



รายงานโครงการวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญทางสมุนไพรในกล้วยไม้ลูกผสม

สกุลหวาย

Development of Technology to Increase Herbal Compound in  
*Dendrobium sp.*

ภุมรินทร์ วณิชชานันท์

Phummarin Wanichananan

ปี พ.ศ. 2564



รายงานโครงการวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญทางสมุนไพรในกล้วยไม้ลูกผสม

สกุลหวาย

Development of Technology to Increase Herbal Compound in

*Dendrobium sp.*

ภูมรินทร์ วณิชชานันท์

Phummarin Wanichananan

ปี พ.ศ. 2564

## สารบัญ

สารบัญ	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	1
ผู้วิจัย .....	2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .....	3
บทนำ.....	4
บทคัดย่อ.....	16
การทดลองที่ 1 เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ ลูกผสมสกุลหวายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	19
การทดลองที่ 2 การพัฒนาชุดตรวจสอบสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ ลูกผสมสกุลหวายของไทย	49
การทดลองที่ 3 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลและการวิเคราะห์ยีนที่ เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Moscatilin ในกล้วยไม้ลูก ผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์	79
บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	124
บรรณานุกรม.....	127
ภาคผนวก .....	-

## คำปรารภ (Foreword หรือ Preface)

โครงการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญทางสมุนไพรในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย เป็นการนำเทคโนโลยีชีวภาพด้านเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้ปัจจัยจากภายนอกซึ่งเป็นตัวกระตุ้น (elicitor) เพื่อกระตุ้นปริมาณสารสำคัญในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายให้สูงขึ้น การผลิตชุดตรวจสอบปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ ซึ่งมีความจำเป็นและมีประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของกล้วยไม้ การนำกล้วยไม้ซึ่งทราบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่แน่นอนไปใช้ จะสามารถลดปัญหาความไม่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ เพื่อเข้าใจหน้าที่ของยีนต่อการสร้างสาร Moscatilin และช่วยในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายได้แม่นยำและรวดเร็วยิ่งขึ้น ทำให้กล้วยไม้ของไทยมีแนวทางเพื่อการใช้ประโยชน์ได้หลากหลายขึ้น การตรวจหาปริมาณสารสำคัญในกล้วยไม้ก่อนการซื้อขาย ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กล้วยไม้ ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นด้วย โครงการนี้ประกอบด้วย 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การทดลองที่ 2 การพัฒนาชุดตรวจสอบสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายของไทย

การทดลองที่ 3 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลและการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์

การทดลองทั้ง 3 การทดลองเริ่มดำเนินงานเดือนตุลาคม 2562 สิ้นสุดการทดลองเดือนกันยายน 2564 ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี หวังเป็นอย่างยิ่งว่าข้อมูลจากรายงานโครงการสิ้นสุดฉบับนี้จะเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาศึกษาต่อยอดให้กับนักวิชาการของกรมวิชาการเกษตร และหน่วยงานอื่นๆ รวมทั้งผู้สนใจ ในด้านการกระตุ้นสารสำคัญด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การตรวจสอบสารสำคัญด้วยชุดตรวจสอบ และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ของกล้วยไม้หรือพืชชนิดอื่นๆ ต่อไป



ภุมรินทร์ วณิชชานันท์  
หัวหน้าโครงการ  
มกราคม 2565

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่ให้การสนับสนุนห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการทดลองวิจัย นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ (ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ) นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด (ผู้เชี่ยวชาญด้านจุลชีววิทยา) และ นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ (ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ) ที่ให้คำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, สวนกล้วยไม้คุณดวงพร บุญชัย จ.สมุทรสาคร ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวาย ขอขอบคุณ ดร.กฤตยา เพชรผิ้ง ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านการวิเคราะห์สารมอสคาติลินด้วยเทคนิคทางเคมี ขอขอบคุณ คุณยุพิน กสินเกษมพงษ์ สถาบันวิจัยพืชสวน ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับกล้วยไม้สมุนไพรมะเขือ และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย นางสาววัชรินทร์ ศรีประยูร นายฉลาด ไหวตังนางสาวศุภรัสมิ์ พูลพัฒนสุวรรณ และนางสาวขวัญจิต ชื่นปั้นแดง และพนักงานอัตราจ้างของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่กรุณาให้การสนับสนุนและช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

## ผู้วิจัย

นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวอรุณทัย ซาววา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางศศิมา เมืองแก้ว	สถาบันวิจัยพืชสวน
นายไพฑูรย์ บุปผาดา	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรอำนาจเจริญ
นางสาวดวงพร บุญชัย	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
นางสาวกฤตยา เพชรผึ้ง	ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
	สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน
นางศิริวัลย์ สร้อยกล่อม	ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
	สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน
นางสาววิภาดา ศิริอนุสรณ์ศักดิ์	ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
	สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน
นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

กรมวิชาการเกษตร

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

LED	= Light Emitting Diode
BA	= 6-Benzylaminopurine
VW	= Vacin and Went
Plbs	= protocorm-like bodies
L	= Liters
ml	= Milliliters
kg	= Kilograms
cm	= Centimeters
hr	= Hour
%	= Percentage
$^{\circ}\text{C}$	= Degree Celsius
$\mu\text{l}$	= Microliters
$\mu\text{M}$	= Micromoles
mM	= Millimoles
ng	= Nanograms
mg	= Milligrams
g	= Grams
rpm	= Rounds per Minute
U/mL	= Unit/mL
nm	= nanometers
OD <sub>600</sub>	= optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm
SSR	= Simple Sequence Repeat
SNP	= Single Nucleotide Polymorphism
In/Del	= Insertion/Deletion

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

ประเทศไทยนับเป็นประเทศหนึ่งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งยังคงอุดมสมบูรณ์ไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชในวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) เป็นแหล่งแพร่กระจายพันธุ์และมีความหลากหลายทางด้านชนิดพันธุ์ของพืชในวงศ์กล้วยไม้จำนวนมากมาย กล้วยไม้สกุลหวายหลายชนิดมีฤทธิ์เป็นสมุนไพรในตำรายาจีน (Traditional Chinese Medicine (TCM) กล้วยไม้ป่าที่ถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรทางยาของจีนมีชื่อเรียกว่า “Shihu” ประกอบด้วย กล้วยไม้ 30 ชนิด ตัวอย่างเช่น *D. nobile*, *D. chysotoxum* และ *D. frimbriatum* เป็นต้น โดยจะนำมาใช้ในตำรับยาเพื่อเป็นยาบำรุง ยาสมานแผล ยาแก้ปวด ยาลดไข้ ยาลดอาการอักเสบ เป็นต้น ในหลายประเทศ เช่น อินโดนีเซีย มาเลเซีย ใต้หวัน เวียดนาม พม่า ศรีลังกา ฯลฯ ต่างก็มีการนำกล้วยไม้มาใช้ประโยชน์เป็นสมุนไพรรักษาโรคและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์หลากหลายประเภท ยกตัวอย่างเช่น ยาสมุนไพร อัดแคปซูล ชา อาหารเสริม ในประเทศไทยเองก็มีรายงานภูมิปัญญาพื้นบ้านเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากพืชวงศ์กล้วยไม้เพื่อรักษา อาการเจ็บป่วยกว่า 42 ชนิด (species) จาก 25 สกุล (genera) (Chuakul, 2002) ทำให้พ่อค้าชาวจีนมีความต้องการต้นกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อไปสกัดสารและผลิตเป็นชาสมุนไพร

ปัจจุบันมีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางยาในกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อประโยชน์ในการต้านมะเร็ง ยารักษาโรคเบาหวาน ป้องกันสมองขาดเลือด และเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย สารออกฤทธิ์ Moscatilin จากกล้วยไม้สกุลหวาย พบใน *D. moscatum*, *D. pulchellum* และ *D. loddigesii* สาร Moscatilin อยู่ในกลุ่ม bibenzyl ซึ่งเป็นสารที่มีหมู่ phenol ในโครงสร้าง ซึ่งมีผลการศึกษาทางเภสัชวิทยาแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation), ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant), ฤทธิ์ต้านการเจริญของหลอดเลือดเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (anti-angiogenesis) (Tsai *et al.*, 2010) นอกจากนี้สาร Moscatilin ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ NCI-H187 (มะเร็งปอด) และ KB (มะเร็งเยื่อช่องปาก) และยังสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม (Veronika *et al.* 2017) Moscatilin ถูกพบในกล้วยไม้สกุล Dendrobium หลายชนิด เช่นรายงานของ Chen *et al.* (2012) ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากกล้วยไม้ Dendrobium species จำนวน 24 สายพันธุ์ พบสาร naringenin, DDB-2, gigantol และ moscatilin ซึ่งเป็นสารที่พบมากในกล้วยไม้สกุล Dendrobium และรายงานของ Kowitdamrong *et al.* (2013) พบว่าสารสำคัญ moscatilin ซึ่งสกัดได้จาก เอื้องช้างน้าว (*Dendrobium pulchellum*) สามารถยับยั้งการย้ายถิ่นและการบุกรุกของเซลล์ H23 ของเซลล์ปอดได้ นอกจากนี้ปัจจัยภายนอกได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณน้ำ และธาตุอาหาร มีผลต่อการชักนำให้กล้วยไม้ผลิตสารสำคัญ moscatilin อีกด้วย สารสำคัญ moscatilin ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในกล้วยไม้ มักมีความแปรปรวน ซึ่งอาจมีสาเหตุจาก อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณน้ำ และธาตุอาหาร ซึ่งมีผลต่อการชักนำให้กล้วยไม้ผลิตสารสำคัญ moscatilin (Akula *et al.*, 2011) ส่งผลให้สารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้มีปริมาณไม่สม่ำเสมอในแต่ละครั้งของการผลิต เมื่อนำกล้วยไม้ดังกล่าวไปใช้เป็นยา จะทำให้การรักษาล้มเหลวได้

สำหรับกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่มีการปลูกเป็นการค้าในประเทศไทยได้มีการศึกษาปริมาณสารสำคัญ Moscatilin พบสารดังกล่าวในกล้วยไม้หวายลูกผสมสีขาวได้แก่ ขาว 5N 0.04547 %W/W ขาวสนาน 0.00323 %W/W และ เอื้องสกุล 0.0300 %W/W (พรชัย และคณะ, 2560) ซึ่งสามารถพัฒนานำมาใช้ประโยชน์เพื่อการรักษาโรค เพิ่มทางเลือกของการใช้กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายให้มีคุณค่าและมูลค่าของกล้วยไม้ได้มากกว่าการเป็นไม้ตัดดอก จากแนวโน้มการส่งออกสินค้ากล้วยไม้ของไทยเดือนมกราคม-มิถุนายน 2561 เพิ่มขึ้น 6.69% เมื่อเทียบกับช่วงเวลาเดียวกันของปี 2560 แต่เนื่องจากเศรษฐกิจโลกยังอยู่ในช่วงชะลอตัว ส่งผลให้ความต้องการของตลาดต่างประเทศส่วนใหญ่ยังอยู่ที่ตลาดเดิม และพฤติกรรมการบริโภคของตลาดต่างประเทศ



ค่อนข้างหลากหลาย ผู้บริโภคมีความต้องการดอกกล้วยไม้ที่มีคุณภาพ กล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่ๆ ทำให้ผู้ประกอบการต้องรักษามาตรฐานการผลิต รวมทั้งการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ (ปรานงุช,2561) จึงควรเพิ่มทางเลือกการใช้ประโยชน์ของกล้วยไม้เพื่อการตัดดอกของไทย โดยการนำเทคโนโลยีชีวภาพการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้ปัจจัยจากภายนอกซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้มีผลต่อปริมาณสารสำคัญให้สูงขึ้นได้นั้น จึงเป็นแนวทางเพื่อการศึกษาวิจัย และการตรวจสอบปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้นั้นมีความจำเป็น และมีประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของกล้วยไม้ การนำกล้วยไม้ซึ่งทราบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่แน่นอนไปใช้ จะสามารถลดปัญหาความไม่แน่นอนของการออกฤทธิ์ นอกจากนี้การตรวจหาปริมาณสารสำคัญในกล้วยไม้ก่อน การซื้อขาย ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กล้วยไม้ ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นด้วย จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิจัย พัฒนาชุดตรวจสอบสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ด้วยเทคนิค Enzyme-linked aptamer assay (ELAA) เพื่อเป็นชุดตรวจสอบที่เกษตรกรสามารถใช้งานได้ง่าย สะดวก รวดเร็วและค่าใช้จ่ายไม่สูง และในด้านการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายที่มีศักยภาพในการใช้เป็นสมุนไพรหรือใช้ประโยชน์ในทางเภสัชยศาสตร์ ข้อมูลทางพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ และมีความต้องการเครื่องหมายโมเลกุลในระดับดีเอ็นเอมาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ จำแนกพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ เพื่อประโยชน์ทางด้านสิทธิบัตร ป้องกันการแอบอ้างและปลอมปนวัตถุดิบที่ได้จากกล้วยไม้สกุลหวายที่มีศักยภาพเป็นสมุนไพร เป็นต้น

ดังนั้นโครงการนี้จึงมีแนวทางเพื่อการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายของไทย โดยการศึกษาการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้ปัจจัยจากภายนอกซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้มีผลต่อปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ให้สูงขึ้น ร่วมกับการผลิตชุดตรวจสอบปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ ซึ่งมีความจำเป็นและมีประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของกล้วยไม้ และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเทคโนโลยี ทรานสคริปโตมิกส์ เป็นการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอในภาพรวมทั้งหมด ให้เข้าใจหน้าที่ของยีนต่อการสร้างสาร Moscatilin และช่วยในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายได้แม่นยำและรวดเร็วยิ่งขึ้น

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย จำนวน 2 พันธุ์ คือ ขาว 5N และเอียสกุล โดยใช้ปัจจัยจากภายนอกเป็นตัวกระตุ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- 2) เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคนิค Enzyme-linked aptamer assay (ELAA).
- 3) เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์ และวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์

### วิธีการดำเนินการวิจัย

**การทดลองที่ 1 เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

- 1) ศึกษาปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ร่วมกับชนิดแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน ในกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N และ เอียสกุล

นำหน่อของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลจำนวน 2 พันธุ์ ประกอบด้วย ขาว 5N และ เอียสกุล มาชักนำให้เกิดเป็น protocorm-like bodies (plbs) ในอาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สูตร Vacin and Went ที่ประกอบด้วย น้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร เมื่อขึ้นส่วนตายอด/ตาข้างของ

กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายทั้ง 3 พันธุ์ เกิดเป็น plbs จากนั้นเพิ่มปริมาณ plbs ให้เพียงพอและชักนำให้เกิดเป็นต้นกล้วยไม้ที่มีขนาด 1 เซนติเมตร เพื่อนำมาทดสอบตามกรรมวิธีที่กำหนด ระยะเวลาการทดสอบ 4 เดือน

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD มีจำนวน 5 ซ้ำ มีปัจจัยหลัก คือ ชนิดแสงจำนวน 3 ชนิด ปัจจัยรอง คือ สูตรอาหาร จำนวน 4 สูตรอาหาร บันทึกผลน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น ความสูงต้น ความยาวราก พร้อมถ่ายภาพประกอบ มีรายละเอียดของสูตรอาหารดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 สูตรอาหาร VW (control)
- กรรมวิธีที่ 2 สูตรอาหาร VW + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กรรมวิธีที่ 3 สูตรอาหาร VW + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กรรมวิธีที่ 4 สูตรอาหาร VW + BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

## 2) ศึกษาสภาพเครียด ต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ร่วมกับชนิดแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน ในกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาวสนาน ขาว 5N และ เอียสกุล

นำต้นกล้วยไม้พันธุ์ขาว 5N และเอียสกุล ที่มีความสูงของต้นประมาณ 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงทดสอบในสูตรอาหารและสภาพแสงที่กำหนด ระยะเวลา 4 เดือน วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD มีจำนวน 5 ซ้ำ มีปัจจัยหลัก คือ ชนิดแสงจำนวน 3 ชนิด ปัจจัยรอง คือ สูตรอาหาร จำนวน 3 สูตรอาหาร บันทึกผลน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น ความสูงต้น ความยาวราก พร้อมถ่ายภาพประกอบ มีรายละเอียดของสูตรอาหารดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 สูตร VW (control)
- กรรมวิธีที่ 2 สูตร VW + PEG 5%
- กรรมวิธีที่ 3 สูตร VW + PEG 10%

## 3) การตรวจหาปริมาณสารสำคัญ Moscatilin

การเตรียมสารสกัดของตัวอย่างกล้วยไม้ เพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Ultra-High Liquid Chromatograph (UHPLC)

นำตัวอย่างกล้วยไม้สับให้ละเอียด จากนั้นนำไปอบที่ 50°C เป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง บดให้ละเอียด เก็บไว้ในภาชนะที่แห้งและสะอาด

### การสกัด

สกัดตัวอย่าง 0.5 g ด้วย methanol 5 ml โดยใช้วิธี ultrasonic extraction เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนสารละลายส่วนใสกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  ก่อน นำไปฉีด UHPLC

### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายมาตรฐาน moscatilin (YAL chemicals, China) ด้วย methanol ให้ได้ความเข้มข้น 0.005 - 1 mg/ml

### การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ moscatilin

การวิเคราะห์สารประกอบ moscatilin ในสารสกัดกล้วยไม้ ด้วยเครื่อง Ultra High Liquid Chromatograph (UHPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Shimadzu รุ่น Nexera-2 LD-30AD เครื่องตรวจวัดชนิด Photo diode array รุ่น SPD-M20A ระบบฉีดสารอัตโนมัติรุ่น SIL-30AC

### สถานะเครื่อง UHPLC

คอลัมน์:	GL Sciences InertSustainSwift C18 (150mm x 2.1mm x 1.9 $\mu\text{m}$ )
อุณหภูมิคอลัมน์:	30 oC
อัตราการไหล:	0.4 ml/min
ตัวพา:	1.5% acetic acid (ตัวพา A) และ methanol (ตัวพา B)
	ด้วยระบบ gradient : 0-7 นาที 80% (A) และ 20% (B)

7–14 นาที 68% (A) และ 32% (B)

14–17 นาที 80% (A) และ 20% (B)

เครื่องตรวจวัด: PDA 280 nm

ปริมาตรการฉีด: 5  $\mu$ l

เวลาที่ใช้: 17 นาที

บันทึกผล ค่าของสาร moscatilin แล้วนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

## การทดลองที่ 2 การพัฒนาชุดตรวจสอบสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายของไทย

### 1. การวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin จากกล้วยไม้สกุลหวาย

1.1 เตรียมตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวาย โดยรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย ที่มีสารสำคัญ moscatilin ปริมาณที่ต่างกัน ได้แก่ พันธุ์ขาวสนาน ขาว 5N และ เอียสกุล นำตัวอย่างกล้วยไม้สับให้ละเอียด จากนั้นนำไปอบที่ 60°C เป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง บดให้ละเอียด เก็บไว้ในภาชนะที่แห้งและสะอาด

1.2 สกัดสาร moscatilin จากกล้วยไม้สกุลหวาย โดยชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม ด้วยไนเมธานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้วิธี ultrasonic extraction เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนสารละลายส่วนใสกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22  $\mu$ m ก่อน นำไปฉีด UHPLC

1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน ละลายมาตรฐาน moscatilin (YAL chemicals, China) ความบริสุทธิ์มากกว่า 95% ด้วยเมธานอลให้ได้ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, 50  $\mu$ g/ml

1.4 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ moscatilin ในสารสกัดกล้วยไม้ ด้วยเครื่อง Ultra-High Liquid Chromatograph (UHPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Shimadzu รุ่น Nexera-2 LD-30AD เครื่องตรวจวัดชนิด Photo diode array รุ่น SPD-M20A ระบบฉีดสารอัตโนมัติรุ่น SIL-30AC

#### สภาวะเครื่อง UHPLC

คอลัมน์: GL Sciences InertSustainSwift C18 (150mm  $\times$  2.1mm  $\times$  1.9  $\mu$ m)

อุณหภูมิคอลัมน์: 30°C

อัตราการไหล: 0.4 ml/min

ตัวพา: 1.5% acetic acid (ตัวพา A) และ methanol (ตัวพา B)

ด้วยระบบ gradient : 0–7 นาที 80% (A) และ 20% (B)

7–14 นาที 68% (A) และ 32% (B)

14–17 นาที 80% (A) และ 20% (B)

เครื่องตรวจวัด: PDA 280 nm

ปริมาตรการฉีด: 5  $\mu$ l

เวลาที่ใช้: 17 นาที

บันทึกผล ลักษณะโครมาโตแกรมและ retention time ของสาร moscatilin

### 2. การเตรียมดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสาร moscatilin

2.1 การเตรียมคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ (DNA aptamer library)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (DNA aptamer) ขนาด 86 นิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5'-AAAGAATTCAAGCTTGAAGCTTGTTCGAGCCAG-(N<sub>40</sub>)-TCGGATCCGCTATAGTGAGTCG TATTA-3' ซึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์ (N<sub>40</sub>) อยู่บริเวณกลางของ DNA aptamer ส่วนบริเวณด้านข้างทั้งสองด้านเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ โดยวิธี PCR ดังนี้ forward primer (AptF), 5'-TTTCTGCAGGTGCGACTAATACGACTCACTAT AGCGGA-3'; reverse primer (AptR), 5'-AAAGAATTCAAGCTTGAAGCTTGTTCGAGCCAG-3' เมอร์ และสังเคราะห์ไพรเมอร์ AptR-Biotin [(biotin)-5-AAAGAATTCAAGCTTGAAGCTT GTTCGAGCCAG-3] สำหรับติด biotin ที่ปลาย 5' ของ DNA aptamer

## 2.2 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารสำคัญ moscatilin

### 2.2.1 คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารมาตรฐาน moscatilin ด้วยวิธี SELEX

นำคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 1 นาโนโมลลาร์ มาละลายใน Phosphate buffered saline (PBS: Sigma, USA) ที่เติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ Tween-20 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (PBST) ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารมาตรฐาน moscatilin 10 mg/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ่ายลงคอลัมน์ Vivaspin 500 (GE Healthcare, Sweden) ที่มี molecular weight cut off (MWCO) 30 กิโลดาลตัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย PBST ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงเช่นเดิมเป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง ละลาย aptamer- moscatilin complex ออกจากคอลัมน์ ด้วย PBST ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำ aptamer- moscatilin complex ไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USA) และไพรเมอร์ AptF และ AptR มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ทำการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารมาตรฐาน moscatilin จำนวน 14 รอบ

### 2.2.2 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสารมาตรฐาน moscatilin

ขั้นตอนนี้จะเป็นการกำจัดดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ไม่จำเพาะต่อสารมาตรฐาน moscatilin ได้แก่ สารสำคัญที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับสาร moscatilin ซึ่งพบในกล้วยไม้สกุลหวาย เช่น giantol กระทำเช่นเดียวกับข้อ 3.1 โดยเติมสาร giantol จากนั้นเก็บดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ออกจากคอลัมน์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสารมาตรฐาน moscatilin

บันทึกผลแถบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสาร moscatilin

### 2.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสารมาตรฐาน moscatilin

นำผลผลิตจาก PCR จากข้อ 3.2 โคลนเข้ากับ pGEM®-T Vector (Promega, USA) และถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร 2YT ที่เติม ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่สอดแทรกอยู่ใน พลาสมิดโดยเทคนิค colony PCR ทำโดยใช้โคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารเป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ AptF และ AptR จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวจำนวน 10 โคลน นำมาติด biotin ที่ปลาย 5' (DNA aptamer-biotin) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ AptR-Biotin ในการทำปฏิกิริยา และแยกให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ด้วย Dynabeads® M-280 Streptavidin (Invitrogen, Norway) ตามวิธีการของผู้ผลิต

บันทึกผลจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสาร moscatilin สอดแทรกอยู่ในพลาสมิด

## 2.3 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารสำคัญ moscatilin ด้วยเทคนิค ELAA

นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารสำคัญ moscatilin จำนวน 282 โคลน ไปทดสอบด้วยวิธี indirect ELAA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Barthelmebe *et al.*, (2011) โดยใช้สารมาตรฐาน moscatilin เคลือบลงในหลุมของถาด ELISA ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ติดฉลาก biotin แล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างถาด ELISA ด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม AP-Streptavidin Conjugate (Invitrogen, USA) เจือจาง 1:1,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างถาด ELISA และเติม substrate buffer ที่มี PNPP 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นของสีที่ได้ด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ( $OD_{405}$ )

บันทึกผล ค่าความเข้มข้นของสีที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร ของปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และสาร moscatilin

### 3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โดยใช้วิธี ELAA

ใช้วิธี Checker board titration เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โดยใช้สารมาตรฐาน moscatilin เคลือบลงในหลุมของถาด ELISA ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ติดฉลาก biotin แล้ว ความเข้มข้นที่ระดับ 0.16 0.32 0.63 1.25 2.5 5.0 10.0 20.0 และ 200.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างถาด ELISA ด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม AP-Streptavidin Conjugate (Invitrogen, USA) เจือจาง 1:1,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างถาด ELISA และเติม substrate buffer ที่มี PNPP 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นของสีที่ได้ด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ( $OD_{405}$ )

บันทึกผลสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาสาร moscatilin

### 4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ด้วยตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

4.1 การเตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน (Screen printed carbon electrode; SPCE) ด้วยวิธีของ Mishra *et al.* (2015)

ล้าง SPCE ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ต่อ SPCE เข้ากับเครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนาม (Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100) ล้างปรับสภาพด้วย sulfuric acid ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ KCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้ศักย์ไฟฟ้า -0.5 ถึง 0.5 โวลต์ จำนวน 12 รอบ โพลแทสเซียมเพอโรซายาไนต์ ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ และ โพลแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ บนขั้วไฟฟ้าทั้งสามภายใต้ศักย์ไฟฟ้า -0.5 ถึง 1.0 โวลต์ ล้างขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน แล้วเป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่าซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู

4.2 การเคลือบขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนด้วย 4-carboxyphenyl diazonium salt

จุ่มแผ่น SPCE จากข้อ 4.1 ลงในสารละลาย  $NaNO_2$  ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมลงใน electrolytic solution (2 mM 4-aminobenzoic acid และ 0.5 M HCl) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากให้ศักย์ไฟฟ้า -0.5 ถึง 0.5 โวลต์ จำนวน 1 รอบ จะได้สาร 4-carboxyphenyl diazonium salt (4-CP/SPCE) เคลือบบนแผ่น SPCE ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

4.3 การยึดติดดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสาร moscatilin บนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน



นำแผ่น SPCE ที่เคลือบแล้วจากข้อ 4.2 แช่ใน EDC เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ MES เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 60 นาที ล้างขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน หยอดดีเอ็นเอตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสาร moscatilin ซึ่งพ่วงด้วยสารกลุ่ม  $\text{NH}_2$  ทางด้านปลาย 5' ของเส้นดีเอ็นเอตาเมอร์ ความเข้มข้น 100 พิโคโมล ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนขั้วไฟฟ้า บ่มในกล่องความชื้นนาน 90 นาที ล้างขั้วไฟฟ้าด้วย binding buffer (1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 1.8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.4) จากนั้นหยอด ethanolamine เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนขั้วไฟฟ้า บ่มนาน 60 นาที และล้างขั้วไฟฟ้าด้วย BSA เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มนาน 60 นาที เก็บแผ่น SPCE ที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอตาเมอร์ต่อสาร moscatilin ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 5. ทดสอบประสิทธิภาพของตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าในการวิเคราะห์สาร moscatilin ในกล้วยไม้

นำตัวอย่างกล้วยไม้ที่บดแห้งแล้ว โดยใช้เอ็ยสกุล ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ด้วยวิธี UHPLC ได้เท่ากับ 0.062 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม เป็นตัวอย่างควบคุมบวก และกล้วยไม้ ขาว 5N ที่ไม่สามารถตรวจพบปริมาณสาร moscatilin ได้ เป็นตัวอย่างควบคุมลบ

สกัดสาร moscatilin โดยชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม ด้วยในเมธานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้วิธี ultrasonic extraction เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนสารละลายส่วนใสกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  นำมาเจือจางใน binding buffer หยอดลงบนแผ่น SPCE ที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอตาเมอร์ต่อสาร moscatilin จากข้อ 4 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ moscatilin ในสารสกัดกล้วยไม้ วัดค่าสเปกตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) ด้วยเครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนาม (Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100)

บันทึกผล ค่า EIS สาร moscatilin ในสารสกัดกล้วยไม้

## การทดลองที่ 3 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลและการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์

### 1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์

#### 1.1 ตัวอย่างพืช

เลี้ยงต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ได้แก่ กล้วยไม้หวายขาว 5N (พบสาร moscatilin สูง) กล้วยไม้หวายขาวสนาน (พบสาร moscatilin ต่ำ) และกล้วยไม้หวายเอ็ยสกุล ชนิดละ 6 ต้น ภายในตู้ควบคุมสภาวะแวดล้อม (Growth Chamber) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 1 เดือน เก็บตัวอย่างใบเพื่อสกัดอาร์เอ็นเอรวมสำหรับการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมิกส์

#### 1.2 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบและลำต้นกล้วยไม้ โดยใช้ RNeasy Plant Mini Kit ของบริษัท Qiagen นำใบและลำต้น ปริมาณ 0.2 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ RLT ปริมาตร 450 ไมโครลิตร และ  $\beta$ -mercaptoethanol ผสมอยู่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่าสารละลายโดยการ vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นดูดสารละลายลงไปใน QIAshredder

spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองด้วย QIAshredder spin column (ปริมาตรประมาณ 450 ไมโครลิตร) มาเติมลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม absolute ethanol 0.5 เท่าของส่วนใส ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีดูดขึ้นและลง แล้วดูดสารละลายดังกล่าวลงไป RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้งไป ล้าง column ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ RW<sub>1</sub> ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้งไป ล้าง column อีกสองครั้งโดยการเติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้ง ปั่นเหวี่ยง column ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่เหลือค้างอยู่บน column ให้หมดไป ย้ายเฉพาะในส่วนของ column ไปวางลง microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เซอาร์เอ็นเอออกจาก column ด้วยการเติม RNase free water ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ที่มี RiboLock™ RNase Inhibitor ของบริษัท Fermentas ผสมอยู่ความเข้มข้น 0.04 ยูนิต์ต่อไมโครลิตร

### 1.3 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอรวมด้วยวิธีเจลอิเล็กโตโฟรีซิส (gel electrophoresis)

ทำการตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตโฟรีซิสโดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

### 1.4 การกำจัดไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA removal)

กำจัด rRNA ด้วยชุด RiboMinus™ Plant Kit for RNA-Seq โดยนำอาร์เอ็นเอรวมที่ได้มาติดกับโพรบ RiboMinus™ Probe ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปล่อยให้เย็น แล้วเติม RiboMinus™ Beads บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อให้ rRNA ติดกับโพรบ แล้วเทสารละลายทิ้ง (ทำซ้ำอีก 1 รอบ) จากนั้นเติม glycogen 3 M sodium acetate และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ที่ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่น 15 นาที แล้วล้างด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 2 รอบ ทิ้งไว้ให้แห้ง ละลายด้วยน้ำ DEPC

### 1.5 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สม (cDNA synthesis)

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สมด้วยชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit ยี่ห้อ Thermo โดยนำอาร์เอ็นเอรวมความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร 5 ไมโครลิตร เติมไพรเมอร์ oligo(dT)<sub>18</sub> 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DEPC 6.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำมาเติมบัฟเฟอร์ 5X reaction 4.5 ไมโครลิตร RiboLock™ RNase inhibitor 1 ไมโครลิตร 10mM dNTP mix 2 ไมโครลิตร และ RevertAid M-MuLV 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

### 1.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์

นำตัวอย่าง cDNA ที่ได้ใส่ในหลอด 1.5 ไมโครลิตร แล้วปิดฝาให้สนิทด้วยพาราฟิล์ม แล้วส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์โดยใช้เครื่อง Next Generation Sequencing รูปแบบ illumina ของบริษัทโนวอยีน (Novogene) ประเทศจีน

### 1.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน และเปรียบเทียบกับหน้าที่ของยีนจากฐานข้อมูล Swiss-Prot database, Gene Ontology (GO), Eukaryotic Orthologous Groups of protein (KOG) และ Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genome (KEGG)

### 1.7 การค้นหาตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุล

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลและค้นหาตำแหน่ง SNP ที่เกิดการกลายไป และลักษณะการขาดหายหรือการเพิ่มเข้ามา (In/del) ของชิ้นส่วนยีนขนาดเล็กที่วิเคราะห์จากชิ้นส่วนของยีนหรือ mRNA โดยใช้โปรแกรม Samtools และ Picard แล้วทำการคัดกรองการอ่านซ้ำด้วยโปรแกรม Samtools/BCFtools ในการค้นหาตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP และ In/Del โดยตั้งโดเมนทอรีตัวแปรผลเป็น Result/10 variant และทำการค้นหาตำแหน่งเครื่องหมาย SSR หรือ simple sequence repeat ที่มีชุดซ้ำของลำดับเบส 1-6 คู่เบส ทำการคำนวณความซ้ำของเบสด้วย MISA (V.1.0) ที่พารามิเตอร์ของลำดับเบสซ้ำที่ 1-10; 2-6; 3-5; 4-5; 5-5; 6-5

## 2. การทดสอบและประเมินความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุล

### 2.1 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างใบกล้วยไม้สกุลหวายสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ เป็นตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายที่ทำการศึกษากัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลไว้แล้วจำนวน 5 ชนิดๆ ละ 2 ต้น ได้แก่ ขาว5N, ขาวสนาน, ขาวเลอเวีย, เอียสกุล และ *D. officinale*

### 2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบกล้วยไม้หวายมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุณทัยและคณะ (2552) ดังนี้ เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ซังใบ 5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Chloroform:Isoamyl alcohol(24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAc 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทั้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA(10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

### 2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ (5 uM) อย่างละ 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 52-57 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ

### 2.4 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุล SNPs หรือ SSR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE



buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD) และทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุล SSR ด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System

### 3. การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่กระตุ้นให้เพิ่มปริมาณสาร Moscatilin

#### 3.1 ตัวอย่างพืช

นำ protocorm-like bodies (plbs) ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ขาว5N มาเพาะเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คัดเลือกต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากระตุ้นให้เพิ่มสาร moscatilin โดยใช้ข้อมูลและกรรมวิธีจากการทดลองที่ 1 (เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) ที่มีการกระตุ้นให้สร้างสารมากที่สุด มาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จำนวน 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (control) กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่ให้แสง LED สีขาว และอาหารปราศจากสาร BA นาน 4 เดือน

กรรมวิธีที่ 2 ชุดเปรียบเทียบ กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่ให้แสง LED สีขาว และเติมสาร BA ความเข้มข้น 1 ml/l นาน 4 เดือน

3.2 การวิเคราะห์แสดงออกของยีนด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ นำตัวอย่างกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ขาว5N ที่ผ่านกรรมวิธี ทำตามวิธีการในขั้นตอนข้อที่ 1 ดังนี้

- การสกัดอาร์เอ็นเอรวม
- การตรวจสอบอาร์เอ็นเอรวมด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)
- การกำจัดไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA removal)
- การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สม (cDNA synthesis)
- การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์
- การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

3.3 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ moscatilin ในสารสกัดกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ขาว5N ที่ผ่านกรรมวิธี ด้วยเครื่อง Ultra-High Liquid Chromatograph (UHPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Shimadzu รุ่น Nexera-2 LD-30AD เครื่องตรวจวัดชนิด Photo diode array รุ่น SPD-M20A ระบบฉีดสารอัตโนมัติรุ่น SIL-30AC ตามสภาวะเครื่อง UHPLC ดังนี้

#### สภาวะเครื่อง UHPLC

คอลัมน์: GL Sciences InertSustainSwift C18 (150mm × 2.1mm × 1.9  $\mu$ m)

อุณหภูมิคอลัมน์: 30°C

อัตราการไหล: 0.4 ml/min

ตัวพา: 1.5% acetic acid (ตัวพา A) และ methanol (ตัวพา B)

ด้วยระบบ gradient : 0–7 นาที 80% (A) และ 20% (B)

7–14 นาที 68% (A) และ 32% (B)

14–17 นาที 80% (A) และ 20% (B)

เครื่องตรวจวัด: PDA 280 nm

ปริมาตรการฉีด: 5  $\mu$ l

เวลาที่ใช้: 17 นาที

บันทึกผล ลักษณะโครมาโตแกรม ค่า retention time และคำนวณค่าปริมาณสาร moscatilin

### บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์จากกล้วยไม้เพื่อรักษาอาการเจ็บป่วยกว่า 42 ชนิด สารออกฤทธิ์ moscatilin จากกล้วยไม้สกุลหวาย อยู่ในกลุ่ม bibenzyl มีหมู่ phenol ในโครงสร้าง มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการเจริญเซลล์มะเร็ง มีศักยภาพในการใช้เป็นสมุนไพร แต่ยังคงขาดแคลนข้อมูลทางพันธุกรรม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ร่วมกับการใช้ปัจจัยจากภายนอกเป็นตัวกระตุ้นปริมาณสารสำคัญให้สูงขึ้น การผลิตชุดตรวจสอบปริมาณสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของกล้วยไม้ การศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ เพื่อเข้าใจหน้าที่ของยีนต่อการสร้างสาร moscatilin โดยการศึกษาแสง LED 3 สี ร่วมกับสูตรอาหารที่มี 6-benzylaminopurine (BA) พบว่า พันธุ์เอี้ยสกุลปริมาณสารสำคัญ moscatilin จะตอบสนองต่อแสง LED สีขาว ร่วมกับ BA 1 mg/l พันธุ์ขาว 5N จะพบได้มากในแสง LED สีน้ำเงิน ร่วมกับ BA 2 mg/l การทดสอบสาร PEG ร่วมกับ LED พบว่า พันธุ์เอี้ยสกุลสูตรอาหารที่มี PEG 5% ในแสงสีน้ำเงินจะมีปริมาณสาร moscatilin สูงสุด 2.30 g/ 100 g sample พันธุ์ขาว 5N พบว่าในแสง LED สีน้ำเงิน ร่วมกับสูตรอาหารที่มี PEG 10% จะมีปริมาณสารสำคัญ Moscatilin สูงสุด การผลิตชุดตรวจสอบสารมาตรฐาน moscatilin ถูกนำมาใช้เป็นแอปตาเจนในการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ด้วยวิธี Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) การทดสอบปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน moscatilin คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ได้ 7 โคลน คือ MosA6 MosH4 MosH8 MosE6 MosB6 MosA3 และ MosA7 เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี indirect enzyme-linked aptamer assay (ELAA) พบว่า ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ทั้ง 7 โคลน ให้ค่า S/N ratio อยู่ในช่วง 1.03-5.4 เมื่อนำไปพัฒนาวิธี electrochemical aptasensor พบว่า ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์โคลน MosH4 และ MosH8 สามารถตรวจจับสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวายได้ จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการตรวจสอบสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวายของไทย ด้วยวิธี electrochemical impedimetric aptasensor ได้ และนำไปใช้ยังภาคสนามได้อีกด้วยการทดลองหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอี้ยสกุล มีลักษณะพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *Dendrobium catenatum* ที่ค่าความเหมือน 80.6 เมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงผลของยีนทั้งหมดพบการแสดงออกของยีนจำนวน 45,012 44,849 และ 29,209 ยีน ตามลำดับ และมีการแสดงออกของกลุ่มยีนมากที่สุด ได้แก่ กลุ่มยีนเกี่ยวกับ Cell wall organization (หรือ biogenesis) response to stress และ lipid binding สำหรับการทดสอบและประเมินความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ในรูปแบบ di-repeat และ tri-repeat ที่ให้ความแตกต่างระหว่าง ขาว5N, ขาวสนาน และเอี้ยสกุล จำนวน 30 คู่ โพรเมอร์ พบมีเพียง 10 คู่ โพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ นอกจากนี้ผลการแสดงออกของยีนภายหลังการกระตุ้นด้วยแสง LED สีขาวร่วมกับสาร BA 1 mg/l พบสามารถเพิ่มปริมาณสาร moscatilin มากขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยการแสดงออกของยีนหลังการกระตุ้นด้วย BA พบว่ากล้วยไม้สกุลหวายเอี้ยสกุลมีการแสดงออกของยีนมากกว่าขาว5N ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสาร moscatilin ที่พบในกล้วยไม้ลูกผสมเอี้ยสกุลมากกว่าขาว5N

### Abstract

Thailand has reports about the use of Orchids for treatment more than 42 species. An active substance Moscatilin belongs to the bibenzyl group, a structural phenol group, which has results in pharmacological studies showing a wide range of biological activities such as anti-inflammatory, antioxidant and anti-cancer cell proliferation. It has potential for medicinal uses

but lacks genetic information. The objectives of this study are (1) to apply plant tissue culture biotechnology in combination with the use of external factors as catalysts to increase the content of Moscatilin substances, (2) to produce of Moscatilin amount test kits in orchids, which is essential and useful in orchid quality control, (3) to study and development of molecular marker of *Dendrobium* orchids using transcriptomics technology. Besides, to understand the function of genes involving in the production of Moscatilin. The study of LED light 3 colors together with the medium containing various 6-benzylaminopurine (BA) concentration found that in *Eia sakun* cultivar, the amount of moscatilin was most responsive to white LED in combination with BA 1 mg/l, *Khaow-5N* cultivar moscatilin were produced most in blue LED in combination with BA 2 mg/l. Testing of PEG compounds with different color LED to activate the production of moscatilin found that in *Eia sakun* the blue LED in combination with 5% PEG in medium had a maximum moscatilin content of 2.3 g/ 100 g sample. In *Khaow-5N*, the moscatilin content was the highest in the blue LED combined with the 10% PEG in medium. In the production of Moscatilin amount test kits, Moscatilin was used as an aptagen to select specific DNA aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) method. Seven DNA aptamers designated MosA6 MosH4 MosH8 MosE6 MosB6 MosA3 and MosA7 were selected from the binding affinity test with moscatilin. By using seven DNA aptamers in indirect ELISA, the result showed the binding activity between an S/N ratio of 1.03-5.48. When DNA aptamer clone MosH4 and MosH8 were tested in electrochemical impedimetric aptasensor, the result showed that both clone of DNA aptamers can detect moscatilin in orchid sample. The result from this research can be a model for the detection of moscatilin in Thai orchid *Dendrobium* species based on electrochemical impedimetric aptasensor. Besides, analysis can perform onsite with pre-constructed electrodes and modified aptamer employing a portable EIS set up. The nucleotide sequences from three *Dendrobium* hybrids, *Khaow-Sanan*, *Khaow-5N* and *Eia-sakul* were closely related to *Dendrobium catenatum* at 80.6 homology. The analysis of whole genes expression in these three hybrids showed 45,012 44,849 and 29,209 genes, respectively. In addition, the gene groups with highest expression were cell wall organization (biogenesis), stress response, and lipid binding. In testing and evaluating the validity of 30 primer pairs of SSR markers in di-repeat and tri-repeat patterns that differentiates between species of three *Dendrobium* hybrids, it was found that 10 primer pairs could be amplified. Furthermore, the results of genes expression after stimulation by white LED light in combination with BA 1 mg/L revealed the increase of the amount of Moscatilin compared to the control. *Earsakul* have higher gene expression than *Khaow-5N*. consistent with the amount of Moscatilin found more in *Earsakul* than in *Khaow-5N*.

เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ  
Techniques for Increasing the Active Substance Moscatilin in Dendrobium hybrid Orchids  
by Tissue Culture.

ภุมรินทร์ วณิชชานันท์ อัจฉราพรรณ ใจเจริญ อรุโณทัย ซาววา  
ดวงพร บุญชัย ศิริวัลย์ สร้อยกล่อม

Phummarin Wanichananan Adcharapun Chaicharoen Aroonothai Saowa  
Duangporn Boonchai Siriwan Soiklom

คำสำคัญ

สารสำคัญ กล้วยไม้หวาย สิ่งกระตุ้น  
Secondary metabolite, Dendrobium sp., Elicitor

บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีรายงานภูมิปัญญาพื้นบ้านเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากพืชวงศ์กล้วยไม้เพื่อรักษาอาการเจ็บป่วยกว่า 42 ชนิด (species) จาก 25 สกุล (genera) สารออกฤทธิ์ Moscatilin จากกล้วยไม้สกุลหวาย พบใน *D. moscatum*, *D. pulchellum* และ *D. loddigesii* สาร Moscatilin อยู่ในกลุ่ม bibenzyl ซึ่งเป็นสารที่มีหมู่ phenol ในโครงสร้าง ซึ่งมีผลการศึกษาทางเภสัชวิทยาแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคโนโลยีชีวภาพการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้ปัจจัยจากภายนอกซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้มีผลต่อปริมาณสารสำคัญให้สูงขึ้นในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลและพันธุ์ขาว 5N โดยใช้ปัจจัยของแสง LED 3 สี คือ ขาว แดง และน้ำเงิน ร่วมกับปัจจัยร่วมคือสูตรอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แสง LED สีขาวเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ และสูตรอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA เป็นปัจจัยร่วมซึ่งจะมีผลต่อปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ที่เกิดขึ้น พันธุ์เอี้ยสกุลจะตอบสนองต่อแสง LED สีขาว ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนพันธุ์ขาว 5N จะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในแสง LED สีขาว ร่วมกับสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ปริมาณสารสำคัญ Moscatilin จะพบได้มากเมื่อเลี้ยงในแสง LED สีน้ำเงิน ร่วมกับสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร การทดสอบสาร PEG ร่วมกับ LED สีต่างๆ ในการกระตุ้นสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุล และพันธุ์ขาว 5N พบว่า สูตรอาหารที่มี PEG 5% ในแสงสีน้ำเงินจะมีปริมาณสาร Moscatilin สูงสุด 2.30 g/ 100 g sample ปัจจัยหลักคือสูตรอาหารที่มี PEG มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้และปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แสงเป็นปัจจัยรองในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในกล้วยไม้พันธุ์เอี้ยสกุล ส่วนในพันธุ์ขาว 5N พบว่า ปัจจัยของสูตรอาหารและแสงไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin โดยพบว่าในแสง LED สีน้ำเงิน ร่วมกับสูตรอาหารที่มี PEG 10% จะมีปริมาณสารสำคัญ Moscatilin สูงสุด

Abstract

Thailand has reports about the use of Orchids for treatment more than 42 species from 25 genera. The active ingredient moscatilin from the Dendrobium is found in *D. moscatum*, *D. pulchellum* and *D. loddigesii*. Moscatilin belongs to the bibenzyl group, a structural phenol group, which has results in pharmacological studies showing a wide range of biological activities such as anti-inflammatory and antioxidant. The objective of this study is to

apply plant tissue culture biotechnology in combination with the use of external factors as catalysts to increase the content of moscatilin substances. The factors of 3 color LED light (white, red and blue) were studied with cofactors which were formulated with BA growth regulators at concentrations of 0, 1, 2 and 3 mg/l. It was found that white LED is the main factor affecting plant growth and a formulation medium containing BA as a cofactor affected the amount of moscatilin active substance. “Eia sakun” and “Khaow-5N” cultivars responded to white LED light in combination with 1 mg/l BA. However, the moscatilin content is more abundant when cultured in blue LED light with medium containing 2 mg/l BA. Testing of PEG compounds in combination with different color LED to activate the production of moscatilin in *Dendrobium* hybrids “Eia sakun” and “Khaow-5N” found that in Eia sakun the blue LED in combination with 5% PEG in medium had a maximum moscatilin content of 2.3 g/ 100 g sample. PEG containing in medium as the main factor had a statistically significant effect on the orchid plant growth and the amount of moscatilin. Light is a secondary factor to increase the amount of secondary metabolite in the orchid. In Khaow-5N, various the medium and light conditions were not statistically different for the increase of moscatilin. It was found that the moscatilin content was the highest in the blue LED combined with the 10% PEG in medium.

## บทนำ

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) ถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรในตำรายาจีน (Traditional Chinese Medicine (TCM)) กล้วยไม้ป่าที่ถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรทางยาของจีนมีชื่อเรียกว่า “Shihu” ประกอบด้วยกล้วยไม้ 30 ชนิด ตัวอย่างเช่น *D. nobile*, *D. chysotoxum* และ *D. frimbriatum* เป็นต้น โดยจะนำมาใช้ในตำรับยาเพื่อเป็นยาบำรุง ยาสมานแผล ยาแก้ปวด ยาลดไข้ ยาลดอาการอักเสบ เป็นต้น ในหลายประเทศ เช่น อินโดนีเซีย มาเลเซีย ใต้หวัน เวียดนาม พม่า ศรีลังกา ฯลฯ ต่างก็มีการนำกล้วยไม้มาใช้ประโยชน์เป็นสมุนไพรรักษาโรคและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์หลากหลายประเภท ยกตัวอย่างเช่น ยาสมุนไพร อัดแคปซูล ชาอาหารเสริม ในประเทศไทยเองก็มีรายงานภูมิปัญญาพื้นบ้านเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากพืชวงศ์กล้วยไม้เพื่อรักษา อาการเจ็บป่วยกว่า 42 ชนิด (species) จาก 25 สกุล (genera) (Chuakul, 2002)

ปัจจุบันมีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางยาในกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อประโยชน์ในการต้านมะเร็ง ยารักษาโรคเบาหวาน ป้องกันสมองขาดเลือด และเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย สารออกฤทธิ์ Moscatilin จากกล้วยไม้สกุลหวาย พบใน *D. moscatum*, *D. pulchellum* และ *D. loddigesii* มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งปอด มะเร็งเต้านม (Veronika et.al. 2017) มีการนำกล้วยไม้มาใช้ในการป้องกันและรักษาโรค เนื่องจากเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ กล้วยไม้ในสกุล *Dendrobium* มีสารที่มีหมู่ฟีนอลในโครงสร้าง ได้แก่ bibenzyl, phenanthrene และ fluorenone เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ในประเทศไทยมีจำนวนกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* มากกว่า 150 ชนิด

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจัดเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพที่จะชักนำให้พืชผลิตสารสำคัญ (secondary metabolites) ภายใต้สภาพควบคุมได้ ปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการชักนำให้พืชผลิตสารสำคัญ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ความเข้มแสง ปริมาณน้ำ ธาตุอาหาร และปริมาณ CO<sub>2</sub> พบว่า สาร Moscatilin เป็นสารในกลุ่ม Phenolic compound จะสามารถชักนำให้มีปริมาณสูงขึ้นได้เมื่อได้รับ Potassium, Sulfur และ Magnesium ที่สูงขึ้น สภาพความแห้งแล้ง(ขาดน้ำ) เป็นสาเหตุให้เกิดสภาพเครียดซึ่งมีผลทำให้ปริมาณ Phenolic acid และ Flavonoids สูงขึ้น รวมทั้งความเข้มแสงที่สูงจะกระตุ้นให้มีการสร้างสาร Phenolic acid ที่สูงขึ้นได้ สำหรับสาร Methyl Jasmonate และ Jasmonic acid สามารถกระตุ้นให้มีการผลิตสารประกอบ alkaloids, terpenoid, phenolic phytoalexins, coumarin และ taxanes ได้ในพืชหลายชนิด และมีการรายงานว่าการให้สาร Jasmonate จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารสำคัญในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยได้ (cell suspension culture) (Akula and Ravishankar, 2011)

ไซโตไคนิน (cytokinins) (พีเรเดซ, 2537 ; พรพิมล, 2545) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช มีหน้าที่ควบคุมการแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโตทางด้านกิ่งใบ การแตกแขนง สารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อกระตุ้นการเจริญของแคลลัส (callus) ให้เติบโตขึ้นมาเป็นลำต้น พืชสามารถสร้างไซโตไคนินขึ้นมาเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ คือ สาร zeatin ส่วนสารสังเคราะห์ในกลุ่มไซโตไคนินตามโครงสร้างทางเคมีเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มสารประกอบ purine และกลุ่มสาร phenylureas โดยสารประกอบ purine ที่เป็นสารสังเคราะห์ ได้แก่ 6-benzylaminopurine (BA) และ 6-furfuryl 3 aminopurine (kinetin) มีราคาไม่แพง ส่วน purine ที่เป็นสารธรรมชาติ คือ N<sub>6</sub>-isopentenyladenine (2iP) มีราคาแพงมาก จึงนิยมใช้เฉพาะในงานวิจัยเท่านั้น ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งเป็นสาร phenylureas เช่น thidiazuron (TDZ) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์คล้ายไซโตไคนินที่มีฤทธิ์แรง แม้จะมีราคาสูง แต่การใช้งานอยู่ในระดับความเข้มข้นต่ำ

การศึกษาผลกระทบเมื่อพืชได้รับภาวะความเครียด ระบบเมตาโบลิซึมต่างๆ ของฮอร์โมนภายในพืช มักจะเป็นสิ่งแรกที่มีการเปลี่ยนแปลงในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมที่เกิดขึ้น ซึ่งหากภาวะเครียดดำเนินไปในช่วงระยะเวลาสั้นๆ การเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ที่ตามมาอาจเกิดขึ้นเพียงใน



ระดับของกระบวนการทางชีวเคมี หรือกระบวนการเมตาโบลิซึม แต่หากภาวะเครียดเกิดติดต่อกันเป็นระยะเวลา นานๆ อาจพบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับลักษณะทางสัณฐาน (morphological character) หรือลักษณะทางกายวิภาค (anatomical character) ของพืชเพื่อลดภาวะความเครียด และทำให้พืชนั้นสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ (ชุมพล, 2549) การสร้างสภาวะเครียดของพืชในห้องปฏิบัติการทำได้โดยใช้สารละลาย PEG (polyethylene glycol) เป็นตัวควบคุมให้พืชอยู่ในสภาวะเครียดในระดับต่างๆ ตามที่ต้องการ EG มีชื่อทางการค้าว่า Carbowaxes มีสูตรโครงสร้าง  $\text{HOCH}_2(\text{OCH}_2\text{CH})_n\text{OH}$  มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ตั้งแต่ 300-20,000 (Jackson, 1962) เป็นสารที่มีพิษต่อคนและสัตว์น้อยมาก (Smyth et al, 1955) PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 6000 นั้น ไม่สามารถซึมผ่าน เมมเบรนได้ สารละลาย PEG 6000 ที่มีความเข้มข้นสูงมีผลทำให้ osmotic potential ลดลงทำให้พืชได้รับสภาวะเครียด

เนื่องจากแสงจัดเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัส ช่วงความยาวแสง (day length) ชนิดแสง (light quality) และความเข้มแสง (light intensity) ล้วนมีความสำคัญต่อพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลอง ช่วงความยาวแสงที่เลือกใช้โดยทั่วไปคือ 14-16 ชั่วโมง แต่บางครั้งอาจมีการให้แสงตลอดเวลาหรือให้มืดตลอดเวลา ชนิดของแสงสีต่างๆ มีความสำคัญต่อการเจริญของพืชที่เลี้ยง เช่น แสงสีส้มแดงมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช เพราะแสงสีส้มแดงเกี่ยวข้องกับการทำงานของ Phytochrome การสะสมไซโตไคนิน เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงด้วย การเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นยาสูบในอาหารที่มี IAA พบว่า ถ้านำไปเก็บเลี้ยงภายใต้แสงสีแดง และเขียว จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ดีกว่าแสงสีน้ำเงิน เนื่องจาก IAA จะถูกทำลายโดยแสงสีน้ำเงิน ทำให้การเจริญเติบโตถูกจำกัด แสงสีน้ำเงิน มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง คือจะลดการสังเคราะห์ DNA มีผลต่อการเพิ่มการผลิตฟีนอลิก (phenolic compound) และเพิ่มการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน (Gibberellic) ซึ่งทำให้กระบวนการทำงานของสารควบคุมการเจริญเติบโต สำหรับการเกิดยอดหรือรากจากแคลลัสยาสูบ พบว่าแสงสีน้ำเงินและม่วงส่งเสริมการเกิดยอดในขณะที่แสงสีแดงส่งเสริมการเกิดราก เป็นต้น (คำคุณ, 2542)

Adisa et. al. (2017) รายงานว่าการใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต BA มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นเปปเปอร์มินต์ (*Mentha piprita*) และการใส่ BA ที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้มีการผลิตสารประกอบกลุ่ม Phenolic เพิ่มขึ้นด้วย ส่วนการเพาะเลี้ยงแคลลัสในเทคนิคปลอดเชื้อเป็นการพัฒนาการผลิตสารประกอบฟีนอลิกของกล้วยไม้ *Habenaria edgeworthii* Hook. f. ex. Collett ซึ่งเป็นกล้วยไม้หายากและมีฤทธิ์ทางยา การนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสชนิด friable ที่มีลักษณะสีเหลืองอ่อนสามารถเกิดขึ้นบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS หรือ ½ MS ร่วมกับการเติม NAA ความเข้มข้น 1 M และสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสให้มีจำนวนมากโดยการเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ ก่อนจะย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่มี BA 0.1 M ซึ่งแคลลัสจะมีน้ำหนักสดสูงสุด 2.61 กรัม ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่มีการเติม BA โดยมีค่า gallic acid equivalent (GAE) 10.33 และ 14.30 mg ต่อค่าน้ำหนักแห้ง (เปรียบเทียบกับค่า control มีค่า 10.17 mg ต่อค่าน้ำหนักแห้ง) การตรวจสอบแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มีการเติม BA 3.0 M ด้วยวิธี HPLC แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณ gallic acid 143.63 /100 g DW เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนหัวของกล้วยไม้ป่า *Habenaria edgeworthii* Hook. f. ex. ที่มีปริมาณ gallic acid 5.5 /100 g DW ดังนั้น BA สามารถเพิ่มปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและจากผลการศึกษานำไปประยุกต์ใช้ในผลิตสารสำคัญในเชิงพาณิชย์ต่อไป (Lalit et. al. 2012) เช่นเดียวกับ Ke et. al. (2015) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสะสม curcumin ในเหง้า (microrhizomes) ของขมิ้น (*Curcuma aromatic Salisb*) โดยศึกษาผลของปริมาณน้ำตาล, สัดส่วนของ 6-benzylaminopurine (BA) และ  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA) และคุณภาพของแสงต่อการสะสม curcumin และ curcuminoids พบว่าการชักนำ microrhizome ในอาหาร MS ที่มีปริมาณน้ำตาล 3% จะมีการสะสมของ curcumin และ curcuminoids มากกว่าการใช้ปริมาณน้ำตาลที่สูง 5%, 7%

และ 9% และพบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 3 mg/L ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับการให้แสงสีแดง จะมีผลการสร้าง curcumin และ curcuminoids เพิ่มสูงขึ้นใน microrhizome

Tanaka et al. (1998) ได้ศึกษาแสงสีน้ำเงินและสีแดงในการเลี้ยงกล้วยไม้ *Cymbidium* ภายใต้อุณหภูมิห้อง พบว่า แสงสีน้ำเงินจะลดการเจริญเติบโตของใบ และเพิ่มปริมาณ chlorophyll ในใบเมื่อเปรียบเทียบกับแสงฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งให้ผลตรงข้ามกันในแสงสีแดง ต่อมา Cybularz et al. (2007) ได้ทดสอบเลี้ยงกล้วยไม้ *Cattleya* ในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิภายใต้สภาพแสงสีน้ำเงิน พบว่า แสงสีน้ำเงินจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ *cattleya* ใช้มีการสร้างส่วนของราก และเพิ่มความยาวรากอากาศของกล้วยไม้ได้ รวมทั้งเพิ่มน้ำหนักแห้งและจำนวนรากต่อต้นได้ แต่ไม่มีผลต่อปริมาณ carotenoid และ chlorophyll เมื่อเปรียบเทียบกับแสงฟลูออเรสเซนต์ปกติ Ouzounis et al. (2015) การผลิตไม้กระถางฟาแลนนอปซิส (*Phalaenopsis*) ในโรงเรือนที่มีการควบคุม โดยการทดสอบใช้แสง LEDs ที่มีความเข้มแสง 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  ระยะเวลา 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 24°C ในเวลากลางวัน และ 18°C ในเวลากลางคืน โดยทดสอบในเดือนมกราคม-เมษายน ปี 2013 ในสภาพแสง 3 ชนิด คือ 1) แสงสีน้ำเงิน (Blue) 40% : สีแดง (Red) 60% 2) แสงสีแดง 100% และ 3) แสงสีขาว 100% (Control) ใช้กล้วยไม้ ฟาแลนนอปซิสพันธุ์ "Vivien" และพันธุ์ "Purple star" ตรวจสอบปริมาณ chlorophyll fluorescence ด้วยเครื่อง PAM-2001 พบว่า *Phalaenopsis* พันธุ์ "Vivien" จะมีปริมาณ chlorophyll fluorescence สูงสุดเมื่อเลี้ยงในสภาพแสงสีน้ำเงิน (Blue) 40% : สีแดง (Red) 60% และในพันธุ์ "Purple star" จะพบ ปริมาณ chlorophyll fluorescence สูงสุดในแสงสีแดง 100% การตรวจสอบปริมาณสารสำคัญด้วยวิธี HPLC แสดงให้เห็นว่าการให้แสงสีน้ำเงินจะทำให้มีค่า flavonoids และ carotenoid สูงที่สุด

สำหรับกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่มีการปลูกเป็นการค้าในประเทศไทยได้มีการศึกษาปริมาณสารสำคัญ Moscatilin พบสารดังกล่าวในกล้วยไม้หวายลูกผสมสีขาวได้แก่ ขาว 5N 0.04547 %W/W ขาวสนาน 0.00323 %W/W และ เอียสกุล 0.0300 %W/W (พรชัย และคณะ, 2560) ซึ่งสามารถพัฒนานำมาใช้ประโยชน์เพื่อการรักษาโรค เพิ่มทางเลือกของการใช้กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายให้มีคุณค่าและมูลค่าของกล้วยไม้ได้มากกว่าการเป็นไม้ตัดดอก ดังนั้นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ช้ร่วมกับการใช้ปัจจัยจากภายนอกซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้มีผลต่อปริมาณสารสำคัญให้สูงขึ้นได้นั้น จึงเป็นแนวทางเพื่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

### วัตถุประสงค์

เพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย จำนวน 2 พันธุ์ คือ ขาว 5N และเอียสกุล โดยใช้ปัจจัยจากภายนอกเป็นตัวกระตุ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

### ขอบเขตการวิจัย

การเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย จำนวน 2 พันธุ์ คือ ขาว 5N และเอียสกุล โดยใช้ปัจจัยจากภายนอก ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโต (BA) และสารสร้างสภาพเครียด (PEG) รวมถึงการใช้แสงจากหลอด LED สีขาว (control) สีแดง และสีน้ำเงิน เป็นตัวกระตุ้นในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



## ระเบียบวิธีการวิจัย

### ประเด็นวิจัย

การใช้ปัจจัยจากภายนอกเป็นสิ่งกระตุ้น (elicitor) เพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย จำนวน 2 พันธุ์ คือ ขาว 5N และเอียสกุล

### สถานที่ทำการวิจัย

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จ.ปทุมธานี

### ระยะเวลาดำเนินงาน

ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564 (2 ปี)

### วิธีการดำเนินการ

#### 1) ศึกษาปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ร่วมกับชนิดแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน ในกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N และ เอียสกุล

นำหน่อของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลจำนวน 2 พันธุ์ ประกอบด้วย ขาว 5N และ เอียสกุล มาชักนำให้เกิดเป็น protocorm-like bodies (plbs) ในอาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สูตร Vacin and Went ที่ประกอบด้วย น้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร เมื่อขึ้นส่วนตายอด/ตาข้างของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายทั้ง 3 พันธุ์ เกิดเป็น plbs จากนั้นเพิ่มปริมาณ plbs ให้เพียงพอและชักนำให้เกิดเป็นต้นกล้วยไม้ที่มีขนาด 1 เซนติเมตร เพื่อนำมาทดสอบตามกรรมวิธีที่กำหนด ระยะเวลาการทดสอบ 4 เดือน

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD มีจำนวน 5 ซ้ำ มีปัจจัยหลัก คือ ชนิดแสงจำนวน 3 ชนิด ปัจจัยรอง คือ สูตรอาหาร จำนวน 4 สูตรอาหาร บันทึกผลน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น ความสูงต้น ความยาวราก พร้อมถ่ายภาพประกอบ มีรายละเอียดของสูตรอาหารดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 สูตรอาหาร VW (control)
- กรรมวิธีที่ 2 สูตรอาหาร VW + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กรรมวิธีที่ 3 สูตรอาหาร VW + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กรรมวิธีที่ 4 สูตรอาหาร VW + BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 2) ศึกษาสภาพเครียด ต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ร่วมกับชนิดแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน ในกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาวสนาน ขาว 5N และ เอียสกุล

นำต้นกล้วยไม้พันธุ์ขาว 5N และเอียสกุล ที่มีความสูงของต้นประมาณ 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงทดสอบในสูตรอาหารและสภาพแสงที่กำหนด ระยะเวลา 4 เดือน วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD มีจำนวน 5 ซ้ำ มีปัจจัยหลัก คือ ชนิดแสงจำนวน 3 ชนิด ปัจจัยรอง คือ สูตรอาหาร จำนวน 3 สูตรอาหาร บันทึกผลน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น ความสูงต้น ความยาวราก พร้อมถ่ายภาพประกอบ มีรายละเอียดของสูตรอาหารดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 สูตร VW (control)
- กรรมวิธีที่ 2 สูตร VW + PEG 5%
- กรรมวิธีที่ 3 สูตร VW + PEG 10%

#### 3) การตรวจหาปริมาณสารสำคัญ Moscatilin

การเตรียมสารสกัดของตัวอย่างกล้วยไม้ เพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Ultra-High Liquid Chromatograph (UHPLC)

นำตัวอย่างกล้วยไม้สับให้ละเอียด จากนั้นนำไปอบที่ 50°C เป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง บดให้ละเอียด เก็บไว้ในภาชนะที่แห้งและสะอาด

#### การสกัด

สกัดตัวอย่าง 0.5 g ด้วย methanol 5 ml โดยใช้วิธี ultrasonic extraction เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนสารละลายส่วนใสกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22 µm ก่อน นำไปฉีด UHPLC

#### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายมาตรฐาน moscatilin (YAL chemicals, China) ด้วย methanol ให้ได้ความเข้มข้น 0.005 - 1 mg/ml

#### การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ moscatilin

การวิเคราะห์สารประกอบ moscatilin ในสารสกัดกล้วยไม้ ด้วยเครื่อง Ultra High Liquid Chromatograph (UHPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Shimadzu รุ่น Nexera-2 LD-30AD เครื่องตรวจวัดชนิด Photo diode array รุ่น SPD-M20A ระบบฉีดสารอัตโนมัติรุ่น SIL-30AC

#### สภาวะเครื่อง UHPLC

คอลัมน์:	GL Sciences InertSustainSwift C18 (150mm × 2.1mm × 1.9 µm)
อุณหภูมิคอลัมน์:	30 °C
อัตราการไหล:	0.4 ml/min
ตัวพา:	1.5% acetic acid (ตัวพา A) และ methanol (ตัวพา B)
	ด้วยระบบ gradient :
	0–7 นาที 80% (A) และ 20% (B)
	7–14 นาที 68% (A) และ 32% (B)
	14–17 นาที 80% (A) และ 20% (B)
เครื่องตรวจวัด:	PDA 280 nm
ปริมาตรการฉีด:	5 µl
เวลาที่ใช้:	17 นาที

บันทึกผล ค่าของสาร moscatilin แล้วนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

#### ผลการวิจัย

1) ศึกษาปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ร่วมกับ ชนิดแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน ในกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N และ เอียสกุล

##### 1.1 การทดสอบปริมาณ BA ต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์เอียสกุล

การทดสอบปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และชนิดของแสง LED ต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์เอียสกุล เมื่อเลี้ยงทดสอบในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน ระยะเวลาการทดสอบ 4 เดือน พบว่าปัจจัยด้านแสงมีผลต่อค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของต้นกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล โดยสีแสง LED สีขาวมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดสูงสุด 18.79 กรัม แสง LED สีแดง มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 16.08 กรัม และแสง LED สีน้ำเงินมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดน้อยที่สุด 15.71 กรัม โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ในส่วนปัจจัยด้านสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน พบว่า กล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เอียสกุลที่เพาะเลี้ยงทดสอบในสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาพแสง LED สีขาว จะทำ

ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของต้นสูงสุด 20.60 กรัม (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่พบว่า แสง LED สีขาว จะมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งสูงสุด 1.30 กรัม และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับแสง LED สีอื่นๆ โดยปัจจัยร่วมของ แสง LED สีขาวกับสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 1.50 กรัม (ตารางที่ 2)

การเจริญเติบโตด้านความสูงของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุล พบว่า แสง LED สีขาว และสูตรอาหารเปรียบเทียบกับไม่มีการเติม BA ทำให้ค่าเฉลี่ยความสูงต้นสูงสุดเท่ากับ 2.94 เซนติเมตร โดยต้นมีขนาดใหญ่แตกกอน้อยและมีรากขนาดใหญ่และมีปริมาณรากเกิดขึ้นจำนวนมากอย่างชัดเจน (ภาพที่ 1) และการเลี้ยงในสภาพแสง LED สีน้ำเงินมีค่าเฉลี่ยด้านความสูงต้นน้อยที่สุด คือ 2.32 เซนติเมตร โดยในสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีค่าเฉลี่ยความสูงต้นน้อยที่สุดเท่ากับ 2.01 เซนติเมตร ทั้งปัจจัยด้านแสงและสูตรอาหาร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 3) แต่เมื่อเปรียบเทียบความสูงของต้นจะเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน (ภาพที่ 1) ในส่วนความยาวของรากพบว่า การเลี้ยงในแสง LED สีแดงจะทำให้ค่าเฉลี่ยความยาวรากสูงสุดเท่ากับ 8.26 เซนติเมตร โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง กับแสง LED สีขาว และสีน้ำเงิน การเลี้ยงต้นกล้วยไม้เอียสกุลในสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสง LED สีแดง จะมีค่าเฉลี่ยความยาวรากสูงสุด เท่ากับ 8.86 เซนติเมตร ในขณะที่การเลี้ยงต้นเอียสกุลในสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในแสง LED สีน้ำเงินจะทำให้ค่าเฉลี่ยความยาวรากน้อยที่สุดเท่ากับ 5.36 เซนติเมตร (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับ คำานูญ (2542) ที่รายงานว่า ช่วงความยาวแสง (day length) ชนิดแสง (light quality) และความเข้มแสง (light intensity) ล้วนมีความสำคัญต่อพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลอง ชนิดของแสงสีต่างๆ มีความสำคัญต่อการเจริญของพืชที่เลี้ยง เช่น แสงสีส้มแดงมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช เพราะแสงสีส้มแดงเกี่ยวข้องกับการทำงานของ Phytochrome การสะสมไซโตไคนิน เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ และเกี่ยวข้องกับการกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยแสงสีแดงส่งเสริมการเกิดราก แสงสีน้ำเงิน มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง คือจะลดการสังเคราะห์ DNA มีผลต่อการเพิ่มการผลิตฟีนอลิก (phenolic compound) และเพิ่มการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน (Gibberellic) ซึ่งทำให้รบกวนการทำงานของสารควบคุมการเจริญเติบโต

การทดสอบปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ร่วมกับชนิดแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน ในกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N เมื่อเลี้ยงทดสอบในอาหารที่มี BA ความเข้มข้นต่างๆ และแสง LED ทั้ง 3 สี ระยะเวลา 4 เดือน พบว่า ต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N ที่เพาะเลี้ยงในแสง LED สีขาวจะมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดสูงสุดเท่ากับ 16.87 กรัม การเลี้ยงในแสง LED สีน้ำเงินจะมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดน้อยที่สุดเท่ากับ 11.17 กรัม โดยปัจจัยด้านแสงจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ในขณะที่ปัจจัยด้านสูตรอาหารไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อพิจารณาปัจจัยร่วมกัน พบว่า การเลี้ยงต้นกล้วยไม้พันธุ์ขาว 5N ในสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสง LED สีขาวจะทำให้มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดสูงสุดเท่ากับ 19.97 กรัม (ตารางที่ 5) สอดคล้องกับค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของกล้วยไม้พันธุ์ขาว 5N ที่พบว่า แสง LED สีขาวจะมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 1.06 กรัม และแสง LED สีน้ำเงินให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งน้อยที่สุดเท่ากับ 0.67 กรัม โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 6) ในด้านความสูงของต้นของกล้วยไม้พันธุ์ขาว 5N พบว่า ปัจจัยด้านแสงและสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ไม่มีผลต่อความสูงต้น โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ค่าเฉลี่ยความสูงของต้นจะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.08 เซนติเมตร ในการเลี้ยงบนสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสง LED สีแดง (ตารางที่ 7) เช่นเดียวกับความยาวของรากในกล้วยไม้พันธุ์ขาว 5N ที่พบว่าปัจจัยด้านแสงและสูตรอาหาร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่า การเลี้ยงในแสง LED สีขาว มีค่าเฉลี่ยความยาวรากสูงสุด 11.71 เซนติเมตร ส่วนการเลี้ยงในแสง LED สีน้ำเงินจะมีค่าเฉลี่ยความยาวรากน้อยที่สุด 9.81 เซนติเมตร ปัจจัยด้านสูตรอาหารพบว่า สูตรอาหารที่มี BA ความ

เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ค่าเฉลี่ยความยาวรากมากที่สุด 11.72 เซนติเมตร และในสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในแสง LED สีแดง จะมีค่าเฉลี่ยความยาวรากน้อยที่สุดเท่ากับ 8.80 เซนติเมตร (ตารางที่ 8) รากมีลักษณะเป็นกระจุกสั้นๆ อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นๆ (ภาพที่ 2)

#### การตรวจสอบปริมาณสาร ปริมาณสาร Moscatilin โดยวิธีการ HPLC

การวิเคราะห์หาปริมาณสาร Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลและขาว 5N ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA ปริมาณ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเลี้ยงในสภาพแสง LED จำนวน 3 สี คือ ขาว (control) สีแดง และสีน้ำเงิน ด้วยวิธีการ HPLC พบว่า การเลี้ยงต้นกล้วยไม้ในสภาพแสง LED สีขาวของสูตรอาหารที่มีปริมาณ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลมีปริมาณสารสำคัญ moscatilin สูงสุดมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.0902 g/100 g sample ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างสภาพแสง LED กับสูตรอาหารที่มีปริมาณ BA ต่างๆ จะให้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าปัจจัยของสภาพแสง LED จำนวน 3 สี คือ ขาว แดงและน้ำเงินเป็นปัจจัยหลักที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งต่อปริมาณสารสำคัญ moscatilin การเลี้ยงต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลในแสง LED สีขาว ซึ่งใช้เป็นแสงเปรียบเทียบ (control) จะให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารสำคัญ moscatilin สูงสุดเท่ากับ 0.0412 g/100 g sample (ตารางที่ 9) ในขณะที่กล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ขาว 5N พบปริมาณสารสำคัญ moscatilin มีค่าเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 0.0092 g/100 g sample ในอาหารที่มี BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสงสีน้ำเงิน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติทั้งในด้านของปัจจัยหลักของสภาพแสง LED ทั้ง 3 สี และปัจจัยรองคือ สูตรอาหารที่มีปริมาณ BA ความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 10) พบว่าการเลี้ยงต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายทั้ง 2 พันธุ์ ในอาหารที่มี BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาพแสงสีน้ำเงิน เมื่อตรวจหาปริมาณสาร moscatilin จะมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้ (ตารางที่ 9 และ 10) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ moscatilin ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลและพันธุ์ขาว 5N พบว่า ในพันธุ์เอี้ยสกุลจะมีปริมาณสารสำคัญ moscatilin ที่สูงกว่าพันธุ์ขาว 5N อย่างชัดเจน เมื่อเลี้ยงในสภาพแสง LED สีขาวและ สีแดง แต่ในแสง LED สีน้ำเงิน จะพบว่าพันธุ์ขาว 5N มีปริมาณสาร moscatilin สูงกว่าพันธุ์เอี้ยสกุล (ภาพที่ 3) สอดคล้องกับ หทัยรัตน์และคณะ (2563) รายงานการกระตุ้นสาร curcumin ในขมิ้นชัน โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้ปริมาณสารสำคัญ curcumin สูงสุด เท่ากับ 3.0639 mg/L (หรือ 0.306% ของปริมาณน้ำหนักแห้ง 10 mg) ในการศึกษาการใช้แสง LED สีต่างๆ มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมปริมาณสารสำคัญ curcumin ของ ขมิ้นชัน พบว่าแสง LED สีน้ำเงินมีผลต่อสารสำคัญ curcumin จะให้มิตค่าปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 2.4487 mg/L (หรือ 0.2448% ของปริมาณน้ำหนักแห้ง 10 mg) Adisa *et al.*, (2017) รายงานว่าการใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต BA มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นเปปเปอร์มินต์ (*Mentha piprita*) และการใส่ BA ที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้มีการผลิตสารประกอบกลุ่ม Phenolic เพิ่มขึ้นด้วย เช่นเดียวกับ ซึ่งสารสำคัญ Moscatilin อยู่ในกลุ่ม bibenzyl ซึ่งเป็นสารที่มีหมู่ phenol ในโครงสร้าง (Tsai *et al.*, 2010)

#### **2) ศึกษาสภาพเครียด ต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ร่วมกับชนิดแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน ในกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาวสนาน ขาว 5N และ เอี้ยสกุล**

การทดสอบปริมาณสาร Polyethylene glycol (PEG 6000) ความเข้มข้น 0 5% และ 10% ในอาหารเพื่อสร้างสภาพเครียดให้กับกล้วยไม้ ร่วมกับการเลี้ยงในสภาพแสงต่างๆ กันประกอบด้วยแสง LED สีขาว สีแดง และ สีน้ำเงิน ในกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์เอี้ยสกุล และพันธุ์ขาว 5N พบว่า กล้วยไม้พันธุ์เอี้ยสกุลเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร VW (control) แสง LED สีขาว มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดสูงสุด 11.02 กรัม โดยปัจจัยด้านแสงจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และปัจจัยด้านสูตรอาหารจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 11) เช่นเดียวกับค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งสูงสุด 1.02 กรัม ในอาหารสูตร VW ร่วมกับแสง LED สีขาว ซึ่งปัจจัยทั้งสองคือ

สูตรอาหารและแสงจะมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 12) ด้านความสูงของต้นและความยาวของราก พบว่า อาหารสูตร VW (control) ร่วมกับแสง LED สีแดง ต้นจะมีค่าความสูงของต้นเฉลี่ยสูงสุด 5 เซนติเมตร ความยาวของรากสูงสุด 9.36 เซนติเมตร และในสูตรอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 10% จะทำให้ค่าเฉลี่ยความสูงของต้นและความยาวของรากน้อยที่สุด ต้นกล้วยไม่มีลักษณะแคระแกร็น รากเกิดจำนวนน้อยและสั้น (ภาพที่ 4) ปัจจัยที่มีผลกับความสูงของต้นกล้วยไม้พันธุ์เอเซียสกุลคือ ปัจจัยของสูตรอาหารที่พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และปัจจัยด้านแสงจะให้ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 13) สำหรับความยาวของรากนั้น พบว่า ปัจจัยของสูตรอาหารและแสงมีผลต่อความยาวของรากทำให้มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 14) สอดคล้องกับรายงานของ Tanaka *et al.*, 1998 ได้ศึกษาแสงสีน้ำเงินและสีแดงในการเลี้ยงกล้วยไม้ *Cymbidium* ภายใต้โรงเรือนควบคุม พบว่าแสงสีน้ำเงินจะลดการเจริญเติบโตของใบ

เมื่อนำต้นกล้วยไม้พันธุ์เอเซียสกุลที่ได้รับการกระตุ้นในอาหารสูตรต่างๆ ร่วมกับการให้แสง 3 ชนิด ไปตรวจสอบปริมาณสารสำคัญ moscatilin ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า ในสูตรอาหาร VW ร่วมกับ PEG 5% ในแสง LED สีน้ำเงินมีค่าเฉลี่ยสารสำคัญสูงสุด 2.30 g/100 sample ซึ่งปัจจัยด้านสูตรอาหารที่มีการเติม PEG เพื่อสร้างความเครียดให้แก่กล้วยไม้มีผลต่อปริมาณสารสำคัญ moscatilin อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ สำหรับปัจจัยด้านแสง LED สีแดงและสีน้ำเงินมีผลต่อปริมาณสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอเซียสกุลมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 15) เช่นเดียวกับหทัยรัตน์และคณะ (2563) รายงานการใช้สาร Polyethyleneglycol (PEG) ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของขม้นชัน และทำให้เฉลี่ยปริมาณสาร curcumin สูงสุด 3.825 mg/l (0.3825% ของปริมาณน้ำหนักแห้ง 10 mg) ในการกระตุ้นสาร curcumin แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

การทดสอบกระตุ้นสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์ขาว 5N พบว่า การเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ในสูตรอาหาร VW ร่วมกับ LED สีขาว ซึ่งใช้เป็นสิ่งเปรียบเทียบกับ (control) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดสูงสุด 8.75 กรัม ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งสูงสุด 0.75 กรัม โดยปัจจัยที่มีผลต่อค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ คือปัจจัยของสูตรอาหาร (ตารางที่ 16 และ 17) ส่วนความสูงของต้นและความยาวของราก พบว่า สูตรอาหาร VW (control) ร่วมกับแสง LED สีแดง ทำให้ค่าเฉลี่ยความสูงต้นสูงสุด 3.44 เซนติเมตร ความยาวรากสูงสุด 7.7 เซนติเมตร ปัจจัยหลักของสูตรอาหารที่มีการเติม PEG มีผลต่อความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งต่อความสูงต้นและความยาวของกล้วยไม้พันธุ์ขาว 5N ทำให้ความสูงของต้นกล้วยไม้และความยาวของรากรวมทั้งจำนวนของรากลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่มีการเติม PEG (ภาพที่ 5) ในขณะที่ปัจจัยด้านแสงไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 18 และ 19) การตรวจสอบปริมาณสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์ขาว 5N พบว่า แสง LED สีน้ำเงินร่วมกับการเลี้ยงในสูตรอาหาร VW ที่มี PEG 10% จะมีค่าเฉลี่ยสารสำคัญ moscatilin สูงสุด 0.50 g/ 100 sample การเติม PEG เพื่อสร้างสภาพเครียดให้กล้วยไม้พันธุ์ขาว 5N มีผลให้ปริมาณสารสำคัญ moscatilin สูงขึ้นได้ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 20) เมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ moscatilin ของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์พบว่า พันธุ์เอเซียสกุลจะตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PEG ร่วมกับการใช้แสง LED สีแดงและสีน้ำเงิน ได้มากกว่าพันธุ์ขาว 5N (ภาพที่ 6) ปัจจัยหลักของสูตรอาหารควรคำนึงถึงการเลือกใช้ความเข้มข้นของสาร PEG ซึ่งสามารถกระตุ้นปริมาณสารสำคัญได้แต่หากมีการใช้ความเข้มข้นที่สูงจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้น ปัจจัยด้านแสงเป็นปัจจัยรองแต่พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติของต้นกล้วยไม้เช่น และพันธุ์กล้วยไม้ยังคงเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่ง ดังนั้นในการกระตุ้นปริมาณสารสำคัญ moscatilin จึงควรทำการศึกษหาปัจจัยที่เหมาะสมในกล้วยไม้แต่ละพันธุ์



## อภิปรายผล

กาตรอบสนองต่อแสง LED ที่แตกต่างกันของพันธุ์เอียสกุลและพันธุ์ขาว 5N ในการสะสมปริมาณสารสำคัญ Moscatilin เกิดจากพันธุกรรมที่ต่างกัน จึงมีความต้องการแสงที่ต่างกันไประหว่างพันธุ์ของกล้วยไม้ สอดคล้องกับ Hina *et al.*, (2016) ศึกษาความสัมพันธ์ความแตกต่างชนิดของแสงในการเพิ่มปริมาณการสะสม และการผลิตสารสำคัญ antioxidant ในการเลี้ยงแคลลัสของพืชสมุนไพрсสำคัญ *Prunella vulgaris* L. พบว่าการเลี้ยงแคลลัสภายใต้แสงสีน้ำเงิน จะทำให้ค่า phenolics contents (TPC) สูงสุด 23.9 mg/g-DW และมีปริมาณ flavonoids content (TFC) เท่ากับ 1.65 mg/g-DW แสงสีน้ำเงินมีผลต่อ photosynthetic capacity จึงทำให้มีสารชีวมวลเพิ่มขึ้น (Hogewoning *et al.*, 2010) ส่วนการเจริญเติบโตของต้นต้องการแสง LED สีขาวทั้งสองพันธุ์ เนื่องจาก LED สีขาว เป็นช่วงแสงกว้างที่ครอบคลุม ความยาวช่วงแสง 420-750 นาโนเมตร เป็นช่วงแสงที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพืช (คำณูณ, 2542)

การใช้ PEG เป็นสิ่งกระตุ้นให้เกิดการสะสมปริมาณสารสำคัญ Moscatilin มีแนวโน้มที่ทำให้สารสำคัญเพิ่มขึ้น ได้จากรายงานของ Wang *et al.*, 2020 ได้ศึกษาสารทุติยภูมิชนิดฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ในเซลล์แขวนลอยของ *S. baicalensis* พบว่า ความเครียดที่เกิดจากการใช้ PEG ส่งเสริมให้เกิดการสังเคราะห์และการสะสมของฟลาโวนอยด์ได้ เมื่อใช้ PEG ความเข้มข้น 4% ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ควรเลือกใช้ PEG ในปริมาณที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดเนื่องจาก PEG เป็นสารที่ใช้ในการสร้างสภาวะเครียดของพืชในห้องปฏิบัติการทำให้น้ำไม่สามารถซึมผ่านเมมเบรนได้ มีผลทำให้ osmotic potential ลดลงทำให้พืชได้รับสภาวะเครียดมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพืช (คำณูณ, 2542)

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การทดสอบแสง LED สีขาว แดง และน้ำเงิน ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA เพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 2 พันธุ์ คือ เอียสกุล และขาว 5N พบว่า แสงเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้น และสูตรอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA เป็นปัจจัยร่วม ซึ่งจะมีผลต่อปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ที่เกิดขึ้น พันธุ์เอียสกุลจะตอบสนองต่อแสง LED สีขาว ร่วมกับ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 mg/l ส่วนพันธุ์ขาว 5N จะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในแสง LED สีขาว ร่วมกับสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 1 mg/l แต่ปริมาณสารสำคัญ Moscatilin จะพบได้มากเมื่อเลี้ยงในแสง LED สีน้ำเงิน ร่วมกับสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 2 mg/l ดังนั้นการเลือกใช้หลอด LED สีขาวซึ่งหาซื้อได้ง่ายและมีราคาถูกในปัจจุบันจึงเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของต้นกล้วยทั้ง 2 พันธุ์ และเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เอียสกุล ส่วนพันธุ์ขาว 5N ควรเลือกใช้หลอด LED สีน้ำเงินเพื่อการกระตุ้นปริมาณสารสำคัญ

การทดสอบสาร PEG ร่วมกับ LED สีต่างๆ ในการกระตุ้นสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุล และพันธุ์ขาว 5N พบว่า สูตรอาหารที่มี PEG มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้และปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ที่เกิดขึ้น จะเป็นปัจจัยรองในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล ส่วนในพันธุ์ขาว 5N พบว่า ปัจจัยของสูตรอาหารและแสงไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin โดยพบว่าในแสง LED สีน้ำเงิน ร่วมกับสูตรอาหารที่มี PEG 10% จะมีปริมาณสารสำคัญ Moscatilin สูงสุด การเลือกใช้สาร PEG ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้จึงควรเลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในแต่ละพันธุ์

### การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำข้อมูลของปัจจัยที่กระตุ้นการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในเชิงอุตสาหกรรม สามารถนำไปเป็นแนวทางในการผลิตสารสำคัญชนิดอื่นๆ ในกล้วยไม้ หรือการประยุกต์ใช้ในการผลิตสารสำคัญจากพืชสมุนไพรชนิดอื่นๆ ต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

- คำคุณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 162 หน้า.
- พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์, บุญชู ศรีตุลารักษ์, วิชชุดา ธนกิจเจริญพัฒน์ และ บุญศรี องค์พิพัฒนกุล. 2560. รายงานการวิจัย “การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลในกล้วยไม้สกุลเดนโดรเบียมยี่สิบชนิดโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง”. โครงการความร่วมมือด้านการวิจัยและพัฒนากล้วยไม้สกุล *Dendrobium* ที่มีศักยภาพเป็นสมุนไพร ประจำปีงบประมาณ 2560. 23 หน้า.
- ปรางนุช เลิศหิรัญย์. 2561. สินค้ากล้วยไม้. กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, สำนักส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตรและอุตสาหกรรม. [http://www.ditp.go.th/ditp\\_pdf.php?filename=contents\\_attach/244615/244615](http://www.ditp.go.th/ditp_pdf.php?filename=contents_attach/244615/244615).
- หทัยรัตน์ อุไรรงค์ ภรณ์ สว่างศรี ภูรินทร์ วณิชชานันท์ กัญฐวุฒิ บุญมี และกฤตพร รำจวนเกียรติ. 2563. การเพิ่มประสิทธิภาพการสะสมสารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน. ใน รายงานการวิจัยและการพัฒนาการวิจัยการเกษตร ฉบับสมบูรณ์ รหัสโครงการ CRP6105020620. สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), กรุงเทพฯ. 79 หน้า
- Akula R., and G.A. Ravishankar. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6(11) : 1720-1731.
- Chen X, Wang F, Wang Y, Li X, Wang A, Wang C, Guo S. 2012. Discrimination of the rare medicinal plant *Dendrobium officinale* based on naringenin, bibenzyl, and polysaccharides. *Sci China Life Sci.* 55(12): 1092-1099.
- Chuakul, W. 2002. Ethnomedical uses of Thai Orchidaceous plants. *Mahidol Univ J Pharm Sci* 29(3-4): 41-45.
- Hina F., B. H. Abbasi, N. Ahmad, S. S. Ali, F. Akbar and F. Kanwal. 2016. Correlation of different spectral light with biomass accumulation and production of antioxidant secondary metabolites in callus culture of medicinally important *Prunella vulgaris* L. *J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 159 : 1-7.
- Hogewoning, S.W.H., Govert, T., Hans, M., Hendrick, P., Wim V.I. and Jeremy, H., 2010, Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light, *J. Exp. Bot.* 61: 3107-3117.
- Kowitdamrong, A., P. Chanvorachote, B. Sritularak and V. Pongrakhananon. 2013. Moscatilin Inhibits Lung Cancer Cell Motility and Invasion via Suppression of Endogenous Reactive Oxygen Species. *BioMed Research International.* 765894.
- Michaud, M., E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset and E. Peyrin. 2003. A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (28): 8672-8679.
- Tsai A.C., S. L. Pan, C. H. Liao, J. H. Guh, S. W. Wang, H. L. Sun, Y. N. Liu, C. C. Chen, C. C. Shen, Y. L. Chang and C. M. Teng. 2010. Moscatilin, a bibenzyl derivative from the India

orchid *Dendrobium loddigesii*, suppresses tumor angiogenesis and growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 292:163–170.

Wang, B., T.X. Zhang., H.W. Du., Q. Zhao and X.C. Meng. 2020. Effect of PEG on Secondary Metabolites in Suspension Cell of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Acta Medica Mediterranea.* 36: 2307-2312.

คณะวิทยาศาสตร์



## ตารางและภาพ

**ตารางที่ 1** แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด (กรัม) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์เอเซียสกุล ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	17.23	15.79	14.10	15.88 b <sup>1/</sup>	
VW + BA 1 mg/l	20.60	16.80	17.34	18.24 a	
VW + BA 2 mg/l	19.18	15.27	16.08	16.83 ab	
VW + BA 3 mg/l	18.18	16.48	14.85	16.49 ab	
mean	18.79 a	16.08 b	15.71 b		**
F-test					ns
c.v (%)	21.77				

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 2** แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง (กรัม) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์เอเซียสกุล ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	น้ำหนักแห้ง (กรัม)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	1.27	0.97	0.81	1.03 b <sup>1/</sup>	
VW + BA 1 mg/l	1.50	1.03	0.99	1.17 a	
VW + BA 2 mg/l	1.26	0.83	0.86	0.98 b	
VW + BA 3 mg/l	1.20	0.87	0.83	0.96 b	
mean	1.30 a	0.92 b	0.87 b		**
F-test					**
c.v (%)	19.37				

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 3** แสดงค่าเฉลี่ยความสูงต้น (cm.) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์เอี้ยสกุล ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	ความสูงต้น (cm.)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	2.94	2.77	2.33	2.71 a <sup>1/</sup>	
VW + BA 1 mg/l	2.51	2.77	2.66	2.64 a	
VW + BA 2 mg/l	2.93	2.10	2.01	2.35 a	
VW + BA 3 mg/l	2.46	2.27	2.32	2.34 a	
mean	2.71 a	2.47 ab	2.32 b		ns
F-test					ns
c.v (%)	29.33				

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 4** แสดงค่าเฉลี่ยความยาวราก (cm.) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์เอี้ยสกุล ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	ความยาวราก (cm.)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	7.90	8.80	7.29	8.07 a <sup>1/</sup>	
VW + BA 1 mg/l	7.69	7.76	6.40	7.28 a	
VW + BA 2 mg/l	7.72	7.62	5.36	6.90 a	
VW + BA 3 mg/l	8.62	8.86	6.00	7.82 a	
mean	7.98 a	8.26 a	6.17 b		**
F-test					ns
c.v (%)	35.71				

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 5** แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด (กรัม) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	16.75	15.24	11.40	14.46 ab <sup>1/</sup>	
VW + BA 1 mg/l	19.97	15.66	10.11	15.24 a	
VW + BA 2 mg/l	16.80	14.93	13.16	14.96 a	
VW + BA 3 mg/l	13.98	11.65	10.03	11.88 b	
mean	16.87 a	14.37 b	11.17 c		**
F-test				ns	
c.v (%)	26.30				

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 6** แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง (กรัม) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	น้ำหนักแห้ง (กรัม)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	1.18	0.76	0.66	0.86 a <sup>1/</sup>	
VW + BA 1 mg/l	1.12	0.91	0.61	0.88 a	
VW + BA 2 mg/l	1.03	0.82	0.77	0.87 a	
VW + BA 3 mg/l	0.91	0.65	0.67	0.74 a	
mean	1.06 a	0.78 b	0.67 b		**
F-test				ns	
c.v (%)	22.37				

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 7** แสดงค่าเฉลี่ยความสูงต้น (cm.) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	ความสูงต้น (cm.)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	2.84	2.48	2.30	2.54 a <sup>1/</sup>	
VW + BA 1 mg/l	1.86	3.34	2.54	2.58 a	
VW + BA 2 mg/l	3.02	3.08	2.64	2.91 a	
VW + BA 3 mg/l	2.24	2.58	2.46	2.42 a	
mean	2.49 a	2.87 a	2.48 a		ns
F-test					ns
c.v (%)	50.32				

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 8** แสดงค่าเฉลี่ยความยาวราก (cm.) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	ความยาวราก (cm.)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	9.52	9.04	9.26	9.27 a	
VW + BA 1 mg/l	10.62	12.58	10.28	11.16 a	
VW + BA 2 mg/l	13.38	12.18	9.62	11.72 a	
VW + BA 3 mg/l	13.32	8.80	10.1	10.74 a	
mean	11.71 a	10.65 a	9.81 a		ns
F-test					ns
c.v (%)	30.63				

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 9** การตรวจหาปริมาณสารสำคัญ moscatilin (g/100 g sample) ของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เอี้ยสกุลในอาหารที่มี BA 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสภาพแสง LED คือ ขาว แดง และน้ำเงิน โดยเทคนิค HPLC

สูตรอาหาร	สภาพแสง LED			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (Control)	0.0567	0.0105	0.0050	0.0241 ab	
VW + BA 1 mg/l	0.0902	0.0038	ND	0.0313 a	
VW + BA 2 mg/l	0.0095	0.0060	0.0030	0.0061 bc	
VW +BA 3 mg/l	0.0086	0.0020	0.0015	0.0040 c	
mean	0.0412 a	0.0055 b	0.0025 b		**
F-test				*	
c.v.(%)	92.38				

\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ND : not detected

**ตารางที่ 10** การตรวจหาปริมาณสารสำคัญ moscatilin (g/100 g sample) ของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ขาว 5N ในอาหารที่มี BA 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสภาพแสง LED คือ ขาว แดง และน้ำเงิน โดยเทคนิค HPLC

สูตรอาหาร	สภาพแสง LED			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (Control)	0.0020	0.0028	0.0018	0.0022	
VW + BA 1 mg/l	0.0026	0.0016	ND	0.0014	
VW + BA 2 mg/l	0.0011	0.0018	0.0092	0.0025	
VW +BA 3 mg/l	0.0024	0.0019	0.0040	0.0021	
mean	0.0020	0.0020	0.0021		ns
F-test				ns	
c.v.(%)	105.55				

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ND : not detected

**ตารางที่ 11** แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด (กรัม) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์เอี้ยสกุล ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	11.02	4.91	6.35	7.43 a	
VW + PEG 5%	3.87	2.74	1.77	2.79 b	
VW + PEG 10%	1.18	1.14	1.08	1.13 b	
mean	5.36 a	3.06 b	3.06 b		*
F-test					**
c.v (%)	99.26				

\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

**ตารางที่ 12** แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง (กรัม) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์เอี้ยสกุล ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	1.02	0.42	0.51	0.65 a	
VW + PEG 5%	0.41	0.27	0.18	0.29 b	
VW + PEG 10%	0.14	0.18	0.14	0.15 b	
mean	0.52 a	0.30 b	0.28 b		**
F-test					**
c.v (%)	91.26				

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

**ตารางที่ 13** แสดงค่าเฉลี่ยความสูงต้น (cm.) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์เอี้ยสกุล ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และ สีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	3.94	5.00	4.40	4.44 a	
VW + PEG 5%	3.62	3.74	2.44	3.26 b	
VW + PEG 10%	1.10	2.04	1.96	1.70 c	
mean	2.88 b	3.59 a	2.93 b		*
F-test				**	
c.v (%)	44.38				

\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 14** แสดงค่าเฉลี่ยความยาวราก (cm.) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์เอี้ยสกุล ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และ สีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	8.46	9.36	5.32	7.71 a	
VW + PEG 5%	4.44	3.94	2.32	3.56 b	
VW + PEG 10%	2.40	3.02	2.68	2.70 b	
mean	5.10 a	5.44 a	3.44 b		**
F-test				**	
c.v (%)	59.96				

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 15** การตรวจหาปริมาณสารสำคัญ moscatilin (g/100 g sample) ของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เฮียสกุล ในอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ร่วมกับสภาพแสง LED คือ ขาว แดง และน้ำเงิน โดยเทคนิค HPLC

สูตรอาหาร	สภาพแสง LED			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (Control)	0.04	0.17	0.09	0.10 b	
VW + PEG 5%	0.20	0.88	2.30	1.13 a	
VW + PEG 10%	0.74	1.83	1.38	1.28 a	
mean	0.33 b	0.90 ab	1.26 a		*
F-test				**	
c.v.(%)	131.3				

\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 16** แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด (กรัม) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	8.75	7.42	5.27	7.15 a	
VW + PEG 5%	1.21	0.87	1.06	1.05 b	
VW + PEG 10%	0.08	0.23	0.92	0.41 b	
mean	3.34	2.84	2.42		ns
F-test				**	
c.v (%)	118.09				

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



**ตารางที่ 17** แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง (กรัม) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และ สีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	0.74	0.54	0.48	0.59 a	
VW + PEG 5%	0.12	0.07	0.13	0.11 b	
VW + PEG 10%	0.01	0.02	0.14	0.06 b	
mean	0.29	0.21	0.25		ns
F-test				**	
c.v (%)	109.1				

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 18** แสดงค่าเฉลี่ยความสูงต้น (cm.) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และ สีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	ความสูงต้น (cm.)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	3.00	3.44	2.90	3.13 a	
VW + PEG 5%	1.82	1.16	2.04	1.82 b	
VW + PEG 10%	0.80	0.66	0.96	0.80 c	
mean	2.02	1.75	1.96		ns
F-test				**	
c.v (%)	56.48				

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 19** แสดงค่าเฉลี่ยความยาวราก (cm.) ของต้นกล้วยไม้หวายลูกผสมพันธุ์ขาว 5N ที่กระตุ้นปริมาณสาร moscatilin ในอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ในสภาพแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร	ความยาวราก (cm.)			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (control)	7.32	7.7	6.14	7.08 a	
VW + PEG 5%	4.66	2.90	3.88	3.81 b	
VW + PEG 10%	1.40	1.40	1.24	1.34 c	
mean	4.46	4.02	3.75		ns
F-test				**	
c.v (%)	64.90				

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

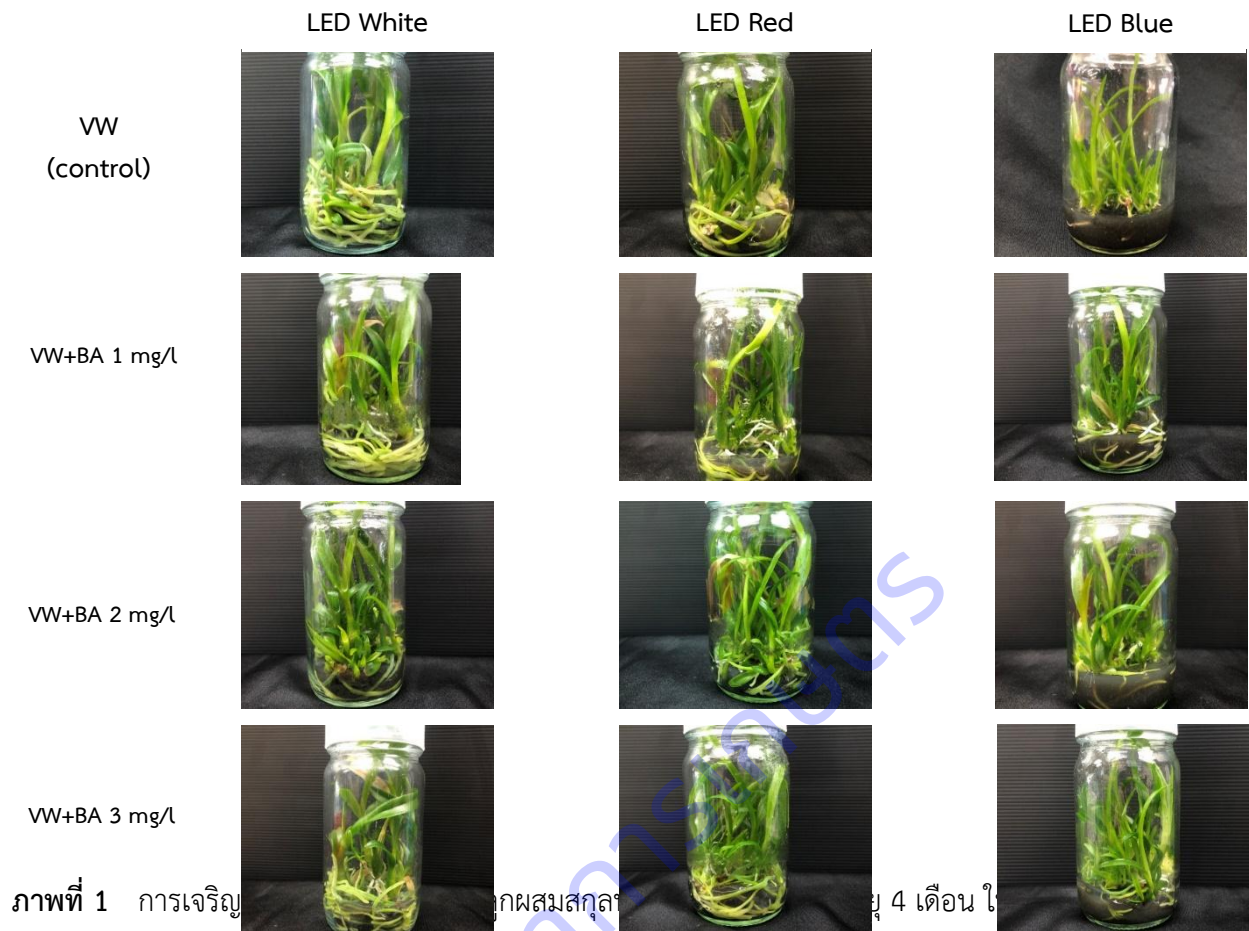
\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

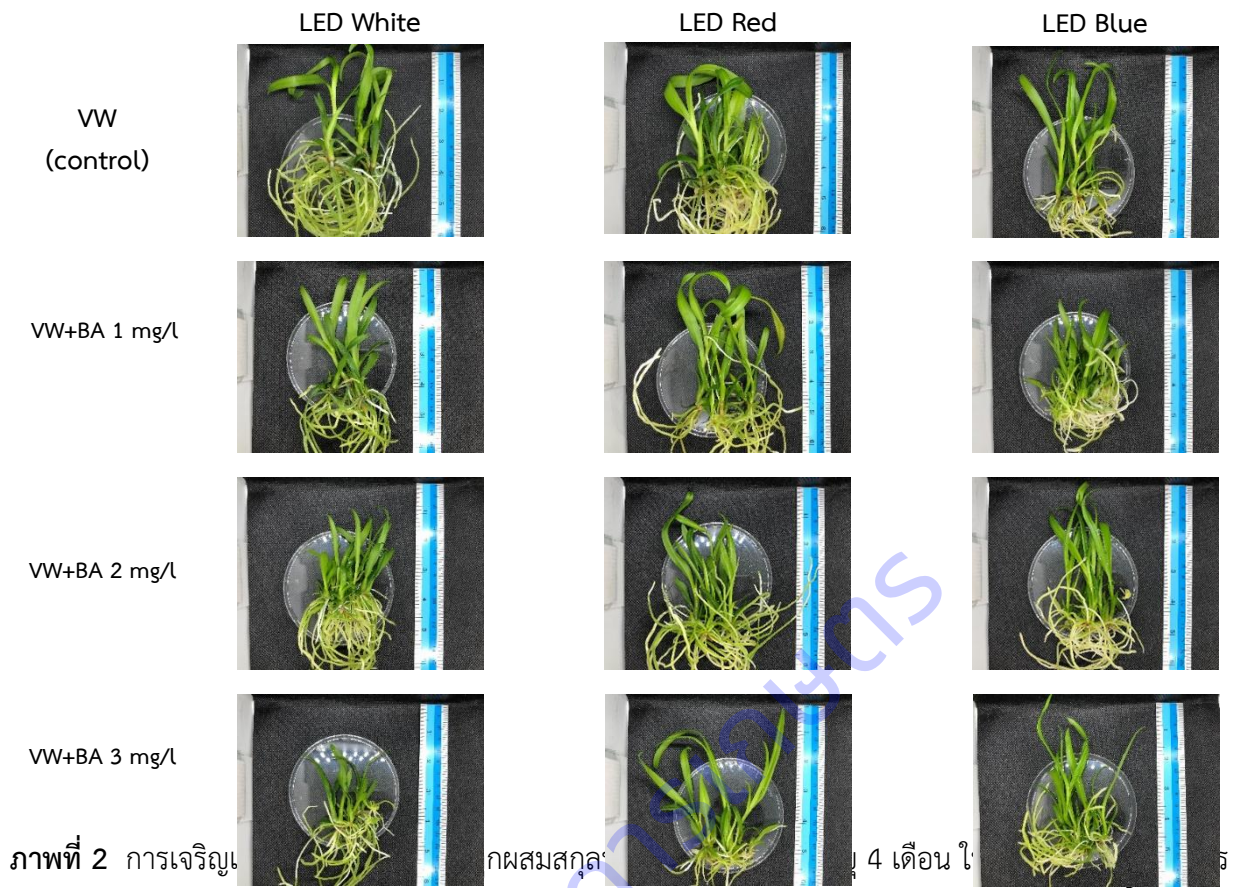
**ตารางที่ 20** การตรวจหาปริมาณสารสำคัญ moscatilin (g/100 g sample) ของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ขาว 5N ในอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ร่วมกับสภาพแสง LED คือ ขาว แดง และน้ำเงิน โดยเทคนิค HPLC

สูตรอาหาร	สภาพแสง LED			mean	F-test
	LED สีขาว (control)	LED สีแดง	LED สีน้ำเงิน		
VW (Control)	0.01	0.02	0.07	0.04	
VW + PEG 5%	0.33	0.16	0.43	0.31	
VW + PEG 10%	0.19	0.17	0.50	0.29	
mean	0.18	0.12	0.33		ns
F-test				ns	
c.v.(%)	170.17				

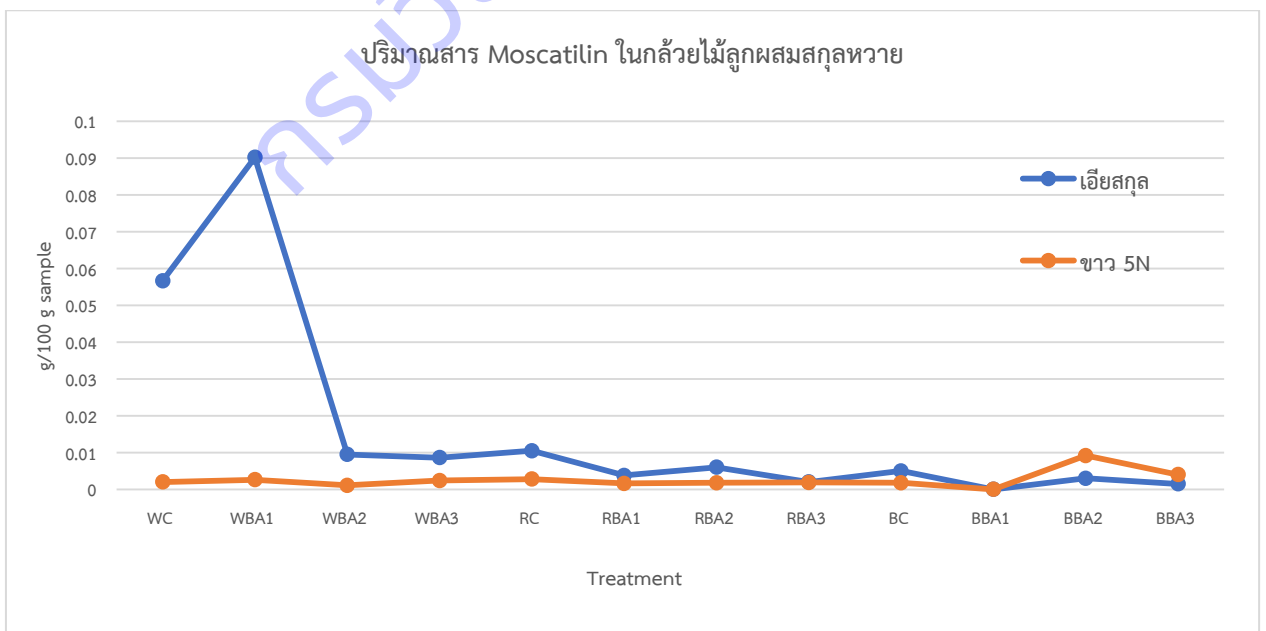
ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของพืชสมศกุลภายใต้การเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้การเพาะเลี้ยงในแสง LED 3 สี คือ ขาว แดง และน้ำเงิน 4 เดือน

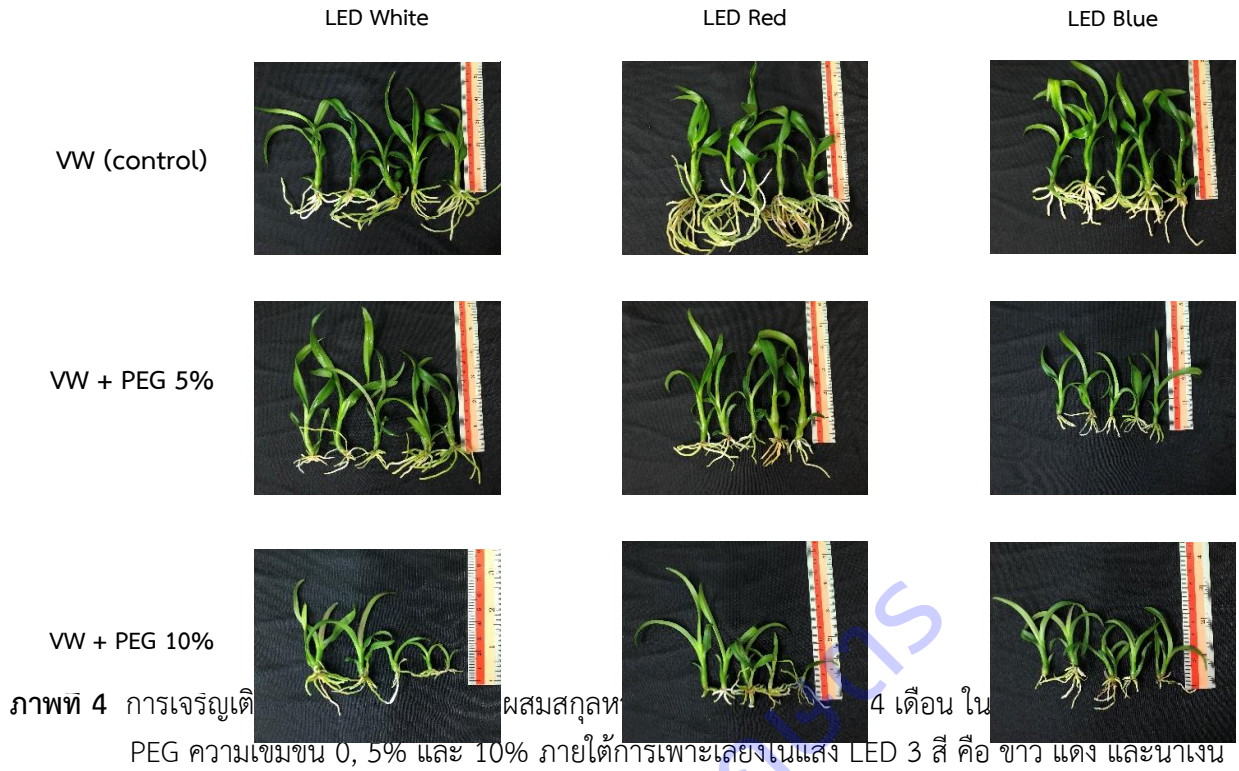


ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของกล้าข้าวผสมสกุลภายใต้การเพาะเลี้ยงในแสง LED 3 สี คือ ขาว แดง และน้ำเงิน ควบคู่กับการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้อายุ 4 เดือน

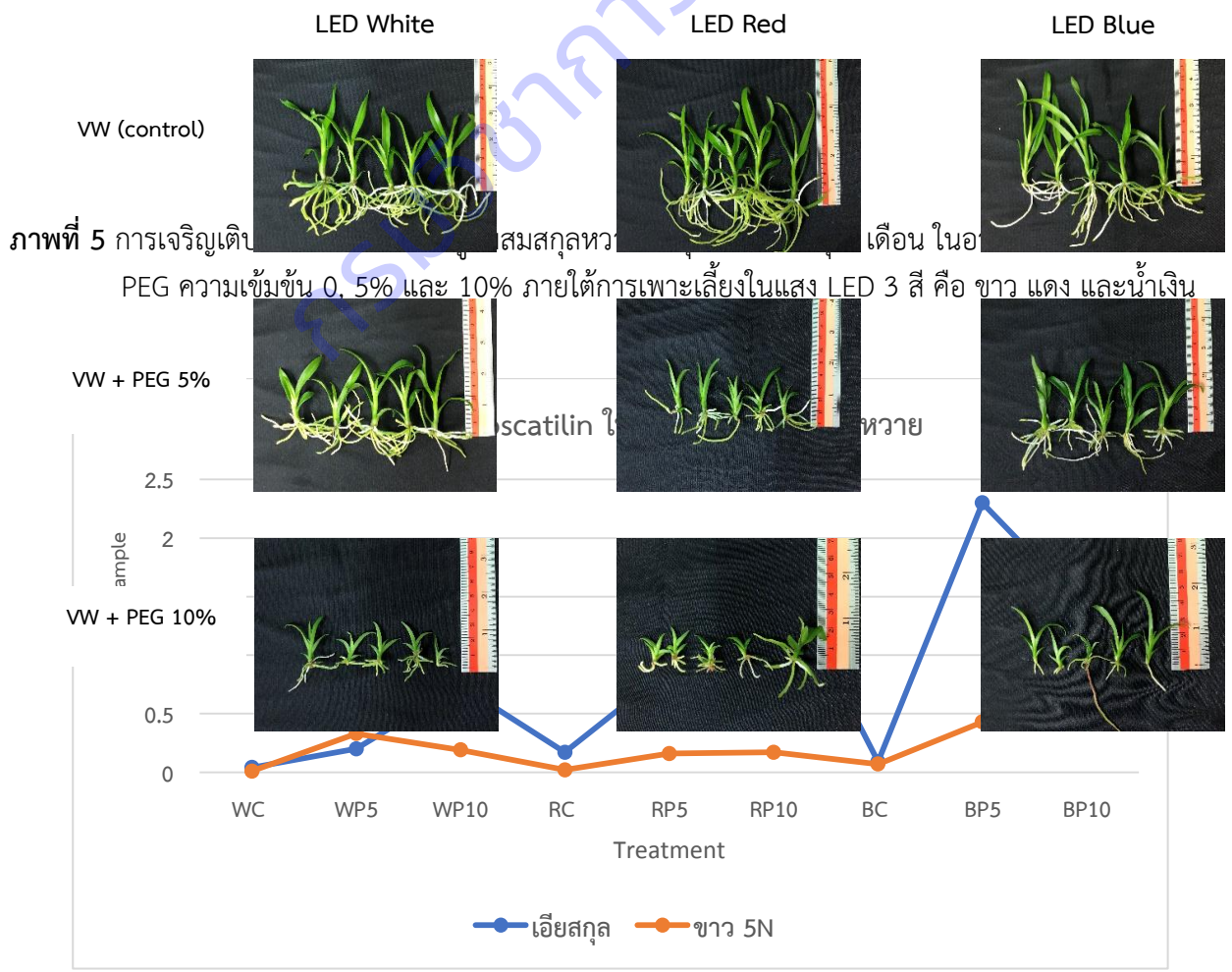


ภาพที่ 3 ปริมาณสารสำคัญ moscatilin ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เอียสกุล และชาว 5N ในการทดสอบสูตรอาหารที่มี BA 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับแสง LED สีขาว แดง และน้ำเงิน





ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตของพืชสมรสกุลหว่าน 4 เดือน ใน PEG ความเข้มข้น 0, 5% และ 10% ภายใต้การเพาะเลี้ยงในแสง LED 3 สี คือ ขาว แดง และน้ำเงิน



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของพืชสมรสกุลหว่าน 4 เดือน ใน PEG ความเข้มข้น 0, 5% และ 10% ภายใต้การเพาะเลี้ยงในแสง LED 3 สี คือ ขาว แดง และน้ำเงิน

ภาพที่ 6 ปริมาณสารสำคัญ moscatilin ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เอี้ยสกุล และ  
ขาว 5N ในการทดสอบสูตรอาหารที่มี PEG 0, 5% และ 10% ร่วมกับแสง LED สีขาว แดง และน้ำเงิน

กรมวิชาการเกษตร

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้สกุลผสมสกุลหวายของไทย  
Development of detection kit for moscatilin in Thai orchid *Dendrobium* species

อัจฉราพรรณ ใจเจริญ ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ อรุณทัย ซาววา ศศิมา เมืองแก้ว  
ดวงพร บุญชัย กฤตยา เพชรผึ้ง และศรีเมฆ ชาวโพงพาง

Adcharapun CHAICHAROEN Phummarin WANICHANANAN Aroonothai SAOWA  
Sasima MUANGKAEW Duangporn BOONCHAI Krittaya PETCHPOUNG and  
Srimek CHOWPONGPANG

คำสำคัญ

ต้านอนุมูลอิสระ, เดนโดเบียม, ดีเอ็นเอแอสตาเมอร์  
antioxidant, *Dendrobium*, DNA aptamer

บทคัดย่อ

สาร Moscatilin อยู่ในกลุ่ม bibenzyl ซึ่ง Moscatilin ถูกพบในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* หลายชนิด เช่น เอื้องชางิ้ว (*Dendrobium pulchellum*) ซึ่งมีผลการศึกษาทางเภสัชวิทยาแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และยังมีรายงานการมีฤทธิ์ต้านการเจริญเซลล์มะเร็ง (anti-angiogenesis) หลายชนิดอีกด้วย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกดีเอ็นเอแอสตาเมอร์ที่จับกับสาร moscatilin เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวายของไทย สารมาตรฐาน moscatilin ถูกนำมาใช้เป็นแอสตาเจนในการคัดเลือกดีเอ็นเอแอสตาเมอร์ด้วยวิธี Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) การทดสอบปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน moscatilin คัดเลือกดีเอ็นเอแอสตาเมอร์ ได้ 7 โคลน คือ MosA6 MosH4 MosH8 MosE6 MosB6 MosA3 และ MosA7 เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี indirect enzyme-linked aptamer assay (ELAA) พบว่า ดีเอ็นเอแอสตาเมอร์ทั้ง 7 โคลน ให้ค่า S/N ratio อยู่ในช่วง 1.03-5.48 เมื่อนำไปพัฒนาวิธี electrochemical aptasensor พบว่า ดีเอ็นเอแอสตาเมอร์โคลน MosH4 และ MosH8 สามารถตรวจจับสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวายได้ จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการตรวจสอบสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวายของไทย ด้วยวิธี electrochemical impedimetric aptasensor ได้ และยังสามารถนำวิธีการตรวจสอบนี้ไปใช้ยังภาคสนามได้อีกด้วย

### Abstract

Moscatilin is a bibenzyl derivative found in Thai orchid such as *Dendrobium pulchellum*, which is “Ueang chang nao” in Thai. Moscatilin was reported to have various pharmacological properties such as anti-inflammatory and antioxidant. Recently, it has shown anticancer activity against many types of cancer. The aim of this study was the selection of DNA aptamers specific to moscatilin for applying in the development of detection kit for moscatilin in Thai orchid *Dendrobium* species. Moscatilin was used as an aptagen to select moscatilin specific DNA aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) method. Seven DNA aptamers, namely MosA6 MosH4 MosH8 MosE6 MosB6 MosA3 and MosA7, were selected from the binding affinity test with moscatilin. By using seven DNA aptamers in indirect ELISA, the result showed the binding activity between an S/N ratio in range of 1.03-5.48. When DNA aptamer clone MosH4 and MosH8 were tested in electrochemical impedimetric aptasensor, the result showed that both clone of DNA aptamers can detect moscatilin in orchid sample. The result from this research can be a model for the detection of moscatilin in Thai orchid *Dendrobium* species based on electrochemical impedimetric aptasensor. Besides, analysis can perform onsite with pre-constructed electrodes and modified aptamer employing a portable EIS set up.



## บทนำ

### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางยาในกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อประโยชน์ในการต้านมะเร็ง ยารักษาโรคเบาหวาน ป้องกันสมองขาดเลือด และเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย สารออกฤทธิ์ Moscatilin จากกล้วยไม้สกุลหวาย พบใน *D. moscatum*, *D. pulchellum* และ *D. loddigesii* สาร Moscatilin อยู่ในกลุ่ม bibenzyl ซึ่งเป็นสารที่มีหมู่ phenol ในโครงสร้าง ซึ่งมีผลการศึกษาทางเภสัชวิทยาแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation), ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant), ฤทธิ์ต้านการเจริญของหลอดเลือดเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (anti-angiogenesis) นอกจากนี้สาร Moscatilin ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ NCI-H187 (มะเร็งปอด) และ KB (มะเร็งเยื่อช่องปาก และยังสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม Moscatilin ถูกพบในกล้วยไม้สกุล Dendrobium หลายชนิด เช่น พบสารสำคัญ moscatilin ซึ่งสกัดได้จาก เอื้องช้างน้าว (*Dendrobium pulchellum*) สามารถยับยั้งการย้ายถิ่นและการบุกรุกของเซลล์ H23 ของเซลล์ปอดได้ นอกจากนี้ปัจจัยภายนอกได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณน้ำ และธาตุอาหาร มีผลต่อการชักนำให้กล้วยไม้ผลิตสารสำคัญ moscatilin อีกด้วย สารสำคัญ moscatilin ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในกล้วยไม้ มักมีความแปรปรวน ซึ่งอาจมีสาเหตุจาก อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณน้ำ และธาตุอาหาร ซึ่งมีผลต่อการชักนำให้กล้วยไม้ผลิตสารสำคัญ moscatilin ส่งผลให้สารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้มีปริมาณไม่สม่ำเสมอในแต่ละครั้งของการผลิต เมื่อนำกล้วยไม้ดังกล่าวไปใช้เป็นยา จะทำให้การรักษาล้มเหลวได้

สำหรับกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่มีการปลูกเป็นการค้าในประเทศไทยได้มีการศึกษาปริมาณสารสำคัญ Moscatilin พบสารดังกล่าวในกล้วยไม้หวายลูกผสมสีขาวได้แก่ ขาว 5N 0.04547 %W/W ขาวสนาน 0.00323 %W/W และ เอื้องสกุล 0.0300 %W/W (พรชัย และคณะ, 2560) ซึ่งสามารถพัฒนานำมาใช้ประโยชน์เพื่อการรักษาโรค เพิ่มทางเลือกของการใช้กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายให้มีคุณค่าและมูลค่าของกล้วยไม้ได้มากกว่าการเป็นไม้ตัดดอก จากแนวโน้มการส่งออกสินค้ากล้วยไม้ของไทยเดือนมกราคม-มิถุนายน 2561 เพิ่มขึ้น 6.69% เมื่อเทียบกับช่วงเวลาเดียวกันของปี 2560 แต่เนื่องจากเศรษฐกิจโลกยังอยู่ในช่วงชะลอตัว ส่งผลให้ความต้องการของตลาดต่างประเทศส่วนใหญ่ยังอยู่ที่ตลาดเดิม และพฤติกรรมผู้บริโภคของตลาดต่างประเทศค่อนข้างหลากหลาย ผู้บริโภคมีความต้องการดอกกล้วยไม้ที่มีคุณภาพ กล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่ๆ ทำให้ผู้ประกอบการต้องรักษามาตรฐานการผลิต รวมทั้งการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ จึงควรเพิ่มทางเลือกการใช้ประโยชน์ของกล้วยไม้เพื่อการตัดดอกของ การนำกล้วยไม้ซึ่งทราบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่แน่นอนไปใช้ จะสามารถลดปัญหาความไม่แน่นอนของการออกฤทธิ์ นอกจากนี้การตรวจหาปริมาณสารสำคัญในกล้วยไม้ก่อนการซื้อขาย ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กล้วยไม้ ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นด้วย จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิจัยพัฒนาชุดตรวจสอบสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ด้วยเทคนิค electrochemical aptasensor เพื่อเป็นชุดตรวจสอบที่เกษตรกรสามารถใช้งานได้ง่าย สะดวก รวดเร็วและค่าใช้จ่ายไม่สูง ดังนั้นงานวิจัยนี้มีแนวทางเพื่อการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายของไทย โดยการผลิตชุดตรวจสอบปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ ซึ่งมีความจำเป็นและมีประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของกล้วยไม้

Moscatilin อยู่ในกลุ่ม bibenzyl ซึ่งเป็นสารที่มีหมู่ phenol ในโครงสร้าง (ภาพที่ 1) ซึ่งมีผลการศึกษาทางเภสัชวิทยาแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation), ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant), ฤทธิ์ต้านการเจริญของหลอดเลือดเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (anti-angiogenesis) (Tsai *et al.*, 2010) นอกจากนี้สาร moscatilin ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ NCI-H187 (มะเร็งปอด) และ KB (มะเร็งเยื่อช่องปาก) (Thanawuth, 2011) และยังสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด

(Akkarawut, 2012) Moscatilin ถูกพบในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* หลายชนิด เช่นรายงานของ Chen *et al.* (2012) ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากกล้วยไม้ *Dendrobium* species จำนวน 24 สายพันธุ์ พบสาร naringenin, DDB-2, gigantol และ moscatilin ซึ่งเป็นสารที่พบมากในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* และรายงานของ Kowitdamrong *et al.* (2013) พบว่าสารสำคัญ moscatilin ซึ่งสกัดได้จาก เอื้องช้างน้ำ (*Dendrobium pulchellum*) สามารถยับยั้งการย้ายถิ่นและการบุกรุกของเซลล์ H23 ของเซลล์ ปอดได้ นอกจากนี้ปัจจัยภายนอกได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณน้ำ และธาตุอาหาร มีผลต่อการชักนำให้ กล้วยไม้ผลิตสารสำคัญ moscatilin อีกด้วย

การวิเคราะห์สาร Moscatilin ในกล้วยไม้ โดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิคทางด้านเคมี เช่นวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ละเอียดและแม่นยำ ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้คือระดับนาโนกรัม แต่มีข้อเสียคือที่มี ค่าใช้จ่ายสูง ต้องการผู้เชี่ยวชาญและชำนาญ เฉพาะทาง อีกทั้งขั้นตอนการสกัด Moscatilin ยุ่งยากไม่เหมาะกับงานตัวอย่างที่มีจำนวนมาก

ปัจจุบันมีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ อาจเป็น RNA, ssDNA หรือ dsDNA ที่เรียกว่าแอปตาเมอร์ (Aptamer) มีคุณสมบัติมีวนพับเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (tertiary structure) ซึ่งมีการทำงานคล้ายกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ สามารถจับกับโมเลกุลต่างๆ ได้อย่างจำเพาะและหลากหลายชนิด ขั้นตอนแรกของการผลิตแอปตาเมอร์ จะต้องออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวแบบสุ่ม (randomized sequence) ซึ่งขนาดสั้นด้วยลำดับนิวโอไทด์ที่ทราบลำดับเบส จำนวนชนิดของแอปตาเมอร์นั้นจะมีความหลากหลายมาก เนื่องจากความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มที่อยู่ตรงกลางลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อแอปตาเมอร์แต่ละเส้นเกิดการมีวนพับ จะเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิที่มีลักษณะต่างๆ กัน (ภาพที่ 2) ซึ่งคาดว่าน่าจะมีมีความหลากหลายมากกว่า  $10^{30}$  ชนิด จึงเสมือนเป็นคลังแอปตาเมอร์ (aptamer library) โครงสร้างทุติยภูมิของแอปตาเมอร์ที่เกิดขึ้นนี้สามารถเข้าจับโมเลกุลได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Michaud *et al.*, 2003) (ภาพที่ 3)

จากนั้นทำการคัดเลือกแอปตาเมอร์ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโมเลกุลที่ต้องการจากคลังแอปตาเมอร์ ด้วยเทคนิค Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) (Tuerk and Gold, 1990) (ภาพที่ 4) ซึ่งมีเพียง 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ 1. นำคลังแอปตาเมอร์จับกับโมเลกุลเป้าหมาย 2. คัดแยกแอปตาเมอร์ที่จับกับโมเลกุลเป้าหมาย และ 3. เพิ่มปริมาณแอปตาเมอร์ที่จับกับโมเลกุลเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ การคัดเลือกแอปตาเมอร์ด้วยวิธี SELEX ส่วนใหญ่จะคัดเลือกประมาณ 5-15 รอบ โดยรายงานของ Yan (2011) พบว่าเมื่อคัดเลือกแอปตาเมอร์ต่อโปรตีน CP4 EPSPS ด้วยวิธี SELEX จำนวน 15 รอบ แอปตาเมอร์ที่คัดเลือกได้ให้ค่าการดูดกลืนแสง เพิ่มขึ้นถึง 6.7 เท่า จาก 0.2257 ในการคัดเลือกรอบแรก และวัดได้ 1.5132 ในรอบที่ 15

ด้วยคุณสมบัติของแอปตาเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงเหมือนโมโนโคลนอลแอนติบอดี แต่มีความคงทนกว่าแอนติบอดี และสามารถสังเคราะห์ได้ในปริมาณมากด้วยวิธีการทางเคมี และข้อดีอีกประการของแอปตาเมอร์ คือ ไม่จำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลอง มีค่าใช้จ่ายน้อย และใช้เวลาในการผลิตสั้นกว่าการผลิตแอนติบอดี โดยใช้เวลาประมาณ 4 เดือน ในขั้นตอนการคัดเลือกแอปตาเมอร์ ทำให้แอปตาเมอร์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในงานวิจัยที่หลากหลาย เช่น นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค และใช้ในการรักษาโรค โดยการนำยามาติดเข้ากับแอปตาเมอร์ เพื่อให้แอปตาเมอร์ขนส่งยาไปยังเป้าหมายที่จำเพาะ ทำให้ยาออกฤทธิ์ตรงตำแหน่งที่ต้องการ (Tan *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2016) ใช้แอปตาเมอร์ตรวจหาไอออนที่ปนเปื้อนในอาหารและสิ่งแวดล้อม (Cho *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2017) ตรวจหาสารพิษจากเชื้อราในอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Wang *et al.*, 2011) การใช้แอปตาเมอร์ตรวจสอบไวรัส apple stem pitting virus (ASPV) ด้วยเทคนิค Surface plasmon resonance (SPR) (Lautner *et al.*, 2010) และใช้ในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม เช่น รายงานของ Yan (2011) ที่คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบโปรตีน CP4 EPSPS ในพืชดัดแปลงพันธุกรรม และรายงานของ Jin

*et al.* (2017) ที่ใช้แอปตาเมอร์ในการตรวจสอบโปรตีน Cry1Ab ในพืชตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Impedimetric Microfluidic Analysis ส่วนในประเทศไทยนั้น พบว่าปัญญาวฤต (2559) คัดเลือกแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง เพื่อใช้ในการตรวจสอบโรค

จากรายงานของ Pfeiffer และ Mayer (2016) มีการนำแอปตาเมอร์ไปใช้ในด้านต่างๆ หลากหลายรูปแบบ เช่น การใช้แอปตาเมอร์ตรวจสอบโคเคน การตรวจสอบการปนเปื้อน ochratoxin A ในอาหาร (ภาพที่ 5) และ Ruscito และ DeRosa (2016) รายงานงานวิจัยที่มีการใช้แอปตาเมอร์ ตั้งแต่ปี 2012 ถึงปี 2015 พบว่ามีการใช้แอปตาเมอร์กับสารโมเลกุลขนาดเล็กจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 1 เช่น สารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซินบี 1 (aflatoxin B1) โอคราทอกซินเอ (ochratoxin A) ซีราลีโนน (zearalenone) และสารกำจัดแมลง Acetamiprid ซึ่งล้วนแต่เป็นสารโมเลกุลที่มีขนาดเล็กใกล้เคียงกับสาร moscatilin และยังมีอนุพันธ์เบนซินเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างด้วย (ภาพที่ 6)

## 2. วัตถุประสงค์ที่เชื่อมโยงสัมพันธ์กับสาระของงานวิจัย

เพื่อคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ (DNA aptamer) ที่จำเพาะต่อสารสำคัญ moscatilin และนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย

## 3. ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ออกแบบและสังเคราะห์คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ นำมาคัดเลือกแอปตาเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสารสำคัญ moscatilin และนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย

## ระเบียบวิธีการวิจัย

### 1. ประเด็นวิจัย

ออกแบบและสังเคราะห์คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ คัดเลือกแอปตาเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสารสำคัญ moscatilin ด้วยวิธี SELEX จากนั้นคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารสำคัญ moscatilin ด้วยเทคนิค ELAA และนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารสำคัญ moscatilin ด้วยตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า เพื่อใช้ตรวจสอบสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล

### 2. สถานที่ทำการวิจัย

สำนักวิจัยพัฒนา เทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จ.ปทุมธานี

### 3. ระยะเวลาดำเนินงาน

ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564 (2 ปี)

### 4. วิธีการดำเนินการ

#### 1. การวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin จากกล้วยไม้สกุลหวาย

1.1 เตรียมตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวาย โดยรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย ที่มีสารสำคัญ moscatilin ปริมาณที่แตกต่างกัน ได้แก่ พันธุ์ชาวสวน ขาว 5N และ เอียสกุล นำตัวอย่างกล้วยไม้สับให้ละเอียด จากนั้นนำไปอบที่ 60°C เป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง บดให้ละเอียด เก็บไว้ในภาชนะที่แห้งและสะอาด

1.2 สกัดสาร moscatilin จากกล้วยไม้สกุลหวาย โดยชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม ด้วยในเมธานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้วิธี ultrasonic extraction เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนสารละลายส่วนใสกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22 µm ก่อน นำไปฉีด UHPLC

1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน ละลายมาตรฐาน moscatilin (YAL chemicals, China) ความบริสุทธิ์มากกว่า 95% ด้วยเมธานอลให้ได้ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$

1.4 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ moscatilin ในสารสกัดกล้วยไม้ ด้วยเครื่อง Ultra-High Liquid Chromatograph (UHPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Shimadzu รุ่น Nexera-2 LD-30AD เครื่องตรวจวัดชนิด Photo diode array รุ่น SPD-M20A ระบบฉีดสารอัตโนมัติรุ่น SIL-30AC

#### สภาวะเครื่อง UHPLC

คอลัมน์:	GL Sciences InertSustainSwift C18 (150mm x 2.1mm x 1.9 $\mu\text{m}$ )
อุณหภูมิคอลัมน์:	30 °C
อัตราการไหล:	0.4 ml/min
ตัวพา:	1.5% acetic acid (ตัวพา A) และ methanol (ตัวพา B)
	ด้วยระบบ gradient :
	0–7 นาที 80% (A) และ 20% (B)
	7–14 นาที 68% (A) และ 32% (B)
	14–17 นาที 80% (A) และ 20% (B)
เครื่องตรวจวัด:	PDA 280 nm
ปริมาตรการฉีด:	5 $\mu\text{l}$
เวลาที่ใช้:	17 นาที

บันทึกผล ลักษณะโครมาโตแกรมและ retention time ของสาร moscatilin

## 2. การเตรียมดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสาร moscatilin

### 2.1 การเตรียมคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ (DNA aptamer library)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (DNA aptamer) ขนาด 86 นิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5'-AAAGAATTCAAGCTTGAAGCTTGTTCGAGCCAG-(N<sub>40</sub>)-TCGGATCCGCTATAGTGAGTCG TATTA-3' ซึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์ (N<sub>40</sub>) อยู่บริเวณกลางของ DNA aptamer ส่วนบริเวณด้านข้างทั้งสองด้านเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ โดยวิธี PCR ดังนี้ forward primer (AptF), 5'-TTTCTGCAGGTCGACTAATACGACTCACTAT AGCGGA-3'; reverse primer (AptR), 5'-AAAGAATTCAAGCTTGAAGCTTGTTCGAGCCAG-3' เมอร์ และสังเคราะห์ไพรเมอร์ AptR-Biotin [(biotin)-5-AAAGAATTCAAGCTTGAAGCTT GTTCGAGCCAG-3] สำหรับติด biotin ที่ปลาย 5' ของ DNA aptamer

### 2.2 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารสำคัญ moscatilin

#### 2.2.1 คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารมาตรฐาน moscatilin ด้วยวิธี SELEX

นำคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 1 นาโนโมลลาร์ มาละลายใน Phosphate buffered saline (PBS: Sigma, USA) ที่เติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ Tween-20 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (PBST) ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารมาตรฐาน moscatilin 10 mg/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ่ายลงคอลัมน์ Vivaspinn 500 (GE Healthcare, Sweden) ที่มี molecular weight cut off (MWCO) 30 กิโลดาลตัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย PBST ปริมาตร 1 มิลลิตร หมุนเหวี่ยงเช่นเดิมเป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง ละลาย aptamer- moscatilin complex ออกจากคอลัมน์ ด้วย PBST ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำ aptamer- moscatilin complex ไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USA) และไพรเมอร์ AptF และ AptR มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 95 องศา

เซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ทำการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารมาตรฐาน moscatilin จำนวน 14 รอบ

### 2.2.2 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสารมาตรฐาน moscatilin

ขั้นตอนนี้จะเป็นการกำจัดดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ไม่จำเพาะต่อสารมาตรฐาน moscatilin ได้แก่ สารสำคัญที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับสาร moscatilin ซึ่งพบในกล้วยไม้สกุลหวาย เช่น giantol กระทำเช่นเดียวกับข้อ 3.1 โดยเติมสาร giantol จากนั้นเก็บดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ออกจากคอลัมน์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสารมาตรฐาน moscatilin

บันทึกผลแถบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสาร moscatilin

### 2.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสารมาตรฐาน moscatilin

นำผลผลิตจาก PCR จากข้อ 3.2 โคลนเข้ากับ pGEM®-T Vector (Promega, USA) และถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธีการ heat shock transformation นำโคลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร 2YT ที่เติม ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่สอดแทรกอยู่ใน พลาสมิดโดยเทคนิค colony PCR ทำโดยใช้โคลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารเป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ AptF และ AptR จากนั้นคัดเลือกโคลนีเดี่ยวจำนวน 10 โคลน นำมาติด biotin ที่ปลาย 5' (DNA aptamer-biotin) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ AptR-Biotin ในการทำปฏิกิริยา และแยกให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ด้วย Dynabeads® M-280 Streptavidin (Invitrogen, Norway) ตามวิธีการของผู้ผลิต

บันทึกผลจำนวนโคลนีของแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสาร moscatilin สอดแทรกอยู่ในพลาสมิด

### 2.3 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารสำคัญ moscatilin ด้วยเทคนิค ELAA

นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารสำคัญ moscatilin จำนวน 282 โคลน ไปทดสอบด้วยวิธี indirect ELAA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Barthelmebe *et al.*, (2011) โดยใช้สารมาตรฐาน moscatilin เคลือบลงในหลุมของถาด ELISA ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ติดฉลาก biotin แล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างถาด ELISA ด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม AP-Streptavidin Conjugate (Invitrogen, USA) เจือจาง 1:1,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างถาด ELISA และเติม substrate buffer ที่มี PNPP 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นของสีที่ได้ด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ( $OD_{405}$ )

บันทึกผล ค่าความเข้มข้นของสีที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร ของปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และสาร moscatilin



### 3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โดยใช้วิธี ELAA

ใช้วิธี Checker board titration เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โดยใช้สารมาตรฐาน moscatilin เคลือบลงในหลุมของถาด ELISA ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ติดฉลาก biotin แล้ว ความเข้มข้นที่ระดับ 0.16 0.32 0.63 1.25 2.5 5.0 10.0 20.0 และ 200.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างถาด ELISA ด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม AP-Streptavidin Conjugate (Invitrogen, USA) เจือจาง 1:1,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างถาด ELISA และเติม substrate buffer ที่มี PNPP 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นของสีที่ได้ด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ( $OD_{405}$ )

บันทึกผลสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาสาร moscatilin

### 4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ด้วยตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

4.1 การเตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน (Screen printed carbon electrode; SPCE) ด้วยวิธีของ Mishra *et al.* (2015)

ล้าง SPCE ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ต่อ SPCE เข้ากับเครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนาม (Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100) ล้างปรับสภาพด้วย sulfuric acid ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ KCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้ศักย์ไฟฟ้า -0.5 ถึง 0.5 โวลต์ จำนวน 12 รอบ โพลแทสเซียมเพอโรโซยานด์ ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ และ โพลแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ บนขั้วไฟฟ้าทั้งสามภายใต้ศักย์ไฟฟ้า -0.5 ถึง 1.0 โวลต์ ล้างขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน แล้วเป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่าซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู

4.2 การเคลือบขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนด้วย 4-carboxyphenyl diazonium salt

จุ่มแผ่น SPCE จากข้อ 4.1 ลงในสารละลาย  $NaNO_2$  ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมลงใน electrolytic solution (2 mM 4-aminobenzoic acid และ 0.5 M HCl) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากให้ศักย์ไฟฟ้า -0.5 ถึง 0.5 โวลต์ จำนวน 1 รอบ จะได้สาร 4-carboxyphenyl diazonium salt (4-CP/SPCE) เคลือบบนแผ่น SPCE ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

4.3 การยึดติดดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสาร moscatilin บนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน

นำแผ่น SPCE ที่เคลือบแล้วจากข้อ 4.2 แช่ใน EDC เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ MES เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 60 นาที ล้างขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน หยดดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสาร moscatilin ซึ่งพ่วงด้วยสารกลุ่ม  $NH_2$  ทางด้านปลาย 5' ของเส้นดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ความเข้มข้น 100 พิโคโมล ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนขั้วไฟฟ้า บ่มในกล่องความชื้นนาน 90 นาที ล้างขั้วไฟฟ้าด้วย binding buffer (1 mM  $MgCl_2$ , 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1 mM  $Na_2HPO_4$  and 1.8 mM,  $KH_2PO_4$  pH 7.4) จากนั้นหยด ethanolamine เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนขั้วไฟฟ้า บ่มนาน 60 นาที และล้างขั้วไฟฟ้าด้วย BSA เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มนาน 60 นาที เก็บแผ่น SPCE ที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสาร moscatilin ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 5. ทดสอบประสิทธิภาพของตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าในการวิเคราะห์สาร moscatilin ในกล้วยไม้

นำตัวอย่างกล้วยไม้ที่บดแห้งแล้ว โดยใช้เอียงสุก ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ด้วยวิธี UHPLC ได้เท่ากับ 0.062 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม เป็นตัวอย่างควบคุมบวก และกล้วยไม้ ขาว 5N ที่ไม่สามารถตรวจพบปริมาณสาร moscatilin ได้ เป็นตัวอย่างควบคุมลบ

สกัดสาร moscatilin โดยชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม ด้วยในเมธานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้วิธี ultrasonic extraction เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนสารละลายส่วนใสกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  นำมาเจือจางใน binding buffer หยอดลงบนแผ่น SPCE ที่เคลือบด้วยดีแอมป์ตาเมอร์ต่อสาร moscatilin จากข้อ 4 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ moscatilin ในสารสกัดกล้วยไม้ วัดค่าสเปคตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) ด้วยเครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนาม (Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100)

บันทึกผล ค่า EIS สาร moscatilin ในสารสกัดกล้วยไม้

### ผลการทดลองและอภิปรายผล

#### 1. การวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin จากกล้วยไม้สุกหลาย

ทำการทดสอบการสกัดสาร moscatilin ด้วยเมธานอล โดยใช้กล้วยไม้จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ขาวสนาน ขาว 5N และ เอียงสุก (ภาพที่ 7) นำส่วนลำต้นและใบ (ภาพที่ 8) ของกล้วยไม้ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า แต่ละพันธุ์ให้น้ำหนักแห้งแตกต่างกัน โดยพบว่า ขาว 5N มีน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด รองลงมา คือ เอียงสุก ขาวสนานให้น้ำหนักแห้งสูงสุด

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ด้วยเทคนิค UHPLC โดยฉีดสารมาตรฐาน moscatilin ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร พบโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน moscatilin มีค่า retention time เท่ากับ 12.18 (ภาพที่ 9) จากนั้นได้ฉีดตัวอย่างกล้วยไม้ ขาวสนาน เอียงสุก และขาว 5N พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 12.37 12.12 และ 12.24 ตามลำดับ (ภาพที่ 10) ซึ่งแสดงว่าสามารถตรวจสอบสาร moscatilin ด้วยเทคนิค UHPLC ได้ เนื่องจากมีค่า retention time ของสาร moscatilin ในกล้วยไม้ ตรงกับค่า retention time สารมาตรฐาน moscatilin

และเมื่อวิเคราะห์สาร moscatilin ในส่วนของลำต้นและส่วนใบของกล้วยไม้ พบสาร moscatilin ในลำต้นของขาวสนานและเอียงสุก เท่ากับ 0.015 และ 0.011 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ และ ปริมาณสาร moscatilin ในส่วนของใบในขาวสนานและเอียงสุก เท่ากับ 0.013 และ 0.062 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ ส่วนกล้วยไม้ ขาว 5N ไม่สามารถตรวจพบปริมาณสาร moscatilin ได้ (ตารางที่ 2) จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ในส่วนต่างๆของกล้วยไม้นั้น โดยเฉพาะในส่วนของใบกล้วยไม้ ที่พบการสะสมของสาร moscatilin ในปริมาณที่สูงเทียบเคียงกับส่วนของลำต้น จะทำให้การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ด้วยชุดตรวจสอบที่จะพัฒนาขึ้น สามารถใช้ใบกล้วยไม้มาตรวจวิเคราะห์ได้โดยตรง ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการตรวจวิเคราะห์สาร moscatilin ในแปลงปลูกได้

#### 2. การเตรียมดีเอ็นเอแอมป์ตาเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อสาร moscatilin

##### 2.1 การเตรียมคลังดีเอ็นเอแอมป์ตาเมอร์

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแอมป์ตาเมอร์ ขนาด 86 นิวคลีโอไทด์ โดยบริเวณส่วนกลางของดีเอ็นเอแอมป์ตาเมอร์ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์ ( $N_{40}$ ) (ภาพที่ 11) ซึ่งสามารถคำนวณความหลากหลาย



ของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ตามสูตรการคำนวณ คือ  $4^N$  N คือ จำนวนนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม (Pan and Clawson, 2009) ดังนั้น ความหลากหลายของคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ เท่ากับ  $4^{40} = 1.2 \times 10^{24}$  จากนั้นจะนำคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ไปคัดเลือกสาร moscatilin ต่อไป

## 2.2 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารสำคัญ moscatilin

คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ที่สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin จากคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน moscatilin และปั่นแยกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ไม่จับกับสารมาตรฐาน moscatilin ออกโดยใช้ Vivaspin 500 เนื่องจากดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารมาตรฐาน moscatilin มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า MWCO ของ Vivaspin และยังคงอยู่ในหลอด จากนั้นนำ aptamer- moscatilin complex ไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ aptF และ aptR เพื่อเพิ่มปริมาณ aptamer- moscatilin complex และนำไปใช้ในการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ที่สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin อีก 14 รอบ (ภาพที่ 12)

## 2.3 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารสำคัญ moscatilin ด้วยเทคนิค ELAA

นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่คัดเลือกได้จากเทคนิค SELEX เชื่อมต่อกับ pGEM-T Vector คัดเลือกโคลนเดี่ยวได้ 282 โคลน นำไปพ่วงกับ Biotin ด้วยปฏิกิริยา PCR (DNA aptamer-biotin) จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการจับกับสารมาตรฐาน moscatilin ด้วยเทคนิค ELAA พบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 7 โคลน สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin ได้ โดยมีค่า S/N ration อยู่ในช่วง 1.03-5.48 (ตารางที่ 3) จึงคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ทั้ง 7 โคลน ใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

## 2.4 การทดสอบสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อ moscatilin ด้วยเทคนิค ELAA

จากการทำ checker board titration โดยเลือกใช้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อ moscatilin จำนวน 4 โคลน ได้แก่ MosA6 MosH4 MosH8 และ MosE6 โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.16 0.32 0.63 1.25 2.5 5.0 10.0 20.0 และ 200.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ทุกโคลนที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำปฏิกิริยากับ moscatilin โดยให้ค่า S/N ratio อยู่ในช่วง 0.96 – 1.50 นอกจากนี้ยังพบว่าดีเอ็นเอแอปตาเมอร์โคลน MosA6 ที่ความเข้มข้น 0.16 และ 0.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า S/N ratio เท่ากับ 1.80 และ 1.72 ตามลำดับ (ภาพที่ 13) จึงทำการสกัดพลาสมิดของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์แต่ละโคลน (ภาพที่ 14) เมื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณสุ่มมีความแตกต่างกัน จึงทำให้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์มีโครงสร้างตติยภูมิ (ภาพที่ 15) ที่ประกอบด้วย loop และ hairpin ที่แตกต่างกัน ซึ่งโครงสร้างเหล่านี้มีส่วนสำคัญในการจับกับสารเป้าหมาย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ของทั้ง 4 โคลน ที่สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณสุ่มที่แตกต่างกัน เมื่อนำมาหาโครงสร้างตติยภูมิ จึงทำให้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์แต่ละโคลนมีโครงสร้างที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งโครงสร้างที่ประกอบด้วย loop และ hairpin เหล่านี้ เป็นโครงสร้างที่มีส่วนสำคัญในการจับกับสารเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Michaud *et al.*, 2003)

## 4. การหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ด้วยตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

จากผลการวิจัยด้วยเทคนิค ELAA พบว่า มีความเป็นไปได้ของการตรวจสอบสาร moscatilin ด้วยดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จึงนำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ทั้ง 4 โคลน มาใช้ตรวจสอบสาร moscatilin ด้วยวิธีการวิเคราะห์ค่าสเปตตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) เป็นการวัดความต้านทานในวงจรกระแสสลับ หลังจากการให้ความต่างศักย์แก่วงจรไฟฟ้า สัญญาณที่เกิดขึ้นด้วยวิธีนี้ จะแสดงผลเป็นตัวเลข ทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ โดยเริ่มต้นต้องมีการเตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน (Screen printed carbon electrode; SPCE) (ภาพที่ 16) ที่จะใช้ตรวจวิเคราะห์สาร moscatilin โดยทำการตรึงดีเอ็นเอแอปตาเมอร์บนขั้วไฟฟ้า SPCE ที่เคลือบด้วย 4-carboxyphenyl diazonium salt จากผลการวิจัย จะพบว่า ใน

แต่ละขั้นตอนเริ่มด้วยการปรับสภาพ SPCE ด้วย sulfuric และ KCl จะมีค่า EIS ต่ำที่สุด (ภาพที่ 17a) เมื่อหลังจากเคลือบขั้วไฟฟ้า ด้วย 4-carboxyphenyl diazonium salt (ภาพที่ 17b) และตรึงดีเอ็นเอแอปตาเมอร์บนขั้วไฟฟ้า SPCE (ภาพที่ 17d) จะมีค่า EIS สูงขึ้นตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mishra *et al.* (2015) ที่ใช้วิธีการตรึงดีเอ็นเอแอปตาเมอร์บนขั้วไฟฟ้า SPCE วิธีเดียวกัน แสดงว่าการตรึงดีเอ็นเอแอปตาเมอร์บนขั้วไฟฟ้า SPCE ประสบความสำเร็จ

เมื่อทำการตรึงดีเอ็นเอแอปตาเมอร์แต่ละโคลนบนขั้วไฟฟ้า SPCE แล้ว จึงนำมาตรวจวิเคราะห์การจับกับสารมาตรฐาน moscatilin โดยเปรียบเทียบกับบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายสารมาตรฐาน หากค่าสัญญาณ EIS ของการตรวจจับสารมาตรฐาน moscatilin (ภาพที่ 18) เพิ่มขึ้น จากค่าสัญญาณ EIS ของบัฟเฟอร์ (ภาพที่ 18a) นั้น แสดงว่า ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์บนแผ่น SPCE สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin ได้ จากการทดลอง พบว่า ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โคลน MosH4 และ MosH8 มีค่าสัญญาณ EIS ของการตรวจจับสารมาตรฐาน moscatilin สูงกว่าค่าสัญญาณ EIS ของบัฟเฟอร์ (ภาพที่ 18) แสดงว่า ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โคลน MosH4 และ MosH8 ที่ถูกตรึงไว้บนขั้วไฟฟ้า SPCE ยังคงสามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin ได้ ส่วนดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โคลน MosA6 และ MosE6 มีค่าสัญญาณ EIS ของการตรวจจับสารมาตรฐาน moscatilin ต่ำกว่าค่าสัญญาณ EIS ของบัฟเฟอร์ (ภาพที่ 18) แสดงว่าดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ทั้งสองโคลน ไม่สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin ได้ ถึงแม้ว่าดีเอ็นเอแอปตาเมอร์โคลน MosA6 จะมีความสามารถในการจับกับสารมาตรฐาน moscatilin ด้วยเทคนิค ELAA สูงที่สุด ซึ่งการตรึงดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ อาจทำให้การการม้วนพับของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์เปลี่ยนไป อาจส่งผลทำให้สูญเสียโครงสร้างตติยภูมิในรูปแบบที่จะจับสาร moscatilin ได้

## 5. ทดสอบประสิทธิภาพของตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าในการวิเคราะห์สาร moscatilin ในกล้วยไม้

เมื่อนำแผ่น SPCE ที่มีการตรึงดีเอ็นเอแอปตาเมอร์แต่ละโคลนแล้ว ทดสอบการจับกับสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวาย เอียสกุล ซึ่งจากการวิเคราะห์สาร moscatilin ด้วยเทคนิค UHPLC มีค่าเท่ากับ 0.062 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม เป็นตัวอย่างควบคุมบวก โดยเปรียบเทียบกับกล้วยไม้สกุลหวาย ขาว 5N เป็นตัวอย่างควบคุมลบ โดยอ่านผลจากค่าสัญญาณ EIS ของการตรวจจับสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุล (ภาพที่ 19b) หากเพิ่มขึ้นจากค่าสัญญาณ EIS ของกล้วยไม้สกุลหวายขาว 5N (ภาพที่ 19a) นั้นแสดงว่า ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์บนแผ่น SPCE สามารถจับกับสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวายได้ จากผลการทดลอง พบว่า ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โคลน MosH4 และ MosH8 บนแผ่น SPCE สามารถจับกับสาร moscatilin ในกล้วยไม้ได้ ส่วนดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โคลน MosA6 และ MosE6 ไม่สามารถจับกับสาร moscatilin ในกล้วยไม้ (ภาพที่ 19) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ ที่มีเพียง ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โคลน MosH4 และ MosH8 เท่านั้นที่จับกับสารมาตรฐาน moscatilin ได้

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้สกุลผสมสกุลหวายด้วยเครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนามนั้น ยังต้องศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ใช้ตรึงบนขั้วไฟฟ้า SPCE ที่เหมาะสมในการตรวจสอบสาร moscatilin ในกล้วยไม้ จากงานวิจัยนี้ จะเห็นว่าค่าสัญญาณ EIS ที่ตรวจสอบสาร moscatilin ค่อนข้างต่ำ ซึ่งเกิดจากการใช้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ความเข้มข้นเพียง 100 พิโคโมล ซึ่งไม่เพียงพอสำหรับการตรวจสอบสาร moscatilin ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Mishra *et al.* (2015) ซึ่งใช้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ความเข้มข้นถึง 0.35 ไมโครโมล นอกจากนี้ยังต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สาร เพื่อปรับให้มีความเหมาะสมในการตรวจสอบสาร moscatilin ในกล้วยไม้ที่ดีขึ้น โดยต้องปรับค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ชนิดของบัฟเฟอร์ วิธีการเก็บรักษาแผ่น SPCE ที่ตรึงดีเอ็นเอแอปตาเมอร์แล้ว เทคนิคที่ใช้วัด เป็นต้น

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. วิเคราะห์สาร moscatilin ในส่วนของลำต้นและส่วนใบของกล้วยไม้ ด้วยเทคนิค UHPLC พบสาร moscatilin ในลำต้นของชาวสนานและเอี้ยสกุล เท่ากับ 0.015 และ 0.011 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ และ ปริมาณสาร moscatilin ในส่วนของใบในชาวสนานและเอี้ยสกุล เท่ากับ 0.013 และ 0.062 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ ส่วนกล้วยไม้ ขาว 5N ไม่สามารถตรวจพบปริมาณสาร moscatilin ได้ จากผลการวิเคราะห์ ปริมาณสาร moscatilin ในส่วนต่างๆของกล้วยไม้นั้น โดยเฉพาะในส่วนของใบกล้วยไม้ ที่พบการสะสมของสาร moscatilin ในปริมาณที่สูงเทียบเคียงกับส่วนของลำต้น จะทำให้การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ด้วย ชุดตรวจสอบที่จะพัฒนาขึ้น สามารถใช้ใบกล้วยไม้มาตรวจวิเคราะห์ได้โดยตรง ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการ ตรวจวิเคราะห์สาร moscatilin ในแปลงปลูกได้

2. ได้คลังของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ขนาด  $1.2 \times 10^{24}$  รูปแบบ ซึ่งดีเอ็นเอแอปตาเมอร์มีความยาว 86 นิวคลีโอไทด์ โดยบริเวณส่วนกลางของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์ ซึ่งคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์นี้ เป็นแหล่งของแอปตาเมอร์ ที่มีความหลากหลาย ดังนั้นเมื่อต้องการตรวจสอบสารสำคัญชนิดอื่นๆ ในอนาคต จึงสามารถนำคลังของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์นี้มาใช้ได้ทันที เป็นการสะดวกและประหยัดกว่า วิธีการผลิตแอนติบอดีแบบเดิม ๆ

3. คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ที่สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin จากคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ด้วยวิธี SELEX จำนวน 14 รอบ นำมาดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ผ่านการคัดเลือกเชื่อมต่อกับ pGEM-T Vector คัดเลือกโคลนีเดี่ยวได้ 282 โคลนี นำไปทดสอบความสามารถในการจับกับสารมาตรฐาน moscatilin ด้วยเทคนิค ELAA พบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 7 โคลน สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin ได้ โดยมีค่า S/N ration อยู่ในช่วง 1.03-5.48 สามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจหากกล้วยไม้ที่มีสาร Moscatilin และคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จำนวน 4 โคลน ได้แก่ MosA6 MosH4 MosH8 และ MosE6 ทำ checker board titration ด้วยเทคนิค ELAA พบว่าดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ทุกโคลนที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำปฏิกิริยากับ moscatilin ได้โดยให้ค่า S/N ratio อยู่ในช่วง 0.96 – 1.50

4. การตรวจสอบสาร moscatilin ด้วยเครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนาม (Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100) โดยใช้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จำนวน 4 โคลน ได้แก่ MosA6 MosH4 MosH8 และ MosE6 ตรึงบนขั้วไฟฟ้า SPCE พบว่า มีเพียงดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โคลน MosH4 และ MosH8 ที่สามารถจับกับสาร moscatilin ได้ อย่างไรก็ตาม ค่าสัญญาณ EIS จากการตรวจสอบสารค่อนข้างต่ำ อาจเกิดจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ใช้ตรึงบนขั้วไฟฟ้า SPCE ต่ำ จึงไม่เพียงพอในการตรวจจับสาร moscatilin ซึ่งจะดำเนินการพัฒนาการตรวจสอบโดยการเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และชนิดของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ เพื่อให้การตรวจสอบสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวายมีประสิทธิภาพในอนาคตต่อไป

### การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์โคลน MosH4 และ MosH8 ไปใช้ตรวจสอบสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวาย โดยใช้เครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนาม (Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่แสดงผลการตรวจสอบเป็นตัวเลข ทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ผลได้

ด้วยตัวเองและทราบผลในเวลาอันรวดเร็ว นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ในภาคสนาม ทำให้ลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการตรวจวิเคราะห์สารด้วยวิธีทางเคมีได้

#### เอกสารอ้างอิง

- ปัญญาวุฒิ อัมพูนรินทร์. 2559. ไวรัสไบโอดีทติ้งสำหรับประเทศไทยและการคัดเลือก Aptamer ที่จำเพาะเพื่อการตรวจสอบโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 103 หน้า.
- Akkarawut Kowitdamrong . 2012. Effects of moscatilin on migration of non-small cell lung cancer cells. Thesis (M.Sc.) Chulalongkorn University.
- Barthelmebs, L., J. Jonca, A. Hayat, B. P. Simon and J.-L. Marty. 2011. Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control*. 22: 737-743.
- Chen X, Wang F, Wang Y, Li X, Wang A, Wang C, Guo S. Discrimination of the rare medicinal plant *Dendrobium officinale* based on naringenin, bibenzyl, and polysaccharides. *Sci China Life Sci*. 55(12): 1092-1099.
- Chin, J. X., B. K. S. Chung and D. Y. Lee. 2014. Codon optimization online (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design. *Bioinformatics*. 30(15): 2210–2212.
- Cho, Y. S., E. J. Lee, G. H. Lee and S. S. Hah. 2015. Aptamer selection for fishing of palladium ion using graphene oxide-adsorbed nanoparticles. *Bioorg Med Chem Lett*. 25(23): 5536–5539.
- Jin, S., Z. Ye, Y. Wang and Y. Ying. 2017. A novel impedimetric microfluidic analysis system for transgenic protein Cry1Ab detection. *Scientific Reports* 7: 43175.
- Kowitdamrong, A., P. Chanvorachote, B. Sritularak and V. Pongrakhananon. 2013. Moscatilin Inhibits Lung Cancer Cell Motility and Invasion via Suppression of Endogenous Reactive Oxygen Species. *BioMed Research International*. 765894.
- Lautner, G., Z. Balogh, V. Bardóczy, T. Mészáros and R. E. Gyurcsányi. 2010. Aptamer-based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging. *Analyst*. 135(5): 918–926.
- Liu, J., T. Wei, J. Zhao, Y. Huang, H. Deng, A. Kumar, C. Wang, Z. Liang, X. Ma and X. J. Liang. 2016. Multifunctional aptamer-based nanoparticles for targeted drug delivery to circumvent cancer resistance. *Biomaterials*. 91: 44-56.
- McGown, L. B., M. J. Joseph, J.B. Pitner, G. P. Vonk and C. P. Linn. 1995. The nucleic acid ligand. A new tool for molecular recognition. *Anal Chem*. 67(21): 663A-668A
- Michaud, M., E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset and E. Peyrin. 2003. A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (28): 8672–8679. DOI: 10.1021/ja034483t.

- Mishra, R. K., A. Hayat, C. Gaëlle, C. Ocaña, and J. L. Marty. 2015. A label free aptasensor for Ochratoxin A detection in cocoa beans: An application to chocolate industries. *Analytica Chimica Acta*, 889: 106–112.
- Pfeiffer, F. and G. Mayer. 2016. Selection and Biosensor Application of Aptamers for Small Molecules. *Frontiers in Chemistry*. 4: 25.
- Ruscito, A. and M. C. DeRosa. 2016. Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications. *Frontiers in Chemistry*. 4: 14.
- Tan, W., H. Wang, Y. Chen, X. Zhang, H. Zhu, C. Yang, R. Yang and C. Liu. 2011. Molecular aptamers for drug delivery. *Trends in Biotechnology*. 29(12): 634-640.
- Thanawuth P. 2011. Cytotoxic constituents from *dendrobium capillipes* and *dendrobium secundum*. Thesis (M.Ph.)--Chulalongkorn University.
- Tsai A.C., S. L. Pan, C. H. Liao, J. H. Guh, S. W. Wang, H. L. Sun, Y. N. Liu, C. C. Chen, C. C. Shen, Y. L. Chang and C. M. Teng. 2010. Moscatilin, a bibenzyl derivative from the India orchid *Dendrobium loddigesii*, suppresses tumor angiogenesis and growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett*. 292:163–170.
- Tuerk, C and L. Gold. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 249(4968): 505-510.
- Waminal, N., K. H. Ryu, S. H. Choi and H. H. Kim. 2013. Randomly Detected Genetically Modified (GM) Maize (*Zea mays* L.) near a Transport Route Revealed a Fragile 45S rDNA Phenotype. *PloS one*. 8: e74060.
- Wang, L., W. Ma, W. Chen, L. Liu and Y. Zhu. 2011. An aptamer-based chromatographic strip assay for sensitive toxin semi-quantitative detection. *Biosens. Bioelectron*. 26: 3059–3062.
- Wolter, O. and G. Mayer. 2017. Aptamers as Valuable Molecular Tools in Neurosciences. *J. Neurosci*. 37(10): 2517-2523. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1969-16.2017
- Wu, H., Zhang, Y., Zhu, C., Xiao, X., Zhou, X., Xu, W. Shen and M. Huang. 2012. Presence of CP4-EPSPS Component in Roundup Ready Soybean-Derived Food Products. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(2): 1919–1932.
- Yan, L. C. 2011. Screening and affinity analysis of the aptamers against the CP4-EPSPS transgenic protein. Master's thesis. Fujian Agriculture and Forestry University. China.
- Yang, D., X. Liu, Y. Zhou, L. Luo, J. Zhang, A. Huang, Q. Mao, X. Chen and L. Tang. 2017. Aptamer-based biosensors for detection of lead (II) ion: a review. *Anal. Methods*. 9: 1976-1990. DOI: 10.1039/C7AY00477J.
- Zhang, Y., H. Hong and W. Cai. 2011. Tumor-targeted drug delivery with aptamers. *Curr Med Chem*. 18(27): 4185-94.



## ตารางและภาพ

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการใช้แอปตาเมอร์ตรวจสอบสารโมเลกุลเล็ก ตั้งแต่ปี 2012 ถึง 2015

Aptamer Target	RNA/DNA	$K_d$ or LOD
(Z)-4-(3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidene)-1,2-dimethyl-1H-imidazol-5(4H)-one (DFHBI)	RNA	360 nM
17 $\beta$ -estradiol	DNA	0.9 $\mu$ M
17 $\beta$ -estradiol	DNA	50 nM
Aflatoxin B1	DNA	11.39 $\pm$ 1.27 nM
Aflatoxin B2	DNA	9.83 $\pm$ 0.99 nM
Aflatoxin B1	DNA	96.6 $\pm$ 8.6 nM
Aflatoxin M1		35.6 $\pm$ 2.9 nM
Anatoxin-A	DNA	81.3 $\pm$ 8 nM
Atrazine	DNA	0.62 $\pm$ 0.21 nM
Benzylguanine	RNA	219.1 $\pm$ 7.8 nM
Brevetoxin-2	DNA	42 nM
Bromacil	DNA	9.6 $\pm$ 7.8 nM
Cd (II)	DNA	34.5 nM
Danifloxacin	RNA	2.99 $\pm$ 2.12 nM
Fumonisin B1	DNA	62 $\pm$ 5 nM
Kanamycin A	DNA	3.9 $\mu$ M
Kanamycin A	DNA	2.8 $\mu$ M
Ketamine	DNA	0.59 $\mu$ M
Lysergamine	DNA	73 nM
Malathion	DNA	1.14 $\pm$ 0.7 nM
Methamphetamine	DNA	100.2 $\pm$ 16.9 nM
N-methyl mesoporphyrin (NMD)	DNA	0.88 $\pm$ 0.12 $\mu$ M
Ochratoxin A	DNA	110 $\pm$ 50 nM
Okadaic Acid	DNA	77 nM
Okadaic acid	DNA	1.05 nM
Organophosphorus pesticides	DNA	Phorate: 1.11 $\mu$ M Profenofos: 1 $\mu$ M Isocarbophos: 0.83 $\mu$ M Omethoate: 2 $\mu$ M
Oxytetracycline	DNA	4.7 nM
Pd II	DNA	4.60 $\pm$ 1.17 $\mu$ M
Polychlorinated biphenyls	DNA	4.02 $\pm$ 0.54 $\mu$ M
Polychlorinated biphenyls	DNA	66.36 $\pm$ 7 nM 99 $\pm$ 12 nM
Progesterone	DNA	9.63 $\pm$ 3.12 nM
T-2 toxin	DNA	20.8 $\pm$ 3.1 nM
Tebuconazole, inabenfide, and mefenacet	DNA	Inabenfide: 191 nM (LOD) tebuconazole 128 nM (LOD) mefenacet: 276 nM (LOD)
Tobramycin	DNA	150 nM
Zearalenone	DNA	29 $\pm$ 5 nM

ที่มา: Ruscito และ DeRosa, 2016

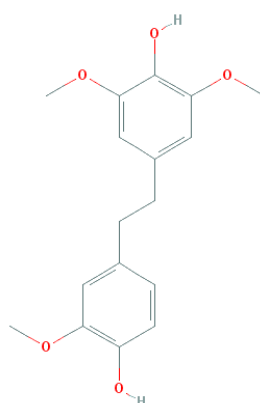
ตารางที่ 2 ปริมาณสาร moscatilin จากส่วนลำต้นและใบจากกล้วยไม้สกุลหวาย ขาวสนาน เอี้ยสกุล และขาว 5N วิเคราะห์ด้วยเทคนิค UHPLC

พันธุ์กล้วยไม้	ปริมาณสาร moscatilin (g/100g sample)	
	ลำต้น	ใบ
ขาวสนาน	0.015	0.013
เอี้ยสกุล	0.011	0.062
ขาว 5N	ND	ND

ตารางที่ 3 ผลการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐาน moscatilin เทียบกับบัฟเฟอร์ ด้วยวิธี indirect ELAA

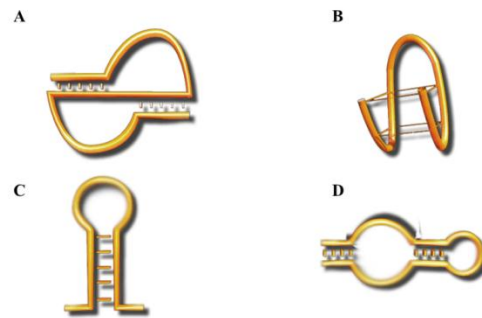
DNA aptamer	ค่า OD <sub>405</sub>		S/N ratio*
	สารมาตรฐาน moscatilin	บัฟเฟอร์	
MosA6	0.595	0.109	5.48
MosH4	0.293	0.139	2.10
MosH8	0.207	0.104	1.99
MosE6	0.176	0.126	1.39
MosB6	0.125	0.104	1.20
MosA3	0.113	0.103	1.10
MosA7	0.119	0.114	1.03

\*S/N ratio (signal-to-noise ratio) = OD<sub>405</sub> ของสารมาตรฐาน moscatilin / OD<sub>405</sub> ของบัฟเฟอร์



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ moscatilin

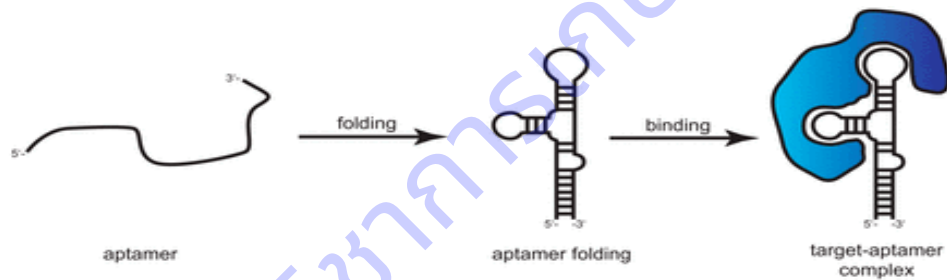




ภาพที่ 2 โครงสร้างทุติยภูมิของแอปตาเมอร์รูปแบบต่างๆ

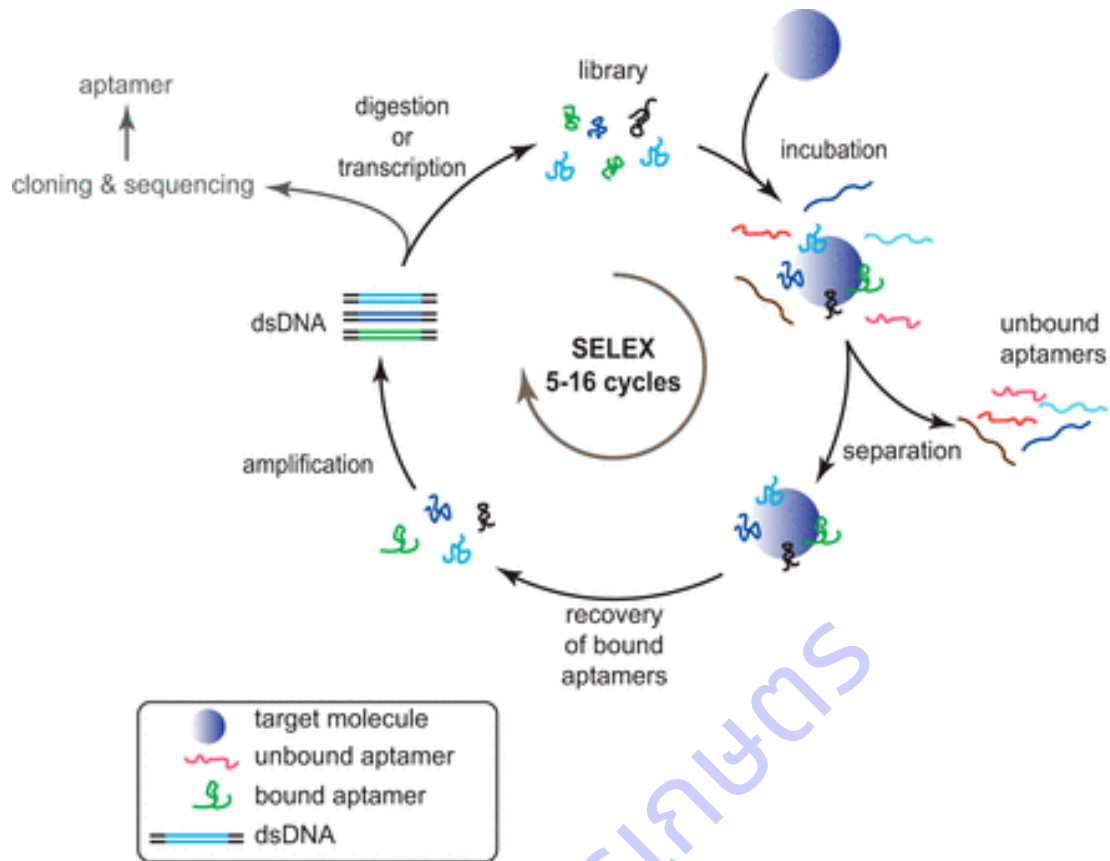
- A. แอปตาเมอร์รูปแบบ Pseudoknot มีความจำเพาะต่อ HIV-1 reverse transcriptase
- B. แอปตาเมอร์รูปแบบ G-quartet มีความจำเพาะต่อ thrombin
- C. แอปตาเมอร์รูปแบบ Hairpin มีความจำเพาะต่อ bacteriophage for T4 polymerase
- D. แอปตาเมอร์รูปแบบ Stem loop/bulge มีความจำเพาะต่อ ATP

ที่มา: McGown, *et al.* 1995

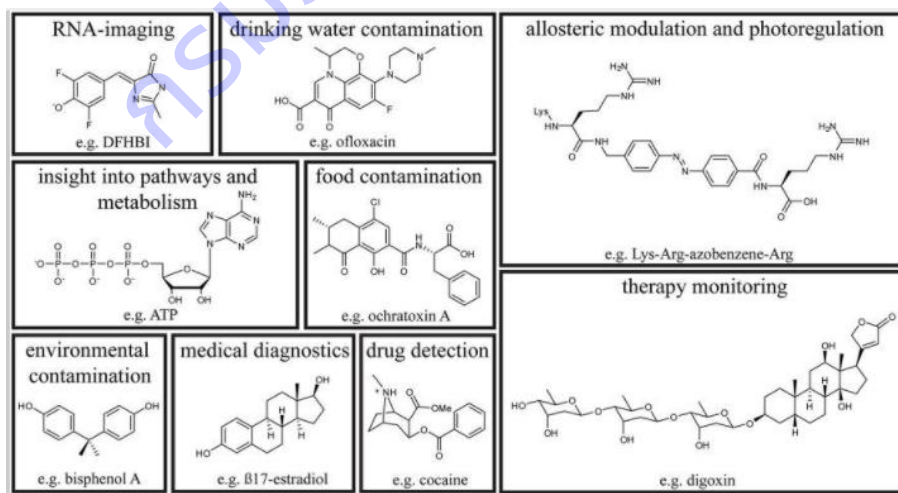


ภาพที่ 3 กลไกการค้นหาแอปตาเมอร์ต่อโปรตีนเป้าหมายตามขั้นตอนของ SELEX

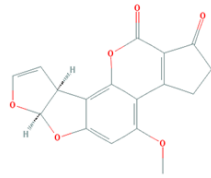
ที่มา: Wolter and Mayer, 2017



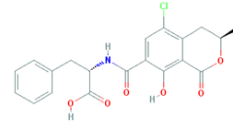
ภาพที่ 4 กลไกการค้นหาแอปตาเมอร์ต่อโมเลกุลเป้าหมายตามขั้นตอนของ SELEX  
ที่มา: Wolter and Mayer, 2017



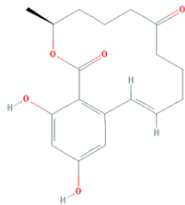
ภาพที่ 5 การใช้ประโยชน์จากแอปตาเมอร์ในด้านต่างๆ  
ที่มา: Pfeiffer และ Mayer, 2016



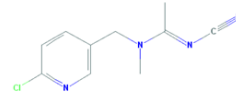
Aflatoxin B1, 312.277 g/mol  
(Castillo et al, 2015)



Ochratoxin A, 403.815 g/mol  
(Zhenzhen et al, 2014)



Zearalenone, 318.369 g/mol  
(Chen et al, 2012)



Acetamiprid, 222.676 g/mol  
(Shi et al, 2013)

ภาพที่ 6 สารโมเลกุลขนาดเล็กที่มีอนุพันธ์เบนซีนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง



ขาวสนาน



เอี้ยสกุล

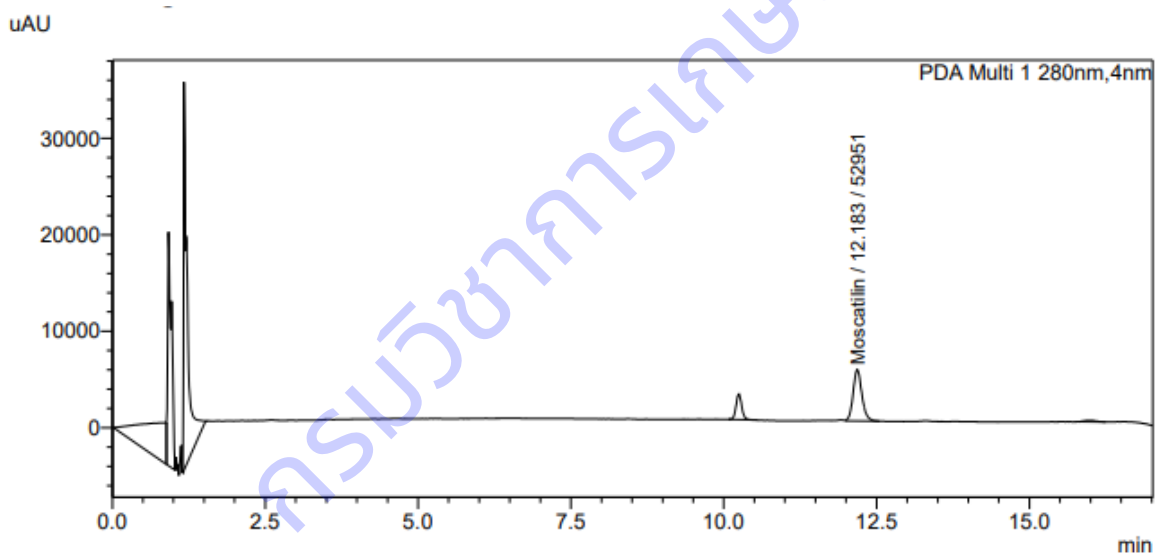


ขาว 5N

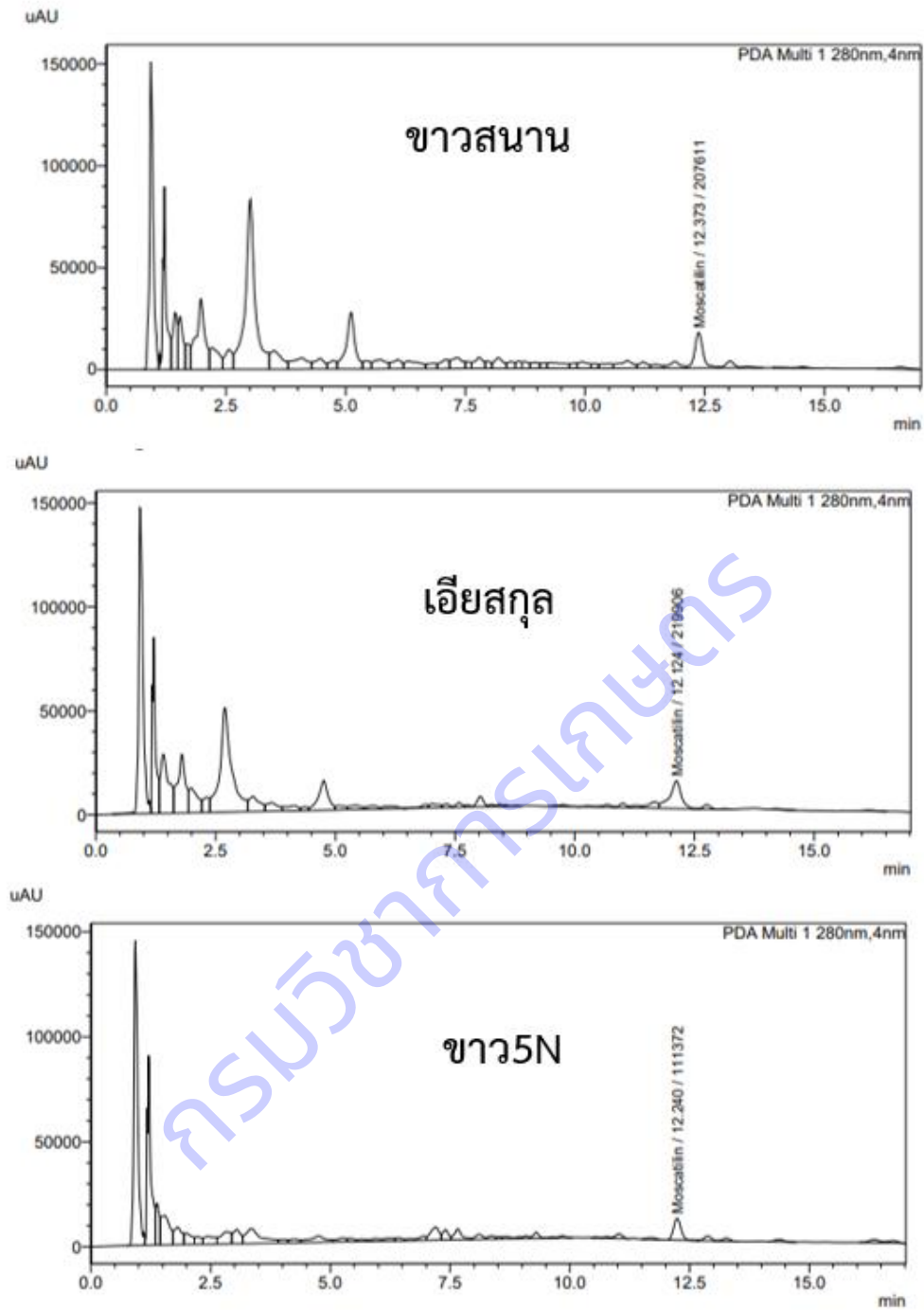
ภาพที่ 7 กล้วยไม้สกุลหวาย จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ขาวสนาน ขาว 5N และ เอี้ยสกุล



ภาพที่ 8 ส่วนลำต้นและใบของกล้วยไม้สกุลหวายที่ใช้ในการสกัดสาร moscatilin

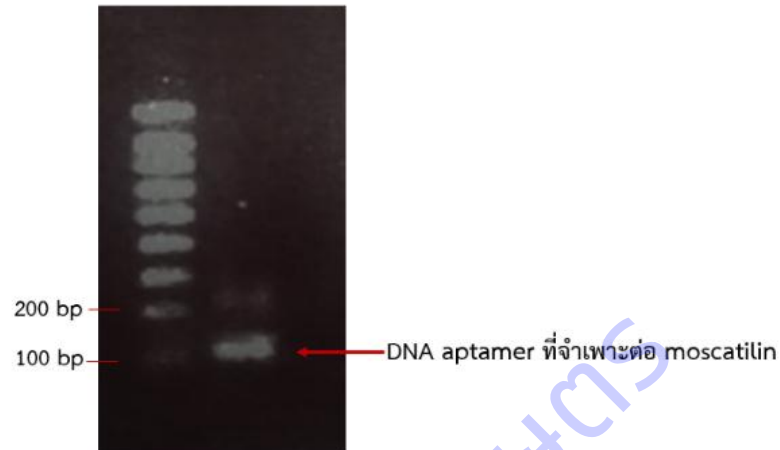


ภาพที่ 9 ลักษณะของโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน moscatilin ที่มีค่า retention time เท่ากับ 12.18

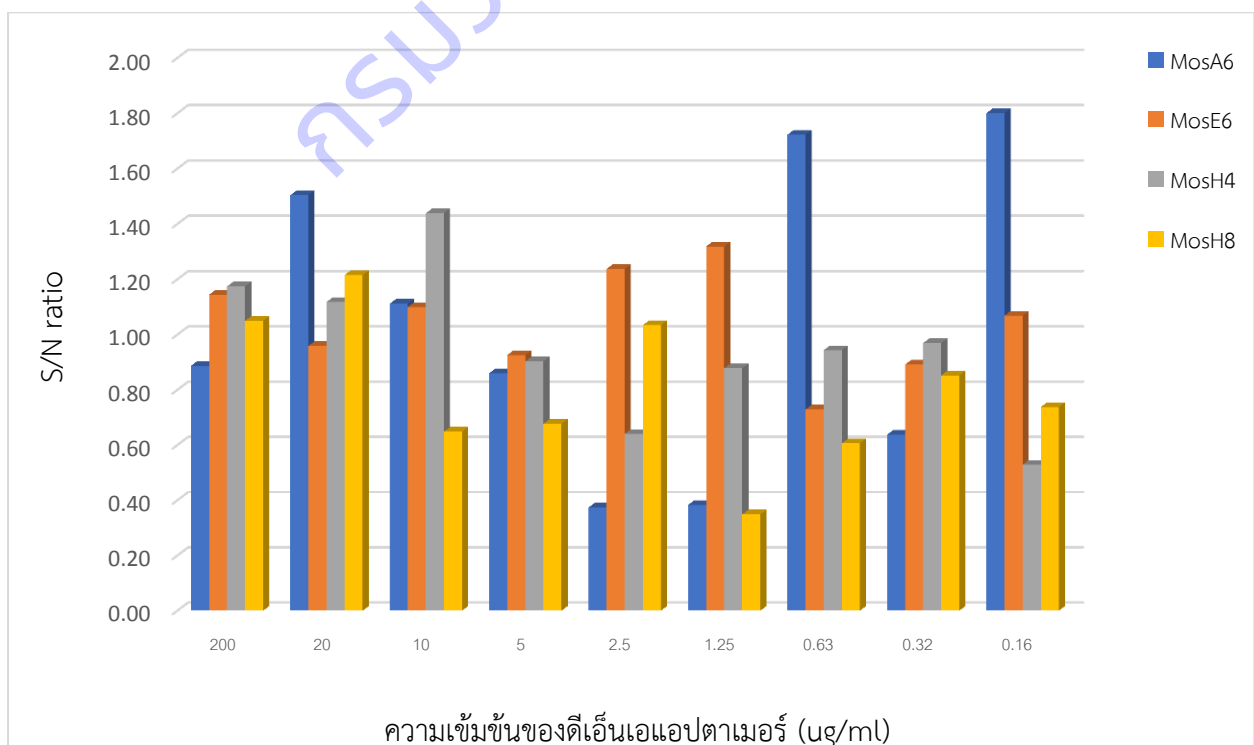


ภาพที่ 10 ลักษณะของโครมาโตแกรมของสาร moscatilin ในกล้วยไม้ (ข้าวสนาน เอียสกุล และข้าว 5N)

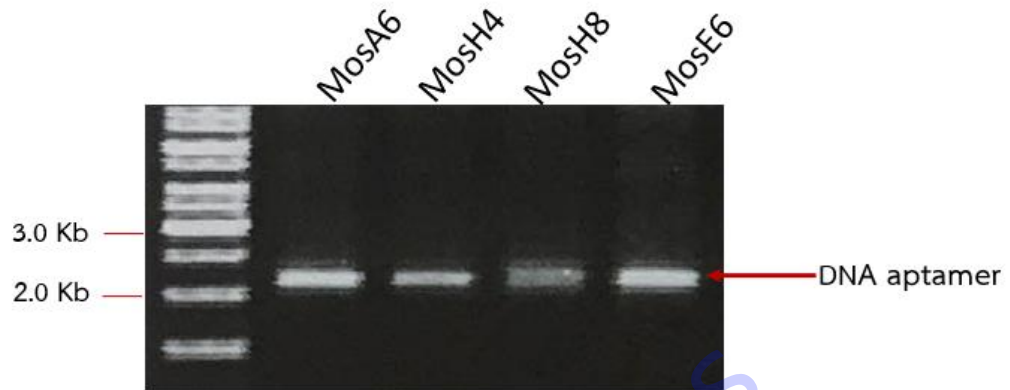
ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โดยบริเวณส่วนกลางประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม จำนวน 40 เมอร์ (N<sub>40</sub>)



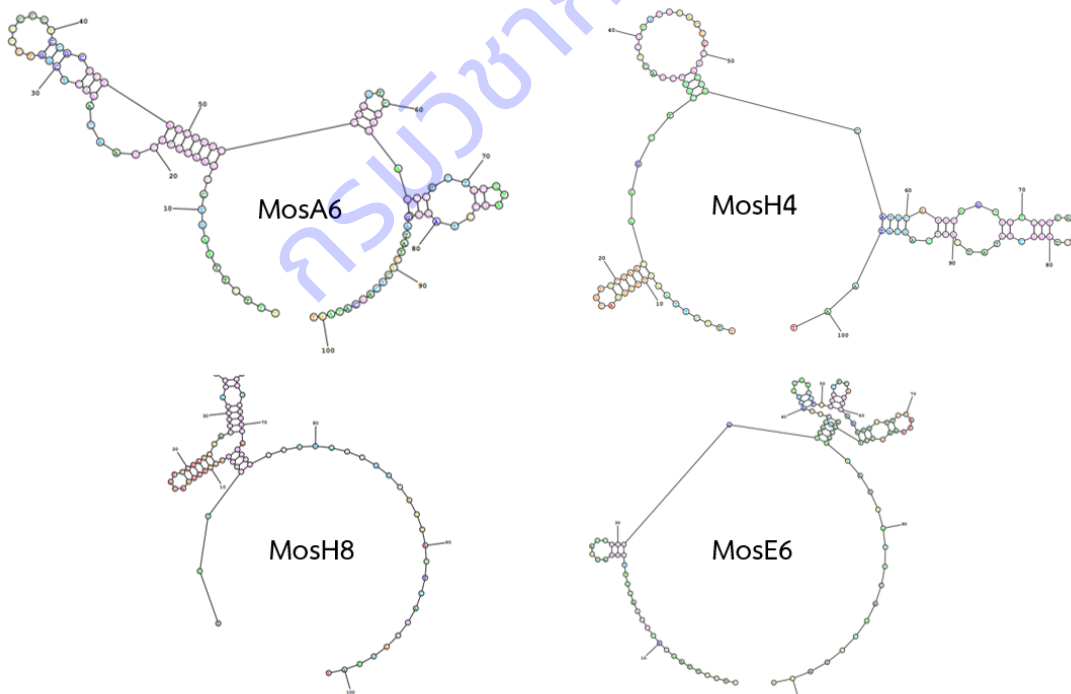
ภาพที่ 12 ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะกับสารมาตรฐาน moscatilin ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR หลังจากผ่านการคัดเลือกด้วยวิธี SELEX รอบที่ 14



ภาพที่ 13 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอสตาเมอร์ โคลน MosA6 MosH4 MosH8 และ MosE6 ด้วยวิธี ELAA ที่ความเข้มข้น 0.16 0.32 0.63 1.25 2.5 5.0 10.0 20.0 และ 200.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 14 พลาสมิดของดีเอ็นเอแอสตาเมอร์ต่อ moscatilin โคลน MosA6 MosH4 MosH8 และ MosE6

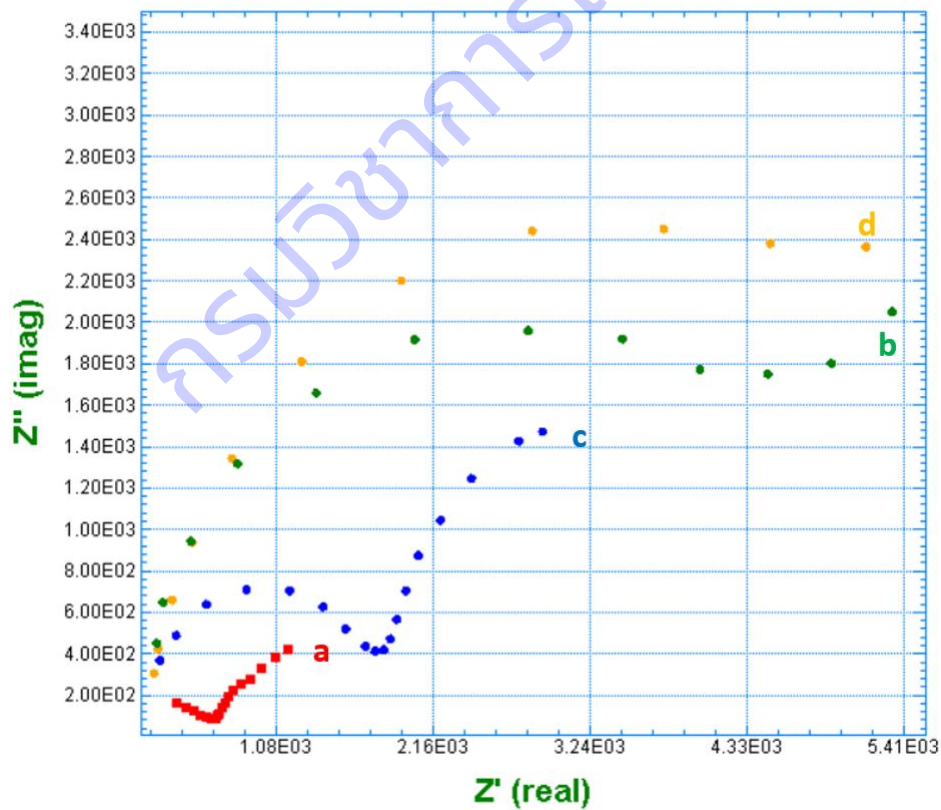


ภาพที่ 15 โครงสร้างทุติยภูมิของดีเอ็นเอแอสตาเมอร์ที่จับกับสาร moscatilin โคลน MosA6 MosH4 MosH8 และ MosE6 วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม RNA structure Web server (<http://RNAstructureWeb/Servers/Predict1/>).



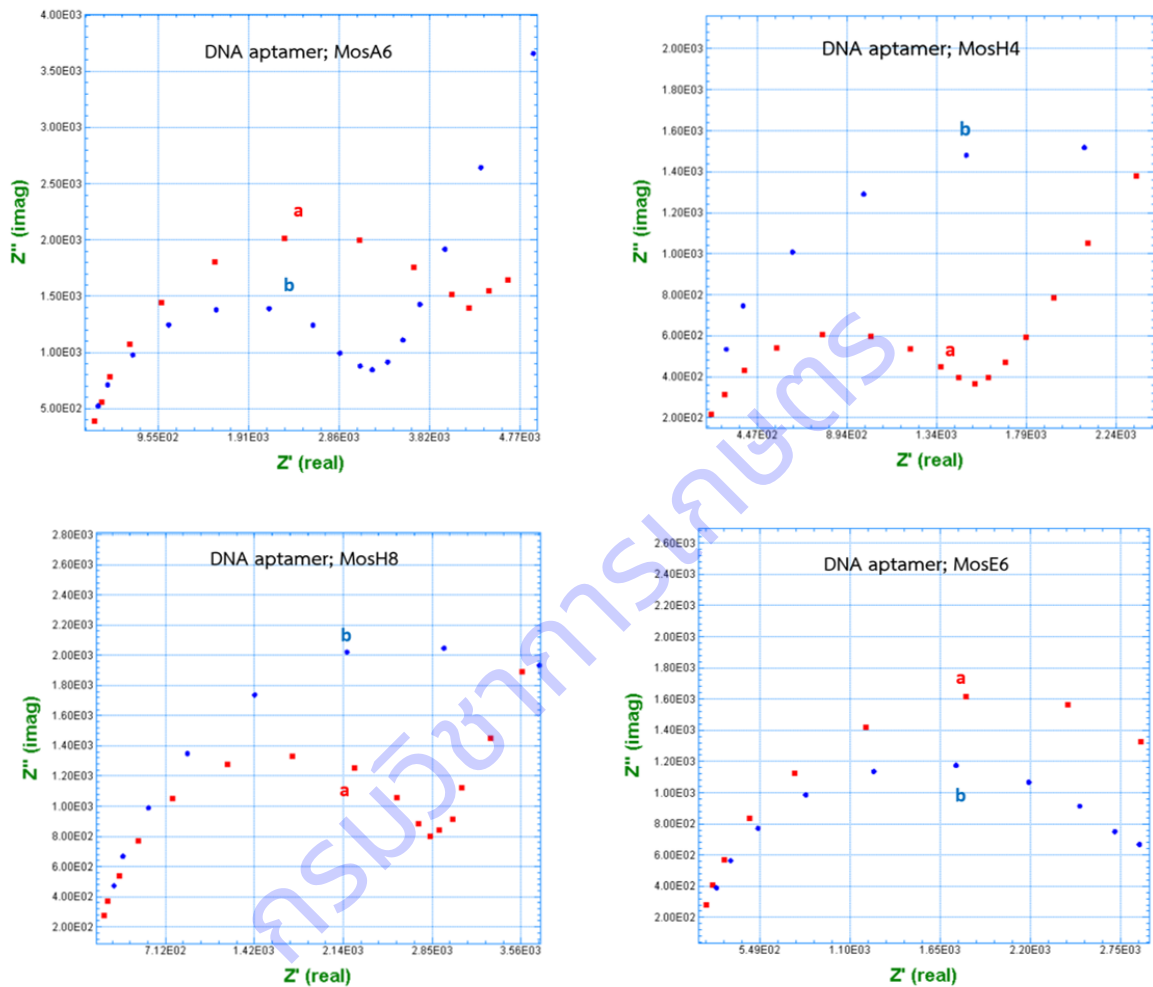


ภาพที่ 16 ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน (Screen printed carbon electrode; SPCE) แบบ 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้วไฟฟ้าเคาน์เตอร์ และขั้วไฟฟ้าอ้างอิง

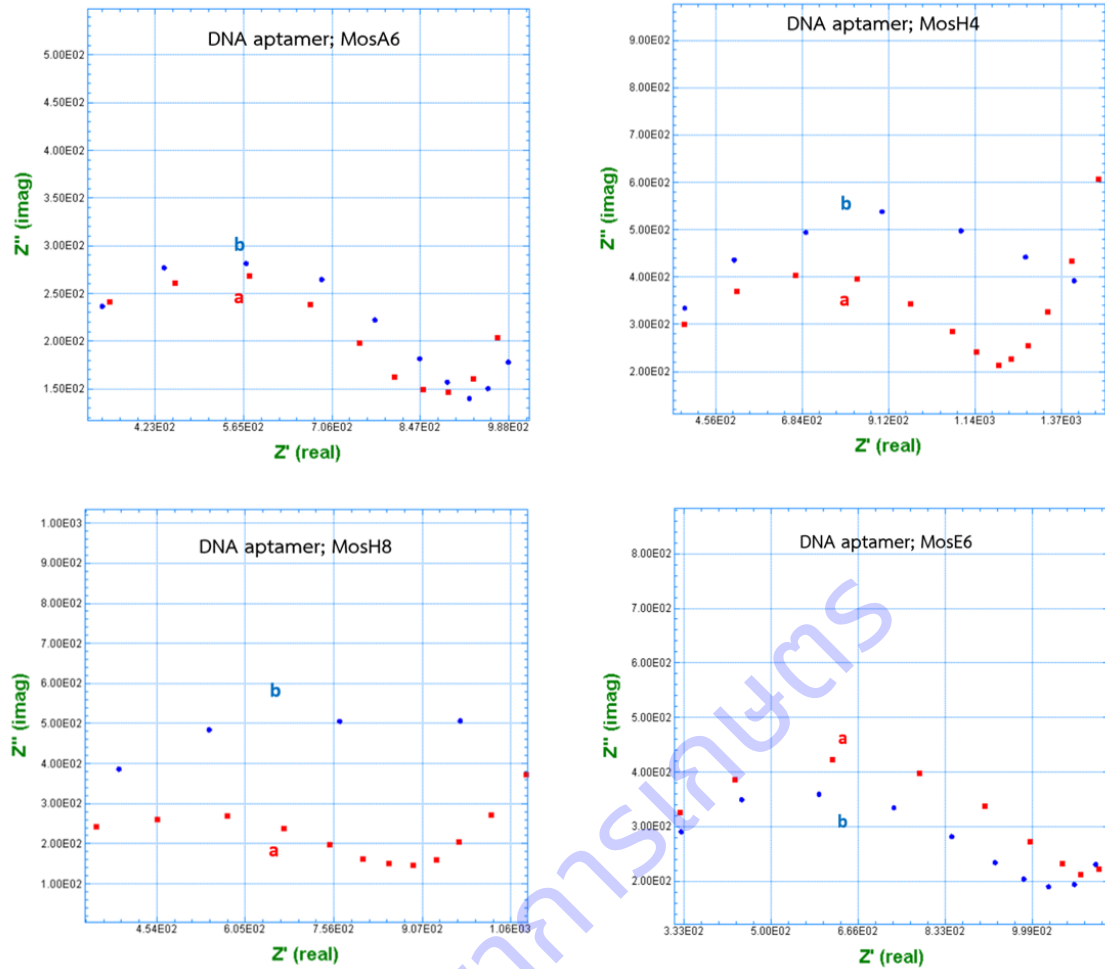


ภาพที่ 17 ค่าสเปกตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) ในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน (Screen printed carbon electrode; SPCE)

- (a) ปรับสภาพ SPCE ด้วย sulfuric acid ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ KCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
- (b) เคลือบขั้วไฟฟ้า SPCE ด้วย 4-carboxyphenyl diazonium salt
- (c) กระตุ้นขั้วไฟฟ้า SPCE ด้วย EDC เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์
- (d) ตรึงดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสาร moscatilin บนขั้วไฟฟ้า SPCE



ภาพที่ 18 ค่าสเปตตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) ของการทำปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ MosA6 MosH4 MosH8 และ MosE6 กับบัพเฟอร์ (a) และ สารมาตรฐาน moscatilin (b)



ภาพที่ 19 ค่าสเปตตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) ของการทำปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ MosA6 MosH4 MosH8 และ MosE6 กับน้ำคั้นจากกล้วยไม้สกุลหวาย ขาว 5N (a) และน้ำคั้นจากกล้วยไม้สกุลหวาย เอี้ยสกุล ซึ่งมีสาร moscatilin (b)

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลและการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Moscatilin ในกล้วยไม้  
 ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์  
 Development of Molecular Markers and the Analysis of Gene Involving in *Dendrobium* sp.  
 Using Transcriptomics Technology

อรุณทัย ซาววา ภูมรินทร์ วณิชชานันท์ อัจฉราพรรณ ใจเจริญ  
 ไพฑูรย์ บุปผาดา วิภาดา ศิริอนุสรณ์ศักดิ์  
 Aroonothai Sawwa Phummarin Wanichananan Adcharapun Chaicharoen  
 Phaitun Bupphada Wipada Siri-anusornsak

คำสำคัญ

ทรานสคริปโตมิกส์ เครื่องหมายโมเลกุล กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย  
 Transcriptomics, Molecular markers, Orchid *Dendrobium*

บทคัดย่อ

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกกล้วยไม้สกุลหวายมากที่สุดในโลก ปัจจุบันกล้วยไม้สกุลหวายที่มีศักยภาพในการใช้เป็นสมุนไพรยังขาดแคลนข้อมูลทางพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ และมีความต้องการเครื่องหมายโมเลกุลในระดับดีเอ็นเอมาช่วยในคัดเลือกพันธุ์ จำแนกพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ เพื่อประโยชน์ทางด้านสิทธิบัตร ปกป้องการแอบอ้างและปลอมปนวัตถุดิบที่ได้จากกล้วยไม้สกุลหวายที่มีศักยภาพเป็นสมุนไพร ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ เพื่อเข้าใจหน้าที่ของยีนต่อการสร้างสาร moscatilin และช่วยในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายได้แม่นยำและรวดเร็วยิ่งขึ้น จากการทดลองพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวसनาน และเอียสกุล มีลักษณะพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *Dendrobium catenatum* ที่ค่าความเหมือน 80.6 เมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนทั้งหมดพบการแสดงออกของยีนจำนวน 45,012 44,849 และ 29,209 ยีน ตามลำดับ และมีการแสดงออกของกลุ่มยีนมากที่สุด ได้แก่ กลุ่มยีนเกี่ยวกับ *Cell wall organization* (หรือ *biogenesis*) *response to stress* และ *lipid binding* สำหรับการทดสอบและประเมินความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ในรูปแบบ di-repeat และ tri-repeat ที่ให้ความแตกต่างระหว่าง ขาว5N, ขาวसनาน และเอียสกุล จำนวน 30 คู่ไพรเมอร์ พบมีเพียง 10 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ นอกจากนี้ผลการแสดงออกของยีนภายหลังการกระตุ้นด้วยแสง LED สีขาวร่วมกับสาร BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร พบสามารถเพิ่มปริมาณสาร moscatilin มากขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยการแสดงออกของยีนหลังการกระตุ้นด้วย BA พบว่ากล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลมีการแสดงออกของยีนมากกว่าขาว5N ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสาร moscatilin ที่พบในกล้วยไม้ลูกผสมเอียสกุลมากกว่าขาว5N

### Abstract

Thailand is the world's largest producer and exporter of *Dendrobium* orchids. Currently, the selection and breeding of these orchids with potential for herbal and medicinal use lack of genetic information. Moreover, there is a need for molecular markers at the DNA level to help in the selection of species, Classification, breeding, patents and plant protection, including of the impersonation and adulteration of raw materials obtained from potent herb *Dendrobium*. Therefore, the aims of this research were study and development of molecular marker of *Dendrobium* orchids using Transcriptomics technology. Including, to understand the function of genes involving the production of moscatilin, and assist in the development of molecular markers for more accurate and faster identification and reproduction of *Dendrobium*. Results, nucleotide sequences from three *Dendrobium* hybrids, Khaow-Sanan, Khaow-5N and Earsakul were closely related to *Dendrobium catenatum* at 80.6 homology. The analysis of whole genes expression showed 45,012 44,849 and 29,209 genes respectively. In addition, the highest expression of gene groups was Cell wall organization (biogenesis) response to stress, and lipid binding. Testing and evaluating the validity of 30 primer pairs of SSR markers in di-repeat and tri-repeat patterns that differentiates between species of three *Dendrobium* hybrids, were found 10 primer pairs could be amplification. Furthermore, the results of genes expression after stimulation by white LED light including with BA 1 mL/L. This stimulated could be increasing the amount of Moscatilin when compared with control. *Dendrobium* hybrid, Earsakul have higher genes express than *Dendrobium* hybrid, Khaow-5N. Similarly, the amount of Moscatilin was found more in *Dendrobium* hybrid, Earsakul than *Dendrobium* hybrid, Khaow-5N.

## บทนำ

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกกล้วยไม้สกุลหวายมากที่สุดของโลก โดยกล้วยไม้ที่ปลูกเป็นการค้าส่วนใหญ่มีการนำมาจากต่างประเทศเข้ามาพัฒนาจนได้พันธุ์ลูกผสมที่มีลักษณะเหมาะสมสำหรับปลูกเพื่อตัดดอกและจำหน่ายเป็นกล้วยไม้กระถางจำนวนมาก กล้วยไม้สกุลหวายตัดดอกที่ประเทศไทยส่งออกเป็นพันธุ์แรก คือ พันธุ์ปอมปาดัวร์ หรือหวายมาตาม ส่วนในปัจจุบันพันธุ์ที่นิยมปลูกกันมาก ได้แก่ พันธุ์บอมโม่แดง บอม 17 เอีย สกุล ขาวสนาน ขาวประวิทย์ แอนนา ซากุระ บุรณะเจด มีพื้นที่ปลูกกล้วยไม้ตัดดอกประมาณ 20,000 ไร่ เกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยงจำนวน 3,000 ราย ปัจจุบันสามารถผลิตกล้วยไม้ตัดดอกไม้ละกว่า 45,000 ต้น ผลผลิตประมาณครึ่งหนึ่งจำหน่ายตลาดภายในประเทศ ส่วนที่เหลือส่งไปจำหน่ายต่างประเทศ ทำรายได้ให้ประเทศประมาณ 2,500 ล้านบาท ตลาดที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อิตาลี สาธารณรัฐประชาชนจีนกล้วยไม้ตัดดอกที่ผลิตและส่งออก ประมาณร้อยละ 90 เป็นกล้วยไม้สกุลหวาย รองลงมาเป็นสกุลม็อคคาราออนซิเดียมออเรนดา และแวนดา (ศูนย์บริการการจัดการเครือข่ายข้อมูลกล้วยไม้, กรมส่งเสริมการเกษตร) ชาวจีนนำเอากล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) ใช้เป็นยาสมุนไพรมาหลายร้อยปีแล้ว ปัจจุบัน มีมากกว่า 50 ชนิด (species) ที่ใช้เป็นส่วนประกอบในตำรายาสมุนไพรจีน เช่น *D. officinale*, *D. loddigesii*, *D. fimbriatum*, *D. chrysanthum*, *D. candidum* และ *D. nobile* เป็นต้น (Teoh, 2016) สำหรับสรรพคุณมีหลากหลาย ได้แก่ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ต้านทานมะเร็ง เสริมสร้างการมองเห็น ลดระดับน้ำตาลในเลือด ส่งเสริมการหลั่งอินซูลินและเพิ่มความไวของอินซูลินใน ลดความเครียด เป็นยาชูกำลัง ถูกนำมาเป็นยาเพื่อบรรเทาโรคระเคาะอาหาร, ไข้, อักเสบ, ปวดและโรคลมชัก นอกจากนี้ยังใช้ในการรักษา โรคไขข้อ, เหงื่อที่มากเกินไป, ความอ่อนแอทางร่างกายที่นำมาเกี่ยวกับความกระหาย การตกขาวช่องคลอดและอาการปวดประจำเดือน ส่วนของกล้วยไม้ที่นำมาใช้ส่วนใหญ่ใช้ลำต้น โดยหันเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปตากแห้ง เวลารับประทานก็ชงน้ำร้อนแบบเดียวกับชา (Bulpitt *et al.*, 2007)

Moscatilin เป็นอนุพันธ์ของสาร bibenzy มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Tsai *et al.*, 2010) พรพรม และคณะ (2557) ได้ศึกษาสารบริสุทธิ์จากเอื้องคำฝอย (*Dendrobium brymerianum* Rchb. f.) และประเมินฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด KB ของสารสกัดที่แยกได้ สามารถแยกได้ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ moscatilin, flavanthrinin และ lusianthridin เมื่อนำสารทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบ พบว่า moscatilin มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งแรงที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ 50% (IC50) คือ 2.62  $\mu\text{M}$  ขณะที่ flavanthrinin และ lusianthridin มีฤทธิ์ปานกลาง โดยมีค่า IC50 79.67 และ 44.50  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ โดยใช้ ellipticine (IC50 5.00  $\mu\text{M}$ ) และ doxorubicin (IC50 1.44  $\mu\text{M}$ ) เป็นชุดควบคุมผลบวก

“โอมิกส์” หมายถึงการศึกษาแบบองค์รวมของสิ่งมีชีวิตบนฐานความรู้ด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ประกอบด้วย จีโนมิกส์ ว่าด้วยข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต ทรานสคริปโตมิกส์ เป็นความรู้ในเรื่องการแสดงออกของยีนทั้งหมดจากจีโนมซึ่งได้จากการศึกษาเอ็ม-อาร์เอ็นเอทั้งหมด โปรตีโอมิกส์ เป็นความรู้ในเรื่องการแสดงออกของยีนทั้งหมดจากจีโนม ซึ่งได้จากการศึกษาโปรตีนทั้งหมด ส่วนสุดท้ายคือ เมตาบอลอิมิกส์ เป็นการศึกษาความหลากหลายของสารเคมีในเซลล์ในขณะใดขณะหนึ่งว่ามีวิถีและกลไกที่สัมพันธ์กันอย่างไร สำหรับเทคโนโลยีจีโนมิกส์ในพืช ได้เริ่มพัฒนามาจากการศึกษาจีโนมมนุษย์ ทำให้เราเริ่มเข้าใจข้อมูลลำดับของดีเอ็นเอ และหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคและสุขภาพของมนุษย์ หลายปีต่อมาจึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีและเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์หน้าที่ของจีโนมขึ้นมาแทนที่วิธีการพีซีอาร์แบบเดิม เป็นแบบ next-generation sequencing ที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้จำนวนมากต่อครั้ง (high-throughput) (Gasperskaja and Kučinskis, 2017) การใช้เทคโนโลยีโอมิกส์ในกล้วยไม้สกุลหวายนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาองค์ประกอบของยีนบนจีโนม หรือแม้แต่หน้าที่ของยีนต่อบทบาทการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม การศึกษา



จีโนมของกล้วยไม้หวายด้วยเทคโนโลยีโอมิกส์ ได้มีการศึกษาในกล้วยไม้หวาย *Dendrobium Officinale* เป็นชนิดแรก ด้วยเทคโนโลยี Next Generation Sequencing (NGS) แบบ illumine Hiseq 2000 และ Third Generation Sequencing (TGS) โดยใช้ PacBio ทำให้เราทราบถึงกระบวนการสร้างสารประกอบที่มีสรรพคุณทางการแพทย์ ซึ่งพบว่ามียีน *SPS* และ *SuSy* จำนวน 2 copy ซึ่งยีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร alkaloid ทำให้สามารถสร้างสาร 16-epivellosimine ต่อไปได้ (Yan *et al.*, 2015) นอกจากนี้การศึกษาจีโนมในกล้วยไม้หวาย *Dendrobium catenatum* Lindl. พบเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ในส่วนของ exons ถึง 139,830 ตำแหน่ง (Zhang *et al.*, 2016) จะเห็นได้ว่าข้อมูลจากเทคโนโลยีโอมิกส์ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลจำนวนมาก จึงเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของกล้วยไม้หวายที่มีศักยภาพเป็นสมุนไพรของไทยได้

สำหรับการศึกษาทรานสคริปโตมิกส์เป็นการวิเคราะห์ หากกลุ่มยีนเป้าหมายที่มีการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อ ในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง หรือการเปรียบเทียบ การแสดงออกของกลุ่มยีนในเนื้อเยื่อ เป้าหมายภายใต้เงื่อนไขสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน (Wolf, 2013) เทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาองค์ประกอบรวมทั้งหมดของการสังเคราะห์เอ็ม-อาร์เอ็นเอ มีการศึกษาครั้งแรกในปี 1990 ซึ่งเป็นข้อมูลจากการถอดรหัสบนดีเอ็นเอ จะได้มาทั้งในส่วนที่สามารถแปลเป็นรหัสโปรตีนได้ (coding RNA) และไม่ได้ (non-coding RNA) เช่นส่วนของโปรโมเตอร์และสายนิวคลีโอไทด์ทางด้านสายโพลีเอ นิวตกรรมของเทคโนโลยีดังกล่าวแบ่งออกเป็นสองด้าน ได้แก่ เทคโนโลยีไมโครอะเรย์ (microarrays) เป็นเทคโนโลยีที่ทำการหาลำดับเบสที่คาดการณ์ไว้ล่วงหน้า และ อาร์เอ็นเอเสคว (RNA-seq) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ทำการจับทุกลำดับเบสแบบปริมาณมาก (high-throughput sequencing) (Lowe *et al.*, 2017) มีการศึกษาทรานสคริปโตมิกส์ โดยวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง dendrobine ในกล้วยไม้หวาย *Dendrobium nobile* Lindl. ที่ถูกทำลายด้วยเชื้อรา *Mycena sp.* พบมี 30 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร dendrobine ซึ่งยีน *AACT*, *MVD*, *PMK* และ *TPS21* เพิ่มขึ้นเมื่อถูกทำลายได้ 9 วัน (Li *et al.*, 2017) และจากการศึกษาในกล้วยไม้ *Dendrobium officinale* Kimura *et Migo* ในกระบวนการสร้างสาร alkaloid ทำการวิเคราะห์ในส่วนของ ESTs พบมียีนทั้งหมด 25 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง alkaloid backbone นอกจากนี้ยังพบเครื่องหมาย SSR ถึง 36,407 ตำแหน่งบนยีน (Gao *et al.*, 2013)

ประเทศไทยนับเป็นประเทศหนึ่งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งยังคงอุดมสมบูรณ์ไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชในวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) เป็นแหล่งแพร่กระจายพันธุ์และมีความหลากหลายทางด้านชนิดพันธุ์ของพืชในวงศ์กล้วยไม้จำนวนมากมาย กล้วยไม้สกุลหวายหลายชนิดมีฤทธิ์เป็นสมุนไพรในตำรายาจีน ใช้เป็นยาลดไข้ สมานแผล ลดการอักเสบ และเป็นยาบำรุงร่างกาย ทำให้พ่อค้าชาวจีนมีความต้องการต้นกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อไปสกัดสารและผลิตเป็นชาสมุนไพร การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางยาในกล้วยไม้สกุลหวาย เช่น ฤทธิ์ต้านทานการอักเสบ ฤทธิ์ในการต้านทานมะเร็ง ฤทธิ์ต้านทานอนุมูลอิสระ การรักษาโรคเบาหวาน ป้องกันสมองขาดเลือด เป็นต้น ซึ่งพบว่ากล้วยไม้สกุลหวายเป็นแหล่งของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ รวมถึงมีสารที่มีหมู่ phenol ในโครงสร้างที่น่าสนใจได้แก่สาร moscatilin ที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งแรงที่สุดเมื่อเทียบกับสารอื่นที่สกัดได้จากกล้วยไม้สกุลหวาย ปัจจุบันมีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางเภสัชในกล้วยไม้ถูกผสมสกุลหวายหลายชนิดพบว่ากล้วยไม้หวายขาว 5N มีปริมาณสาร moscatilin สูงที่สุดเมื่อเทียบกับ ขาวสนานและเอี้ยสกุล

ปัจจุบันการคัดเลือกพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายที่มีศักยภาพในการใช้เป็นสมุนไพรหรือใช้ประโยชน์ในทางเภสัชยังขาดแคลนข้อมูลทางพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ และมีความต้องการเครื่องหมายโมเลกุลในระดับดีเอ็นเอมาช่วยในคัดเลือกพันธุ์ จำแนกพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ เพื่อประโยชน์ทางด้านสิทธิบัตร ปกป้องการแอบอ้างและปลอมปนวัตถุดิบที่ได้จากกล้วยไม้สกุลหวายที่มีศักยภาพเป็นสมุนไพร เป็นต้น ดังนั้น การศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ จึงเป็นอีกหนึ่ง

ทางเลือกที่ใช้ศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอในภาพรวมทั้งหมด ทำให้เข้าใจหน้าที่ของยีนต่อการสร้างสาร moscatilin และช่วยในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายได้แม่นยำและรวดเร็วยิ่งขึ้น

## ระเบียบวิธีการวิจัย

### 1.วิธีการดำเนินการวิจัย

#### อุปกรณ์

1. สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุล ได้แก่ CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), Tris-HCl, Tag DNA polymerase, sodium EDTA, PVP (Polyvinylpyrrolidone), Acetic acid และ NaCl ฯลฯ
2. เครื่อง spectrophotometer
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ
4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง
5. ชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators
6. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 และ -80 องศาเซลเซียส

#### วิธีการ

### 1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์

#### 1.2 ตัวอย่างพืช

เลี้ยงต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ได้แก่ กล้วยไม้หวายขาว 5N (พบสาร moscatilin สูง) กล้วยไม้หวายขาวสนาน (พบสาร moscatilin ต่ำ) และกล้วยไม้หวายเอียงสกุล ชนิดละ 6 ต้น ภายในตู้ควบคุมสภาวะแวดล้อม (Growth Chamber) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 1 เดือน เก็บตัวอย่างใบเพื่อสกัดอาร์เอ็นเอรวมสำหรับการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมิกส์

#### 1.2 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบและลำต้นกล้วยไม้ โดยใช้ RNeasy Plant Mini Kit ของบริษัท Qiagen นำใบและลำต้น ปริมาณ 0.2 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ RLT ปริมาตร 450 ไมโครลิตร และ  $\beta$ -mercaptoethanol ผสมอยู่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่าสารละลายโดยการ vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นดูดสารละลายลงใน QIAshredder spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองด้วย QIAshredder spin column (ปริมาตรประมาณ 450 ไมโครลิตร) มาเติมลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม absolute ethanol 0.5 เท่าของส่วนใส ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีดูดขึ้นและลง แล้วดูดสารละลายดังกล่าวลงใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้งไป ล้าง column ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ RW<sub>1</sub> ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้ง ล้าง column อีกสองครั้งโดยการเติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้ง ปั่นเหวี่ยง column ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่เหลือค้างอยู่บน column ให้หมดไป ย้ายเฉพาะในส่วนของ column ไปวางลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เซอาร์เอ็นเอออกจาก column ด้วยการเติม RNase free water ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ที่มี RiboLock™ RNase Inhibitor ของบริษัท Fermentas ผสมอยู่ความเข้มข้น 0.04 ยูนิตต่อไมโครลิตร

### 1.3 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอรวมด้วยวิธีเจลอิเล็กโตโฟรีซิส (gel electrophoresis)

ทำการตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตโฟรีซิสโดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

### 1.6 การกำจัดไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA removal)

กำจัด rRNA ด้วยชุด RiboMinus™ Plant Kit for RNA-Seq โดยนำอาร์เอ็นเอรวมที่ได้มาติดกับโพรบ RiboMinus™ Probe ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปล่อยให้เย็น แล้วเติม RiboMinus™ Beads บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อให้ rRNA ติดกับโพรบ แล้วเทสารละลายทิ้ง (ทำซ้ำอีก 1 รอบ) จากนั้นเติม glycogen 3 M sodium acetate และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ที่ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่น 15 นาที แล้วล้างด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 2 รอบ ทิ้งไว้ให้แห้งละลายด้วยน้ำ DEPC

### 1.7 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สม (cDNA synthesis)

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สมด้วยชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit ยี่ห้อ Thermo โดยนำอาร์เอ็นเอรวมความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร 5 ไมโครลิตร เติมไพรเมอร์ oligo(dT)<sub>18</sub> 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DEPC 6.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำมาเติมบัฟเฟอร์ 5X reaction 4.5 ไมโครลิตร Ribolock™ RNase inhibitor 1 ไมโครลิตร 10mM dNTP mix 2 ไมโครลิตร และ RevertAid M-MuLV 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

### 1.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์

นำตัวอย่าง cDNA ที่ได้ใส่ในหลอด 1.5 ไมโครลิตร แล้วปิดฝาให้สนิทด้วยพาราฟิล์ม แล้วส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์โดยใช้เครื่อง Next Generation Sequencing รูปแบบ illumina ของบริษัทโนโวเจิน (Novogene) ประเทศจีน

### 1.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน และเปรียบเทียบหน้าที่ของยีนจากฐานข้อมูล Swiss-Prot database, Gene Ontology (GO), Eukaryotic Orthologous Groups of protein (KOG) และ Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genome (KEGG)

### 1.7 การค้นหาตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุล

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลและค้นหาตำแหน่ง SNP ที่เกิดการกลายไป และลักษณะการขาดหายหรือการเพิ่มเข้ามา (In/del) ของชิ้นส่วนยีนขนาดเล็กที่วิเคราะห์จากชิ้นส่วนของยีนหรือ mRNA โดยใช้โปรแกรม Samtools และ Picard แล้วทำการคัดกรองการอ่านซ้ำด้วยโปรแกรม Samtools/BCFtools ในการค้นหาตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP และ In/Del โดยตั้งไคเรททอรีตีวแปรผลเป็น Result/10 variant และทำการค้นหาตำแหน่งเครื่องหมาย SSR หรือ simple sequence repeat ที่มีชุดซ้ำของลำดับเบส 1-6 คู่เบส ทำการคำนวณความซ้ำของเบสด้วย MISA (V.1.0) ที่พารามิเตอร์ของลำดับเบสซ้ำที่ 1-10; 2-6; 3-5; 4-5; 5-5; 6-5

## 2. การทดสอบและประเมินความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุล

### 2.1 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างใบกล้วยไม้สกุลหวายสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ เป็นตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายที่ทำการศึกษาระดับปริญญาโทประกอบด้วยพันธุ์แล้วจำนวน 5 ชนิดๆ ละ 2 ต้น ได้แก่ ชาว5N, ชาวสนาน, ชาวเลอเวีย, เอียสกุล และ *D. officinale*

## 2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบกล้วยไม้หาวมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุโณทัยและคณะ (2552) ดังนี้ เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งใบ 5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Chloroform:Isoamyl alcohol(24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAc 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทั้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA(10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

## 2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) 2 ไมโครลิตร, 25 mM  $\text{MgCl}_2$  2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ (5 uM) อย่างละ 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 52-57 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ

## 2.4 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุล SNPs หรือ SSR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD) และทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุล SSR ด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System

## 3 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหาวที่กระตุ้นให้เพิ่มปริมาณสาร Moscatilin

### 3.1 ตัวอย่างพืช

นำ protocorm-like bodies (plbs) ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหาว ขาว5N มาเพาะเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คัดเลือกต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากระตุ้นให้เพิ่มสาร moscatilin โดยใช้ข้อมูลและกรรมวิธีจากการทดลองที่ 1 (เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) ที่มีการกระตุ้นให้สร้างสารมากที่สุด มาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จำนวน 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (control) กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหาวที่ให้แสง LED สีขาว และอาหารปราศจากสาร BA นาน 4 เดือน

กรรมวิธีที่ 2 ชุดเปรียบเทียบ กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่ให้แสง LED สีขาว และเติมสาร BA ความเข้มข้น 1 ml/l นาน 4 เดือน

3.2 การวิเคราะห์แสดงออกของยีนด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ นำตัวอย่างกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ขาว5N ที่ผ่านกรรมวิธี ทำตามวิธีการในขั้นตอนข้อที่ 1 ดังนี้

- การสกัดอาร์เอ็นเอรวม
- การตรวจสอบอาร์เอ็นเอรวมด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)
- การกำจัดไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA removal)
- การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สม (cDNA synthesis)
- การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์
- การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

3.3 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ moscatilin ในสารสกัดกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ขาว5N ที่ผ่านกรรมวิธี ด้วยเครื่อง Ultra-High Liquid Chromatograph (UHPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Shimadzu รุ่น Nexera-2 LD-30AD เครื่องตรวจวัดชนิด Photo diode array รุ่น SPD-M20A ระบบฉีดสารอัตโนมัติรุ่น SIL-30AC ตามสภาวะเครื่อง UHPLC ดังนี้

#### สภาวะเครื่อง UHPLC

คอลัมน์: GL Sciences InertSustainSwift C18 (150mm x 2.1mm x 1.9  $\mu$ m)

อุณหภูมิคอลัมน์: 30 $^{\circ}$ C

อัตราการไหล: 0.4 ml/min

ตัวพา: 1.5% acetic acid (ตัวพา A) และ methanol (ตัวพา B)

ด้วยระบบ gradient : 0–7 นาที 80% (A) และ 20% (B)

7–14 นาที 68% (A) และ 32% (B)

14–17 นาที 80% (A) และ 20% (B)

เครื่องตรวจวัด: PDA 280 nm

ปริมาตรการฉีด: 5  $\mu$ l

เวลาที่ใช้: 17 นาที

บันทึกผล ลักษณะโครมาโตแกรม ค่า retention time และคำนวณค่าปริมาณสาร moscatilin

### ผลการวิจัย

#### 1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์

จากการคัดเลือกตัวอย่างกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอี้ยสกุล อายุ 6 เดือน ที่มีขนาดลำต้นใกล้เคียงกันชนิดละ 6 ต้น ตามภาพที่ 1 เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม (Growth Chamber) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน แล้วทำการการทดสอบสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากชิ้นส่วนของต้นกล้วยไม้สกุลหวายขาว 5N ได้แก่ ใบ ต้น ราก พบว่าการสกัดอาร์เอ็นเอจากน้ำหนักชิ้นส่วนพืช 0.2 กรัม ด้วยชุดสกัด RNeasy Plant Mini Kit พบมีอาร์เอ็นเอมีความบริสุทธิ์อยู่ในค่าที่เหมาะสม แต่ได้ปริมาณอาร์เอ็นเอค่อนข้างน้อย (ภาพที่ 2) ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณชิ้นส่วนเริ่มต้นน้อยไป จึงได้ทำการทดสอบปริมาณการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบของกล้วยไม้สกุลหวายขาว 5N ที่น้ำหนัก 0.1 0.2 0.3 0.4 พบว่าเมื่อปริมาณชิ้นส่วนที่เพิ่มขึ้นปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้ยังมีความบริสุทธิ์และมีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย (ภาพที่ 3) ดังนั้นการใช้ตัวอย่างใบกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายจึงอยู่ที่น้ำหนัก 0.4 กรัม และถูกนำมาใช้ในการทดลอง



เมื่อทราบปริมาณที่เหมาะสมต่อการสกัดอาร์เอจากใบกล้วยแล้วจึงได้นำใบกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอียสกุล ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ (ภาพที่ 4) เพื่อให้ได้ปริมาณที่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ โดยได้ทำการกำจัด rRNA และสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สม (cDNA) จากนั้นจึงจะนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์โดยใช้เครื่อง Next Generation Sequencing

เทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์เป็นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์องค์รวมของอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่ได้ การวิเคราะห์ผลในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอียสกุล พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด มีค่าความเหมือน (identity) กับ *Dendrobium catenatum Phalaenopsis equestris Quercus suber Apostasia shenzhenica* และ *Vitis vinifera* ที่ 80.6 7.1 1.8 1.6 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 5) การแสดงออกของยีนในสภาพแวดล้อมเดียวกันพบกล้วยไม้สกุลหวาย ขาว 5N เอียสกุล และขาวสนาน มีการแสดงออกของยีนจำนวน 45,012 44,849 และ 29,209 ยีน ตามลำดับ โดยมียีนที่แสดงออกเหมือนกันในกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 3 ชนิด อยู่ที่ 23,158 ยีน (ภาพที่ 6)

การค้นหาคำศัพท์และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนด้วย Gene Ontology (GO) เป็นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนที่แสดงออกในรูปแบบของปฏิสัมพันธ์กันของยีนในโครงข่ายแบบ GO ที่รวบรวมความหมายและหน้าที่ของยีนจากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ไว้ เพื่อช่วยในการค้นหาคำศัพท์และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ต้องการ เช่น การสร้างสารสำคัญ ความต้านทานโรค ความต้านทานต่อสภาวะเครียดต่างๆ เป็นต้น การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และปริมาณการแสดงออกของยีนทั้งหมดจากกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม 2 ชนิด ได้แก่ ขาว 5 N ที่มีสาร moscatilin สูง และขาวสนานที่มีสาร moscatilin ต่ำ กับแหล่งข้อมูลยีนอ้างอิง Gene Ontology (GO) พบมีการแสดงออกของกลุ่มยีนมากที่สุด ได้แก่ กลุ่มยีนเกี่ยวกับ Cell wall organization (หรือ biogenesis) response to stress และ lipid binding ตามลำดับ (ภาพที่ 7) โดยมีอัตราส่วนของยีนในกลุ่ม oxidoreductase activity และ response to stress มากที่สุด (ภาพที่ 8) ซึ่งยีนในกลุ่มดังกล่าวพบเกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในพืช มีทั้งลักษณะไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างหรือลดระดับการสร้างสารทุติยภูมิได้ (Zhang *et al.*, 2013)

จากนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลจากฐานข้อมูล KEGG หรือ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมข้อมูลทางชีวโมเลกุลเช่นเดียวกับ NCBI แต่มุ่งเน้นเพื่อ สนับสนุนการศึกษาทางด้าน System Biology จึงมีข้อมูลที่ต่างกับ NCBI และมีฐานข้อมูลย่อยเป็นของ KEGG เอง เช่น REACTIONS หรือฐานข้อมูล ของปฏิกิริยาเคมีในกระบวนการของเซลล์และ PATHWAYS ซึ่งเป็น ฐานข้อมูลของกระบวนการทำงานของเซลล์ ที่แบ่งออกเป็นหมวดหมู่ และ เป็นฐานข้อมูลที่ IDEP ใช้เพื่อเรียกดูข้อมูลการทำงานร่วมกันของยีน ทั้งนี้ KEGG สามารถเชื่อมต่อกับฐานข้อมูลยีนใน NCBI ด้วยข้อมูลของยีนและ สายดีเอ็นเอเท่านั้น และมีจุดเด่นคือการเรียกดูข้อมูลทุกอย่างตามชนิดของ สิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้ โดยสามารถเรียกดูข้อมูลได้จาก Web Services เช่นเดียวกับ NCBI พบการเปรียบเทียบระหว่างกล้วยไม้สกุลหวาย 2 ชนิด ที่มีสาร moscatilin สูง คือ ขาว 5 N และที่มีสาร moscatilin ต่ำ คือ ขาวสนาน มีการทำงานภายในเซลล์ของกลุ่มยีน Tryptophan metabolism Glyoxylate and dicarboxylate metabolism และ limonene and pinene degradation สูงสุดตามลำดับ (ภาพที่ 9) และมีอัตราส่วนของกลุ่มยีน Carbon metabolism Glyoxylate and dicarboxylate metabolism และ Tryptophan metabolism มากที่สุด (ภาพที่ 10) มีการรายงานกลุ่มยีน Carbon metabolism Glyoxylate and dicarboxylate metabolism ว่าช่วยกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิในพืชโดยผลจากสภาวะเครียดของพืชต่อปัจจัยสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสง อุณหภูมิ เป็นต้น (Zandalinas *et al.*, 2017) สำหรับกลุ่มยีน Tryptophan metabolism มีรายงานว่ากลไกการเคลื่อนย้ายสาร Tryptophan ส่งผลให้กระบวนการสร้างสารอะโรมาติก (aromatic) ในข้าวซึ่งเป็นอีกหนึ่งกลไกในการสร้างสารสำคัญสำหรับพืช (Ishihara *et*



al.,2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมว่าหน้าที่ของ Tryptophan เป็นอีกกลไกในการสร้างสารทุติยภูมิซึ่งเกิดจากการตอบสนองความต้านทานต่อเชื้อโรคในข้าว (Ishihara *et al.*,2011)

## 2. การวิเคราะห์และค้นตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุล

การวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP (Single Nucleotide Polymorphism) และ In/Del (Insertion/Deletion) นำข้อมูลการวิเคราะห์ลำดับเบสจากเครื่อง Next generation sequencing มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลและค้นหาตำแหน่ง SNP ที่เกิดการกลายไป เมื่อเทียบกับตัวอย่างจีโนมอ้างอิง *Dendrobium catenatum* (assembly ASM160598v2) (ภาพที่ 11) ร่วมกับวิเคราะห์หาการกลายในลักษณะการขาดหายหรือการเพิ่มเข้ามา In/del ของชิ้นส่วนยีนขนาดเล็กที่วิเคราะห์จากชิ้นส่วนของ mRNA โดยใช้โปรแกรม Samtools และ Picard แล้วทำการคัดกรองการอ่านซ้ำด้วยโปรแกรม Samtools/BCFtools ในการค้นหาตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP และ In/Del โดยตั้งไคเรกทอรีตัวแปรผลเป็น Result/10 variant ผลการวิเคราะห์พบตำแหน่งเครื่องหมาย SNP จำนวน 518,051 ตำแหน่ง และเครื่องหมาย In/del จำนวน 49,159 ตำแหน่ง

เครื่องหมายโมเลกุลในรูปแบบ In/del เป็นลักษณะของการแทรกเข้ามาของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Insertion) หรือการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ (deletion) อาจส่งผลกระทบต่อแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตให้แตกต่างจากเดิมได้ การทดลองนี้จึงได้วิเคราะห์หาตำแหน่ง In/del ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อชนิดของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายทั้ง 3 ชนิด ชนิดละ 4 ตำแหน่งจากข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมิกส์ เมื่อทำการคัดเลือกมาได้แล้วทำการค้นหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 12) แล้วทำการออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อกล้วยไม้ลูกผสมชาวสนาน ได้แก่ WS1T/A WS2T/G WS3A/A และ WS4G/A ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อกล้วยไม้ลูกผสมชาว5N ได้แก่ 5N1A/C 5N2C/T 5N3T/C และ 5N4T/T สำหรับไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อกล้วยไม้ลูกผสมเอียสกุล ได้แก่ ES1T/A ES2T/A ES3G/G และ ES4T/T (ตารางที่ 1) โดยไพรเมอร์ที่ได้เป็นข้อมูลที่สามารถนำไปต่อยอดในการทดสอบหาลักษณะประจำพันธุ์ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายได้ในอนาคต

สำหรับเครื่องหมาย SSR หรือ simple sequence repeat ถูกพัฒนามาจากชุดลำดับเบสซ้ำที่กระจายทั่วจีโนมของพืช สำหรับเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ การได้มาของเครื่องหมาย SSR พัฒนามาจากลำดับเบสซ้ำบนยีน เนื่องการเป็นการวิเคราะห์จากชิ้นส่วน mRNA โดยมีชุดซ้ำของลำดับเบส 1-6 คู่เบส ทำการคำนวณความซ้ำของเบสด้วย MISA (V.1.0) ที่พารามิเตอร์ของลำดับเบสซ้ำที่ 1-10; 2-6; 3-5; 4-5; 5-5; 6-5 ได้ตำแหน่งลำดับเบสซ้ำที่เป็นตัวแทนของเครื่องหมาย SSR ทั้งสิ้นจำนวน 15,973 ตำแหน่ง จากนั้นนำมาวิเคราะห์และคัดเลือกตำแหน่งเบสซ้ำ ในรูปแบบ di-repeat tri-repeat tetra-repeat และ penta-repeat แล้วเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนยีนที่ได้จากกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมทั้ง 3 ชนิด และคัดเลือกเฉพาะ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของกล้วยไม้ พบมีจำนวน 9,064 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป

## 2. การทดสอบและประเมินความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุล

เก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้สกุลหวายได้จำนวน 5 ชนิดๆ ละ 2 ต้น ได้แก่ ขาว5N, ขาวสนาน, ขาวเลอเวีย, เอียสกุล และ *D. officinale* นำตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุณทัย และคณะ (2552) ได้ดีเอ็นเอที่มีค่าความเข้มข้น (Optical Density) ที่ความยาวคลื่นแสงที่ A260/A280 อยู่ในช่วง 1.8 -2.0 (ภาพที่ 13) ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำไปใช้ในการทดสอบไพรเมอร์เพื่อประเมินลักษณะทางพันธุกรรม

การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลทำการคัดเลือกตำแหน่งเครื่องหมายชนิด SSR (Simple Sequence Repeat) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์พบตำแหน่ง SSR ในรูปแบบ di-repeat tri-repeat tetra-repeat และ penta-repeat ทั้งสิ้น 9,064 ตำแหน่ง ที่ให้ความแตกต่างระหว่าง ขาว5N, ขาวสนาน และเอียสกุล จึงทำการคัดเลือกมาทดสอบจำนวน 30 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.2) เพื่อใช้ทดสอบและประเมินเครื่องหมายดังกล่าวด้วยวิธีพีซีอาร์

การทดสอบและประเมินเครื่องหมายดังกล่าวด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่าคู่ไพรเมอร์ที่ได้จากเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์จำนวน 30 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์เพียง 10 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 2 5 8 12 13 14 18 25 27 และ 29 (ภาพที่ 14) ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีจำนวนซ้ำของตำแหน่ง Repeat ชนิด di-repeat และ tri-repeat อาจให้ความแตกต่างของจำนวนเบสต่ำกว่า 20 เบส จึงทำให้การแสดงผลบนเจลอะกาโรสยังมองไม่เห็น ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ ทั้งนี้การทดสอบเครื่องหมายชนิด SSR มีเทคโนโลยีและเครื่องมือที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำกว่า 20 เบส แต่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เนื่องด้วยในการวิจัยในปี 2563 มีการปรับลดงบประมาณลง จึงได้เลือกการทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ที่มีค่าใช้จ่ายน้อย อย่างไรก็ตามข้อมูลไพรเมอร์ที่ได้จากเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์สามารถนำมาเป็นฐานข้อมูลเพื่อนำไปศึกษาลักษณะพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายได้ในอนาคต

## 3. การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่กระตุ้นให้เพิ่มปริมาณสาร moscatilin

การศึกษาการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวายที่ผ่านการทดสอบว่าสามารถกระตุ้นให้เพิ่มสาร moscatilin จากการทดลองที่ 1 (เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) ซึ่งพบว่ามี 2 ชนิดที่สามารถกระตุ้นให้เพิ่มสาร moscatilin ได้ คือ ขาว5N และเอียสกุล จึงได้นำมากระตุ้นด้วยแสง LED สีขาว ร่วมกับสาร BA 1 ml/l ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Vacin and Went นาน 4 เดือน (ภาพที่ 15) เมื่อครบกำหนดระยะเวลานำตัวอย่างกล้วยไม้ลูกผสมทั้งสองชนิดมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม (ภาพที่ 16) เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและกลุ่มยีนด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ และวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ด้วยเครื่อง Ultra-High Liquid Chromatograph (UHPLC) พบสาร BA สามารถกระตุ้นให้สาร moscatilin เพิ่มขึ้นในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายทั้งสองชนิด ซึ่งกล้วยไม้ลูกผสมขาว5N เมื่อกระตุ้นด้วยสาร BA นาน 4 เดือน ปริมาณสาร moscatilin เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมจาก 0.0518 กรัม/100 กรัมตัวอย่าง เป็น 0.1129 กรัม/100 กรัมตัวอย่าง สำหรับกล้วยไม้ลูกผสมเอียสกุล ปริมาณสาร moscatilin เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมจาก 0.1078 กรัม/100 กรัมตัวอย่าง เป็น 0.1577 กรัม/100 กรัมตัวอย่าง (ตารางที่ 3 และภาพที่ 17) จะเห็นได้ว่าสาร BA ในสภาวะแสง LED สีขาวสามารถช่วยกระตุ้นให้กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายผลิตสาร moscatilin เพิ่มขึ้น เป็นแนวทางในการช่วยกระตุ้นลูกกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายในการผลิตสาร moscatilin ต่อไปในอนาคต

เมื่อศึกษาองค์รวมของอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ พบว่าการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ขาว5N มีการแสดงออกของยีนสูงสุดแบบ up-regulation ในกลุ่มยีน Quorum

sensing, Biosynthesis of amino acid, Phenylpropanoid biosynthesis และ Nitrogen metabolism สำหรับการแสดงออกของยีนแบบ down-regulation ได้แก่ *Vibrio cholera* infection, Rheumatoid arthritis, Lysosome, Synaptic vesicle cycle, Epithelial cell signaling, Oxidative phosphorylation และ Collecting duct acid secretion (ภาพที่ 3.18) การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ในกล้วยไม้ลูกผสมขาว5N พบเมื่อกระตุ้นด้วยแสง LED สีขาวร่วมกับสาร BA 1 ml/L นาน 4 เดือน มีการแสดงออกของยีนจำนวน 9 ยีน และหายไปจำนวน 7 ยีน (ตารางที่ 4)

การแสดงออกของยีนในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายเอื้องสกุล พบการแสดงออกของยีนสูงสุดแบบ up-regulation ได้แก่ Phenylpropanoid biosynthesis, Flavonoid biosynthesis, Phenylalanine metabolism, Stilbenoid diarylthptanoid and gingerol และ pentose and glucuronate interconversions สำหรับการแสดงออกของยีนสูงสุดแบบ down-regulation ได้แก่ Tropane piperidine and pyridine alkaloid, Isoquinoline alkaloid biosynthesis, Plant hormone signal transduction, Lysosome, Tyrosine metabolism และ Beta-Alanine metabolism (ภาพที่ 19) การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ในกล้วยไม้ลูกผสมเอื้องสกุล พบเมื่อกระตุ้นด้วยแสง LED สีขาวร่วมกับสาร BA 1 ml/L นาน 4 เดือน มีการแสดงออกของยีนจำนวน 79 ยีน และหายไปจำนวน 18 ยีน (ตารางที่ 5) จะเห็นได้ว่าการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้ลูกผสมเอื้องสกุลมีการแสดงออกและหายไปมากกว่าในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายขาว5N ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสาร moscatilin ที่ได้ในกล้วยไม้ลูกผสมเอื้องสกุลที่มีมากกว่ากล้วยไม้ลูกผสมขาว5N นอกจากนี้การแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นมากที่สุดในกล้วยไม้ลูกผสมเอื้องสกุล คือ hypothetical protein ซึ่งมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิภายใต้สภาวะเครียดจากความเป็นพิษของแมงกานีสในพืชตระกูลกล้วย (Jia *et al.*, 2020) อย่างไรก็ตามสาร BA อยู่ในกลุ่มฮอร์โมนไซโตไคนินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช เมื่อทำงานร่วมกับสารเสริม (elicitor) ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะส่งผลต่อการสังเคราะห์สารทุติยภูมิโดยไม่จำเป็นต้องดัดแปลงพันธุกรรมของพืชได้ (Govindaraju และ Indra Arulselvi, 2018)

### อภิปรายผล

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ ทำให้ทราบข้อมูลการแสดงออกของยีนแบบองค์รวมทั้งหมด พร้อมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ให้ความแตกต่าง (Polymorphism) ระหว่างตัวอย่างกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่ทำการวิเคราะห์ ซึ่งการแสดงออกของยีนที่พบทำให้ทราบถึงหน้าที่และกลไกของยีนที่มีผลต่อกิจกรรมภายในพืช นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้เฉพาะเจาะจงต่อชนิดของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย สามารถนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลตำแหน่งเครื่องหมายเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ประเมินลักษณะทางพันธุกรรม ระบุ หรือจำแนกกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายได้ต่อไป

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอื้องสกุล มีการแสดงออกของยีนจำนวน 45,012 44,849 และ 29,209 ยีน ตามลำดับ โดยมียีนที่แสดงออกเหมือนกันจำนวน 23,158 ยีน การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนในตัวหนกล้วยไม้หวายที่มีสาร moscatilin สูง คือ ขาว 5 N และสาร moscatilin ต่ำ คือ ขาวสนาน มีการแสดงออกของกลุ่มยีนเกี่ยวกับ Cell wall organization (หรือ biogenesis) response to stress และ lipid binding มากที่สุดตามลำดับ มีอัตราส่วนของยีนในกลุ่ม oxidoreductase activity และ

response to stress มากที่สุด นอกจากนี้มีการทำงานภายในเซลล์ของกลุ่มยีน Tryptophan metabolism Glyoxylate and dicarboxylate metabolism และ limonene and pinene degradation สูงสุดตามลำดับ และมีอัตราส่วนของกลุ่มยีน Carbon metabolism Glyoxylate and dicarboxylate metabolism และ Tryptophan metabolism มากที่สุด เมื่อวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุล พบตำแหน่งเครื่องหมายชนิด SNP จำนวน 518,051 ตำแหน่ง เครื่องหมายชนิด SNP แบบ In/del จำนวน 49,159 ตำแหน่ง ซึ่งข้อมูลตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลที่พบสามารถนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลตำแหน่งเครื่องหมายเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ประเมินลักษณะทางพันธุกรรม ระบุ หรือจำแนกกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายได้ต่อไป

2. การทดสอบและประเมินความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุล ได้ออกแบบไพรเมอร์จากเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย โดยคาดการณ์ด้วยเทคนิคทางด้านชีวสารสนเทศ และค้นหาชิ้นส่วนยีนที่มีตำแหน่งเครื่องหมายชนิด In/del ทำการออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะต่อชนิดได้จำนวน 12 คู่ รวมถึงออกแบบไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายชนิด SSR (Simple Sequence Repeat) ในรูปแบบ di-repeat และ tri-repeat ที่ให้ความแตกต่างระหว่างชนิด ขาว5N, ขาวสนาน และเอียสกุล จำนวน 30 คู่ไพรเมอร์ พบมีเพียง 10 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ เนื่องจากการทดลองส่วนนี้มีตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลจำนวนมาก แต่การดำเนินงานในปี 2563 มีการปรับลดงบประมาณลง จึงไม่เพียงพอต่อการทดสอบและประเมินความใช้ได้ของไพรเมอร์เพิ่มเติม อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ที่ออกแบบได้สามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยในปี 2565 ได้ต่อไป

3. กล้วยไม้ลูกผสมสกุลขาว5N และเอียสกุล สามารถกระตุ้นให้เพิ่มสาร moscatilin ได้โดยใช้แสง LED สีขาว ร่วมกับสาร BA 1 ml/l ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นาน 4 เดือน เมื่อศึกษาองค์รวมของอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ พบการแสดงออกของยีนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ในกล้วยไม้ลูกผสมเอียสกุลมีการแสดงออกของยีนมากกว่ากล้วยไม้ลูกผสมขาว5N ได้แก่ กลุ่มยีน *Phenylpropanoid biosynthesis, Flavonoid biosynthesis, Phenylalanine metabolism, Stilbenoid diarylthptanoid and gingerol* และ *pentose and glucuronate interconversions* ทั้งนี้การแสดงออกของยีนที่มากกว่าสอดคล้องกับปริมาณสาร moscatilin ที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งพบในกล้วยไม้ลูกผสมเอียสกุลมากกว่ากล้วยไม้ลูกผสมขาว5N เช่นกัน

### ข้อเสนอแนะ

ข้อมูลและองค์ความรู้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอียสกุล ข้อมูลตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs และ SNPs ที่เฉพาะเจาะจงต่อชนิดของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย เป็นฐานข้อมูลเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ประเมินลักษณะทางพันธุกรรม ระบุ หรือจำแนกกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย สามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย เพื่อวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะประจำพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย หรือช่วยในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายต่อไป รวมถึงข้อมูลการแสดงออกของยีนแบบองค์รวมทั้งหมดที่ได้จากเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์สามารถนำไปคาดการณ์การใช้สารกระตุ้นให้กล้วยไม้สกุลหวายเพื่อสร้างสาร moscatilin ต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

- พรพรม คล่องคำนวณการ, บุญชู ศรีตุลารักษ์ และ กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วาทติ. 2557. องค์ประกอบที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด KB จากเอื้องคำฝอย. การประชุมงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2557 มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 1533-1539.
- ศูนย์บริการการจัดการเครือข่ายข้อมูลกล้วยไม้, กรมส่งเสริมการเกษตร. <http://orchidnet.doae.go.th/2555/index.php>
- อรุณทัย ซาววา, สุภาวดี ง้อเหรียญ, อัญชลี ศรีสุวรรณ, ประพิศ วงเทียม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-118.
- Bulpitt, C.J., Y. Li, P.F. Bulpitt and J. Wang. 2007. The Use of Orchids in Chinese Medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine.* 100(12): 558-563.
- Gasperskaja, E. and V. Kučinskas. 2017. The Most Common Technologies and Tools for Functional Genome Analysis. *Acta Medica Lituanica.* 24(1): 1-11.
- Govindaraju, S. and P. Indra Arulselvi. 2018. Effect of cytokinin combined elicitors (l-phenylalanine, salicylic acid and chitosan) on in vitro propagation, secondary metabolites and molecular characterization of medicinal herb – *Coleus aromaticus* Benth (L). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, Volume 17, Issue 4, Pages 435-444, <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.11.001>.
- Guo, X., Y. Li, C. Li, H. Luo, L. Wang, J. Qian, X. Luo, L. Xiang, J. Song, C. Sun, H. Xu, H. Yao and S. Chen. 2013. Analysis of the *Dendrobium Officinale* Transcriptome Reveals Putative Alkaloid Biosynthetic Genes and Genetic Markers. *Gene.* 527(1): 131-138.
- Ishihara A, T. Nakao, Y. Mashimo, M. Murai, N. Ichimaru, C. Tanaka, H. Nakajima, K. Wakasa and H. Miyagawa. 2011. Probing the role of tryptophan-derived secondary metabolism in defense responses against *Bipolaris oryzae* infection in rice leaves by a suicide substrate of tryptophan decarboxylase. *Phytochemistry.* Jan;72(1):7-13. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.11.001.
- Ishihara, A., F. Matsuda and H. Miyagawa. 2007. Metabolomics for metabolically manipulated plants: effects of tryptophan overproduction. *Metabolomics* 3, 319–334. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0072-4>
- Jia, Y., X. Li and Q. Liu. 2020. Physiological and transcriptomic analyses reveal the roles of secondary metabolism in the adaptive responses of *Stylosanthes* to manganese toxicity. *BMC Genomics* 21, 861. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07279-2>
- Li, Q., G. Ding, B. Li and S.-X. Guo. 2017. Transcriptome Analysis of Genes Involved in Dendrobine Biosynthesis in *Dendrobium Nobile* Lindl. Infected with Mycorrhizal Fungus Mf23 (*Mycena* Sp.). *Scientific Reports.* 7(1): 316.
- Lowe, R., N. Shirley, M. Bleackley, S. Dolan and T. Shafee. 2017. Transcriptomics Technologies. *PLOS Computational Biology.* 13(5): e1005457.
- Teoh, E.S . 2016. *Medicinal Orchids of Asia.* Science - 752 pages



- Tsai, A.-C., S.-L. Pan, C.-H. Liao, J.-H. Guh, S.-W. Wang, H.-L. Sun, Y.-N. Liu, C.-C. Chen, C.-C. Shen, Y.-L. Chang and C.-M. Teng. 2010. Moscatilin, a Bibenzyl Derivative from the India Orchid *Dendrobium Loddigesii*, Suppresses Tumor Angiogenesis and Growth *in Vitro* and *in Vivo*. *Cancer Letters*. 292(2): 163-170.
- Wolf Jochen, B.W. 2013. Principles of Transcriptome Analysis and Gene Expression Quantification: An Rna-Seq Tutorial. *Molecular Ecology Resources*. 13(4): 559-572.
- Yan, L., X. Wang, H. Liu, Y. Tian, J. Lian, R. Yang, S. Hao, X. Wang, S. Yang, Q. Li, S. Qi, L. Kui, M. Okpekum, X. Ma, J. Zhang, Z. Ding, G. Zhang, W. Wang, Y. Dong and J. Sheng. 2015. The Genome of *Dendrobium Officinale* Illuminates the Biology of the Important Traditional Chinese Orchid Herb. *Molecular Plant*. 8(6): 922-934.
- Zandalinas S.I., S. Carlos, B. Joaquim, G.Aurelio and A. Vicent. 2017. Activation of Secondary Metabolism in Citrus Plants Is Associated to Sensitivity to Combined Drought and High Temperatures. *Frontiers in Plant Science*, Vol.7, Pages 1954, DOI=10.3389/fpls.2016.01954.
- Zhang M., T. Fang, G. Pu, X. Sun, X. Zhou and Q. Cai. 2013. Xenobiotic metabolism of plant secondary compounds in the English grain aphid, *Sitobion avenae* (F.) (Hemiptera: Aphididae). *Pestic Biochem Physiol*;107(1):44-9. doi: 10.1016/j.pestbp.2013.05.002. Epub 2013 May 17. PMID: 25149234.
- Zhang, G.-Q., Q. Xu, C. Bian, W.-C. Tsai, C.-M. Yeh, K.-W. Liu, K. Yoshida, L.-S. Zhang, S.-B. Chang, F. Chen, Y. Shi, Y.-Y. Su, Y.-Q. Zhang, L.-J. Chen, Y. Yin, M. Lin, H. Huang, H. Deng, Z.-W. Wang, S.-L. Zhu, X. Zhao, C. Deng, S.-C. Niu, J. Huang, M. Wang, G.-H. Liu, H.-J. Yang, X.-J. Xiao, Y.-Y. Hsiao, W.-L. Wu, Y.-Y. Chen, N. Mitsuda, M. Ohme-Takagi, Y.-B. Luo, Y. Van de Peer and Z.-J. Liu. 2016. The *Dendrobium catenatum* Lindl. Genome Sequence Provides Insights into Polysaccharide Synthase, Floral Development and Adaptive Evolution. *Scientific Reports*. 6(19029).

### ตารางและภาพ

**ตารางที่ 1** ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากตำแหน่ง In/del แบบเฉพาะเจาะจงต่อชนิดของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย

ชื่อไพรเมอร์	ตำแหน่ง In/del	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
WS1T/A_F	WS_Cluster-9996.0:3429_AATTT/A_F	CCATAGTCAGCCATGCAGAA
WS1T/A_R	WS_Cluster-9996.0:3429_AATTT/A_R	TGATGCACCCCAAGACTA
WS2T/G_F	WS_Cluster-11152.9728:1605_GTT/GTTTCTGCTT_F	CAATGTCAGCGGTAAGCAA
WS2T/G_R	WS_Cluster-11152.9728:1605_GTT/GTTTCTGCTT_R	CCTTACTTTTGAACCTGGCATT
WS3A/A_F	WS_Cluster-22821.0:4050_AATA/AATATATATATA_F	GATTGAGCTTGAAGGCGAAC
WS3A/A_R	WS_Cluster-22821.0:4050_AATA/AATATATATATA_R	AAACCTCAAGAGGGAAAGG
WS4G/A_F	WS_Cluster-6988.0:479_AGATTGTAGCGCTTATCTGAAG/A_F	GCATGGTGGTACTGAACGTC
WS4G/A_R	WS_Cluster-6988.0:479_AGATTGTAGCGCTTATCTGAAG/A_R	GAGCACAGGCTGCTTCAGAT
5N1A/C_F	5N_Cluster-11152.2664:2262_CAAAATGCTAAA/CAA_F	GGGGAGTATGGACCGAAAAG
5N1A/C_R	5N_Cluster-11152.2664:2262_CAAAATGCTAAA/CAA_R	ACCAGATCCACGATTTACGC
5N2C/T_F	5N_Cluster-11152.12912:860_TTGGGTTAATC/T_F	GGGCCATAGTCGAATGAATG
5N2C/T_R	5N_Cluster-11152.12912:860_TTGGGTTAATC/T_R	CTTCGCCTTCATCAGCTACC



5N3T/C_F	5N_Cluster-11152.428:1428_CT/CTCTATCAAACTAT_F	CAGTTACGGGAAGGCAGAAA
5N3T/C_R	5N_Cluster-11152.428:1428_CT/CTCTATCAAACTAT_R	CATCTTTACGCATTTCCGAGT
5N4T/T_F	5N_Cluster-11152.13516:870_TTGTTTTTTTTTTTGT/TT_F	TTTTGGTATTGATCTCGTTGTGA
5N4T/T_R	5N_Cluster-11152.13516:870_TTGTTTTTTTTTTTGT/TT_R	TGGTGGGACATGGATTATGA
ES1T/A_F	ES_Cluster-11152.9283:4385_ATAATTCTAAAACCGAGGACT/AT_F	TTTCACCTGAATCTGACAATGTG
ES1T/A_R	ES_Cluster-11152.9283:4385_ATAATTCTAAAACCGAGGACT/AT_R	ATGATCAGGAGTCCTCGGTTT
ES2T/A_F	ES_Cluster-27000.0:1962_ATGCTAAATGCACTGCAGGTTTCTTGCT/ATGCT_F	TGCATAATCACTGCCTAAAAACA
ES2T/A_R	ES_Cluster-27000.0:1962_ATGCTAAATGCACTGCAGGTTTCTTGCT/ATGCT_R	GGTAGACCATTGCCACATCA
ES3G/G_F	ES_Cluster-19864.1:3792_GTTG/GTTGGTCTGAAAAGAGGTCTATTTTG_F	GGAGGAGGAGGTGATCCAAG
ES3G/G_R	ES_Cluster-19864.1:3792_GTTG/GTTGGTCTGAAAAGAGGTCTATTTTG_R	CAGCCAAACACCTGAAATGA
ES4T/T_F	ES_Cluster-11152.11187:4923_TGATTCAGTAACTCTTCCAGTCTCAGAT/TGAT_F	GGATCAAAATCCTGAATGTTACAGA
ES4T/T_R	ES_Cluster-11152.11187:4923_TGATTCAGTAACTCTTCCAGTCTCAGAT/TGAT_R	TGCGCTGAAAACAGAATGCTA

หมายเหตุ: อักษรย่อ หมายถึง ชนิดของกล้วยไม้ลูกผสม ดังนี้ WS=ชาวสวน 5N=ชาว5N และ ES=เอี้ยสกุล

ตารางที่ 2 คู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกจากข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์และทำการทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

No.	FORWARD PRIMER1 (5'-3')	Tm(°C)	REVERSE PRIMER1 (5'-3')	Tm(°C)
1	CTACAGCGGTAATGGCGTCT	59.898	CGAGAACCCCATTCACCAA	59.962
2	GAGTGTTCTTTTCGGCAGCC	59.761	TCCATACCTCTTCCTCCTCC	57.223
3	GGCCTGAAACCTCCAATT	60.179	TTGTTCCCGGAATGATGGA	60.036
4	GTTTTCTTCCTCACCGCCT	60.251	ATAGAGCGCCACTGATTCCG	59.967
5	TCTGCTGCCGAAGAAACCTT	59.891	TTCTTACCGGAATCAGGGC	60.035
6	CCCAGCACAGAAACCAGAA	60.179	GAATTGACGGCGATTGAGGC	59.972
7	CATGTAGCCAACCCACGTA	59.749	TACCAATGCCTGATGAGCGC	60.815
8	CCTGCTAGCAATCCATGGCT	60.179	GCTGACCGGAAGTCTTTGA	59.965
9	TGAGCCACATCTACAGACCA	58.063	CCCTGCATACAAAGAGAACCTT	60.026
10	GATGACCGTCGCCCTCTC	59.586	GAAGCCTTGGATGGGTCTCC	60.107
11	CCACACGGAAGAATCGGAGG	60.46	AAGCGTCTCTCTGCTCTA	60.034
12	TTTCTGGATGTGGACTCGCC	60.036	ATTGAGTGTGTTGGCCATGC	59.395
13	AGATGAGCCAAAAGCCAACT	58.398	GGAGGTGGCAGCAACAATG	60.038
14	GGAGGATGGTCAAGGTGCAA	59.962	GCTTCCTTACAGAAATGGAGATGC	59.437
15	TGATTCATATAGCCAACCCACA	59.539	CAAGCAAAGCCGAGCAGAAG	60.11
16	GCCTCAATCACCATCCCCAA	60.033	TGTTGATTGCGCGTCTCTTC	60.11
17	CATGACCGTCATCGTGGTGA	60.109	CAACCGGAGAGGATTCAACCA	59.997
18	CCCCTCTCTTCTCTGCT	60.032	TGGTACAGCGCCTCTCTTC	59.753
19	TGGTACAGCGCCTCTCTTC	59.753	CCCCTCTCTTCTCTGCT	60.032
20	GCTCGGTTTCTTCTCCCTCC	60.108	CAGATGATACGCAGACCCCC	59.966
21	AGTGGGAGAGCTGAGCAAAC	59.964	CCACCTGCTAGCGATCAGAG	59.968
22	CCCTGCGCTTCTTCCCTAA	60.035	AGGAGGAGAAGCGCATGATG	59.894
23	TCAAAGTCTTCCGCTCCAC	59.965	GAGCTACCATTTTGAGCCG	59.901
24	TGTTGCACATTATCCATCTGGT	58.033	TTTACCCTTCCATCGACA	59.966
25	TTCGGCTCTGCAATTCGGA	60.321	AAATGACCCTGCTAGGCCTC	59.451
26	CCCCGCCATCTTCTCTTT	60.034	CGGCGTTTTGTTTCTCTCTC	59.763

No.	FORWARD PRIMER1 (5'-3')	Tm(°C)	REVERSE PRIMER1 (5'-3')	Tm(°C)
27	CATGGTGAATGGAGAGGGGG	59.816	TGACCAAGATTCACATCAGCCT	59.693
28	AGTTCTCAGAAGCACTTCGG	57.553	CTGGTTGCCTCCACTTCGAT	60.036
29	GCCTCTCATGGCCTTGTCT	60.035	TCATTCATTTTGTGTTTGAGTTCGACT	58.52
30	AACGGCGGTGGATCACGTC	62.927	TGCGAGGAACCTGCTGAATT	59.963

ตารางที่ 3 ปริมาณสาร moscatilin ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ขาว5N และเอี้ยสกุล

ตัวอย่าง	ปริมาณสาร moscatilin	ตัวอย่าง	ปริมาณสาร moscatilin	ตัวอย่าง	ปริมาณสาร moscatilin	ตัวอย่าง	ปริมาณสาร moscatilin
ขาว5N	0.0522	ขาว5N	0.1064	เอี้ยสกุล	0.1122	เอี้ยสกุล	0.1573
control	0.0554	(BA)	0.1188	control	0.1024	(BA)	0.1613
	0.0478		0.1135		0.1088		0.1546
ค่าเฉลี่ย	0.0518	ค่าเฉลี่ย	0.1129	ค่าเฉลี่ย	0.1078	ค่าเฉลี่ย	0.1577

หมายเหตุ: ปริมาณสาร moscatilin หน่วย g/100g sample (กรัม/100 กรัมตัวอย่าง)

ตารางที่ 4 การแสดงออกของยีนแบบ up-regulation และ down-regulation ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ขาว5N

No	GeneID	NT GI	NR Description	ขาว5N control	ขาว5N BA	log2FoldChange
<b>Up-regulation</b>						
1	Cluster-15830.0	XM_028697987.1	protein NRT1/ PTR FAMILY 7.2-like [Phalaenopsis equestris]	0	2.809	8.387
2	Cluster-25357.3749	XM_020828886.2	Aquaporin TIP2-2 [Dendrobium catenatum]	0	1.330	7.313
3	Cluster-9883.0	XM_020825823.2	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A, chloroplastic/mitochondrial [Dendrobium catenatum]	0	1.256	7.231
4	Cluster-25357.4154	XR_003700082.1	Eukaryotic translation initiation factor isoform 4G-1 [Dendrobium catenatum]	0	1.109	7.052
5	Cluster-24101.0	XM_028697235.1	ATP-dependent DNA helicase DDM1 [Dendrobium catenatum]	0	1.035	6.953
6	Cluster-18988.0	XM_020821191.2	protein SHORT-ROOT-like [Dendrobium catenatum]	0	0.961	6.847
7	Cluster-23669.1	XM_020822451.2	hypothetical protein MA16_Dca003298 [Dendrobium catenatum]	0	0.961	6.847
8	Cluster-23602.0	XM_028695183.1	hypothetical protein MA16_Dca000496 [Dendrobium catenatum]	0	0.961	6.847
9	Cluster-23442.0	XM_020848043.2	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32-related protein 1 [Dendrobium catenatum]	0	0.961	6.847
<b>Down-regulation</b>						
1	Cluster-25357.7283	XM_020848630.2	KDEL-tailed cysteine endopeptidase CEP1 [Dendrobium catenatum]	4.7	0	-9.128
2	Cluster-25357.2413	XM_020735567.1	uncharacterized protein LOC110032055 [Phalaenopsis equestris]	1.546	0	-7.529
3	Cluster-25357.5415	XM_020847422.2	cytochrome P450 71A9 [Dendrobium catenatum]	1.546	0	-7.529
4	Cluster-574.0	XM_020840416.2	hypothetical protein MA16_Dca027110 [Dendrobium catenatum]	1.422	0	-7.409
5	Cluster-25357.6879	XM_020726026.1	uncharacterized protein LOC110025502 [Phalaenopsis equestris]	1.051	0	-6.976

ตารางที่ 4 การแสดงออกของยีนแบบ up-regulation และ down-regulation ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ขาว5N

No	GeneID	NT GI	NR Description	ขาว5N control	ขาว5N BA	log2FoldChange
6	Cluster-22581.4	XM_028693005.1	UDP-glycosyltransferase 85A3 [Dendrobium catenatum]	0.989	0	-6.889
7	Cluster-24121.0	XM_020830294.2	Leucine-rich repeat receptor-like kinase protein THICK TASSEL DWARF1 [Dendrobium catenatum]	0.989	0	-6.889

ตารางที่ 5 การแสดงออกของยีนแบบ up-regulation และ down-regulation ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายเอี้ยสกุล

No.	GeneID	NT GI	NR Description	เอี้ยสกุล control	เอี้ยสกุล BA	log2FoldChange
<b>Up-regulation</b>						
1	Cluster-25357.2844	XM_020831817.2	hypothetical protein VITISV_036363 [Vitis vinifera]	0.000	196.034	13.475
2	Cluster-19325.0	XM_020848595.2	MHC class II regulatory factor RFX1 [Dendrobium catenatum]	0.000	171.108	13.279
3	Cluster-19282.0	XM_020835971.2	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PXL2 [Dendrobium catenatum]	0.000	27.003	10.616
4	Cluster-16787.0	XM_020836624.2	subtilisin-like protease SBT1.5 [Phalaenopsis equestris]	0.000	25.056	10.508
5	Cluster-24199.0	XM_020846040.2	Early nodulin-like protein 1 [Dendrobium catenatum]	0.000	21.681	10.299
6	Cluster-14911.0	XM_020818644.2	Leucine-rich repeat extensin-like protein 6 [Dendrobium catenatum]	0.000	12.593	9.517
7	Cluster-21586.0	XM_020846696.2	GDSL esterase/lipase [Dendrobium catenatum]	0.000	12.203	9.471
8	Cluster-25357.4119	XM_020817725.2	aspartyl protease AED3 [Dendrobium catenatum]	0.000	11.554	9.393
9	Cluster-25357.3991	XM_028697294.1	36.4 kDa proline-rich protein [Dendrobium catenatum]	0.000	9.867	9.165
10	Cluster-16691.0	XM_020830034.2	transcription repressor OFP13 [Dendrobium catenatum]	0.000	9.477	9.107
11	Cluster-11000.0	XM_020849232.2	Cysteine-rich repeat secretory protein 55 [Dendrobium catenatum]	0.000	9.088	9.047
12	Cluster-11368.0	XM_020846126.2	cationic peroxidase 1-like [Dendrobium catenatum]	0.000	9.088	9.047
13	Cluster-16851.0	XM_020821358.2	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 22 [Dendrobium catenatum]	0.000	8.828	9.005

ตารางที่ 5 การแสดงออกของยีนแบบ up-regulation และ down-regulation ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายเอื้องสกุล

No.	GeneID	NT GI	NR Description	เอื้องสกุล control	เอื้องสกุล BA	log2FoldChange
14	Cluster-9883.0	XM_020825823.2	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A, chloroplasic/mitochondrial [Dendrobium catenatum]	0.000	8.698	8.984
15	Cluster-8188.0	XM_020846298.2	Subtilisin-like protease [Dendrobium catenatum]	0.000	7.919	8.848
16	Cluster-23714.0	XM_020836257.2	syntaxin-related protein KNOLLE-like [Dendrobium catenatum]	0.000	6.881	8.646
17	Cluster-1912.0	XM_020848244.2	GDSL esterase/lipase At1g71691-like [Phalaenopsis equestris]	0.000	6.621	8.591
18	Cluster-12194.0	XM_020835955.2	U-box domain-containing protein 27-like [Dendrobium catenatum]	0.000	6.491	8.562
19	Cluster-14525.0	XM_028697728.1	GDSL esterase/lipase [Dendrobium catenatum]	0.000	6.102	8.473
20	Cluster-14145.0	XM_020846254.2	thaumatin-like protein [Dendrobium catenatum]	0.000	5.972	8.442
21	Cluster-21008.0	XM_020820466.2	TORTIFOLIA1-like protein 3 [Dendrobium catenatum]	0.000	5.842	8.411
22	Cluster-10968.1	XM_020838855.2	alpha-galactosidase-like [Phalaenopsis equestris]	0.000	5.582	8.345
23	Cluster-19175.0	XM_020836946.2	High mobility group B protein 4 [Dendrobium catenatum]	0.000	5.582	8.345
24	Cluster-12691.0	XM_020718358.1	hypothetical protein MA16_Dca009510 [Dendrobium catenatum]	0.000	5.582	8.345
25	Cluster-22681.0	XM_020831432.2	ubiquitin-conjugating enzyme E2 20-like [Dendrobium catenatum]	0.000	5.323	8.277
26	Cluster-19351.0	XM_020835287.2	ethylene-responsive transcription factor WIN1 [Dendrobium catenatum]	0.000	5.063	8.205
27	Cluster-11245.0	XM_020818421.2	protein DROOPING LEAF [Dendrobium catenatum]	0.000	4.933	8.168
28	Cluster-11757.0	XM_009388447.2	hypothetical protein MA16_Dca015902 [Dendrobium catenatum]	0.000	4.933	8.168
29	Cluster-10670.0	MG702179.1	putative F-box protein [Dendrobium catenatum]	0.000	4.284	7.965
30	Cluster-16835.0	XM_020835907.2	Peroxidase 4 [Dendrobium catenatum]	0.000	4.282	7.964
31	Cluster-25357.3749	XM_020828886.2	Aquaporin TIP2-2 [Dendrobium catenatum]	0.000	4.025	7.875
32	Cluster-2161.0	XM_020736646.1	Cysteine desulfurase 2, chloroplasic [Apostasia shenzhenica]	0.000	4.025	7.875
33	Cluster-18639.0	XM_020821837.2	LOB domain-containing protein 15 [Dendrobium catenatum]	0.000	3.895	7.828
34	Cluster-25357.6841	XM_020848815.2	Subtilisin-like protease SDD1 [Dendrobium catenatum]	0.000	3.765	7.779
35	Cluster-7527.1	XM_020826235.2	putative LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase [Dendrobium catenatum]	0.000	3.765	7.779

ตารางที่ 5 การแสดงออกของยีนแบบ up-regulation และ down-regulation ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายเอื้องสกุล

No.	GeneID	NT GI	NR Description	เอื้องสกุล control	เอื้องสกุล BA	log2FoldChange
36	Cluster-11548.0	XM_020839154.2	Protein SOMBRERO [Dendrobium catenatum]	0.000	3.505	7.677
37	Cluster-16109.0	XM_020838243.2	chalcone synthase [Dendrobium hybrid cultivar]	0.000	3.505	7.677
38	Cluster-15587.0	XM_020834604.2	GDSL esterase/lipase APG [Dendrobium catenatum]	0.000	3.505	7.677
39	Cluster-22132.0	XM_020830575.2	ABC transporter G family member 8 [Dendrobium catenatum]	0.000	3.505	7.677
40	Cluster-16842.0	XM_020835907.2	peroxidase P7-like [Phalaenopsis equestris]	0.000	2.989	7.448
41	Cluster-20977.0	XM_020848196.2	receptor-like protein kinase 2 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.986	7.446
42	Cluster-17032.0	XM_020847426.2	DNA topoisomerase 2 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.986	7.446
43	Cluster-25233.0	XM_020850313.2	hypothetical protein MA16_Dca016113 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.856	7.383
44	Cluster-25357.6061	XM_020821595.2	transmembrane protein 45B-like [Dendrobium catenatum]	0.000	2.856	7.383
45	Cluster-25357.4381	XM_020837267.2	probable xyloglucan glycosyltransferase 9 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.726	7.316
46	Cluster-23238.0	XM_020718670.1	putative beta-D-xylosidase 2 [Apostasia shenzhenica]	0.000	2.726	7.316
47	Cluster-19394.0	AJ294542.2	cytokinin oxidase [Dendrobium hybrid cultivar]	0.000	2.596	7.246
48	Cluster-15319.0	XM_020846517.2	hypothetical protein MA16_Dca025097 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.467	7.173
49	Cluster-13182.0	XM_028701266.1	probable peroxidase 61 [Asparagus officinalis]	0.000	2.337	7.095
50	Cluster-23061.0	XM_020848943.2	Non-symbiotic hemoglobin 2 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.337	7.095
51	Cluster-11714.0	XM_020844786.2	protein DETOXIFICATION 49 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.337	7.095
52	Cluster-3519.0	XM_020835955.2	U-box domain-containing protein 27 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.337	7.095
53	Cluster-9838.3	XR_003700879.1	ubiquitin-protein ligase E3 C [Dendrobium catenatum]	0.000	2.207	7.013
54	Cluster-23563.0	XM_028695127.1	Branched-chain-amino-acid aminotransferase-like protein 3, chloroplastic [Dendrobium catenatum]	0.000	2.207	7.013
55	Cluster-25357.7334	XM_020818925.2	protein PIN-LIKES 7-like isoform X2 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.207	7.013
56	Cluster-23357.1	XM_028697151.1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.077	6.927
57	Cluster-23947.0	XM_028695340.1	Pentatricopeptide repeat-containing protein [Dendrobium catenatum]	0.000	2.077	6.927



ตารางที่ 5 การแสดงออกของยีนแบบ up-regulation และ down-regulation ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายเอื้องสกุล

No.	GeneID	NT GI	NR Description	เอื้องสกุล control	เอื้องสกุล BA	log2FoldChange
58	Cluster-6983.3	XM_020846362.2	RHOMBOID-like protein 12, mitochondrial isoform X1 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.077	6.927
59	Cluster-13673.0	XM_020845306.2	hypothetical protein MA16_Dca011489 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.077	6.927
60	Cluster-25153.0	XM_020837468.2	DUF21 domain-containing protein At2g14520 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.077	6.927
61	Cluster-12245.0	XM_020830916.2	Pathogenesis-related protein 1 [Dendrobium catenatum]	0.000	2.077	6.927
62	Cluster-10062.0	XM_020822198.2	gibberellin 3-oxidase [Dendrobium officinale]	0.000	2.077	6.927
63	Cluster-14152.0	XM_020816092.2	Subtilisin-like protease [Dendrobium catenatum]	0.000	2.077	6.927
64	Cluster-25357.394	XM_020841255.2	Putative leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase [Dendrobium catenatum]	0.000	1.947	6.834
65	Cluster-12672.0	XM_020828483.2	rho GTPase-activating protein REN1 [Dendrobium catenatum]	0.000	1.947	6.834
66	Cluster-16259.0	XM_020849232.2	Cysteine-rich repeat secretory protein 55 [Dendrobium catenatum]	0.000	1.818	6.736
67	Cluster-6557.0	XM_020845626.2	putative pectinesterase 68 [Dendrobium catenatum]	0.000	1.818	6.736
68	Cluster-14759.0	XM_020843470.2	homologous-pairing protein 2 homolog [Dendrobium catenatum]	0.000	1.818	6.736
69	Cluster-25357.3437	XM_020840114.2	CASP-like protein [Dendrobium catenatum]	0.000	1.818	6.736
70	Cluster-21774.0	XM_020832918.2	pectinesterase [Dendrobium catenatum]	0.000	1.818	6.736
71	Cluster-16496.1	XM_020830740.2	putative mannan synthase 11 [Dendrobium catenatum]	0.000	1.818	6.736
72	Cluster-25235.0	XM_020821813.2	Transcription factor MYB39 [Dendrobium catenatum]	0.000	1.818	6.736
73	Cluster-4489.0	XM_020821579.2	Protodermal factor 1 [Dendrobium catenatum]	0.000	1.818	6.736
74	Cluster-3404.0	XM_028696526.1	F-box protein [Dendrobium catenatum]	0.000	1.688	6.630
75	Cluster-16421.0	XM_020849738.2	Protein RALF-like 34 [Dendrobium catenatum]	0.000	1.688	6.630
76	Cluster-14091.0	XM_020843831.2	Auxin response factor 2 [Dendrobium catenatum]	0.000	1.688	6.630
77	Cluster-19275.0	XM_020821655.2	hypothetical protein MA16_Dca022029 [Dendrobium catenatum]	0.000	1.688	6.630
78	Cluster-8349.0	CP025656.1	Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon RE1 [Vitis vinifera]	0.000	1.688	6.630

ตารางที่ 5 การแสดงออกของยีนแบบ up-regulation และ down-regulation ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายเอื้องสกุล

No.	GeneID	NT GI	NR Description	เอื้องสกุล control	เอื้องสกุล BA	log2FoldChange
79	Cluster-7548.4	XR_003702419.1	ataxia telangiectasia mutated family protein [Dendrobium catenatum]	0.000	1.593	6.547
<b>Down-regulation</b>						
1	Cluster-25357.7283	XM_020848630.2	KDEL-tailed cysteine endopeptidase CEP1 [Dendrobium catenatum]	707.573	0	-15.327
2	Cluster-25357.2406	XM_020849491.2	zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2 [Dendrobium catenatum]	3.667	0	-7.741
3	Cluster-25357.2087	XM_020831421.2	sm-like protein LSM3A [Dendrobium catenatum]	3.227	0	-7.558
4	Cluster-25357.298	XM_020827682.2	auxin-responsive protein SAUR32 [Dendrobium catenatum]	3.080	0	-7.491
5	Cluster-12972.0	XM_020846643.2	probable CCR4-associated factor 1 homolog 11 [Dendrobium catenatum]	2.934	0	-7.421
6	Cluster-15252.0	XM_026581077.1	hypothetical protein MA16_Dca028650 [Dendrobium catenatum]	2.934	0	-7.421
7	Cluster-12169.0	XM_020840020.2	hypothetical protein MA16_Dca024675 [Dendrobium catenatum]	2.494	0	-7.188
8	Cluster-18443.0	XM_020833294.1	pentatricopeptide repeat-containing protein At3g49240, mitochondrial [Dendrobium catenatum]	2.200	0	-7.009
9	Cluster-25357.2305	XM_020820327.2	digalactosyldiacylglycerol synthase 2, chloroplastic-like [Phoenix dactylifera]	2.200	0	-7.009
10	Cluster-17952.0	XM_020835885.2	Abscisic acid receptor PYR1 [Dendrobium catenatum]	2.200	0	-7.009
11	Cluster-16385.1	MK470581.1	protein arginine N-methyltransferase 7 [Dendrobium catenatum]	2.054	0	-6.910
12	Cluster-8795.0	XM_020820171.2	Pentatricopeptide repeat-containing protein [Dendrobium catenatum]	1.907	0	-6.804
13	Cluster-25357.3107	XM_020821248.2	arginase 1, mitochondrial [Dendrobium catenatum]	1.907	0	-6.804
14	Cluster-13316.0	XM_020818931.2	ubiquitin-conjugating enzyme E2 5 [Dendrobium catenatum]	1.760	0	-6.690
15	Cluster-12768.0	XM_020839645.2	Heavy metal-associated isoprenylated plant protein 26 [Dendrobium catenatum]	1.760	0	-6.690
16	Cluster-25357.1675	XM_020837355.2	cellulose synthase-like protein E6 [Phalaenopsis equestris]	1.760	0	-6.690

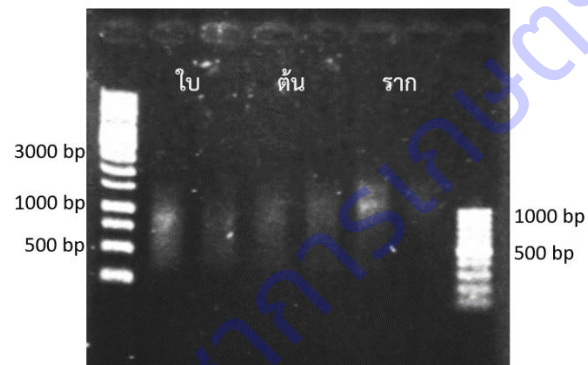
ตารางที่ 5 การแสดงออกของยีนแบบ up-regulation และ down-regulation ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายเอี้ยสกุล

No.	GeneID	NT GI	NR Description	เอี้ยสกุล control	เอี้ยสกุล BA	log2FoldChange
17	Cluster-13918.1	XM_004139859.3	ALA-interacting subunit 3 isoform X1 [Dendrobium catenatum]	1.760	0	-6.690
18	Cluster-14413.0	XM_020834201.2	protein RADIALIS-like 3 [Dendrobium catenatum]	1.613	0	-6.565

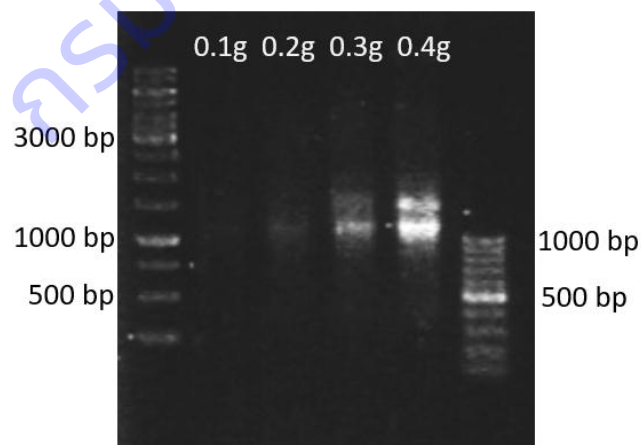
กรมวิชาการเกษตร



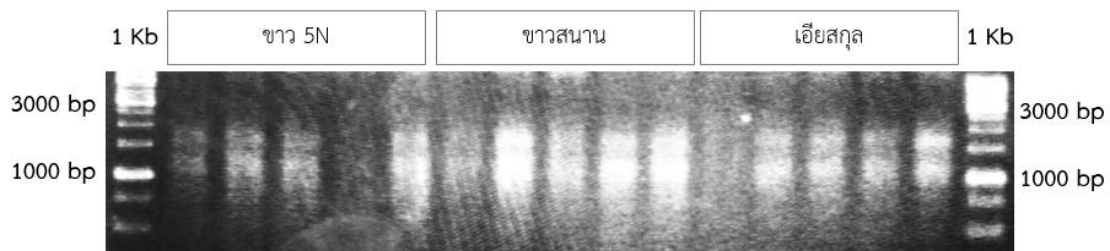
ภาพที่ 1 ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 3 ชนิด



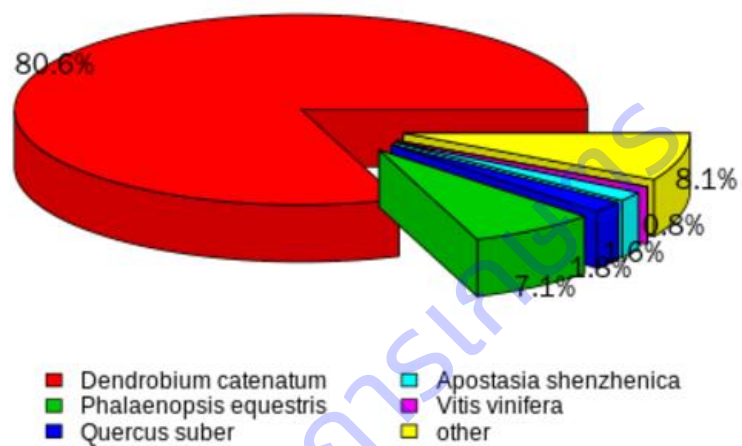
ภาพที่ 2 การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากชิ้นส่วนใบ ต้น และราก ของกล้วยไม้สกุลหวายขาว 5N



ภาพที่ 3 การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบกล้วยไม้สกุลหวายขาว 5N ที่น้ำหนัก 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 กรัม



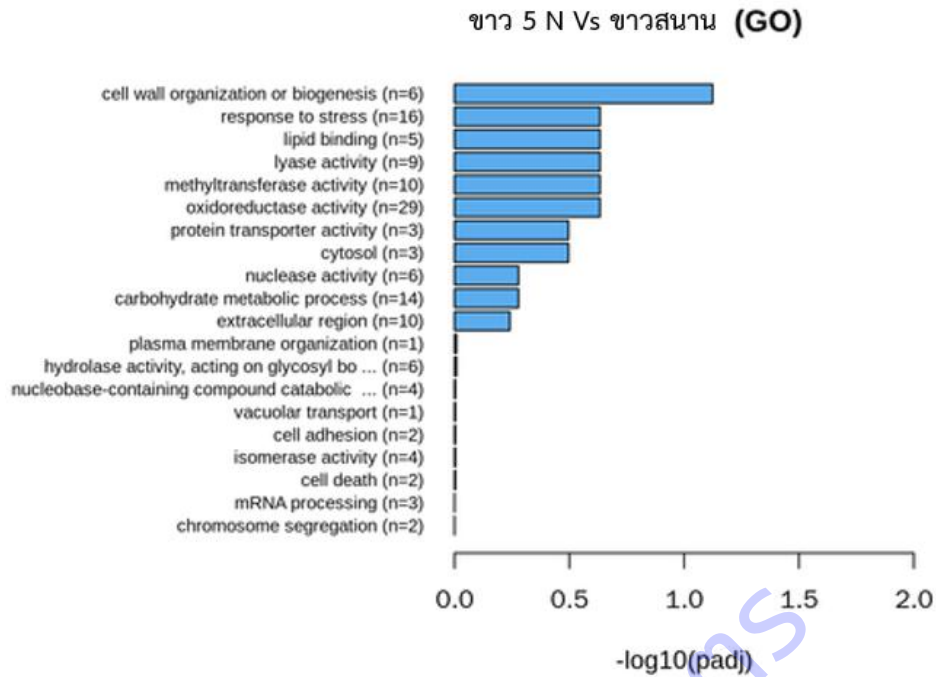
ภาพที่ 4 อาร์เอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอี้ยสกุล ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ



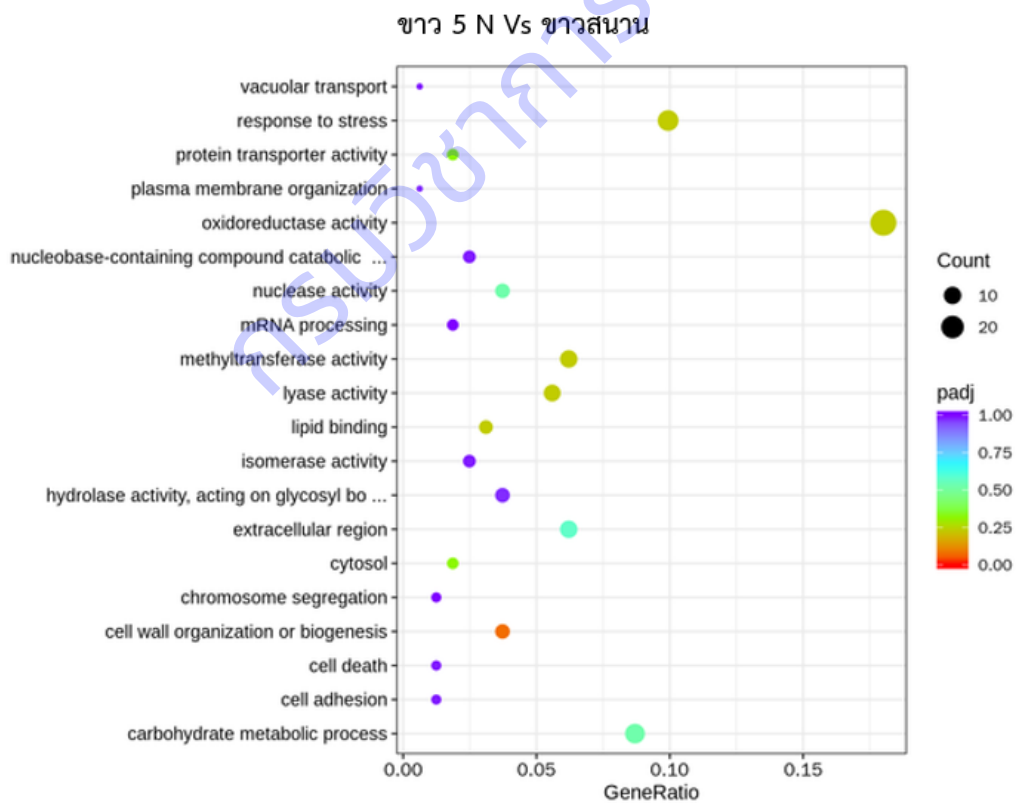
ภาพที่ 5 ชนิดของพืชที่พบความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้สกุลหวายจากฐานข้อมูล BLAST



ภาพที่ 6 จำนวนการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย ขาว 5 N เอี้ยสกุล และขาวสนาน



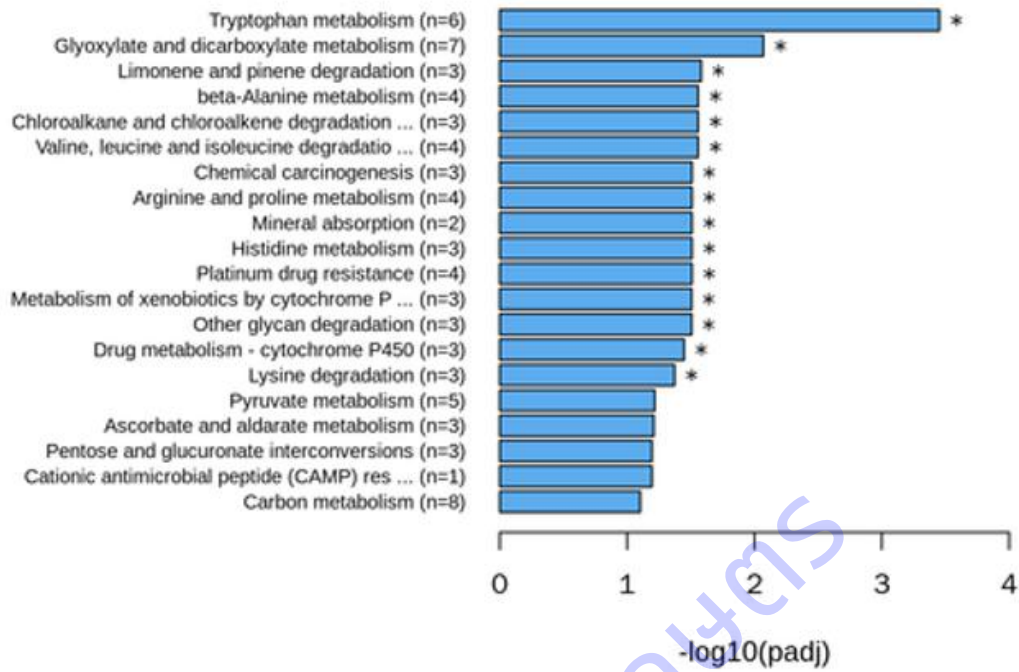
ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนระหว่างกล้วยไม้สกุลหวายชาว 5N ที่มีสาร moscatilin สูง และชาวสนานที่มีสาร moscatilin ต่ำ กับแหล่งข้อมูลยีนอ้างอิง Gene Ontology (GO)



ภาพที่ 8 อัตราส่วนของยีนระหว่างกล้วยไม้สกุลหวายชาว 5N ที่มีสาร moscatilin สูง และชาวสนานที่มีสาร moscatilin ต่ำ กับแหล่งข้อมูลยีนอ้างอิง Gene Ontology (GO)

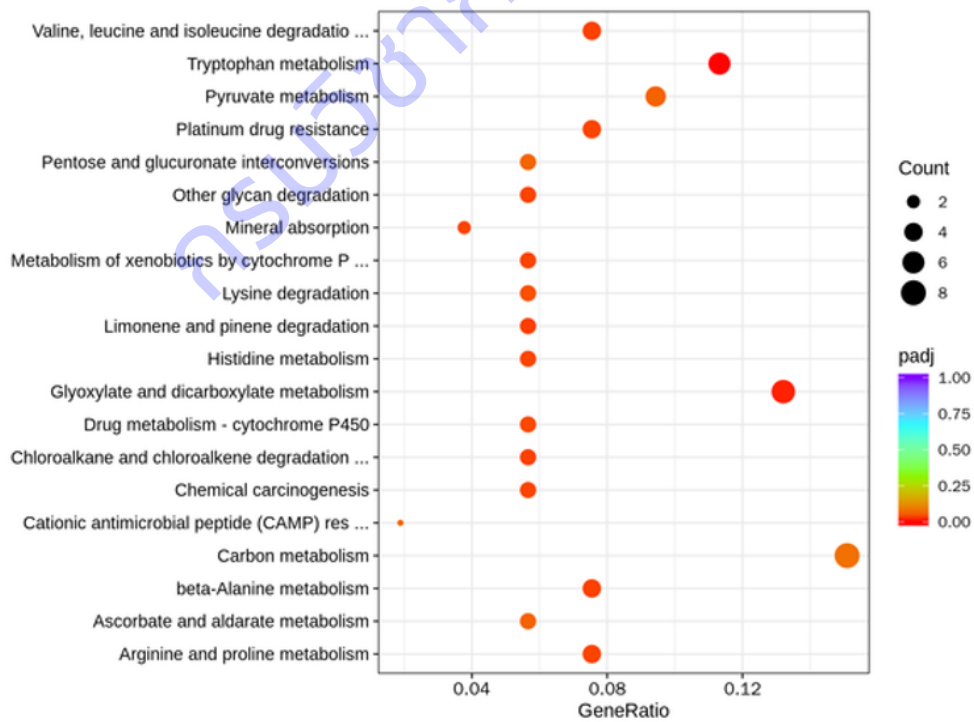


ชาว 5 N Vs ชาวสนาน (KEGG)



ภาพที่ 9 การวิเคราะห์การทำงานของยีนภายในเซลล์ระหว่างกล้วยไม้หวายที่มีสาร moscatilin สูง คือ ชาว 5 N และที่มีสาร moscatilin ต่ำ คือ ชาวสนาน จากฐานข้อมูล KEGG

ชาว 5 N Vs ชาวสนาน



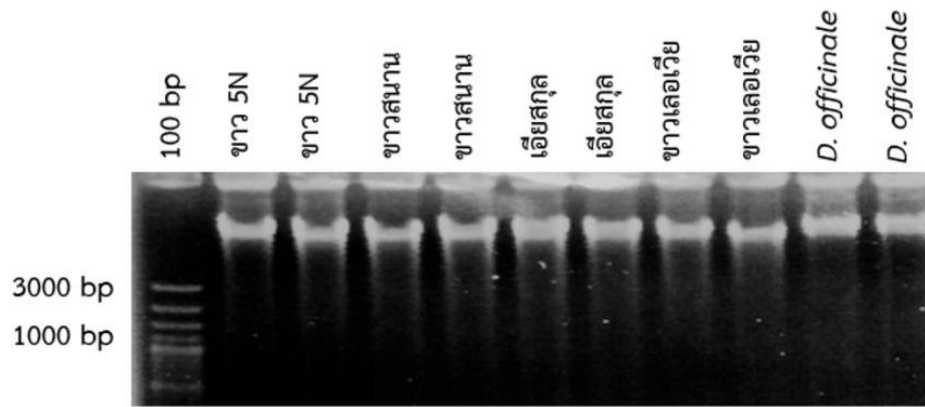
ภาพที่ 10 อัตราส่วนของยีนระหว่างกล้วยไม้หวายที่มีสาร moscatilin สูง คือ ชาว 5 N และที่มีสาร moscatilin ต่ำ คือ ชาวสนาน จากฐานข้อมูล KEGG



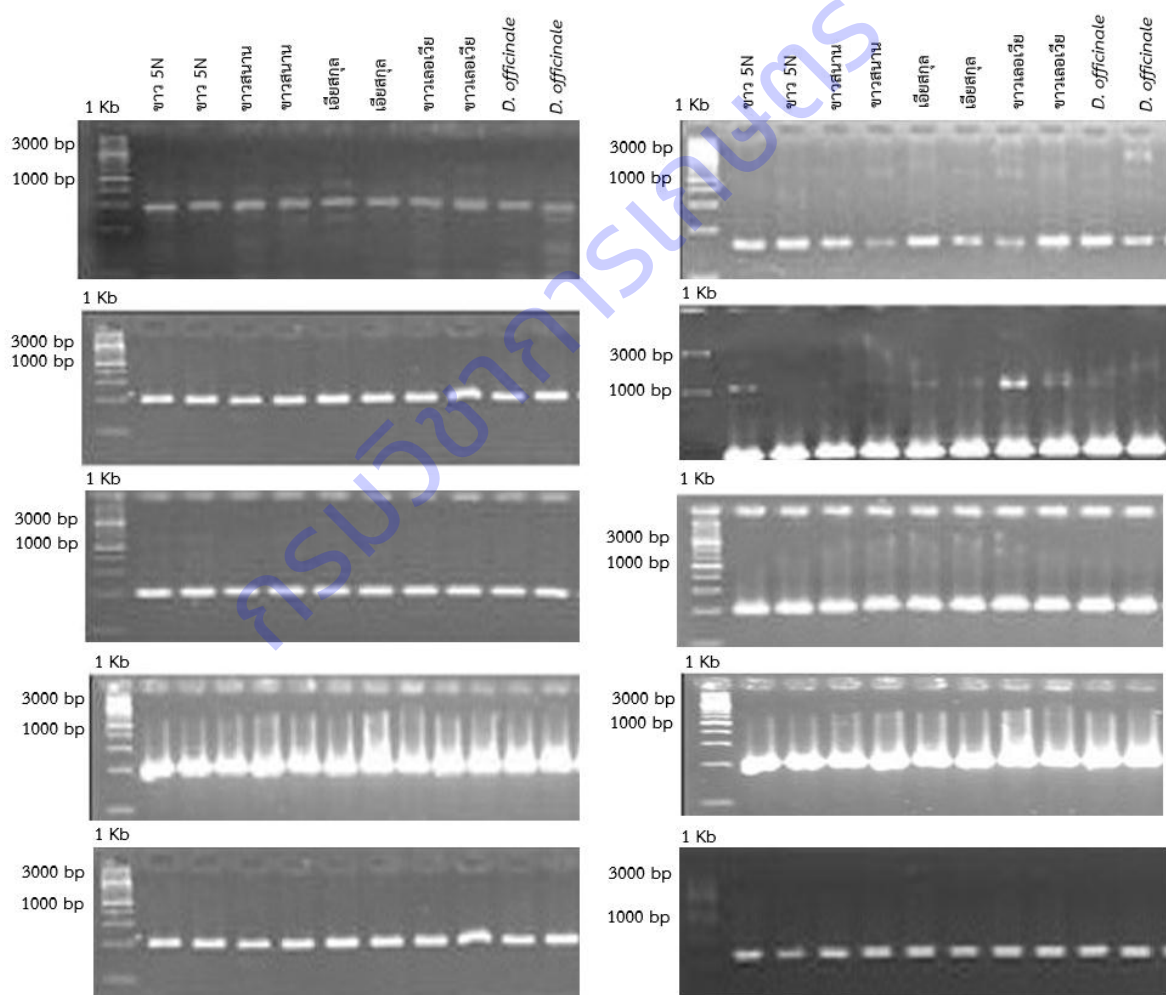
ภาพที่ 11 กล้วยไม้สกุลหวาย *Dendrobium catenatum* (assembly ASM160598v2) ที่ใช้เป็น  
จีโนมอ้างอิง

```
>WSCluster-9996.0:3429 AATTT/A
CTCATGATGCTGCGATGTGGAGCGAGGACTTGTGGAGCTGAGGAAGTTAGGCATCGAACCAACTATGGGAAGCTTCACGTAGAGAAATGATCCATCTTCTCCATAGTCAG
CCATGCGAGAAAGCTCTTAGTTTGAAGCTGGATAT [AATTT/A] ATTTTATTTTTTTTATTGGTTCATTTATCCTTTCCATAAACATTAGTCTTGTGGGTGCATCAATGCACCTA
AATCCGTTATTTGCATACAAAATAAATAATTTGGCAGCATCAAGCATTTTTTCATGTACATAACAAAATGAGTTT
>WSCluster-11152.9728:1605 GTT/GTTTCGCTT
ATGATTTTACAGAGATGACGCCCCAGAGGAGACTACTACGACTGAAGGAGCAGCGCTTCAATGTGACGGGTAAGCAAAAGCCATATGGCAGCTAAAACCTGGACGAGTTGCAG
GTGCATGTTATCTCTCTTCAAAAGGTACATTTG [GTT/GTTTCGCTT] TAAAAAGTCCAAAGTTTCAAAAGTAAGGGATCTTAGATAAATGTGAAAGCTCTTTCATTTTAATA
CATAGTTCCGTTTCATGCTTGGAAATCTATAAAATATTTGAAAAATGGTGATATTTAAAAAAGCAAAAAAATTTTCAAGTTA
>WSCluster-22821.0:4050 AATA/AATATATATATA
TGATGCTAAGGTCAACATACCCGTCATGTGATTTGTCCCTCAAAGAGCTCTTTTATACTTCAGTTTTTATTGAGCTTGAAGCGCAACAAGAGCTGAAGTTAATCAATAAAG
TTTCCCTTAAGAAATTTAGAGGTGAATCATGTAGG [AATA/AATATATATATA] ATAGAGAGAGAGAGAGGGGAAATCCTTTACCTTCCCTCTTGGGTTTTAAATGCATTTAA
ATGAATAATATTTGGTGCCTTTTGGCAATTTACAGTGGATGGATGAGCCATATCACCTTTTAGATCCATGCCAACCAAAAATATCTCTTG
>WSCluster-6988.0:479 AGATTGTAGCGCTTATCTGGAAG/A
TATAGCTGCAAAATCCGTTTTTCATCATGAACATGCTTCRAAGCATTTGATCCTCCTTTTGACATGAGTCAAGATATAGATCTTGATGGCATGGTGGTACTGAACGCTCTTCCTAAT
GGTCATCTCTTCTGCAAGCTTCTCATCATACTCA [AGATTGTAGCGCTTATCTGGAAG/A] GATTGTAGCGCTTATCTGGAAGCAAGCTGTGCTCACGAGGCCCGAGTTATCTAGT
TGCGGTGGAGGATGTCATCATACTCCAAAAATAAATAATGAAAAACAGGAGATTTCAAGTGAAGGCTCTTGTACTCTTATTTGAATGTGAACGCA
>SNCluster-11152.2664:2262 CAAAAATGCTAAA/CAAA
GATCCATCCGAGCAGCAGCCTTTTGCATCGCACTGGACGCACTCATCAATAATTTTCATCGCCACCACAGGGTAAATTTTTAAGGAGGAGCATCTTTTGACTTATTTTATAGG
GGGAGATATGACCGAAAAGTTTTTTGGAAGGGAG [CAAAAATGCTAAA/CAAA] AAAAAATGCTAAAAGCTTTAGCATTTTTTCTGTGCCAACATGAACAACCAAAACAAATTCGGC
GTATTTTACAGGACCGCTAAATCGTGGATCTGGTCCGAGTGTTCGAGCGATTTTTTGCTTTAAAAGCTCGGAGTGGCAGGAGGAGCAGCT
>SNCluster-11152.13516:870 TGTTTTTTTTTTTTGT/T
ATCTCTTTTGGGATAAAAAAAGGAGTTCATCTGTTGTTTTCCATGGTTTTGTTTTCTTAAATGAAGCTTTTGCCTTCAACTTAGCAAAATAGCTGACTGCTATTTTGGT
ATTGATCTGTTGATACATTTTTGTTTTTTGTTT [TGTTTTTTTTTTTTGT/T] TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGAGAAATCATTGTATGTTCTCTATTTTTCTGCTGTA
CGCTCATAATCCATGTCACCAATTTAATTTAAGATGTAGTCGGGTGAAAGGTCAGCCCTCCTCATAAATTAATTTGAAATTTCTTTTATTTTAT
>SNCluster-11152.428:1428 CT/CTCTATCAAAAACAT
GGGCTTTTGTGACCCGCTATAAAAAGAGTTTGTCTGCATATACGAATCATCAGGGATGATCAGGCTCATAAGGTGATGATGCCTGACGAAAGTCTAATCTGAACAGTTAC
AGTTACGGGAGGCGAAAATTTGAAAAACAAG [CT/CTCTATCAAAAACAT] TTGGTTCCTGATGCTATTCATCTGTTAATCCCTGCTATAAGCTCTATCAAAAACATATAC
AGTATCTTAACACTCGGAAATGCGTAAAGATGGACATGAACTCGCTAAACCAATCTTGTGTTGGGTTTTCTAAAAACACTCCAAAT
>SNCluster-11152.12912:860 TGGGTTAATC/T
TCCAACCGCCCTCATTACAGTGAAGCTGTCAGATTTCCAAAAAGCTTGTAGTTGTCAAGTGTTTTTGCTTTTTTTCAGCCGGCCATAGTCGAATGAATGTCTGAATAGACCCC
AAAGTTCAGATTTTGAAGGAAGACAGATTGAGAA [TGGGTTAATC/T] TGGGTTAATCCTGACGAAAGTGTGAAAGCAGGCGCAGGATGCGGTAGCTGATGAAGCGAAGC
TGTTTTTGTGATCTTGAAGAAAGCTTTTACTAGCTCCTCCACAACTGTTTACCATCAAAACGGAATTTCTATCTTCAGAACTGGCTG
>ESCluster-11152.9283:4385 ATAATTCTCTAAAACCGAGGACT/AT
AGATAATCTCCAGATGACTTCACCTCGTCTGATCAAGGAGGAAATACTGAGACTCAGATTCAGGAACAGAAAGTTTCACTGTTGTACAAAACCTGGCTACTACTTTCACT
GAATCTGACAATGTGAATCCATAGCTAGCCAAATC [ATAATTCTCTAAAACCGAGGACT/AT] TAATTCCTAAAACCGAGGACTCCTGATCATGAGGAGAAACCTAAAAGAAAA
GGAGATAATTTGATGTTGACCATCTTTTTGGTATGTAGCATCGAGCCATGGAAGCTGTTGATGTTGAGATGGAGCTAATGCTGCTGATTTGGAAC
>ESCluster-11152.11187:4923 TGATTTCAGTAACTTCTCCAGTCTCAGAT/TGAT
CCTTGAAGGCTGGCTGTGCCAGGTTGAGGACTTTGTTTCGAGCTGCAAGAGGGCTGCTATCGTGTGGTCCAAAATCTGCTGCAGCTTAGCTGCATGCTAATCTGATGCA
TTCAGAGTAGGATCAAAATCCTGAATGTTACAGAC [TGATTTCAGTAACTTCTCCAGTCTCAGAT/TGAT] GATTTCAGTAACTTCTCCAGTCTCAGATAACATAAATATG
AGCTTTAGATTTTTTGTAGCAGTTAGCATTTCTGTTTCAGCCAAATAATGTGCCAATTTGTGAGCAATGAAATTTCTATAATGGAAGCTTGAATTTGTTCAACTAG
>ESCluster-19864.1:3792 GTTG/GTTGGTCTGAAAAGAGGCTTATTTTG
CGGCTAAATGGGAAGCTCGGGGAGGACAGCAGTTCCGAGGCGAGCGGCTCATTTCAACTAGTGGTTTTTATCCTGGCCACGGGAGGAGGATGATCCAAGTAATAAACA
AGCTGGTCTCAGTAATTTATCATCTTCTGTTGA [GTTG/GTTGGTCTGAAAAGAGGCTTATTTTG] TTGCTCATATGGATGTCAGAGAAAATCATTTCAGGTGTTGGCTG
TATGTTATGGAGGGGAGAGAGAGAGAGAAATTTGGGGGAAATGGAAGTTTTATCGGTGAGGTGTTCAAGCCAGTTTTGATTCGGAGGACAAAGTGAAC
>ESCluster-27000.0:1962 ATGCTAAATGCACCTGCAGGTTCTTCTGCT/ATGCT
AATAGTATTTTATGATTTAAAAAATTCACAAAATAGTATAACTAATAAGCAAAAAAATAAATTTTGTGAGAGAACTGAAGTAAACAACCTGCATAATCACTGCCTAAAAACA
ACAAAAGTATGAATAGAGCTACAACATAAAGTTGA [ATGCTAAATGCACCTGCAGGTTCTTCTGCT/ATGCT] TGCTAAATGCACCTGCAGGTTTTCTGCTGAAAAGCTACTGATG
GCATGGCTCACAAGCAATCTAATGAACCTGTTATGAGAAAAGTTTTGTGAACATGTTAGTAAATGATTTAAGTTTATGTTGCAATCTTTTTCAT
```

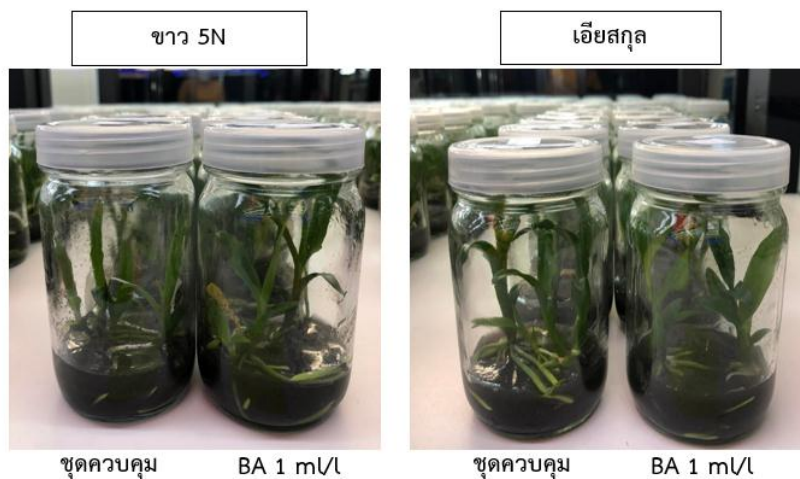
ภาพที่ 12 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่มีตำแหน่ง In/del ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของ  
กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายวิเคราะห์ได้จากเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ โดยอักษรย่อ  
หมายถึง ชนิดของกล้วยไม้ลูกผสม ดังนี้ WS=ชาวสนาน 5N=ชาว5N และ ES=เอียสกุล



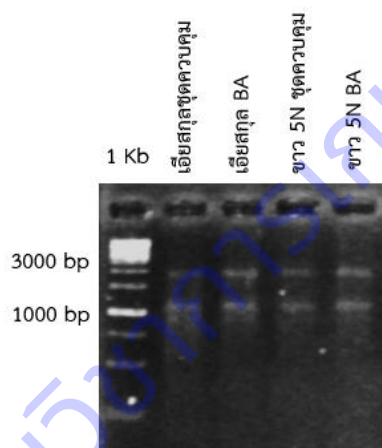
ภาพที่ 13 ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายที่สกัดด้วยวิธี CTAB



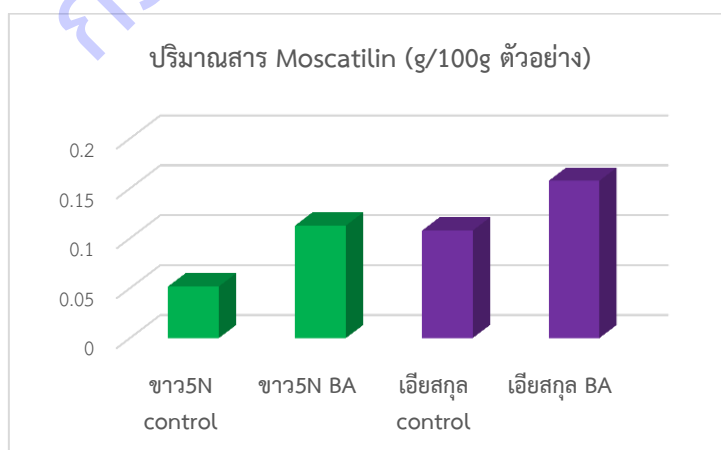
ภาพที่ 14 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จากตารางที่ 1 คู่ที่ 2 5 8 12 13 14 18 25 27 และ 29 ตามลำดับ



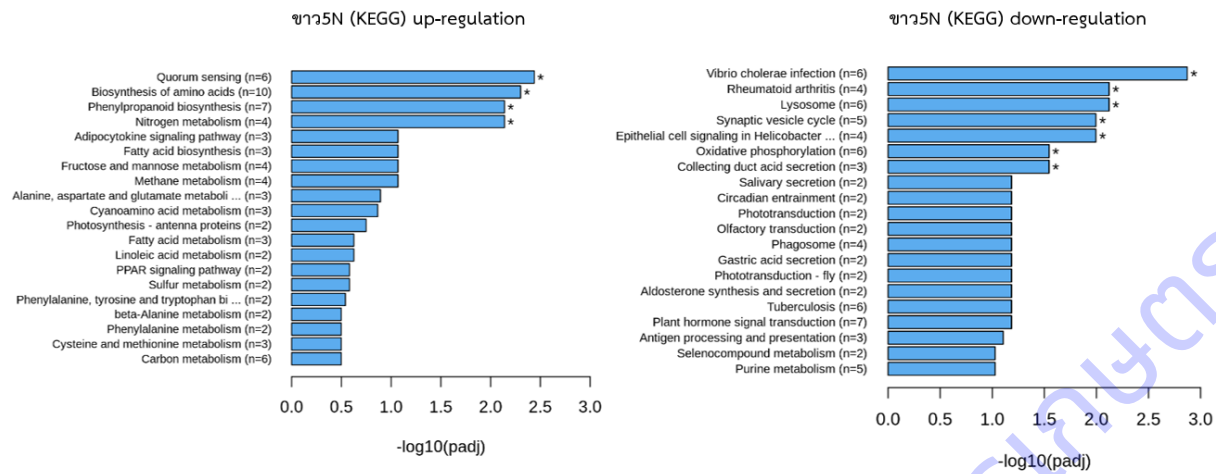
ภาพที่ 15 ต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ข้าว5N และเอี้ยสกุล ที่กระตุ้นด้วยสาร BA 1 m/L ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Vacin and Went นาน 4 เดือน



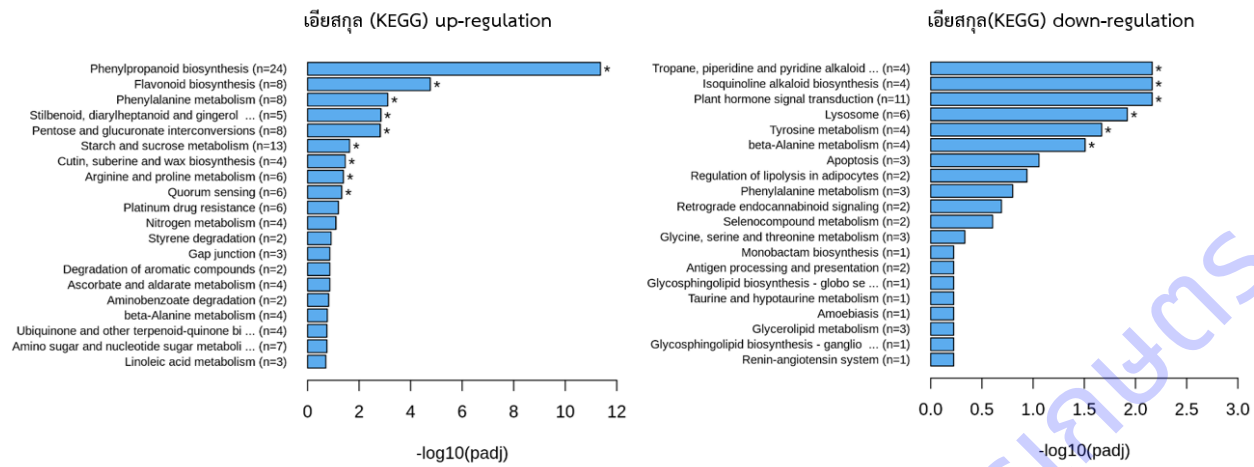
ภาพที่ 16 อาร์เอ็นเอจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ข้าว5N และเอี้ยสกุล



ภาพที่ 17 ปริมาณสาร moscatilin ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ข้าว5N และเอี้ยสกุล



ภาพที่ 18 การแสดงออกของยีนแบบ up-regulation และ down-regulation ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ขวา5N



ภาพที่ 19 การแสดงออกของยีนแบบ up-regulation และ down-regulation ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายเอียสกุล



## บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. การทดสอบแสง LED สีขาว แดง และน้ำเงิน ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA เพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 2 พันธุ์ คือ เอียสกุล และขาว 5N พบว่า แสงเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้น และสูตรอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA เป็นปัจจัยร่วม ซึ่งจะมีผลต่อปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ที่เกิดขึ้น พันธุ์เอียสกุลจะตอบสนองต่อแสง LED สีขาว ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 mg/l ส่วนพันธุ์ขาว 5N จะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในแสง LED สีขาว ร่วมกับสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 1 mg/l แต่ปริมาณสารสำคัญ Moscatilin จะพบได้มากเมื่อเลี้ยงในแสง LED สีน้ำเงิน ร่วมกับสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 2 mg/l ดังนั้นการเลือกใช้หลอด LED สีขาวซึ่งหาซื้อได้ง่ายและมีราคาถูกในปัจจุบันจึงเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของต้นกล้วยทั้ง 2 พันธุ์ และเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เอียสกุล ส่วนพันธุ์ขาว 5N ควรเลือกใช้หลอด LED สีน้ำเงินเพื่อการกระตุ้นปริมาณสารสำคัญ

2. การทดสอบสาร PEG ร่วมกับ LED สีต่างๆ ในการกระตุ้นสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุล และพันธุ์ขาว 5N พบว่า สูตรอาหารที่มี PEG มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้และปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ที่เกิดขึ้น จะเป็นปัจจัยรองในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล ส่วนในพันธุ์ขาว 5N พบว่า ปัจจัยของสูตรอาหารและแสง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin โดยพบว่าในแสง LED สีน้ำเงิน ร่วมกับสูตรอาหารที่มี PEG 10% จะมีปริมาณสารสำคัญ Moscatilin สูงสุด การเลือกใช้สาร PEG ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้จึงควรเลือกใช้ความเข้มข้นให้เหมาะสมในแต่ละพันธุ์

3. วิเคราะห์สาร moscatilin ในส่วนของลำต้นและส่วนใบของกล้วยไม้ ด้วยเทคนิค UHPLC พบสาร moscatilin ในลำต้นของขาวสนานและเอียสกุล เท่ากับ 0.015 และ 0.011 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ และ ปริมาณสาร moscatilin ในส่วนของใบในขาวสนานและเอียสกุล เท่ากับ 0.013 และ 0.062 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ ส่วนกล้วยไม้ ขาว 5N ไม่สามารถตรวจพบปริมาณสาร moscatilin ได้ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ในส่วนต่างๆของกล้วยไม้ นั้น โดยเฉพาะในส่วนของใบกล้วยไม้ ที่พบการสะสมของสาร moscatilin ในปริมาณที่สูงเทียบเคียงกับส่วนของลำต้น จะทำให้การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ด้วยชุดตรวจสอบที่จะพัฒนาขึ้น สามารถใช้ใบกล้วยไม้มาตรวจวิเคราะห์ได้โดยตรง ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการตรวจวิเคราะห์สาร moscatilin ในแปลงปลูกได้

4. ได้คลั่งของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ขนาด  $1.2 \times 10^{24}$  รูปแบบ ซึ่งดีเอ็นเอแอปตาเมอร์มีความยาว 86 นิวคลีโอไทด์ โดยบริเวณส่วนกลางของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์ ซึ่งคลั่งดีเอ็นเอแอปตาเมอร์นี้ เป็นแหล่งของแอปตาเมอร์ ที่มีความหลากหลาย ดังนั้นเมื่อต้องการตรวจสอบสารสำคัญชนิดอื่นๆ ในอนาคต จึงสามารถนำคลั่งของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์นี้มาใช้ได้ทันที เป็นการสะดวกและประหยัดกว่าวิธีการผลิตแอนติบอดีแบบเดิม ๆ

5. คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ที่สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin จากคลั่งดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ด้วยวิธี SELEX จำนวน 14 รอบ นำมาดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ผ่านการคัดเลือกเชื่อมต่อกับ pGEM-T Vector คัดเลือกโคลนีเดี่ยวได้ 282 โคลนี นำไปทดสอบความสามารถในการจับกับสารมาตรฐาน moscatilin ด้วยเทคนิค ELISA พบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 7 โคลน สามารถจับกับสาร

มาตรฐาน moscatlin ได้ โดยมีค่า S/N ration อยู่ในช่วง 1.03-5.48 สามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจหากล้วยไม้ที่มีสาร Moscatilin และคัดเลือคดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จำนวน 4 โคลน ได้แก่ MosA6 MosH4 MosH8 และ MosE6 ทำ checker board titration ด้วยเทคนิค ELAA พบว่าดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ทุกโคลนที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำปฏิกิริยากับ moscatilin ได้โดยให้ค่า S/N ratio อยู่ในช่วง 0.96 – 1.50

6. การตรวจสอบสาร moscatilin ด้วยเครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนาม (Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100) โดยใช้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จำนวน 4 โคลน ได้แก่ MosA6 MosH4 MosH8 และ MosE6 ตรึงบนขั้วไฟฟ้า SPCE พบว่า มีเพียงดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โคลน MosH4 และ MosH8 ที่สามารถจับกับสาร moscatilin ได้ อย่างไรก็ตาม ค่าสัญญาณ EIS จากการตรวจสอบสารค่อนข้างต่ำ อาจเกิดจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ใช้ตรึงบนขั้วไฟฟ้า SPCE ต่ำ จึงไม่เพียงพอในการตรวจจับสาร moscatilin ซึ่งจะดำเนินการพัฒนาการตรวจสอบโดยการเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และชนิดของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ เพื่อให้การตรวจสอบสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวายมีประสิทธิภาพในอนาคตต่อไป

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอียสกุล มีการแสดงออกของยีนจำนวน 45,012 44,849 และ 29,209 ยีน ตามลำดับ โดยมียีนที่แสดงออกเหมือนกันจำนวน 23,158 ยีน การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนในตัวแทนกล้วยไม้หวายที่มีสาร moscatilin สูง คือ ขาว 5 N และสาร moscatilin ต่ำ คือ ขาวสนาน มีการแสดงออกของกลุ่มยีนเกี่ยวกับ Cell wall organization (หรือ biogenesis) response to stress และ lipid binding มากที่สุดตามลำดับ มีอัตราส่วนของยีนในกลุ่ม oxidoreductase activity และ response to stress มากที่สุด นอกจากนี้มีการทำงานภายในเซลล์ของกลุ่มยีน Tryptophan metabolism Glyoxylate and dicarboxylate metabolism และ limonene and pinene degradation สูงสุดตามลำดับ และมีอัตราส่วนของกลุ่มยีน Cabon metabolism Glyoxylate and dicarboxylate metabolism และ Tryptophan metabolism มากที่สุด เมื่อวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุล พบตำแหน่งเครื่องหมายชนิด SNP จำนวน 518,051 ตำแหน่ง เครื่องหมายชนิด SNP แบบ In/del จำนวน 49,159 ตำแหน่ง ซึ่งข้อมูลตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลที่พบสามารถนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลตำแหน่งเครื่องหมายเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ประเมินลักษณะทางพันธุกรรม ระบุ หรือจำแนกกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายได้ต่อไป

8. การทดสอบและประเมินความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุล ได้ออกแบบไพรเมอร์จากเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย โดยคาดการณ์ด้วยเทคนิคทางด้านชีวสารสนเทศ และค้นหาชิ้นส่วนยีนที่มีตำแหน่งเครื่องหมายชนิด In/del ทำการออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะต่อชนิดได้จำนวน 12 คู่ รวมถึงออกแบบไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายชนิด SSR (Simple Sequence Repeat) ในรูปแบบ di-repeat และ tri-repeat ที่ให้ความแตกต่างระหว่างชนิด ขาว5N, ขาวสนาน และเอียสกุล จำนวน 30 คู่ไพรเมอร์ พบมีเพียง 10 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ เนื่องจากการทดลองส่วนนี้มีตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลจำนวนมาก แต่การดำเนินงานในปี 2563 มีการปรับลดงบประมาณลง จึงไม่เพียงพอต่อการทดสอบและประเมินความใช้ได้ของไพรเมอร์เพิ่มเติม อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ที่ออกแบบได้สามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยในปี 2565 ได้ต่อไป

9. กล้วยไม้ลูกผสมสกุลขาว5N และเอี้ยสกุล สามารถกระตุ้นให้เพิ่มสาร moscatilin ได้โดยใช้แสง LED สีขาว ร่วมกับสาร BA 1 ml/l ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นาน 4 เดือน เมื่อศึกษาองค์รวมของอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ พบการแสดงออกของยีนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ในกล้วยไม้ลูกผสมเอี้ยสกุลมีการแสดงออกของยีนมากกว่ากล้วยไม้ลูกผสมขาว5N ได้แก่ กลุ่มยีน *Phenylpropanoid biosynthesis*, *Flavonoid biosynthesis*, *Phenylalanine metabolism*, *Stilbenoid diarylthptanoid and gingerol* และ *pentose and glucuronate interconversions* ทั้งนี้การแสดงออกของยีนที่มากกว่าสอดคล้องกับปริมาณสาร moscatilin ที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งพบในกล้วยไม้ลูกผสมเอี้ยสกุลมากกว่ากล้วยไม้ลูกผสมขาว 5N เช่นกัน

10. ข้อมูลและองค์ความรู้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอี้ยสกุล ข้อมูลตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs และ SNPs ที่เฉพาะเจาะจงต่อชนิดของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย เป็นฐานข้อมูลเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ประเมินลักษณะทางพันธุกรรม ระบุ หรือจำแนกกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย สามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายเพื่อวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะประจำพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย หรือช่วยในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายต่อไป รวมถึงข้อมูลการแสดงออกของยีนแบบองค์รวมทั้งหมดที่ได้จากเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์สามารถนำไปคาดการณ์การใช้สารกระตุ้นให้กล้วยไม้สกุลหวายเพื่อสร้างสาร moscatilin ต่อไป

### บรรณานุกรม

- คำณูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 162 หน้า.
- ปรางนุช เลิศหิรัญย์. 2561. สีนค้ำกล้วยไม้. กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, สำนักส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตรและอุตสาหกรรม.  
[http://www.ditp.go.th/ditp\\_pdf.php?filename=contents\\_attach/244615/244615](http://www.ditp.go.th/ditp_pdf.php?filename=contents_attach/244615/244615).
- ปัญญาวุฒิ อัมพูชินทร์. 2559. ไวรัสใบด่างมันสำปะหลังในประเทศไทยและการคัดเลือก Aptamer ที่จำเพาะเพื่อการตรวจสอบโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 103 หน้า.
- พรชัย โรจนสิทธิศักดิ์, บุญชู ศรีตุลารักษ์, วิชชุดา ธนกิจเจริญวัฒน์ และ บุญศรี องค์กรพัฒนกุล. 2560. รายงานการวิจัย “การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลในกล้วยไม้สกุลเดนดรอเบียมยี่สิบชนิดโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง”. โครงการความร่วมมือด้านการวิจัยและพัฒนากล้วยไม้สกุล Dendrobium ที่มีศักยภาพเป็นสมุนไพร ประจำปีงบประมาณ 2560. 23 หน้า.
- พรพรม คล่องคำนวณการ, บุญชู ศรีตุลารักษ์ และ กิตติศักดิ์ ลิขิตวิฑูวฒิ. 2557. องค์ประกอบที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด KB จากเอื้องคำฝอย. การประชุมงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2557 มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 1533-1539.
- ศูนย์บริการการจัดการเครือข่ายข้อมูลกล้วยไม้, กรมส่งเสริมการเกษตร.  
<http://orchidnet.doae.go.th/2555/index.php>
- หทัยรัตน์ อุไรรงค์ ภรณ์ สว่างศรี ภูมรินทร์ วณิชขนานันท์ กัณฐวุฒิ บุญมี และกฤตพร รำจวนเกียรติ. 2563. การเพิ่มประสิทธิภาพการสะสมสารเคอร์คูมินอยตีนขมิ้นชัน. ใน รายงานการวิจัยและการพัฒนาการวิจัยการเกษตร ฉบับสมบูรณ์ รหัสโครงการ CRP6105020620. สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), กรุงเทพฯ. 79 หน้า
- อรุณทัย ซาววา, สุภาวดี ง้อเหรียญ, อัญชลี ศรีสุวรรณ, ประพิศ วองเทียม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-118.
- Akkarawut Kowitdamrong . 2012. Effects of moscatilin on migration of non-small cell lung cancer cells. Thesis (M.Sc.) Chulalongkorn University.
- Akula R., and G.A. Ravishankar. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling & Behavior 6(11) : 1720-1731.
- Barthelmebs, L., J. Jonca, A. Hayat, B. P. Simon and J.-L. Marty. 2011. Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. Food Control. 22: 737-743.
- Bulpitt, C.J., Y. Li, P.F. Bulpitt and J. Wang. 2007. The Use of Orchids in Chinese Medicine. Journal of the Royal Society of Medicine. 100(12): 558-563.

- Chen X, Wang F, Wang Y, Li X, Wang A, Wang C, Guo S. 2012. Discrimination of the rare medicinal plant *Dendrobium officinale* based on naringenin, bibenzyl, and polysaccharides. *Sci China Life Sci.* 55(12): 1092-1099.
- Chin, J. X., B. K. S. Chung and D. Y. Lee. 2014. Codon optimization online (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design. *Bioinformatics.* 30(15): 2210–2212.
- Cho, Y. S., E. J. Lee, G. H. Lee and S. S. Hah. 2015. Aptamer selection for fishing of palladium ion using graphene oxide-adsorbed nanoparticles. *Bioorg Med Chem Lett.* 25(23): 5536–5539.
- Chuakul, W. 2002. Ethnomedical uses of Thai Orchidaceous plants. *Mahidol Univ J Pharm Sci* 29(3-4): 41–45.
- Chen X, Wang F, Wang Y, Li X, Wang A, Wang C, Guo S. Discrimination of the rare medicinal plant *Dendrobium officinale* based on naringenin, bibenzyl, and polysaccharides. *Sci China Life Sci.* 55(12): 1092-1099.
- Gasperskaja, E. and V. Kučinskas. 2017. The Most Common Technologies and Tools for Functional Genome Analysis. *Acta Medica Lituanica.* 24(1): 1-11.
- Govindaraju, S. and P. Indra Arulselvi. 2018. Effect of cytokinin combined elicitors (l-phenylalanine, salicylic acid and chitosan) on in vitro propagation, secondary metabolites and molecular characterization of medicinal herb – *Coleus aromaticus* Benth (L). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, Volume 17, Issue 4, Pages 435-444, <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.11.001>.
- Guo, X., Y. Li, C. Li, H. Luo, L. Wang, J. Qian, X. Luo, L. Xiang, J. Song, C. Sun, H. Xu, H. Yao and S. Chen. 2013. Analysis of the *Dendrobium Officinale* Transcriptome Reveals Putative Alkaloid Biosynthetic Genes and Genetic Markers. *Gene.* 527(1): 131-138.
- Hina F., B. H. Abbasi, N. Ahmad, S. S. Ali, F. Akbar and F. Kanwal. 2016. Correlation of different spectral light with biomass accumulation and production of antioxidant secondary metabolites in callus culture of medicinally important *Prunella vulgaris* L. *J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 159 : 1-7.
- Hogewoning, S.W.H., Govert, T., Hans, M., Hendrick, P., Wim V.I. and Jeremy, H., 2010, Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light, *J. Exp. Bot.* 61: 3107-3117.
- Ishihara A, T. Nakao, Y. Mashimo, M. Murai, N. Ichimaru, C. Tanaka, H. Nakajima, K. Wakasa and H. Miyagawa. 2011. Probing the role of tryptophan-derived secondary metabolism in defense responses against *Bipolaris oryzae* infection

- in rice leaves by a suicide substrate of tryptophan decarboxylase. *Phytochemistry*. Jan;72(1):7-13. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.11.001.
- Ishihara, A., F. Matsuda and H. Miyagawa. 2007. Metabolomics for metabolically manipulated plants: effects of tryptophan overproduction. *Metabolomics* 3, 319–334. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0072-4>
- Jia, Y., X. Li and Q. Liu. 2020. Physiological and transcriptomic analyses reveal the roles of secondary metabolism in the adaptive responses of *Stylosanthes* to manganese toxicity. *BMC Genomics* 21, 861. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07279-2>
- Jin, S., Z. Ye, Y. Wang and Y. Ying. 2017. A novel impedimetric microfluidic analysis system for transgenic protein Cry1Ab detection. *Scientific Reports* 7: 43175.
- Kowitdamrong, A., P. Chanvorachote, B. Sritularak and V. Pongrakhananon. 2013. Moscatilin Inhibits Lung Cancer Cell Motility and Invasion via Suppression of Endogenous Reactive Oxygen Species. *BioMed Research International*. 765894.
- Li, Q., G. Ding, B. Li and S.-X. Guo. 2017. Transcriptome Analysis of Genes Involved in Dendrobine Biosynthesis in *Dendrobium Nobile* Lindl. Infected with Mycorrhizal Fungus Mf23 (*Mycena* Sp.). *Scientific Reports*. 7(1): 316.
- Lowe, R., N. Shirley, M. Bleackley, S. Dolan and T. Shafee. 2017. Transcriptomics Technologies. *PLOS Computational Biology*. 13(5): e1005457.
- Lautner, G., Z. Balogh, V. Bardóczy, T. Mészáros and R. E. Gyurcsányi. 2010. Aptamer-based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging. *Analyst*. 135(5): 918–926.
- Liu, J., T. Wei, J. Zhao, Y. Huang, H. Deng, A. Kumar, C. Wang, Z. Liang, X. Ma and X. J. Liang. 2016. Multifunctional aptamer-based nanoparticles for targeted drug delivery to circumvent cancer resistance. *Biomaterials*. 91: 44-56.
- McGown, L. B., M. J. Joseph, J.B. Pitner, G. P. Vonk and C. P. Linn. 1995. The nucleic acid ligand. A new tool for molecular recognition. *Anal Chem*. 67(21): 663A-668A
- Michaud, M., E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset and E. Peyrin. 2003. A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (28): 8672–8679.
- Mishra, R. K., A. Hayat, C. Gaëlle, C. Ocaña, and J. L. Marty. 2015. A label free aptasensor for Ochratoxin A detection in cocoa beans: An application to chocolate industries. *Analytica Chimica Acta*, 889: 106–112.
- Pfeiffer, F. and G. Mayer. 2016. Selection and Biosensor Application of Aptamers for Small Molecules. *Frontiers in Chemistry*. 4: 25.



- Ruscito, A. and M. C. DeRosa. 2016. Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications. *Frontiers in Chemistry*. 4: 14.
- Tsai A.C., S. L. Pan, C. H. Liao, J. H. Guh, S. W. Wang, H. L. Sun, Y. N. Liu, C. C. Chen, C. C. Shen, Y. L. Chang and C. M. Teng. 2010. Moscatilin, a bibenzyl derivative from the India orchid *Dendrobium loddigesii*, suppresses tumor angiogenesis and growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 292:163–170.
- Wang, B., T.X. Zhang., H.W. Du., Q. Zhao and X.C. Meng. 2020. Effect of PEG on Secondary Metabolites in Suspension Cell of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Acta Medica Mediterranea*. 36: 2307-2312.
- Tan, W., H. Wang, Y. Chen, X. Zhang, H. Zhu, C. Yang, R. Yang and C. Liu. 2011. Molecular aptamers for drug delivery. *Trends in Biotechnology*. 29(12): 634-640.
- Teoh, E.S . 2016. Medicinal Orchids of Asia. Science - 752 pages
- Thanawuth P. 2011. Cytotoxic constituents from *dendrobium capillipes* and *dendrobium secundum*. Thesis (M.Ph.)--Chulalongkorn University.
- Tsai A.C., S. L. Pan, C. H. Liao, J. H. Guh, S. W. Wang, H. L. Sun, Y. N. Liu, C. C. Chen, C. C. Shen, Y. L. Chang and C. M. Teng. 2010. Moscatilin, a bibenzyl derivative from the India orchid *Dendrobium loddigesii*, suppresses tumor angiogenesis and growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 292:163–170.
- Tuerk, C and L. Gold. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 249(4968): 505-510.
- Waminal, N., K. H. Ryu, S. H. Choi and H. H. Kim. 2013. Randomly Detected Genetically Modified (GM) Maize (*Zea mays* L.) near a Transport Route Revealed a Fragile 45S rDNA Phenotype. *PloS one*. 8: e74060.
- Wang, L., W. Ma, W. Chen, L. Liu and Y. Zhu. 2011. An aptamer-based chromatographic strip assay for sensitive toxin semi-quantitative detection. *Biosens. Bioelectron.* 26: 3059–3062.
- Wolf Jochen, B.W. 2013. Principles of Transcriptome Analysis and Gene Expression Quantification: An Rna-Seq Tutorial. *Molecular Ecology Resources*. 13(4): 559-572.
- Wolter, O. and G. Mayer. 2017 Aptamers as Valuable Molecular Tools in Neurosciences. *J. Neurosci.* 37(10): 2517-2523. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1969-16.2017
- Wu, H., Zhang, Y., Zhu, C., Xiao, X., Zhou, X., Xu, W. Shen and M. Huang. 2012. Presence of CP4-EPSPS Component in Roundup Ready Soybean-Derived Food Products. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(2): 1919–1932.
- Yan, L. C. 2011. Screening and affinity analysis of the aptamers against the CP4-EPSPS transgenic protein. Master's thesis. Fujian Agriculture and Forestry University. China.

- Yan, L., X. Wang, H. Liu, Y. Tian, J. Lian, R. Yang, S. Hao, X. Wang, S. Yang, Q. Li, S. Qi, L. Kui, M. Okpekum, X. Ma, J. Zhang, Z. Ding, G. Zhang, W. Wang, Y. Dong and J. Sheng. 2015. The Genome of *Dendrobium Officinale* Illuminates the Biology of the Important Traditional Chinese Orchid Herb. *Molecular Plant*. 8(6): 922-934.
- Yang, D., X. Liu, Y. Zhou, L. Luo, J. Zhang, A. Huang, Q. Mao, X. Chen and L. Tang. 2017. Aptamer-based biosensors for detection of lead (II) ion: a review. *Anal. Methods*. 9: 1976-1990. DOI: 10.1039/C7AY00477J.
- Zandalinas S.I., S. Carlos, B. Joaquim, G. Aurelio and A. Vicent. 2017. Activation of Secondary Metabolism in Citrus Plants Is Associated to Sensitivity to Combined Drought and High Temperatures. *Frontiers in Plant Science*, Vol.7, Pages 1954, DOI=10.3389/fpls.2016.01954.
- Zhang M., T. Fang, G. Pu, X. Sun, X. Zhou and Q. Cai. 2013. Xenobiotic metabolism of plant secondary compounds in the English grain aphid, *Sitobion avenae* (F.) (Hemiptera: Aphididae). *Pestic Biochem Physiol*;107(1):44-9. doi: 10.1016/j.pestbp.2013.05.002. Epub 2013 May 17. PMID: 25149234.
- Zhang, Y., H. Hong and W. Cai. 2011. Tumor-targeted drug delivery with aptamers. *Curr Med Chem*. 18(27): 4185-94.
- Zhang, G.-Q., Q. Xu, C. Bian, W.-C. Tsai, C.-M. Yeh, K.-W. Liu, K. Yoshida, L.-S. Zhang, S.-B. Chang, F. Chen, Y. Shi, Y.-Y. Su, Y.-Q. Zhang, L.-J. Chen, Y. Yin, M. Lin, H. Huang, H. Deng, Z.-W. Wang, S.-L. Zhu, X. Zhao, C. Deng, S.-C. Niu, J. Huang, M. Wang, G.-H. Liu, H.-J. Yang, X.-J. Xiao, Y.-Y. Hsiao, W.-L. Wu, Y.-Y. Chen, N. Mitsuda, M. Ohme-Takagi, Y.-B. Luo, Y. Van de Peer and Z.-J. Liu. 2016. The *Dendrobium catenatum* Lindl. Genome Sequence Provides Insights into Polysaccharide Synthase, Floral Development and Adaptive Evolution. *Scientific Reports*. 6(19029).