ระดับโครงการ

กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญทางสมุนไพรในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย

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

ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์

Phummarin Wanichananan

ปี 2564

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปผู้บริหาร

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 (มะเร็งเยื่อบุช่องปาก และยังสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม (Veronika et.al. 2017) 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 กล้วยไม้สกุลหวายที่มีศักยภาพในการใช้เป็นสมุนไพรหรือใช้ประโยชน์ในทางเภสัชยังขาดแคลนข้อมูลทางพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ในการคัดเลือก ระบุ และปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงประโยชน์ทางด้านสิทธิบัตร ปกป้องการแอบอ้าง และปลอมปนวัตถุดิบที่ได้จากกล้วยไม้สกุลหวายที่มีศักยภาพเป็นสมุนไพร เป็นต้น

ปัจจัยภายนอกได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณน้ำ และธาตุอาหาร มีผลต่อการชักนำให้กล้วยไม้ผลิตสารสำคัญ moscatilin ส่งผลให้สารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้มีปริมาณไม่สม่ำเสมอในแต่ละครั้งของการผลิต เมื่อนำกล้วยไม้ดังกล่าวไปใช้เป็นยา จะทำให้การรักษาล้มเหลวได้ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีแนวทางเพื่อการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายของไทย โดยการศึกษาการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้ปัจจัยจากภายนอกซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้มีผลต่อปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ให้สูงขึ้นเพื่อเพิ่มศักยภาพการใช้ประโยชน์ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ร่วมกับศึกษาวิจัยพัฒนาชุดตรวจสอบสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ด้วยเทคนิค electrochemical aptasensor เพื่อเป็นชุดตรวจสอบที่เกษตรกรสามารถใช้งานได้ง่าย สะดวก รวดเร็วและค่าใช้จ่ายไม่สูง และการศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเทคโนโลยี ทรานสคริปโตมิกส์ เป็นทางเลือกในการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอในภาพรวมทั้งหมด ทำให้เข้าใจหน้าที่ของยีนต่อการสร้างสาร Moscatilin และช่วยในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายได้แม่นยำและรวดเร็วยิ่งขึ้น

การทดสอบปัจจัยด้านแสง LED ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA เพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 2 พันธุ์ คือ เอียสกุล และขาว 5N พบว่า แสงเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้น และสูตรอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA เป็นปัจจัยร่วมจะมีผลต่อปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ที่เกิดขึ้น ในส่วนการทดสอบสาร

กรมวิทยาศาสตร์

PEG ร่วมกับแสงพบว่า พันธุ์เอียสกุลสูตรอาหารที่มี PEG 5% ในแสงสีน้ำเงินจะมีปริมาณสาร moscatilin สูงสุด พันธุ์ขาว 5N พบว่าในแสง LED สีน้ำเงิน ร่วมกับสูตรอาหารที่มี PEG 10% จะมีปริมาณสารสำคัญ Moscatilin สูงสุด ข้อมูลดังกล่าวจึงใช้เป็นแนวทางการพัฒนาศักยภาพของกล้วยไม้สกุลหวายของไทยเพื่อการพัฒนาการผลิตสารสำคัญสู่อุตสาหกรรมด้านเภสัชภัณฑ์ 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 งานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการตรวจสอบสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวายของไทย ด้วยวิธี electrochemical impedimetric aptasensor ได้ และนำไปใช้ยังภาคสนามได้อีกด้วย ด้านการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอียสกุล การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนทั้งหมดพบการแสดงออกของยีนจำนวน 45,012 44,849 และ 29,209 ยีน ตามลำดับ และมีการแสดงออกของกลุ่มยีนมากที่สุด ได้แก่ กลุ่มยีนเกี่ยวกับ Cell wall organization (หรือ biogenesis) response to stress และ lipid binding และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs และ SNPs สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Moscatilin หรือลักษณะประจำพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย เพื่อช่วยในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายให้มีสาร Moscatilin สูงต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์จากกล้วยไม้เพื่อรักษาอาการเจ็บป่วยกว่า 42 ชนิด สารออกฤทธิ์ moscatilin จากกล้วยไม้สกุลหวาย อยู่ในกลุ่ม bibenzyl มีหมู่ phenol ในโครงสร้าง มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการเจริญเซลล์มะเร็ง มีศักยภาพในการใช้เป็นสมุนไพร แต่ยังขาดแคลนข้อมูลทางพันธุกรรม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้ปัจจัยจากภายนอกเป็นตัวกระตุ้นปริมาณสารสำคัญให้สูงขึ้น การผลิตชุดตรวจสอบปริมาณสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของกล้วยไม้ การศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ เพื่อเข้าใจหน้าที่ของยีนต่อการสร้างสาร moscatilin โดยการศึกษาแสง LED 3 สี ร่วมกับสูตรอาหารที่มี 6-benzylaminopurine (BA) พบว่าพันธุ์เอียสกุลปริมาณสารสำคัญ moscatilin จะตอบสนองต่อแสง LED สีขาว ร่วมกับ BA 1 mg/l พันธุ์ขาว 5N จะพบได้มากในแสง LED สีน้ำเงิน ร่วมกับ BA 2 mg/l การทดสอบสาร PEG ร่วมกับ LED พบว่า พันธุ์เอียสกุลสูตรอาหารที่มี 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 และนำไปใช้ยังภาคสนามได้อีกด้วย การทดลองหาลำดับนิวคลีโอจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอียสกุล มีลักษณะพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *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, ขาวสนาน และเอียสกุล จำนวน 30 คู่ไพรเมอร์ พบมีเพียง 10 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ นอกจากนี้ผลการแสดงออกของยีนภายหลังการกระตุ้นด้วยแสง LED สีขาวร่วมกับสาร BA 1 mg/l พบสามารถเพิ่มปริมาณสาร moscatilin มากขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยการแสดงออกของยีนหลังการกระตุ้นด้วย BA พบว่ากล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลมีการแสดงออกของยีนมากกว่าขาว5N ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสาร moscatilin ที่พบในกล้วยลูกผสมเอียสกุลมากกว่าขาว 5N

กรมวิชาการเกษตร

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 ELAA, 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 moscatiln 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 homologosity. 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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 ml/L revealed the increase of the amount of Moscatilin compared to the control. Earsakul have higher gene expression than Khaow-5N. consistant with the amount of Moscatilin found more in Earsakul than in Khaow-5N.

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

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

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, สวนกล้วยไม้คุณดวงพร บุญชัย จ.สมุทรสาคร ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวาย ขอขอบคุณ ดร.กฤตยา เพชรผึ้ง ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านการการวิเคราะห์สารมอสคาติลินด้วยเทคนิคทางเคมี ขอขอบคุณ คุณยุพิน กสินเกษมพงษ์ สถาบันวิจัยพืชสวน ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับกล้วยไม้สมุนไพร และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย นางสาววัชรินทร์ ศรีประยูร นายฉลาด ไหวติงนางสาวศุภรัสมิ์ พูลพัฒนสุวรรณ และนางสาวขวัญจิต ชั้นปั้นแตง และพนักงานอัตราจ้างของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่กรุณาให้การสนับสนุนและช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	1
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
กิตติกรรมประกาศ	6
สารบัญ	8
สารบัญภาพ	9
สารบัญตาราง	-
บทที่ 1 บทนำ	10
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	14
บทที่ 3 ผลการศึกษา	24
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	31
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	40

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปริมาณสารสำคัญ moscatilin ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เอียสกุล และขาว 5N ในการทดสอบสูตรอาหารที่มี BA 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับแสง LED สีขาว แดง และน้ำเงิน	37
2	ปริมาณสารสำคัญ moscatilin ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เอียสกุล และขาว 5N ในการทดสอบสูตรอาหารที่มี PEG 0, 5% และ 10% ร่วมกับแสง LED สีขาว แดง และน้ำเงิน	37
3	ค่าสเปตตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) ของการทำปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ MosA6 MosH4 MosH8 และ MosE6 กับบัฟเฟอร์ (a) และสารมาตรฐาน moscatilin (b)	38
4	การแสดงออกของยีนแบบ up-regulation และ down-regulation ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายขาว5N	39

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 1 บทนำ

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

วิสัยทัศน์

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

พันธกิจ

1. สร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยด้านพืชและเครื่องจักรกลการเกษตร สู่กลุ่มเป้าหมาย
2. กำหนดและกำกับดูแลมาตรฐานระบบการผลิตและผลิตพันธุ์พืชและปัจจัยการผลิต พัฒนาระบบตรวจรับรองสินค้าการเกษตรด้านพืชให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล
3. อนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืช แมลง และจุลินทรีย์
4. กำกับ ดูแล และพัฒนากฎหมายที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ

2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน (โปรดเลือกเฉพาะยุทธศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับหน่วยงานของท่าน)

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคง

เพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ

☑ ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน

เน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์

คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษและภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคม

สร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคม เพิ่มโอกาสให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

คำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ

การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”

กรมวิชาการเกษตร

3. วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 และโปรดระบุแผนงาน/โครงการให้สอดคล้องกับโปรแกรมของแผน ววน.

โปรแกรมตามแผน ววน.	งบประมาณ (บาท)
โปรแกรม P10. ยกระดับความสามารถการแข่งขันและวางรากฐานทางเศรษฐกิจ	**784,480**

4. รายละเอียดโครงการ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

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 ไต้หวัน 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 (มะเร็งเยื่อบุช่องปาก 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

กรมวิชาการเกษตร

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 เอียสกุล 0.0300 %W/W (พรชัย และคณะ, 2560) ซึ่งสามารถพัฒนานำมาใช้ประโยชน์เพื่อการรักษาโรค เพิ่มทางเลือกของการใช้กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายให้มีคุณค่าและมูลค่าของกล้วยไม้ได้มากกว่าการเป็นไม้ตัดดอก จากแนวโน้มการส่งออกสินค้ากล้วยไม้ของไทยเดือนมกราคม-มิถุนายน 2561 เพิ่มขึ้น 6.69% เมื่อเทียบกับช่วงเวลาเดียวกันของปี 2560 แต่เนื่องจากเศรษฐกิจโลกยังอยู่ในช่วงชะลอตัว ส่งผลให้ความต้องการของตลาดต่างประเทศส่วนใหญ่ยังอยู่ที่ตลาดเดิม และพฤติกรรมการบริโภคของตลาดต่างประเทศค่อนข้างหลากหลาย ผู้บริโภคมีความต้องการดอกกล้วยไม้ที่มีคุณภาพ กล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่ๆ ทำให้ผู้ประกอบการต้องรักษามาตรฐานการผลิต รวมทั้งการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ (ปรางนุช,2561) จึงควรเพิ่มทางเลือกการใช้ประโยชน์ของกล้วยไม้เพื่อการตัดดอกของไทย โดยการนำเทคโนโลยีชีวภาพการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้ปัจจัยจากภายนอกซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้มีผลต่อปริมาณสารสำคัญให้สูงขึ้นได้นั้น จึงเป็นแนวทางเพื่อการศึกษาวิจัย และการตรวจสอบปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้นั้นมีความจำเป็นและมีประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของกล้วยไม้ การนำกล้วยไม้ซึ่งทราบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่แน่นอนไปใช้ จะสามารถลดปัญหาความไม่แน่นอนของการออกฤทธิ์ นอกจากนี้การตรวจหาปริมาณสารสำคัญในกล้วยไม้ก่อนการซื้อขาย ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กล้วยไม้ ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นด้วย จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิจัยพัฒนาชุดตรวจสอบสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ด้วยเทคนิค Enzyme-linked aptamer assay (ELAA) เพื่อเป็นชุดตรวจสอบที่เกษตรกรสามารถใช้งานได้ง่าย สะดวก รวดเร็วและค่าใช้จ่ายไม่สูง และในด้านการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายที่มีศักยภาพในการใช้เป็นสมุนไพรหรือใช้ประโยชน์ในทางเภสัชยังขาดแคลนข้อมูลทางพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ และมีความต้องการเครื่องหมายโมเลกุลในระดับดีเอ็นเอมาช่วยในคัดเลือกพันธุ์ จำแนกพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ เพื่อประโยชน์ทางด้านสิทธิบัตร ปกป้องการแอบอ้างและปลอมปนวัตถุดิบที่ได้จากกล้วยไม้สกุลหวายที่มีศักยภาพเป็นสมุนไพร เป็นต้น

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

กรมวิชาการเกษตร

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

ขอบเขตการศึกษา

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

2) ออกแบบและสังเคราะห์คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ นำมาคัดเลือกแอปตาเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสารสำคัญ Moscatilin และนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคนิค ELAA

3) ทำการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs และ SSR ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่มีศักยภาพในการผลิตสาร Moscatilin ได้แก่ กล้วยไม้หวายพันธุ์ ขาว 5N ซึ่งเป็นพันธุ์ที่พบสาร Moscatilin สูง เปรียบเทียบกับกล้วยไม้หวายพันธุ์ขาวสนานที่พบสาร Moscatilin ต่ำ เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย ร่วมกับการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Moscatilin ในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์

นิยามศัพท์

Light Emitting Diode (LED) คือ หลอดไฟชนิดหนึ่ง มีสารกึ่งตัวนำไฟฟ้าที่ยอมให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่าน แล้วปล่อยแสงสว่างออกมาได้ทันที

6-Benzylaminopurine (BA) คือ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโตไคนิน

Vacin and Went (VW) คือ สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

protocorm-like bodies (plbs) คือ เนื้อเยื่อของกล้วยไม้ที่เพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กรมวิชาการเกษตร

ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ อาจเป็น RNA, ssDNA หรือ dsDNA ที่เรียกว่าแอปตาเมอร์ (Aptamer) ซึ่งมีการทำงานคล้ายกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายต่างๆ ได้อย่างจำเพาะและหลากหลายชนิด

electrochemical aptasensor คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างชีวภาพโดยใช้ตัววัดสัญญาณระบบเคมีไฟฟ้าโดยอาศัยดีเอ็นเอแอปตาเมอร์เป็นตัวตรวจจับ

ทรานสคริปโตมิกส์ (Transcriptomics) คือ ศาสตร์ของการศึกษาอาร์เอ็นเอองค์รวมของสิ่งมีชีวิต เพื่อศึกษาการแสดงออกและหน้าที่ของยีน

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) คือ ชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม ที่ใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิตและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้

กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย (Orchid Dendrobium) เป็นกล้วยไม้ลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามสายพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

1.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 เมื่อชิ้นส่วนตายอด/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

กรมวิชาการเกษตร

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

การวิเคราะห์ประมาณสารประกอบ 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 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)

กรมวิชาการเกษตร

เครื่องตรวจวัด: PDA 280 nm

ปริมาตรการฉีด: 5 µl

เวลาที่ใช้: 17 นาที

บันทึกผล ค่าของสาร moscatilin แล้วนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองที่ 2 การพัฒนาชุดตรวจสอบสารสำคัญ moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายของไทย

1. การวิเคราะห์ปริมารสาร moscatilin จากกล้วยไม้สกุลหวาย

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

1.2 สกัดสาร moscatilin จากกล้วยไม้สกุลหวาย โดยชั่วตัวอย่าง 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 µg/ml

1.4 วิเคราะห์ประมาณสารประกอบ 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

<u>สภาวะเครื่อง UHPLC</u>

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 ลักษณะโครมาโตแกรมและ retention time ของสาร moscatilin

กรมวิชาการเกษตร

2. การเตรียมดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสาร moscatilun

2.1 การเตรียมคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ (DNA aptamer library)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (DNA aptamer) ขนาด 86 นิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5’-AAAGAATTCAAGCTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-(N_{40})-TCGGATCCGCTATAGTGAGTCG TATTA-3’ ซึ่งประกอบ ด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์ (N_{40}) อยู่บริเวณกลางของ DNA aptamer ส่วนบริเวณด้านข้างทั้งสองด้านเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ โดยวิธี PCR ดังนี้ forward primer (AptF), 5'-TTTCTGCAGGTCGACTAATACGACTCACTAT AGCGGA-3'; reverse primer (AptR), 5'-AAAGAATTCAAGCTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-3' เมอร์ และสังเคราะห์ไพรเมอร์ AptR–Biotin [(biotin)-5-AAAGAATTCAAGCTTGCAAGCTT 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 โดยใช้1X 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 ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสบน 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล ทำการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารมาตรฐาน moscatilinจำนวน 14 รอบ

2.2.2 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสารสารมาตรฐาน moscatilin

ขั้นตอนนี้จะเป็นกำจัดดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ไม่จำเพาะต่อสารมาตรฐาน 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 ที่

กรมวิทยาศาสตร์

เติม 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 moscatilinสอดแทรกอยู่ในพลาสมิด

2.3 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารสำคัญ moscatilin ด้วยเทคนิค ELAA

นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารสำคัญ moscatilin จำนวน 282 โคลน ไปทดสอบด้วยวิธี indirect ELAA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Barthelmebse *et al*., (2011) โดยใช้สารมาตรฐาน moscatilin เคลือบลงในหลุมของถาด ELISA ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ติดฉลาก biotin แล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37องศาเซลเซียส 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 ค่าความเข้มของสีที่ความยาวคลื่นแสง 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 37องศาเซลเซียส 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

กรมวิชาการเกษตร

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 โพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ และ โพแทสเซียมคลอไรด์ 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 หยดดีเอ็นเอตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสาร moscatilin ซึ่งพ่วงด้วยสารกลุ่ม NH_2 ทางด้านปลาย 5’ ขอเส้นดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 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 โดยใช้เอียสกุล ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ด้วยวิธี UHPLC ได้เท่ากับ 0.062 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม เป็นตัวอย่างควบคุมบวก และกล้วยไม้ ขาว 5N ที่ไม่สามารถตรวจพบปริมาณสาร moscatilin ได้ เป็นตัวอย่างควบคุมลบ

สกัดสาร moscatilin โดยชั่วตัวอย่าง 0.5 กรัม ด้วยในเมธานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้วิธี ultrasonic extraction เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนสารละลายส่วนใสกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 µm นำมาเจือจางใน binding buffer หยอดลงบนแผ่น SPCE ที่เคลือบด้วยดีแอปตาเมอร์ต่อสาร moscatilin จากข้อ 4 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ moscatilin ในสารสกัดกล้วยไม้ วัดค่าสเปตตรัมของอิมพีแดนซ์

กรมวิชาการเกษตร

ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) ด้วยเครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนาม (Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100)

บันทึกผล ค่า EIS สาร moscatilin ในสารสกัดกล้วยไม้

การทดลองที่ 3 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลและการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์

1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยี ทรานสคริปโตมิกส์

1.1 ตัวอย่างพืช

เลี้ยงต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ได้แก่ กล้วยไม้หวายขาว 5N (พบสาร moscatilin สูง) กล้วยไม้หวายขาวสนาน (พบสาร moscatilin ต่ำ) และกล้วยไม้หวายเอียสกุล 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 β-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 แล้วดูดสารละลายดังกล่าวลงไปใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้งไป ล้าง column ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ RW_1 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 ไปวางลง microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชะอาร์เอ็นเอออกจาก column ด้วยการเติม RNase free water ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ที่มี RiboLock™ RNase Inhibitor ของบริษัท Fermentas ผสมอยู่ความเข้มข้น 0.04 ยูนิตต่อไมโครลิตร

1.3 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอรวมด้วยวิธีเจลอิเลคโตโฟรีซีส (gel electrophoresis)

ทำการตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีสโดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

กรมวิชาการเกษตร

1.4 การกำจัดไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA removal)

กำจัด rRNA ด้วยชุด RiboMinusTM Plant Kit for RNA-Seq โดยนำอาร์เอ็นเอรวมที่ได้มาติดกับโพรบ RiboMinusTM Probe ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปล่อยให้เย็น แล้วเติม RiboMinusTM 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 เติมไพร์เมอร์ oligo$(dT)_{18}$ 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DEPC 6.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำมาเติมบัปเฟอร์ 5X reaction 4.5 ไมโครลิตร Ribolock™ RNase inhibitor 1 ไมโครลิตร 10mM dNTP mix 2 ไมโครลิตร และ ReverstAid M-MuLV 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

1.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์

นำตัวอย่าง cDNA ที่ได้ใส่ในหลอด 1.5 ไมโครลิตร แล้วปิดฝาให้สนิทพันด้วยพาราฟิมส์ แล้วส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีทรานสคริบโตมิกส์โดยใช้เครื่อง Next Generation Sequencing รูปแบบ illuminar ของบริษัทโนโวยีน (Novogene) ประเทศจีน

1.7 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

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

1.8 การค้นหาตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุล

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลและค้นหาตำแหน่ง SNP ที่เกิดการกลายไป และลักษณะการขาดหายหรือการเพิ่มเข้ามา (In/del) ของชิ้นส่วนยีนขนาดเล็กที่วิเคราะห์จากชิ้นส่วนของยีนหรือ mRNA โดยใช้โปรแกรม Samtools และ Picard แล้วทำการคัดกรองการอ่านซ้ำด้วยโปรแกรม Samtools/BCFtools ในการค้นหาตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP และ In/Del โดยตั้งไดเรกทอรีตัวแปรผลเป็น 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

กรมวิชาการเกษตร

2. การทดสอบและประเมินความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุล

2.1 ตัวอย่างพืช

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

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบกล้วยไม้หวายมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี 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% β-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 Choroform: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 Choroform: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 ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย 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($(NH_4)_2SO_4$) 2 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (5 uM) อย่างละ 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง themal 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 ด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส (electropholesis) 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

กรมวิชาการเกษตร

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

3.3 วิเคราะห์ประมาณสารประกอบ 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 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

กรมวิชาการเกษตร

ปริมาตรการฉีด: 5 µl

เวลาที่ใช้: 17 นาที

บันทึกผล ลักษณะโครมาโตแกรม ค่า retention time และคำนวณค่าปริมาณสาร moscatilin

3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

☑ ไม่มี ❑ มี ได้รับอนุมัติเมื่อวันที่..... (โปรดแสดงหลักฐานในภาคผนวก)

❑ เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

❑ เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

บทที่ 3 ผลการศึกษา

3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

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 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 (ภาพที่ 1) 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 ปัจจัยของสูตรอาหารและแสงไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin โดยพบว่าในแสง LED สีน้ำเงิน ร่วมกับสูตรอาหารที่มี PEG 10% จะมีปริมาณสารสำคัญ Moscatilin สูงสุด (ภาพที่ 2) 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 จากผลการวิเคราะห์

กรมวิชาการเกษตร

ปริมาณสาร moscatilin ในส่วนต่างๆของกล้วยไม้นั้น โดยเฉพาะในส่วนของใบกล้วยไม้ ที่พบการสะสมของสาร moscatilin ในปริมาณที่สูงเทียบเคียงกับส่วนของลำต้น จะทำให้การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ด้วยชุดตรวจสอบที่จะพัฒนาขึ้น สามารถใช้ใบกล้วยไม้มาตรวจวิเคราะห์ได้โดยตรง ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการตรวจวิเคราะห์สาร moscatilin ในแปลงปลูกได้

4. ได้คลังของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ขนาด 1.2×10^{24} รูปแบบ ซึ่งดีเอ็นเอแอปตาเมอร์มีความยาว 86 นิวคลีโอไทด์ โดยบริเวณส่วนกลางของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์ ซึ่งคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์นี้ เป็นแหล่งของแอปตาเมอร์ ที่มีความหลากหลาย ดังนั้นเมื่อต้องการตรวจสอบสารสำคัญชนิดอื่นๆ ในอนาคต จึงสามารถนำคลังของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์นี้มาใช้ได้ทันที เป็นการสะดวกและประหยัดกว่าวิธีการผลิตแอนติบอดีแบบเดิมๆ

5. คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ที่สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin จากคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ด้วยวิธี SELEX จำนวน 14 รอบ นำมาดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ผ่านการคัดเลือกเชื่อมต่อกับ pGEM-T Vector คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวได้ 282 โคโลนี นำไปทดสอบความสามารถในการจับกับสารมาตรฐาน moscatlin ด้วยเทคนิค ELAA พบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 7 โคลน สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatlin ได้ โดยมีค่า S/N ration อยู่ในช่วง 1.03-5.48 สามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจหากล้วยไม้ที่มีสาร 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

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 (ภาพที่ 3) อย่างไรก็ตาม ค่าสัญญาณ EIS จากการตรวจสอบสารค่อนข้างต่ำ อาจเกิดจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ใช้ตรึงบนขั้วไฟฟ้า SPCE ต่ำ จึงไม่เพียงพอในการตรวจจับสาร moscatilin ซึ่งจะดำเนินการพัฒนาการตรวจสอบโดยการเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และชนิดของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ เพื่อให้การตรวจสอบสาร moscatiln ในกล้วยไม้สกุลหวายมีประสิทธิภาพในอนาคตต่อไป

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยี ทรานสคริปโตมิกส์ 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 Trytophan metabolism Glyoxylate and dicaboxylate metabolism และ limonene and pinene degradation สูงสุดตามลำดับ

กรมวิชาการเกษตร

และมีอัตราส่วนของกลุ่มยีน Cabon metabolism Glyoxylate and dicarboxylate metabolism และ Trytophan 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 โดยคาดการณ์ด้วยเทคนิคทางด้านชีวสารสนเทศและค้นหาชิ้นส่วนยีนที่มีตำแหน่งเครื่องหมายชนิด 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 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* (ภาพที่ 4) ทั้งนี้การแสดงออกของยีนที่มากกว่าสอดคล้องกับปริมาณสาร moscatilin ที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งพบในกล้วยไม้ลูกผสมเอียสกุลมากกว่ากล้วยไม้ลูกผสมขาว5N เช่นกัน

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

กรมวิชาการเกษตร

โครงการที่ได้รับอนุมัติ	วัตถุประสงค์ของโครงการ	ผลการดำเนินงานที่เกิดขึ้นจริง
โครงการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญทางสมุนไพรในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย **ชื่อหัวหน้าโครงการ** **นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์**	1. เพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายจำนวน 2 พันธุ์ คือ ขาว 5N และเอียสกุล โดยใช้ปัจจัยจากภายนอกเป็นตัวกระตุ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2. เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคนิค Enzyme-linked aptamer assay (ELAA) เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเบกุลช่วยในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์ และวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์	1. การเปรียบเทียบสิ่งกระตุ้นที่เป็นชนิดของแสงและสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA พบว่าแสงจะมีผลต่อปริมาณสาร Moscatilin ได้มากกว่า และ PEG จะมีผลต่อปริมาณสาร Moscatilin ของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ 2. ได้คลังของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ขนาด 1.2×10^{24} รูปแบบ และคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ที่สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin จากคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ด้วยวิธี SELEX 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 3. 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 4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยี ทรานสคริปโตมิกส์ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอียสกุล มีการแสดงออกของยีนจำนวน 45,012 44,849 และ 29,209 ยีน ตามลำดับ โดยมียีนที่แสดงออกเหมือนกันจำนวน 23,158 ยีน 5. การแสดงออกของยีนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ในกล้วยไม้ลูกผสมเอียสกุลมีการแสดงออกของยีนมากกว่ากล้วยไม้ลูกผสมขาว5N ได้แก่ กลุ่มยีน *Phenylpropanoid biosynthesis, Flavonoid biosynthesis, Phenylalanine metabolism, Stilbenoid diarylthptanoid and gingerol* และ *pentose and glucuronate interconversions* การแสดงออกของยีนที่มากกว่าสอดคล้องกับปริมาณสาร moscatilin

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
1. องค์ความรู้	3	เรื่อง	องค์ความรู้	3	เรื่อง	แผ่นพับองค์ความรู้ เรื่องการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้ด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ (เอกสารแนบ 1)	การแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย
2. การพัฒนากำลังคนนักวิจัยภาคเอกชน	1	คน	การพัฒนากำลังคนนักวิจัยภาคเอกชน	1	คน	เทคโนโลยีการผลิตสารสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย (อยู่ระหว่างจัดทำเอกสารคู่มือ)	ดำเนินการในเดือนเมษายนการอบรมถ่ายทอดในระบบ online และจัดทำคู่มือการถ่ายทอดเทคโนโลยี
3. ผลงานตีพิมพ์ระดับชาติ	3	เรื่อง	ผลงานตีพิมพ์ระดับชาติ	3	เรื่อง	1. เทคโนโลยีการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ moscatilin ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 2. การผลิตชุดตรวจสอบสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3. บทความการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Moscatilin หรือลักษณะประจำพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย รวมถึงข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Moscatilin จากเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์	เอกสารวิชาการเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาการผลิตสารสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหลายการผลิตชุดตรวจสอบสารสำคัญ และเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารสำคัญ ในกล้วยไม้สกุลหวาย
4. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ห้องปฏิบัติการ	1	ต้นแบบ	ต้นแบบผลิตภัณฑ์ห้องปฏิบัติการ	1	ต้นแบบ	ต้นแบบชุดตรวจสอบสาร Moscatilin	ประยุกต์ใช้ตรวจสอบปริมาณสาร Moscatilin ของกล้วยไม้สกุลหวายในภาคสนาม นำส่งผลผลิตในปี 2565
5. ต้นแบบเทคโนโลยีระดับห้องปฏิบัติการ	2	ต้นแบบ	ต้นแบบเทคโนโลยีระดับห้องปฏิบัติการ	3	ต้นแบบ	1. การเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เอียสกุล (เอกสารแนบ 2) 2. การเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ขาว 5N (เอกสารแนบ 3) 3. การผลิตดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวาย (เอกสารแนบ 4)	1. กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุลใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 1 มก./ล. BA ร่วมกับแสง LED สีขาว 2. กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุลและพันธุ์ขาว 5N ใช้สาร PEG ความเข้มข้น 5% และ 10% ตามลำดับ ร่วมกับแสง LED สีน้ำเงิน 3. คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสาร Moscatilin มาตรฐานด้วยวิธี SELEX แล้วนำมาทดสอบกับสาร Moscatlin ในกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเทคนิค ELAA

กรมวิชาการเกษตร

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
องค์ความรู้ บทความทางวิชาการ ต้นแบบผลิตภัณฑ์ ต้นแบบเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ นักวิจัย นักวิชาการ รวมทั้งผู้ประกอบการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้านกล้วยไม้ของภาคเอกชนที่ได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีในการผลิตสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ให้มีปริมาณสูงขึ้นและมีคุณภาพมากขึ้น และนำองค์ความรู้ไปพัฒนาต่อย่อและขยายผลในโครงการวิจัยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและชักนำการผลิตสารสำคัญทางเภสัชภัณฑ์ของพืชสมุนไพร ปี 2565-2567	2565
เทคโนโลยีการผลิตดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และการผลิตชุดตรวจสอบต่อสารเป้าหมาย สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในโครงการวิจัย เรื่องวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสารพิษตกค้างทางการเกษตรอย่างรวดเร็วเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชปลอดภัย และ การทดลอง เรื่อง การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างมันสำปะหลังอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค Immunochromatographic strip (ICS) เพื่อเกษตรกร ปี 2565-2567 เพื่อการผลิตชุดตรวจสอบที่สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้	2565
ต้นแบบผลิตภัณฑ์ชุดตรวจสอบสารสำคัญ ผู้ประกอบการผลิตสมุนไพรสามารถนำไปใช้เพื่อการตรวจสอบคุณภาพของสมุนไพรในการผลิตยา และผู้ประกอบการผลิตชุดตรวจสอบสามารถนำเทคโนโลยีหรือต้นแบบไปผลิตเพื่อการจำหน่ายต่อไป	2566

*ผลลัพธ์ : ผลสำเร็จที่เกิดจากการนำผลผลิต (Output)ไปต่อยอด การเปลี่ยนรูปของผลผลิตไปสู่รูปแบบที่ใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง หรือการเคลื่อนผลผลิตไปสู่กิจกรรมที่ต่อเนื่อง ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (Change) ที่ปรากฏชัด และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านวิชาการ : ข้อมูลด้านวิชาการในรูปแบบวารสารตีพิมพ์ หรือเอกสารแผ่นพับ ที่นักวิจัย/นักวิชาการ ของภาครัฐและเอกชนสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในกล้วยไม้ชนิดอื่นๆ	**2565**
ด้านเศรษฐกิจ : 1. สารสำคัญ Moscatilin ที่ผลิตได้จากต้นกล้วยไม้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมปัจจัยที่จะใช้เป็นสิ่งกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มปริมาณสารสำคัญให้สูงกว่าในธรรมชาติ สามารถนำไปขยายผลเชิงอุตสาหกรรมในการผลิตสารสำคัญด้านเภสัชภัณฑ์ เป็นแนวทางการใช้ประโยชน์กล้วยไม้สกุลหวายของไทยให้แก่เกษตรกร และเพิ่มมูลค่าให้กับกล้วยไม้สกุลหวายของไทย	**2566**

กรมวิชาการเกษตร

2. สารสำคัญ Moscatilin ที่ถูกผลิตขึ้นในกล้วยไม้สกุลหวาย ปริมาณของสาร Moscatilin จะขึ้นกับสภาพแวดล้อมในการปลูกกล้วยไม้ ดังนั้นหากเกษตรกรใช้ชุดตรวจสอบสารสำคัญ Moscatilin จะทำให้เกษตรกรสามารถควบคุมการผลิตกล้วยไม้ให้มีปริมาณสาร Moscatilin ได้อย่างสม่ำเสมอ และเมื่อเกษตรกรทราบปริมาณสาร Moscatilin ในกล้วยไม้ก่อนการขาย จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของกล้วยไม้ ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มมากขึ้นด้วย 3. นักวิจัยได้ข้อมูลและองค์ความรู้ด้านยีนและลักษณะทางพันธุ์กรรมที่สัมพันธ์ต่อการสร้างสาร moscatilin สามารถนำไปวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีน ทำให้ทราบถึงกลไกการกระตุ้นปริมาณสารในพืช และสามารถปรับปรุงพันธุ์ให้ได้สาร moscatilin เพิ่มมากขึ้น สร้างมูลค่าเพิ่มให้กับกล้วยไม้สกุลหวายสำหรับผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์	

* ผลกระทบ : ผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงตามผลลัพธ์ (Results of the change) ซึ่งวัดได้อย่างชัดเจนและมีหลักฐานปรากฏชัด (Evidence-based) ทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม ทั้งที่วัดในเชิงปริมาณได้และไม่ได้ ผลกระทบอาจเป็นได้ทั้งทางบวกและทางลบ

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการ/กระบวนการผลักดันงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (โปรดแนบหลักฐานเชิงประจักษ์การนำผลงานไปใช้ประโยชน์)

1. นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์โคลน MosH4 และ MosH8 ไปใช้ตรวจสอบสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวาย โดยใช้เครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนาม (Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่แสดงผลการตรวจสอบเป็นตัวเลข ทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ผลได้ด้วยตัวเองและทราบผลในเวลาอันรวดเร็ว นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ในภาคสนาม ทำให้ลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการตรวจวิเคราะห์สารด้วยวิธีทางเคมีได้

2. จัดทำเอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ แผ่นพับ โปสเตอร์ หรือวารสารวิชาการต่างๆ (อยู่ในระหว่างการร่างเนื้อหาบทความในการตีพิมพ์)

3. จัดทำเอกสารเผยเพื่อการอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยี ให้แก่นักวิจัย บริษัทเอกชน และผู้สนใจ (อยู่ระหว่างการจัดทำเอกสารเผยแพร่และ จะเผยแพร่ อบรมในรูปแบบ online)

ด้านนโยบาย โดยใคร.....(ระบุใครเป็นผู้นำไปใช้).....

อย่างไร..... (ระบุผลที่เกิดจากการนำไปใช้ประโยชน์ก่อให้เกิดผลอย่างไร).....

ด้านสังคม โดยใคร.....(ระบุใครเป็นผู้นำไปใช้).....

อย่างไร (ระบุผลที่เกิดจากการนำไปใช้ประโยชน์ก่อให้เกิดผลอย่างไร).....

กรมวิชาการเกษตร

ด้านเศรษฐกิจ

1. สารสำคัญ Moscatilin ที่ผลิตได้จากต้นกล้วยไม้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมปัจจัยที่จะใช้เป็นสิ่งกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มปริมาณสารสำคัญให้สูงกว่าในธรรมชาติ สามารถนำไปขยายผลเชิงอุตสาหกรรมในการผลิตสารสำคัญด้านเภสัชภัณฑ์ เป็นแนวทางการใช้ประโยชน์กล้วยไม้สกุลหวายของไทยให้แก่เกษตรกร และเพิ่มมูลค่าให้กับกล้วยไม้สกุลหวายของไทย
2. สารสำคัญ Moscatilin ที่ถูกผลิตขึ้นในกล้วยไม้สกุลหวาย ปริมาณของสาร Moscatilin จะขึ้นกับสภาพแวดล้อมในการปลูกกล้วยไม้ ดังนั้นหากเกษตรกรใช้ชุดตรวจสอบสารสำคัญ Moscatilin จะทำให้เกษตรกรสามารถควบคุมการผลิตกล้วยไม้ให้มีปริมาณสาร Moscatilin ได้อย่างสม่ำเสมอ และเมื่อเกษตรกรทราบปริมาณสาร Moscatilin ในกล้วยไม้ก่อนการขาย จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของกล้วยไม้ ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มมากขึ้นด้วย

ด้านวิชาการ

1. กรมวิชาการเกษตร หน่วยงานด้านการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หน่วยงานด้านวิชาการมหาวิทยาลัย นักศึกษา นักวิชาการ หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์จากกล้วยไม้สกุลหวาย

   อย่างไร : เป็นองค์ความรู้ด้านวิชาการ สามารถนำไปตีพิมพ์เกี่ยวกับการผลิตดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จะเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมายและพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ
2. นักวิจัย นักวิชาการ นักปรับปรุงพันธุ์พืช มหาวิทยาลัย บริษัทเอกชนผู้ประกอบการกล้วยไม้

   อย่างไร : โดยการเผยแพร่บทความทางวิชาการ การประชุมสัมมนาวิชาการ การอบรมสัมมนา

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผล

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 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

กรมวิชาการเกษตร

2. 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 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

4. ได้คลังของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ขนาด 1.2×10^{24} รูปแบบ ซึ่งดีเอ็นเอแอปตาเมอร์มีความยาว 86 นิวคลีโอไทด์ โดยบริเวณส่วนกลางของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์

5. คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ที่สามารถจับกับสารมาตรฐาน moscatilin จากคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ด้วยวิธี SELEX 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

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

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอียสกุล มีการแสดงออกของยีนจำนวน 45,012 44,849 และ 29,209 ยีน ตามลำดับ โดยมียีนที่แสดงออกเหมือนกันจำนวน 23,158 ยีน การวิเคราห์ความสัมพันธ์ของยีนในตัวแทนกล้วยไม้หวายที่มีสาร 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 Trytophan metabolism Glyoxylate and dicaboxylate metabolism และ limonene and pinene degradation สูงสุดตามลำดับ และมีอัตราส่วนของกลุ่มยีน Cabon metabolism Glyoxylate and dicarboxylate metabolism และ Trytophan metabolism มากที่สุด เมื่อวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุล พบตำแหน่งเครื่องหมายชนิด SNP จำนวน 518,051 ตำแหน่ง เครื่องหมายชนิด SNP แบบ In/del จำนวน 49,159 ตำแหน่ง ซึ่งข้อมูลตำแหน่ง

กรมวิชาการเกษตร

เครื่องหมายโมเลกุลที่พบสามารถนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลตำแหน่งเครื่องหมายเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ประเมินลักษณะทางพันธุกรรม ระบุ หรือจำแนกกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายได้ต่อไป

8. การทดสอบและประเมินความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุล ได้ออกแบบไพรเมอร์จากเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย โดยคาดการณ์ด้วยเทคนิคทางด้านชีวสารสนเทศและค้นหาชิ้นส่วนยีนที่มีตำแหน่งเครื่องหมายชนิด 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 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

อภิปรายผล

1. การตอบสนองต่อแสง LED ที่แตกต่างกันของพันธุ์เอียสกุลและพันธุ์ขาว 5N ในการสะสมปริมาณสารสำคัญ Moscatilin เกิดจากพันธุกรรมที่แตกต่างกัน จึงมีความต้องการแสงที่ต่างกันไประหว่างพันธุ์ของกล้วยไม้ สอดคล้องกับ Hina *et al.*, (2016) ศึกษาความสัมพันธ์ความแตกต่างชนิดของแสงในการเพิ่มปริมาณการสะสมและการผลิตสารสำคัญ antioxidant ในการเลี้ยงแคลลัสของพืชสมุนไพรสำคัญ *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 (คำนูณ, 2542)

กรมวิชาการเกษตร

2. การใช้ PEG เป็นสิ่งกระตุ้นให้เกิดการสะสมปริมาณสารสำคัญ Moscatilin มีแนวโน้มที่ทำให้สารสำคัญเพิ่มขึ้นได้ จากรายงานของ Wang *et al*., 2020 ได้ศึกษาสารทุติยภูมิชนิดฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ในเซลล์แขวนลอยของ *S. baicalensis* พบว่า ความเครียดที่เกิดจากการใช้ PEG ส่งเสริมให้เกิดการสังเคราะห์และการสะสมของ ฟลาโวนอยด์ได้ เมื่อใช้ PEG ความเข้มข้น 4% ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ควรเลือกใช้ PEG ในปริมาณที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดเนื่องจาก PEG เป็นสารที่ใช้ในการสร้างสภาวะเครียดของพืชในห้องปฏิบัติการทำให้น้ำไม่สามารถซึมผ่านเมมเบรนได้ มีผลทำให้ osmotic potential ลดลงทำให้พืชได้รับสภาวะเครียดมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพืช (คำนูญ, 2542)

3. จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ในส่วนต่างๆของกล้วยไม้นั้น โดยเฉพาะในส่วนของใบกล้วยไม้ ที่พบการสะสมของสาร moscatilin ในปริมาณที่สูงเทียบเคียงกับส่วนของลำต้น จะทำให้การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร moscatilin ด้วยชุดตรวจสอบที่จะพัฒนาขึ้น สามารถใช้ใบกล้วยไม้มาตรวจวิเคราะห์ได้โดยตรง ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการตรวจวิเคราะห์สาร moscatilin ในแปลงปลูกได้

4. คลังของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ขนาด 1.2×10^{24} รูปแบบที่ผลิตขึ้นนี้ เป็นแหล่งของแอปตาเมอร์ ที่มีความหลากหลาย ดังนั้นเมื่อต้องการตรวจสอบสารสำคัญชนิดอื่นๆ ในอนาคต จึงสามารถนำคลังของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์นี้มาใช้ได้ทันที เป็นการสะดวกและประหยัดกว่าวิธีการผลิตแอนติบอดีแบบเดิม ๆ

5. การตรวจสอบสาร moscatilin ด้วยเครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนาม (Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100) นั้น พบว่า ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โคลน MosH4 และ MosH8 สามารถจับกับสาร moscatilin ได้ อย่างไรก็ตาม ค่าสัญญาณ EIS จากการตรวจสอบสารค่อนข้างต่ำ อาจเกิดจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ใช้ตรึงบนขั้วไฟฟ้า SPCE ต่ำ จึงไม่เพียงพอในการตรวจจับสาร moscatilin ซึ่งจะดำเนินการพัฒนาการตรวจสอบโดยการเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และชนิดของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ เพื่อให้การตรวจสอบสาร moscatiln ในกล้วยไม้สกุลหวายมีประสิทธิภาพในอนาคตต่อไป

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

มหาวิทยาลัย นักวิชาการ นักวิจัย สามารถนำข้อมูลและองค์ความรู้ลำดับนิวคลีโอจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย 3 ชนิด ได้แก่ ขาว 5N ขาวสนาน และเอียสกุล ข้อมูลตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs และ SNPs ที่เฉพาะเจาะจงต่อชนิดของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย เป็นฐานข้อมูลเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ประเมินลักษณะทางพันธุกรรม ระบุ หรือจำแนกกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย สามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายเพื่อวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะประจำพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย หรือช่วยในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายต่อไป รวมถึงข้อมูลการแสดงออกของยีนแบบองค์รวมทั้งหมดที่ได้จากเทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์สามารถนำไปคาดการณ์การใช้สารกระตุ้นให้กล้วยไม้สกุลหวายเพื่อสร้างสาร moscatilin ต่อไป

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

-

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 162 หน้า.

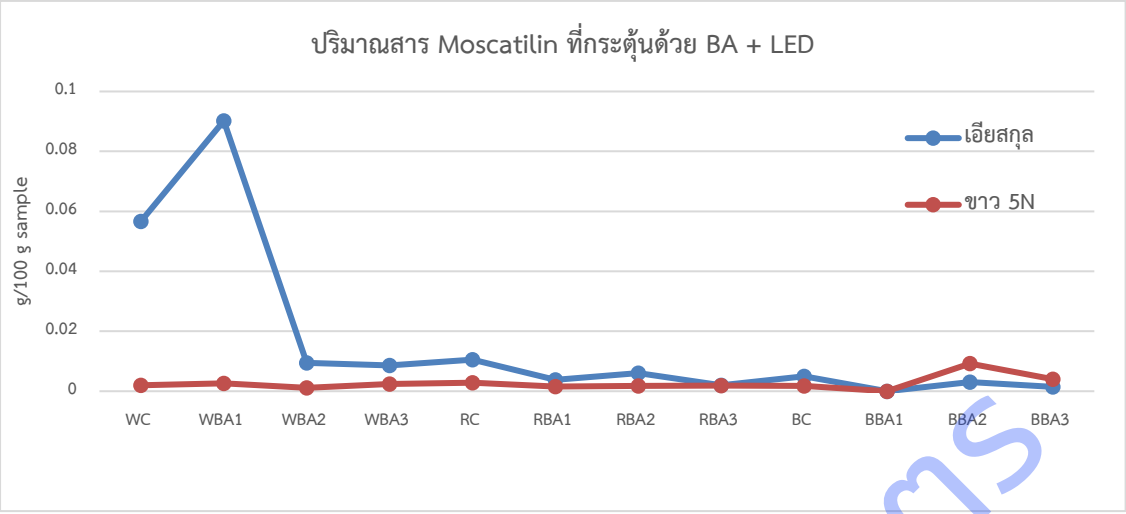
Hina F., B. H. Abbasi, N. Ahmad, S. S. Ali, F. Akbar and F. Kanwal. 2016. Correlation of different spectral light with biomass accumulation and production of antioxidant secondary metabolites in callus culture of medicinally important *Prunella vulgaris* L. J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 159 : 1-7.

Hogewoning, S.W.H., Govert, T., Hans, M., Hendrink, 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.

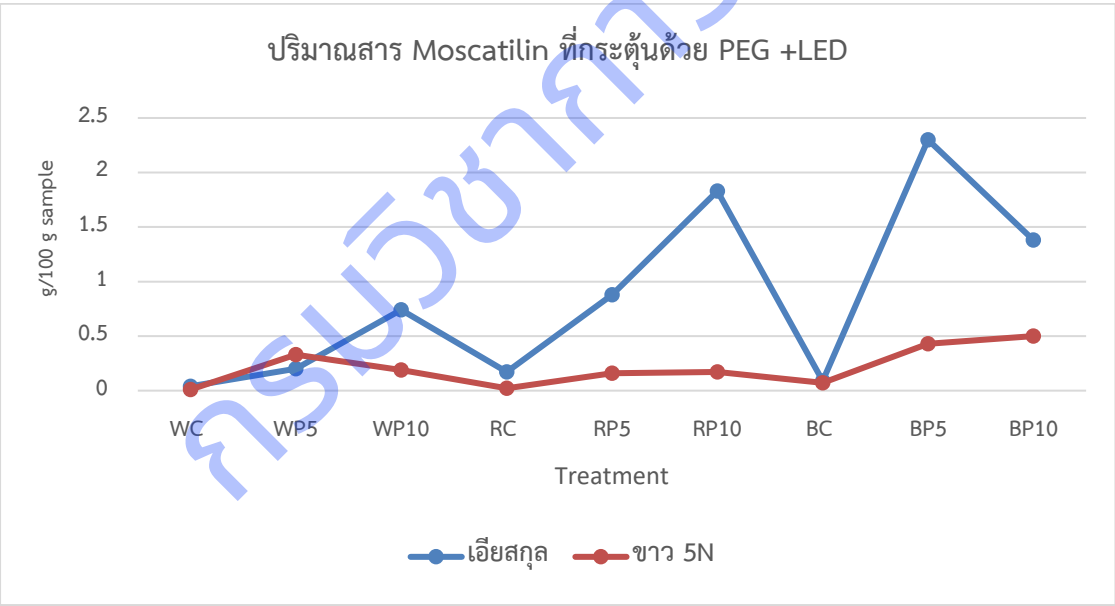
Wang, B. 2, T.X. Zhang, H.W. Du, Q. Zhao and X.C. Meng. 2020. Effect of PEG on Secondary Metabolites in Suspension Cells of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Acta Medica Mediterranea. 36: 2307-2312.

กรมวิชาการเกษตร

ตารางและภาพ

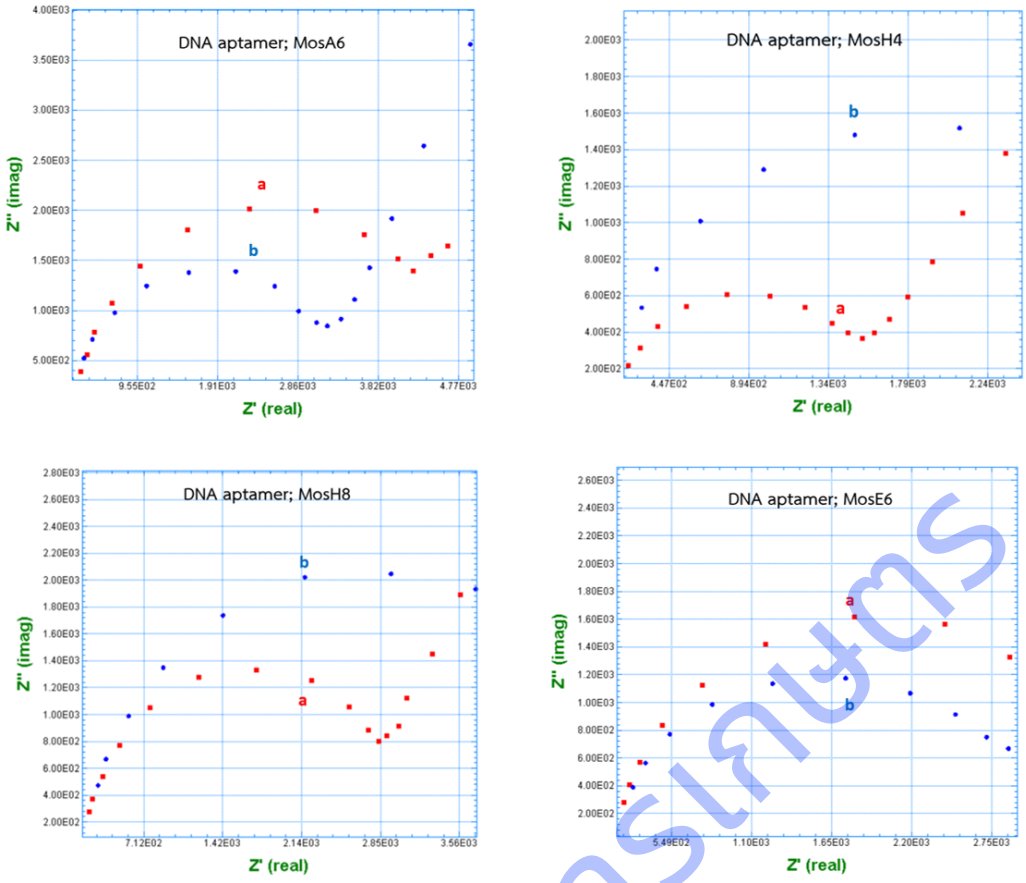


ภาพที่ 1 ปริมาณสารสำคัญ moscatilin ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เอียสกุล และขาว 5N ในการทดสอบสูตรอาหารที่มี BA 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน



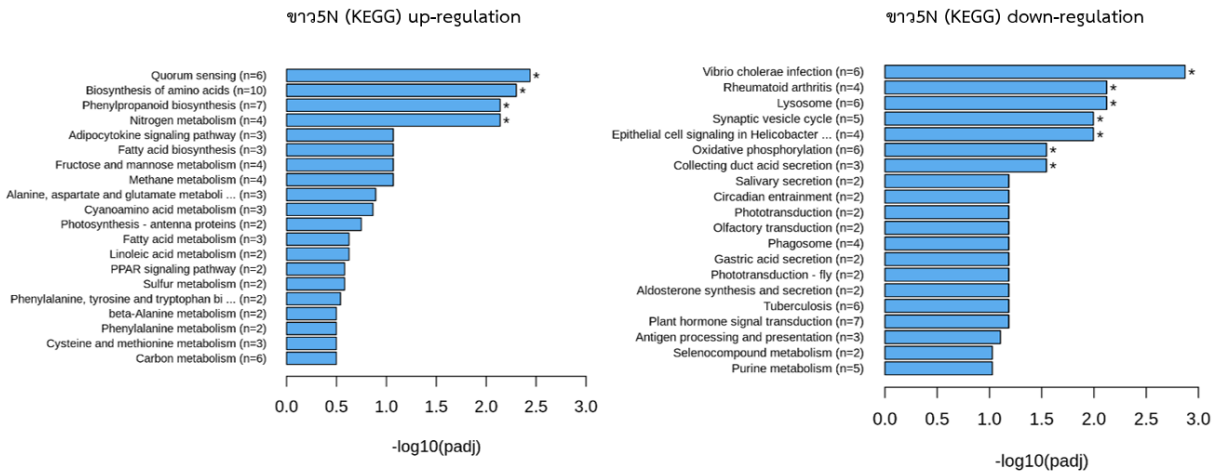
ภาพที่ 2 ปริมาณสารสำคัญ moscatilin ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เอียสกุล และขาว 5N ในการทดสอบสูตรอาหารที่มี PEG 0, 5% และ 10% ร่วมกับแสง LED สีขาว สีแดง และสีน้ำเงิน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3 ค่าสเปตตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) ของการทำปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ MosA6 MosH4 MosH8 และ MosE6 กับบัฟเฟอร์ (a) และสารมาตรฐาน moscatilin (b)

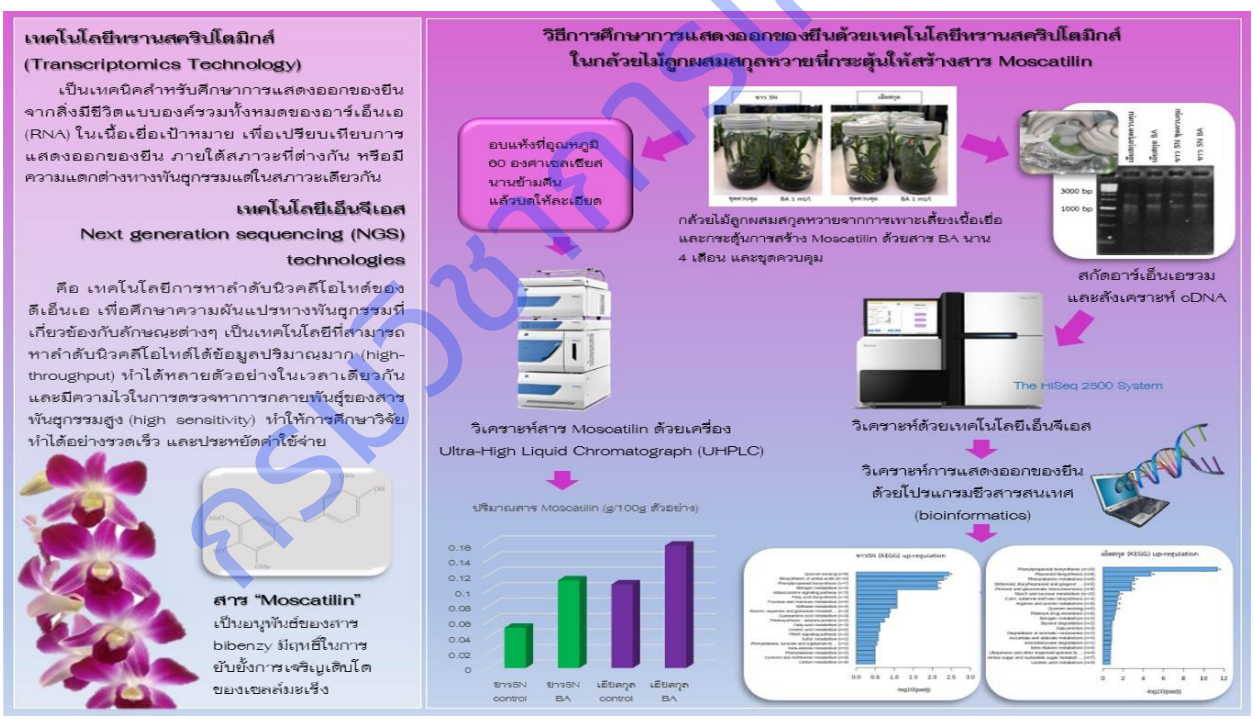
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์



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

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารแนบ 1



กรมวิชาการเกษตร

เอกสารแนบ 2

กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาคารทรัพยากรพันธุกรรมพืชสิรินธร
เลขที่ 85 ถนนรังสิต-นครนายก อำเภอธัญบุรี
จังหวัดปทุมธานี 12110 โทร. 0-2904-6885-95

ต้นแบบเทคโนโลยีระดับห้องปฏิบัติการ การเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์เอียสกุล

ภมรินทร์ วณิชชนานันท์
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุล

กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่มีการปลูกเป็นการค้าในประเทศไทยมีการศึกษาปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ซึ่งมีรายงานว่าสารสำคัญดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งปอด มะเร็งเต้านม พบสารดังกล่าวในกล้วยไม้หวายลูกผสมได้แก่ ขาว 5N 0.04547 %W/W และ เอียสกุล 0.0300 %W/W (พรชัย และคณะ, 2560) ซึ่งสามารถพัฒนานำมาใช้ประโยชน์เพื่อการรักษาโรค เพิ่มทางเลือกของการใช้กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายให้มีคุณค่าและมูลค่าของกล้วยไม้ได้มากกว่าการเป็นไม้ตัดดอก

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุล

การใช้สิ่งกระตุ้น : สารควบคุมการเจริญเติบโต (BA) +LED สีขาว

การใช้สิ่งกระตุ้น : สาร PEG + LED สีน้ำเงิน

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการกระตุ้นสารสำคัญในกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล

- สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับแสง LED สีขาว เป็นสิ่งกระตุ้นปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุลสูงขึ้น 159 เท่า
- สาร PEG PEG 5% + LED สีน้ำเงิน คือปัจจัยที่ใช้กระตุ้นสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุลให้สูงขึ้น 5,750 เท่า

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารแนบ 3

กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาคารทรัพยากรพันธุกรรมพืชสิรินธร
เลขที่ 85 ถนนรังสิต-นครนายก อำเภอธัญบุรี
จังหวัดปทุมธานี 12110 โทร. 0-2904-6885-95

ต้นแบบเทคโนโลยีระดับห้องปฏิบัติการ
การเพิ่มปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ขาว 5N

ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์ขาว 5N

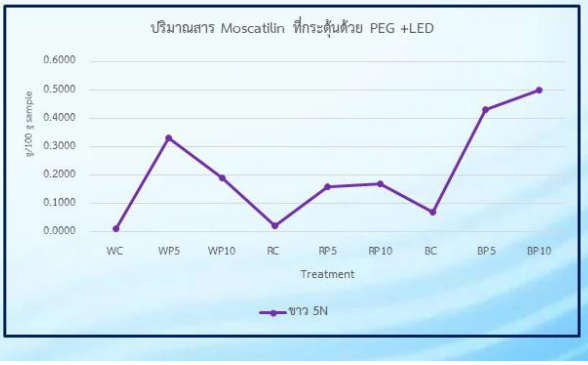
เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้ปัจจัยจากภายนอกเป็นตัวกระตุ้น เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณน้ำ ความเข้มแสงและสารเคมี มีผลทำให้ปริมาณสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์ขาว 5N สูงขึ้น

สิ่งกระตุ้น (elicitor) ในการสร้างสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์ขาว 5N ได้แก่ สาร PEG ความเข้มข้น 10% ร่วมกับการเลี้ยงในแสง LED สีน้ำเงิน สามารถกระตุ้นสารสำคัญ Moscatilin ให้มีปริมาณสูงขึ้น 5,000 เท่า

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์ขาว 5N

ปัจจัยหลักที่ใช้เป็นสิ่งกระตุ้นสารสำคัญ Moscatilin : Polyethylene glycol (PEG)

ปัจจัยรองที่ใช้เป็นสิ่งกระตุ้นสารสำคัญ Moscatilin : แสง LED สีน้ำเงิน



กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาคารทรัพยกรพันธุกรรมพืชสิรินธร เลขที่ 85 ถนนรังสิต-นครนายก ต. รังสิต อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี 12110
โทรศัพท์ 02-9046885 โทรสาร 02-9046885 ต่อ 555

เอกสารแนบ 4

ต้นแบบเทคโนโลยี ระดับห้องปฏิบัติการ

การผลิตดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวาย

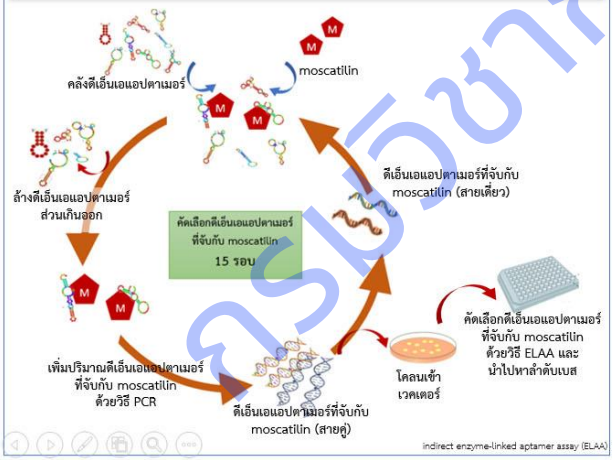
อัจฉราพรรณ ใจเจริญ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

Moscatilin ถูกพบในกล้วยไม้สกุล Dendrobium หลายชนิด เช่น *D. moscatum* *D. pulchellum* และ *D. loddigesii* สาร Moscatilin อยู่ในกลุ่ม bibenzyl ซึ่งเป็นสารที่มีหมู่ phenol ในโครงสร้าง ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ฤทธิ์ต้านการเจริญของหลอดเลือดเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (anti-angiogenesis) นอกจากนี้สาร Moscatilin ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ NCI-H187 (มะเร็งปอด) และ KB (มะเร็งเยื่อบุช่องปาก และยังสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม

การผลิตดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารสำคัญ Moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวาย

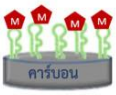
ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวสั้นๆ มีคุณสมบัติม้วนพับเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (tertiary structure) ซึ่งมีการทำงานคล้ายกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ สามารถจับกับโมเลกุลต่างๆ ได้อย่างจำเพาะและหลากหลายชนิด

ขั้นตอนการคัดเลือกแอปตาเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ Moscatilin



การนำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อ moscatilin ไปใช้ประโยชน์

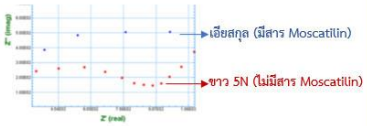
1) นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับ moscatilin เคลือบลงบนแผ่นขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน (SPCE)



2) นำแผ่น SPCE ที่เคลือบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์แล้ว ตรวจสอบสาร moscatilin โดยหยดน้ำคั้นจากกล้วยไม้หวาย

3) วัดค่าสเปตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) ของการทำปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเมอร์กับน้ำคั้นกล้วยไม้หวาย ด้วยเครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนาม (Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100)

4) ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ผลิตขึ้นสามารถจับกับสาร moscatilin ในกล้วยไม้สกุลหวายได้



กรมวิชาการเกษตร