rajeshwar, R.P., R. Narayan, P. Ranga and S.R. Sokka. 2014. Cultural and morphological variability among *Exserohilum turicum* isolates. *International Journal of Scientific Research and Publication*. 3: 54-59.
- Raymundo, A.D. and A.L. Hooker. 1981. Measuring the relationship between northern corn

- blight and yield losses. *Plant Disease*. 65: 325-327.
- Teakle, G.R., I.W. Manfield, J.F. Graham and P.M. Gilmartin. 2002. *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organization, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Molecular Biology*. 50(1): 43-57.
- Tuberosa, S., M.C. Sanguinet, P. Landi, M.M. Giulini, S. Salvi and M. Conti. 2002. Identification of QTLs for root characteristics in maize grown in hydroponics and analysis of their overlap with QTLs for grain yield in the field at two water regimes. *Plant Molecular Biology*. 48: 697-712
- Wende, A., H. Shimelis and E.T. Gwata. 2018. Genetic variability for resistance to leaf blight and diversity among selected maize inbred lines. pp. 39-56. In: M.A. El-Esawi, *Maize Germplasm-Characterization and Genetic Approaches for Crop Improvement*. London, U.K. IntechOpen.
- Yu, Y.H., L. Bian, K.K. Yu, S.D. Yang, G.H. Zhang and D.L. Guo. 2020. Grape (*Vitis davidii*) VdGATA2 functions as a transcription activator and enhances powdery mildew resistance via the active oxygen species pathway. *Scientia Horticulturae*. 267: 109327.
- Zhang, K., X. Wang, W. Zhu, X. Qin, J. Xu, C. Cheng, Q. Lou, J. Li and J. Chen. 2018. Complete resistance to powdery mildew and partial resistant to downy mildew in a *Cucumis hystrix*, introgression line of cucumber were controlled by a co-localized locus. *Theoretical and Applied Genetics*. 131: 2229-2243.

การกำจัดเชื้อไวรัสที่ติดมากับเมล็ดพริก Disinfection of *Pepper chat fruit viroid* in Pepper Seeds

ลักษิกา ศรีเกษม^{1/} ชมาภร สิงห์พันธุ์^{1/} คณิงนิตย์ เจริญวรารการ^{1/*}
Luksika Srikasem^{1/} Samabhorn Sinhabandhu^{1/} Kanungnit Reanwarakorn^{1/*}

Received 15 Mar. 2024/Revised 14 May 2024/Accepted 20 May 2024

ABSTRACT

Pepper chat fruit viroid (PCFVd) can cause disease in pepper. This disease can be transmitted via seeds and mechanical means. The global pepper seed trade is an important channel for PCFVd dissemination from country to country. The effectiveness of seed disinfection methods for PCFVd ranging from chemical to physical ones was evaluated. The methods using sodium hypochlorite 3%, sodium bicarbonate 10%, hydrochloric acid 0.5 N, trisodium phosphate 10%, hot water and dry heat treatment in combinations at different temperatures and time periods were tested in pepper seed varieties P-74 and P-TV infected with PCFVd 100%. After treatment, the infection rate was inspected by the reverse transcription-polymerase chain reaction technique on the whole seeds, seed coats and seedlings and the germination rates were determined. The results showed that soaking pepper seeds in 50°C hot water for 25 min followed by 72°C dry heat for 24 hours was the best treatment regime. It could get rid of 100% PCFVd while the germination rates remained at 96-99%. This result can be used as a recommendation for seed disinfection for PCFVd.

Keywords: hot water treatment; dry heat treatment; seed viroid detection; seed transmission

^{1/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

^{1/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

* Corresponding author: agrknr@ku.ac.th

บทคัดย่อ

Pepper chat fruit viroid (PCFVd) เป็นไวรอยด์ที่ทำให้เกิดโรคในพริกและสามารถถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ดโดยวิธีกล เชื้อนี้สามารถแพร่กระจายจากประเทศหนึ่งไปอีกประเทศหนึ่งผ่านทางการค้าเมล็ดพันธุ์ จึงทำการทดสอบเพื่อหาวิธีการใช้สารเคมีและความร้อนในการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริกที่มีประสิทธิภาพ โดยการใช้สาร sodium hypochlorite 3% sodium bicarbonate 10% hydrochloric acid 0.5 N trisodium phosphate 10% น้ำร้อน และลมร้อน ร่วมกันที่อุณหภูมิและช่วงเวลาต่างกันในการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริกพันธุ์ P-74 และ P-TV ที่มีการติดเชื้อไวรอยด์ PCFVd 100% หลังการทดสอบตรวจริบยีนย้อนอัตราการติดเชื้อในเมล็ดพริกด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction ในแบบทั้งเมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ด และต้นอ่อนรวมทั้งผลต่ออัตราการงอก ผลการทดสอบพบว่า กรรมวิธีที่ดีที่สุด คือ การแช่เมล็ดพริกในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50°C. เป็นเวลา 25 นาที ตามด้วยการอบด้วยลมร้อนที่ 72°C. เป็นเวลา 24 ชม. สามารถกำจัดเชื้อ PCFVd ได้ 100% โดยเมล็ดพริกมีอัตราการงอกที่ 96 - 99% ผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นคำแนะนำเพื่อลดการติดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริกได้

คำสำคัญ: การฆ่าเชื้อด้วยน้ำร้อน; การฆ่าเชื้อด้วยลมร้อน; การตรวจเชื้อไวรอยด์ในเมล็ด; การถ่ายทอดทางเมล็ด

บทนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกและนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริกควบคุมค่อนข้างมาก ในปี พ.ศ. 2565 มีปริมาณการส่งออกเมล็ดพันธุ์พริกควบคุม 60,459 กก.

มูลค่า 856.1 ล้านบาท และนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริกควบคุม 26,064 กก. มูลค่า 140.3 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2566) มีรายงานเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ติดไปกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกส่งออก (Chambers et al., 2013; Verhoeven et al., 2021) ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ PCFVd ที่ติดไปกับเมล็ดไปยังประเทศต่าง ๆ ได้ หากไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อที่มีประสิทธิภาพ ไวรอยด์เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุด มีโครงสร้างเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยววงปิด ก่อให้เกิดโรคกับพืชปลูกหลายชนิด ทั้งพืชผัก ไม้ผล และไม้ประดับ ส่งผลให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ (Hammond and Owens, 2006) ไวรอยด์จำแนกได้เป็น 2 วงศ์ คือ *Pospiviroidae* และ *Avsunviroidae* (Serio et al., 2014) ไวรอยด์ในวงศ์ *Pospiviroidae* เข้าทำลายพืชในวงศ์ *Solanaceae* เป็นหลัก เช่น มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง และมะเขือ ไวรอยด์ในสกุล *Pospiviroid* หลายชนิดมีรายงานการถ่ายทอดเชื้อผ่านเมล็ด (Matsushita and Tsuda, 2016) ละอองเกสร (Card et al., 2007) หรือแมลงบางชนิด (Hammond, 2017)

เชื้อ PCFVd เป็นไวรอยด์ที่จัดอยู่ในสกุล *Pospiviroid* มีขนาดจีโนมประมาณ 348 นิวคลีโอไทด์ พบครั้งแรกในพริกหวาน (*Capsicum annuum* L.) ที่ปลูกในโรงเรือนในประเทศเนเธอร์แลนด์ ทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง ขนาดของผลพริกลดลงถึง 50% และมีอาการเส้นใบไหม้ (Verhoeven et al., 2009) นอกจากนี้ ผลมะเขือเทศและหัวมันฝรั่งที่เชื้อ PCFVd เข้าทำลายมีขนาดลดลงเช่นกัน (Verhoeven et al., 2020) ประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ PCFVd ครั้งแรกในมะเขือเทศที่ จ.ลำปาง (Reanwarakorn et al., 2011) ทำให้พืชมีลักษณะ

อาการเตี้ยแคระ เส้นใบไหม้ ใบผิดปกติ และใบเปลี่ยนสี ต่อมาเครือข่ายรัฐออสเตรียได้รายงานการตรวจพบเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ส่งออกโดยประเทศไทย (Chambers et al., 2013) และรายงานการตรวจพบเชื้อ PCFVd ติดไปกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกจากหลายประเทศ (Verhoeven et al., 2021)

การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสสามารถดำเนินการได้หลายวิธี เช่น การป้องกันการนำเมล็ดหรือส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ติดเชื้อเข้าสู่แปลงหรือโรงเรือนปลูกพืช การปฏิบัติด้านสุขอนามัยที่เข้มงวดและการตรวจติดตามอาการผิดปกติของพืช จะช่วยให้การควบคุมโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีรายงานวิธีการกำจัดเชื้อไวรัสและไวรัสชนิดอื่น ๆ ได้แก่ การกำจัดเชื้อ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ที่ปนเปื้อนบนเมล็ดและอุปกรณ์ต่าง ๆ ด้วยการแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite (NaOCl) (Garnsey and Whidden, 1971; Singh et al., 1989; Matsuura et al., 2010) การใช้สารละลาย 2% sodium hydroxide และ 2% formaldehyde ในการกำจัดเชื้อ *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), *Citrus exocortis viroid* (CEVd) และ *Hop stunt viroid* (HSVd) (Garnsey and Whidden, 1971) การแช่เมล็ดใน 10% trisodium phosphate เป็นเวลา 3 ชม. หรือการอบเมล็ดด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 80° ซ. เป็นเวลา 24 ชม. และ 74° ซ. นาน 48 ชม. เพื่อกำจัดเชื้อ *Pepino mosaic virus* (PepMV) ในเมล็ดมะเขือเทศ (Córdoba-Sellés et al., 2007) นอกจากนี้ Olivier et al. (2015) ได้ทดสอบสารหลายชนิดพบว่า ให้ผลไม่แตกต่างกับการใช้ 0.8% NaOCl ในการกำจัดเชื้อ PSTVd ต่อมา Sombat (2019) รายงานการใช้ 3% NaOCl ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50° ซ. เป็นเวลา 25 นาที

กับเมล็ดมะเขือเทศ ซึ่งพบว่า สามารถกำจัดเชื้อ PCFVd และ *Columnea latent viroid* (CLVd) ได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ด จากรายงานที่กล่าวมาจะพบว่า ข้อมูลการกำจัดเชื้อ PCFVd ยังมีอย่างจำกัดนอกจากนี้ การกำจัดเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่าง ทั้งชนิดพืช พันธุ์พืช ชนิดของเชื้อ กรรมวิธีและระยะเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดเชื้อ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงได้นำข้อมูลการใช้สารเคมีและความร้อนที่มีรายงานในการใช้กำจัดเชื้อไวรัสและไวรัสมาทดสอบ และพัฒนาวิธีการกำจัดเชื้อ PCFVd ที่ติดมากับเมล็ดพริก เพื่อเป็นข้อมูลและแนวทางในการกำจัดเชื้อ PCFVd ในการผลิตเมล็ดพันธุ์พริกอย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การตรวจสอบเมล็ดพริกติดเชื้อ PCFVd

ใช้เมล็ดพันธุ์พริกติดเชื้อ PCFVd สองพันธุ์ ได้แก่ P-74 และ P-TV โดยเป็นพริกที่มีลักษณะผลยาว (elongated) ตามการจัดจำแนกของ IPGRI (1995) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก อ.ดร.ขมากร สิงห์พันธุ์ (งานวิจัยเรื่อง การศึกษาความต้านทานและลักษณะอาการโรคที่เกิดจากเชื้อ PCFVd บนมะเขือเทศ พริก และมะเขือสายพันธุ์ต่าง ๆ ภายใต้โครงการศูนย์เชื้อพันธุ์กรรมพืชแห่งประเทศไทย ปีงบประมาณ 2561 - 2563) เมล็ดที่นำมาใช้ไม่ได้ผ่านการแช่สารเคมีใด ๆ มาก่อน นำเมล็ดพริกพันธุ์ละ 100 เมล็ด/กรรมวิธี มาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Jeffries and Tina, 2004) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RT-PCR โดยการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค

PCR ด้วย GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, USA) ทำปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการของ Kungwon et al. (2022) ด้วยไพรเมอร์ PCF-seq-F (5' CCG TCT TCT GAC AGG AGT AAT CCC 3') และ PCF-seq-R (5' ACC CGC ACG GCG CTT CTC 3') (Yanagisawa et al., 2017) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ PCFVd

ปฏิกิริยา Reverse transcription (RT) ประกอบด้วย 2 pmole PCF-seq-R 5.0 ไมโครลิตร RNA sample 1.75 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน 96° ซ. นาน 5 นาที จากนั้น นำมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นใส่ RT buffer 2.0 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs 1.0 ไมโครลิตร 200 U/reverse transcriptase 0.25 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 50° ซ. เป็นเวลา นาน 1 ชม. และ 70° ซ. นาน 10 นาที ซึ่งขั้นตอนนี้จะได้ cDNA ที่สามารถนำไปเพิ่มปริมาณ ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

ปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ในปฏิกิริยารวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจาก nuclease 3.0 ไมโครลิตร PCR master mix buffer 5 ไมโครลิตร 2 pmol/μl ไพรเมอร์ PCF-seq-F 0.5 ไมโครลิตร 2 pmol/μl ไพรเมอร์ PCF-seq-R 0.5 ไมโครลิตร cDNA 1.0 ไมโครลิตร จากนั้น นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมปฏิกิริยา PCR ดังนี้ อุณหภูมิ 94° ซ. นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ, denaturation temperature 94° ซ. นาน 40 วินาที annealing temperature 60° ซ. นาน 40 วินาที extension temperature 72° ซ. นาน 40 วินาที จำนวน 34 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72° ซ. นาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบขนาดของผลผลิตจาก

ปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis เพื่อดูแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 348 นิวคลีโอไทด์ ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation UV-transilluminator (SYNCENE U: Genius3)

2. การทดสอบกรรมวิธีการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริก

ทำการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 11 กรรมวิธี 4 ซ้ำ มีขนาดหน่วยทดลอง 200 เมล็ด ใช้เมล็ดพริกที่ติดเชื้อ PCFVd (เมล็ดพริกที่ตรวจสอบแล้วว่ามีเชื้อ) ทำ 2 พันธุ์ คือ P-74 และ P-TV ตามกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธี T1 แช่เมล็ดใน 3% sodium hypochlorite (NaOCl) เป็นเวลา 25 นาที ที่อุณหภูมิห้องที่ $25\pm 2^{\circ}$ ซ.

กรรมวิธี T2 แช่เมล็ดใน 10% sodium bicarbonate (NaHCO_3) เป็นเวลา 25 นาที ที่อุณหภูมิห้องที่ $25\pm 2^{\circ}$ ซ.

กรรมวิธี T3 แช่เมล็ดใน 3% NaOCl ในน้ำร้อนที่ 50° ซ. เป็นเวลา 25 นาที

กรรมวิธี T4 แช่เมล็ดใน 3% NaOCl ในน้ำร้อนที่ 50° ซ. เป็นเวลา 60 นาที

กรรมวิธี T5 แช่เมล็ดในน้ำร้อนที่ 50° ซ. เป็นเวลา 25 นาที ตามด้วยอบลมร้อน ที่ 72° ซ. เป็นเวลา 24 ชม.

กรรมวิธี T6 แช่เมล็ดในน้ำร้อนที่ 50° ซ. เป็นเวลา 25 นาที ตามด้วยอบลมร้อน ที่ 72° ซ. เป็นเวลา 48 ชม.

กรรมวิธี T7 แช่เมล็ดใน 0.5 N hydrochloric acid (HCl) เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 10% trisodium phosphate (TSP) เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง $25\pm 2^{\circ}$ ซ. และ อบลมร้อนที่ 80° ซ. เป็นเวลา 24 ชม.

กรรมวิธี T8 วางเมล็ดบนกระดาษเพาะเมล็ดที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องที่ $25\pm 2^{\circ}$ ซ.

กรรมวิธี T9 แช่เมล็ดในน้ำที่อบฆ่าเชื้อแล้วนาน 25 นาที ที่อุณหภูมิห้องที่ $25\pm 2^{\circ}$ ซ.

กรรมวิธี T10 วางเมล็ดปกติ (เมล็ดพริกจากต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ PCFVd) บนกระดาษเพาะเมล็ดที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องที่ $25\pm 2^{\circ}$ ซ.

กรรมวิธี T11 แช่เมล็ดปกติ (เมล็ดพริกจากต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ PCFVd) ในน้ำที่อบฆ่าเชื้อแล้ว นาน 25 นาที ที่อุณหภูมิห้องที่ $25\pm 2^{\circ}$ ซ.

ในกรรมวิธี T1 T2 T7 T9 และ T11 นำเมล็ดบรรจุใส่ถุงตาข่าย (ถุงกรองชาทำมาจากกระดาษเยื่อไม้) ขนาด 9×10 ซม. แช่ถุงในน้ำหรือสารละลายของแต่ละกรรมวิธี ทั้งนี้ภาชนะที่ใส่น้ำหรือสารละลายจะตั้งบนเครื่องกวนสารแบบปรับอุณหภูมิได้ (magnetic stirrer hotplate) ที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm 2^{\circ}$ ซ.) สำหรับเมล็ดที่ทดสอบในกรรมวิธี T3 T4 T5 และ T6 นำเมล็ดใส่หลอดที่มีฝาปิดที่ภายในบรรจุน้ำหรือสารละลายของแต่ละกรรมวิธี นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water-bath shaker) เมื่อครบกำหนดเวลาของแต่ละกรรมวิธี นำเมล็ดมาตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบด้วยลมร้อนต่อไป สำหรับกรรมวิธี T5 T6 และ T7 ตามลำดับ หลังจากนั้น นำเมล็ดจากต้นติดเชื้อและต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องที่ $25\pm 2^{\circ}$ ซ. เพื่อนำไปตรวจสอบหาเชื้อ PCFVd ในเมล็ดและอัตราการงอก วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี least significant difference (LSD) ด้วยโปรแกรม R (R Core Team, 2021)

3. การประเมินประสิทธิภาพของกรรมวิธีการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพริก

นำเมล็ดที่ผ่านการทดสอบในแต่ละกรรมวิธีการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริกในข้อที่ 2 มาตรวจหาเชื้อ PCFVd โดยแบ่งเมล็ดเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ตรวจหาเชื้อไวรัสจากทั้งเมล็ด (whole seed) จำนวน 100 เมล็ด (จำนวน 25 เมล็ด/ซ้ำ) เพื่อตรวจสอบว่ายังมีเชื้อ PCFVd อยู่ที่เมล็ดพริกหรือไม่หลังผ่านกรรมวิธีการกำจัดเชื้อ และส่วนที่ 2 แยกตรวจหาเชื้อไวรัสจากส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) และต้นอ่อน (seedling) เพื่อตรวจสอบว่า เชื้อ PCFVd อยู่ที่ส่วนไหนของเมล็ดพริก และอัตราการงอกของเมล็ด โดยนำเมล็ดมาเพาะด้วยวิธี top of paper (TOP) (ISTA, 2016) ในจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษชั้นหนึ่งฆ่าเชื้อวางรองก้นจาน (จำนวน 25 เมล็ด/จาน) จำนวน 4 ซ้ำ นาน 14 วัน จดบันทึกจำนวนเมล็ดที่งอก หาอัตราการงอก โดยนับรวมต้นที่งอกเห็นใบเลี้ยงจาก 4 ซ้ำ (100 เมล็ด) นำมาคำนวณเป็นร้อยละของอัตราการงอก จากนั้นใช้ปากคีบ (forceps) แยกเก็บเปลือกหุ้มเมล็ด และต้นอ่อน (จำนวน 25 เปลือกหุ้มเมล็ด หรือ 25 ต้นอ่อน รวมเป็น 1 ตัวอย่าง) ป้องกันการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่าง โดยทำความสะอาดปากคีบด้วยแอลกอฮอล์และเผาไฟก่อนใช้กับตัวอย่างใหม่ แล้วนำแต่ละตัวอย่างมาแยกสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB และตรวจสอบหาเชื้อ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 1

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริกที่ติดเชื้อ

พบว่า เมล็ดพริกทั้ง 2 พันธุ์ ที่นำมาใช้ในการทดสอบครั้งนี้ติดเชื้อ PCFVd 100% โดยตรวจ

พบแถบดีเอ็นเอขนาด 348 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นขนาดของเชื้อ PCFVd จากการตรวจทั้งเมล็ด (whole seed) ทั้ง 4 ซ้ำ ของทั้งพันธุ์ P-74 (เลนช่องที่ 1 - 4) and P-TV (เลนช่องที่ 5 - 8) (Figure 1A)

2. ประสิทธิภาพของวิธีการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพริก

2.1 วิธีการกำจัดเชื้อด้วยสารเคมี

พบว่า เมล็ดที่นำมากำจัดเชื้อ PCFVd ในกรรมวิธี T1 และ กรรมวิธี T2 สามารถกำจัดเชื้อ PCFVd ได้ แต่วิธีการของ T1 ทำให้อัตราการงอกของเมล็ดพันธุ์ P-74 และ P-TV ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ มีอัตราการงอกเหลือ 49 และ 71% ตามลำดับ ส่วน T2 มีผลต่ออัตราการงอกเล็กน้อยพบว่า อัตราการงอกของพันธุ์ P-74 และ P-TV คิดเป็น 91 และ 94% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีควบคุมที่เมล็ดติดเชื้อแช่น้ำนาน 25 นาที ในกรรมวิธี T9 ที่มีอัตราการงอก 95% และวิธีควบคุมที่เมล็ดไม่ติดเชื้อแช่น้ำนาน 25 นาที ในกรรมวิธี T11 มีอัตราการงอก 100% (คำนวณรวมจาก 4 ซ้ำ = 100 เมล็ด) (Table 1) สอดคล้องกับงานทดสอบในเมล็ดมะเขือเทศของ Sombat (2019) และยังสอดคล้องกับรายงานที่ใช้ NaOCl ในการกำจัดเชื้อ *Pospiviroids* ได้ (Singh et al., 1989; Wang, 2022) ทั้งนี้ผลที่ได้ขึ้นกับสายพันธุ์ของพริกที่นำมาทดสอบด้วย (Wang, 2022) กรณีกรรมวิธีการกำจัดเชื้อด้วยสารเคมีจะใช้ได้ผลดีกับเชื้อที่อยู่ที่เซลล์ผิวของเมล็ด และไม่ค่อยมีประสิทธิภาพกับเชื้อที่อยู่ภายในเมล็ด (Nakamura, 1982) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่รายงานว่า NaOCl สามารถใช้กำจัดเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนบนเครื่องมือต่าง ๆ ได้ (Singh et al., 1989) Matsuura et al. (2010) พบว่า NaOCl ที่ความเข้มข้น 0.5% หรือมากกว่าใช้กำจัดเชื้อ TCDVd ได้อย่างมี

ประสิทธิภาพโดยที่สารเคมีดังกล่าวจะย่อยสลายอาร์เอ็นเอของไวรัส และยังพบอีกว่า ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของสารละลายมีผลในการย่อยสลายอาร์เอ็นเอของไวรัส โดยถ้าสารละลาย NaOCl ที่ใช้มี pH ต่ำจะกำจัดเชื้อไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า (Matsuura et al., 2010)

2.2 วิธีการกำจัดเชื้อด้วยสารเคมีร่วมกับความร้อน

การทดสอบการกำจัดเชื้อในเมล็ดด้วยสารเคมีร่วมกับการแช่น้ำร้อนในกรรมวิธี T3 และกรรมวิธี T4 พบว่า ทั้งสองวิธีมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ PCFVd ได้ จากการตรวจแบบทั้งเมล็ดไม่พบเชื้อ PCFVd (Table 1) แต่ส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกในเมล็ดพริกทั้งสองสายพันธุ์อย่างมาก ทำให้อัตราการงอกเป็น 0% (Table 1) จึงไม่สามารถใช้วิธีการดังกล่าวนี้ในการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพริกได้ ซึ่งให้ผลแตกต่างจากรายงานของ Sombat (2019) ที่พบว่า การใช้ 3% NaOCl ในน้ำอุณหภูมิ 50° ซ. นาน 25 นาที ในการกำจัดเชื้อ PCFVd หรือ CLVd ในเมล็ดมะเขือเทศติดเชื้อ จะไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ด ทั้งนี้ในการทดสอบการฆ่าเชื้อในเมล็ดด้วยวิธีการต่าง ๆ อาจให้ผลที่เหมือนหรือแตกต่างกันได้ ขึ้นกับชนิดของพืช พันธุ์พืช และเชื้อสาเหตุ (Wang, 2022) นอกจากนั้น ความชื้นในเมล็ด อุณหภูมิ และระยะเวลาในการกำจัดเชื้อ ตลอดจนการทำให้เมล็ดลดอุณหภูมิได้อย่างรวดเร็วหลังกรรมวิธีการกำจัด มีผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ดด้วย (Nakamura, 1982)

2.3 วิธีการกำจัดเชื้อด้วยความร้อน

เมล็ดพริกที่ได้รับการทดสอบการกำจัดเชื้อ PCFVd ด้วยการแช่น้ำร้อนและการอบด้วยลมร้อน

ในกรรมวิธี T5 มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ PCFVd และไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ดพริกทั้งสองพันธุ์ โดยตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอ ขนาด 348 นิวคลีโอไทด์ ของเชื้อ PCFVd ในทั้ง 2 พันธุ์ ในส่วนของทั้งเมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ด และต้นอ่อน (Figure 1B) และมีอัตราการงอกที่ 99 และ 96% ของพันธุ์ P-74 และ P-TV ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่ต่างจากกรรมวิธีควบคุมในเมล็ดติดเชื้อ (T9) และในเมล็ดไม่ติดเชื้อ (T11) ที่มีอัตราการงอกที่ 95% และ 100% ตามลำดับ (Table 1) ทั้งนี้การใช้ความร้อนมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อโรคพืชได้หลายชนิด และยังเหมาะสมกับการผลิตเมล็ดพันธุ์ในแบบเกษตรอินทรีย์ (Nakamura, 1982) อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มเวลาการอบเป็น 48 ชม. ในกรรมวิธี T6 พบว่าเวลาการอบที่เพิ่มขึ้นมีผลกระทบต่อความงอกของเมล็ดอย่างมาก (ความงอกเป็น 0% ทั้ง 2 พันธุ์) (Table 1) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า การแช่น้ำร้อนเมล็ดที่ 50° ซ. นาน 20 - 30 นาที เป็นที่นิยมใช้ อย่างไรก็ตาม กรรมวิธีการแช่น้ำร้อนนั้นจะต้องควบคุมให้เมล็ดแห้งอย่างรวดเร็วหลังการแช่น้ำร้อน เนื่องจากมีผลกับความงอกของเมล็ด ซึ่งเป็นข้อที่ผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ต้องพึงระวัง นอกจากนั้นการเลือกใช้การอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมจะส่งผลให้ไม่เกิดอันตรายกับเมล็ด เนื่องจากความชื้นในเมล็ดมีผลต่อความงอกของเมล็ด (Nakamura, 1982)

2.4 วิธีการกำจัดเชื้อด้วยสารเคมีแล้วตามด้วยความร้อน

สำหรับกรรมวิธี T7 ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อ PCFVd ได้ เนื่องจากยังสามารถตรวจพบเชื้อ PCFVd ในทั้ง 2 พันธุ์ ในส่วนของทั้งเมล็ด (whole seed) โดยตรวจพบเชื้อในเมล็ดพริกพันธุ์ P-74 และ P-TV ในอัตรา 25% และ 50% ตามลำดับ

อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ดอย่างมาก ทำให้มีความงอกเป็น 0% ทั้ง 2 พันธุ์ (Table 1) ในขณะที่ Antignus et al. (2007) พบว่า 10% TSP หรือ 2% sodium hypochlorite สามารถใช้ในการกำจัดเชื้อ *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) ที่ปนเปื้อนที่เซลล์ผิวของเมล็ดมะเขือเทศได้

จากรายงานการศึกษาของ Nakamura (1982) พบว่าความชื้นของเมล็ดก่อนเริ่มกรรมวิธีในการกำจัดเชื้อเป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการเลือกการกำจัดเชื้อที่ติดมากับเมล็ดด้วยความร้อน เนื่องจากส่งผลต่อความงอกของเมล็ด เช่น การอบด้วยลมร้อนจะส่งผลให้เป็นอันตรายกับเมล็ด โดยความงอกจะลดลงในกรณีที่เมล็ดมีความชื้นสูงพบว่าถ้าเมล็ดมีความชื้น 10% ใช้การอบด้วยลมร้อนที่ 75° ซ. แม้เพียงไม่กี่นาทีสามารถทำให้เมล็ดตายหรือไม่งอกทั้งหมด ในทางตรงกันข้ามถ้าเมล็ดมีความชื้นน้อยกว่า 5% สามารถใช้การอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิสูงได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อความมีชีวิตของเมล็ด (Nakamura, 1982)

เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้เก็บข้อมูลความชื้นของเมล็ดก่อนที่จะนำมาทดสอบ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลในส่วนนี้ได้ อย่างไรก็ตามจากกรรมวิธีควบคุมในเมล็ดติดเชื้อ (T8) และในเมล็ดไม่ติดเชื้อ (T10) ที่เมล็ดไม่ผ่านการแช่น้ำ จะเห็นได้ว่าอัตราการงอกในทั้ง 2 พันธุ์มีความแตกต่างกันในทั้ง 2 กรรมวิธีควบคุม เช่น ใน T8 มีอัตราการงอกที่ 77 และ 98% และใน T10 มีอัตราการงอกที่ 86 และ 95% ของพันธุ์ P-74 และ P-TV ตามลำดับ (Table 1) ซึ่งเห็นว่าความชื้นในเมล็ดเริ่มต้นของทั้งสองพันธุ์มีความแตกต่างกัน จึงส่งผลให้อัตราการงอกของทั้งสองพันธุ์มีความแตกต่างกันหลังเมล็ดผ่านกรรมวิธีในการกำจัดเชื้อ

Table 1 Evaluation of seed treatments for control of PCFVd in pepper seeds of variety P-74 and P-TV

Treatment	Seed variety	Viroid detection rate * (%)			Seed germination rate (%)
		Whole seed	Seed coat	Seedling	
T1: 3% NaOCl 25 min	P-74	0	0	0	49 f
	P-TV	0	0	0	71 cde
T2: 10% NaHCO ₃ 25 min	P-74	0	0	0	91 bcd
	P-TV	0	0	0	94 abc
T3: 3% NaOCl + 50° C HWT 25 min	P-74	0	NT	NT	0
	P-TV	0	NT	NT	0
T4: 3% NaOCl + 50° C HWT 60 min	P-74	0	NT	NT	0
	P-TV	0	NT	NT	0
T5: 50° C HWT 25 min + 72° C DHT 24 hr	P-74	0	0	0	99 a
	P-TV	0	0	0	96 ab
T6: 50° C HWT 25 min + 72° C DHT 48 hr	P-74	0	NT	NT	0
	P-TV	0	NT	NT	0
T7: 0.5 N HCl 15 min + 10% TSP 1 hr + 80° C DHT 24 hr	P-74	25	NT	NT	0
	P-TV	50	NT	NT	0
T8: No treatment	P-74	100	100	100	77 e
	P-TV	100	100	100	98 a
T9: H ₂ O 25 min	P-74	100	100	100	95 ab
	P-TV	100	100	100	95 ab
T10: healthy seed, no treatment	P-74	0	0	0	86 de
	P-TV	0	0	0	95 ab
T11: healthy seed, H ₂ O 25 min	P-74	0	0	0	100 a
	P-TV	0	0	0	100 a
CV (%)					5.21

Means in the same column followed by the different letters are significantly different at P<0.05 by LSD, CV = coefficient of variation, *100 seeds test (25 seeds/sample); HWT: hot water treatment; DHT: dry heat treatment, HCl: hydrochloric acid; TSP: trisodium phosphate; NaOCl: sodium hypochlorite; NaHCO₃: sodium bicarbonate; NT: no test

นอกจากนั้นการอบด้วยลมร้อนกับเมล็ดที่มีความชื้นสูงในขณะเริ่มกรรมวิธีการกำจัดเชื้อและใช้เวลากำจัดเชื้อที่ยาว ยังส่งผลให้เกิดความผิดปกติกับต้นกล้าที่งอกได้ เนื่องจากอุณหภูมิส่งผลต่อกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ อย่างไรก็ตามการอบด้วยลมร้อนที่เหมาะสมในเมล็ดพืชบางชนิดยังมี

ประโยชน์ช่วยในการกระตุ้นการงอกของเมล็ด ดังนั้น การเลือกใช้การกำจัดเชื้อด้วยความร้อนควรมีการตรวจวัดความชื้นของเมล็ดก่อนเริ่มต้นกรรมวิธีการกำจัดเชื้อ เพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับเมล็ด (Nakamura, 1982)

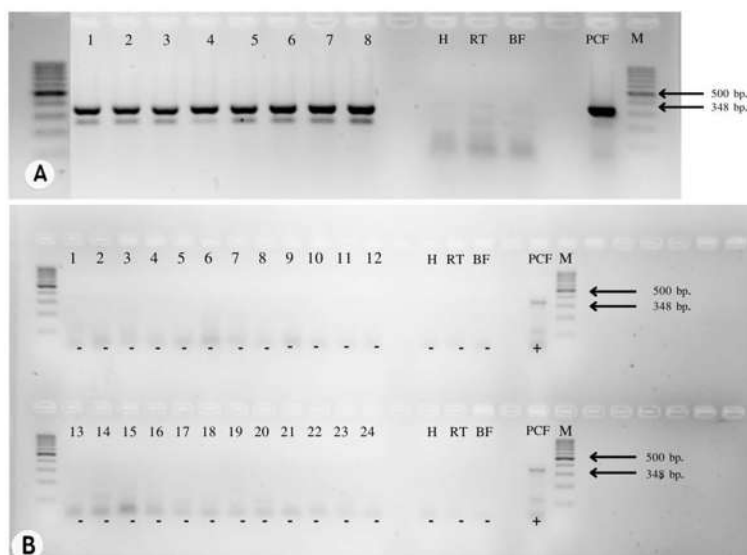


Figure 1 PCFVd detection by RT-PCR technique and the PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis; A = whole seed test of PCFVd-infected pepper seeds of P-74 (lane 1 - 4) and P-TV (lane 5 - 8); B = seed treatment no. 5 (T5) of PCFVd-infected pepper seeds of P-74 (lane 1 - 4 are whole seeds, lane 5 - 8 are seed coats and lane 9 - 12 are seedlings) and seed treatment no. 5 (T5) of PCFVd-infected pepper seeds of P-TV (lane 13 - 16 are whole seeds, lane 17 - 20 are seed coats and lane 21 - 24 are seedlings); H = healthy seeds; RT = rt reaction products; BF = buffer; and PCF = pepper chat fruit viroid used as control; M = 100 bp DNA ladder markers

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบวิธีการกำจัดเชื้อไวรัส PCFVd ที่มีการถ่ายทอดมาจากเมล็ดพันธุ์พริก โดยใช้สารเคมี หรือการใช้สารเคมีร่วมกับการแช่น้ำร้อน และ/หรืออบด้วยลมร้อน ที่อุณหภูมิและช่วงเวลาที่แตกต่างกัน กับเมล็ดพันธุ์พริก P-74 และ P-TV ที่มีการติดเชื้อไวรัส PCFVd 100% โดยในการทดลองทำการตรวจผลการติดเชื้อ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR และตรวจอัตราการงอกของเมล็ดหลังจากผ่านกรรมวิธีการกำจัดเชื้อในแบบต่าง ๆ พบว่า การแช่เมล็ดพันธุ์พริกในน้ำร้อนอุณหภูมิ 50° ซ. นาน 25 นาที ตามด้วยการอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 72° ซ. เป็นเวลา 24 ชม. มีประสิทธิภาพดีที่สุด สามารถกำจัดเชื้อ PCFVd จากเมล็ดได้ 100% ตรวจไม่พบการติด

เชื้อ PCFVd จากเมล็ดทั้งบริเวณเปลือกหุ้มเมล็ดและต้นอ่อน ทั้งนี้ไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ดพริกในทั้งสองพันธุ์ ผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นคำแนะนำเพื่อลดการติดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริกได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนเพื่อส่งเสริมและการผลิตนิสิตระดับบัณฑิตศึกษาจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ขอขอบคุณบุคลากรภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนสถานที่และเครื่องมือต่าง ๆ เพื่อใช้ในการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2566. ข้อมูลการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุมเพื่อการค้า ปี 2566. แหล่งที่มา: https://www.doa.go.th/ard/?page_id=1443. สืบค้น: 20 เมษายน 2567.
- Antignus, Y., O. Lachman and M. Pearlsman, 2007. Spread of *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed transmission and bumble bee activity. *Plant Disease*. 91(1): 47-50.
- Card, S.D., M.N. Pearson and G.R.G. Clover. 2007. Plant pathogens transmitted by pollen. *Australasian Plant Pathology*. 36: 455-461.
- Chambers, G.A., A.M. Seyb, J. Mackie, F.E. Constable, B.C. Rodoni, D. Letham, K. Davis and M.J. Gibbs. 2013. First report of *Pepper chat fruit viroid* in traded tomato seed, an interception by Australian Biosecurity. *Plant Disease*. 97: 1386.
- Córdoba-Sellés, M. C., A. García-Ráñez, A. Alfaro-Fernández and C. JordáGutiérrez. 2007. Seed transmission of *Pepino mosaic virus* and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*. 91: 1250-1254.
- Garnsey, S.M. and R. Whidden. 1971. Decontamination treatments to reduce the spread of *Citrus exortis virus* (CEV) by contaminated tools. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 84: 63-67.
- Hammond, R.W. 2017. Seed, pollen, and insect transmission of viroids. pp. 521-529. In: *Viroids and Satellites*. A. Hadidi and R. Flores (eds). Elsevier Inc.
- Hammond, R.W. and R.A. Owens. 2006. Viroids: new and continuing risks for horticultural and agricultural crops. *APS Features*. Available at: <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2006-1106>. Accessed: January 19, 2023.
- International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). 1995. Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum spp.*). Available at: <https://cgspace.cgiar.org/items/ef0f3bcd-4878-4025-90ed-098a4c1b2918>. Accessed: February 1, 2024.
- ISTA. 2016. International Rules for Seed Testing 2016. The International Seed Testing Association (ISTA) Zürichstrasse 508303, Bassersdorf CH - Switzerland. 16. Available at: https://www.merconet.eu/files/SeedSampling_ISTA.pdf. Accessed: October 10, 2023.
- Jeffries, C. and J. Tina. 2004. Protocol for the Diagnosis of Quarantine Organism: *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). Scottish Agricultural Science Agency, East Craigs, Edinburgh, United Kingdom.
- Kungwon, P., C. Netwong, S. Porsoongnoen and K. Reanwarakorn. 2022. *Chrysanthemum stunt viroid* as a protective viroid isolate against *Columnea latent viroid* and *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants. *International Journal of Agricultural Technology*. 18(4): 1601-1618.
- Matsuura, S., Y. Matsushita, T. Usugi and S. Tsuda. 2010. Disinfection of tomato *Chlorotic dwarf viroid* by chemical and biological agents. *Crop Protection*. 29(10): 1157-1161.
- Matsushita, Y and S. Tsuda. 2016. Seed transmission of *Potato spindle tuber viroid*, *Tomato*

- chlorotic dwarf viroid*, *Tomato apical stunt viroid* and *Columnea latent viroid* in horticultural plants. *European Journal of Plant Pathology*. 145: 1007–1011.
- Nakamura, H. 1982. Effects of dry heat treatment for seed disinfection on germination in vegetables. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 15: 243-247.
- Olivier, T., V. Sveikauskas, S. Grausgruber-Groger, M. VirscekMarn, F. Faggioli, M. Luigi, E. Pitchugina and V. Planchon. 2015. Efficacy of five disinfectants against *Potato spindle tuber viroid*. *Crop Protection*. 67: 257-260.
- R core team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. Available at: <https://www.r-project.org/>. Accessed: October 10, 2023
- Reanwarakorn, K., S. Klinkong and J. Porsoongnum. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*. 24(6): 6.
- Serio, F.D., R. Flores, J.Th.J. Verhoeven, S.F. Li, V. Pallás, J.W. Randles, T. Sano, G. Vidalakis and R.A. Owens. 2014. Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology*. 159: 3467–3478.
- Singh, R.P., A. Boucher and T.H. Somerville. 1989. Evaluation of chemicals for disinfection of laboratory equipment exposed to *Potato spindle tuber viroid*. *American Journal of Potato Research*. 66: 239-245.
- Sombat, S. 2019. Multiplex Real-time RT-PCR and Seed Disinfection of *Pepper chat fruit viroid* and *Columnea latent viroid* in Tomato Seed. Thesis in Doctor of Philosophy of Science, Program in Plant Pathology. Kasetsart University. 82 p.
- Verhoeven, J.T.J., C.C.C. Jansen, J.W. Roenhorst, R. Flores and M. de la Peña. 2009. *Pepper chat fruit viroid*: Biological and molecular properties of a proposed new species of the genus *Pospiviroid*. *Virus Research*. 144: 209-214.
- Verhoeven, J.T.J., H.M.S. Koenraad, A. Jodlowska, L. Hüner and J.W. Roenhorst. 2020. Pospiviroid infection in *Capsicum annuum*: Disease symptom and lack of seed transmission. *European Journal of Plant Pathology*. 156: 21-29.
- Verhoeven, J. T. J., M. Botermans, R. Schoen, H. Koenraad and J. W. Roenhorst. 2021. Possible overestimation of seed transmission in the spread of pospiviroids in commercial pepper and tomato crops based on large-scale grow-out trials and systematic literature review. *Plants*. 10(8): 1707.
- Wang, C.H. 2022. Evaluation of seed re-treatment efficiency for viroid positive seed lots. World Vegetable Center. Available at: <https://worldveg.tind.io/record/74713>. Accessed: December 9, 2023.
- Yanagisawa, H., Y. Shiki, Y. Matsushita, M. Ooishi, N. Takaue and S. Tsuda. 2017. Development of a comprehensive detection and identification molecular based system for eight pospiviroids. *European Journal of Plant Pathology*. 149: 11–23.

ชนิดของไรศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติในกัญชา

Mite Pest Species and Their Natural Enemies of the Cannabis Plants

พลอยชมพู กรวิภาสเรือง^{1/*} วิมลวรรณ โชติวงศ์^{1/} อติติยา แก้วประดิษฐ์^{1/}
ณพชรกร ธัญชัย^{1/} วีระชัย สมศรี^{1/}
Ploychompoo Konvipasruang^{1/*} Wimolwan Chotwong^{1/} Athitiya Kaewpradit^{1/}
Naphacharakorn Ta-phaisach^{1/} Weerachai Somsri^{1/}

Received 15 Jan. 2024/Revised 7 Apr. 2024/Accepted 18 Apr. 2024

ABSTRACT

Currently, cannabis is allowed to be grown for herbal medicine uses in Thailand. It is becoming a new economic crop with expanding planting area while there is very limited knowledge of the pest species and their distribution. The survey of mite species, the potential pests of cannabis, was carried out from October 2021 to December 2023 in 61 districts of 33 provinces of Thailand. We found 19 species in 7 families of mites and insect, including 15 species of mite pests in 4 families, 2 predatory mites in 1 family, and 1 species of predatory insect. They were: *Aculops cannabicola* (Farkas) in the family Eriophyidae, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) in the family Tarsonemidae which caused the tops of cannabis leaves to become small and curled, *Brevipalpus californicus* group in the family Tenuipalpidae. The other 12 species were in the family Tetranychidae: *Eotetranychus suvipakiti* Ehara, *Neotetranychus* sp., *Panonychus elongatus* Manson, *Tetranychus kanzawai* Ehara, *Tetranychus gloveri* Banks, *Tetranychus neocaledonicus* Andre, *Tetranychus piercei* McGregor, *Tetranychus phaselus* Ehara, *Tetranychus truncatus* Ehara, *Tetranychus* sp., *Tetranychus urticae* Koch and *Tetranychus hydrangeae* Pritchard & Baker. Spider mites were found to cause damage to the lower leaves of cannabis, turning them yellow and eventually dry. The most important mite species of cannabis was *T. truncates* which was found infesting cannabis in almost every area surveyed. In addition, 2 species of predatory mites and 1 predatory insect were found in this study: *Amblyseius cinctus* Corpuz-Raros & Rimando, *Neoseiulus longispinosus* (Evans), and *Scolothrips asura* Ramakrishna & Margabhandu.

Keywords: mite pest; mite; spider mite; broad mite; eriophyid mite; rust mite

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 50 ถ. พหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, 50 Phahonyothin Rd., Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding author: ploychompoo.k@doa.go.th

บทคัดย่อ

พืชกัญชาได้รับการอนุญาตให้ปลูกเป็นพืชสมุนไพรเพื่อรักษาโรคได้ จึงเป็นพืชเศรษฐกิจใหม่ของประเทศไทย ข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับชนิดศัตรูของกัญชายังมีน้อยมาก โดยเฉพาะไรศัตรูพืชซึ่งเป็นศัตรูหลักของกัญชา จึงทำการสำรวจไรศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติในแปลงกัญชาระหว่างเดือน ต.ค. 2564 ถึง ธ.ค. 2566 เพื่อจำแนกชนิดชื่อที่ถูกต้อง ลักษณะการทำลาย และการแพร่กระจาย ในพื้นที่ 61 อำเภอ 33 จังหวัด ในประเทศไทย พบไรและแมลงในแปลงกัญชาทั้งหมด 19 ชนิด 7 วงศ์ โดยเป็นศัตรูพืชทั้งหมด 15 ชนิด 4 วงศ์ เป็นไรตัวห้ำ 2 ชนิด 1 วงศ์ ไรกินเชื้อรา 1 ชนิด 1 วงศ์ แมลงตัวห้ำ 1 ชนิด 1 วงศ์ ผลการจำแนกไรศัตรูพืชที่พบ ได้แก่ (1) วงศ์ Eriophyidae 1 ชนิด คือ *A. cannabicola* (2) วงศ์ Tarsonemidae 1 ชนิด คือ *P. latus* (Banks) ทำให้ใบยอดกัญชา มีขนาดเล็กลง ใบหงิกงอ (3) วงศ์ Tenuipalpidae 1 ชนิด คือ *B. californicus* (4) วงศ์ Tetranychidae 12 ชนิด คือ *E. suvipakiti* *Neotetranychus* sp. *P. elongates* *T. kanzawai* *T. gloveri* *T. neocaledonicus* *T. piercei* *T. phaselus* *T. truncatus* *Tetranychus* sp. *T. urticae* และ *Tetranychus hydrangea* ไรแดงในวงศ์ Tetranychidae เข้าทำลายบริเวณใต้ใบกัญชา ทำให้ใบกัญชามีสีซีด ต่อมาใบจะเหลืองและแห้ง ชนิดที่สำคัญและพบเข้าทำลายในเกือบทุกพื้นที่คือ *T. truncatus* ส่วนไรตัวห้ำพบ 2 ชนิด คือ *A. cinctus* และ *N. longispinosus* พบเพลี้ยไฟตัวห้ำ 1 ชนิด คือ *S. asura* และไรกินเชื้อราอยู่ในวงศ์ Tydeidae 1 ชนิด ข้อมูลที่ได้ในงานวิจัยนี้เป็นข้อมูลใหม่ สามารถนำไปใช้อ้างอิงและเป็นข้อมูลในการหาวิธีการป้องกันกำจัดไรศัตรูกัญชาต่อไป

คำสำคัญ: ไรศัตรูพืช; ไรแดง; ไรแดงกัญชา; ไรขาว; ไรสีขา; ไรสีขา; ไรสนิมกัญชา

บทนำ

กัญชาเป็นไม้ล้มลุกที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชีย จัดเป็นยาเสพติดให้โทษประเภท 5 ตามพระราชบัญญัติ (พ.ร.บ.) ยาเสพติดให้โทษ แต่ได้รับข้อยกเว้นในกรณีจำเป็น โดยอนุญาตให้นำกัญชาไปศึกษาวิจัย เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และรักษาโรคภายใต้การดูแลของแพทย์ หรือเพื่อการศึกษาวิจัยและพัฒนา ทั้งนี้ให้รวมถึงการเกษตรกรรม พาณิชยกรรม วิทยาศาสตร์ หรืออุตสาหกรรม เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ ตาม พ.ร.บ. ยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 7) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 พ.ศ. 2565 เมื่อวันที่ 8 ก.พ. 2565 เผยแพร่ในราชกิจจานุเบกษา เมื่อวันที่ 9 ก.พ. 2565 และมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 9 มิ.ย. 2565 มีผลให้สารสกัดจากทุกส่วนของกัญชา และกัญชง ไม่เป็นยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ยกเว้นสารสกัดที่มีสาร Tetrahydrocannabinol (THC) เกินร้อยละ 0.2 ยังคงเป็นยาเสพติด และยกเลิกความผิดฐานผลิต นำเข้า หรือส่งออก มีไว้ในครอบครองและจำหน่าย (กองบัญชาการตำรวจสันติบาล, 2565) กัญชามีสารออกฤทธิ์ (bioactive compounds) ในกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) มีการใช้ทางการแพทย์มาก 2 ชนิด ได้แก่ THC และ cannabidiol (CBD) หลายประเทศได้มีการนำผลิตภัณฑ์สารสกัดจากกัญชามาใช้เพื่อเป็นยารักษาโรคสำคัญ ได้แก่ ลมบ้าหมู กล้ามเนื้อหดเกร็ง โรคต่อหีน คลื่นไส้ โรคเกาต์ โรคอัลไซเมอร์ โรคเบาหวาน และโรคมะเร็ง (กรมการแพทย์, 2562; สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2562; เมดไทย, 2563) กัญชาอาจ

เป็นพืชเศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรในการผลิตเพื่อใช้ในการแพทย์ ซึ่งวัตถุดิบ گیาที่นำมาใช้ทางการแพทย์ควรมีมาตรฐาน ปราศจากการทำลายของศัตรูพืช (กรมวิทยาศาสตร์ทาง การแพทย์, 2563)

แมลงศัตรูพืชที่สำคัญที่เคยมีรายงาน ได้แก่ เพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae* *Aphis fabae*) แมลงหีวขาว (*Trialeurodes vaporariorum* *Bemisia tabaci* *B. argentifolii*) (California Department of Pesticide Regulation, 2019) และไร ชนิดไร ที่ทำความเสียหายต่อต้น گیา ได้แก่ ไรสองจุด (*Tetranychus urticae*) ไรขาวพริก (*Polyphago tarsonemus latus*) และไรสนิม (*Aculops cannabicola*) ซึ่งเป็นไรที่มีความสำคัญในโรงเรือนปลูก گیา ถ้าไรเข้าดูดน้ำเลี้ยงใบอ่อน ยอดอ่อน มีผลทำให้ใบหงิก ม้วนงอ เป็นสนิม และต้น گیา ตายในที่สุด (Boczek and Maciejczyk, 1993; Petanovic et al., 2007; Xue et al., 2013; Górski et al., 2016; Wainwright-Evans, 2017; Quarles, 2018) สำหรับประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาถึงชนิดของไรศัตรูที่พบใน گیา จึงทำการสำรวจและจำแนกชนิดชื่อของไรศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติในแปลง گیาในประเทศไทย พร้อมทั้งศึกษา ลักษณะการทำลายและเขตการแพร่กระจาย ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกร นักวิชาการและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง นำไปใช้อ้างอิงและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาวิธีการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

ทำการสำรวจไรศัตรูพืชในแปลง گیา โดยการสุ่มเก็บใบในแปลงปลูก گیาของประเทศไทย

ทั้งในสภาพโรงเรือนตาข่าย และสภาพภายนอกโรงเรือน หรือสภาพพื้นที่โล่ง ระหว่างเดือน ต.ค. 2564 ถึง ธ.ค. 2566 ใน 61 อำเภอ 33 จังหวัด ได้แก่ จ.พระนครศรีอยุธยา กรุงเทพฯ นนทบุรี ชุมพร ตรัง สุราษฎร์ธานี ภูเก็ต กาญจนบุรีราชบุรี อุทัยธานี นครสวรรค์ ชัยนาท ลำพูน สุโขทัย ลำปาง เชียงใหม่ สระบุรี นครราชสีมา มหาสารคาม ขอนแก่น ร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์ บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ สกลนครอุดรธานี บึงกาฬหนองคาย สระแก้ว ตราด ชลบุรี ระยอง และจันทบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างไรจากต้น گیาที่แสดงอาการไรเข้าทำลายในแต่ละพื้นที่ ทำการเก็บใบ گیาจำนวนแปลงละ 5 ต้น ต้นละ 10 ใบ และเก็บใบ กิ่ง ผล หรือส่วนต่าง ๆ ของพืชที่แสดงอาการผิดปกติ ลงในกล่องพลาสติก หรือถุงกระดาษพับปากถุง บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่าง เช่น ชื่อพืช ชื่อผู้เก็บ ลักษณะการทำลาย สถานที่ที่เก็บ และพิกัดทางภูมิศาสตร์ ใบ แล้วนำตัวอย่างศัตรูพืชที่ได้มายังห้องปฏิบัติการเพื่อทำ สไลด์ถาวรและจำแนกชนิด

2. การทำสไลด์ถาวรเพื่อการจำแนกชนิด

ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope โดยหยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเช็ดตัวไรลงบนหยด น้ำยา จัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน ไรตัวผู้ให้จัดทำทางในลักษณะตะแคงข้าง เพื่อตรวจสอบลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ จากนั้นปิดสไลด์ด้วย cover glass นำสไลด์ขึ้นอังบนตะเกียงแอลกอฮอล์พอร้อนเพื่อให้อวัยวะส่วนต่าง ๆ ยึดออก และไล่ฟองอากาศ นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40° ซ. ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ cover glass ด้วยน้ำยาทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับสถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บ และพืชอาศัยที่ด้าน ขวามือของแผ่นสไลด์

3. การจำแนกชนิดไรโดยใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

นำตัวอย่างไรที่ทำสไลด์ถาวรแล้ว มาศึกษา ลักษณะทางอนุกรมวิธานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบ compound microscope เพื่อจำแนกชนิด โดยเทียบกับคู่มือการจำแนกไรของ Ehara and Wongsiri (1975) Ehara and Bhandhufalck (1977) Meyer (1979) Meyer (1987) Ehara (1999) และ Amrine et al. (2003)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ชนิดของไรศัตรูพืช

สำรวจไรศัตรูพืชในแปลงปลูกกัญชารวม ทั้งสิ้น 97 แปลง พบไรศัตรูพืช 87 แปลง มีอัตราการเข้าทำลาย (infestation rate) 89.7% ของพื้นที่สำรวจ โดยไรที่พบเป็นศัตรูพืช 15 ชนิด (Table 1)

จัดอยู่ในอันดับ Trombidiformes 5 วงศ์ ได้แก่

- (1) วงศ์ Eriophyidae พบ 1 ชนิด คือ *A. cannabicola*
- (2) วงศ์ Tarsonemidae พบ 1 ชนิด คือ *P. latus*
- (3) วงศ์ Tetranychidae พบ 12 ชนิด คือ *E. suvipakiti* *Neotetranychus* sp. *P. elongatus* *T. gloveri* *Tetranychus kanzawai* *T. phaselus* *T. neocaledonicus* *T. urticae* *T. truncatus* *T. piercei* *Tetranychus* sp. และ *T. hydrangeae*
- (4) วงศ์ Tenuipalpidae พบ 1 ชนิด คือ *B. californicus* และ (5) ไรงินเชื้อราที่อยู่ในวงศ์ Tydeidae 1 ชนิด สำหรับไรตัวห้ำที่พบจัดอยู่ในอันดับ Mesostigmata พบ 2 ชนิด อยู่ในวงศ์ Phytoseiidae คือ *A. cinctus* และ *N. longispinosus* นอกจากนี้ยังพบเพลี้ยไฟ ตัวห้ำ 1 ชนิด คือ *S. asura* (Table 2)

Table 1 Mite pest species attacking *Cannabis sativa* L. and their symptom of injury found in various areas of Thailand

Specific name of mite	Location	Symptom of injury	Latitude	Longitude
Family Eriophyidae				
<i>Aculops cannabicola</i> (Farkas)	Mueang Nong Khai district, Nong Khai province	Vagrant, Rust leaf curve	17°47.58	102°47.49
	Mueang Buri Ram district, Buri Ram province		14°57.735	103°4.653
	Mueang Bueng Kan district, Bueng Kan province		18°20.18	103°41.37
	Mueang Kan province		18°20.32	103°40.15

Family Tarsonemidae				
<i>Polyphagotarsonemus latus</i> (Banks)	Chatuchak district, Bangkok	Young leaf curve	13°51.07	100°34.31
	Mueang Trang district, Trang province		7°39.480	99°39.554

Family Tenuipalpidae				
<i>Brevipalpus californicus</i> group	Chatuchak district, Bangkok		13°51.07	100°34.31

Family Tetranychidae				
<i>Eotetranychus suvipakiti</i> Ehara	Samoeng district, Chiang Mai province	White patches on the lower leaf surface	18°51.29	98°45.38
<i>Neotetranychus</i> sp.	Samoeng district, Chiang Mai province		18°51.29	98°45.38
<i>Panonychus elongatus</i> Manson	Tha Sae district, Chumphon province	White patches on the lower leaf surface	10°49.68	99°12.128
<i>Tetranychus gloveri</i> Banks	Mueang Ratchaburi district, Ratchaburi province	White patches on the lower leaf surface	13°32.73	99°47.007

Table 1 (continued)

Specific name of mite	Location	Symptom of injury	Latitude	Longitude
<i>Tetranychus kanzawai</i> Kishida	Samoeng district, Chiang Mai province	White patches on the lower leaf surface	18°51.29	98°45.38
	Lat Yao sub-district, Chatuchak district, Bangkok		13°51.07	100°34.31
	Mueang Trang district, Trang province		7°39.48	99°39.554
	Makham district, Chanthaburi province		12°49.036	102°13.914
	Laem Ngop district, Trat province		12°14.58	102°17.37
	Laem Sing district, Chanthaburi province		12°29.976	102°8.826
	Tha Sae district, Chumphon province		10°49.481	99°12.536
	Thalang district, Phuket province		8°0.56	98°23.33
	Kanchanadit district, Surat Thani province		9°8.724	99°38.184
	Ko Pha-ngan district, Surat Thani province		9°44.802	100°3.271
	Mueang Chanthaburi district, Chanthaburi province		12°34.08	102°3.11
<i>Tetranychus neocaledonicus</i> Andre				
<i>Tetranychus piercei</i> McGregor	Nong Prue district, Kanchanaburi province	White patches on the lower leaf surface	14°36.488	99°27.537
	Khao Khitchakut district, Chanthaburi province		12°52.985	102°01.153
<i>Tetranychus phaselus</i> Ehara	Mueang Buri Ram district, Buri Ram province	White patches on the lower leaf surface	14°57.47	103°4.38
<i>Tetranychus truncatus</i> Ehara	Mueang Uthai Thani district, Uthai Thani province	White patches on the lower leaf surface	15°24.44	100°02.04
	Mueang Uthai Thani district, Uthai Thani province		15°24.43	100°02.05
	Phayuha Khiri district, Nakhon Sawan province		15°37.491	100°14.934
	Lat Yao district, Nakhon Sawan province		15°48.633	99°49.355
	Nonthaburi province		-	-
	Pak Kret district, Nonthaburi province		-	-
	Tha Tako district, Nakhon Sawan province		15°42.894	100°27.713
	Nong Bua district, Nakhon Sawan province		15°51.939	100°36.415
	Mueang Nakhon Sawan district, Nakhon Sawan province		15°38.131	100°15.554
	Phaisali district, Nakhon Sawan province		15°31.900	100°36.854
	Nong Ma Mong district, Chai Nat province		15°16.229	99°47.060
	Kasetsart University, Chatuchak district, Bangkok		13°51.098	100°34.007
			13°50.526	100°33.462

Table 1 (continued)

Specific name of mite	Location	Symptom of injury	Latitude	Longitude
	Wang Muang district, Saraburi province		14°47.13	101°04.04
	Bang Pa-in district, Phra Nakhon Si Ayutthaya province		14°13.02	100°36.04
	Nakhon Luang district, Phra Nakhon Si Ayutthaya province		14°24.235	100°38.064
	Ko Chan district, Chon Buri province		13°23.583	101°18.109
	Mueang Chanthaburi district, Chanthaburi province		12°41.898	102°6.402
	Kaeng Hang Maeo district, Chanthaburi province		12°56.574	101°49.404
	Khlomg Yai district, Trat province		11°41.1	102°54.402
	Kaeng Hang Maeo district, Chanthaburi province		13°4.342	101°51.897
	Nikhom Phatthana district, Rayong province		12°51.406	101°10.344
	Mueang Rayong district, Rayong province		12°44.242	101°22.288
	Bang Phae district, Ratchaburi province		13°38.814	100°1.095
	Dan Makham Tia district, Kanchanaburi province		13°53.871	99°20.572
	Tha Muang district, Kanchanaburi province		13°57.32	99°39.06
	Lang Suan district, Chumphon province		9°54.381	99°1.823
	Thalang district, Phuket province		8°0.56	98°23.33
	Tha Bo district, Nong Khai province		17°52.35	102°34.59
	Mueang Udon Thani district, Udon Thani province		17°28.1	102°47.34
	Wang Nam Khiao district, Nakhon Ratchasima province		14°21.343	101°55.557
	Kantharawichai district, Maha Sarakham province		14°21.333	101°55.554
	Ban Dan district, Buri Ram province		16°16.297	103°12.988
	Ban Dan district, Buri Ram province		15°10.699	103°09.511
	Ban Dan district, Buri Ram province		15°05.504	103°10.378
	Nong Ki district, Buri Ram province		14°40.453	102°33.274
	Mueang Buri Ram district, Buri Ram province		15°2.49	103°4.26
	Mueang Buri Ram district, Buri Ram province		14°57.761	103°4.655
	Phra Yuen district, Khon Kaen province		-	-
	Mueang Khon Kaen district, Khon Kaen province		-	-
	Suwannaphum district, Roi Et province		15°36.009	103°43.628
	Changhan district, Roi Et province		16°09.427	103°38.198
	Lam Khlomg sub-district, Mueang Kalasin district, Kalasin province		16°34.691	103°29.326

Table 1 (continued)

Specific name of mite	Location	Symptom of injury	Latitude	Longitude
	Kantharalak district, Si Sa Ket province		14°45.540	104°39.584
	Khlung Hat district, Sa Kaeo province		13°26.811	102°19.408
	Wang Nam Yen district, Sa Kaeo province		13°35.177	102°08.116
	Mueang Udon Thani district, Udon Thani province		17°18.509	102°39.350
	Mueang Nong Khai district, Nong Khai province		17°46.86	102°47.59
			17°47.58	102°47.49
	Mueang Sakon Nakhon district, Sakon Nakhon province		17°01.020	104°07.013
	Mueang Bueng Kan district, Bueng Kan province		18°20.18	103°41.37
			18°20.32	103°40.15
	Mueang Buri Ram district, Buri Ram province		14°57.42	103°04.39
	Mueang Buri Ram district, Buri Ram province		14°57.47	103°04.38
	Si Samrong district, Sukhothai province		17°9.588	99°51.624
	Chae Hom district, Lampang province		18°48.158	99°35.005
	Ban Hong district, Lamphun province		18°19.353	98°45.089
	Saraphi district, Chiang Mai province		18°44.334	99°0.094
	Samoeng district, Chiang Mai province		18°51.517	98°45.651
	Doi Saket district, Chiang Mai province		18°54.603	99°14.024
	Samoeng district, Chiang Mai province		18°51.29	98°45.38
	San Pa Tong district, Chiang Mai province		18°31.285	98°52.285
	<i>Tetranychus</i> sp. Samoeng district, Chiang Mai province		18°51.29	98°45.38
	Mueang Trang district, Trang province		7°39.480	99°39.554
	Mueang Buri Ram district, Buri Ram province		-	-
<i>Tetranychus urticae</i> Koch	Mueang Nakhon Ratchasima district, Nakhon Ratchasima province	White patches on the lower leaf surface	14°52.2912	102°1.5504
	Saraphi district, Chiang Mai province		18°40.033	99°4.526
	Pran Buri district, Prachuap Khiri Khan province		12°26.025	99°56.314
	Mueang Lamphun district, Lamphun province		18°35.7023	98°58.1205
	Ban Hong district, Lamphun province		18°22.550	98°49.396
<i>Tetranychus hydrangeae</i> Pritchard & Baker		White patches on the lower leaf surface		
Family Tydeidae	Kantharawichai district, Maha Sarakham province	Mold mite	16°16.297	103°12.988

Table 2 Predatory mites and thrips found on *Cannabis sativa* L. in various areas of Thailand

Scientific name of predatory mite/thrips	Associated mite pest	Location	Latitude	Longitude
Family Phytoseiidae				
<i>Amblyseius cinctus</i> Corpuz-Raros & Rimando	<i>Tetranychus kanzawai</i> Kishida	Thalang district, Phuket province	8°0.56	98°23.33
<i>Neoseiulus longispinosus</i> (Evans)	<i>Tetranychus truncatus</i> Ehara	Mueang Uthai Thani district, Uthai Thani province	15°24.44	100°02.04
<i>Neoseiulus longispinosus</i> (Evans)	<i>Tetranychus truncatus</i> Ehara	Mueang Khon Kaen district, Khon Kaen province	-	-
		Thalang district, Phuket province	8°0.56	98°23.33
		Kantharawichai district, Maha Sarakham province	16°16.297	103°12.988
		Changhan district, Roi Et province	16°09.427	103°38.198
		Mueang Sakon Nakhon district, Sakon Nakhon province	17°01.020	104°07.013
	<i>Tetranychus urticae</i> Koch	Saraphi district, Chiang Mai province	18°40.033	99°4.526
	<i>Tetranychus phaselus</i> Ehara	Mueang Buri Ram district, Buri Ram province	14°57.47	103°4.38
	<i>Tetranychus kanzawai</i> Kishida	Tha Sae district, Chumphon province	10°49.4808	99°12.536
		Thalang district, Phuket province	8°0.56	98°23.33
Family Thripidae				
<i>Scolothrips asura</i> Ramakrishna & Margabhandu	<i>Tetranychus kanzawai</i> Kishida	Tha Sae district, Chumphon province	10°49.4808	99°12.5364

อัตราการเข้าทำลาย และลักษณะการเข้าทำลายของไรศัตรูพืชที่สำคัญในประเทศไทย

ไรศัตรูพืชวงศ์ Tetranychidae เป็นไรที่พบบ่อยที่สุด โดยไรแดงหมอน *T. truncatus* พบมากที่สุดถึง 64.95% ของพื้นที่สำรวจ รองลงมา คือไรแดงคันขาว *T. kanzawai* (10.31%) ไรสองจุด *T. urticae* (4.12%) และ *T. piercei* คิดเป็น 2.06% ของพื้นที่สำรวจ ในงานวิจัยนี้พบไรสีขา กัญชา *A. cannabicola* 4.12% ของพื้นที่สำรวจ ขณะที่พบไรตัวห้ำ *A. cinctus* 1.01% และ *N. longispinosus* 5.15% ของพื้นที่สำรวจ สำหรับเพลี้ยไฟตัวห้ำ *S. asura* พบ 1.03% สำหรับไรศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ

ที่พบในกัญชา ได้แก่ *P. latus*, *B. californicus*, *E. suvipakiti*, *P. elongatus*, *T. gloveri*, *T. neocaledonicus*, *T. phaselus* และ *T. hydrangea* ไรทั้ง 8 ชนิดนี้พบเพียง 1.03% ของพื้นที่สำรวจ

ไรสีขา กัญชา

ไรสีขา กัญชาวงศ์ Eriophyidae ได้แก่ *A. cannabicola* มีรูปร่างลักษณะคล้ายหนอนสีขาวใสหรือเหลืองอ่อน ๆ (Figure 1A) ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และเป็นชนิดที่พบครั้งแรก (first record) ในประเทศไทย และทำให้ใบกัญชามีลักษณะเป็นคลื่น ๆ และมีอาการสนิมบริเวณ

ใต้ใบ ผิวของใบมีลักษณะเป็นขนกำมะหยี่เล็ก ๆ (Figure 1B) หรือบางครั้งพบใบมีลักษณะหงิกงอ คล้ายอาการเข้าทำลายของไรขาว และหากพบไร ปริมาณมากจะทำให้ต้นแคระแกรน ส่งผลต่อ ผลผลิตซึ่งลักษณะอาการเข้าทำลายของไรสีขาว กัญชาที่สำรวจพบนี้ สอดคล้องกับรายงานของ Hirsch and Kesheimer (2021) ไรชนิดนี้มีรายงาน เข้าทำลายที่ใบกัญชา รัฐเคนทักกี และรัฐแคลิฟอร์เนีย

ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเข้าทำลายที่ตายอด และตาข้างของพืช อาจทำให้แคระแกรนได้ หากพบ ไรจำนวนมากจะทำให้ใบมีขนาดเล็กลง และ เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของตายอดและ ตาข้าง ลำต้นแคระแกรน ส่งผลกระทบต่อผลผลิต และคุณภาพได้ (Pulkoski and Burrack, 2020; Villanueva et al., 2021)

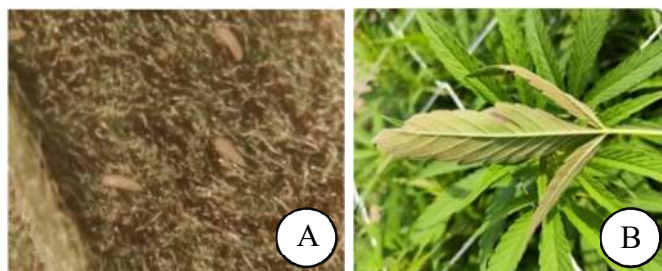


Figure 1 (A) Hemp russet mite, *Aculops cannabicola* (Farkas), (B) Russetting of leaf

วงศ์ Tarsonemidae ได้แก่ ไรขาว *Polyphagotarsonemus latus* พบเข้าทำลายใบ กัญชาโดยเข้าทำลายใบกัญชาในระยะแตกใบอ่อน ทำให้ใบกัญชาหงิกงอ และมีขนาดเล็กลง

(Figure 2A - B) โดยไรขาวชนิดนี้เป็นชนิดเดียวกับ ที่พบในพริก ส้มโอ มะม่วง และพืชเศรษฐกิจอีก หลายชนิด (วัฒนา และคณะ, 2544)



Figure 2 (A) Broad mite, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), (B) Leaves curl damage

วงศ์ Tetranychidae พบ 12 ชนิด ได้แก่ *E. suvipakiti*, *Neotetranychus* sp., *P. elongatus* (Figure 3A - B) และ *T. gloveri* (Figure 3C - D), ไรศัตรูกัญชาชนิด *T. kanzawai* (Figure 3E - G) และ *T. phaselus* (Figure 3H - J), *T. neocaledonicus* (Figure 3K - M), *T. urticae* (Figure 3N - P),

T. truncatus (Figure 3Q - S), *T. piercei* (Figure 3T- U), *Tetranychus* sp. และ *T. hydrangeae*

สำหรับการเข้าทำลายของไรแดงในวงศ์ Tetranychidae พบบริเวณใต้ใบกัญชา ทำให้ใบ กัญชามีสีซีด ต่อมาใบจะเหลือง และแห้ง ที่สำคัญ พบเข้าทำลายในเกือบทุกพื้นที่ (Figure 3G, J, M, P, S)

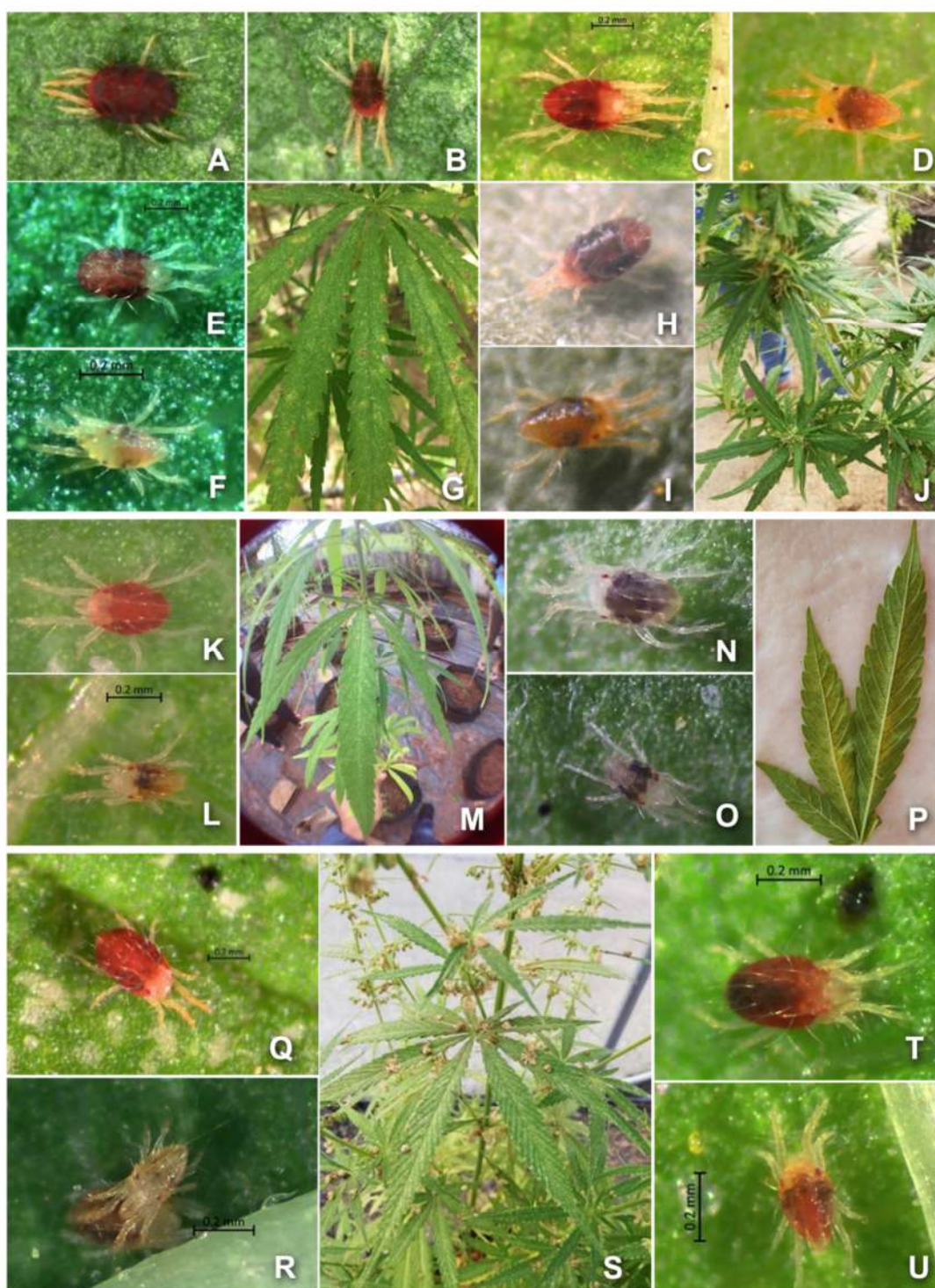


Figure 3 (A) *Panonychus elongatus* Manson (female), (B) Male; (C) *Tetranychus gloveri* Banks (female), (D) Male; (E) *Tetranychus kanzawai* Kishida (female), (F) Male, (G) Injury to hemp leaves; (H) *Tetranychus phaselus* Ehara (female), (I) Male, (J) Injury to hemp leaves; (K) *Tetranychus neocaledonicus* Andre (female), (L) Male, (M) Injury to hemp leaves; (N) Two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (female), (O) Male, (P) Injury to hemp leaves; (Q) Mulberry red mite, *Tetranychus truncatus* Ehara (female), (R) Male, (S) Injury to hemp leaves; (T) *Tetranychus piercei* McGregor (female), (U) Male

จากการสำรวจพบว่า ไรแดงมีลำตัวสีแดงเข้าทำลายบริเวณใต้ใบกล้วย ทำให้ใบเป็นจุดประขาว หรือ สีซีด อย่างไรก็ตาม ไรแดงที่มีชื่อว่า *E. suvipakiti* และ *Neotetranychus* sp. จะมีลักษณะลำตัว สีเหลืองหรือสีเขียว เข้าทำลายใต้ใบเช่นเดียวกัน ซึ่งไรแดงในสกุล *Neotetranychus* นี้พบในประเทศไทยเพียงชนิดเดียวบนใบมันสำปะหลังมีชื่อว่า *Neotetranychus lek* (Flechtmann, 2013) แต่การสำรวจพบในครั้งนี้มีจำนวนตัวไรน้อยและไม่พบตัวผู้ในประชากร จึงไม่สามารถจำแนกได้ถึงระดับชนิด (species) เนื่องจาก การจำแนกชนิดไรแดง จำเป็นต้องใช้ไรแดงเพศผู้ในการจำแนกชนิดสำหรับไรแดง *P. elongates* มีลำตัวสีแดงจะแตกต่างจากไรแดงชนิดอื่นโดยพบว่า ขนด้านหลังยาวมาก เกินกว่าระยะของฐานขน และขนเป็นกระบอง (Figure 3A - B) ไรชนิดนี้จะพบในพืชตระกูลส้ม หรือท้อ (Baker, 1975) จากการสืบค้นในฐานข้อมูลพิพิธภัณฑิ์ไรของกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม พบว่าไร *P. elongates* มีการแพร่กระจายในพื้นที่ จ. เชียงใหม่ เท่านั้น จึงเป็นครั้งแรกที่รายงานการพบไรชนิดนี้เข้าทำลายใบกล้วย โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคใต้ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ยังไม่มีการรายงานว่ามีพบไรชนิดนี้มาก่อน (Baker, 1975; Ehara and Wongsiri, 1975) ไรแดง *T. okinawanus* เป็นไรที่ชื่อซ้ำ (synonym) กับ ไรแดง *T. gloveri* ดังนั้น ไรแดงที่ได้เคยรายงานไว้เป็นชื่อ *T. okinawanus* จึงถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *T. gloveri* ทั้งหมด (Sharkey et al., 2022)

ไรแดงหมอน

Tetranychus truncatus เป็นไรแดงชนิดที่มีความสำคัญ จากการสำรวจพบการแพร่กระจายเกือบทุกพื้นที่ที่สำรวจ (Figure 3Q - R) ไรแดง

หมอนจะเข้าทำลายบริเวณใต้ใบกล้วยทำให้ใบกล้วยมีสีซีด (Figure 3S) ต่อมาใบจะเหลือง หากระบาดรุนแรงต้นกล้วยอาจแห้งตายได้ สำหรับไรแดง *T. phaselus* มีรายงานว่าพบในแปลงปลูกกล้วยครั้งแรกในประเทศไทย (new record) (Konvipasruang, 2022)

วงศ์ Tenuipalpidae พบ 1 ชนิด คือ *Brevipalpus californicus* (Figure 4) ลักษณะอาการเข้าทำลายของไรชนิดนี้ไม่ชัดเจน มักพบไรอยู่กระจัดกระจายตามเส้นกลางใบกล้วย มีขนาดเล็กกว่าไรแดง มีสีแดง เคลื่อนไหวช้า



Figure 4 False spider mite, *Brevipalpus californicus* group

ไรตัวห้ำ

การวิจัยนี้ยังพบไรตัวห้ำที่มีประสิทธิภาพ คือ *A. cinctus* และ *N. longispinosus* (Figure 5) ซึ่งสามารถนำมาเลี้ยงขยายได้ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดแบบชีววิธี นอกจากนี้ยังพบเพลี้ยไฟ *S. asura* มีความสามารถในการกินไรแดงได้มากเช่นกัน แต่ยังไม่มียางานการเลี้ยงขยายได้สำเร็จในห้องปฏิบัติการ



Figure 5 Predatory mite, *Neoseiulus longispinosus* (Evans)

ผลการสำรวจไรศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติในแปลงกัญชาในประเทศไทยนี้ ทำให้ทราบชนิดหรือชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของไรที่ทำลายกัญชา ทราบศัตรูธรรมชาติ ทราบลักษณะการทำลาย และเขตการแพร่กระจายในประเทศไทย นอกจากนี้ ตัวอย่างไรศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่พบในแปลงกัญชายังได้ถูกเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อใช้ในการศึกษาและอ้างอิงในอนาคต หรือใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาวิธีการบริหารจัดการศัตรูกัญชาที่เหมาะสมต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การสำรวจไรศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติในแปลงกัญชาในประเทศไทยเพื่อจำแนกชนิดลักษณะการทำลาย และเขตการแพร่กระจายในพื้นที่ 61 อำเภอ 33 จังหวัด พบไรและแมลงในแปลงกัญชาทั้งหมด 19 ชนิด 7 วงศ์ โดยเป็นไรศัตรูพืชทั้งหมด 15 ชนิด 4 วงศ์ เป็นไรตัวห้ำ 2 ชนิด 1 วงศ์ ไรกินเชื้อรา 1 ชนิด 1 วงศ์ และแมลงตัวห้ำ 1 ชนิด 1 วงศ์ โดยผลการจำแนกไรศัตรูพืชที่พบ คือ (1) วงศ์ Eriophyidae 1 ชนิด (2) วงศ์ Tarsonemidae 1 ชนิด (3) วงศ์ Tenuipalpidae 1 ชนิด (4) วงศ์

Tetranychidae 12 ชนิด ส่วนไรตัวห้ำพบ 2 ชนิด คือ *A. cinctus* และ *N. longispinosus* ผลการจำแนกยังพบเพลี้ยไฟตัวห้ำ 1 ชนิด คือ *S. asura* และไรกินเชื้อราอยู่ในวงศ์ Tydeidae 1 ชนิด ข้อมูลที่ได้นี้เป็นข้อมูลล่าสุดซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษามาก่อน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ Dr. Carlos Holger Wenzel Flechtmann จาก Departamento de Entomologia e Acarologia, Universidade de São Paulo, Brazil ที่ให้เอกสารวิชาการที่เป็นประโยชน์ในงานวิจัย และยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง

เอกสารอ้างอิง

- กรมการแพทย์. 2562. คำแนะนำการใช้กัญชาทางการแพทย์. กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. นนทบุรี. 23 หน้า.
- กรมวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์. 2563. กรมวิทย์ ฯ เพิ่มข้อกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์กัญชาในตำรายาของประเทศไทย. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แหล่งข้อมูล: www3.dmsc.moph.go.th/post-view/818. สืบค้น: 13 มิถุนายน 2567.
- กองบัญชาการตำรวจสันติบาล. 2565. ปลดล็อกกัญชา เช็กตร. แล้ว สรุปร่าง ๆ 11 ข้อ ครอบครอง-สูบ-คดิ-ของกลาง. แหล่งข้อมูล <https://www.bangkokbiznews.com/news/1008837>. สืบค้น: 8 สิงหาคม 2565.
- เมดไทย. 2563. กัญชา สรรพคุณและประโยชน์ของต้นกัญชา 30 ข้อ. แหล่งข้อมูล: <https://medthai.com/กัญชา/>. สืบค้น: 20 มิถุนายน 2566.
- วัฒนา จารณศรี มานิตา คงชื่นสิน เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และพิเชฐ เขาวนวัฒนาวงศ์. 2544. ไรศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. เขตจตุจักร กรุงเทพฯ. 192 หน้า.

- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2562. กฎระเบียบ
สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กอง
ควบคุมวัตถุเสพติด. แหล่งข้อมูล: <https://narcotic.fda.moph.go.th/law-type/category/rules-fda>
สืบค้น: 13 มิถุนายน 2562.
- Amrine, J.W.J, T.A.H. Stasny and C.H.W. Flechtmann.
2003. Revised Keys to World Genera of
Eriophyoidea (Acari: Prostigmata). Indira
Publishing House. Michigan, USA. 244 p.
- Baker, E.W. 1975. Plant Feeding Mites of Thailand
(Tetranychidae, Tenuipalpidae, and
Tuckerellidae). Department of Agriculture,
Ministry of Agriculture and Co-operative.
Bangkok. 43 p.
- Boczek, J. and K. Maciejczyk. 1993. Studies on
eriphyid mites (Acari: Eriophyoidea). XIII.
Bulletin of the Polish Academy of Sciences.
Biological Sciences. 41(4): 405–411.
- California Department of Pesticide Regulation.
2019. Legal pest management practices
for cannabis growers in California,
Version: October 9, 2017. Available at:
<https://www.cdpr.ca.gov/docs/county/cac>
[ltrs/penfltrs/penf2015/2015atch/attach15](https://www.cdpr.ca.gov/docs/county/cac)
[02.pdf](https://www.cdpr.ca.gov/docs/county/cac). Accessed: September 4, 2019.
- Ehara, S. and T., Wongsiri. 1975. The spider mites
of Thailand (Acarina: Tetranychidae).
Mushi. 48(13): 149-185.
- Ehara, S. and A. Bhandhufalck. 1977. Phytoseiid
mites of Thailand (Acarina: Mesostigmata).
Journal of the Faculty of Education.
Tottori University (Natural Science). 27(2):
43-82.
- Ehara, S. 1999. Revision of the spider mite family
Tetranychidae of Japan (Acari, Prostigmata).
Species Diversity. 4(1): 63-141.
- Flechtmann, C.H.W. 2013. A new species of
Neotetranychus Traägårdh (Acari, Prostigmata,
Tetranychidae) from Thailand with a key to
world species. Persian Journal of Acarology,
2(1): 35-40.
- Górski, R., K. Sobieralski and M. Siwulski. 2016. The
effect of hemp essential oil on mortality
Aulacorthum solani Kalt. and *Tetranychus*
urticae Koch. Ecological Chemistry and
Engineering S. 23(3): 505-511.
- Hirsch, H. and K., Kesheimer. 2021. Russet mites in
hemp. July 8, 2021. Available at: <https://www.aces.edu/blog/topics/crop-production/russet-mites-in-hemp/>. Accessed: March 17, 2024.
- Konvipasruang, P. 2022. New record of spider
mite on cannabis plant with key to
the species of *Tetranychus* in Thailand.
Entomology and Zoology Gazette. 40(2):
38-51.
- Meyer, M.K.P. 1979. African Tetranychidae (Acari:
Prostigmata) with Reference to the World
Genera. The Republic of South Africa by
the government printer, Pretoria. 175 p.
- Meyer, M.K.P. 1987. The Tenuipalpidae (Acari) of
Africa with Keys to the World Fauna.
Republic of South Africa by the
Government Printer. 135 p.
- Petanovic, R., B. Magud and D. Smiljanic. 2007.
The hemp russet mite *Aculops cannabicola*
(Farkas, 1960) (Acari: Eriophyoidea) found
on *Cannabis sativa* L. in Serbia:
supplement to the description. Archives of
Biological Sciences. 59(1): 81-85.
- Pulkoski, M. and H. Burrack. 2020. Hemp russet
mite in industrial hemp. Available at:
<https://Content.ces.ncsu.edu/hemp-russet-mite-in-industrial-hemp>. Accessed: April
1, 2024.

- Quarles, W. 2018. IPM for *Cannabis* pests. The IPM Practitioner Monitoring the Field of Pest Management. 36(5/6): 1-7.
- Sharkey, E.R., F. Beaulieu, M.R. Moore and S.J. Bolton. 2022. Morphological and molecular data reveal the conspecificity of the spider mites *Tetranychus gloveri* and *T. okinawanus* (Acari: Trombidiformes: Tetranychidae). Systematic and Applied Acarology. 27(2): 250–268.
- Villanueva, R., Z. Vilorio, R. Ochoa and A. Ulsamer. 2021. Hemp russet mite, a key pest of hemp in Kentucky. Available at: <https://entomology.ca.uky.edu/ef162>. Accessed: April 1, 2024.
- Wainwright-Evans, S. 2017. Take control of mites in *Cannabis* crops. Greenhouse Grower. October 22, 2017.
- Xue, X.F., H. Sadeghi, X.Y. Hong and S. Sinaie. 2013. New species and records of eriophyid mites from Iran (Acari: Eriophyidae). Systematic and Applied Acarology. 18(1): 41–52.

Development of Tetra-primer ARMS-PCR for Selection and Discrimination of CMD-Resistant Cassava Varieties Used in Thailand

Jeeraporn Kansup^{1/*} Suwaluk Sansanee^{2/} Adcharapun Chaicharoen^{1/}

Received 12 Feb. 2024/Revised 3 Apr. 2024/Accepted 9 Apr. 2024

ABSTRACT

Cassava mosaic disease (CMD) is a major disease that causes damage to cassava production worldwide. CMD-resistant cassava varieties obtained from the International Center for Tropical Agriculture (CIAT) and the International Institute of Tropical Agriculture (IITA), including 7 varieties, namely TME 3, C 33, IITA-TMS-IBA 920057, IITA-TMS-IBA 972205, IITA-TMS-IBA 980505, IITA-TMS-IBA 980581 and TME B 419, are currently being used as parent lines to create hybrids resistant to CMD suitable for cultivation in Thailand. The tetra-primer ARMS-PCR is a technique for single-nucleotide polymorphism (SNP) detection. It has the advantages of amplifying multiple alleles in a single reaction with the inclusion of a control fragment, cost-effectiveness as well as simplicity in operation. The purposes of this research were to develop primer sets using the tetra-primer ARMS-PCR technique to detect SNP markers associated with CMD resistance for the selection of resistant varieties and to develop a primer set for discrimination of variety within 7 CMD-resistant varieties being used in Thailand. The resultant primer sets have been readily developed and optimized condition to detect SNP markers Ex2-78, Ex2-157, Ex3-128, and S12_7926132 on chromosome 12, and can be used to select CMD-resistant varieties. For discrimination of CMD-resistant varieties, a primer set was developed to detect the SNP marker S12_8910428 in the *DNA polymerase δ subunit 1 gene*, and could distinguish TME B 419 from the remaining six resistant varieties. To our knowledge, this is the first report of using tetra-primer ARMS-PCR, which is cost-effective and simple to operate, in SNP detection for CMD-resistance selection in cassava.

Keywords: cassava; cassava mosaic disease; detection; molecular marker; single-nucleotide polymorphism (SNP)

^{1/} Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

^{2/} Rayong Field Crops Research Center, Department of Agriculture, Mueang Rayong, Rayong 21150, Thailand

* Corresponding author: maykansup77@hotmail.com

INTRODUCTION

Cassava is one of the important economic crops of Thailand with an area of 1.59 million hectares of plantations throughout the country. Thailand's cassava production amount was ranked third in the world after Nigeria and Congo. In 2022, Thailand has exported cassava products worth 172,593 million baht (Office of Agricultural Economics, 2022).

Cassava mosaic disease (CMD) is caused by the *Cassava mosaic virus* (CMV). It can infect cassava at all growth stages, causing a decrease in yield by more than 80%. Cassava plants infected with this disease show symptoms such as spotted leaves to yellow and deformed leaves, short trees and stunted stems. The disease epidemic is carried by the tobacco whitefly, *Bemisia tabaci*, and can be transmitted by infected cassava cuttings. The disease is endemic in many countries in Africa and Asia. The first outbreak of CMD in Thailand was reported in 2018 (Maneechoat et al., 2018). The causal virus was *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) (Rakkrai et al., 2022).

Until now, three loci or genes related to CMD resistance have been identified, namely *CMD1*, *CMD2* and *CMD3*. *CMD1* is a recessive gene originating from the wild cassava, *Manihot glaziovii* Muell. Arg. (Fregene and Puonti-Kaerlas, 2002). *CMD2*

is the major dominant locus controlling CMD resistance and is called the qualitative resistance source (Akano et al., 2002). It was identified in the cassava variety TME3 and is commonly found in West African landraces (Lim et al., 2022). *CMD3* is a minor gene that was identified in TMS 972205 (Okogbenin et al., 2012).

Molecular markers associated with the *CMD2* locus were reported. Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) marker, namely RME1 and Simple Sequence Repeat (SSR) markers, namely NS158, SSRY28 and NS169, are flanking near the *CMD2* locus with the distances 4, 7, 9 and 16 centimorgan, respectively (Carmo et al., 2015).

Wolfe et al. (2016) reported 3 SNP markers in the *peroxidase* gene (Cassava4.1_029175) differentiating between the CMD-resistant cassava genotypes having the qualitative resistance source *CMD2* (TMEB3, TMEB7 and I011412) and the CMD-tolerant cassava genotypes without *CMD2* (I30572 and TMEB1), namely Ex2-78 (the 78th nucleotide of Exon2), Ex2-157 and Ex3-128. The CMD-resistant cassava genotypes have alleles homozygous GG, TT and TT at SNPs Ex2-78, Ex2-157 and Ex3-128, respectively. Rabbi et al. (2020) conducted a Genome-Wide Association Study (GWAS) using a cassava population of 5,130 clones developed at the International Institute of Tropical

Agriculture (IITA) in Nigeria and found an additional SNP marker associated with CMD resistance at position S12_7926132 in the CMD2 locus on Chromosome 12 in *Manihot esculenta* v6.1 of the Phytozome database (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>). Ige et al. (2021) and Codjia et al. (2022) used the Kompetitive Allele-Specific PCR (KASP) assay to evaluate the effectiveness of the SNP S12_7926132 in selection for CMD resistance and found that the SNP S12_7926132 provided 77 – 80% accuracy.

Recently, Lim et al. (2022) discovered a gene involved in the loss of CMD2 resistance (LCR) after regeneration through de novo morphogenesis in multiple landraces but not in varieties developed through a breeding program. The gene was *DNA polymerase δ subunit 1 (MePOLD1)*. The SNP marker that co-segregates with CMD resistance was also identified. The SNP is in the coding sequence of *MePOLD1* and changes amino acid from valine to leucine at position 528 (V528L) (Lim et al., 2022), which is nucleotide position 8910428 on chromosome 12 (S12_8910428) in *Manihot esculenta* v8.1 of the Phytozome database, changing nucleotide from G to C. The resistant allele of SNP in *MePOLD1* was found in cassava varieties TME204 and TME B 419 (Lim et al., 2022), which are genetically close to each other (Raji et al., 2009). TME B 419 is one of the CMD-resistant varieties

that were used in breeding programs in Thailand.

There are several methods for the detection of SNP markers such as restriction fragment length polymorphism (RFLP), cleaved amplified polymorphic sequence marker (CAPS), pyrosequencing, real-time PCR and tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (tetra-primer ARMS-PCR). Among these methods, the tetra-primer ARMS-PCR has the advantage of speed and cost-effective, simple to operate and requires basic instrumentation (Lajin et al., 2013). Therefore, in this research, primer sets used for the tetra-primer ARMS-PCR technique were developed to detect SNP markers associated with CMD resistance for the selection of resistant varieties and to discriminate variety within the 7 CMD-resistant varieties used in cassava breeding programs in Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and DNA extraction

Thailand Department of Agriculture (DOA) received 7 CMD-resistant varieties from the International Center for Tropical Agriculture (CIAT) and the International Institute of Tropical Agriculture (IITA) including TME 3, C 33, IITA-TMS-IBA 920057, TMS-IBA 972205, IITA-TMS-IBA 980505, IITA-TMS-IBA 980581 and TME B 419 (Rakkrai et al., 2022). These varieties were

used as parents to develop varieties resistant to CMD and suitable for cultivation in Thailand. The cassava breeding program has been carried out at Rayong Field Crops Research Center, DOA, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand.

Seven introduced CMD-resistant varieties and a Thai-landrace CMR43-08-89 susceptible variety were collected from the Rayong Field Crops Research Center. Leaves were taken from 6-month-old cassava from the top of the plant for DNA extraction using hexadecyltrimethylammonium bromide or the CTAB method (Devi et al., 2013). The quantity and quality of DNA were measured by using a spectrophotometer (Biodrop, UK).

Primer Design

To design primer sets for the tetra-primer ARMS-PCR technique to detect SNP markers Ex2-78, Ex2-157, Ex3-128, S12_7926132, and S12_8910428, genome sequences adjacent to each SNP obtained from the Phytozome database (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) were used. A primer set for each SNP detection was designed by using an accessible primer1 program (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) (Ye et al., 2001). The sequences of primer sets for Ex2-78, Ex2-157, Ex3-128, S12_7926132, and S12_8910428 detection are provided in Table 1.

Table 1 Primers used in the tetra-primer ARMS-PCR for selection and discrimination of CMD-resistant cassava varieties

SNP position	Primer set and sequence (5' – 3')		Product size
Ex2-78	Outer forward	CCTTTGTTGAGAATGCATTTCCATGATT	Control fragment: 416 bp
	Outer reverse	GTCCAGTTTTTAACATCCCAAAATGGTCC	
	Inner forward	AAAGAAGCAATCCCAAAACCAACCGTA	A allele: 253 bp
	Inner reverse	TTCACAGCATCAATCACATTGAATCCTATC	G allele: 220 bp
Ex2-157	Outer forward	TTCAAAGAGAGGCAATCAAGCTGAGAAA	Control fragment: 296 bp
	Outer reverse	GACACTCTTCCATCTCTCCGTCCAGTTT	
	Inner forward	TGGTGTGGTTTCTTGCGCTGATATCT	T allele: 192 bp
	Inner reverse	AAACTGCATCTCGAGCTACTAAGGCCAC	G allele: 158 bp
Ex3-128	Outer forward	GTAGCTCGAGATGCAGTTTCAATGGTAA	Control fragment: 434 bp
	Outer reverse	CTTTGCCTGTGAAATTGTATAAGCGGT	
	Inner forward	TAAGTGAGCTTAAACAAAATTTTGCGGC	C allele: 231 bp
	Inner reverse	AAGGTCCTTAACATTTAAACCCCGGA	T allele: 257 bp
S12_7926132	Outer forward	CCAAGTTTTATGGACCTTTCGTGGTTCT	Control fragments: 291, 240 bp
	Outer reverse	CCAATGGACTAAAATCTCAAGTTGTCCG	
	Inner forward	TATTTTCCATGTTTCCACCCTCAAACGT	T allele: 204 bp
	Inner reverse	GGAGTACAAGAATCTTGCTTTGTGACAC	G allele: 145 bp
S12_8910428	Outer forward	ATTTCCTCTTTGAAACAAGGATTGTCAT	Control fragment: 398 bp
	Outer reverse	TAGCCTTCCTCAGGAGTTGAGAAAGTAC	
	Inner forward	TTATTTATAATTATGTAGAAATGGCCCCTG	G allele: 196 bp
	Inner reverse	AGGAAAGATAAAGGGACGCCTGTGAC	C allele: 258 bp

PCR amplification

For DNA amplification by single PCR for RME1 marker detection, PCR was performed using primers designed by Fregene et al. (2006): F: 5'-ATGTTAATGTAATGAAAGAGC-3' and R: 5'-AGAAGAGGGTAGGAGTTATGT-3'. The reaction was assembled in a total volume of 20 µl containing 100 ng of genomic DNA, 1X Taq buffer with (NH₄)₂SO₄ (Thermo Scientific, USA), 0.2 mM for each dNTP, 0.4 µM forward primer, 0.4 µM reverse primer, 1.5 mM MgCl₂ and 1 U Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA). The PCR cycling profile was 94° C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94° C for 40 s, annealing at 56° C for 40 s, extension at 72° C for 1 min, and final extension at 72° C for 5 min PCR products were analyzed by 2% (w/v) agarose gel electrophoresis.

For DNA amplification using the tetra-primer ARMS-PCR technique for Ex2-78, Ex2-157 and Ex3-128 SNP detection, PCR was performed in a total volume of 20 µl containing 100 ng of genomic DNA, 1X Taq buffer with (NH₄)₂SO₄ (Thermo Scientific, USA), 0.2 mM for each dNTP, 0.2 µM of each outer primer, 0.2 µM of each inner primer, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 U Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA). In addition, 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) was added for Ex2-157 detection. The mixture was then applied to DNA

amplification using the GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). The optimum PCR cycling profile was 94° C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation at 94° C for 40 s, annealing for 40 s at 58° C for Ex2-78 and at 60° C for Ex2-157 and Ex3-128, extension at 72° C for 30 s, and final extension at 72° C for 5 min PCR products were analyzed by 2.5% (w/v) agarose gel electrophoresis.

For DNA amplification using the tetra-primer ARMS-PCR technique for S12_7926132 and S12_8910428 SNP detection, PCR was performed in a total volume of 20 µl containing 50 ng of genomic DNA, 1X GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA), 0.25 µM of each outer primer and 0.25 µM of each inner primer. The mixture was then applied to DNA amplification using the GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). The optimum PCR cycling profile was 95° C for 2 min, followed by 35 cycles of step for S12_7926132 and 38 cycles of step for S12_8910428, consisting of denaturation at 94° C for 40 s, annealing for 40 s at 58° C for S12_7926132 and at 59° C for S12_8910428, extension at 72° C for 30 s, and final extension at 72° C for 5 min PCR products were analyzed by 2.5% (w/v) agarose gel electrophoresis.

For DNA amplification by single PCR for SSRY75 marker detection, PCR was performed by using primers designed by Mba

et al (2001): F: 5'-TCTGGTAAACCTACTAGTGCTCCA-3' and R: 5'-TTCATGCACGTCCTGATACA-3'. The reactions were assembled in a total volume of 20 µl containing 50 ng of genomic DNA, 1X GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA), 0.25 µM forward primer and 0.25 µM reverse primer. The mixture was then applied to DNA amplification using the GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). The optimum PCR cycling profile was 95° C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94° C for 40 s, annealing at 55° C for 40 s, extension at 72° C for 30 s, and final extension at 72° C for 5 min PCR products were analyzed by 3% (w/v) agarose gel electrophoresis.

RESULTS AND DISCUSSION

CMD-resistant varieties used in the cassava breeding program in Thailand

Most of the resistant varieties have red leaf petioles, except TMS-IBA 972205 and TME B 419 which have green leaf petioles. All varieties have similar leaf shapes with an average of 7 lobes. The genotype analysis using a SCAR marker named RME1 associated with the CMD2 locus revealed that all CMD-resistant varieties showed a DNA band approximately 700 bp in size (Figure 1 lane 1 - 7), consistent with the expected size found in CMD-resistant varieties as reported previously (Bi et al.,

2010; Carmo et al., 2015; Houngue et al., 2019). While the 700 bp band did not appear by CMR43-08-89, a CMD-susceptible variety, and distilled water control samples, (Figure 1 lane 8 and 9, respectively).

Development of primer sets for detection of SNP markers related to CMD resistance

The cassava varieties with different genotypes of SNP Ex2-78 were used in the optimization of tetra-primer ARMS-PCR, including TME 3 (GG), Rayong 5 (AG) and Rayong 3 (AA). The optimization for SNP Ex2-78 detection was carried out by using gradients of annealing temperature at 58, 60, 64 and 66° C, the addition of dimethyl sulfoxide (DMSO) and increasing of inner reverse (IR) primer concentration (Figure 2). A suitable DMSO concentration improve PCR amplification (Kang et al., 2005). The best condition for SNP Ex2-78 detection was the annealing temperature of 58° C without DMSO (0% DMSO) and without changing the primer concentration (Figure 2 panel D), which provided clear DNA fragments at the expected size as described in Table 1. The increase of IR primer from 0.2 µM to 0.4 µM was tried in optimization, but this condition did not provide the expected bands (Figure 2 panel B). The product of tetra-primer ARMS-PCR specific to SNP Ex2-78 contained 416 bp as a control fragment, 220 bp as the G allele and 253 bp as the A allele (Figure 2).

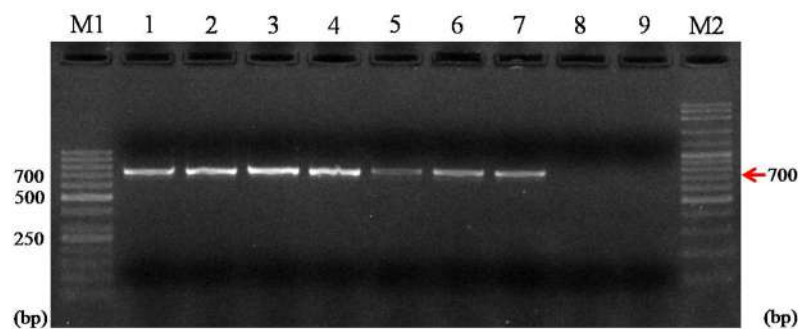


Figure 1 Genotype analysis of cassava varieties using SCAR marker RME1, M1: 50 bp DNA Ladder; 1: TME 3; 2: C 33; 3: IITA-TMS-IBA 920057; 4: TMS-IBA 972205; 5: IITA-TMS-IBA 980505; 6: IITA-TMS-IBA 980581; 7: TME B 419; 8: CMR43-08-89 (CMD-susceptible variety); 9: ddH₂O; M2: 100 bp DNA Ladder plus

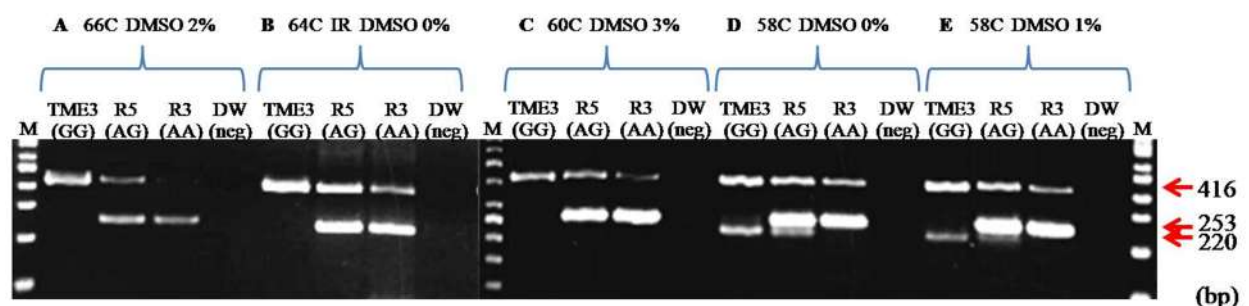


Figure 2 Tetra-primer ARMS-PCR optimization for SNP Ex2-78 detection with different annealing temperatures and conditions, A: Annealing temperature of 66° C and addition of 2% DMSO in PCR reagents; B: Annealing temperature of 64° C and increasing of IR primer without the addition of DMSO; C: Annealing temperature of 60° C and addition of 3% DMSO; D: Annealing temperature of 58° C without the addition of DMSO, which was the optimum PCR condition for SNP Ex2-78 detection; E: Annealing temperature of 58° C and addition of 1% DMSO; Lane M: DNA ladder. DNA fragments generated by primers of SNP Ex2-78 include a control fragment (416 bp), a specific fragment of the A allele (253 bp) and the G allele (220 bp)

The SNP Ex2-78 genotype analysis showed that all CMD-resistant varieties used in this study have genotype GG (Figure 3A lane 1 - 7), consistent with the report of Wolfe et al. (2016) that CMD-resistant varieties (TMEB3, TMEB7 and I011412) have alleles homozygous GG at SNP Ex2-78. While CMR

43-08-89 had a genotype of heterozygous GA (Figure 3A lane 8).

The optimization of tetra-primer ARMS-PCR for SNP Ex2-157 and Ex3-128 detections revealed the best conditions for SNP Ex2-157 and Ex3-128 detections by the annealing temperature of 60° C with 1%

DMSO and the annealing temperature of 60° C without DMSO, respectively. The genotype analysis of SNP Ex2-157 is shown in Figure 3B. The 296-bp band was a control fragment and the 192-bp band represented the T allele fragment. The result showed that all CMD-resistant varieties used in this study and a susceptible variety, CMR43-08-89, have a homozygous TT genotype (Figure 3B). The genotype analysis result of SNP Ex3-128 is shown in Figure 3C. The 434-bp band was a control fragment and the 257-bp band represented the

T allele fragment. In this marker, all 7 CMD-resistant varieties and CMR43-08-89 have similar genotypes, which are homozygous TT (Figure 3C). According to Wolfe et al. (2016), CMD-resistant varieties have genotype homozygous TT at SNPs Ex2-157 and Ex3-128. However, CMR43-08-89 also has the same genotype with resistant varieties at SNPs Ex2-157 and Ex3-128. Therefore, these two SNP markers may not be as effective as SNP Ex2-78 for selecting varieties resistant to CMD.

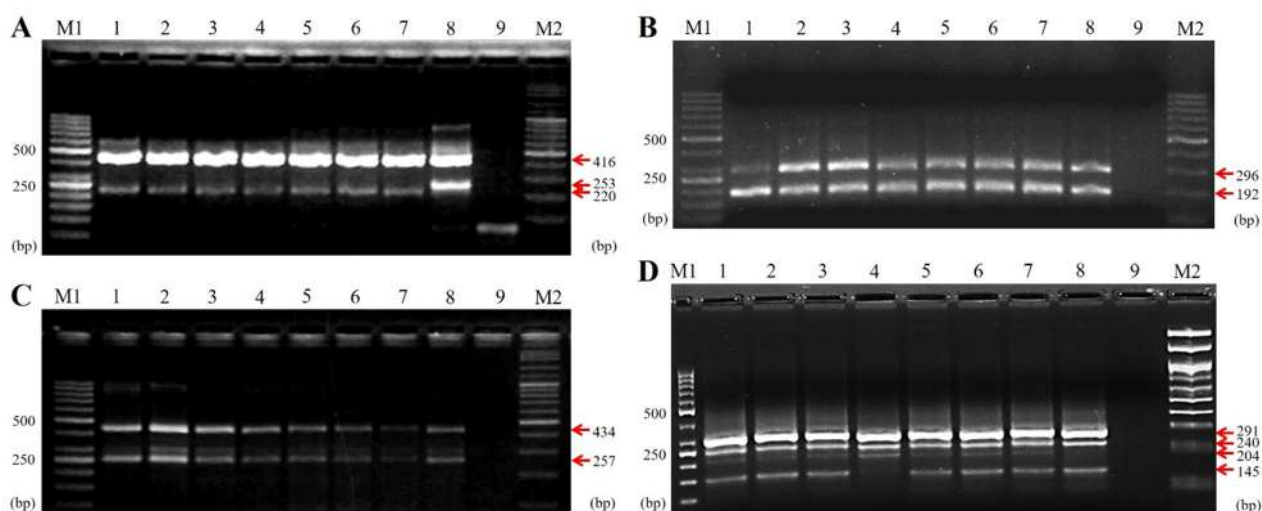


Figure 3 Genotype analysis of cassava varieties using SNP Ex2-78 (A), Ex2-157 (B), Ex3-128 (C) and S12_7926132 (D). M1: 50 bp DNA Ladder; 1: TME 3; 2: C 33; 3: IITA-TMS-IBA 920057; 4: TMS-IBA 972205; 5: IITA-TMS-IBA 980505; 6: IITA-TMS-IBA 980581; 7: TME B 419; 8: CMR43-08-89 (CMD-susceptible variety); 9: ddH₂O; M2: 100 bp DNA Ladder plus

For the detection of SNP S12_7926132, the optimum condition was an annealing temperature of 58° C without DMSO. The genotype analysis of SNP S12_7926132 is shown in Figure 3D. The 291-bp band and 240-bp band were control

fragments. The 204-bp band and 145-bp band represented the T allele and the G allele, respectively (Figure 3D). Rabbi et al. (2020) reported that the T allele is a favorable genotype found in CMD-resistant varieties. Similar to this study, the T allele

was found in all 7 CMD-resistant varieties. Cassava varieties TME 3, C 33, IITA-TMS-IBA 920057, IITA-TMS-IBA 980505, IITA-TMS-IBA 980581, and TME B 419 have genotype heterozygous TG (Figure 3D lane 1 - 3 and 5 - 7), while TMS-IBA 972205 has genotype homozygous TT (Figure 3D lane 4). The susceptible variety CMR43-08-89 has the genotype homozygous GG (Figure 3D lane 8).

Development of a primer set for discrimination of each CMD-resistant cassava variety

Because the shape and number of lobes of 7 CMD resistant varieties were similar, it was difficult to differentiate these varieties, especially among TME 3, C 33, IITA-TMS-IBA 920057, IITA-TMS-IBA 980505

and IITA-TMS-IBA 980581 with similar red leaf petioles and TMS-IBA 972205 and TME B 419 with green leaf petioles. To identify the cassava variety TME B 419, a primer set for detection of the SNP S12_8910428 was developed.

The optimum condition was an annealing temperature of 59° C without DMSO. The genotype analysis of SNP S12_8910428 is shown in Figure 4. The 398-bp band was the control fragment. The 258-bp band and 196-bp band represented the C allele and the G allele, respectively (Figure 4). The C allele was uniquely observed in TME B 419, which had genotype heterozygous CG (Figure 4 lane 1), while the other CMD-resistant varieties had genotype homozygous GG (Figure 4 lane 2-7).

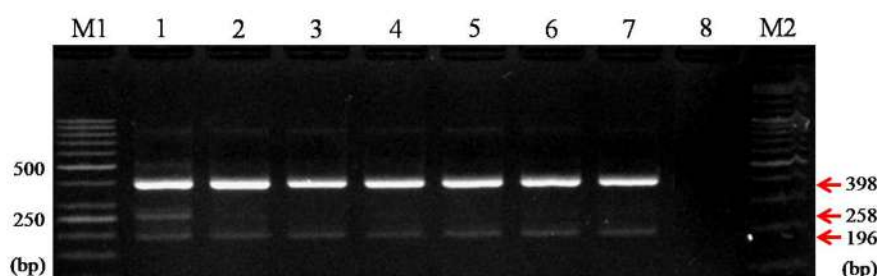


Figure 4 Genotype analysis of cassava varieties using S12_8910428, M1: 50 bp DNA Ladder; 1: TME B 419; 2: TME 3; 3: C 33; 4: IITA-TMS-IBA 920057; 5: TMS-IBA 972205; 6: IITA-TMS-IBA 980505; 7: IITA-TMS-IBA 980581; 8: ddH₂O; M2: 100 bp DNA Ladder plus

This result was consistent with the report of Lim et al. (2022) that the C allele is found in TME B 419 and TME 204 but not in other resistant varieties examined in the research, such as TME 3, TME 8, TME 14, NASE 12, NASE 14 and TMS-9102324. Therefore,

SNP S12_8910428 can differentiate TME B 419 from the remaining six CMD-resistant varieties. Moreover, the SNP S12_7926132 can distinguish TMS-IBA 972205 from the others because only this variety has a

homozygous TT genotype at the SNP position (Figure 3D lane 4).

In addition, using the SSR marker, SSRY75, could differentiate IITA-TMS-IBA 980505 and IITA-TMS-IBA 980581 from the remaining varieties. Analysis of the genotype using the SSRY75 marker revealed

that TME 3, C 33, IITA-TMS-IBA 920057, IITA-TMS-IBA 972205 and TME B 419 showed only 1 band with the approximate size of 280 bp (Figure 5 lane 1 - 4 and 7), while IITA-TMS-IBA 980505 and IITA-TMS-IBA 980581 showed 3 and 2 bands, respectively (Figure 5 lane 5 and 6).

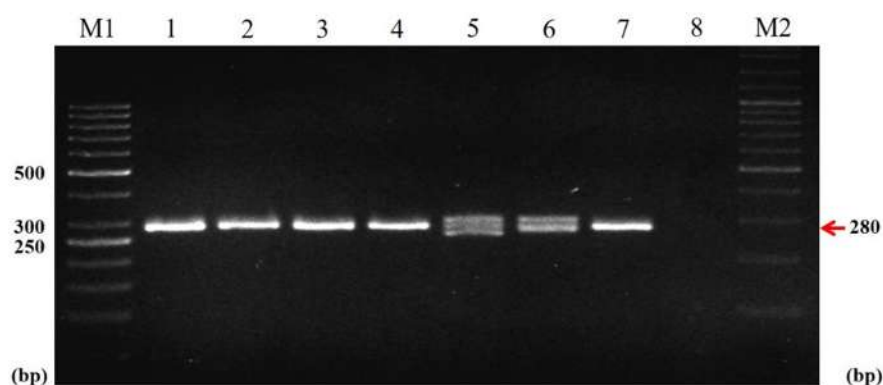


Figure 5 Genotype analysis of cassava varieties using SSR marker SSRY75, M1: 50 bp DNA Ladder; 1: TME 3; 2: C 33; 3: IITA-TMS-IBA 920057; 4: TMS-IBA 972205; 5: IITA-TMS-IBA 980505; 6: IITA-TMS-IBA 980581; 7: TME B 419; 8: ddH₂O; M2: 100 bp DNA Ladder plus

CONCLUSION

Primer sets used for the tetra-primer ARMS-PCR technique to detect SNP markers associated with CMD resistance for the selection of resistant varieties and to discriminate variety within the 7 CMD-resistant varieties used in cassava breeding programs in Thailand were developed. Four primer sets for the detection of SNP markers Ex2-78, Ex2-157, Ex3-128 and S12_7926132 were successfully developed for selecting CMD-resistance trait. Another

SNP marker, S12_8910428 was developed for discriminating TME B 419 variety. The tetra-primer ARMS-PCR technique is specific, sensitive, speedy, cost-saving and convenient to carry out in a molecular laboratory for cassava breeding programs in Thailand with basic equipment.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by Thailand Science Research and Innovation (TSRI).

REFERENCES

- Akano, A.O., A.G.O. Dixon, C. Mba, E. Barrera and M. Fregene. 2002. Genetic mapping of a dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease. *Theoretical and Applied Genetics*. 105: 521-525.
- Bi, H., M. Aileni and P. Zhang. 2010. Evaluation of cassava varieties for cassava mosaic disease resistance jointly by agro-inoculation screening and molecular markers. *African Journal of Plant Science*. 4(9): 330-338.
- Carmo, C.D., M.S. Silva, G.A.F. Oliveira and E.J. Oliveira. 2015. Molecular-assisted selection for resistance to cassava mosaic disease in *Manihot esculenta* Crantz. *Scientia Agricola*. 72(6): 520-527.
- Codjia, E.D., B. Olasanmi, P.A. Agre, R. Uwugiaren, A.D. Ige and I.Y. Rabbi. 2022. Selection for resistance to cassava mosaic disease in African cassava germplasm using single nucleotide polymorphism markers. *South African Journal of Science*. 118(1-2): 11607.
- Devi, K.D., K. Punyarani, N.S. Singh and H.S. Devi. 2013. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales-suitable for diverse PCR based downstream applications. *SpringerPlus*. 2: 669.
- Fregene, M. and J. Puonti-Kaerlas. 2002. Cassava biotechnology. pp. 179-207. In: *Cassava: Biology, Production and Utilization*. CABI Publishing, Wallingford.
- Fregene, M., N. Morante, T. Sánchez, J.A. Marin, C. Ospina, E. Barrera Sabogal, A.J.P. Gutierrez, J.M. Guerrero, A.C. Bellotti, L.G. Santos Melendez, A.M. Alzate Gutierrez, S. Moreno and H. Ceballos. 2006. Molecular markers for the introgression of useful traits from wild *Manihot* relatives of cassava, marker-assisted selection (MAS) of disease and root quality traits. *Journal of Root Crops*. 32(1): 1-31.
- Houngue, J.A., M. Zandjanakou-Tachin, H.B. Ngalle, J.S. Pita, G.H.T. Cacaï, S.E. Ngatat, J.M. Bell and C. Ahanhanzo. 2019. Evaluation of resistance to cassava mosaic disease in selected African cassava cultivars using combined molecular and greenhouse grafting tools. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 105: 47-53.
- Ige, A.D., B. Olasanmi, E.G.N. Mbanjo, I.S. Kayondo, E.Y. Parkes, P. Kulakow, C. Egesi, G.J. Bauchet, E. Ng, L.A.B. Lopez-Lavalle, H. Ceballos and I.Y. Rabbi. 2021. Conversion and validation of uniplex SNP markers for selection of resistance to cassava mosaic disease in cassava breeding programs. *Agronomy*. 11(3): 420.
- Kang, J., M.S. Lee and D.G. Gorenstein. 2005. The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: Application to *in vitro* combinatorial selection of aptamers. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 64(2): 147-151.
- Lajin, B., A. Alachkar and A. Alhaj Sakur. 2013. Betaine significantly improves multiplex tetra-primer ARMS-PCR methods. *Molecular Biotechnology*. 54(3): 977-982.
- Lim, Y.W., B.N. Mansfeld, P. Schläpfer, K.B. Gilbert, N.N. Narayanan, W. Qi, Q. Wang, Z. Zhong, A. Boyher, J. Gehan, G. Beyene, Z.D. Lin, W. Esuma, S. Feng, C. Chanez, N. Eggenberger, G. Adiga, T. Alicai, S.E. Jacobsen, N.J. Taylor, W. Grisseem and R.S. Bart. 2022. Mutations

- in DNA polymerase δ subunit 1 mediate CMD2-type resistance to Cassava Mosaic Geminiviruses. *Nature Communications*. 13(1): 3933.
- Maneechoat, P., S. Chaowalit, K. Warawichanee, W. Rungsawang, P. Mooljanta, S. Lankaew and P. Pangda. 2018. Survey and surveillance of cassava mosaic disease caused by virus. Full Research Report under the Project of Income from Agricultural Research Operations. Department of Agriculture. 52 p. (in Thai)
- Mba, R., P. Stephenson, K. Edwards, S. Melzer, J. Nkumbira, U. Gullberg, K. Apel, M. Gale, J. Tohme and M. Fregene. 2001. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: Towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. *Theoretical and Applied Genetics*. 102: 21–31.
- Office of Agricultural Economics. 2022. Situation of important agricultural products and trends in 2023. Office of Agricultural Economics, Ministry of Agriculture and Cooperatives. 240 p. (in Thai)
- Okogbenin, E., C.N. Egesi, B. Olanmi, O. Ogundapo, S. Kahya, P. Hurtado, J. Marin, O. Akinbo, C. Mba, H. Gomez, C. de Vicente, S. Baiyeri, M. Uguru, F. Ewa and M. Fregene. 2012. Molecular marker analysis and validation of resistance to cassava mosaic disease in elite cassava genotypes in Nigeria. *Crop Science*. 52(6): 2576-2586.
- Rabbi, I.Y., K.S. Ismail, B. Guillaume, Y. Muyideen, A.C. Idhigu, O. Kayode, U. Ruth, S.I. Andrew, P. Prasad, A. Afolabi, P. Elizabeth, L. Ezenwaka, W. Marnin, J. Jean-Luc, E. Chiedozi and K. Peter. 2020. Genome-wide association analysis reveals new insights into the genetic architecture of defensive, agro-morphological and quality-related traits in cassava. *Plant Molecular Biology*. 109(3): 195-213.
- Raji, A.A., J.V. Anderson, O.A. Kolade, C.D. Ugwu, A.G. Dixon and I.L. Ingelbrecht. 2009. Gene-based microsatellites for cassava (*Manihot esculenta* Crantz): Prevalence, polymorphisms, and cross-taxa utility. *BMC Plant Biology*. 9: 118.
- Rakkrai, C., T. Chomdate, W. Khampanich, P. Paechaisri, D. Chaireunkaew and P. Maneechoat. 2022. Evaluation of disease resistance of the cassava lines introduced from Nigeria to Sri Lankan cassava mosaic virus, the causal agent of cassava mosaic disease, under greenhouse conditions. *Thai Agricultural Research Journal*. 40 (3): 226-237. (in Thai)
- Wolfe, M.D., I.Y. Rabbi, C. Egesi, M. Hamblin, R. Kawuki, P. Kulakow, R. Lozano, D.P.D. Carpio, P. Ramu and J. Jannink. 2016. Genome-wide association and prediction reveals genetic architecture of cassava mosaic disease resistance and prospects for rapid genetic improvement. *Plant Genome*. 9(2): 1-13.
- Ye, S., S. Dhillon, X. Ke, A.R. Collins and I.N. Day. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*. 29(17): e88-e88.

คำแนะนำ สำหรับผู้เขียน

วารสารวิชาการเกษตร มีวัตถุประสงค์เพื่อพิมพ์เผยแพร่ความรู้
และผลงานวิจัยด้านการเกษตร นักวิชาการทุกท่านสามารถที่จะส่งเรื่อง
เพื่อลงพิมพ์ได้โดยไม่จำเป็นต้องเป็นสมาชิกหรือสังกัดกรมวิชาการเกษตร
เรื่องที่พิมพ์ต้องเป็นเรื่องน่าสนใจ มีสาระอันเป็นประโยชน์แก่งานวิชาการเกษตร
และจะต้องเป็นเรื่องที่ไม่เคยตีพิมพ์หรือรอการตีพิมพ์ในวารสารฉบับอื่น
การส่งต้นฉบับ: **Online submission <http://at.doa.go.th/journal>**

หรือ **tci-thaijo.org/index.php/thaiagriculturalresearch**

กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทร. 0-2940-7279 Fax: 0-2561-4674

Email: journal@doa.in.th

ต้นฉบับ: พิมพ์ด้วยโปรแกรมพิมพ์เอกสาร ms-word ขนาด 16 pts พิมพ์บรรทัดห่าง 1 บรรทัด
พิมพ์หน้าเดียว มีความยาว 5-15 หน้า กระดาษขนาด A4 มีรูปแบบการเขียนและการวางหัวข้อ
ตามรายละเอียดดังนี้

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) ชื่อเรื่อง (ภาษาอังกฤษ)

(ภาษาไทย) ชื่อ สกุล¹ (ผู้แต่งคนที่ 1) ชื่อ สกุล² (ผู้แต่งคนที่ 2)
(ภาษาอังกฤษ) ชื่อ สกุล¹ (ผู้แต่งคนที่ 1) ชื่อ สกุล² (ผู้แต่งคนที่ 2)

ABSTRACT

สรุปวัตถุประสงค์ สถานที่ เวลาทำการทดลอง ที่เป็นสาระสำคัญของการทดลองเป็นภาษา
อังกฤษใช้สำนวนรัดกุมและให้รายละเอียดที่ชัดเจน มีความยาวไม่เกิน 300 คำ

Keywords: ไม่เกิน 5 คำ

บทคัดย่อ

มีเนื้อหาสาระเช่นเดียวกันกับบทคัดย่อภาษาอังกฤษ (ABSTRACT) ควรจะอยู่ในหน้าเดียวกัน
กับบทคัดย่อภาษาอังกฤษ (ถ้าเป็นไปได้)

คำสำคัญ: ไม่เกิน 5 คำ

บทนำ

อธิบายถึงเหตุผล ความสำคัญ วัตถุประสงค์และเป้าหมายของงานวิจัยพร้อมทั้งเสนอข้อมูล
สนับสนุน หรือโต้แย้งจากการตรวจเอกสาร

1 ที่อยู่ของหน่วยงานของผู้แต่งคนที่ 1 (ภาษาไทย)

1 ที่อยู่ของหน่วยงานของผู้แต่งคนที่ 1 (ภาษาอังกฤษ)

2 ที่อยู่ของหน่วยงานของผู้แต่งคนที่ 2 (ภาษาไทย)

2 ที่อยู่ของหน่วยงานของผู้แต่งคนที่ 2 (ภาษาอังกฤษ)

* Corresponding author : Email address

เรื่องที่จะลงพิมพ์

1. บทความวิจัย (research article) เป็นเอกสารวิชาการเพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การเกษตร
2. บทความทางวิชาการ (academic article) เป็นเอกสารที่เขียนขึ้นจากการรวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ของงานวิทยาศาสตร์เกษตร

อุปกรณ์และวิธีการ

อธิบายการวางแผนการทดลอง ขนาดแปลงทดลอง และรายละเอียดของวิธีการดำเนินการทดลอง วัน เวลา และสถานที่ทดลอง วิธีการบันทึกข้อมูล ใช้สำนวนที่ไม่เินยื้อ และให้รายละเอียดเป็นขั้นตอนที่ชัดเจน

ผลการทดลองและวิจารณ์

อธิบายผลการทดลองที่สำคัญ อ้างอิงถึงตาราง กราฟ หรือรูปประกอบพร้อมเหตุผลสนับสนุนผลการทดลอง และวิจารณ์เหตุผลที่ทำให้ผลการทดลองเป็นเช่นนั้น รวมทั้งอ้างอิงถึงผลการทดลองของผู้อื่น (จากเอกสารอ้างอิงในคำนำ หรืออุปกรณ์และวิธีการ) เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านผลการทดลองนั้นๆ

สรุปผลการทดลอง

สรุปสาระสำคัญของผลการทดลอง คำแนะนำในการนำไปใช้ประโยชน์และข้อเสนอแนะในงานวิจัยเรื่องนั้นๆ ในอนาคต (ถ้ามี)

คำขอบคุณ (ถ้ามี)

กล่าวถึงบุคคลและหน่วยงานที่ช่วยเหลืองานวิจัยและทดลอง

เอกสารอ้างอิง หรือ บรรณานุกรม

ตัวอย่างการเขียนเอกสารอ้างอิงแสดงในหน้าถัดไป

ตาราง

ชื่อตารางและรายละเอียดเป็นภาษาอังกฤษ เรียงตั้งแต่ Table 1 เป็นต้นไป

ภาพประกอบ

ภาพวาดคำ หรือภาพสี หรือภาพลายเส้น (กราฟ) เป็นต้นฉบับที่ชัดเจน สะอาดและสวยงาม พร้อมคำบรรยายเป็นภาษาอังกฤษเรียงตั้งแต่ Figure 1 เป็นต้นไป

การเขียน เอกสารอ้างอิง

1. การตรวจเอกสาร

ในเรื่องของคำนำหรืออุปกรณ์และวิธีการหรือ
ผลการทดลอง

ตัวอย่างการเขียน

- โกศล (2523) หรือ (โกศล, 2523)
 - อิมจิต และมานะ (2535) หรือ (อิมจิต
และมานะ, 2535)
 - สะอาด และคณะ (2523) หรือ (สะอาด
และคณะ, 2523)
 - Krebs (1978) หรือ (Krebs, 1978)
 - Lekakul et al. (1977) หรือ (Lekakul
et al., 1977)
- ถ้าเป็นเอกสารไม่ปรากฏชื่อผู้เขียนให้ใช้
- นีรนาม (2529) หรือ (นีรนาม, 2529)

ตัวอย่างการเขียน

- โกศล เจริญสม. 2523. แตนเบียนคาซิดอยด์. เอกสาร
พิเศษ ฉบับที่ 3 ศูนย์วิจัยและควบคุมศัตรูพืช
โดยชีววิธีแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เกษตรศาสตร์ และสำนักงานคณะกรรมการ
วิจัยแห่งชาติ กรุงเทพฯ. 301 หน้า
- สะอาด บุญเกิด จเร สดากกร และทิพย์พรรณ สดากกร.
2523. ชื่อพรรณไม้ในเมืองไทย. กองทุนจัดพิมพ์
ตำราป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 657 หน้า.
- Holm, G.L., D.L. Plucknett, J.V. Pancho and J.P.
Herberger. 1997. *Imperata cylindrica* (L.)
Beauv. pp. 62-71. In: The World's Worst
Weeds, Distribution and Biology.
Honolulu. University Press of Hawaii.
- Krebs. C.J. 1978. Ecology: The Experimental
Analysis, Distribution and Abundance.
2nd Ed. H.A. Harper and C.B. Row, (eds.)
N.Y. 678 p

2. เอกสารอ้างอิงหรือบรรณานุกรม

ในบัญชีเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง

การเรียงลำดับเอกสาร

ให้เอกสารภาษาไทยอยู่ในส่วนแรกและเอกสาร
ภาษาต่างประเทศอยู่ในส่วนที่สอง

ให้เรียงชื่อผู้แต่งตามอักษรแต่ละภาษา

ผู้แต่งชื่อเดียวกัน มีเอกสารมากกว่า 1 ฉบับ

- ถ้าตีพิมพ์ในปีต่างๆ กัน ให้เรียงปีที่ตีพิมพ์จาก
น้อยไปหามาก

- ถ้าตีพิมพ์ในปีเดียว ให้ใส่อักษร ก, ข, ค
หรือ a, b, c กำกับในเนื้อเรื่องอ้างอิงก่อนและหลังตาม
ลำดับ

ประเภทของเอกสาร

ก. ตำรา

แบบการเขียน

ชื่อผู้แต่ง. ปี. ชื่อหนังสือ. ชื่อสำนักพิมพ์ จังหวัด.
จำนวนหน้า.

ข. วารสาร Newsletter และ Bulletin

แบบการเขียน

ชื่อผู้แต่ง. ปี. ชื่อเรื่อง. ชื่อวารสารหรือชื่อ Newsletter
หรือชื่อ Bulletin ปีที่ หน้า - หน้า

ตัวอย่างการเขียน

- ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2524. วิธีการเขียนบทความทาง
วิชาการวิทยาศาสตร์. วารสารสงขลานครินทร์.
3: 27-43.
- Sharwa, A.D. and C.I. Jandalk. 1986. Studies on
Recycling of Pleurotus Waste. Mushroom
Newsletter for the Tropics. 6: 13-15.
- Yano, K. 1979. Effect of Vegetable juice and Milk
on Alkylating Activity of n-methyl-n-ni
trou-rea. Journal of Agricultural and
Food Chemistry 27: 2456-2458.

ค. รายงานประจำปี

แบบการเขียน

ชื่อผู้แต่ง. ปี. ชื่อเรื่อง. หน้า-หน้า. ชื่อรายงานประจำปี
พ.ศ. หน่วยงาน.

ตัวอย่างการเขียน

กรองทอง จันทร อำนวย ทองดี และบรรจง สิกขะ
มณฑล. 2522. การศึกษาหาวิธีการปลูก
หอมแดงในภาคเหนือ. หน้า 5-20. ใน: รายงาน
สรุปผลการทดลองพืชสวน 2522. กองพืชสวน
กรมวิชาการเกษตร.

Lewanich, A. 1974. A Taxonomic Study on
the Lipidopterous Pests of Sugar Cane.
pp. 511-513. In: Annual Research Report
1974. Div. of Entomol.

ง. รายงานการประชุม

แบบการเขียน

ชื่อผู้แต่ง. ปี. ชื่อเรื่อง. หน้า-หน้า. ชื่อรายงานการประชุม
ครั้งที่ (ถ้ามี) วัน เดือน ปี ที่มีการประชุม
สถานที่ประชุม.

ตัวอย่างการเขียน

พิสิษฐ์ เสพสวัสดิ์ ศรีสมร พัทธ์ เทียนจิตต์ สัตยาวิรุทธิ์
และสาทร สิริสิงห์. 2523. ประสิทธิภาพของ
สารฆ่าแมลงบางชนิดกับหนอนเจาะฝักถั่วเหลือง.
หน้า 492-523. ใน: รายงานการประชุมวิชาการ
แมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 2. กองกัญและ
สัตววิทยา 24-27 มิถุนายน 2532 กรุงเทพฯ.

Bliss, C.I. 1956. The Analysis of Insect Counts
as Negative Binomial Distribution.
pp. 1015-1030. In: Proceedings of 10th
International Congress of Entomology.
Vol 2.

Magee, P.N. 1992. The Future of Research on
Chemical Carcinogenesis. pp 11. In: 2nd
Princess Chulabhorn Science Congress.
Nov. 2-6, 1992. Bangkok.

จ. เอกสารไม่ปรากฏชื่อผู้เขียน

แบบการเขียน

ให้ใช้คำว่า นิรนาม หรือ Anonymous แทนชื่อตาม
ด้วยปี พ.ศ. หรือ ค.ศ. ที่ตีพิมพ์และใช้วิธีการ
เขียนตามประเภทของเอกสารนั้นๆ ดังที่กล่าว
มาแล้วข้างต้น.

แบบการเขียน

นิรนาม. 2520. สัตว์ศัตรูอ้อย. วารสารกสิกรรม ไร่อ้อย
1: 445-449.

Anonymous. 1989. Krung Thai Bank Annual
Report 1989. Bangkok. 80 p.

ฉ. สื่อวิชาการทาง Website

แบบการเขียน

ชื่อผู้แต่ง. ปีที่พิมพ์ (กรณีไม่ปรากฏให้ใช้ n.d. หรือ
ม.ป.ป.) ชื่อเรื่องของเอกสาร.
แหล่งข้อมูล (ระบุ URL). สืบค้น (วัน เดือน ปี)

ตัวอย่างการเขียน

นิรนาม. 2556. ชาน้ำมัน (Camellia oleifera Abel).
ศูนย์วิจัยและพัฒนาชาน้ำมันและพืชน้ำมัน
มูลนิธิชัยพัฒนา. แหล่งข้อมูล : <http://www.teaoilcenter.org/index.php/2013-12-01-03-05-52/2013-12-01-03-12-54/entry/camellia-oleifera-abel> สืบค้น: 20 พฤษภาคม 2559.

FSANZ. 2007. Final assessment report.
Application A565. Use of nisin in
processed meat products. Food
Standards Australia New Zealand.
Available at: http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/documents/A565_FAR_Nissin_Final.pdf.
Accessed : March 22, 2015.

Thai Agricultural Research Journal

Production : Department of Agriculture (DOA), Thailand
Office : Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
Objective : As a medium for disseminate the agricultural research and innovation for crop plant

Advisors

Director general, Deputy Director General, Technical Advisor, Senior Experts
Directors of Centre, Divisions, Institutes and Offices

Editor

Amara Chinaphuti, Ph.D. Department of Agriculture (DOA)

Assistant Editors

Walaiporn Sasiprapa Information and Communication Technology Center, DOA
Aumnuai Adthlangrong Horticulture Institute, DOA
Kanchana Priesapan, Ph.D. Plant Varieties Protection Office, DOA

Editorial Board

Wannarat Chutibut	Agricultural Production Science Research and Development Division, DOA
Suphakam Luanmanee, Ph.D.	Agricultural Production Science Research and Development Division, DOA
Piyanuch Sornchai, Ph.D.	Biotechnology Research and Development Office, DOA
Nettra Somboonkaew, Ph.D.	Postharvest of Horticulture Crop Group, PPRDD, DOA
Boonyawadee Chirawut, Ph.D.	Postharvest Pathology Research Group, PPRDD, DOA
Supamas Klinkajorn Crops	Processing Research and Development Group, PPRDD, DOA
Vichanee Ormzubsin	Surat Thani Oil Palm Research Center, DOA
Chanintorn Doungsa-ard, Ph.D.	Plant Protection Research and Development Office, DOA
Patchareewan Chongchitmate, Ph.D.	Plant Protection Research and Development Office, DOA
Suphasit Sngiamphongse	Retired government official
Pompimon Athipunyakom, Ph.D	Retired government official
Suprada Sukonthabhirom na Pattalung, Ph.D.	Retired government official
Surapee Kiratiyaangul	Agricultural Research Development Agency (ARDA)
Sanchai Tantayaporn, Ph.D.	National Bureau of Agriculture Community and Food Standard (ACFS)
Hathairat Urairong, Ph.D.	Rangsit University
Assoc. Prof. Wichai Kositratana, Ph.D.	Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus
Assoc. Prof. Penkwan Chompreeda, Ph.D.	Kasetsart University
Assoc. Prof. Orapin Kerdchoechuen, Ph.D.	King Mongkut's University of Technology Thonburi
Assoc. Prof. Kamronwit Thipmanee, Ph.D.	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Asst. Prof. Piyaporn Chueamchaitrakun, Ph.D.	Mae Fah Luang University
Asst. Prof. Jeeraporn Pekkoh, Ph.D.	Chiang Mai University
Asst. Prof. Boonsom Bussabun, Ph.D.	Chiang Mai University
Wanporn Khemmuk, Ph.D.	Rice Department
Kriengsak Lirdprapamongkol, Ph.D.	Chulabhorn Research Institute

Manager

Director of Research planning group Planning and Technical Division, DOA

Assistant Manager

Donya Klaymala Planning and Technical Division, DOA



THAI AGRICULTURAL RESEARCH JOURNAL

Volume 42 No. 2

May - August 2024

ISSN : 3027-7264 (Print) ISSN : 3027-7272 (Online)

CONTENTS

EDITORIAL.....115

Nichai Thaipanich

RESEARCH PAPERS

- Genetic Diversity and DNA Fingerprint of Pineapple (*Ananas comosus*)
Using SSR Markers.....116
Suphawadee Ngorian Jeeraporn Kansup Vipavee Chanroj Mallika Nuankaew
- Comparison of Cassava Lines/Varieties and Proper Harvesting Period for Processing
to French Fries.....131
Kusuma Readpeawpan Chadaporn Inplean Suwaluk Sansanee Tanavadee Kumchoo
- Symptomatology and Seed Transmission of *Columnea latent viroid*
and *Pepper chat fruit viroid* in Melon.....145
Nopparat Leartvirasanon Samabhorn Sinhabandhu Kanungnit Reanwarakorn
- Development of Nitrate Content Prediction Technique of Aloe Vera Leaves
using Nondestructive Technique by Near Infrared Spectroscopy.....156
Suwit Bootsien Anupun Terdwongworakul Arthit Phuangsombut Kaewkarn Phuangsombut
- Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Sprouted Mung Bean
and Sprouted Sunflower Seeds.....166
Bung-on Prajanban Saijai Posoongnoen Somkit Jaitrong
- Identification of SSR Markers Associated with Northern Corn Leaf Blight Resistance
in Sweet Corns.....180
Theerawut Wongwarat Chalong Kerd Sri Chaowanart Phruetthitthep
- Disinfection of *Pepper chat fruit viroid* in Pepper Seeds.....192
Luksika Srikasem Samabhorn Sinhabandhu Kanungnit Reanwarakorn
- Mite Pest Species and Their Natural Enemies of the Cannabis Plants.....203
Ploychompoo Konvipasruang Wimolwan Chotwong Athitiya Kaewpradit Naphacharakorn
Ta-phaisach Weerachai Somsri
- Development of Tetra-primer ARMS-PCR for Selection and Discrimination of
CMD-Resistant Cassava Varieties Used in Thailand.....217
Jeeraporn Kansup Suwaluk Sansanee Adcharapun Chaicharoen