ระดับโครงการวิจัย

กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

เทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมการผลิตพืชปลอดภัย

Biotechnology and innovation for safety plant production

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวอรุโณทัย ซาววา

Ms. Aroonothai Sawwa

ปี 2565

บทสรุปผู้บริหาร

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย: ปัจจุบันการผลิตพืชได้รับผลกระทบหลายด้านจากภาวะโลกร้อน ภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน การแพร่ระบาดของโรคและแมลงศัตรูพืช ปัญหาสารพิษตกค้างและการปนเปื้อนโลหะหนักในดิน รวมถึงความไม่สอดคล้องของมาตรฐานการควบคุมด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ซึ่งปัญหาดังกล่าวเหล่านี้ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอาหารและการส่งออกสินค้าเกษตรของประเทศ นอกจากนี้สภาวการณ์การแข่งขันของสินค้าเกษตรที่เน้นด้านสุขภาพและความปลอดภัยอาหาร การผลิตสินค้าให้มีความปลอดภัยจากการตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชหรือโลหะหนักที่สะสมอยู่ในดิน การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างมีความจำเป็นการพัฒนาชุดตรวจสอบที่รวดเร็วแม่นยำ ช่วยลดระยะเวลาและลดต้นทุนการวิเคราะห์ จะช่วยสร้างความเชื่อมั่นในระบบการตรวจสอบและการตรวจสอบย้อนกลับ จำเป็นต้องเร่งพัฒนางานวิจัย เพื่อนำเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ มาใช้ในการผลิตพืชปลอดภัย อาทิ เทคโนโลยีการอารักขาพืชจากสารชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษตกค้างทางการเกษตร ผลิตสารสำคัญที่เป็นประโยชน์ทางเภสัชภัณฑ์ในระบบการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ ช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มของสินค้าเกษตร พัฒนาการผลิตพืชปลอดภัยเสริมสร้างความมั่นคงทางอาหารและเพิ่มรายได้สู่ชุมชน โครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมเพื่อการผลิตพืชปลอดภัย จึงมุ่งเน้นการนำเทคโนโลยีชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มาสร้างนวัตกรรมแก้ปัญหาระบบการผลิต การตรวจสอบสินค้าเกษตร และเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรด้วยนวัตกรรม สร้างความเข้มแข็งทางเศรษฐกิจและแข่งขันในตลาดโลกได้อย่างยั่งยืนแก้ปัญหาการผลิตพืชที่สำคัญ

2. วัตถุประสงค์: เพื่อ 1) พัฒนาเทคโนโลยีการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลัง 2) พัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการผลิตเหง้าขมิ้นชันจิ๋วที่ปลอดสารพิษและผลิตสารสำคัญในระบบ Bioreactor 3) พัฒนาชุดตรวจสอบสารปนเปื้อนทางการเกษตรอย่างง่าย ด้วยตัวตรวจจับแอนติบอดีหรือดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ และ 4) พัฒนาพันธุ์พืชต้านทานโรคด้วยเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำและวิธีการตรวจวิเคราะห์

3. ระเบียบวิธีวิจัย: โครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมการผลิตพืชปลอดภัย ประกอบด้วยงานวิจัย 4 โครงการวิจัยย่อย ได้แก่ 1) เทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลัง ประกอบด้วย 3 กิจกรรม 6 การทดลอง ดำเนินการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังที่สะอาดปลอดโรคตรงตามพันธุ์ปริมาณมากด้วยระบบ TIB พัฒนาเทคโนโลยี RNAi สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันในพืชเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคและแมลงหวี่ขาวพาหะ และพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างภาคสนามด้วยเทคนิค LAMP และ ICS สำหรับตรวจท่อนพันธุ์และติดตามเฝ้าระวังการแพร่ระบาด 2) เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและชักนำการผลิตสาระสำคัญทางเภสัชภัณฑ์ของพืชสมุนไพร ประกอบด้วย 2 กิจกรรม 3 การทดลอง ดำเนินการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตพืชปลอดภัยในระบบ

กรมวิชาการเกษตร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประยุกต์เทคโนโลยีให้มีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับเครื่องมือ พัฒนาการผลิตขมิ้นชันหัวจิ๋วปลอดโรคและสารปนเปื้อนทางการเกษตร การผลิตโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย และพัฒนาเทคนิคการกระตุ้นให้พืชผลิตสารสำคัญที่มีมูลค่าทางเภสัชภัณฑ์ โดยใช้ปัจจัยภายนอกกระตุ้นให้ขมิ้นชันหัวจิ๋วสร้างและสะสมสารเคอร์คูมิน และผลิตสารมอสคาติลินในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ ให้มีปริมาณและความบริสุทธิ์สูงกว่าระบบการผลิตตามธรรมชาติ 3) วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสารพิษตกค้างทางการเกษตรอย่างรวดเร็วเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชปลอดภัย ประกอบด้วย 2 กิจกรรม 4 การทดลอง ดำเนินการพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์โดยการคัดเลือกหาตัวตรวจจับ (แอนติบอดีหรือดีเอ็นเอแอปตาเมอร์) ที่จำเพาะเจาะจงต่อสารปนเปื้อนทางการเกษตรอนุมูลของโลหะหนัก (แคดเมียมและตะกั่ว) และตัวตรวจจับที่จำเพาะต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (สารคาร์บาริลและไซเพอร์เมทริน) และ 4) วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำเพื่อการผลิตพืชปลอดภัยและยั่งยืน ประกอบด้วย 2 กิจกรรม 5 การทดลอง ดำเนินการวิจัยและสร้างนวัตกรรมจากเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำด้วยการใช้เทคนิค CRISPR/Cas พัฒนามะละกอให้มีความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์พืชที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำและได้รับการอนุมัติใช้ในเชิงการค้า

4. งบประมาณที่ใช้: (ปี 65) จำนวน 5,643,808 บาท ระยะเวลาที่ดำเนินงาน ตั้งแต่ ต.ค. 64 – มี.ค. 66

5. ผลการวิจัย: ผลการวิจัยของโครงการฯ สรุปได้ดังนี้

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 เทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลัง ได้ต้นแบบผลิตภัณฑ์ (Prototype) ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 1 ต้นแบบ คือ เทคโนโลยีการผลิตต้นมันสำปะหลังปลอดโรค ดังนี้ 1) ต้นแบบเทคโนโลยีการผลิตต้นมันสำปะหลังปลอดโรค 2) กระบวนการเพาะเลี้ยงมันสำปะหลังในระบบ TIB 3) วิธีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 4) วิธีการผลิต dsRNA ในการควบคุมแมลงหวี่ขาวยาสูบด้วยเทคโนโลยี RNAi 5) วิธีการและรูปแบบสำหรับตรวจวิเคราะห์โรคใบด่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค LAMP-LFICS และ 6) การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและโปรตีน replicase ของไวรัส CMD สำหรับใช้คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและชักนำการผลิตสาระสำคัญทางเภสัชภัณฑ์ของพืชสมุนไพร ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 3 กระบวนการ คือ 1) สูตรอาหารสำหรับการเกิดต้นขมิ้นชันในสภาพปลอดเชื้อ 2) ชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการสะสมสารสำคัญในเหง้าจิ๋วขมิ้นชัน และ 3) สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตและเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสารพิษตกค้างทางการเกษตรอย่างรวดเร็วเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชปลอดภัย ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 4 กระบวนการ คือ 1) ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียม 2) ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักตะกั่ว 3) ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง คาร์บาริล (carbaryl) และ 4) ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin)

กรมวิชาการเกษตร

<u>โครงการวิจัยย่อยที่ 4</u> วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำเพื่อการผลิตพืชปลอดภัยและยั่งยืน ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 5 กระบวนการ คือ 1) ชุดยีน gRNA สำหรับปรับแต่งยีนมะละกอให้ต้านทานโรคจุดวงแหวนและวิธีส่งถ่ายยีนให้มะละกอกลายพันธุ์ 2) สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะละกอและวิธีการชักนำการเกิดยอดจาก hypocotyl และเนื้อเยื่อใบก่อนและหลังการยิงอนุภาคทังสเตน 3) โปรตีน Recombinant expression Cas12a และผลการทดสอบ Cas12a เพื่อนำไปพัฒนาการตรวจยีนกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค SHERLOK 4) เวคเตอร์จำลองรูปแบบยีนการกลายพันธุ์ของถั่วเหลืองและสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อนำไปตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค LFICS และ 5) ชุดไพรเมอร์และสภาวะการตรวจคัดกรองข้าวโพดกลายพันธุ์แบบแม่นยำด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR

6. ข้อเสนอแนะที่ได้จากงานวิจัย

6.1 ข้อเสนอแนะจากผลงานวิจัย การดำเนินงานวิจัยในปี 2565 เป็นเพียงการเริ่มต้นศึกษาข้อมูลที่จะนำไปพัฒนาศึกษาต่อในปีถัดไป เพื่อให้ได้องค์ความรู้ที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และตรงตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้

6.2 ข้อเสนอแนะจากผู้วิจัย ให้ความสำคัญต่อการกำจัดแมลงศัตรูของมันสำปะหลังที่ติดมากับท่อนพันธุ์เพื่อลดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับต้นมันสำปะหลังก่อนการวิจัย และขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอควรจะมีการทดสอบหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เพื่อลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ ในระยะต่อไปเพื่อให้ชุด LFICS มีความสมบูรณ์ก่อนการใช้งาน

7. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ นำเทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมมาพัฒนาการวิจัยแก้ปัญหาการผลิตพืช พัฒนาพันธุ์พืชปลอดโรค พันธุ์พืชต้านทานโรค โดยใช้ทรัพยากรของประเทศไทยเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตร ช่วยยกระดับความสามารถในการแข่งขันในภาคอุตสาหกรรม จากการวางรากฐานทางเศรษฐกิจภายใต้แนวคิด BCG ด้านการเกษตรและอาหาร

8. การเผยแพร่ผลงานวิจัย

การเผยแพร่องค์ความรู้ เรื่อง “เทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรคใบด่าง” ในงานประชุมติดตามแผน เมื่อวันที่ 13 ธันวาคม 2565

การเผยแพร่องค์ความรู้จากการตีพิมพ์ผลงานวิจัย เรื่อง “การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองกรดโอเลอิกสูงที่ผ่านการปรับแต่งยีน FAD3A ด้วยเทคนิค Duplex PCR” ในการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 14 ภายใต้หัวข้อ “วิจัยสร้าง Inovation and Technology เพื่อรองรับสังคมไทยยุค Digital World ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม เมื่อวันที่ 7-8 กรกฎาคม 2565

ศูนย์วิทยทรัพยากร

บทคัดย่อ

การผลิตพืชปัจจุบันได้รับผลกระทบหลายด้านจากภาวะโลกร้อน สภาวะภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน การแพร่ระบาดของโรคและแมลงศัตรูพืช ปัญหาสารพิษตกค้างและการปนเปื้อนโลหะหนักในดิน รวมถึงความไม่สอดคล้องของมาตรฐานการควบคุมด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ซึ่งปัญหาดังกล่าวเหล่านี้ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอาหารและการส่งออกสินค้าเกษตรของประเทศ โครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมเพื่อการผลิตพืชปลอดภัย จึงมุ่งเน้นการนำเทคโนโลยีชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มาสร้างนวัตกรรมแก้ปัญหาระบบการผลิต การตรวจสอบสินค้าเกษตร และเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรด้วยนวัตกรรม สร้างความเข้มแข็งทางเศรษฐกิจและแข่งขันในตลาดโลกได้อย่างยั่งยืนแก้ปัญหาการผลิตพืชที่สำคัญ ประกอบด้วย 4 โครงการวิจัยย่อย ดังนี้ 1) เทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลัง 2) เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและชักนำการผลิตสาระสำคัญทางเภสัชภัณฑ์ของพืชสมุนไพร 3) วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสารพิษตกค้างทางการเกษตรอย่างรวดเร็วเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชปลอดภัย และ 4) วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำเพื่อการผลิตพืชปลอดภัยและยั่งยืน

การวิจัยได้ผลสัมฤทธิ์ของโครงการฯ ในปี 2565 ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 18 กระบวนการ เรียงตามลำดับโครงการวิจัยย่อย ดังนี้ โครงการวิจัยย่อยที่ 1 ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 6 กระบวนการ คือ 1) ต้นแบบเทคโนโลยีการผลิตต้นมันสำปะหลังปลอดโรค 2) กระบวนการเพาะเลี้ยงมันสำปะหลังในระบบ TIB 3) วิธีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 4) วิธีการผลิตdsRNA ในการควบคุมแมลงหวี่ขาวยาสูบด้วยเทคโนโลยี RNAi 5) วิธีการและรูปแบบสำหรับตรวจวิเคราะห์โรคใบด่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค LAMP-LFICS และ 6) การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและโปรตีน replicase ของไวรัส CMD สำหรับใช้คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โครงการวิจัยย่อยที่ 2 ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 3 กระบวนการ คือ 1) สูตรอาหารสำหรับการเกิดต้นขมิ้นชันในสภาพปลอดเชื้อ 2) ชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการสะสมสารสำคัญในเหง้าจิ๋วขมิ้นชัน และ 3) สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตและเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย โครงการวิจัยย่อยที่ 3 ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 4 กระบวนการ คือ 1) ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียม 2) ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักตะกั่ว 3) ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลงคาร์บาริล และ 4) ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง ไซเพอร์เมทริน และ โครงการวิจัยย่อยที่ 4 ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 5 กระบวนการ คือ 1) ชุดยีน gRNA สำหรับปรับแต่งยีนมะละกอให้ต้านทานโรคจุดวงแหวนและวิธีส่งถ่ายยีนให้มะละกอกลายพันธุ์ 2) สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะละกอและวิธีการชักนำการเกิดยอดจาก hypocotyl และเนื้อเยื่อใบก่อนและหลังการยิงอนุภาคทังสเตน 3)

กรมวิชาการเกษตร

โปรตีน Recombinant expression Cas12a และผลการทดสอบ Cas12a เพื่อนำไปพัฒนาการตรวจยีนกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค SHERLOK 4) เวคเตอร์จำลองรูปแบบยีนการกลายพันธุ์ของถั่วเหลืองและสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อนำไปตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค LFICS และ 5) ชุดไพรเมอร์และสภาวะการตรวจคัดกรองข้าวโพดกลายพันธุ์แบบแม่นยำด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR

อย่างไรก็ตาม ผลการดำเนินงานที่ได้ในปี 2565 จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยต่อยอดไปในปี 2566 - 2567 เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของโครงการฯ ตามที่ตั้งไว้ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

The current crop productions have affected in many problems such as global warming, sudden climate changed, the spread of plants diseases and pests, the problem of pesticide residues and heavy metal contamination in the soil, including nonconformity of standards in biosafety regulation. These problems affect the food industry and the country's agricultural exports. The research project, Biotechnology and Innovation for Safety Plant Production aims to bring biotechnology and modern biotechnology to create innovations to solve production system problems. Moreover, to inspection of agricultural products, and adding value to agricultural products through innovations, to strengthen the economy and sustainably compete in the global market and solve major crop production problems. This project consist of 4 sub-projects were, 1) Biotechnology and innovative for control of cassava mosaic disease, 2) Tissue culture technology and inducing the production of activemedicinal substances from medicinal plants, 3) Research and development of a rapid test kit for agricultural residues to increase crop production efficiency, and 4) Research and development of precise mutation technology for safe and sustainable crop production, respectively.

In 2022, the input results of the project were achieved with 18 processes of new technologies /processes in laboratory level as follows; Six processes in the first sub-project, were 1) Prototype of technology for the production of disease-free cassava plants, 2) Production of cassava tissue plant in the TIB system, 3) Bioactive compound production method, 4) dsRNA production method, 5) LAMP-LFICS method and procedure for detection of cassava mosaic disease , and 6) Production of recombinant encapsulated proteins and replicase proteins of the *cassava mosaic virus* for DNA aptamer selection. Three processes in the second sub-project, were 1) The tissue culture medium formulation for disease-free turmeric rhizomes, 2) Suitable growth regulators for the accumulation of active substances in turmeric rhizomes, and 3) Suitable formulations for the production and increasing the amount of Dendrobium hybrid’s protocorm. Four processes in the thirth sub-project, are 1) The selected DNA Aptamer for cadmium heavy metel detection, 2) The selected DNA Aptamer for lead heavy metel detection, 3) The selected DNA Aptamer for the insecticide carbaryl, and 4) The selected DNA Aptamer for the insecticide

กรมวิชาการเกษตร

cypermethrin. Five processes in last sub-project, were 1) A gRNA gene kit for papaya ring spot resistance and a method for gene transferring of papaya mutation, 2) The medium formulation for papaya tissue culture and a shoot induction method from hypocotyl and leaf meristem, before and after tungsten particle bombardment, 3) The expression Cas12a recombinant and Cas12a assay results for developing the detection of gene mutation by SHERLOK technique, 4) The vector model of gene edited in soybean and PCR condition for detection of gene mutation position by LFICS technique, and 5) The primer set and PCR condition for screening gene edited in corn with Digital Droplet PCR technique.

However, the results obtained in 2022 will be the basis for further research studies in 2023 - 2024 in order to achieve the objectives of the project.

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมการผลิตพืชปลอดภัยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ การรายงานผลสัมฤทธิ์โครงการฯ ปี พ.ศ. 2565 ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ดีเนื่องด้วยความร่วมมือจากบุคคลากรและหน่วยงานหลายภาคส่วน

ขอขอบคุณ นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตรด้านจุลชีววิทยา และนางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ ที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตรด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ที่ให้คำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัยภายใต้โครงการ ขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง ศูนย์วิจัยพืชสวนตรังที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างขมิ้นชันและคำแนะนำในการปลูก สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 และ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 ที่ให้คำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการและเทคนิคด้านเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน ที่ให้คำปรึกษาด้านการการวิเคราะห์สารมอสคาติลินด้วยเทคนิคทางเคมี สวนกล้วยไม้คุณดวงพร บุญชัย จังหวัดสมุทรสาคร ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวาย เกษตรกรที่ปลูกมันสำปะหลังทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการดำเนินงานวิจัยในแต่ละกิจกรรม

สุดท้ายขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยรวมทั้งบุคลากรทุกท่านที่ช่วยประสานงานและอำนวยความสะดวกให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	i
บทคัดย่อ	iv
Abstract	vi
กิตติกรรมประกาศ	viii
สารบัญ	ix
สารบัญภาพ	x
สารบัญตาราง	xii
บทที่ 1 บทนำ	18
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	24
บทที่ 3 ผลการศึกษา	57
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	125
เอกสารอ้างอิง	134
ภาคผนวก	135

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1 เกณฑ์ระดับการแสดงอาการของโรคใบด่างมันสำปะหลัง	28
ภาพที่ 2 พลาสมิดชนิด pRGEB32 ซึ่งมียีน CAS	43
ภาพที่ 3 แสดงการออกแบบ Primer สำหรับปฏิกิริยา RPA	49
ภาพที่ 4 แสดง Fluorescence detection	50
ภาพที่ 5 แสดงLateral flow assay detection กระบวนการตรวจวิเคราะห์ด้วย Lateral flow assay detection	51
ภาพที่ 6 การจำลองการขาดหายไปของตำแหน่งยีน	55
ภาพที่ 7 การศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค พันธุ์ระยอง 72 และ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50	57
ภาพที่ 8 อาการยอดเหี่ยวของต้นมันสำปะหลังเมื่อนำมาทดสอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Growth Chamber)	58
ภาพที่ 9 การตัดเนื้อเยื่อปลายยอดของต้นมันสำปะหลัง และชักนำให้เกิดปลายยอดใหม่	59
ภาพที่ 10 การศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ (Ribavirin) ในการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค	60
ภาพที่ 11 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นของ Ribavirin ทุกระดับความเข้มข้น สามารถทำให้ต้นที่เกิดขึ้น	61
ปลอดจากเชื้อ CMV ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคใบด่างได้ทั้ง 2 พันธุ์	62
ภาพที่ 12 ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ที่ทดสอบใน Salicylic acid ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 1 เดือน	62
ภาพที่ 13 ต้นมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่ทดสอบใน Salicylic acid ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 1 เดือน	62
ภาพที่ 14 ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 (ก) และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (ข) ที่ทดสอบใน Salicylic acid ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 3 เดือน	63
ภาพที่ 15 ผลการตรวจหาเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค PCR ของต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 (ก) และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (ข) ที่ทดสอบใน Salicylic acid ความเข้มข้นต่างๆ	64
ภาพที่ 16 การเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ในระบบ TIB	
ภาพที่ 17 การเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ในระบบ TIB	64
ภาพที่ 18 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรีย Bacterial culture *Bacillus* sp.	65
ภาพที่ 19 การสกัดโปรตีนจากถั่วเหลือง	65
ภาพที่ 20 การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิกในระบบถังหมักขนาดเล็ก	66
ภาพที่ 21 การสกัดสารไคโตซานจากเปลือกกุ้ง	66

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

ภาพที่ 22 การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ไคติเนสในระบบถังหมักขนาดเล็ก และการทดสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ chitinase ที่ผลิตได้ด้วยวิธี Bioassay plate technique 67

ภาพที่ 23 การตรวจสอบโรคใบด่างมันสำปะหลัง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CpSLC_Bm_F, CpSLC_Sc_R ซึ่งมีความจำเพาะกับเชื้อสาเหตุโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง ได้ผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดประมาณ 780 คู่เบส และไพรเมอร์ ITS1, ITS4 68

ภาพที่ 24 การทดสอบการแช่ท่อนพันธุ์ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเพาะทดสอบการเจริญเติบโต 69

ภาพที่ 25 ดีเอ็นเอที่เจือจางความเข้มข้นเท่ากันที่ 50 นาโนกรัม สำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QuantStudio™ 5 Real time PCR (Applied Biosystems® USA) 70

ภาพที่ 26 กราฟ Amplification plot ที่แสดงการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ SLCMV ในท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง ที่ผ่านการแช่ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ 70

ภาพที่ 27 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในเทคนิค Loop mediated isothermal amplification-Lateral flow-Immunochromatographic strip (LAMP-LFICS) เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กและระดับภาคสนาม สำหรับใช้ในการตรวจเชื้อ SLCMV ที่เป็นสาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลัง 73

ภาพที่ 28 ก. แสดงแถบ DNA จากการสกัด DNA ด้วยวิธี Lysis buffer และ ข. แสดงแถบ DNA จากการสกัด DNA ด้วยชุดสกัด DNA พืชอย่างง่าย เมื่อ M= 1 Kb DNA Ladder และ 1/1-5/2=ตัวอย่างใบมันสำปะลัง 74

ภาพที่ 29 ผลการทดสอบเพื่อหาสภาพวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเชื้อ SLCMV โดย ก. ผลผลิตของปฏิกิริยา RPA ในการตรวจตัวอย่างใบด่างมันสำปะหลัง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ SLCMV-DOA1 โดยใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ 10 µM และ ข ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจตัวอย่างใบด่างมันสำปะหลัง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ SLCMV-DOA1 โดยใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ 10 µM โดยที่ Po = Positive control, W= water, C= ตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่ไม่เป็นโรค และ #1-#3= ตัวอย่างใบด่างมันสำปะหลังที่ไม่เป็นโรค 76

ภาพที่ 30 ผลการการทดสอบประสิทธิภาพของคู่ไพรเมอร์ SLCMV-KU และ SLCMV-DOA1 อีกครั้งด้วยการนำเอาตัวอย่างที่ให้ผลบวกในปฏิกิริยา RPA มาทำปฏิกิริยาซ้ำด้วยเทคนิค PCR เมื่อ mixPCR=ตัวควบคุมปฏิกิริยาเชิงลบในปฏิกิริยา PCR, mixRPA=ตัวควบคุมปฏิกิริยาเชิงลบในปฏิกิริยา RPA และ CMV1-CMV2=ตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่เป็นโรค 76

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 31 แถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase จากไวรัส SLCMD ในใบมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง ขนาด 780 และ 1035 คู่เบส ตามลำดับ	77
ภาพที่ 32 รีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และรีคอมบิแนนท์โปรตีน replicase ที่ผลิตได้จากเซลล์ *E. coli*	78
ภาพที่ 33 การเพาะเหง้าขมิ้นชันด้วยวัสดุปลูกดินเผาในโรงเรือน	79
ภาพที่ 34 ชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของขมิ้นชัน ที่ใช้ในการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	79
ภาพที่ 36 ชิ้นส่วนตายอดของต้นขมิ้นชัน เมื่อผ่านขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ	80
ภาพที่ 37 การเพิ่มปริมาณต้นขมิ้นชันบนอาหารแข็ง	81
ภาพที่ 38 ต้นขมิ้นชันที่ทดสอบการเจริญเติบโตและเกิดเหง้าจิ๋วในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ระยะเวลา 2 เดือน	82
ภาพที่ 39 ต้นขมิ้นชันเมื่อเลี้ยงทดสอบในอาหารเหลวในสูตรอาหาร MS หรือ ½ MS ระยะเวลานาน 3 เดือน	82
ภาพที่ 40 การเจริญเติบโตด้านความสูงของต้นขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ระยะเวลา 3 เดือน	82
ภาพที่ 41 ต้นขมิ้นชันที่ทดสอบการเจริญเติบโตและเกิดเหง้าจิ๋วในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ระยะเวลา 2 เดือน	83
ภาพที่ 42 การเจริญเติบโตด้านความสูงของต้นขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่างๆ ระยะเวลา 3 เดือน	83
ภาพที่ 43 การเกิดรากขนาดใหญ่ที่พัฒนาเป็น micro rhizome (ลูกศรชี้) ของต้นขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่างๆ ระยะเวลา 3 เดือน	83
ภาพที่ 44 การเจริญเติบโตของต้นขมิ้นชันในการทดสอบสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อการกระตุ้นสารสำคัญ	84
ภาพที่ 45 ชิ้นส่วนของตายอด (ก) และตาข้าง (ข) จากหน่ออ่อนของต้นกล้วยไม้เพื่อชักนำโปรโตคอร์ม (plbs)	85
ภาพที่ 46 การทดสอบสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตของ plbs กล้วยไม้ เพื่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณ plbs	85
ภาพที่ 47 การทดสอบการสะสมปริมาณสารสำคัญ moscatilin ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายในสูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต	86
ภาพที่ 48 โครงสร้างทุติยภูมิของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารโลหะหนักแคดเมียม โคลน Cd1B11 วิเคราะห์โดย	89

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

ภาพที่ 49 โครงสร้างทุติยภูมิของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารไซเพอร์เมทริน โคลน Cyp126 และ สารคาร์บาริล โคลน Car2 วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม RNA structure Web server http://RNAstructureWeb/Servers/Predict1/ . 90

ภาพที่ 50 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอชุดยีน sgRNA แบบสุ่มที่มีลำดับเบส attL1 และ attL2 ด้วยวิธีพีซีอาร์ ชุดยีน RG6 และ RG7 สร้างโดยการพีซีอาร์ 2 ครั้ง โดยใช้ เวกเตอร์ pEN-RZ-Lb-Chimera และ pEN-Sa-Chimera เป็นเทมเพลท ได้เป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาด 717 และ 713 คู่เบส ตามลำดับ ทั้งนี้ ไพรเมอร์ Primer-R1 ของ RG6 และ RG7 มีการออกแบบให้ลำดับเบสบริเวณ sgRNA เป็น N (ผสม A/G/C/T) จำนวน 24 และ 20 เบส ตามลำดับ สุดท้ายชิ้นดีเอ็นเอ RG6 และ RG7 ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ U6, 93

ภาพที่ 51 ผลการสร้างชิ้นดีเอ็นเอ RG6 และ RG7 ด้วยวิธีพีซีอาร์ 2 รอบ (ซ้าย) พีซีอาร์รอบที่ 1 ด้วยไพรเมอร์ Primer-F และ Primer-R1 นำมาแยกขนาดด้วยเจลอะกาโรสอิเล็กโทฟอรีซิส แล้วตัดแถบดีเอ็นเอมาสกัดให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 2 (ขวา) ด้วยไพรเมอร์ Primer-F และ Primer-R2 จากนั้นแยกขนาดด้วยเจลและสกัดให้บริสุทธิ์อีกครั้ง ก่อนทำไปใช้ในปฏิกิริยา Gateway cloning ในขั้นถัดไป 93

ภาพที่ 52 ปฏิกิริยา Gateway cloning สำหรับการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ RG6 และ RG7 เข้าสู่เวกเตอร์ pDE-ttLbCas12a และ pDE-SaCas9 ที่ตำแหน่งแลกเปลี่ยนระหว่าง attL และ attR ด้วยเอนไซม์ clonase 94

ภาพที่ 53 ผลการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ RG6 และ RG7 เข้าสู่เวกเตอร์ หลังจากการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ตัวควบคุมเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีการเติมชิ้นดีเอ็นเอ (เวกเตอร์เปล่า) 94

ภาพที่ 54 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ vector library แบบ RG6 (บน) และ RG7 (ล่าง) ที่บริเวณ sgRNA โดยแสดงตำแหน่งโปรโมเตอร์ U6, random guide และ sgRNA scaffold โดยตำแหน่ง random guide ปรากฏเป็นสัญญาณลำดับเบส 4 ชนิด A/G/T/C ผสมกัน แสดงว่าเวกเตอร์ที่สร้างขึ้นมีลักษณะเป็นเวกเตอร์ผสมที่มี sgRNA รูปแบบสุ่ม (sgRNA ของ RG6 ที่ใช้ ttLbCas12a และ RG7 ที่ใช้ SaCas9 มีการจัดเรียงรูปแบบโครงสร้างภายใน sgRNA ที่แตกต่างกัน)

ภาพที่ 55 ตัวอย่างเพลทอะโกรแบคทีเรียมที่ได้จากการถ่ายโอนเวกเตอร์แบบสุ่มด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม ลงเพลทด้วยเซลล์ทั้งหมดจากการถ่ายโอน 1 ครั้ง คัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ rifampicin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน 95

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 56 การยิงอนุภาคทังสเตนบนกระดาษกรองด้วยเครื่องยิงแบบ PDS-1000/He (BioRad gun) ที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 650 psi ในระยะ 3, 6 และ 9 ซม.	97
ภาพที่ 57 ตัวอย่างภาพตัดตามขวางเพลตวุ้นบริเวณที่มีอนุภาคทังสเตน การยิงอนุภาคทังสเตนด้วยเครื่องยิงแบบ PDS-1000/He (BioRad gun) ที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,550 psi ในระยะ 6 และ 9 ซม.	97
ภาพที่ 58 เกณฑ์การให้คะแนนการเกิดแคลลัส และราก	100
ภาพที่ 59 แสดงตำแหน่งที่ออกแบบสำหรับตัดยีน Papain บน Exon 1 และ Exon 2	101
ภาพที่ 60 แสดงตำแหน่งที่ออกแบบสำหรับตัด Promoter 35S	102
ภาพที่ 61 แสดงตำแหน่งที่ออกแบบสำหรับตัด Terminator NOS	102
ภาพที่ 62 แสดงกระบวนการ dual nuclease ของ Cas12a เพื่อตัด DNA เป้าหมายและ ssDNA ที่ไม่ใช่เป้าหมาย	103
ภาพที่ 63 แสดงผลการตัด Plasmid PCXSN50 โดย Nuclease activity cpf1	103
ภาพที่ 64 แสดงผลการตรวจสอบการโคลนยีน cpf1 เข้าสู่ Expression Vector	104
ภาพที่ 65 แสดงความจำเพาะและอุณหภูมิannealingที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (N = ถั่วเหลืองปกติ, PB = พลาสมิดFAD2-1B วัสดุทดสอบถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ)	105
ภาพที่ 66 แสดงจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (N = ถั่วเหลืองปกติ, PB = พลาสมิด FAD2-1B วัสดุทดสอบถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ)	105
ภาพที่ 67 แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาแบบSimplex PCR กับตัวอย่างทดสอบจำนวน 5 ตัวอย่าง	105
ภาพที่ 68 แสดงผลการทดสอบเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดยเทคนิค PCR สำหรับปฏิกิริยาแบบ Duplex PCR ของยีน *FAD2-1B* และ ยีน *Lectin* กับตัวอย่างทดสอบจำนวน 5 ตัวอย่าง	106
ภาพที่ 69 แสดงการออกแบบชุด LFICS เพื่อทดสอบยีน *FAD2-1B* (Test line 1) และ *Lectin* (Test line2)	107
ภาพที่ 70 แสดงผลการทดสอบชุด LFICS ในปฏิกิริยาแบบ Simplex PCR ของยีน FAD2-1B และ ยีน Lectin (N = ถั่วเหลืองปกติ, PB = พลาสมิดFAD2-1B วัสดุทดสอบถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ)	107
ภาพที่ 71 แสดงผลการทดสอบชุด LFICS ในปฏิกิริยาแบบ Duplex PCR ของยีน FAD2-1B และ ยีน Lectin (N = ถั่วเหลืองปกติ, PB = พลาสมิดFAD2-1B วัสดุทดสอบถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ)	108

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 72 แสดงผลความเข้มข้นดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบในชุด LFICS	109
ภาพที่ 73 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Waxy1 ที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI	109
ภาพที่ 74 การออกแบบไพรเมอร์ และโพรบ โดย (A.) บริเวณยีน Waxy ที่มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และ (B.) บริเวณยีน Waxy ที่มีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์	110
ภาพที่ 75 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบที่ทำการออกแบบด้วยโปรแกรม Primer3	111
ภาพที่ 76 การตรวจจับตำแหน่งยีนส่วนของข้าวโพดปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิค Real-time PCR	111
ภาพที่ 77 องค์ประกอบที่เหมาะสมสำหรับดำเนินงาน Digital Droplet PCR	112

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตารางที่ 1 ผลของสารออกออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่ติดเชื้อ SLCMV 69

ตารางที่ 2 การศึกษาสืบค้นและวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางชีววิทยาของแมลงหวี่ขาว 71 74

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวัดคุณ DNA ที่ได้จากการทดลองการสกัด DNA ด้วยวิธี Lysis buffer และชุดสกัด DNAพืชอย่าง่าย 88

ตารางที่ 4 ผลการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมเทียบกับบัฟเฟอร์ ด้วยวิธี indirect ELAA 88

ตารางที่ 5 ผลการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐานโลหะหนักตะกั่วเทียบกับบัฟเฟอร์ ด้วยวิธี indirect ELAA 90

ตารางที่ 6 ผลการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐานคาร์บาริลเทียบกับบัฟเฟอร์ ด้วยวิธี indirect ELAA 91

ตารางที่ 7 ผลการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐานไซเพอร์เมทรินเทียบกับบัฟเฟอร์ด้วยวิธี indirect ELAA 97

ตารางที่ 8 แสดงระยะการกระจายตัวของอนุภาคทังสเตนที่ระยะห่างระหว่างแท่นยิงกับเพลตที่แตกต่างกัน 97

ตารางที่ 9 แสดงระยะทางที่อนุภาคทังสเตนเคลื่อนที่ได้ (มม.) ที่ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียมแตกต่างกัน 98

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยพื้นที่การเข้าของอนุภาคทังสเตนบนชิ้นแผ่นใบมะละกอต่อการยิงอนุภาค 1 ครั้ง 98

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยพื้นที่การข้าวของอนุภาคทังสเตนที่ความเข้มข้น 3 ระดับ โดยใช้จำนวนชิ้นส่วนเนื้อเยื่อใบ 10 ชิ้น แรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1100 psi และระยะห่าง 6 ซม. 99

ตารางที่ 12 คะแนนค่าเฉลี่ยการเกิดแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน hypocotyl บนอาหารทดลองจำนวน 12 สูตร ให้แสงเป็นเวลา 16 ชม.ต่อวัน อายุ 65 วัน 100

ตารางที่ 13 คะแนนค่าเฉลี่ยการเกิดยอดและแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอด (shoot tip) และข้อ (node) บนอาหารทดลองจำนวน 12 สูตร ให้แสงเป็นเวลา 16 ชม.ต่อวัน อายุ 60 วัน 101 102

ตารางที่ 14 แสดงการสังเคราะห์ crRNA เพื่อใช้เป็นตัวจับ dsDNA 103

ตารางที่ 15 แสดง แสดงการออกแบบ Reporter และติดสัญญาณโมเลกุล ประเภทต่างๆ 104

ตารางที่ 16 แสดงส่วนผสม เพื่อใช้ทดสอบ Nuclease activity 107

ตารางที่ 17 ไพรเมอร์สำหรับตรวจวิเคราะห์ยีน FAD2-1B และ ยีน Lectin 110

ตารางที่ 18 แสดงไพรเมอร์ที่ติดฉลากสีเพื่อใช้เป็นโพรบในชุด LFICS

ตารางที่ 19 ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบจากบริเวณยีน Waxy

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทที่ 1 บทนำ

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

วิสัยทัศน์

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

พันธกิจ

1. สร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยด้านพืชและเครื่องจักรกลการเกษตรสู่กลุ่มเป้าหมาย
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. 2565 จำนวน 5,643,808 บาท

4. รายละเอียดโครงการ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

การผลิตพืชปัจจุบันได้รับผลกระทบหลายด้านจากภาวะโลกร้อน สภาวะภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลง การเกิดโรคและแมลงศัตรูพืชแพร่ระบาดสร้างความเสียหาย ปัญหาสารพิษตกค้างและการปนเปื้อนโลหะหนักในดิน รวมถึงความไม่สอดคล้องของมาตรฐานการควบคุมด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ เกิดการปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ยังไม่ผ่านการประเมินหรืออนุญาตใช้ปะปนมากับวัตถุดิบนำเข้า ซึ่งปัญหาดังกล่าวเหล่านี้ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอาหารและการส่งออกสินค้าเกษตรของประเทศ อาทิ ปัญหาวิกฤตการณ์การแพร่ระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังจากเชื้อไวรัส *Sri Lankan cassava mosaic* ทำให้พื้นที่การผลิตหัวมันสำปะหลังมีแนวโน้มความเสียหายสูงร้อยละ 80-100 ส่งผลกระทบต่อภาคอุตสาหกรรม จำเป็นต้องหาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค โดยภาครัฐต้องพัฒนางานวิจัยเพื่อหาวิธีการควบคุมและป้องกันกำจัดอย่างเร่งด่วน

นอกจากนี้ สภาวการณ์การแข่งขันของสินค้าเกษตรที่เน้นด้านสุขภาพและความปลอดภัยอาหาร การผลิตสินค้าให้มีความปลอดภัย กระบวนการผลิตสารสำคัญทางเภสัชภัณฑ์จากพืชสมุนไพรในประเทศเพื่อใช้เป็นเภสัชภัณฑ์ การเพิ่มปริมาณสารสำคัญและควบคุมไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของสารพิษทางการเกษตรสร้างมูลค่าเพิ่มของสินค้า การผลิตสินค้าให้มีความปลอดภัยจากการตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชหรือโลหะหนักที่สะสมอยู่ในดิน การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างมีความจำเป็นการพัฒนาชุดตรวจสอบที่รวดเร็วแม่นยำ ช่วยลดระยะเวลาและลดต้นทุนการวิเคราะห์ จะช่วยสร้างความเชื่อมั่นในระบบการตรวจสอบและการตรวจสอบย้อนกลับ ทั้งนี้ด้วยความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืช การกลายพันธุ์แบบแม่นยำหรือการปรับแต่งจีโนมเพื่อแก้ไขรหัสพันธุกรรมให้พืชมีคุณลักษณะตามต้องการอย่างจำเพาะ มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาพันธุ์พืชอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน มีความปลอดภัยเสี่ยงต่ำกว่าการกระตุ้นให้กลายพันธุ์ด้วยวิธีทางเคมี โดยมีพืชปรับปรุงพันธุ์สำเร็จแล้ว อาทิ ข้าวโพดแป้งเหนียว เห็ดแชมปิญองทนต่อการเกิดสีน้ำตาล และถั่วเหลืองปราศจากไขมันทรานส์ ซึ่งการพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์พืชกลายพันธุ์ดังกล่าวจึงมีความสำคัญเพื่อให้การตรวจสอบย้อนกลับสินค้าเกษตรที่ไม่ผ่านการอนุญาตใช้เข้ามาในประเทศ พัฒนาระบบการสุ่มและตรวจสอบสินค้าพืชนำเข้าเพื่อป้องกันการหลุดรอดเข้ามาแพร่กระจายในประเทศ ช่วยสนับสนุนนโยบายการเป็นแหล่งผลิตสินค้าเกษตรและอาหารที่ปลอดภัย สร้างความเชื่อมั่นทางการค้าป้องกันการปฏิเสธหรือการกีดกันทางการค้าของสินค้าเกษตรจากประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตรเป็นหน่วยงานหลักรับผิดชอบงานวิจัยด้านพืช จำเป็นต้องเร่งพัฒนางานวิจัย เพื่อนำเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ มาใช้ในการผลิตพืชปลอดภัย อาทิ เทคโนโลยีการอารักขาพืชจากสารชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษตกค้างทางการเกษตร ผลิตสารสำคัญที่เป็นประโยชน์ทางเภสัชภัณฑ์ในระบบการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ ช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มของสินค้าเกษตร พัฒนาการผลิตพืชปลอดภัยเสริมสร้างความมั่นคงทางอาหารและเพิ่มรายได้สู่ชุมชน โครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมเพื่อการผลิตพืชปลอดภัย จึงมุ่งเน้นการนำเทคโนโลยีชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มาสร้างนวัตกรรมแก้ปัญหาระบบการ

กรมวิชาการเกษตร

ผลิต การตรวจสอบสินค้าเกษตร และเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรด้วยนวัตกรรม สร้างความเข้มแข็งทางเศรษฐกิจและแข่งขันในตลาดโลกได้อย่างยั่งยืนแก้ปัญหาการผลิตพืชที่สำคัญ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลัง การผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค เพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ด้วยเทคนิค Temporary Immersion Bioreactor (TIB) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ RNAi และ dsRNA ที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันพืชต่อเชื้อ SLCMV ยับยั้งการเข้าทำลายของแมลงหวี่ขาว พัฒนาเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์ และพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส SLCMD สาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิค LAMP-LFICS สำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กและภาคสนาม และชุดตรวจสอบจากเทคนิค Immunochromatographic strip (ICS) สำหรับเกษตรกร

2) เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการผลิตเห้าขมิ้นชันจิ๋วที่ปลอดสารพิษ มีปริมาณสารสำคัญสูงกว่าการผลิตในสภาพธรรมชาติ ใช้เป็นส่วนขยายพันธุ์สะอาดสำหรับเกษตรกร และพัฒนาการผลิตสารสำคัญในระบบปิดด้วย protocorm-like bodies ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายในระบบ Bioreactor ให้มีปริมาณสารสำคัญสูงขึ้น

3) เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบสารปนเปื้อนทางการเกษตรอย่างง่าย ด้วยตัวตรวจจับแอนติบอดีหรือดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อโลหะหนักประเภทแคดเมียมและตะกั่ว และชุดตรวจสารเคมีกำจัดศัตรูพืชคาร์บาริลและไซเพอร์เมทริน พัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ Electrochemical aptasensor ทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบอย่างง่ายกับวิธีทางเคมี และทดสอบการใช้งานกับตัวอย่างจริงในพื้นที่

4) เพื่อพัฒนาพันธุ์พืชต้านทานโรคด้วยเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ โดยการกลายพันธุ์มะละกอให้มีความต้านทานโรคไวรัสใบจุดวงแหวน และพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์พืชที่ผ่านการใช้เทคโนโลยีกลายพันธุ์แบบแม่นยำ ด้วยเทคนิค SHERLOCK เทคนิคเลเทอรัลโฟลว์อิมมูโนโครมาโตกราฟฟิกสตริปส์ เทคนิค homo/hetero-duplexes และเทคนิคดิจิทัลดรอปเลตพีซีอาร์

ขอบเขตการศึกษา

โครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมการผลิตพืชปลอดภัย เป็นการนำเทคโนโลยีชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ พัฒนาสร้างนวัตกรรมสำหรับภาคการเกษตรของประเทศไทย ตอบโจทย์ความต้องการผลิตพืชปลอดภัย แก้ปัญหาการแพร่ระบาดของโรคพืชและศัตรูพืชที่ทำความเสียหายต่อการผลิตพืชที่สำคัญคือโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง และโรคไวรัสใบจุดวงแหวนมะละกอ มีเป้าประสงค์เพื่อให้ได้เทคโนโลยีและนวัตกรรมด้านการเกษตรสำหรับประเทศไทยเพื่อการผลิตพืชปลอดภัย ลดปัญหาการแพร่ระบาดของศัตรูพืช ได้นวัตกรรมชุดตรวจสอบภาคสนามที่มีความรวดเร็ว แม่นยำ ตรวจสอบง่าย และได้เทคโนโลยีการผลิตสารชีวภาพจากพืชสมุนไพรเพิ่มมูลค่าในการผลิตพืช เพื่อให้สามารถควบคุมโรคที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจของประเทศ ลดความเสียหายในการผลิตพืช สร้างมูลค่าเพิ่มให้ผลิตภัณฑ์จากเทคโนโลยีชีวภาพ ควบคุมพืชดัดแปลงพันธุกรรมไม่ให้เกิด

กรมวิชาการเกษตร

การปนเปื้อน สร้างความเชื่อมั่นสินค้าเกษตร สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตพืชปลอดภัย สร้างความมั่นคงทางอาหารและความเข้มแข็งในชุมชน สร้างรายได้เกษตรกรมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น โดยมีแนวทางการดำเนินงานดังนี้

1. โครงการวิจัยย่อยเทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมการจัดการโรคใบด่างมันสำปะหลัง เพื่อแก้ปัญหาโรคใบด่างสำปะหลังเกิดจากเชื้อไวรัส SLCMV ที่สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกร โดยศึกษาการขยายพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค ด้วยเทคนิค TIB ผลิตต้นพันธุ์ที่ปลอดเชื้อ และผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคปลอดเชื้อให้เกษตรกร ซึ่งการเลือกใช้ต้นพันธุ์ปลอดโรคสามารถช่วยให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นลดความเสียหาย ลดการใช้สารเคมี วิจัยสารชีวภาพเพื่อการประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงหวี่ขาวและไวรัสสาเหตุโรคใบด่างในมันสำปะหลัง ศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์สร้างความต้านทานของพืชโดยใช้เทคโนโลยี RNAi รบกวนการทำงานของ RNA เป้าหมายที่อยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยออกแบบ dsRNA ให้มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสและแมลงหวี่ขาวยาสูบ โดยพืชจะสามารถดูดซึมและเคลื่อนย้าย dsRNA เข้าไปในเนื้อเยื่อผ่านทางระบบท่อลำเลียง เมื่อไวรัสและแมลงพาหะเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืช dsRNA จะถูกดูดซึมเข้าไปในเซลล์กำจัดศัตรูเป้าหมายได้โดยทำให้เกิดการรบกวนระบบทำงานของ RNA ในเซลล์เป้าหมาย การศึกษาพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในพืชสร้างความทนทานต่อการเกิดโรค โดยการศึกษาสารซึ่งทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณหรือมีคุณสมบัติต้านเชื้อโดยตรง พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกเพื่อการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลังให้กับเกษตรกร และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ต่อไป การวิจัยพัฒนาชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ ไม่ยุ่งยาก รวดเร็ว และแม่นยำ สำหรับใช้ตรวจสอบเฝ้าระวังโรคในพื้นที่ภาคสนามหรือห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก จะช่วยในการตรวจสอบท่อนพันธุ์ให้ปลอดโรคก่อนการปลูก ใช้เทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) และ PCR-lateral flow ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อไวรัส ประยุกต์ใช้เครื่องมือที่ราคาไม่แพง ไม่ยุ่งยากต้นทุนต่ำ สามารถใช้ตรวจสอบในภาคสนาม โดยเจ้าหน้าที่ทดสอบไม่ต้องมีความชำนาญ อ่านผลการทดสอบได้ด้วยตาเปล่า ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง เป็นการควบคุมโรคอย่างเป็นระบบครบวงจร

2. โครงการวิจัยย่อยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและชักนำการผลิตสารสำคัญทางเภสัชภัณฑ์ของพืชสมุนไพร โดยใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งมีประสิทธิภาพสามารถชักนำให้พืชผลิตสารสำคัญ ภายใต้สภาพควบคุม ดำเนินงานวิจัยในพืช 2 ชนิด คือขมิ้นชันสารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและกระตุ้นสารสำคัญในกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ซึ่งการวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประโยชน์ทั้งด้านการปรับปรุงพันธุ์และการเลี้ยงเซลล์เพื่อสกัดสารสำคัญทางเภสชักรรม รวมทั้งการสร้างต้นพันธุ์หรือส่วนขยายพันธุ์ปลอดโรคปริมาณมาก เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของสารสำคัญทางสมุนไพรของไทยในอนาคต โดยศึกษาการเกิดเหง้าขนาดเล็ก (micro rhizome) ของขมิ้นชันให้ปลอดโรคและสิ่งปนเปื้อนที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ร่วมกับการนำปัจจัยต่างๆ จากภายนอกที่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการเพิ่มของสารสำคัญของขมิ้นชันเพื่อให้ได้เหง้าจิ๋วที่มีปริมาณสารสำคัญสูงได้ตามมาตรฐานของเภสัชตำรับ และการเลี้ยง protocorm ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายในระบบ Bioreactor เพื่อให้ได้ปริมาณสารสำคัญที่สูงขึ้นมีปริมาณมากรองรับระดับอุตสาหกรรม และเป็นการเพิ่มคุณค่าและมูลค่าของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายของไทย เป็นต้นแบบในการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการผลิตสารสำคัญทางเภสัชภัณฑ์ ให้สามารถควบคุมปริมาณและคุณภาพสารสำคัญให้มีความปลอดภัย

3. โครงการวิจัยย่อยและพัฒนาชุดตรวจสารพิษตกค้างทางการเกษตรอย่างรวดเร็ว เพิ่มศักยภาพการผลิตพืชปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคที่อาจมีสารปนเปื้อนจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนัก เพื่อให้สินค้าเกษตรมีความปลอดภัยตามมาตรฐานสากล บริโภคได้อย่างปลอดภัยและมีคุณภาพสามารถแข่งขันได้ในตลาดโลก การตรวจสอบสารตกค้างทางการเกษตรในผลผลิตก่อนจะออกจากแปลงสู่แหล่งจำหน่ายเป็นขั้นตอนที่จำเป็นของกระบวนการผลิตอาหารปลอดภัย การปนเปื้อนโลหะหนักอาจมาจากทั้งแหล่งดิน แหล่งน้ำ หรือการใช้ปุ๋ยและสารเคมีในระหว่างการเพาะปลูก เมื่อบริโภคพืชที่ปนเปื้อนโลหะหนักเป็นประจำ โลหะหนักจะสะสมในร่างกาย จนทำให้เกิดอันตรายและเจ็บป่วยได้ เช่นเดียวกับสารเคมีกำจัดแมลง โดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิคทางด้านเคมี สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ละเอียดและแมนยำ แต่มีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายสูง ต้องการผู้เชี่ยวชาญและชำนาญเฉพาะทาง อีกทั้งขั้นตอนการสกัดสารยุ่งยากไม่เหมาะกับงานตัวอย่างที่มีจำนวนมาก ถึงแม้ในปัจจุบันจะมีชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างในภาคสนาม ซึ่งใช้หลักการทางเคมีในการตรวจสอบ มีขั้นตอนและอุปกรณ์ที่ยุ่งยาก ใช้เวลาในการตรวจสอบนาน 30-60 นาที เทคนิค ICS เป็นวิธีการที่ใช้งานง่าย ราคาถูก รวดเร็ว และสามารถพกพาได้ ใช้เวลาในการตรวจสอบเพียง 10 นาที นอกจากการใช้แอนติบอดีในการผลิตชุดตรวจสอบแล้ว ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่เรียกว่า แอปตาเมอร์ (Aptamer) มีคุณสมบัติม้วนพับเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ ซึ่งมีการทำงานคล้ายกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี สามารถจับกับโมเลกุลต่างๆ ได้อย่างจำเพาะและหลากหลายชนิด เป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาชุดตรวจสอบทางเกษตร เทคโนโลยีดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่นำมาใช้ในการตรวหาสารปนเปื้อนทางการเกษตร สามารถนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารปนเปื้อนทางการเกษตรอย่างง่ายได้ เกษตรกรและเจ้าหน้าที่ภาคสนามยังสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยตัวเอง และทราบผลในเวลาอันรวดเร็ว

4. โครงการวิจัยย่อยการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ เพื่อการผลิตพืชปลอดภัยและยั่งยืน เป็นการพัฒนาพืชโดยใช้เทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ หรือการปรับแต่งจีโนม เพื่อปรับเปลี่ยนแก้ไขรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่มีความจำเพาะและแม่นยำด้วยเทคนิค CRISPR/Cas ซึ่งเป็นการเลียนแบบระบบการต่อสู้ของแบคทีเรียต่อไวรัส เรียกว่าระบบ CRISPR ร่วมกับการตัดด้วยโปรตีน Cas นิยมใช้ในรูปแบบ SDN1 (deletion) เป็นการตัดสายดีเอ็นคู่ให้ขาดไปในตำแหน่งที่ต้องการโดยไม่มีการใส่นิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าไป ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นๆ สามารถระบุให้กลายพันธุ์ได้เฉพาะตรงตำแหน่งที่ต้องการ ไม่มีความเสี่ยงในการกลายพันธุ์ของพืชในจุดที่ไม่ต้องการเหมือนการกระตุ้นให้กลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยวิธีการทางเคมีหรือรังสี โดยศึกษาในยีนกลุ่มปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรมยีน eIF4E ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิสัมพันธ์โปรตีน กับโปรตีนของไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ ทำให้มะละกอเกิดโรค เมื่อมีการกลายของยีน eIF4E มะละกอจะสามารถต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอได้ ทั้งนี้พืชดัดแปลงพันธุกรรมหรือได้รับการแก้ไขยีนเพิ่มขึ้นในเชิงอุตสาหกรรมทั่วโลก การตรวจดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือพื้นฐาน สามารถตรวจความเปลี่ยนแปลงได้ตั้งแต่ 1 เบส อีกทั้งพัฒนาการตรวจดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ Cas (Cas12, Cas13 และ Cas14) ซึ่งเป็นการตรวจดีเอ็นเอที่มีความสะดวกและราคาถูก และสามารถตรวจวิเคราะห์ในระดับพื้นที่ได้ วิธีการ hetero-/homo-duplexes และ T7 endonuclease-I (T7E1) ซึ่งอาศัยหลักการของเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอแบบที่เป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สม ทำให้เกิด loop และทราบว่าตัวอย่างใดเป็นตัวอย่างของพืชปรับแต่งจีโนม เทคนิคเลเทอรัลโฟลว์อิมมูโนกราฟฟิกสตริปส์สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากผลผลิตพืชอาร์อย่างง่ายและรวดเร็ว ราคาถูก และสามารถลดการใช้อุปกรณ์

เครื่องมือในการตรวจสอบได้หลายขั้นตอน สำหรับการตรวจคัดกรองและตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบดิจิตอลพีซีอาร์ (Digital Droplet PCR) สามารถแบ่งปฏิกิริยาเป็นส่วนย่อยระดับนาโนลิตรและเตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสได้อัตโนมัติ และเพิ่มปริมาณและตรวจวัดสารพันธุกรรมเป้าหมายตามหลักการตรวจวัดสารพันธุกรรมแบบสัมบูรณ์ ด้วยการอ่านค่าของปฏิกิริยาแต่ละส่วนย่อยที่เกิดปฏิกิริยาอย่างเป็นอิสระต่อกันสามารถวิเคราะห์สารพันธุกรรมเป้าหมายเชิงปริมาณที่แน่นอน โดยไม่ต้องเทียบกับกราฟมาตรฐาน

นิยามศัพท์

โรคใบด่างมันสำปะหลัง (Cassava mosaic disease: CMD): เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในสกุล Begomovirus อาการจะเห็นได้ชัดเจนที่ส่วนยอดและใบ โดยจะแสดงเกิดอาการใบด่าง ใบหงิกงอ เสียรูปทรง และลำต้นแคระแกร็น ส่วนหัวมันจะมีขนาดเล็กกว่าต้นมันสำปะหลังปกติ

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: เป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชวิธีหนึ่ง โดยนำชิ้นส่วนสำคัญของพืช เช่น ลำต้น ยอด ตาข้าง ใบ ดอก มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ภายใต้สภาวะที่ควบคุมความสะอาดแบบปลอดเชื้อ อุณหภูมิ และแสง เพื่อให้ชิ้นส่วนเหล่านั้นสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ สามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้

สารสำคัญ: สารประกอบที่บ่งบอกความเฉพาะตัวของสมุนไพรหรือพืชที่นำมาใช้ประโยชน์ เป็นสารที่ก่อให้เกิดประโยชน์ทางใดทางหนึ่ง

DNA Aptamer: เป็นดีเอ็นเอที่มีคุณสมบัติพิเศษคือสามารถจับกับโมเลกุล ของสารต่างๆได้อย่างจำเพาะ ถึงแม้ว่าโมเลกุลนั้นจะไม่ใช่สารที่จับอยู่ในธรรมชาติ

การกลายพันธุ์แบบแม่นยำ: เป็นการใช้เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม (genome editing) มาพัฒนาสายพันธุ์พืชให้มีลักษณะที่ต้องการได้

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

1.วิธีการดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 เทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลัง

กิจกรรมที่ 1 การผลิตและขยายต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค ด้วยเทคนิค Temporary Immersion Bioreactor

การทดลองที่ 1.1 พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1) ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50

2) สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS), Phytagel6-Benzylaminopurine (BA), Ribavarin, Salicylic acid

3) อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น คีมคีบ (forcept), มีดผ่าตัด, จานเพาะเลี้ยง (Petri dish)

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ/กรรมวิธี

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. นำต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50 มาเลี้ยงในโรงเรือน เมื่อเกิดยอดอ่อน นำไปเข้าสู่ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไป เพื่อผลิตต้นมันสำปะหลังที่ปลอดโรคใบด่างมันสำปะหลัง

1.1 ศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค พันธุ์ระยอง 72 และ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50

นำท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 มาทดสอบที่อุณหภูมิระดับต่างๆ 6 ระดับ โดยกำหนดให้อยู่ในสภาพให้แสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน และสภาพที่มืดนาน 8 ชั่วโมงต่อวัน ร่วมกับระยะเวลาที่ท่อนพันธุ์อยู่ในสภาพควบคุมนาน 1 และ 2 สัปดาห์ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ/กรรมวิธี จากนั้นนำส่วนยอดของมันสำปะหลังที่เกิดขึ้นจากท่อนพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบ มาตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ให้มีขนาด 0.03-0.05 มิลลิเมตร เลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และตรวจสอบต้นมันสำปะหลังปลอดโรค Sri- CMV ด้วยเทคนิค PCR ในการทดสอบประกอบด้วย

1) สภาพให้แสง 36°C สภาพที่มืด 32°C เวลา 1 สัปดาห์
2) สภาพให้แสง 38°C สภาพที่มืด 34°C เวลา 1 สัปดาห์
3) สภาพให้แสง 40°C สภาพที่มืด 36°C เวลา 1 สัปดาห์
4) สภาพให้แสง 42°C สภาพที่มืด 38°C เวลา 1 สัปดาห์
5) สภาพให้แสง 36°C สภาพที่มืด 32°C เวลา 2 สัปดาห์

กรมวิชาการเกษตร

6) สภาพให้แสง 38°C สภาพที่มืด 34°C เวลา 2 สัปดาห์

7) สภาพให้แสง 40°C สภาพที่มืด 36°C เวลา 2 สัปดาห์

8) สภาพให้แสง 42°C สภาพที่มืด 38°C เวลา 2 สัปดาห์

การบันทึกข้อมูล ร้อยละการรอดชีวิต การปลอดโรคของต้นมันสำปะหลัง การเกิดยอดของต้นมันสำปะหลัง พร้อมถ่ายภาพประกอบ

1.2 ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ (Ribavarin) ในการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค พันธุ์ระยอง 72 และ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50

นำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของต้นมันสำปะหลังทั้ง 2 พันธุ์ มาทดสอบในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ Ribavarin ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 60 วัน จากนั้นนำมาตรวจสอบหาเชื้อ Sri-CMV ด้วยเทคนิค PCR ในต้นมันสำปะหลังที่เลี้ยงในแต่ละกรรมวิธี วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี จำนวน 8 ซ้ำ/กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สูตรอาหาร MS + Ribavarin 0 mg/l (control)

กรรมวิธีที่ 2 สูตรอาหาร MS + Ribavarin 15 mg/l

กรรมวิธีที่ 3 สูตรอาหาร MS + Ribavarin 20 mg/l

กรรมวิธีที่ 4 สูตรอาหาร MS + Ribavarin 25 mg/l

กรรมวิธีที่ 5 สูตรอาหาร MS + Ribavarin 30 mg/l

การบันทึกข้อมูล ร้อยละการรอดชีวิต การปลอดโรคของต้นมันสำปะหลัง การเกิดยอดของต้นมันสำปะหลัง พร้อมถ่ายภาพประกอบ

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาปัจจัยการขยายต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรคด้วยเทคนิค Temporary Immersion Bioreactor

<u>สิ่งที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50
2. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS), Phytagel, 6-Benzylaminopurine (BA), Ribavarin
3. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น คีมคีบ (forcept), มีดผ่าตัด, จานเพาะเลี้ยง (Petri dish)
4. อุปกรณ์สำหรับระบบ TIB เช่น filter, สายซิลิโคน

<u>แบบและวิธีการทดลอง</u>

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ/กรรมวิธี

<u>วิธีปฏิบัติการทดลอง</u>

นำต้นมันสำปะหลังที่ปลอดโรคจากการทดลองที่ 1 มาเพิ่มปริมาณในระบบ TIB เพื่อให้ได้ต้นมันสำปะหลังปลอดโรคจำนวนมาก ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังปลอดโรคพันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

ระยอง 72 และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ด้วยระบบ TIB วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ/กรรมวิธี ดังนี้

สูตรที่ 1 ½ MS + BA 0.5 mg/l
สูตรที่ 2 ½ MS + BA 1 mg/l
สูตรที่ 3 MS + BA 0.5 mg/l
สูตรที่ 4 MS + BA 1 mg/l

กิจกรรมที่ 2 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงเพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาวและไวรัสสาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลัง
การทดลองที่ 2.1 การพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคใบด่างมันสำปะหลัง

1. การเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้

- Bacterial culture

ทำการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว นาน 14-16 ชั่วโมง

- โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง

นำผงถั่วเหลือง 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 175 มิลลิลิตร คนให้ละลายโดยใช้ Magnetic stirrer bar ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 ด้วย NaOH นำสารละลายถั่วเหลืองที่ได้ใส่ลงในหลอด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมา ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.5 ด้วย HCl จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำส่วนตะกอนมาละลายในน้ำกลั่นที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปทำ Freeze dry และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

- กรดอะมิโนลีวูลินิก

เตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A นำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ปรับความค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย OD_{600} เท่ากับ ≤1.0 ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นชักนำการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl-**β**-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 3 mM IPTG และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ชักนำการผลิตสาร ALA โดยการเติมสารตั้งต้น 30mM Glycine + 10mM Succinic Acid ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 24 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้ ดังนี้ ปั่นแยกตะกอนเซลล์ ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย Sodium acetate buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (pH 4.6) และสารละลาย Acetone ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที และทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ALA ที่ผลิตได้ โดยนำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100 uM

- ไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

ชั่งผง Chitin จากเปลือกกุ้ง ปริมาตร 5 กรัม ผสมกับ 2N NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส บน Stirring hot plate คนตลอดเวลาโดยใช้ Magnetic stirrer bar เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเตรียมกระดาษกรองใส่ลงในกรวยแก้ว และวางลงบนฟลาสก์ เทสารละลาย Chitin ลงบนกระดาษกรอง จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น กรองจนหมดความเป็นด่าง สามารถทราบได้โดยนำน้ำที่ล้างตะกอนไปวัดความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ pH 7 หรือน้อยกว่า จากนั้นนำตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดย Chitin ปริมาตร 5 กรัม จะได้ Chitosan ปริมาตร 3.63 กรัม

- การเตรียมรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ไคติเนส

เตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน chitinase มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์ตั้งต้น 3 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที วัดความขุ่นของอาหาร จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.5 จากนั้นชักนำการแสดงออกของยีนด้วยสาร 3 mM IPTG และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ โดยนำปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที (หลังจากนี้วางบนน้ำแข็งทุกขั้นตอน) ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Lysis buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเข้าเครื่อง sonicator 30 วินาที ทำซ้ำ 3-4 ครั้ง แล้วเติม DNase I ปริมาตร 3 µl โดยสังเกตจากความหนืด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วนใส (crude enzyme) มาทำการตรวจสอบกิจกรรมของ Recombinant enzymes โดยวิธี Bioassay technique บนอาหารแข็งที่มี colloidal chitin เป็นองค์ประกอบ (น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร : ไคติน 0.5 กรัม, agar 2 กรัม) ในจานเลี้ยงเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่เจาะรูอาหารด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร หยด crude enzyme ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ตรวจสอบกิจกรรมการย่อยไคตินของเอนไซม์ chitinase โดยสังเกตจากการเกิดวงใส (clear zone) เมื่อย้อมด้วยสารละลาย congo red ซึ่งเททับและวางทิ้งไว้นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย NaCl จากนั้นล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง สังเกตดูการเกิดวงใส (clear zone)

2. การศึกษาประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีผลต่อการเกิดโรคใบด่างมันสำปะหลัง

นำท่อนมันสำปะหลังฆ่าเชื้อบริเวณผิวด้วย Clorox 20% ใช้กระดาษอเนกประสงค์ซับให้แห้ง จากนั้นตัดต้นมันสำปะหลังให้มีความยาวท่อนละประมาณ 7 เซนติเมตร แช่โคนท่อนมันมันสำปะหลังลงในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในข้อ 1 วางแผนการทดลอง 10 กรรมวิธี 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่น) เก็บในที่มืด แช่เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปลูกลงดินปลูก (ดินผสมทรายในอัตราส่วน 4:1) นำไปใส่ในตู้ Plant Growth

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Chamber โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส และทำการรดน้ำทุกวัน บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ดังภาพที่ 1

ไม่เกิดโรค **<25%** **25%** **50%** **75%** **100%**

ภาพที่ 1 เกณฑ์ระดับการแสดงอาการของโรคใบด่างมันสำปะหลัง

3. การตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณของเชื้อด้วยเทคนิค Real-time PCR

- การสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลังมาได้จากการทดสอบตามข้อ 2 ทำการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดด้วยวิธี CTAB ตามวิธีการของ Agrawal *et al*. (1992) โดยนำตัวอย่างใบมันสำปะหลัง 1 กรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดด้วยโกร่งให้ละเอียดพร้อมกับไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างที่บดแล้วใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์สกัด (Extraction buffer) (2xCTAB; 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) Cethyl trimethyl ammonium bromide, 1.4 M NaCl, 50 mM Na_2 EDTA, 100 mM Tris-Hcl (pH 8.0) และ 2-mercaptoethanol 2 มิลลิลิตร) ปริมาณ 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที เขย่าหลอดทุก 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 700 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในหลอดโดยวิธีกลับหลอดไปมา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน 500 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 M NaOAC 50 ไมโครลิตร และ isopropanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำการล้างตะกอน 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (1 mM Na_2 EDTA 10 mM Tris-Hcl pH 8.0) จำนวน 50 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่ได้นำมาวัดความเข้มข้นโดยเครื่อง Spectrophotometer เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

- การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR

โดยนำดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากข้างต้น มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอและตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CpSLC_Bm_F, CpSLC_Sc_R (CpSLC_Bm F: TTTGGATCCATGTCGAAGCGACCAGCAG, CpSLC_Sc R: TTGAGCTAATTGCTGACCGAATCGTAG) ซึ่งมีความจำเพาะกับเชื้อสาเหตุโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง และไพรเมอร์ ITS1, ITS4 ซึ่งมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

master mix	10	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ CpSLC_Bm_F 5 µM	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ CpSLC_Sc_R 5 µM	1	ไมโครลิตร
DNA 50 ng	1	ไมโครลิตร
ddH_2O	7	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QuantStudio™ 5 Real time PCR (Applied Biosystems® USA) โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยาดังนี้

50 องศาเซลเซียส	2 นาที	จำนวน 1 รอบ
95 องศาเซลเซียส	2 นาที	จำนวน 1 รอบ
95 องศาเซลเซียส	15 วินาที	ทำซ้ำ จำนวน 40 รอบ
55 องศาเซลเซียส	15 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	1 นาที	จำนวน 1 รอบ

บันทึกข้อมูล การเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุโรคใบด่างในรูปแบบกราฟ amplification plot และค่า Tm

การทดลองที่ 2.2 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี RNAi เพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาว *Bemisia tabasi*

<u>สิ่งที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. แมลงหวี่ขาวยาสูบ
2. พันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ต้านทาน จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
3. วัสดุอุปกรณ์การเกษตรที่ใช้ในการปลูก การเก็บ และการเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลัง
4. สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอมันสำปะหลัง
5. สารเคมี ชุดสำเร็จรูป วัสดุอุปกรณและเครื่องมือ ที่ใช้ในการทดสอบพีซีอาร์และอิเลกโตรโฟรรีซิส

<u>แบบและวิธีการทดลอง</u>

แผนการทดลอง : ไม่มีการวางแผนการทดลอง

<u>วิธีปฏิบัติการทดลอง</u>

1. การเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวยาสูบในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดสอบ Bioassay

- เก็บตัวอย่างแมลงหวี่ขาวจากสภาพธรรมชาติในแปลงมันสำปะหลัง นำมาเพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือนด้วยอาหารธรรมชาติคือต้นมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่แมลงหวี่ขาวชอบเช่น CMR89 หรือพันธุ์อื่นที่มียอดสีขาวหรือมันสำปะหลังพันธุ์ 5 นาที

- จำแนกลักษณะแมลงหวี่ขาวยาสูบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลด้วยการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 780 คู่เบส ของยีนส่วน ไมโตคอนเดรียล ไซโตโครมออกซิเดส 1 (mtCOI) วิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้กับ *Bemisia tabasi* อ้างอิงจากฐานข้อมูลสากล

ศรีวิชาการเกษตร

2. ศึกษา สืบค้นและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางชีววิทยาของแมลงหวี่ขาว เช่น ยีนที่สร้างเอนไซม์ย่อยน้ำตาล การขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ ย่อยโปรตีน ยีนที่ทำให้แมลงทนต่อความร้อน ยีนควบคุม osmoregulation แมลงปากดูด ยีนเกี่ยวข้องกับการสื่อประสาทของแมลง ฯลฯ

3. ออกแบบโมเลกุลของ dsRNAs เพื่อทำการ knock down กลุ่มยีนของแมลงหวี่ขาวที่คัดเลือกไว้แล้วสังเคราะห์ dsRNA ชนิดต่าง ๆ อย่างน้อย 10 ชนิด ได้แก่ กลุ่มยีนที่เกียวข้องกับระบบทางเดินอาหาร และระบบประสาทของแมลง เช่น neurotransmission , osmoregulation, thermal tolerance, sugar metabolism and transport, ferritin Btfer1, heat shock protein 70/90 (HSP70/90), cyclophilin B เป็นต้น ในแต่ละยีนอาจมีการเรียงลำดับของโมเลกุลต่างกัน

- สกัดอาร์เอ็นเอของแมลงหวี่ขาวยาสูบโดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป
- เปลี่ยนให้เป็นดีเอ็นเอโดยใช้ เทคนิค RT-PCR
- โคลนชิ้นส่วน cDNA ที่ได้เข้าสู่เวคเตอร์และเพิ่มปริมาณใน *E. coli*
- นำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบข้อมูลยีนในฐานข้อมูล GenBank เพื่อคัดเลือกยีนที่ต้องการ
- ออกแบบโมเลกุลของ dsRNAs ให้ตรงข้ามกับข้อมูลยีนที่อ่านโดยให้มีขนาดของสายดีเอ็นเอยาว 80-500 นิวคลีโอไทด์ แล้วสังเคราะห์ยีนที่ต้องการ ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด DNA purification kit วัดปริมาณที่ได้ด้วย spectrophotometer เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- เพิ่มปริมาณ dsRNAs ด้วยการถ่ายเข้าสู่เวคเตอร์ และเพาะเลี้ยงในเซลล์แบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณ

<u>การทดสอบ Bioassay</u>

1. การบำรุงรักษาประชากรแมลงหวี่ขาวต่อเนื่องเพื่อเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวยาสูบในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ใน

- เพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือนด้วยอาหารธรรมชาติคือต้นมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่แมลงหวี่ขาวชอบเช่น CMR89 หรือพันธุ์อื่นที่มียอดสีขาวหรือมันสำปะหลังพันธุ์ 5 นาที โดยมีอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ความชื้น 60-70 % ให้แสง 14:10 ช่วงความสว่างและมืด ขยายประชากรแมลงหวี่ขาวให้ได้จำนวนเพียงพอกับการทดลองอย่างน้อย 1,000 ตัวต่อรุ่น

2. ทดสอบประสิทธิภาพของ dsRNA ที่สังเคราะห์ กับแมลงหวี่ขาวยาสูบ เพื่อคัดเลือกแบบของโมเลกุลที่มีศักยภาพในการกำจัดแมลง

- สร้างกรงเลี้ยงแมลงหวี่ขาวให้มีขนาดเหมาะสมกับพืชอาหารคือต้นพันธุ์มันสำปะหลังขนาดเล็กในกระถางขนาด 6 นิ้วที่เพาะไว้จนมีอายุ 1 เดือนและมียอดอย่างน้อย 5 ใบ
- นำ โมเลกุลของ ds RNAs ไปฉีดพ่นบนใบพืชหรือแหล่งอาหารเพื่อเลี้ยงแมลงหวี่ขาวในห้องปฏิบัติการที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ตามชนิดของ dsRNAs ที่ออกแบบไว้จำนวน 10 ชนิด
- ศึกษาอัตราการอยู่รอดของแมลง ลักษณะการเจริญเติบโตของแมลง ความผิดปกติที่ปรากฏ การออกไข่ การลอกคราบ การเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย และระยะวงจรชีวิตของแมลงหวี่ขาวยาสูบ

ศรีวิชาการเกษตร

3. ศึกษาการแสดงออกของยีนเป้าหมายในแมลงหวี่ขาวด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล qPCR

- เก็บตัวอย่างแมลงหวี่ขาวยาสูบที่ได้รับโมเลกุลของ dsRNAs นำไปแช่ที่ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งเมตาโบลิซึมของแมลงหวี่ขาว แล้วเก็บไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

- สกัด อาร์เอ็นเอ ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูปและเปลี่ยนเป็น cDNA แล้ววัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้

- นำ cDNA ไปตรวจวิเคราะห์ด้วย เทคนิค qPCR โดยใช้โพรบและไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะแต่ละยีน

- วิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ปรากฏเมื่อแมลงหวี่ขาวได้รับโมเลกุลของ dsRNAs ที่สังเคราะห์

กิจกรรมที่ 3 การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างมันสำปะหลังอย่างรวดเร็วภาคสนาม

การทดลองที่ 3.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างมันสำปะหลังภาคสนามโดยใช้เทคนิค Loop mediated isothermal amplification-Lateral flow-Immunochromatographic strip (LAMP-LFICS) เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กและระดับภาคสนาม

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ต้น/ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังปกติ

1.2 ต้น/ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง

ออกแบบไพร์เมอร์จากส่วนอนุรักษ์ของ DNA A ของไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสใบด่างมันสำปะหลังจากฐานข้อมูล NCBI แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Rolling circle amplification (RCA) ด้วยชุด GE Healthcare illustra™ TempliPhi™ 100/500 Amplification Kit ดังนี้ เติมดีเอ็นเอต้นแบบลงในสารละลาย master mix แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 4-18 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ให้บริสุทธิ์แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

2. การออกแบบโพรบและไพรเมอร์ สำหรับเทคนิค LAMP และ RCA ที่ใช้กับ Lateral flow-Immunochromatographic strip

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสใบด่างมันสำปะหลังที่ได้การวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI แล้วมาออกแบบไพรเมอร์แบบเทคนิค นิวคลีอิกเอซิดเลเทอรัลโฟลว์ โดยออกแบบให้จำเพาะกับยีนเป้าหมาย คือ AC1(Rep) จำนวน 5 เส้น ในช่วงความยาว 150-300 เบส จากนั้นติดโพรบ Digoxigenin และสารสีฟลูออร์เรสเซ็นต์ทางด้านปลาย 5’ และ 3’ ตามคำแนะนำหรือขั้นตอนของ Cambridge, UK

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสใบด่างมันสำปะหลังที่ได้มาออกแบบให้จำเพาะกับยีนเป้าหมาย คือ AC1(Rep) ใช้โปรแกรมการออกแบบไพร์เมอร์ LAMP โดยชุดไพรเมอร์จะประกอบด้วยไพรเมอร์ 2-3 คู่ ประกอบด้วย Displacement primers (outer primers), Lamp primers (inner primers) และ Loop primers โดยใช้โปรแกรมการ

ศรีนครินทรวิโรฒ

ออกแบบไพรเมอร์ Primer Explorer version 5 (http://primerexplorer.jp/e) ให้ได้ชุดไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบเชื้อ SLCMV ที่เป็นสาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลัง จำนวน 2 ชุด

3. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยาในเทคนิค LAMP เพื่อตรวจสอบโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจสอบเชื้อ SLCMV จาก 2 ปัจจัย ได้แก่ ชุดไพรเมอร์ และอุณหภูมิ โดยนำชุดไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุด มาทดสอบปฏิกิริยา LAMP ที่มีปริมาตรรวม 20 ul และประกอบด้วย 10X Bst polymerase buffer (NEB, UK), 0.4mM dNTPs, 10 uM primers (Incl. Displ primers, Lamp primers, Loop primers), 5M Betaine, *Bst* polymerase โดยใช้ดีเอ็นเอควบคุมเชิงบวกของเชื้อ SLCMV (Positive control) จากข้อที่ 1 ปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา ทดสอบอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา LAMP 6 ระดับ ดังนี้ อุณหภูมิ 60, 61, 62, 63, 64 และ 65 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 กรรมวิธี (ชุดไพรเมอร์) กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ที่อุณหภูมิ 60, 61, 62, 63, 64 และ 65 องศาเซลเซียส การอ่านและบันทึกผลของปฏิกิริยา LAMP เพื่อยืนยันผล โดยการตรวจดูแถบดีเอ็นเอ บน 2% agarose electrophoresis โดยทำการทดสอบอุณหภูมิละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 2 หลอดปฏิกิริยา

4. การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายและรวดเร็วต่อเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง

นำเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลังที่เป็นโรคดังนี้ ชิ้นส่วนใบจากต้นที่เป็นโรคเนื้อเยื่อต้นพันธุ์ที่เป็นโรค น้ำจากท่อลำเลียงและเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นโรค นำมาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นด้วยวิธีต่าง ๆดังต่อไปนี้

4.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB

ทำการดีเอ็นเอรวมจากมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่างมันสำปะหลังไว้เป็นต้นแบบด้วยวิธี 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 ชั่งใบมันสำปะหลัง 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 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

4.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการสกัดอย่างง่าย

ทดสอบการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อมันสำปะหลังด้วยบัปเฟอร์อย่างง่าย

4.3 การสกัดด้วยการตีชิ้นส่วนมันสำปะหลังด้วยเม็ดลูกเหล็ก

ทดสอบการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อมันสำปะหลังด้วยการตีชิ้นส่วนมันสำปะหลังด้วยเม็ดลูกเหล็ก

4.4 การสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้แผ่น filter paper

ทดสอบการสกัดดีเอ็นเอจากใบ และท่อนพันธุ์มันสำปะหลังด้วยการใช้แผ่น filter paper นำดีเอ็นเอที่ได้มาใช้ทดสอบการเกิดสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา PCR (Inhibitor) ต่อเทคนิค LAMP และ เทคนิค LFICS เปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 4 วิธี โดยทำการสกัดวิธีละ 10 ซ้ำ ๆ ละ 2 ตัวอย่าง บันทึกผลความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีการที่แตกต่างกัน

5. การศึกษารูปแบบเทมเพลทที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเชื้อ SLCMV ที่เป็นสาเหตุโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง

ทดสอบหาต้นแบบเทมเพลทที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP และ เทคนิค RCA ในการตรวจสอบเชื้อ SLCMV โดยมีต้นแบบเทมเพลททั้งหมด 5 ชนิด ดังต่อไปนี้ 1. ดีเอ็นเอ 2. ชิ้นส่วนใบจากต้นที่เป็นโรค 3. เนื้อเยื่อต้นพันธุ์ที่เป็นโรค 4.น้ำจากท่อลำเลียง 5.เนื้อเยื่อส่วนที่เป็นโรค นำมาทดสอบปฏิกิริยา LAMP ที่มีปริมาตรรวม 20 ul และประกอบด้วย 10X Bst polymerase buffer (NEB, UK), 0.4mM dNTPs, 10 uM primers (Incl. Displ primers, Lamp primers, Loop primers), 5M Betaine, *Bst* polymerase โดยใช้ดีเอ็นเอควบคุมเชิงบวกของเชื้อ SLCMV (Positive control) จากข้อที่ 1 ปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา ใช้สภาวะที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 3 วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 ต้นแบบ (เทมเพลท) ต้นแบบละ 10 ซ้ำ ที่การอ่านและบันทึกผลของปฏิกิริยา LAMP เพื่อยืนยันผล โดยการตรวจสอบปฏิกิริยาดังนี้ การเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาเมื่อการเติมสาร SyBR GreenI (Sigma) และตรวจดูแถบดีเอ็นเอ บน 2% agarose electrophoresis โดยให้คะแนนการตรวจพบปฏิกิริยาเป็น 1 คะแนน ตรวจไม่พบปฏิกิริยาให้คะแนนเป็น 0 คะแนน ทำการบันทึกผลการเกิดปฏิกิริยาแต่ละซ้ำและนำมาเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของการเกิดปฏิกิริยาที่ได้จากเทมเพลทที่แตกต่างกัน

การทดลองที่ 3.2 การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างมันสำปะหลังอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค Immunochromatographic strip (ICS) เพื่อเกษตรกร

<u>วิธีปฏิบัติการทดลอง</u>

1. การเตรียมแอนติเจน

1.1 โคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase ของไวรัส CMD เพื่อโคลนยีนเข้ากับ expression vector

แยกสกัดไวรัส SLCMD ในใบมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง โดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA) ตามวิธีการในคู่มือของบริษัท จากนั้นนำไวรัส SLCMD ที่ได้มาเพิ่มชิ้นส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ยีน replicase ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) 1X GoTaq®

Colorless Master Mix *(Promega, USA)* และ ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนของไวรัส SLCMD จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) 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) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และนำผลผลิตจาก PCR โคลนเข้ากับ พลาสมิด pQE80L นำดีเอ็นเอถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation เริ่มจากการนำแบคทีเรียที่อยู่ในสภาพพร้อมรับดีเอ็นเอ (competent cell) แช่ในน้ำแข็งจนกระทั่งละลายประมาณ 2 ใน 3 ส่วน เติมสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อแล้วจำนวน 5 ไมโครลิตร ผสมลงในสารแขวนลอยแบคทีเรีย บ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหาร LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ปั่นตกตะกอนแล้วทิ้งส่วนน้ำใส 700 ไมโครลิตร ละลายเชื้อแบคทีเรียนำไปเกลี่ยบนอาหาร LB ที่มี ampicilin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16-20 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารมาตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นยีนอยู่โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด TIANprep Rapid Mini Plasmid Kit (Fermentas, China) และตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่ได้ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล วิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของชิ้นยีนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BLAST (Basic Alignment Search Tool)

บันทึกข้อมูล แถบดีเอ็นเอแสดงขนาดของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase ของไวรัส CMD

1.2 เพิ่มปริมาณโปรตีนโดยเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีเวคเตอร์ลูกผสม ในอาหารที่เติม IPTG

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่ผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาพ และโปรตีน replicase ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2YT ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายลงในอาหารเหลว 2YT ที่ผสม ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อต่อจนเซลล์เจริญ มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 เติม Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 – 1.0 mM เลี้ยงเชื้อต่อเป็นเวลาอย่างน้อย 6-8 ชั่วโมง แยกตะกอนเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย purification buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 8.0) ในอัตราส่วนบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตรต่อตะกอนเซลล์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 25 มิลลิลิตร เติม lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มบนน้ำแข็ง นาน 30 นาที ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี freeze-thaw แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใส (crude extract) ที่มีโปรตีนมาวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาพ และโปรตีน replicase ที่ได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ใช้ 8 เปอร์เซ็นต์ *อะคลีลาไมด์เจล*ใน Tris-glycine buffer (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM Glycine, 0.1% SDS) โดยใช้ความต่าง

กรมวิชาการเกษตร

ศักย์คงที่ 120 โวลต์ ระยะเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลานำมาย้อมสีด้วยสารละลาย Coomassie blue (Fermentas, USA)

บันทึกข้อมูล แถบโปรตีนแสดงขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และโปรตีน replicase ของไวรัส CMD

1.3 สกัดโปรตีนค่อนข้างบริสุทธิ์โดยวิธี affinity column chromatograph

นำ crude extract ที่สกัดได้จากข้อ 1.2 มาผ่านคอลัมน์ nickel nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 6.3) ปริมาตร 10-20 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 4.5) เพื่อชะ (elute) โปรตีนห่อหุ้มอนุภาพ และโปรตีน replicase ออกจากคอลัมน์ เก็บสารละลายโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาเป็นส่วนๆ ส่วนละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 10-20 ส่วน แล้วนำไปหาค่าความเข้มข้นโปรตีนด้วย การวัดค่า OD_{280} และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ rCry1Ab ด้วยวิธี SDS-PAGE ใน 8 เปอร์เซ็นต์ อะคลีลาไมด์เจล

บันทึกข้อมูล แถบโปรตีนแสดงขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และโปรตีน replicase ของไวรัส CMD ที่ผ่านการสกัดบริสุทธิ์แล้ว

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 การเพิ่มศักยภาพการผลิตสารสำคัญให้ปลอดภัยจากสารปนเปื้อนในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาการผลิตขมิ้นชันหัวจิ๋ว และชักนำการสะสมสารสำคัญในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองที่ 1.1 เทคนิคการผลิตขมิ้นชันหัวจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ

<u>สิ่งที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. ต้นขมิ้นชันหรือเหง้าขมิ้นชัน
2. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS), Phytagel, น้ำตาล sucrose, น้ำตาล manitol
3. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น คีมคีบ (forcept), มีดผ่าตัด, จานเพาะเลี้ยง (Petri dish), หลอด LED สีต่างๆ
4. สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) , 4-amino-3,5,6-trichloror-2-pyridineccarboxylic acid (picloram), 1-Naphthaleneacetic acid (NAA), 6-Benzylaminopurine (BA)
5. สารชะลอการเจริญเติบโต pacloburazol , uniconazole

<u>แบบและวิธีการทดลอง</u>

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี จำนวน 10 ซ้ำ/กรรมวิธี ดังนี้

<u>วิธีปฏิบัติการทดลอง</u>

นำเหง้าขมิ้นชันจากแปลงปลูกมาเพาะเลี้ยงในตะกร้าพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกดินเผาซึ่งสามารถดูดความชื้นเพื่อให้เหง้าสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ และลดการปนเปื้อนเชื้อจากดิน การเกิดของยอดขมิ้นชันใน

ศรีวิชาการเกษตร

โรงเรือนใช้ระยะเวลา 3-4 เดือน จะได้ต้นขมิ้นชันที่มีความสูงประมาณ 10 เซนติเมตร นำต้นที่ได้เข้าสู่ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไป

1. ศึกษาสภาพและความเข้มข้นของสูตรอาหารหลักต่อการสร้างเหง้าจิ๋วของขมิ้นชัน

นำส่วนตายอดหรือตาข้างของขมิ้นชันที่ผ่านขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อมาเลี้ยงทดสอบสูตรอาหารหลัก MS ที่มีความเข้มข้นและสภาพอาหารต่างๆ ประกอบด้วย

1) สูตรอาหาร MS ความเข้มข้น 1 เท่า สภาพอาหารแข็ง (control)
2) สูตรอาหาร MS ความเข้มข้น 1 เท่า สภาพอาหารเหลว
3) สูตรอาหาร MS ความเข้มข้น ½ เท่า สภาพอาหารเหลว
4) สูตรอาหาร MS ความเข้มข้น ½ เท่า สภาพอาหารแข็ง

การบันทึกผล น้ำหนักสด,ความสูงต้น, จำนวนราก ความยาวราก และการเกิดเหง้าจิ๋ว

การทดลองที่ 1.2 การชักนำให้ขมิ้นชันหัวจิ๋วสะสมสารสำคัญในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสะสมสารสำคัญในเหง้าจิ๋วของขมิ้นชัน โดยนำต้นขมิ้นชันที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ มาทดสอบเลี้ยงบนอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาการสะสมของสารสำคัญในขมิ้นชัน ดังนี้

1) สูตรอาหาร MS (Control)
2) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA 3 mg/l
3) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA 5 mg/l
4) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ Methyl jasmonate 3 mg/l
5) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ Methyl jasmonate 5 mg/l
6) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ Salicylic acid 3 mg/l
7) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ Salicylic acid 5 mg/l

การบันทึกผล น้ำหนักสด, น้ำหนักแห้งของเหง้าจิ๋ว และปริมาณสารสำคัญ ตรวจสอบสารปนเปื้อน

กิจกรรมที่ 2 เทคนิคการผลิตโปรโตคอร์มจากกล้วยไม้สกุลหวายในระบบไบโอรีแอคเตอร์และชักนำการสะสมสารสำคัญมอสคาติลิน

การทดลองที่ 2.1 เทคนิคการผลิตโปรโตคอร์มจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย

<u>สิ่งที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. ต้นกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล / หน่ออ่อนของกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล

2. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS), สูตรอาหาร Vacin and Went (VW), Phytagel, น้ำตาล sucrose

3. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น คีมคีบ (forcept), มีดผ่าตัด, จานเพาะเลี้ยง (Petri dish), ชุด Bioreactor, filter, สายซิลิโคน

ศรีวิชัยการเกษตร

4. สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น 6-Benzylaminopurine (BA), Thidiazuron (TDZ)

<u>แบบและวิธีการทดลอง</u>

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี จำนวน 8 ซ้ำ/กรรมวิธี ดังนี้

<u>วิธีปฏิบัติการทดลอง</u>

นำหน่ออ่อนของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุล มาผ่านขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อโดยการใช้ชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของหน่ออ่อน นำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างมาเลี้ยงทดสอบบนสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเกิด protocorm-like bodies (plbs) ในระบบ Bioreactor

ศึกษาสูตรอาหารร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ plbs ในระบบ Bioreactor โดยการนำหน่ออ่อนของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายมาฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้ชิ้นส่วนตายอดและตาข้าง มาชักนำให้เกิด protocorm-like bodies (plbs) ในสูตรอาหารเหลวจำนวน 4 สูตรอาหาร ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด ดังนี้

1) สูตรอาหาร VW (control)
2) สูตรอาหาร VW ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L
3) สูตรอาหาร VW ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 mg/L
4) สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L
5) สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 mg/L
6) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L
7) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 mg/L

บันทึกผล จำนวนของ plbs น้ำหนักสดของ plbs ลักษณะของ plbs พร้อมบันทึกภาพ

การทดลองที่ 2.2 การชักนำการสะสมสารสำคัญมอสคาติลินในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายในระบบ Bioreactor

<u>สิ่งที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. ต้นกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล/หน่ออ่อนของกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล
2. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS), สูตรอาหาร Vacin and Went (VW), Phytagel, น้ำตาล sucrose
3. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น คีมคีบ (forcept), มีดผ่าตัด, จานเพาะเลี้ยง (Petri dish), ชุด Bioreactor, filter, สายซิลิโคน
4. สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น 6-Benzylaminopurine (BA), Thidiazuron (TDZ), Methy jasmonate (MeJA), Salicylic acid (SA)

กรมวิชาการเกษตร

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี จำนวน 8 ซ้ำ/กรรมวิธี ดังนี้

วิธีปฏิบัติการทดลอง

นำ plbs ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุล มาเลี้ยงทดสอบบนสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณ plbs ในระบบ Bioreactor ร่วมกับการใช้สิ่งกระตุ้น (elicitor) เพื่อชักนำให้เกิดปริมาณสาร Moscatilin ที่สูงขึ้น

1. ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบต่อการเพิ่มปริมาณสาร Moscatilin

นำ plbs ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่ผลิตได้จากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงทดสอบเพื่อเพิ่มปริมาณสาร Moscatilin โดยมีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ Salicylic acid (SA) และ Methyl jasmonate (MeJA) ที่ความเข้มข้น 50 75 และ 100 µM ประกอบด้วย

1) สูตรอาหาร ½ MS (control)
2) สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ Salicylic acid ความเข้มข้น 50 µM
3) สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ Salicylic acid ความเข้มข้น 75 µM
4) สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ Salicylic acid ความเข้มข้น 100 µM
5) สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ Methyl jasmonate ความเข้มข้น 50 µM
6) สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ Methyl jasmonate ความเข้มข้น 75 µM
7) สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ Methyl jasmonate ความเข้มข้น 100 µM

นำ plbs ไปตรวจสอบปริมาณสาร Moscatilin ด้วยชุดตรวจสอบ / HPLC

การบันทึกผล น้ำหนักสดของ plbs น้ำหนักแห้งของ plbs ลักษณะของ plbs พร้อมบันทึกภาพ ปริมาณสาร Moscatilin

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 การพัฒนาชุดตรวจสอบสารปนเปื้อนทางการเกษตรอย่างรวดเร็วเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชปลอดภัย

กิจกรรมที่ 1 วิจัยและพัฒนาชุดตรวจโลหะหนักที่ตกค้างในขมิ้นชันและไพล

การทดลองที่ 1.1 การพัฒนาชุดตรวจแคดเมียมและตะกั่วในขมิ้นชันและไพล

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. สารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียม
2. สารมาตรฐานโลหะหนักตะกั่ว
3. Vivaspin 500 (GE Healthcare, Sweden)

แบบและวิธีการทดลอง

แผนการทดลอง : การทดลองนี้ไม่ได้ใช้แผนการทดลองทางสถิติ

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การผลิตดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว

1.1 การเตรียมคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ (DNA aptamer library)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (DNA aptamer) ขนาด 86 นิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5’-AAAGAATTCAAGCTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-(N40)-TCGGATCCGCTATAGTGAGTCGTATTA-3’ ซึ่งประกอบ ด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์ (N40) อยู่บริเวณกลางของ DNA aptamer ส่วนบริเวณด้านข้าง ทั้งสองด้านเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ โดยวิธี PCR ดังนี้ forward primer (AptF), 5'-TTTCTGCAGGTCGACTAATACGACTCACTATAGCGGA-3'; reverse primer (AptR),5'-AAAGAATTCAAGCTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-3' เมอร์ และสังเคราะห์ไพรเมอร์ AptR –Biotin [(biotin)-5- AAAGAATTCAAGCTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-3] สำหรับติด biotin ที่ปลาย 5’ ของ DNA aptamer

บันทึกผลขนาดและปริมาณคลังของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์

1.2. การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว

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 จากนั้นเติมโลหะหนักแคดเมียม และตะกั่ว 10 ppm 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 หมุนเหวี่ยงเช่นเดิม เป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง ละลาย aptamer- Cd/Pb complex ออกจากคอลัมน์ ด้วย PBST ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำ aptamer-Cd/Pb complex ไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USA) และไพรเมอร์ AptF และ AptR มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ดังนี้ 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) นำดีเอ็นเอที่เพิ่ม

ลิขสิทธิ์กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสบน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ทำการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่วจำนวน 10 รอบ

บันทึกผลแถบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว

1.3. การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว

ขั้นตอนนี้จะเป็นกำจัดดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ไม่จำเพาะต่อโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว กระทำเช่นเดียวกับข้อ 1.2 โดยเติมโลหะอื่นๆ ได้แก่ As Cu Cr Mn Ni Sn Zn Hg และ Se จากนั้นเก็บดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ไม่จับกับโลหะหนักชนิดอื่นๆ ไปเพิ่มปริมาณและคัดเลือกอีก 4 รอบ

บันทึกผลแถบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว

1.4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว

นำผลผลิตจาก PCR จากข้อ 1.3 โคลนเข้ากับ pGEM®-T Vector (Promega, USA) และถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร 2YT ที่เติม ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดโดยเทคนิค colony PCR ทำโดยใช้โคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารเป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ AptF และ AptR จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวจำนวน 10 โคลน นำมาติด biotin ที่ปลาย 5' (DNA aptamer-biotin) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ AptR–Biotin ในการทำปฏิกิริยา และแยกให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วย Dynabeads® M-280 Streptavidin (Invitrogen, Norway) ตามวิธีการของผู้ผลิต

บันทึกผลจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่วสอดแทรกอยู่ในพลาสมิด

1.5. การทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อกับโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่วด้วยเทคนิค enzyme-linked aptamer assay (ELAA)

นำ DNA Aptamer ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว จำนวน 10 โคลน จากข้อ 1.4 ไปทดสอบด้วยวิธี indirect ELAA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Barthelmebse et al (2011) โดยใช้โลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว เคลือบลงในหลุมของถาด ELISA ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติม DNA aptamer ที่ติด biotin แล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างถาด ELISA ด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที HRP-Streptavidin Conjugate (Invitrogen,USA) เจือจาง 1:1,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างถาด ELISA และเติม substrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นของสีที่ได้ด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร (OD620)

บันทึกผล ค่าความเข้มของสีที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร ของปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และโลหะหนัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิจกรรมที่ 2 วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในพืชผัก

การทดลองที่ 2.1 การพัฒนาชุดตรวจสารคาร์บาริลและไซเพอร์เมทรินในพืชผัก

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. สารมาตรฐานสารกำจัดแมลงศัตรูพืชคาร์บาริล (carbaryl)
2. สารมาตรฐานสารกำจัดแมลงศัตรูพืช ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin)
3. Vivaspin 500 (GE Healthcare, Sweden)

แบบและวิธีการทดลอง

แผนการทดลอง : การทดลองนี้ไม่ได้ใช้แผนการทดลองทางสถิติ

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การผลิตดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารกำจัดแมลงศัตรูพืช

1.1 การเตรียมคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ (DNA aptamer library)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (DNA aptamer) ขนาด 86 นิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5'-AAAGAA TTCAAGCTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-(N40)-TCGGATCCGCTATAGTGAGTCGTATTA-3' ซึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์ (N40) อยู่บริเวณกลางของ DNA aptamer ส่วนบริเวณด้านข้าง ทั้งสองด้านเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ โดยวิธี PCR ดังนี้ forward primer (AptF), 5'-TTTCTGCAGGTCGACTAATACGACTCACTATAGCGGA-3'; reverse primer (AptR), 5'-AAAGAATTCAAG CTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-3' เมอร์ และสังเคราะห์ไพรเมอร์ AptR –Biotin [(biotin)-5- AAAGAATTCA AGCTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-3] สำหรับติด biotin ที่ปลาย 5' ของ DNA aptamer

บันทึกผลขนาดและปริมาณคลังของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์

1.2. การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารกำจัดแมลงศัตรูพืช

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 จากนั้นเติมสารกำจัดแมลงศัตรูพืช [คาร์บาริล (carbaryl) และ ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin)] 10 ppm 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 หมุนเหวี่ยงเช่นเดิม เป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง ละลาย aptamer- Carbaryl/Cypermethrin complex ออกจากคอลัมน์ ด้วย PBST ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำ aptamer- Carbaryl/Cypermethrin 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 ตรวจสอบ

ศรีนวชการเกษตร

ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสบน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ทำการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารกำจัดแมลงศัตรูพืช [คาร์บาริล (carbaryl) และ ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin)] จำนวน 10 รอบ

บันทึกผลแถบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารป้องกันกำจัดแมลงคาร์บาริลและไซเพอร์เมทริน

1.3. การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสารกำจัดแมลงศัตรูพืช

ขั้นตอนนี้จะเป็นกำจัดดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ไม่จำเพาะต่อสารกำจัดแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆ กระทำเช่นเดียวกับข้อ 1.2 โดยเติมสารกำจัดแมลงศัตรูพืชอื่นๆ ได้แก่ profenofos malathion methomyl carbosulfan เป็นต้น จากนั้นเก็บดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ไม่จับกับสารกำจัดแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆ ไปเพิ่มปริมาณและคัดเลือกอีก 4 รอบ

บันทึกผลแถบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารป้องกันกำจัดแมลงคาร์บาริลและไซเพอร์เมทริน

1.4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสารกำจัดแมลงศัตรูพืช

นำผลผลิตจาก PCR จากข้อ 1.3 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

บันทึกผลจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับคาร์บาริลและไซเพอร์เมทรินสอดแทรกอยู่ในพลาสมิด

1.5. การทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อกับสารกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยเทคนิค enzyme-linked aptamer assay (ELAA)

นำ DNA Aptamer ที่จับกับสารกำจัดแมลงศัตรูพืช [คาร์บาริล (carbaryl) และ ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin)] จำนวน 10 โคลน จากข้อ 1.4 ไปทดสอบด้วยวิธี indirect ELAA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Barthelmebse et al (2011) โดยใช้ สารกำจัดแมลงศัตรูพืช [คาร์บาริล (carbaryl) และ ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin)] เคลือบลงในหลุมของถาด ELISA ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติม DNA aptamer ที่ติด biotin แล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างถาด ELISA ด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที HRP-Streptavidin Conjugate (Invitrogen,USA) เจือจาง 1:1,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างถาด ELISA และเติม substrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นของสีที่ได้ด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร (OD620)

บันทึกผล ค่าความเข้มของสีที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร ของปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และสารกำจัดแมลงศัตรูพืช [คาร์บาริล (carbaryl) และ ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin)]

ศูนย์วิทยทรัพยากร

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำเพื่อผลิตพืชปลอดภัยและยั่งยืน

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนามะละกอต้านทานไวรัสจุดวงแหวนด้วยเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ

การทดลองที่ 1.1 พัฒนาระบบกระตุ้นการกลายของยีนแบบแม่นยำด้วยเทคนิค CRISPR/Cas

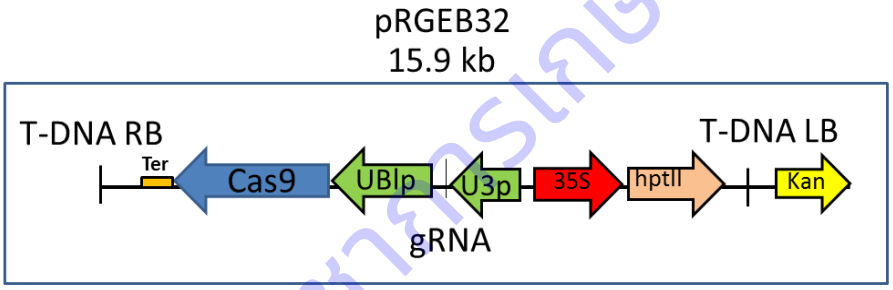
1. การสร้างชุดยีน CRISPR/CAS เพื่อกระตุ้นการกลายพันธุ์แบบจำเพาะเจาะจง

1.1 การคัดเลือกส่วนของยีนบนจีโนมของเอนไซม์

สืบค้นข้อมูลจีโนมของกัญชาในส่วนของยีน eIF4E จากฐานข้อมูล NCBI ดำนินการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบยีนและทำการถอดรหัสสายพันธุกรรมด้วยเทคนิค Genome walking แล้วสกัดอาร์เอ็นเอ และสังเคราะห์ cDNA เพื่อโคลนยีน eIF4E เข้าสู่เวคเตอร์ pCAMBIA สำหรับเก็บไว้เป็นฐานข้อมูลยีนใน NCBI

1.2 การสังเคราะห์ตำแหน่ง sgRNA (Single guide RNA) เพื่อกระตุ้นการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ

นำสายรหัสของยีน eIF4E มาออกแบบตำแหน่ง sgRNA โดยโปรแกรม CRISPR-P 2.0 (Lei *et al*., 2014) จากนั้นสังเคราะห์ sgRNA และนำไป Ligate เข้าสู่พลาสมิดชนิด pRGEB32 ซึ่งมียีน CAS สำหรับถ่ายเข้าสู่ E-coli และ *Agrobacterium* หรือนำไปใช้กับ Carbon nanotube หรือ การยิงอนุภาคต่อไป



ภาพที่ 2 พลาสมิดชนิด pRGEB32 ซึ่งมียีน CAS

1.3 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli*

เตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดย streak เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α บนอาหารแข็ง 2xYT บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วจึงนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าข้ามคืนบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อมานำเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนมาเติมลงในอาหารเหลว 2xYT ใหม่ปริมาตร 1% ของปริมาตรอาหารใหม่ (100 มิลลิลิตร) แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2 ชั่วโมง ให้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 จึงหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารเดิมทิ้งไป จากนั้นละลายตะกอนเซลล์อย่างเบา ๆ ด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็นปริมาตร 32 มิลลิลิตร และแช่เย็นไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลาย TB เดิมทิ้งไป ละลายตะกอนเซลล์อย่างเบา ๆ อีกครั้ง ด้วยสารละลาย TB แช่เย็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร เมื่อตะกอนเซลล์ละลายหมดเติม DMSO ปริมาตร 140 ไมโครลิตร

ศรีชาการเกษตร

ผสมให้เข้ากันเบาๆในที่เย็น แล้วแบ่ง competent cell ที่ได้ไว้ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

1.4 การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

ถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเติมพลาสมิดสายผสมปริมาตร 6 ไมโครลิตร ใน competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้ว heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นแช่น้ำแข็งทันทีนาน 3 นาที เอาออกมาเติมอาหารเหลว SOC ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำหลอดไปเขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออกมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง 2xYT แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เซลล์ที่พบทุกเซลล์จะมีชิ้นส่วนยีนของ *elF4E*

1.5 การสกัดพลาสมิดของดีเอ็นสายผสม (recombinant DNA)

ทำการคัดเลือกเซลล์ของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหารคัดเลือกแต่ละโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดโดยดัดแปลงวิธีการของ Sambrook และ Russell (2001) ดูดเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารทิ้งไป เติม TE buffer (10 mM Tris-HCl; (pH 8.0), 1 mM EDTA) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์ด้วยการ vortex เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที จากนั้นเติม lysis buffer (0.2 mM NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นและลงเบาๆ เติม precipitation buffer (5 M potassium acetate, 96% acitic acid) ปริมาตร 225 ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นและลงเบาๆ แช่น้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเติม isopropanol ปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตรส่วนใส (500 ไมโครลิตร) พลิกหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นและลง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนของพลาสมิดด้วยน้ำที่เติม RNase A ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความถูกต้องด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของพลาสมิดสายผสม

2. การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมะละกอ

นำเมล็ดมะละกอ มาล้างทำความสะอาดโยผ่านน้ำไหล แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ที่มีความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เติมทวีน 20 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที 2 ครั้ง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณยอดและกระตุ้นการพัฒนาแคลลัส

กรมวิทยาศาสตร์

3. สำหรับการถ่ายฝากเวคเตอร์มี 2 วิธีหลักคือ การถ่ายฝากเวคเตอร์ผ่านพาหะ และการถ่ายฝากเวคเตอร์โดยตรง ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่าง ทั้งนี้จึงมีความจำเป็นที่ต้องทำการทดสอบระบบพาหะสำหรับการถ่ายฝากเวคเตอร์ก่อนจะกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ

3.1 การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

3.1.1 การเตรียมเชื้อ *A. tumefaciens* เพื่อใช้ในการถ่ายยีน

Streak เชื้อ *A. tumefaciens* บนอาหารแข็ง LB ที่เติม kanamycin 50 มก./ล. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืดนาน 16 ชม. เขี่ยเชื้อที่โคโลนีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร ลงเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม kanamycin 50 มก./ล. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารแขวนลอยเชื้อจากข้อ 2) ปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มล. เติม kanamycin 50 มก./ล. และ acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลาประมาณ 12 - 14 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออกให้หมดนำตะกอนเซลล์มาละลายในอาหารเหลว MS ปริมาตร 50 มล. และ acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์

3.1.2 การเตรียมเนื้อเยื่อพืชตัดชิ้นส่วนใบจริงของพืช ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 10 เพลต ๆ ละ 10 ชิ้น เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS นานข้ามคืน

3.1.3 ขั้นตอนการถ่ายยีน

ปลูกเชื้อ (inoculation) โดยนำชิ้นส่วนพืชมาเลี้ยงในสารแขวนลอยเชื้อที่เตรียมไว้ (เชื้อที่ถูกกระตุ้นด้วย acetosyringone แล้ว) โดยทำบาดแผล 2 วิธี

1.1) sonication เป็นเวลา 0 และ 30 วินาที

1.2) ใช้เข็มจิ้มเป็นจำนวน 10 ครั้ง

เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช (หลังการทำบาดแผล) ร่วมกับสารแขวนลอยเชื้อเป็นเวลา 30 นาที บนเครื่องเขย่าในสภาพมืด ซับเชื้อส่วนเกินบนกระดาษซับที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นย้ายชิ้นส่วนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และ BA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. เพาะเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 2 วัน เพื่อเป็นการเลี้ยงร่วมกัน (co-cultivation) กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม โดยการล้างด้วยอาหารเหลวสูตร MS ประมาณ 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime 300 มก/ล เป็นเวลา 10 นาทีจำนวน 2 ครั้ง นำชิ้นส่วนพืชจำนวนครึ่งหนึ่งออกไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยเทคนิค *gus* histochemical assay โดยชิ้นส่วนพืชอีกจำนวนหนึ่งนำไปคัดเลือกและกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม บนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มก./ล. และ glyphosate 0.5 mM เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์(อาหารที่ใช้เป็นอาหารแข็ง 5 มิลลิลิตร ที่เติมอาหารเหลว 3 มิลลิลิตรทับด้านบนในขวด 4 ออนซ์) (อาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และ BA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล.) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีน (หลังการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือก) บนอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

3.2 การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (Particle Bombardment)

3.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมาย (Pretreatment)

1) ตัดชิ้นส่วนใบพืชขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 10 เพลต ๆ ละ 10 ชิ้น เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว MS ที่มี Manitol 1 เปอร์เซ็นต์ นานข้ามคืน นำเนื้อเยื่อมาวางเรียงบริเวณกลางเพลต บนกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3.2.2 การเตรียมอนุภาคทังสเตนที่เคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ

ทำความสะอาดอนุภาคทังสเตน โดยชั่งอนุภาคทังสเตนขนาด 1 ไมโครเมตร ปริมาณ 0.015 กรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ล้างด้วยเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ vortex เป็นเวลา 2 นาที ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนการล้างด้วยเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง

ละลายตะกอนในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 50 ไมโครลิตร (ขั้นตอนนี้สามารถเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้นาน 2-3 สัปดาห์) เมื่อจะนำไปใช้ นำทังสเตนที่ผสมในกลีเซอรอลปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมด้วยสิ่งต่าง ๆ ต่อไปนี้ ตามลำดับ (จะต้องทำอย่างรวดเร็ว และ vortex ตลอดเวลา)

นำเวคเตอร์ 5.0 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นของ DNA เท่ากับ 1ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) และ $CaCl_2.2H_2O$ 50 ไมโครลิตร (stock 2.5 M) Spermidine 20 ไมโครลิตร (stock 0.1 M; ใช้ Spermidine free base ผสมน้ำแล้วกรอง ควรเตรียมใหม่เสมอ ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 เดือน แม้ว่าเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสแล้วก็ตาม) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งนาน 10 นาที โดยเขย่าหลอดเบา ๆ เป็นระยะๆ ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอน ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างด้วยเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอน ดูดเอธานอลส่วนบนออก แล้วละลายตะกอนด้วยเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งอนุภาคนี้สามารถนำไปใช้ในการยิงได้อย่างน้อย 4 ตัวอย่าง

การทดลองที่ 1.2 พัฒนาการชักนำต้นและการขยายพันธุ์มะละกอด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนที่ 1 เพาะเมล็ดมะละกอในสภาพปลอดเชื้อ

นำเมล็ดมะละกอ มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด โดยการแช่ในสารละลายคลอร็อกความเข้มข้น 10-20 เปอร์เซ็นต์ เติม tween20 หรือสารลดแรงตึงผิว 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาดผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที นำเมล็ดไปวางอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต วางไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส ในที่มืดประมาณ 15-20 วัน เมล็ดจะเริ่มงอกเป็นต้นกล้า

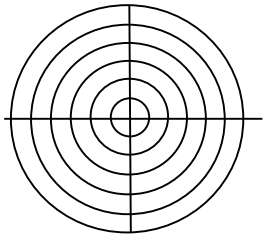
กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาเนื้อเยื่อก่อนและหลังเพื่อการถ่ายยีนแบบยิงอนุภาค

นำเนื้อเยื่อส่วนที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 ทำการฟอกฆ่าเชื้อ และนำมาศึกษาปัจจัยดังต่อไปนี้

1. ระยะห่างของการยิงของอนุภาค

เตรียมเพลตที่ปิดทับด้วยกระดาษกรองที่มีการตีเส้น (ดังภาพ) ทำการยิงอนุภาคด้วยเครื่องยิงแบบ PDS-1000/He (BioRad gun) ที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 650 psi วางเพลตวุ้นที่เตรียมไว้ที่ระยะห่างระหว่างแท่นยิงกับเพลตที่ระยะ 3 6 และ 9 ซม. ทำการยิงอนุภาคที่ระยะห่างแตกต่างกัน บันทึกผลการกระจายตัวของอนุภาคที่ระยะแตกต่างกันโดยศึกษารัศมีของการกระจายของอนุภาคทังสเตนร่วมด้วย



2. รัศมีของการยิงของอนุภาค

เตรียมเพลตที่มีวุ้น 8% ปริมาตร 40 มล. ทำการยิงอนุภาคด้วยเครื่องยิงแบบ PDS-1000/He (BioRad gun) ที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 psi โดยวางเพลตที่ระยะห่างระหว่างแท่นยิงกับเพลตที่ระยะ ระยะ 3 6 และ 9 ซม. ทำการยิงอนุภาคที่ระยะห่างแตกต่างกันบันทึกผลระยะทางที่อนุภาคเคลื่อนที่จากด้านบนแล้วทำการตัดวุ้นเพื่อดูระยะลึกภายใต้กล้อง

3. จำนวนเนื้อเยื่อต่อการยิง 1 ครั้ง

ตัดชิ้นส่วนใบจริงของพืช ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร (ดังภาพ) จำนวนเพลต ๆ ละ 5 10 และ 20 ชิ้น จำนวนอย่างละ 5 เพลต เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว MS บนเครื่องเขย่าข้ามคืน แล้ว นำเนื้อเยื่อมาวางเรียงบริเวณกลางเพลต บนกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ศึกษาเนื้อเยื่อที่ผ่านการยิงและหาจำนวนเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการยิง 1 ครั้ง

4. ศึกษาความเข้มข้นของทังสเตนสำหรับการยิงอนุภาคต่อเนื้อเยื่อ

ทำความสะอาดอนุภาคทังสเตนโดยชั่งอนุภาคทังสเตนขนาด 1.0 ไมโครเมตร ปริมาณ 0.015 กรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ล้างออกด้วยเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันโดยการใช้ vortex เป็นเวลา 2 นาที ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้งทำซ้ำขั้นตอนการล้างด้วยเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง ละลาย

กรมวิชาการเกษตร

ตะกอนในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ หลอดละ 50 ไมโครลิตร เมื่อจะนำไปใช้ นำทังสเตนที่ผสมในกลีเซอรอลปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมด้วยสิ่งต่าง ๆ ต่อไปนี้ ตามลำดับ ดีเอ็นเอ 5.0 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นของ stock เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) $CaCl_2.2H_2O$ 50 ไมโครลิตร (stock 2.5 M) Spermidine 20 ไมโครลิตร (stock 0.1 M; ใช้ Spermidinefree base ผสมน้ำแล้วกรอง ควรเตรียมใหม่เสมอ ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 เดือน แม้ว่าเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสแล้วก็ตาม) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งนาน 10 นาที โดยเขย่าหลอดเบา ๆ เป็นระยะๆ ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอน ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างด้วยเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอน ดูดเอธานอลส่วนบนออก แล้วละลายตะกอนด้วยเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการเข้าของอนุภาคต่อเนื้อเยื่อ โดยเลือกปัจจัยการยิงจากข้อที่ 1 และ 2 มาใช้ในการยิงอนุภาค ศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อและจำนวนเนื้อเยื่อที่ได้รับการยิงต่อการยิง 1 ครั้ง

ขั้นตอนที่ 3 การชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่

ทดลองชักนำยอดจากชิ้นส่วน hypocotyl และ ยอด

นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารทดลองสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสองชนิด ได้แก่ BA และ NAA วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีปัจจัยที่ทดสอบ คือ สูตรอาหารทดลอง มี 12 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 MS
สูตรที่ 2 MS + BA 0.1 มก./ล.
สูตรที่ 3 MS + BA 0.3 มก./ล.
สูตรที่ 4 MS + BA 0.5 มก./ล.
สูตรที่ 5 MS + NAA 0.05 มก./ล.
สูตรที่ 6 MS + BA 0.1 มก./ล. + NAA 0.05 มก./ล.
สูตรที่ 7 MS + BA 0.3 มก./ล. + NAA 0.05 มก./ล.
สูตรที่ 8 MS + BA 0.5 มก./ล. + NAA 0.05 มก./ล.
สูตรที่ 9 MS + NAA 0.1 มก./ล.
สูตรที่ 10 MS + BA 0.1 มก./ล. + NAA 0.1 มก./ล.
สูตรที่ 11 MS + BA 0.3 มก./ล. + NAA 0.1 มก./ล.
สูตรที่ 12 MS + BA 0.5 มก./ล. + NAA 0.1 มก./ล.

เพาะเลี้ยงในสภาพให้แสงเป็นเวลา 16 ชม.ต่อวัน อุณหภูมิ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 สัปดาห์ แต่ละสูตร (treatment) มีจำนวนซ้ำ 4 ซ้ำๆละ 3 ขวด บันทึกผลการเจริญเติบโต และการพัฒนาจากชิ้นส่วนที่ทดลอง เช่น นับจำนวนยอดที่เกิดขึ้น จำนวนใบ ความสูงของยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดราก (ถ้ามี) เป็นต้น

<u>บันทึกผลการทดลอง</u> บันทึกผลสูตรอาหาร อัตราการเจริญเติบโต และการพัฒนาจากชิ้นส่วนที่ทดลอง เช่น นับจำนวนยอดที่เกิดขึ้น จำนวนใบ ความสูงของยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดราก

ศูนย์วิทยทรัพยากร

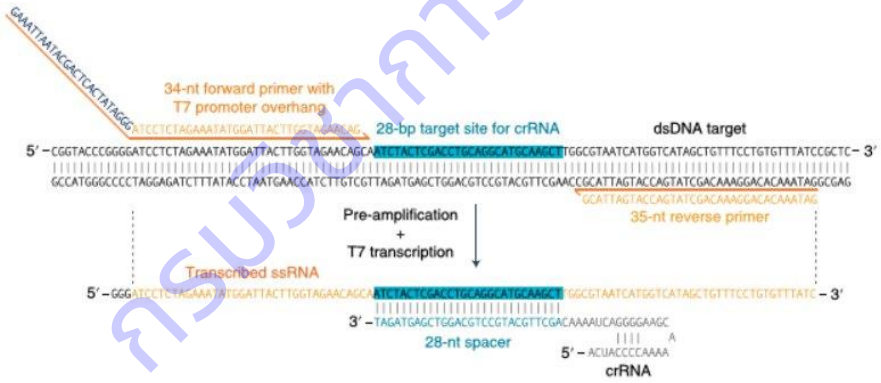
กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาเทคนิคตรวจสอบพืชจากเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ

การทดลองที่ 2.1 พัฒนาชุดตรวจสอบการปลอมปนมะละกอที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำโดยเทคนิค SHERLOCK

1. การออกแบบ Primer สำหรับ RPA, Reporter และ crRNA

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย RPA ออกแบบไพรเมอร์ (Forward และ Reverse) สำหรับเพิ่มปริมาณ Promoter 35S และ NOS และยีน Papain ความยาวของไพรเมอร์ที่ดีที่สุดควรอยู่ที่ 25–35 nt โดยมี T7 promoter overhang ในส่วนของ Forward และ Reverse เป็นส่วนที่อยู่ใน DNA เป้าหมาย และขนาดของ Amplicon ควรเป็น 80–140 bp ไพรเมอร์ควรมี Tm ระหว่าง 54 และ 67 °C อนึ่ง RPA เป็นกระบวนการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายแบบคร่าวๆ แต่ความจำเพาะเจาะจงจริงอยู่ที่ crRNA อนึ่งในส่วนของ reporter ออกแบบดังนี้ FQ-reporter (5’-6-FAM -ttatt-Quencher-3’) ซึ่งเป็น ssDNA reporter สำหรับ fluorescence detection และ FB-reporter (5’-6-FAM -ttattttattttatt-Biotin-3’) เป็น ssDNA reporter สำหรับ lateral flow assay

การออกแบบ crRNA สิ่งที่สำคัญที่สุดของการออกแบบ crRNA สำหรับการตรวจจับโดย Cas12a คือไม่ควรมีการทับซ้อนกับ ไพรเมอร์ RPA เนื่องจากการทับซ้อนกันกับไพรเมอร์อาจส่งผลให้มี Background เพิ่มขึ้น ลำดับ crRNA ควรเป็นสายรหัสแบบย้อนกลับของชิ้นยีนเป้าหมายใน RNA ที่ถอดแบบ ลำดับ spacer แล้ว (20-24 nt ในกรณีของ Cas12a) ทั้งนี้สามารถระบุตำแหน่งตามที่ต้องการใน DNA เป้าหมาย สามารถสร้าง crRNA จาก DNA เทมเพลต ผ่านผู้ให้บริการสังเคราะห์ซึ่งจะมีราคาถูกกว่าการสังเคราะห์ขึ้นทางเคมีเอง ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 3 แสดงการออกแบบ Primer สำหรับปฏิกิริยา RPA

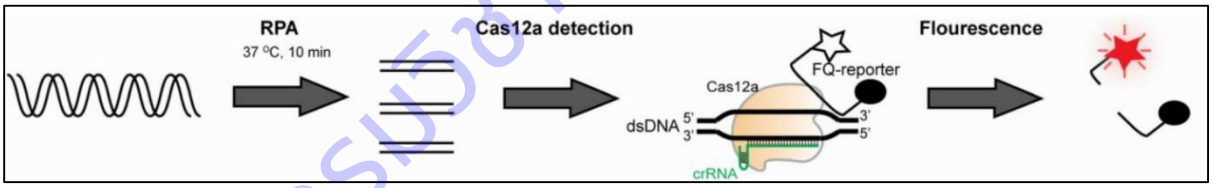
2. การสังเคราะห์และผลิต Recombinant expression Cas12a และการทำ Cas12a ให้บริสุทธิ์ โดยละลาย Competent เซลล์ ที่มีความสามารถบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาทีแล้วเติม Cas12a expression พลาสมิด 50 ng / µL Cas12a expression พลาสมิด 1 µl พักบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที Heat shock เซลล์โดยการวางหลอดลงในอ่างน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 42 ° C เป็นเวลา 45 วินาทีจากนั้นแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติม SOC medium 200 µL บ่มที่ 37 °C 1 ชม. และดูด cell suspension มา 100 µL นำมาเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อที่เติม Antibiotic ที่เหมาะสม บ่มข้ามคืนที่ 37 °C นำแบคทีเรีย ที่ได้รับ Recombinant vector มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตรผสมกับ Antibiotic ที่เหมาะสม เป็นเวลา 1 คืน เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น จากนั้นเตรียมอาหารเหลว LB และ Antibiotic ที่เหมาะสม จากนั้นนำเชื้อตั้งต้นที่ได้เติมลงในอาหารที่เตรียมให้ได้ความเข้มข้น

กรมวิชาการเกษตร

สุดท้าย 20 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบ่มที่ 37oC ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมง หรือ จนกว่าจะได้ค่า OD600 ประมาณ 0.5 จากนั้นเติม IPTG 0.5 มิลลิโมลลา และเลี้ยงต่ออีก 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำเซลล์ทั้งหมดไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ปั่นตกตะกอนทั้งหมดไปดำเนินการสกัดโปรตีนด้วยวิธี freeze thaw โดยแช่ที่อุณหภูมิ -80oC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาละลายและเติมไลโซไซม์ ประมาณ 2 กรัม แล้วเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง และนำไปแช่ที่ -80oC อีก 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4oC แล้วนำโปรตีนไปทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Ni-NTA เมื่อได้โปรตีนแล้วนำโปรตีน BSA (Control) และ Cas12a ย้อมกับ Bradford อัตราส่วน 4:1 (โปรตีน : Bradford) และทำการเจือจางโปรตีน BSA เป็นการเจือจางจากความเข้มข้นเริ่มต้น 75 มิลลิกรัม/,มิลลิลิตร 10 ค่าการเจือจางกับน้ำกลั่นตั้งแต่ 0, 1:9 ถึง 1:1 และ เจือจางโปรตีน Cas12a ในอัตราส่วน 1:10, 1:30, 1:60 จาก Standard curve จากค่าความดูดกลืนแสงของ BSA ได้กราฟสมการเส้นตรงคือ $y = ax + b$ และ หาค่า R^2 เพื่อคำนวนความเข้มของโปรตีน Cas12a เทียบกับโปรตีน BSA แล้วไปแยกผ่านโพลีอะคลีลาไมด์เจลอีกครั้ง โดยเจือจางโปรตีน BSA และ ให้ได้ความเข้มข้น 250, 100, 25, 10, 5 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับโปรตีน Cas12a ที่อัตราส่วน 1:10 เพื่อนำผลมาเทียบกับค่าที่คำนวนได้

3. กระบวนการตรวจวิเคราะห์ ด้วย Fluorescence detection และ Lateral flow assay

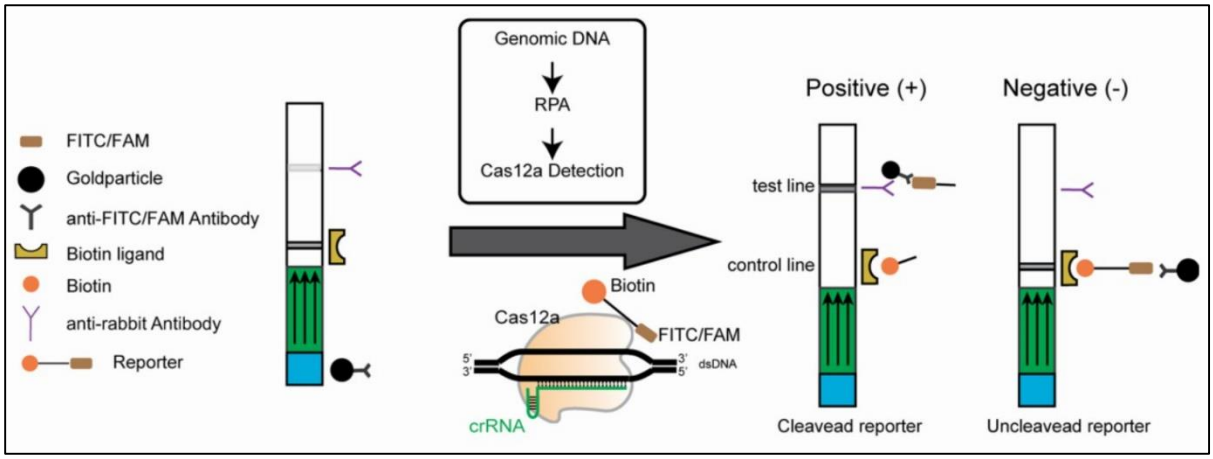
การใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ SHERLOCK สามารถออกแบบการทดลองเพื่อการตรวจวิเคราะห์ได้ทั้ง Fluorescence detection และ Lateral flow assay detection ดังภาพ 4,5



ภาพที่ 4 แสดง Fluorescence detection

กระบวนการตรวจวิเคราะห์ด้วย Fluorescence detection เริ่มจากวิธี Recombinase Polymerase Amplification (RPA) ซึ่งจะเพิ่มปริมาณ Sequence target และ Cas12a จะเป็นตัว Detect และตัด Target พร้อมกับ Trans-cleavage activity ซึ่งจะตัด Reporter FQ-reporter (5’-6-FAM -ttatt-Quencher-3’) พร้อมกับปล่อยแสง Fluorescence ออกมา

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 5 แสดงLateral flow assay detection กระบวนการตรวจวิเคราะห์ด้วย Lateral flow assay detection

เมื่อ Recombinase Polymerase Amplification (RPA) เพิ่มปริมาณ Sequence target และ Cas12a จะเป็นตัว Detect และตัด Target พร้อมกับ Trans-cleavage activity ซึ่งจะตัด Reporter ที่เป็นแบบ FB-reporter (5'-6-FAM -ttattttattttatt-Biotin-3') และจับกับ Goldparticle ที่มี Antibody anti-FITC/FAM อยู่ Gold particle และ antibody จะจับกับโมเลกุล FITC/FAM เคลื่อนที่ไปตาม Strip โดย Biotin ซึ่งถูกตัดก่อนหน้าจะจับกับ Biotin ligand (เช่น streptavidin) เป็น Control line และ Goldparticle ที่จับอยู่กับ Antibody จะถูกจับโดย Anti-rabbit Antibody และปรากฏเป็น test line ถ้าเป็น Positive ในขณะที่ ถ้าเป็น Negative จะไม่ปรากฏ เส้นที่ Test line เพราะ Reporter ไม่ถูกตัด

4. การคำนวนต้นทุนโดยประมาณของการตรวจวิเคราะห์ ต้นทุนโดยประมาณของการตรวจวิเคราะห์ปัจจุบันด้วยวิธี Real-time PCR อยู่ที่ 1,600 – 2,000 บาท/ตัวอย่าง ในขณะที่ต้นทุนโดยประมาณของวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ SHERLOCK Lateral flow assay detection อยู่ที่ 475 บาท/ชิ้น/ตัวอย่าง (อ้างอิง: Vidyasirimedhi Institute of Science and Technology (VISTEC)) และ SHERLOCK Fluorescence detection มีต้นทุนต่ำกว่า 475 บาท/ตัวอย่าง

การทดลองที่ 2.2 พัฒนาชุดตรวจสอบอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค LFICS สำหรับถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ

<u>สิ่งที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. วัสดุอ้างอิงทดสอบ ได้แก่ ถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ พลาสมิดอ้างอิงทดสอบของถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำของยีน *FAD2-1B*

2. สารเคมี ชุดไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบไว้สำหรับตรวจสอบยีน *FAD2-1B*, Ex taq PCR master mix (Takara), Agarose powder, 1 kb DNA Ladder, Ethidium bromide, GeneScan Lysis buffer, Wizard

กรมวิชาการเกษตร

Purification Resin (Promega), Proteinase K (20 mg/ml), Chloroform, Isoamyl alcohol, Isopropanol, Ethanol, PBS buffer และ Tween20

3. วัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องมือ: เครื่อง gel electrophoresis และ gel documentation, Water bath หรือเครื่อง Heat Block, Centrifuge, ไมโครปิเปต และปิเปตทิปขนาด 2, 10, 200, 1000 ไมโครลิตร เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ และแผ่นไนโตรเซลลูโรสและชุดสตริปเทส

<u>แบบและวิธีการทดลอง</u>

1) วางแผนการทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอต้นแบบของถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำกับดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอต้นแบบของถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำในยีน *fad2-1b* ในปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบ Simplex PCR เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพและความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ โดยทำการทดสอบ 10 ซ้ำ ในแต่ละคู่ไพรเมอร์

2) วางแผนทดสอบไพรเมอร์ของยีน *lectin* ในปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอต้นแบบของถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำกับดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอต้นแบบของถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำโดยจะต้องได้แถบดีเอ็นเอของดีเอ็ฯเอต้นแบบสองชนิดนี้ไม่แตกต่างกันโดยทำการทดสอบ 10 ซ้ำ

3) วางแผนทดสอบปฏิกิริยาของคู่ไพรเมอร์ 2 คู่ในปฏิกิริยาเดียวกัน ไพรเมอร์ FAD2-1-B + LECTIN เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของคู่ไพรเมอร์ 2 คู่ในปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบ Duplex PCR โดยการปรับค่า annealing temperature ที่เหมาะสมจนกว่าจะได้แถบดีเอ 2 แถบแยกกันอย่างชัดเจน โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ

4) ทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่จำเพาะต่อ ฉลากสีที่ผ่นไว้บนแผ่นอิมมูโนโครมาโตกราฟฟิกสตริปส์ โดยทดสอบทีละยีนแยกกัน ได้แก่ *FAD2-1-B* และ *LECTIN* เพื่อหาจำนวนรอบ (cycle) ที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยทำการทดสอบ 10 ซ้ำ

5) ทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพีซีอาร์แบบ Duplex PCR ระหว่างยีน *FAD2-1-B* + *LECTIN* โดยจะต้องแสดงแถบสีใน Test line ชัดเจน 2 แถบในตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบของถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ และแสดงแถบสี 1 แถบในดีเอ็นเอต้นแบบของถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำในยีน *fad2-1b*

<u>วิธีปฏิบัติการทดลอง</u>

1) สืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีน *FAD2-1B* จากฐานข้อมูล NCBI และสืบค้นข้อมูลเพื่อหาตำแหน่งลำดับเบสที่หายไปของยีน *FAD2-1B* ในถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ

2) ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *FAD2-1B* ในถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ (Wild type) แต่ไม่จำเพาะในที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ (*fad2-1b*)

3) สกัดดีเอ็นเอถั่วเหลืองด้วยวิธีการ Lysis โดยชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม ผสมกับ Lysis buffer (Eurofin) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex Mixer จากนั้นบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ตกตะกอนโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตด้วย Chloroform จำนวน 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ 2 รอบ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10

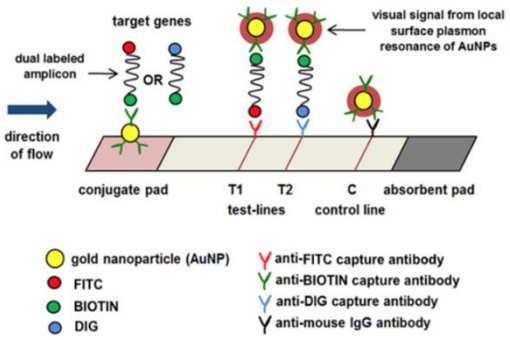
ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย Wizard™ Minicolumn เติม Miniprep DNA Purification Resin ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ในสารละลาย ดีเอ็นเอที่สกัดได้ 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน (อัตราส่วน Miniprep DNA Purification Resin ต่อ สารละลายดีเอ็นเอ คือ 2:1) ใช้ Minicolumn และเครื่องดูดสารละลาย (Vacman®) ทำความสะอาดดีเอ็ฯเอด้วย 80% Isopropanol จำนวน 2 มิลลิลิตร นำ Minicolumn ที่มีดีเอ็ฯเอติดอยู่ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เพื่อให้ของเหลวส่วนที่ตกค้างอยู่ใน Minicolumn ออกให้หมดนำ Minicolumn ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (อุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส) ลงใน Minicolumn ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอออกมาจาก Minicolumn ให้หมด และเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ และบันทึกข้อมูลดีเอ็นเอ ปริมาณและความบริสุทธิ์

4) ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยทดสอบทีละ 1 ยีน แบบ simplex PCR และนำผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปตรวจสอบบนเจลอกาโรส (Agarose gel electrophoresis) โดยแถบดีเอ็เอจะต้องเป็นแถบเดี่ยวชัดเจนในแต่ละยีน และขนาดของแถบดีเอ็นเอเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker DNA) จะต้องตรงตามขนาดที่ได้ออกแบบไว้ จากนั้นเพิ่มคู่ไพรเมอร์ LECTIN เข้าไปในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในคู่ไพรเมอร์ของ FAD2-1B ในปฏิกิริยาแบบ Duplex PCR และนำผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปตรวจสอบบนเจลอกาโรส โดยแถบดีเอ็นเอจะต้องแสดงแถบคู่ ขนาดแยกกันชัดเจนตามที่ได้ออกแบบไว้ในแต่ละคู่ไพรเมอร์

5) ปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาในปฏิกิริยาแบบ Duplex PCR เพื่อหาสภาวะที่สั้นที่สุดและเหมาะสมที่สุด ในการตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอ โดยปรับอุณหภูมิ Annealing และเวลาใน Synthesis โดยแถบดีเอ็นเอยังคงแสดงแถบคู่ ขนาดแยกกันชัดเจนตามที่ได้ออกแบบไว้ในแต่ละคู่ไพรเมอร์

6) ออกแบบและผลิตแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่แผ่นใยแก้วเมมเบรนคอนจูเกต (conjugate pad) และแผ่นดูดซับ (adsorbed pad) พ่นสารละลาย anti-FITC capture antibody ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 0.1 ไมโครลิตรต่อมิลลิเมตร เคลือบแถบทดสอบ (Test-line) ที่ 1 (T1) เพื่อจับสลากสี Fluorescein isothiocyanate (FITC) และพ่นสารละลาย anti-DIG capture antibody ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 0.1 ไมโครลิตรต่อมิลลิเมตร ลงบนแถบทดสอบที่ 2 (T2) สำหรับจับฉลากสี Digoxigenin (DIG) ส่วนแถบควบคุม (Control line) เคลือบด้วย anti-mouse IgG antibody ซึ่งเชื่อมต่อกับอนุภาคทอง (gold nanoparticle) และเคลือบ anti-Biotin capture antiboby เพื่อให้เกิดแถบสี (ดังภาพ)

ลิขสิทธิ์การเกษตร



7) ติดฉลากสีไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้แล้ว ที่ปลาย5’ ด้วย FITC ในคู่ไพรเมอร์ของยีน FAD2-1B เพื่อให้สามารถตรวจสอบได้ที่ แถบทดสอบ (Test-line) ที่ 1 (T1) และ ติดฉลากสีไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้แล้ว ที่ปลาย5’ ด้วย DIG ในคู่ไพรเมอร์ LECTIN เพื่อให้สามารถตรวจสอบได้ที่ แถบทดสอบ 2 (T2)

ตรวจดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ด้วยชุด LFICS นำผลผลิตพีซีอาร์ผสมกับเลเทอรัลโฟลว์บัฟเฟอร์ (PBS+0.1Tween20) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วหยดลงบนชุด LFICS โดยทดสอบปริมาณการหยดผลผลิตพีซีอาร์บนชุด LFICS เปรียบเทียบกับการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเจลอะกาโรส โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 10 5 2.5 1.25 และ 0.5 ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วนำปริมาตรผลผลิตพีซีอาร์ที่เหมาะสมหยดตรวจสอบกับแผ่น LFICS

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

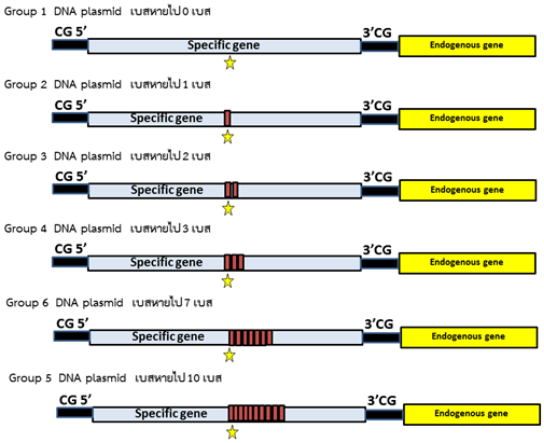
บันทึกผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบปกติ และปรับแต่งจีโนมแบบการตัดยีนตำแหน่งการออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบผสมคู่ไพรเมอร์ ทำการบันทึกผลการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยแผ่น LFICS ผลการเกิดแถบสีบนชุด LFICS และค่าความแม่นยำของการแถบสีบนชุด LFICS

การทดลองที่ 2.3 พัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองข้าวโพดที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR

<u>สิ่งที่ใช้ในการทดลอง</u>

พลาสมิดที่ใช้สำหรับเป็นวัสดุอ้างอิงรับรอง ได้แก่ 1) พลาสมิดที่มียีน WAXY ของข้าวโพดปกติ 2) พลาสมิดที่มียีน WAXY ของข้าวโพดหายไป 1 เบส 3) พลาสมิดที่มียีน WAXY ของข้าวโพดหายไป 2 เบส 4) พลาสมิดที่มียีน WAXY ของข้าวโพดหายไป 3 เบส 5) พลาสมิดที่มียีน WAXY ของข้าวโพดหายไป 7 เบส และ 6) พลาสมิดที่มียีน WAXY ของข้าวโพดหายไป 10 เบส

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 6 การจำลองการขาดหายไปของตำแหน่งยีน

<u>วิธีปฏิบัติการทดลอง</u>

นำพลาสมิดมาตรฐานที่สังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจข้าวโพดที่มีการปรับแต่งยีน WAXY แบบ SDN1 (Site- directed nuclease 1) โดยแต่ละพลาสมิดจะมีการหายของลำดับเบสจำนวน 0, 1, 2, 3, 7 และ 10 เบส โดยนำพลาสมิดดังกล่าวมาเป็นต้นแบบในการทดสอบต่อไป

1. ตรวจสอบข้อมูลของลำดับเบสของพลาสมิดและค้นหาลำดับเบสของยีนแต่ละตัวโดยเลือกตำแหน่งอนุรักษ์ (conserve region) คัดเลือกไพร์เมอร์และโพรบจำนวน 2 ชุด ที่สามารถตรวจสอบได้กับพลาสมิดทั้ง 6 กลุ่มของข้าวโพดปรับแต่งจีโนม (พลาสมิดจะมีการหายของลำดับเบสจำนวน 0, 1, 2, 3, 7 และ 10 เบส) เพื่อใช้ตรวจคัดกรอง

2. สกัดดีเอ็นเอของพลาสมิดข้าวโพดปรับแต่งจีโนมด้วยการดัดแปลงจากวิธี GeneScan ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม (Roger and Bendich, 1985)

3. ทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของชุดไพร์เมอร์และโพรบที่ออกแบบมา กับกับพลาสมิดทั้ง 5 กลุ่มของข้าวโพดปรับแต่งจีโนม (พลาสมิดจะมีการหายของลำดับเบสจำนวน 1, 2, 3, 7 และ 10 เบส) และพลาสมิดที่ไม่ได้ปรับแก้ไขจีโนม (พลาสมิดจะมีการหายของลำดับเบสจำนวน 0 เบส) โดยศึกษาปริมาณและความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ อุณหภูมิขั้นตอน annealing และโปรแกรมในการทดสอบด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Digital Droplet PCR แบบ Simplex ดังภาพ

4. ทดสอบความถูกต้อง (Trueness) ความแม่นยำ (Precision) และร้อยละความเบี่ยงเบน (% Bias) ในวิธีการตรวจคัดกรองข้าวโพดปรับแต่งจีโนม

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

บันทึกผลการคัดเลือกไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมเพื่อใช้ตรวจคัดกรอง ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของชุดไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบได้ การทดสอบความถูกต้อง (Trueness)

ลิขสิทธิ์การเกษตร

3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

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

❑ เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

❑ เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 3 ผลการศึกษา

3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 เทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลัง

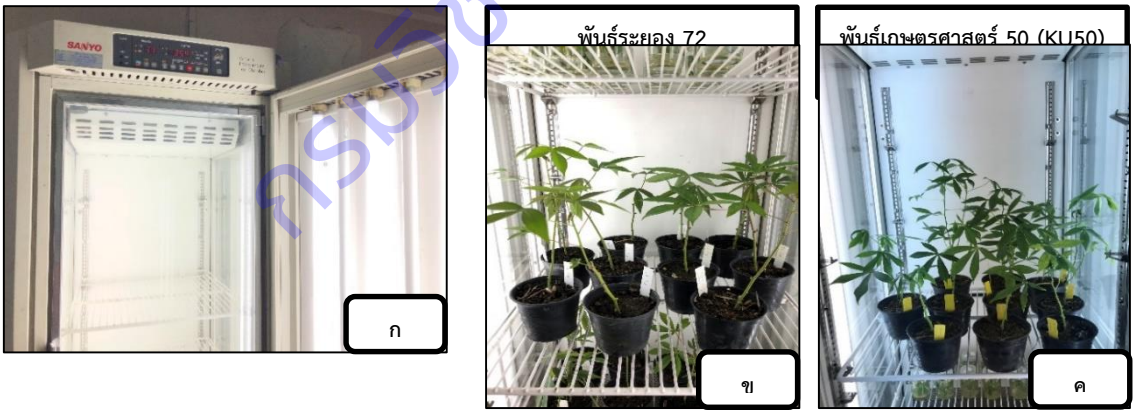
กิจกรรมที่ 1 การผลิตและขยายต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค ด้วยเทคนิค Temporary Immersion Bioreactor

การทดลองที่ 1.1 พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค

1. ศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค พันธุ์ระยอง 72 และ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50

การเตรียมท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU50) จากแหล่งปลูกที่สะอาดไม่มีการระบาดของโรคและมีความตรงตามพันธุ์ นำมาปลูกในกระถางขนาด 4 นิ้วภายในโรงเรือนดูแลต้นพืชเพื่อชักนำให้เกิดยอด เมื่อได้ต้นที่มีขนาดความสูงประมาณ 10 เซนติเมตร นำทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาในการทดสอบที่แตกต่างกันในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Growth Chamber) (ภาพที่ 1) ดังนี้

1) สภาพให้แสง 36°C สภาพที่มืด 32°C เวลา 1 สัปดาห์
2) สภาพให้แสง 36°C สภาพที่มืด 32°C เวลา 2 สัปดาห์
3) สภาพให้แสง 38°C สภาพที่มืด 34°C เวลา 1 สัปดาห์
4) สภาพให้แสง 38°C สภาพที่มืด 34°C เวลา 2 สัปดาห์
5) สภาพให้แสง 40°C สภาพที่มืด 36°C เวลา 1 สัปดาห์



ภาพที่ 7 การศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค พันธุ์ระยอง 72 และ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ก. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Growth Chamber) สำหรับการทดสอบอุณหภูมิ สภาพแสง และระยะเวลาต่างๆ ข. ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ที่นำไปทดสอบภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ค. ต้นมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU50) ที่นำไปทดสอบภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

กรมวิชาการเกษตร

เมื่อนำต้นมันสำปะหลังทั้ง 2 พันธุ์มาทดสอบจนครบระยะเวลาที่กำหนด พบว่า การกำหนดปัจจัยของแสงและอุณหภูมิโดยทดสอบการให้แสงที่มีอุณหภูมิ 36°C ระยะเวลา 16 ชั่วโมง และที่มืดที่มีอุณหภูมิ 34°C ระยะเวลา 8 ชั่วโมง ระยะเวลาการทดสอบนาน 1 และ 2 สัปดาห์ การให้แสงที่มีอุณหภูมิ 38°C ระยะเวลา 16 ชั่วโมง และสภาพที่มืดที่มีอุณหภูมิ 36°C ระยะเวลา 8 ชั่วโมง ระยะเวลาการทดสอบนาน 1 และ 2 สัปดาห์ ต้นมีการเจริญเติบโตที่ปกติเมื่อครบระยะเวลาการทดสอบ แต่เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น คือ การให้แสงที่มีอุณหภูมิ 40°C ระยะเวลา 16 ชั่วโมง และที่มืดที่มีอุณหภูมิ 36°C ระยะเวลา 8 ชั่วโมง ระยะเวลาการทดสอบนาน 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่า การทดสอบ 1 สัปดาห์ต้นมันสำปะหลังจะมีอาการยอดเหี่ยวเกิดขึ้น (ภาพที่ 8) คิดเป็นร้อยละ 20% และการทดสอบ 2 สัปดาห์ ต้นมันสำปะหลังจะเกิดอาการยอดเหี่ยวสูงขึ้นเป็น 50%

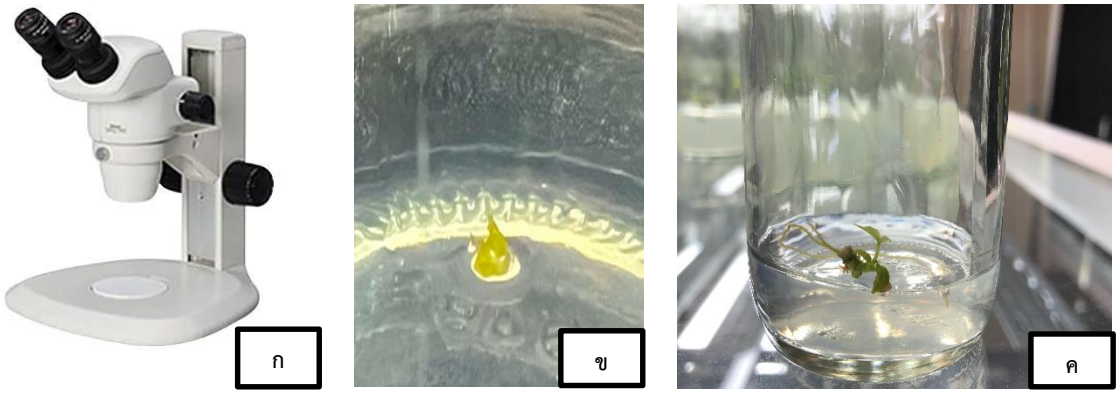
ภาพที่ 8 อาการยอดเหี่ยวของต้นมันสำปะหลังเมื่อนำมาทดสอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Growth Chamber)

2. การตัดเนื้อเยื่อปลายยอด (apical meristem) เพื่อให้ได้ต้นมันสำปะหลังปลอดโรคใบด่าง

นำยอดอ่อนของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และ KU 50 จากโรงเรือน มาฟอกฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตามขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ ดังนี้

1) การนำยอดอ่อนของต้นมันสำปะหลังมาล้างทำความสะอาด ตัดแต่งส่วนใบออก
2) นำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Haiter ®) ความเข้มข้น 15% ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง
3) ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Haiter ®) ความเข้มข้น 5% ระยะเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง
4) นำชิ้นส่วนตายอดของต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50 มาตัดเนื้อเยื่อส่วน apical meristem ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 9ก) ให้มีขนาดประมาณ 1-2 มม.
5) ชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่บนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)

กรมวิชาการเกษตร



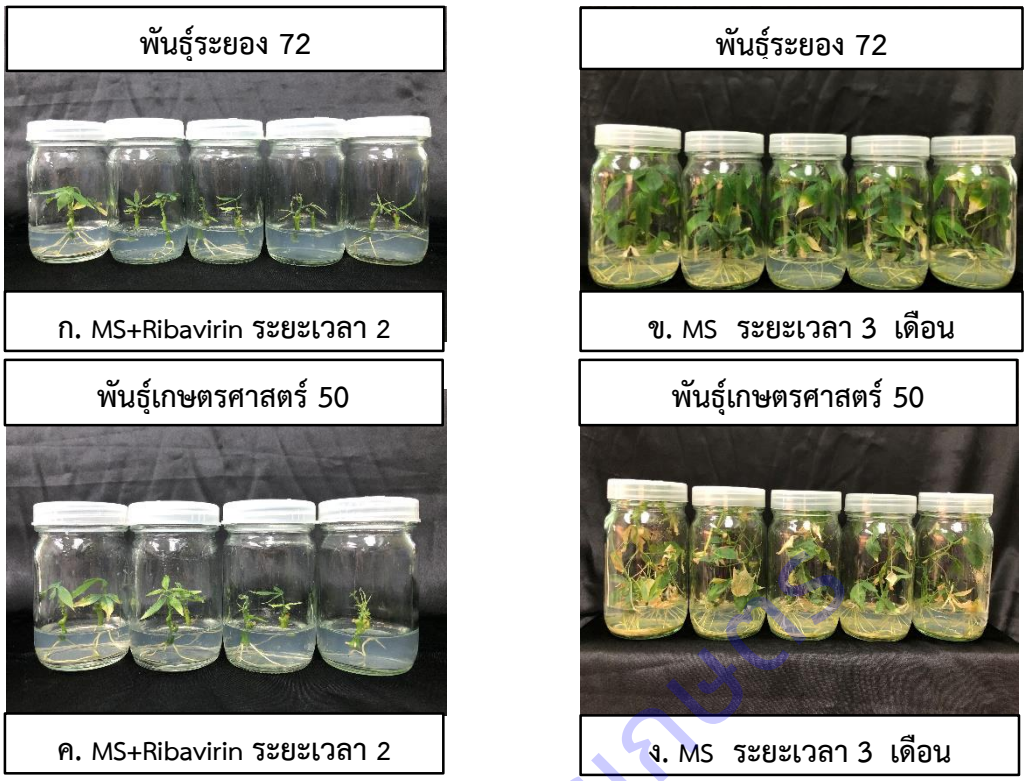
ภาพที่ 9 การตัดเนื้อเยื่อปลายยอดของต้นมันสำปะหลัง และชักนำให้เกิดปลายยอดใหม่
ก. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)
ข. การตัดเนื้อเยื่อปลายยอด(apical meristem) ขนาด 1-2 มิลลิเมตร
ค. การพัฒนาเกิดเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดของมันสำปะหลัง เมื่ออายุ 2 เดือน

การพัฒนาของต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และ KU50 จากการตัดเนื้อเยื่อส่วน apical meristem ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้มีขนาดประมาณ 1-2 มม. (ภาพที่ 3ข) พบว่า การเจริญเติบโตของต้นใหม่จะพัฒนาได้ช้า โดยเมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ระยะเวลานาน 2 เดือน ต้นมีขนาดความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร มีใบเกิดขึ้น 3 ใบ (ภาพที่ 3 ค) เมื่อเทียบกับการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดหรือตาข้างในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบปกติ เมื่อต้นมันสำปะหลังเจริญเติบโตมีใบมากกว่า 5 ใบ จะตัดชิ้นส่วนใบเพื่อตรวจหาเชื้อ CMD ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

3. ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ (Ribavirin) ในการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค พันธุ์ระยอง 72 และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50

นำต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และ KU 50 ที่ผ่านขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อมาทดสอบสารปฏิชีวนะ Ribavirin ความเข้มข้น 0,15,20,25 และ 30 mg/l พบว่า ต้นมันสำปะหลังของทั้ง 2 พันธุ์ที่เลี้ยงทดสอบในสูตรอาหาร MS ร่วมกับ Ribavirin ต้นมีการเจริญเติบโตได้ปกติ และเกิดรากได้ (ภาพที่ 10 ก,ค) เมื่อครบระยะเวลา 2 เดือน นำต้นมันสำปะหลังย้ายไปเลี้ยงในสูตรอาหาร MS จากนั้นเมื่อระยะเวลา 3 เดือน นำใบที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบหาเชื้อ CMD ด้วยเทคนิค PCR (ภาพที่ 10 ข,ง) ผลการตรวจสอบพบว่า ความเข้มข้นของ Ribavirin ทุกระดับความเข้มข้น สามารถทำให้ต้นที่เกิดขึ้นปลอดจากเชื้อ CMV ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคใบด่างได้ทั้ง 2 พันธุ์ (ภาพที่ 10 ก,ข)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 10 การศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ (Ribavirin) ในการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค

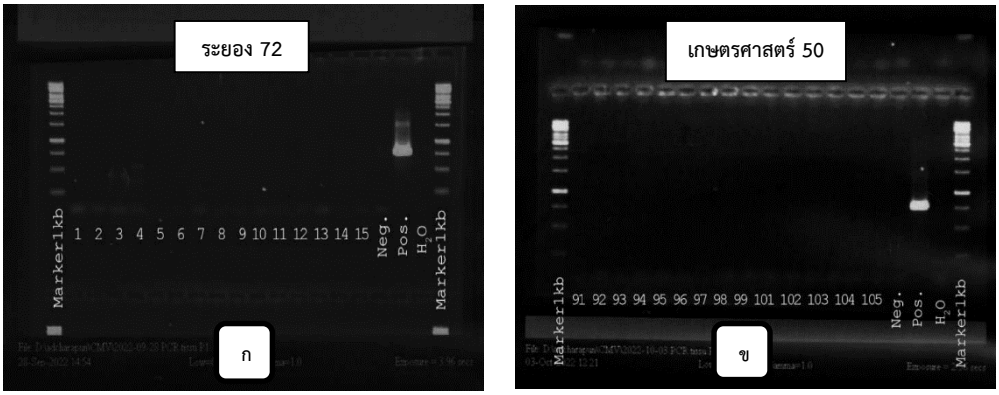
ก. ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ที่ทดสอบสารปฏิชีวนะ Ribavirin ระยะเวลา 2 เดือน

ข. ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 สูตรอาหาร MS ระยะเวลา 3 เดือน

ค. ต้นมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่ทดสอบสารปฏิชีวนะ Ribavirin ระยะเวลา 2 เดือน

ง. ต้นมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 สูตรอาหาร MS ระยะเวลา 3 เดือน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 11 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นของ Ribavirin ทุกระดับความเข้มข้น สามารถทำให้ต้นที่เกิดขึ้นปลอดจากเชื้อ CMV ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคใบด่างได้ทั้ง 2 พันธุ์

ก. ผลการตรวจหาเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค PCR ของต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ที่ทดสอบใน Ribavirin

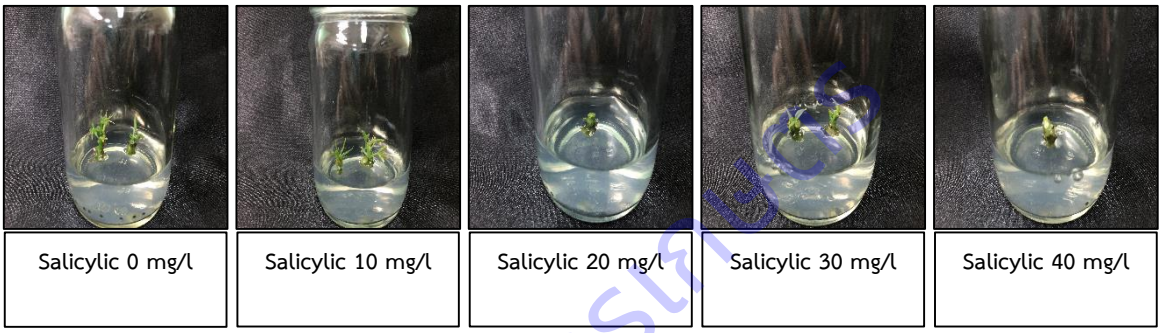
ข. ผลการตรวจหาเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค PCR ของต้นมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่ทดสอบใน Ribavirin

4. ศึกษาความเข้มข้นของสาร Salicylic acid ในการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรคพันธุ์ระยอง 72 และ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50

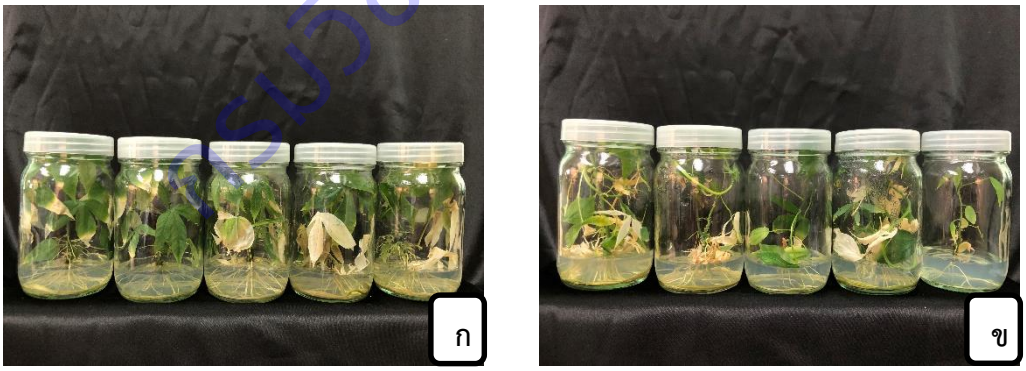
นำชิ้นส่วนตายอดมาทดสอบในอาหารที่มี salicylic acid ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 mg/l ระยะเวลานาน 1 เดือน (ภาพที่ 6 และ 7) เมื่อครบระยะเวลาเปลี่ยนต้นมันสำปะหลังไปยังสูตรอาหาร MS เพื่อเลี้ยงต้นให้เจริญเติบโต ระยะเวลา 3 เดือน จากนั้นนำส่วนใบไปตรวจหาเชื้อไวรัส CMV ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ความเข้มข้นของ salicylic acid ที่ความเข้มข้นสูง (30 และ 40 mg/l) มีผลต่อการเกิดยอดใหม่ของต้นมันสำปะหลังทั้ง 2 พันธุ์ และทำให้เกิดต้นแคระแกร็น (ภาพที่ 13 ก,ข) และเมื่อตรวจสอบหาเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคใบด่าง ด้วยเทคนิค PCR พบว่า พันธุ์ระยอง 72 ที่ใช้ความเข้มข้น Salicylic acid 40 mg/l ยังคงตรวจสอบเชื้อ CMV (ภาพที่ 14 ก) ส่วนพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ไม่พบเชื้อสาเหตุโรคใบด่างในต้นที่ผ่านการทดสอบด้วย Salicylic acid ทุกระดับความเข้มข้น (ภาพที่ 14ข)

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 12 ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ที่ทดสอบใน Salicylic acid ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 1 เดือน

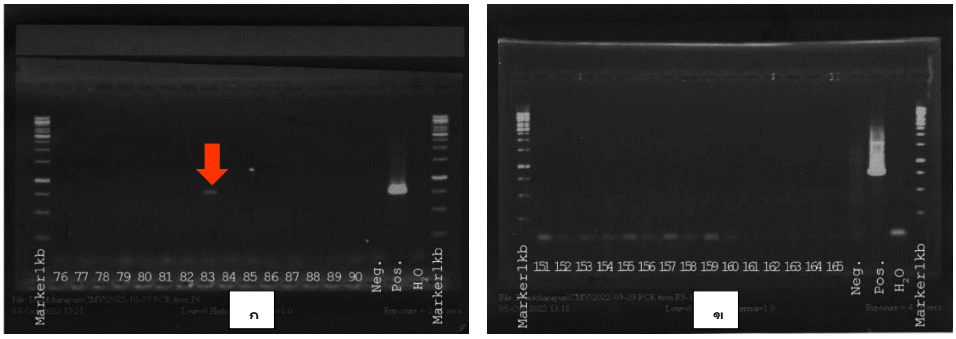


ภาพที่ 13 ต้นมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่ทดสอบใน Salicylic acid ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 14 ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 (ก) และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (ข) ที่ทดสอบใน Salicylic acid ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 3 เดือน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 15 ผลการตรวจหาเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค PCR ของต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 (ก) และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (ข) ที่ทดสอบใน Salicylic acid ความเข้มข้นต่างๆ

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาปัจจัยการขยายต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรคด้วยเทคนิค Temporary Immersion Bioreactor

ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังปลอดโรคพันธุ์ระยอง 72 และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ด้วยระบบ TIB โดยเตรียมท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 จากแหล่งปลูกที่สะอาดไม่มีการระบาดของโรคและมีความตรงตามพันธุ์ นำมาปลูกในโรงเรือนเพื่อชักนำให้เกิดยอด มาฟอกฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการใช้ชิ้นส่วนตายอด และตาข้างของมันสำปะหลังชักนำให้เกิดยอดใหม่ในอาหาร MS และเพิ่มปริมาณยอดในสูตรอาหาร MS+BA 1 mg/l เพื่อให้มีปริมาณต้นเพียงพอสำหรับนำไปทดสอบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ TIB จากนั้นนำต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยอด ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร มาทดสอบการเลี้ยงในระบบ TIB โดยกำหนดให้มีการเติมอาหารทุก 2 ชั่วโมง ระยะเวลาการชิ้นส่วนในอาหารนาน 5 นาที ในทุกสูตรอาหาร ซึ่งประกอบด้วย 4 สูตรอาหาร ได้แก่

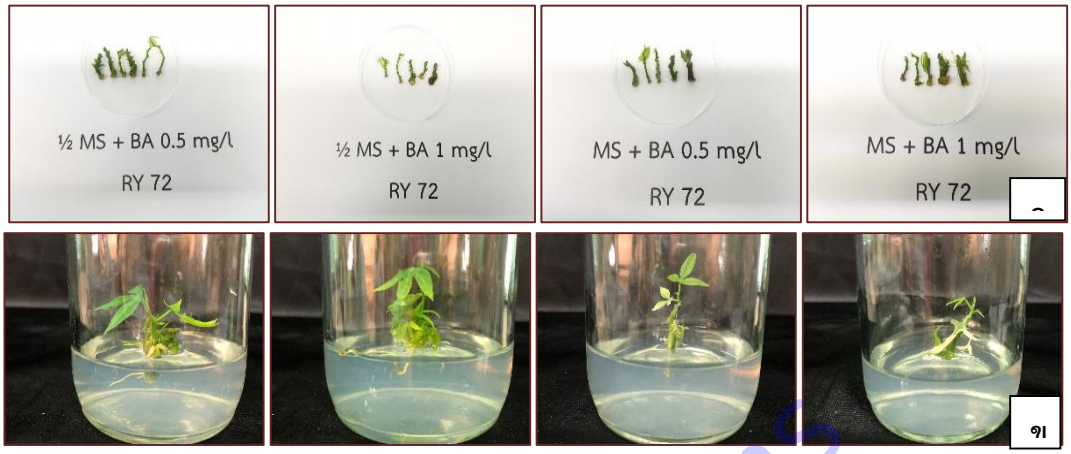
สูตรที่ 1 ½ MS + BA 0.5 mg/l สูตรที่ 2 ½ MS + BA 1 mg/l

สูตรที่ 3 MS + BA 0.5 mg/l สูตรที่ 4 MS + BA 1 mg/l

เมื่อครบระยะเวลา 1 เดือน นำต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ที่ผ่านการทดสอบสูตรอาหารต่างๆ ในระบบ TIB เปลี่ยนมาชักนำให้ต้นมีขนาดใหญ่และเกิดรากในอาหารสูตร MS พบว่า ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 จะเจริญเติบโตได้ดีในระบบ TIB ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรอาหาร MS ในขณะที่สูตรอาหาร 1/2 MS ต้นจะมีลักษณะฉ่ำน้ำ แต่เมื่อย้ายต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ไปยังอาหารแข็งสูตร ½ MS หรือ MS พบว่า ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 จะเจริญเติบโตและเกิดรากได้ในอาหารแข็งสูตร ½ MS สำหรับพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 เจริญเติบโตได้ดีในระบบ TIB ด้วยอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/l และเมื่อย้ายต้นมัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

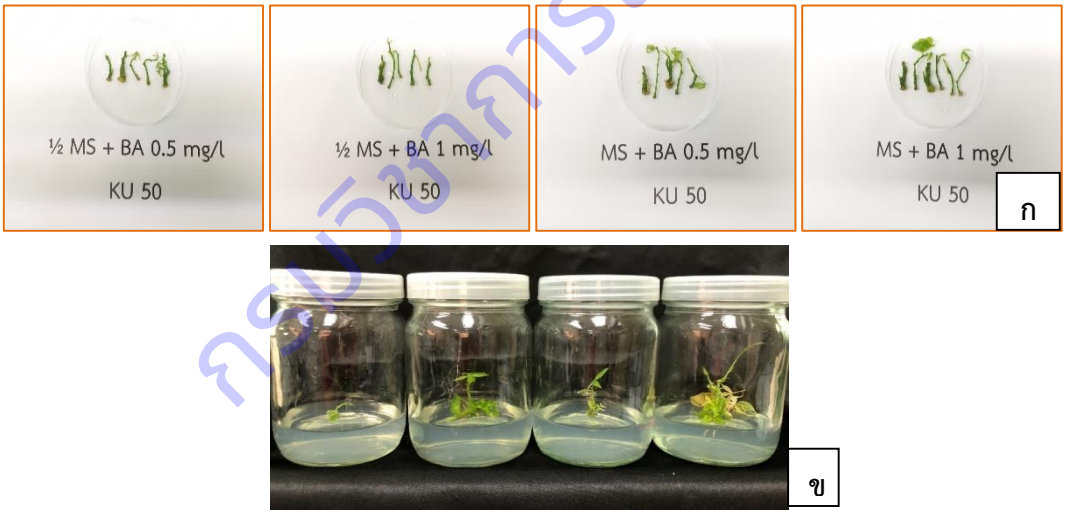
สำปะหลังไปยังอาหารแข็ง พบว่า ต้นมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 จะเจริญเติบโตได้ดีในอาหารสูตร ½ MS หรือ MS ที่มี BA 1 mg/l (ภาพที่ 16, 17)



ภาพที่ 16 การเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ในระบบ TIB

ก. การเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ในระบบ TIB ด้วยอาหารเหลวสูตรต่างๆ ระยะเวลา 1 เดือน

ข. ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ที่เพิ่มปริมาณจากระบบ TIB และย้ายต้นมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่างๆ



ภาพที่ 17 การเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ในระบบ TIB

ก. การเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ในระบบ TIB ด้วยอาหารเหลวสูตรต่างๆ ระยะเวลา 1 เดือน

ข. ต้นมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่เพิ่มปริมาณจากระบบ TIB และย้ายต้นมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่างๆ

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงเพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาวและไวรัสสาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลัง

การทดลองที่ 2.1 การพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคใบด่างมันสำปะหลัง

1. การเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

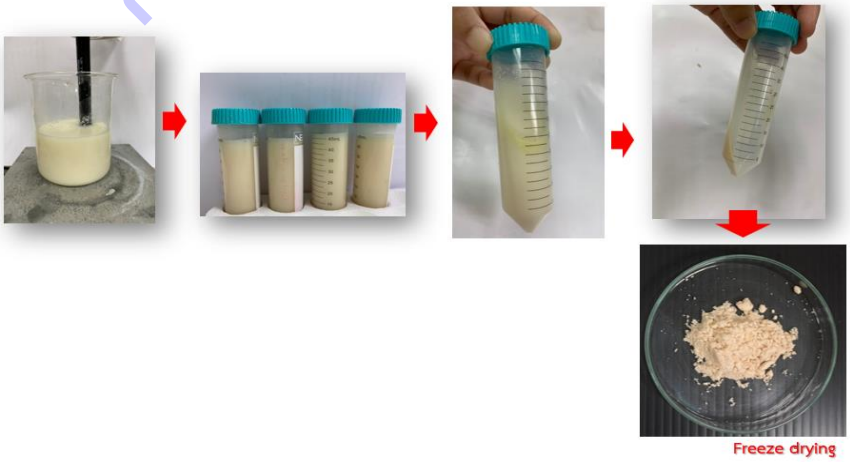
- Bacterial culture *Bacillus* sp.

จากการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของ (เตรียม 1 ลิตร : NaCl 10 กรัม, Tryptone 10 กรัม, Yeast extract 5 กรัม, ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วย ddH_2O) นาน 14-16 ชั่วโมง ดังภาพที่ 18

ภาพที่ 18 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรีย Bacterial culture *Bacillus* sp.

- โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง

จากการสกัดโปรตีนจากถั่วเหลือง โดยนำผงถั่วเหลืองปริมาณ 100 กรัม มาทำการสกัดโปรตีนโดยปรับค่าความเป็น ด่าง เท่ากับ 8 ด้วย NaOH เมื่อนำสารละลายถั่วเหลืองไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน แล้วนำส่วนใสมาปรับค่าความเป็นกรด เท่ากับ 4.5 ด้วย HCl และปั่นตกตะกอนอีกครั้ง จะได้ตะกอนซึ่งสามารถนำมาละลายในน้ำกลั่น แล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งด้วยวิธี Freeze dry พบว่า ถั่วเหลือง 100 กรัม ให้โปรตีนสกัด ปริมาณ 12.2 กรัม แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 19

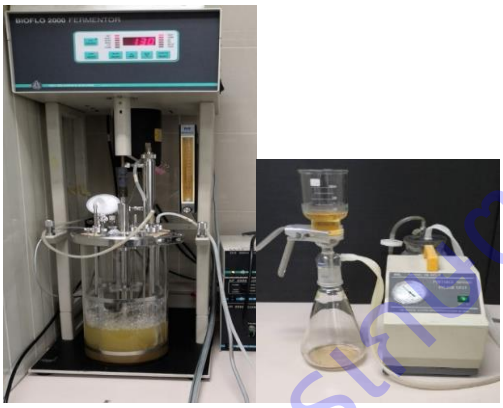


ภาพที่ 19 การสกัดโปรตีนจากถั่วเหลือง

กรมวิชาการเกษตร

- กรดอะมิโนลีวูลินิก

การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิก (ALA) จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A ในขั้นตอนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน พบการแสดงออกของโปรตีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 โดยการกระตุ้นการทำงานของยีน *hem* A เพื่อผลิตเอนไซม์ ALA synthase ด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถกระตุ้นการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ได้ดี มีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิก เมื่อทำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ALA synthase และเติมสารตั้งต้น 30 mM Glycine + 10 mM Succinic Acid และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 24 ชั่วโมง สามารถชักนำการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิกได้ดี ดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิกในระบบถังหมักขนาดเล็ก

- สารสกัดไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

ชั่งผง Chitin จากเปลือกกุ้ง ปริมาตร 5 กรัม ผสมกับ 2N NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เทสารละลาย Chitin ลงบนกระดาษกรอง เมื่อได้ตะกอน Chitin นำไปล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองผ่านกระดาษกรองจนลดค่าความเป็นด่าง เท่ากับ หรือน้อยกว่า pH 7 เมื่อนำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้ Chitosan 3.63 กรัม ดังภาพที่ 21

ภาพที่ 21 การสกัดสารไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

กรมวิชาการเกษตร

- รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ไคติเนส

การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ chitinase จากเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน chitinase ที่เชื่อมต่อเข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) ซึ่งมีแผนที่แสดงตำแหน่งของยีน chitinase แล้วจึงถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน chitinase เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 6.6 กิโลเบส เมื่อทำการชักนำการแสดงออกของยีนด้วยสาร 3 mM IPTG นาน 6 ชั่วโมง ตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนในชั่วโมงที่ 6 โดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ chitinase ที่ได้มีขนาดประมาณ 74 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 22

การทดสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ chitinase ที่ผลิตได้ด้วยวิธี Bioassay plate technique โดยใช้ crude protein หรือ crude enzyme ที่ได้จากการนำ recombinant *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายยีน มากระตุ้นการทำงานของยีนด้วย 3mM IPTG นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบในอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ (น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร : colloidal chitin 0.5 กรัม, agar 2 กรัม) หยด crude enzyme ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเท่ากัน เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ตรวจสอบกิจกรรมการย่อยไคตินของเอนไซม์ chitinase โดยสังเกตจากการเกิดวงใส (clear zone) เมื่อย้อมด้วยสารละลาย congo red ซึ่งเททับและวางทิ้งไว้นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย NaCl จากนั้นล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง สังเกตดูการเกิดวงใส (clear zone) พบว่า เอนไซม์มีกิจกรรมที่ดี โดยตรวจพบการย่อยบนอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ ดังภาพที่ 22

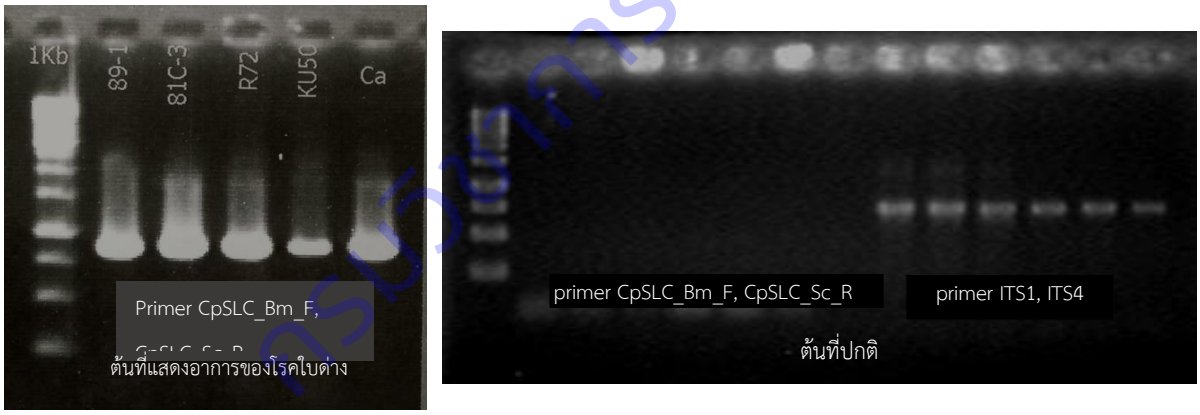
ภาพที่ 22 การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ไคติเนสในระบบถังหมักขนาดเล็ก และการทดสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ chitinase ที่ผลิตได้ด้วยวิธี Bioassay plate technique

กรมวิทยาศาสตร์

2. การศึกษาประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีผลต่อการเกิดโรคใบด่างมันสำปะหลัง

จากการทดสอบนำท่อนมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่าง มาทำการตรวจสอบยืนยันผลด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะใช้คู่ไพรเมอร์ CpSLC_Bm_F, CpSLC_Sc_R ซึ่งมีความจำเพาะกับยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อสาเหตุโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง ดังภาพที่ 23 นำท่อนพันธุ์มันสำปะหลังมาฆ่าเชื้อที่ผิวรอบนอกด้วย Clorox 20% ใช้กระดาษอเนกประสงค์ซับให้แห้ง จากนั้นตัดต้นมันสำปะหลังให้มีความยาวท่อนละประมาณ 7 เซนติเมตร แช่โคนท่อนมันมันสำปะหลังลงในสารทดสอบในที่มืด เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปลูกลงในดินปลูก นำไปเพาะเลี้ยงในตู้ Plant Growth Chamber ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส และรดน้ำทุกวัน ดังภาพที่ 24

ผลการทดสอบสารออกออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีแนวโน้มสร้างความทนทานให้ท่อนมันสำปะหลังที่ติดเชื้อ SLCMV สามารถเจริญเติบโตได้ดี มีระดับเปอร์เซนต์การเกิดโรค ≤25% ได้แก่ bacterial culture (*Bacillus* sp.) เอนไซม์ไคติเนส (recombinant *E. coli*) สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท ALA skim milk ascobic acid และ Thiamime เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่น) ซึ่งมีการเจริญเติบโตน้อยและแสดงอาการของโรคใบด่างรุนแรงกว่า ดังตารางที่ 1

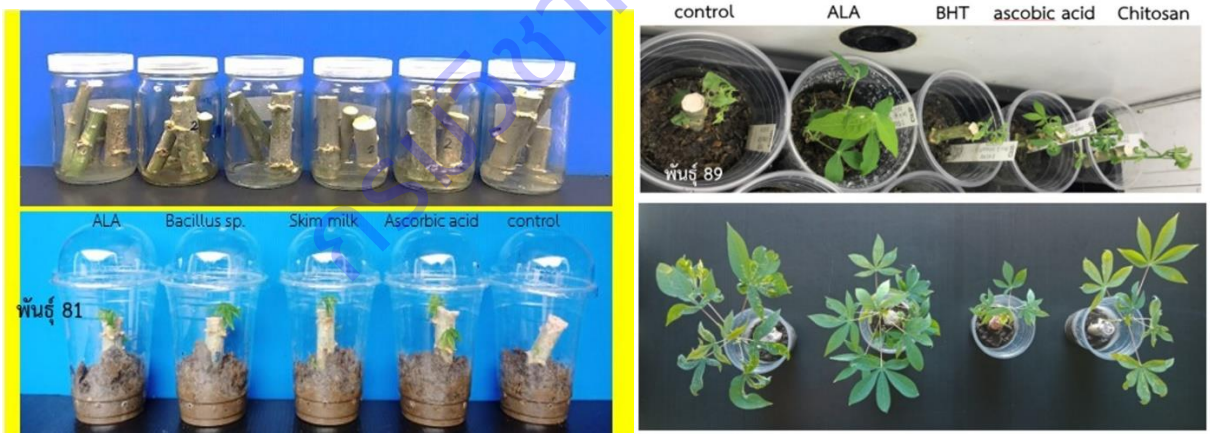


ภาพที่ 23 การตรวจสอบโรคใบด่างมันสำปะหลัง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CpSLC_Bm_F, CpSLC_Sc_R ซึ่งมีความจำเพาะกับเชื้อสาเหตุโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง ได้ผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดประมาณ 780 คู่เบส และไพรเมอร์ ITS1, ITS4

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 ผลของสารออกออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่ติดเชื้อ SLCMV

ชนิดสาร	ระดับความรุนแรงของโรค
H2O (control)	100%
Ascorbic acid 0.1M	<25%
Skim milk 1 mg/ml	<25%
Bacillus sp.	25%
Chitinase	25%
ALA 0.3 mM	<25%
สารสกัดโปรตีนถั่วเหลือง	25%
BHT 1 mg/L	50%
SHAM 0.1M + Salicylic acid 0.1M	-
Chitosan 3%	50%
Thiamine hydrochloride 0.1M	<25%

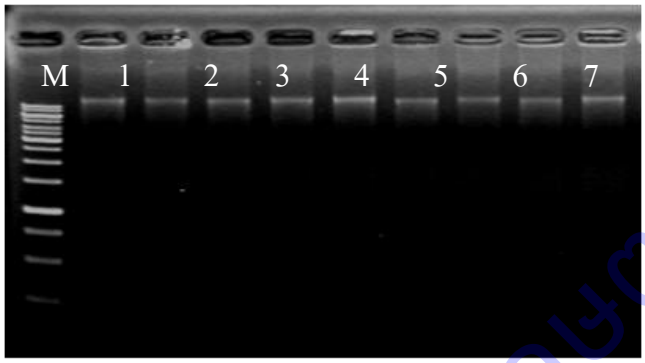


ภาพที่ 24 การทดสอบการแช่ท่อนพันธุ์ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเพาะทดสอบการเจริญเติบโต

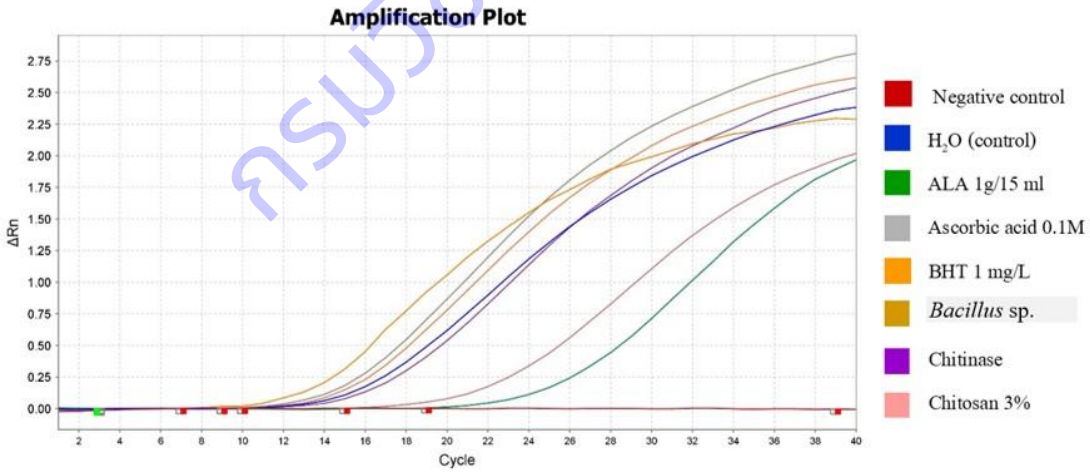
ลิขสิทธิ์การเกษตร

3. การวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณของเชื้อด้วยเทคนิค Real-time PCR

การตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่าง ที่ผ่านการแช่ท่อนพันธุ์ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากข้อ 2 เมื่อนำใบมันสำปะหลังใบที่ 3 นำมาสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด (total DNA) มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เท่ากันทุกตัวอย่าง ดังภาพที่ 25 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสสาเหตุ โดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QuantStudio™ 5 Real time PCR (Applied Biosystems® USA) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CpSLC_Bm_F, CpSLC_Sc_R ซึ่งมีความจำเพาะกับเชื้อสาเหตุโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง ได้ผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดประมาณ 780 คู่เบส โดยพบว่า การแช่ท่อนพันธุ์ในสาร Chitinase ALA 0.3 mM และ Chitosan 3% ส่งผลให้การเพิ่มปริมาณเชื้อเกิดขึ้นในจำนวนรอบที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ไม่แช่สาร) ดังภาพที่ 26



ภาพที่ 25 ดีเอ็นเอที่เจือจางความเข้มข้นเท่ากันที่ 50 นาโนกรัม สำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QuantStudio™ 5 Real time PCR (Applied Biosystems® USA)



ภาพที่ 26 กราฟ Amplification plot ที่แสดงการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ SLCMV ในท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง ที่ผ่านการแช่ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี RNAi เพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาว *Bemisia tabaci*

1. การเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวยาสูบในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดสอบ Bioassay

เพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือนด้วยอาหารธรรมชาติคือต้นมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่แมลงหวี่ขาวชอบเช่น CMR89 และมะเขือเปราะเจ้าพระยาซึ่งมีรายงานว่าเป็นพืชที่แมลงหวี่ขาวชอบในโรงเรือนที่ปิดมิดชิดด้วยตาข่ายที่มีความละเอียดสูง ขยายประชาการแมลงหวี่ขาวได้จำนวนเพียง 500 ตัวต่อรุ่น จะต้องหาแมลงหวี่ขาวจากแหล่งอื่นมาทดสอบ

2. ศึกษา สืบค้นและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางชีววิทยาของแมลงหวี่ขาว

ตารางที่ 2 การศึกษาสืบค้นและวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางชีววิทยาของแมลงหวี่ขาว

ยีน ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางสรีระวิทยาของแมลงหวี่ขาวยาสูบ	**หน้าที่ของยีนในแมลง**
Acetylcholine receptor subunit **α**(D**α** ex5)	เกี่ยวข้องกับระบบการแลกเปลี่ยนแร่ธาตุในตัวแมลง
Alpha glucosidase 1	เกี่ยวข้องกับการใช้น้ำตาลกลูโคสในแมลง
Aquaporin 1	เกี่ยวข้องกับระบบการส่งน้ำในตัวแมลง
cyclophilin B	เกี่ยวข้องกับระบบต่อมไร้ท่อในแมลง
Heat shock protein 70	ทำให้แมลงตายจากอุณหภูมิสูง
Trehalase1	การย่อยน้ำตาลในแมลง
Trehalose transporter1	การขนส่งน้ำตาลในแมลง

3. ออกแบบโมเลกุลของ dsRNAs เพื่อทำการ knock down กลุ่มยีนของแมลงหวี่ขาวที่คัดเลือกไว้

ได้ข้อมูลยีนต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการนำไปสร้าง dsRNAs สำหรับควบคุมกำจัดแมลงหวี่ขาวยาสูบ ได้ออกแบบยีนที่สามารถควบคุมแมลงหวี่ขาวได้จำนวน 6 ยีน ได้แก่ 1) Acetylcholine receptor subunit **α** 697 bp 2) Alpha glucosidase 1 621 bp 3) Aquaporin 1 457 bp 4) Heat shock protein 70 491 bp 5) Trehalase1 1112 bp 6) Trehalose transporter1 555 bp

1) Acetylcholine receptor subunit **α** 697 bp

CCTGAAATGCTCGTCCTCTCTCAAGGGCTCCAAATATTTTATGCTGGGACAACTATCCACCACAGCGCGACCT
GGCGGCGATGGGGTGAATCGACTATGGGACCCGACGTGGACGGACAGGCTGAAAACGGACCTGCTGAAATCTT
ACGACAAGTACTCACGACCGACTGAACATCAAAATATCACCACCGTCTACCTTAGCTTGATCCTCCTACATGT
CTCTTTGGATTATAGCAAATCGGAAATGGCGCTTAATTGTTGGCTTCCAATGAGTTGGCAGGACGAGAAGCTG
AAGTGGAATACAAGTGACTACAATGGAATTTCTCGGATTAACATCCCGCAACCCCCCCCCCGTTGCGGGATGT
TAATCCGAGAAATTCCATTGTAGTCACTTGTATTCCACTTCAGCTTCTCGTCCTGCCAACTCATTGGAAGCCA
ACAATTAAGCGCCATTTCCGATTTGCTATAATCCAAAGAGACATGTAGGAGGATCAAGCTAAGGTAGACGGTG
GTGATATTTTGATGTTCAGTCGGTCGTGAGTACTTGTCGTAAGATTTCAGCAGGTCCGTTTTCAGCCTGTCCG
TCCACGTCGGGTCCCATAGTCGATTCACCCCATCGCCGCCAGGTCGCGCTGTGGTGGATAGTTGTCCCAGCAT
AAAATATTTGGAGCCCTTGAGAGAGGACGAGCATTTCAGG

กรมวิชาการเกษตร

2) Alpha glucosidase 1 621 bp

AATGGCGAGACCAAGAATTGCTCTCGCCCGATCTCGACCCGACGAACTACTGGAATTACAACCGGTCGCGGAC
GATGGACCAACCGAATACATATAGATTGATAACAAGGTTCAGGGAGGTCTTCGATTTCTACACGAAGAAAGAG
GGGAAAACAAAAGTACTAATGACAGAAGCATATACAACTCTCGATAGAACAATGGACTATTATCAGTTTGAGG
GGAAACCAGGAGCCCATATGCCATTCAATTTCTTTTTCATCACGCACGTGAGCGGTCGCTCTCCCGCCAAAGA
TTACCAAAAGGCAACCCCCCCCCTTGCCTTTTGGTAATCTTTGGCGGGAGAGCGACCGCTCACGTGCGTGATG
AAAAAGAAATTGAATGGCATATGGGCTCCTGGTTTCCCCTCAAACTGATAATAGTCCATTGTTCTATCGAGAG
TTGTATATGCTTCTGTCATTAGTACTTTTGTTTTCCCCTCTTTCTTCGTGTAGAAATCGAAGACCTCCCTGAA
CCTTGTTATCAATCTATATGTATTCGGTTGGTCCATCGTCCGCGACCGGTTGTAATTCCAGTAGTTCGTCGGG
TCGAGATCGGGCGAGAGCAATTCTTGGTCTCGCCATT

3) Trehalase1 1109 bp

GGAGCCCTCGGTGCTCGGCTACATCCAGGACGGACAGTACCGACGCTTCGCGGCCAAGCTCAACGAGGTCTGG
AAGACCCTCGCCCGCGTCGTCGACCGCGATGTCCTCGAGAACCCGCGCATGCACTCCCTCCTCTACGTCCCCA
ACACCGTCATCATACCTGGAGGTCGTTTCACCGAAGTATATTACTGGGACACCTACTGGATCGTGAAAGGCTT
GCTGCTGTGTGACATGTTCGATACAGCGAAAGGTGTGATAGACAATATCATATATCTAGTCAAAAAGTACGGC
TACATGCTGAACGGGAGCAGGAACTACTACGAGAACCGGTCCCAACCACCGCTGCTCATCCCGATGGTGGCCG
CCTACTATCAGCTCAAACAGGACGAGGCCTGGCTTCTCGAAAATCTCCCGGTTCTGGAGTTGGAGTTCCAATT
TTGGATGAACAACCGCATGATAAACGTGAAAAAGGACGGGAAAACGTATCGAATGGCGCATTACAGTGTCGAA
ACGTGCGGACCCAGGCCGGAATCATTCAAGGAGGATTTCCCCCCCCCCGAAATCCTCCTTGAATGATTCCGGC
CTGGGTCCGCACGTTTCGACACTGTAATGCGCCATTCGATACGTTTTCCCGTCCTTTTTCACGTTTATCATGC
GGTTGTTCATCCAAAATTGGAACTCCAACTCCAGAACCGGGAGATTTTCGAGAAGCCAGGCCTCGTCCTGTTT
GAGCTGATAGTAGGCGGCCACCATCGGGATGAGCAGCGGTGGTTGGGACCGGTTCTCGTAGTAGTTCCTGCTC
CCGTTCAGCATGTAGCCGTACTTTTTGACTAGATATATGATATTGTCTATCACACCTTTCGCTGTATCGAACA
TGTCACACAGCAGCAAGCCTTTCACGATCCAGTAGGTGTCCCAGTAATATACTTCGGTGAAACGACCTCCAGG
TATGATGACGGTGTTGGGGACGTAGAGGAGGGAGTGCATGCGCGGGTTCTCGAGGACATCGCGGTCGACGACG
CGGGCGAGGGTCTTCCAGACCTCGTTGAGCTTGGCCGCGAAGCGTCGGTACTGTCCGTCCTGGATGTAGCCGA
GCACCGAGGGCTCC

4) ยีนที่ 4 Aquaporin 1

GAGCCATCTGTGGAGCAAGGATTCTCCATGAAAGGACGCCAAAAACAGGTTACACGGCTGCTGGTAATCTGGG
AGAAACGACACTGTAAACAGGAGTTTCCGACCTGCAGGGTGTGGCGATGCAAGCACAAAGGACATTTGTGCTG
CTTTAAATTGTCCAGTCCGTCTGCGATGGGAAGCGGACCGACAGGAAAGGATCGATCGGCGTTGCGAAAAGAT
TCGCTCTTCAAGAGAGAGCGAATCTTTTCGCAACGCCGATCGATCCTTTCCTGTCGGTCCGCTTCCCATCGCA
GACGGACTGGACAATTTAAAGCAGCACAAATGTCCTTTGTGCTTGCATCGCCACACCCTGCAGGTCGGAAACT
CCTGTTTACAGTGTCGTTTCTCCCAGATTACCAGCAGCCGTGTAACCTGTTTTTGGCGTCCTTTCATGGAGAA
TCCTTGCTCCACAGATGGCTC

5) ยีนที่ 5 Trehalose transporter1

GGGTGTATGCGTAGCGATGGTGATGACCGGGCGAGCGATCGCCGGGTTCTGCGTGGGGATCGCCTCGCTGGCG
CTGCCGGTCTTCCTGGGCGAGACGGTGCTGCCGGAGGTGCGCGGGATGCTGGGTCTCCTGCCGACGACCCTGA
GGAACATCGGGATCCTCCTGTGCTTCGTGGCCGGCGCCTTCCTCGACTGGTCCATGCTCGCCTTCGCCGGTGC
CCTCATCCCGGTCCCCTTCCTCATCTGCATGTTCTTCATCCCCGAGACCCCTCGTTCAAGAGACGAGGGGTCT
CGGGGATGAAGAACATGCAGATGAGGAAGGGGACCGGGATGAGGGCACCGGCGAAGGCGAGCATGGACCAGTC
GAGGAAGGCGCCGGCCACGAAGCACAGGAGGATCCCGATGTTCCTCAGGGTCGTCGGCAGGAGACCCAGCATC
CCGCGCACCTCCGGCAGCACCGTCTCGCCCAGGAAGACCGGCAGCGCCAGCGAGGCGATCCCCACGCAGAACC
CGGCGATCGCTCGCCCGGTCATCACCATCGCTACGCATACACCC

6) ยีนที่ 6 Heat shock protein 70

CTGCATCACTGGGTGGAAATGATGACAAAAAAATTAAGGATGTTTTGTTGCGCGATATTTCTCCTCTTTCCCT
TGGAATTTATACCAAAAACAACGTATTTTGTGTTTTCCTTGAGAGAAATACCAGGATTCCATGTAAAAAAACA
AGAACCTATCATACCACAGAAGACAACCAGGATGGTTTGGAATCCAGTATCTATGAAGGTGAGCGTGCAGTAT
CCTCTGAGAATCATTTGCTTGTTCAAGAGACAAGCAAATGATTCTCAGAGGATACTGCACGCTCACCTTCATA
GATACTGGATTCCAAACCATCCTGGTTGTCTTCTGTGGTATGATAGGTTCTTGTTTTTTTACATGGAATCCTG
GTATTTCTCTCAAGGAAAACACAAAATACGTTGTTTTTGGTATAAATTCCAAGGGAAAGAGGAGAAATATCGC
AAAACAAAACATCCTTTTTTTTTATGTCATCATTTCCACCCAGTGATGCAG

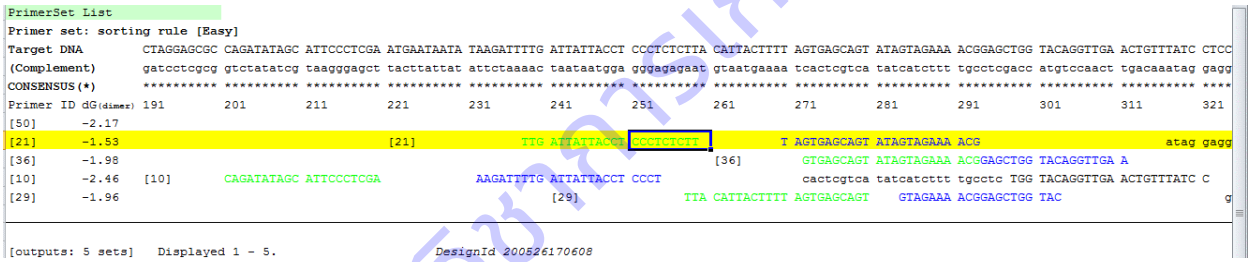
ศรีบัณฑิตวิทยาลัย

กิจกรรมที่ 3 การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างมันสำปะหลังอย่างรวดเร็วภาคสนาม

การทดลองที่ 3.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างมันสำปะหลังภาคสนามโดยใช้เทคนิค Loop mediated isothermal amplification-Lateral flow-Immunochromatographic strip (LAMP-LFICS) เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กและระดับภาคสนาม

1. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในปฏิกิริยา PCR RPA และ LAMP สำหรับใช้ในการตรวจเชื้อ SLCMV ที่เป็นสาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลัง

ดำเนินการออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้สามารถทำปฏิกิริยา PCR RPA และ ตำแหน่ง outer ของ LAMP โดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลของเชื้อพันธุกรรม SLCMV-KU (Siriwan et al, 2020) และ SLCMV-DO1 (ภูวนารถ และคณะ, 2562) ซึ่งออกแบบจากบริเวณ AV1 gene ของเชื้อ Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากเชื้อ SLCMV-KU มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ SLCMV/F-KU : 5'-ATGTCGAAGCGA CCAGCAGATATAAT-3' และ SLCMV/R-KU : 5'-TTAATTGCTGACCGAATCGTAG AAG-3' ขนาดประมาณ 771 bp และไพรเมอร์ที่ออกแบบจากเชื้อ SLCMV-DOA1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ SLCMV/F-M : 5'-TGTAATTCTCAAA AGTTACAGTC-3'และ SLCMV/R-M : 5'- ATATGGACCACA TCGTGTC-3' ขนาดประมาณ 600 bp เพื่อใช้ในการทดสอบในการตรวจหาเชื้อ SLCMV ด้วยปฏิกิริยา PCR RPA และ outer LAMP

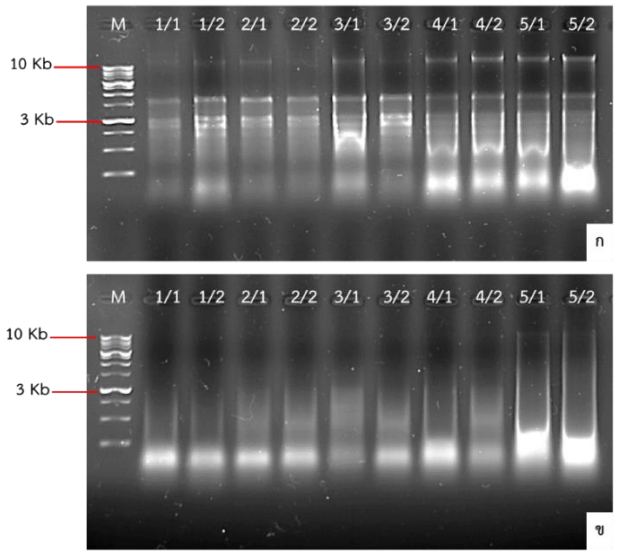


ภาพที่ 27 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในเทคนิค Loop mediated isothermal amplification-Lateral flow-Immunochromatographic strip (LAMP-LFICS) เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กและระดับภาคสนาม สำหรับใช้ในการตรวจเชื้อ SLCMV ที่เป็นสาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลัง

2. การเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ด้วยวิธี Lysis buffer และชุดสกัด DNA พืชอย่างง่าย

จากการทดลองการสกัด DNA ด้วยวิธี Lysis buffer และชุดสกัด DNA พืชอย่างง่าย โดยใช้ใบมันสำปะหลังปริมาณ 0.1 กรัม ดำเนินการสกัด DNA ตามขั้นตอนการสกัด DNA ด้วยวิธี Lysis buffer และชุดสกัด DNA พืชอย่างง่าย ผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัด DNA ด้วยวิธี Lysis buffer ให้คุณภาพของการสกัด DNA ที่ดีกว่าวิธีการใช้ชุดสกัด DNA พืชอย่างง่าย ดังแสดงในภาพที่ 28ก คือวิธีการสกัด DNA ด้วยวิธี Lysis buffer ที่ทำให้เห็นแถบ Genomic DNA ของมันสำปะหลังที่ชัดเจนกว่าวิธีการใช้ชุดสกัด DNA พืชอย่างง่าย ดังแสดงในภาพที่ 1ข และจากผลการตรวจวัดคุณภาพ DNA ด้วยเครื่อง Thermo Multiskan Go 1510 Sky Microplate Xenon UV/VIS Spectrophotometer Nanodrop (Thermo Scientific™, 2012) พบว่าวิธีการสกัด DNA ด้วยวิธี Lysis buffer ให้คุณภาพของ DNA ดีกว่าชุดสกัด DNA พืชอย่างง่าย ดังตารางที่ 3

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 28 ก. แสดงแถบ DNA จากการสกัด DNA ด้วยวิธี Lysis buffer และ ข. แสดงแถบ DNA จากการสกัด DNA ด้วยชุดสกัด DNA พืชอย่างง่าย เมื่อ M= 1 Kb DNA Ladder และ 1/1-5/2=ตัวอย่างใบมันสำปะลัง

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวัดคุณ DNA ที่ได้จากการทดลองการสกัด DNA ด้วยวิธี Lysis buffer และชุดสกัด DNA พืชอย่างง่าย

วิธีการสกัด DNA	ตัวอย่าง	คุณภาพDNA	ความเข้มข้น
การสกัด DNA ด้วยวิธี Lysis buffer	S1/1	1.95	202.50
	S1/2	1.98	561.25
	S2/1	2.19	285.00
	S2/2	2.06	255.96
	S3/1	2.12	1017.88
	S3/2	2.06	554.61
	S4/1	2.02	837.59
	S4/2	2.05	849.71
	S5/1	2.07	848.17
	S5/2	2.06	1168.65
	K1/1	1.14	1786.73
การสกัด DNA ด้วยชุดสกัด DNA พืชอย่างง่าย	K1/2	1.45	1480.76
	K2/1	1.06	1555.24
	K2/2	1.17	1132.35
	K3/1	1.59	442.54
	K3/2	1.56	805.43
	K4/1	1.50	1099.27
	K4/2	1.65	537.74
	K5/1	1.82	1375.24
	K5/2	1.97	1297.54

กรมวิชาการเกษตร

3. การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ออกแบบ

นำไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบจากข้อที่ 3.1.1 มาทดสอบเพื่อหาสภาพวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเชื้อ SLCMV โดยพบว่าปฏิกิริยา PCR และ outer LAMP ที่เหมาะสมควรมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

GoTaq® Reaction Buffer	2	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ forward 1 µM	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Reverse 1 µM	1	ไมโครลิตร
25 µM $MgCl_2$	0.8	ไมโครลิตร
10 µM dNTPs	0.2	ไมโครลิตร
DNA 100 ng	1	ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase	0.25	ไมโครลิตร
dH_2O	2.25	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์

Pre-denaturation	94	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
Annealing	56	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
Extension	72	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 45 วินาท
Final extension	72	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที

Three step-cycling 35 cycles

และนำไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบจากข้อที่ 3.1.1 มาทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเชื้อ SLCMV โดยทำปฏิกิริยา RPA ในชุดปฏิกิริยา Twistamp™ Basic Kit Quick Guide ซึ่งมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา ดังนี้

Set-up (single-plex)

ไพรเมอร์ Forward (10 µM)	2.4	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Reverse (10 µM)	2.4	ไมโครลิตร
Primer Free Rehydration buffer	29.5	ไมโครลิตร
Template 100 ng	13.2	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	47.5	ไมโครลิตร

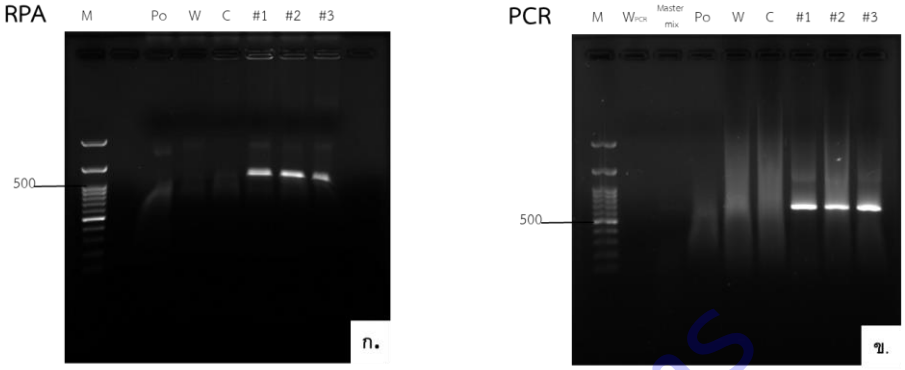
Kit Positive Control Set-up (single-plex)

Positive Control primer mix	2.4	ไมโครลิตร
Primer Free Rehydration buffer	29.5	ไมโครลิตร

กรมวิชาการเกษตร

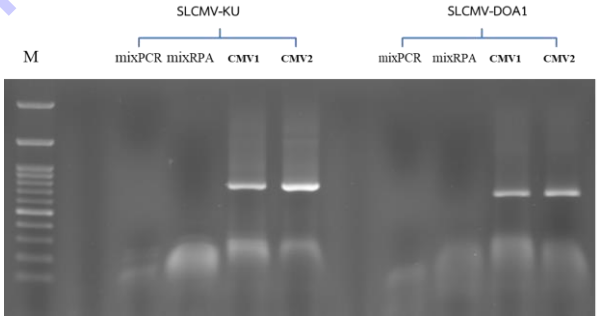
Positive Control DNA template	1	ไมโครลิตร
dH_2O	9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	47.5	ไมโครลิตร

จากนั้นเติมองค์ประกอบปฏิกิริยาลงในหลอด Twistamp™ Basic Kit และใช้ไมโครปิเปตผสมให้ เข้ากัน และเติม 280 mM Magnesium Acetate (MgOAc) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งผลการการทำปฏิกิริยา RPA และ PCR ดังแสดงในภาพที่ 29



ภาพที่ 29 ผลการทดสอบเพื่อหาสภาพวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเชื้อ SLCMV โดย ก. ผลผลิตของปฏิกิริยา RPA ในการตรวจตัวอย่างใบด่างมันสำปะหลัง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ SLCMV-DOA1 โดยใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ 10 µM และ ข ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจตัวอย่างใบด่างมันสำปะหลัง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ SLCMV-DOA1 โดยใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ 10 µM โดยที่ Po = Positive control, W= water, C= ตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่ไม่เป็นโรค และ #1-#3= ตัวอย่างใบด่างมันสำปะหลังที่ไม่เป็นโรค

จากนั้นทำการยืนยันผลการการทดสอบประสิทธิภาพของคู่ไพรเมอร์ SLCMV-KU และ SLCMV-DOA1 อีกครั้งด้วยการนำเอาตัวอย่างที่ให้ผลบวกในปฏิกิริยา RPA มาทำปฏิกิริยาซ้ำด้วยเทคนิค PCR พบว่าตัวอย่างดังกล่าวยังคงให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวกในการทดสอบซ้ำ ดังภาพที่ 30



ภาพที่ 30 ผลการการทดสอบประสิทธิภาพของคู่ไพรเมอร์ SLCMV-KU และ SLCMV-DOA1 อีกครั้งด้วยการนำเอาตัวอย่างที่ให้ผลบวกในปฏิกิริยา RPA มาทำปฏิกิริยาซ้ำด้วยเทคนิค PCR เมื่อ mixPCR=ตัวควบคุมปฏิกิริยาเชิงลบในปฏิกิริยา PCR, mixRPA=ตัวควบคุมปฏิกิริยาเชิงลบในปฏิกิริยา RPA และ CMV1-CMV2=ตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่เป็นโรค

กรมวิชาการเกษตร

3.1.4 การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์และโพรบที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

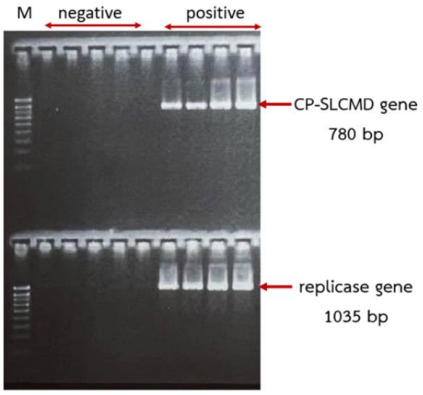
ทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของชุดไพร์เมอร์ที่ออกแบบมากับตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค ด้วยเทคนิค PCR โดย ใช้ความเข้มข้น DNA ของตัวอย่างที่สกัดได้ที่ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตรเพื่อศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ในลำดับเบื้องต้น ผลการทดสอบพบว่า ไพรเมอร์มีความจำเพาะสามารถตรวจจับตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรคไวรัสใบด่างได้ 100 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3.2 การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างมันสำปะหลังอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค Immunochromatographic strip (ICS) เพื่อเกษตรกร

1. การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase ของไวรัส SLCMD

สังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase จากไวรัส SLCMD ในใบมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง พบแถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase ขนาด 780 และ 1035 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 31) เมื่อเปรียบเทียบการเรียงลำดับสารพันธุกรรมของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase กับฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BLAST (Basic Alignment Search Tool) พบว่าการเรียงลำดับสารพันธุกรรมของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ เหมือนกับยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของ Sri Lankan cassava mosaic virus (accession No. AGI16832.1) 99.61 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยีน replicase ที่สังเคราะห์ได้ เหมือนกับยีน AC1 (Replication associated protein/Rep) (accession No. MN026160.1) ถึง 100 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นนำการเรียงลำดับสารพันธุกรรมที่ได้แปรรหัสเป็นโปรตีนด้วยโปรแกรม ExPASy Proteomics tools พบว่า ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase ที่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 256 และ 344 ตัว และนำลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ coat protein [Sri Lankan cassava mosaic virus] (accession No. AVK71677.1) และยีน replication-associated protein [Sri Lankan cassava mosaic virus] (accession No. AYH63714.1) ถึง 99.22 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29.83 และ 38.86 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

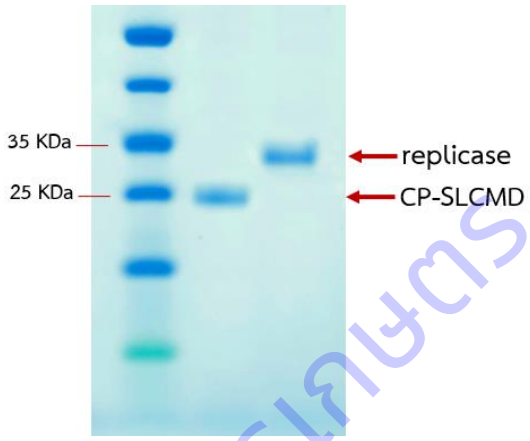


ภาพที่ 31 แถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase จากไวรัส SLCMD ในใบมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง ขนาด 780 และ 1035 คู่เบส ตามลำดับ

กรมวิชาการเกษตร

2. โคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase ของไวรัส CMD เพื่อโคลนยีนเข้ากับ expression vector

ทำการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase ด้วยไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งของเอนไซม์ *Bam* HI ด้านปลาย 5’ และเอนไซม์ *Sac* I ด้านปลาย 3’ และนำชิ้นดีเอ็นเอโคลนเข้ากับพลาสมิดพาหะ pQE80L คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มี recombinant plasmid และชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และโปรตีน replicase ด้วย SDS-PAGE พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และโปรตีน replicase ที่ได้ มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับที่คำนวณไว้ (ภาพที่ 32) เพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสองชนิดและสกัดให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อไป



ภาพที่ 32 รีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และรีคอมบิแนนท์โปรตีน replicase ที่ผลิตได้จากเซลล์ *E. coli*

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 การเพิ่มศักยภาพการผลิตสารสำคัญให้ปลอดภัยจากสารปนเปื้อนในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาการผลิตขมิ้นชันหัวจิ๋ว และชักนำการสะสมสารสำคัญในสภาพปลอดเชื้อ

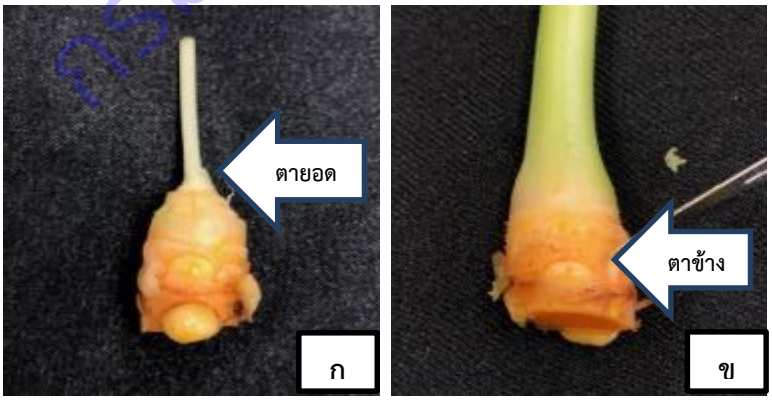
การทดลองที่ 1.1 เทคนิคการผลิตขมิ้นชันหัวจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ

1. เทคนิคการผลิตขมิ้นชันหัวจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ

นำเหง้าขมิ้นชันจากแปลงปลูกของ ศวส.ตรัง และแปลงเกษตรกร จ.พังงา มาเพาะเลี้ยงในตะกร้าพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกดินเผาซึ่งสามารถดูดความชื้นเพื่อให้เหง้าสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ และลดการปนเปื้อนเชื้อจากดิน (ภาพที่ 33) การเกิดของยอดขมิ้นชันในโรงเรือนใช้ระยะเวลา 3-4 เดือน จะได้ต้นขมิ้นชันที่มีความสูงประมาณ 10 เซนติเมตร นำต้นที่ได้เข้าสู่ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การฟอกฆ่าเชื้อต้นขมิ้นชันเพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการนำต้นขมิ้นชันที่มีความสูงประมาณ 10 เซนติเมตร เข้าสู่ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยชิ้นส่วนที่จะใช้ในการขยายพันธุ์คือ ชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนตาข้าง (ภาพที่ 34)

ภาพที่ 33 การเพาะเหง้าขมิ้นชันด้วยวัสดุปลูกดินเผาในโรงเรือน



ภาพที่ 34 ชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของขมิ้นชัน ที่ใช้ในการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ก. ตายอด

ข. ตาข้าง

กรมวิชาการเกษตร

นำต้นอ่อนขมิ้นชันที่แตกจากเหง้าของขมิ้นชันมาการฟอกฆ่าเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1) นำต้นขมิ้นชันมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน ตัดต้นขมิ้นชันให้เหลือความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ลอกกาบใบชั้นแรกออก

2) นำชิ้นส่วนต้นขมิ้นชันมาล้างน้ำไหล ระยะเวลานาน 30 นาที

3) แช่ชิ้นส่วนต้นขมิ้นชันด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ระยะเวลา 1 นาที

4) นำชิ้นส่วนต้นขมิ้นชันเข้าตู้ปลอดเชื้อ ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) Haiter ® ที่ความเข้มข้น 30% ระยะเวลา 30 นาที ในครั้งที่ 1

5) ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แล้วตัดแต่งนำลอกชิ้นส่วนกาบใบออก 1-2 ชั้น

6) นำชิ้นส่วนต้นขมิ้นชันมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) Haiter ® ที่ความเข้มข้น 10% ระยะเวลา 15 นาที ในครั้งที่ 2

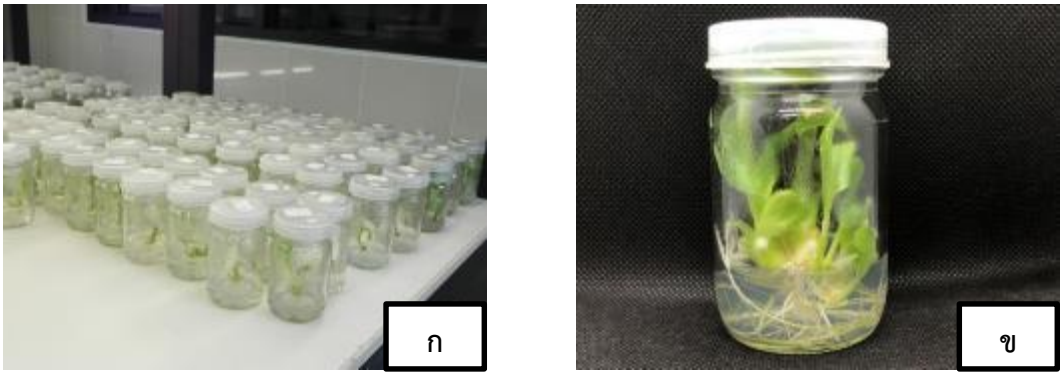
7) ล้างชิ้นส่วนต้นขมิ้นชันด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

8) จากนั้นลอกกาบใบออกให้เหลือกาบใบน้อยที่สุดสำหรับชิ้นส่วนตายอด (ภาพที่ 36) และเจาะส่วนตาข้างซึ่งอยู่ที่บริเวณฐานของชิ้นส่วน นำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เมื่อได้ต้นขมิ้นชันที่ปลอดเชื้อ นำต้นขมิ้นชันไปเลี้ยงบนสูตรอาหารเพื่อการเพิ่มปริมาณต่อไป

ภาพที่ 36 ชิ้นส่วนตายอดของต้นขมิ้นชัน เมื่อผ่านขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ

การเพิ่มปริมาณต้นขมิ้นชันโดยเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ใส่น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ วุ้นผง (phytagel) 3 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงระยะเวลานาน 3 เดือน พบว่ามีอัตราเกิดยอดใหม่เฉลี่ย 4.4 ต้น ต้นขมิ้นชันที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะแข็งแรงและมีรากอย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 37) พร้อมสำหรับการทดสอบในขั้นตอนการกระตุ้นเพิ่มการเพิ่มปริมาณสารสำคัญ

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 37 การเพิ่มปริมาณต้นขมิ้นชันบนอาหารแข็ง

ก. ต้นขมิ้นชันเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับ BA 3 mg/l ระยะเวลา 1 เดือน

ข. ต้นขมิ้นชันเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับ BA 3 mg/l ระยะเวลา 3 เดือน

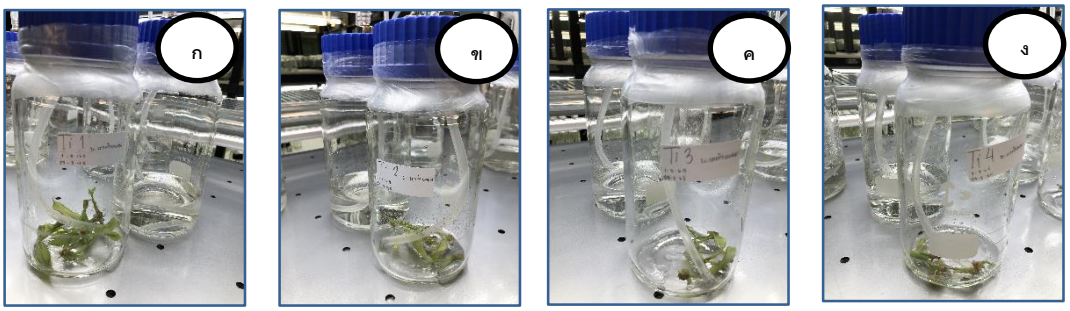
2. ศึกษาสภาพและความเข้มข้นของสูตรอาหารหลักต่อการสร้างเหง้าจิ๋วของขมิ้นชัน

นำต้นขมิ้นชันที่เพิ่มปริมาณได้ โดยเลือกใช้ต้นขมิ้นชันที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาเลี้ยงทดสอบสูตรอาหารหลัก MS ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบการสร้างเหง้าจิ๋วของขมิ้นชัน โดยการใช้สูตรอาหารเหมือนกันแตกต่างกัน คือเป็นอาหารเหลวหรืออาหารแข็ง ทำการทดสอบในสูตรอาหาร MS หรือ ½ MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 หรือ 50 g/l

เมื่อทดสอบในสูตรอาหารระยะเวลา 2 เดือน พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวต้นขมิ้นชันจะมีลักษณะฉ่ำน้ำ ใบกรอบ และใบเหลือง (ภาพที่ 38) ส่วนในอาหารแข็งต้นขมิ้นชันจะมีเจริญเติบโตปกติ มีการแตกใบใหม่และเกิดราก โดยในอาหาร MS ความเข้มข้น 1 เท่า จะเกิดรากได้เร็วกว่าและรากมีความยาวกว่าในอาหาร ½ เท่า (ภาพที่ 38) เมื่อระยะเวลา 3 เดือน พบว่า สูตรอาหารของทั้ง 4 กรรมวิธี ต้นขมิ้นชันสามารถเจริญเติบโตได้ดี มีการแตกกอ และมีรากเกิดขึ้น (ภาพที่ 39) โดยในสูตรอาหาร MS ความเข้มข้น 1 เท่า ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 g/l ต้นจะมีการเจริญเติบโตมีความสูงของต้นมากที่สุด (ภาพที่ 40ก) สูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 50 g/l ต้นขมิ้นชันจะมีสีค่อนข้างเหลือง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 g/l (ภาพที่ 40)

การทดสอบการพัฒนาการเกิดเหง้าจิ๋วของขมิ้นชันในอาหารแข็งสูตรอาหารต่างๆ จำนวน 4 กรรมวิธี เช่นเดียวกับอาหารเหลว พบว่า ระยะเวลา 2 เดือน ในสูตรอาหาร MS ที่มีความเข้มข้น 1 เท่า จะเกิดรากได้เร็วกว่าและมีความยาวรากมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร ½ MS (ภาพที่ 41) เมื่อเพาะเลี้ยงระยะเวลานาน 3 เดือน สูตรอาหาร MS ความเข้มข้น 1 เท่า ต้นขมิ้นชันจะเจริญเติบโตและแตกกอได้มากกว่าในอาหารสูตร ½ MS (ภาพที่ 42 ก,ข) และในการพัฒนาการเกิดเหง้าจิ๋ว พบว่า ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 50 g/l จะมีการพัฒนารากเป็นขนาดใหญ่ มีสีขาวซึ่งจะพัฒนาเป็น micro rhizome ได้ (ภาพที่ 43 ข,ง)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 38 ต้นขมิ้นชันที่ทดสอบการเจริญเติบโตและเกิดเหง้าจิ๋วในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ระยะเวลา 2 เดือน

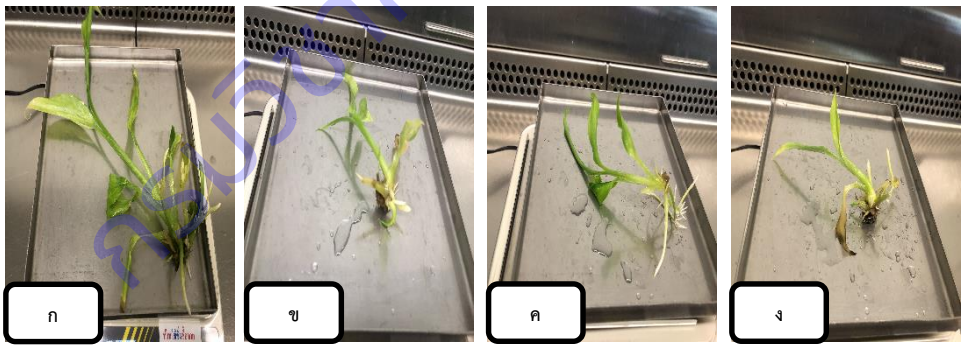
ก. ต้นขมิ้นชันในอาหาร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 g/l

ข. ต้นขมิ้นชันในอาหาร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 50 g/l

ค. ต้นขมิ้นชันในอาหาร ½ MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 g/l

ง. ต้นขมิ้นชันในอาหาร ½ MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 50 g/l

ภาพที่ 39 ต้นขมิ้นชันเมื่อเลี้ยงทดสอบในอาหารเหลวในสูตรอาหาร MS หรือ ½ MS ระยะเวลานาน 3 เดือน



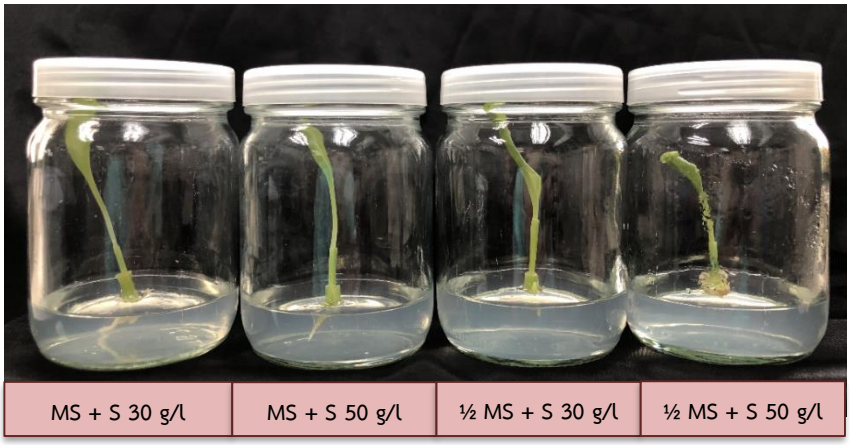
ภาพที่ 40 การเจริญเติบโตด้านความสูงของต้นขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ระยะเวลา 3 เดือน

ก. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 g/l

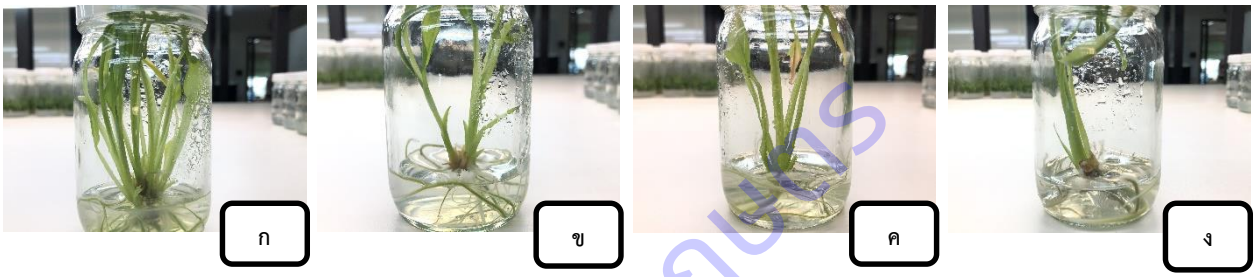
ข. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 g/l

ค. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½ MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 g/l

ง. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½ MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 g/l



ภาพที่ 41 ต้นขมิ้นชันที่ทดสอบการเจริญเติบโตและเกิดเหง้าจิ๋วในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ระยะเวลา 2 เดือน



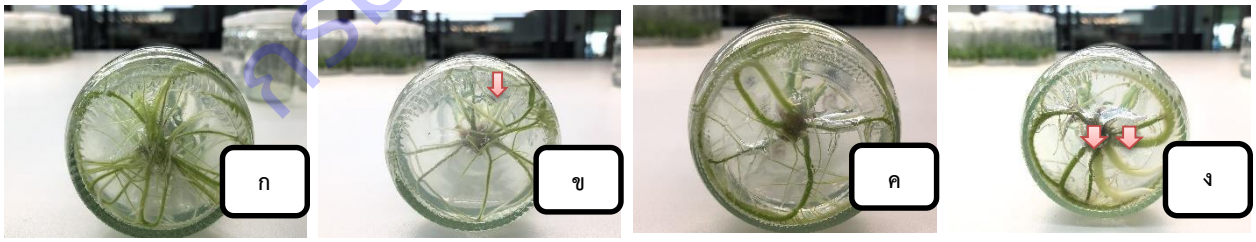
ภาพที่ 42 การเจริญเติบโตด้านความสูงของต้นขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่างๆ ระยะเวลา 3 เดือน

ก. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 g/l

ข. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 g/l

ค. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร ½ MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 g/l

ง. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร ½ MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 g/l



ภาพที่ 43 การเกิดรากขนาดใหญ่ที่พัฒนาเป็น micro rhizome (ลูกศรชี้) ของต้นขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่างๆ ระยะเวลา 3 เดือน

ก. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 g/l

ข. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 g/l

ค. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร ½ MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 g/l

ง. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร ½ MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 g/l

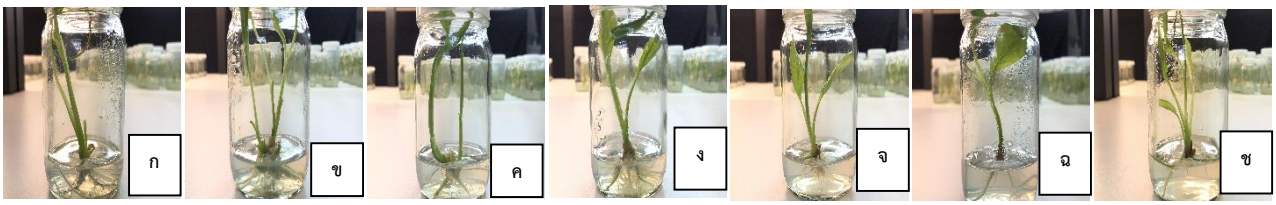
กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2 การชักนำให้ขมิ้นชันหัวจิ๋วสะสมสารสำคัญในสภาพปลอดเชื้อ

1. ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสะสมสารสำคัญในเหง้าจิ๋วของขมิ้นชัน

นำต้นขมิ้นชันที่ปลอดเชื้อซึ่งมีขนาดต้นใกล้เคียงกันมาทดสอบในสูตรอาหารเพื่อการชักนำสารสำคัญ โดยสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ได้แก่ BA, Methyl jasmonate และ Salicylic acid เพื่อการสะสมสารสำคัญของขมิ้นชัน พบว่า

เมื่อทดสอบในสูตรอาหารได้ 2 เดือน พบว่า การเจริญเติบโตในส่วนต้นและรากไม่แตกต่างกันเมื่อทดสอบในสูตรอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกัน (ภาพที่ 44) เมื่อครบระยะเวลาจะนำไปตรวจปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค UHPLC เพื่อหาปริมาณสาร curcumin ต่อไป



ภาพที่ 44 การเจริญเติบโตของต้นขมิ้นชันในการทดสอบสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อการกระตุ้นสารสำคัญ

ก. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงทดสอบในอาหารสูตร MS (control)
ข. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงทดสอบในอาหารสูตร MS + BA 3 mg/l
ค. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงทดสอบในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/l
ง. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงทดสอบในอาหารสูตร MS + Methyl jasmonate 3 mg/l
จ. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงทดสอบในอาหารสูตร MS + Methyl jasmonate 5 mg/l
ฉ. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงทดสอบในอาหารสูตร MS + Salicylic acid 3 mg/l
ช. ต้นขมิ้นชันที่เลี้ยงทดสอบในอาหารสูตร MS + Salicylic acid 5 mg/l

กิจกรรมที่ 2 เทคนิคการผลิตโปรโตคอร์มจากกล้วยไม้สกุลหวายในระบบไบโอรีแอคเตอร์และชักนำการสะสมสารสำคัญมอสคาติลิน

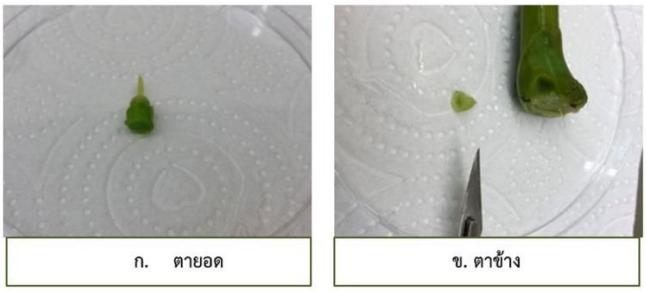
การทดลองที่ 2.1 เทคนิคการผลิตโปรโตคอร์มจากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย

นำต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุลมาเลี้ยงในโรงเรือน เพื่อให้เกิดหน่ออ่อน ใช้ชิ้นส่วนหน่ออ่อนกล้วยไม้มาฟอกฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการตามขั้นตอน ดังนี้

1) นำหน่ออ่อนมาล้างทำความสะอาด ด้วยน้ำยาล้างจาน และการเปิดน้ำไหล นาน 10 นาที
2) ลอกกาบหุ้มหน่อออก1-2 ชั้น
3) ตัดแยกส่วนยอด และส่วนโคนต้นของหน่ออ่อน
4) นำชิ้นส่วนยอด และส่วนโคนต้นแช่ในแอลกอฮอล์ 70% ระยะเวลา 1 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ
5) นำชิ้นส่วนยอดและโคน เขย่าในสารละลาย sodium hypochlorite (Haiter ®) ความเข้มข้น 10% ระยะเวลา 15 นาที (ครั้งที่ 1)

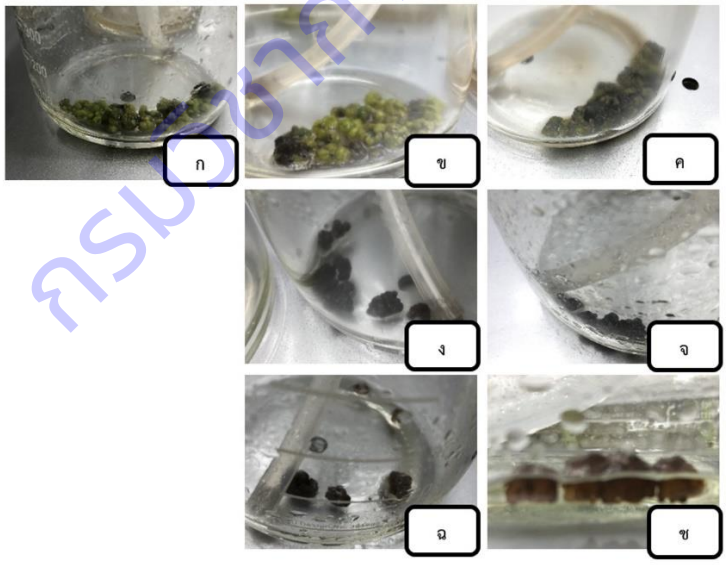
กรมวิชาการเกษตร

6) นำชิ้นส่วนยอดและโคน เขย่าในสารละลาย sodiumhypochloride (Haiter ®) ความเข้มข้น 5% ระยะเวลา 10 นาที (ครั้งที่ 2)
7) ล้างน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง
8) ตัดชิ้นส่วน ตายอด และ ตาข้าง (ภาพที่ 45 ก,ข)
9) นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว บน shaker ระยะเวลานาน 4-6 เดือน (เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์)



ภาพที่ 45 ชิ้นส่วนของตายอด (ก) และตาข้าง (ข) จากหน่ออ่อนของต้นกล้วยไม้เพื่อชักนำโปรโตคอร์ม (plbs)

จากนั้นนำโปรโตอคอร์ม (plbs) มาทดสอบในสูตรอาหารจำนวน 3 สูตรอาหารร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด เพื่อการเพิ่มปริมาณ plbs ในอาหารเหลว พบว่า สูตรอาหาร VW ทำให้ plbs สามารถสามารถเจริญเติบโตได้ มีสีเขียว (ภาพที่ 16ก) และเมื่อทดสอบร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ความเข้มข้ม 0.5 mg/l มีผลให้ plbs สามารถเพิ่มปริมาณได้ (ภาพที่ 46ข) สำหรับสูตรอาหาร ½ MS และสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม BA หรือ TDZ พบว่า plbs ไม่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้ โดยเมื่อเลี้ยงระยะเวลา 1 เดือน plbs จะเปลี่ยนเป็นสีดำ และจะตายในที่สุด (ภาพที่ 46 ง,จ,ฉ,ช)



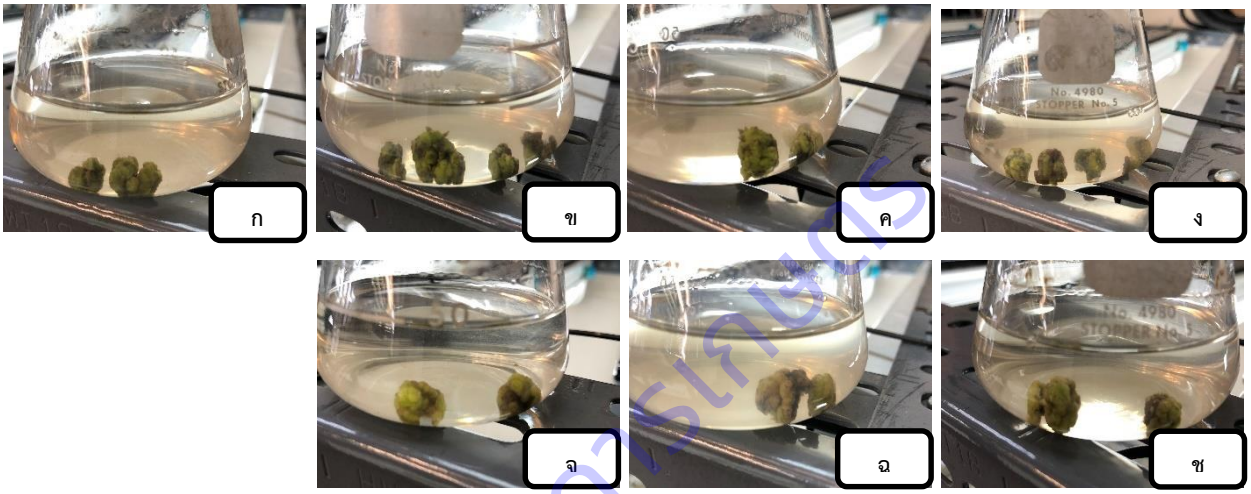
ภาพที่ 46 การทดสอบสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตของ plbs กล้วยไม้ เพื่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณ plbs

ก. สูตรอาหาร VW (control)
ข. สูตรอาหาร VW ร่วมกับ BA 0.5 mg/l
ค. สูตรอาหาร VW ร่วมกับ TDZ 1 mg/l
ง. สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ BA 0.5 mg/l
จ. สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ TDZ 1 mg/l
ฉ. สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA 0.5 mg/l
ช. สูตรอาหาร MS ร่วมกับ TDZ 1 mg/l

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2 การชักนำการสะสมสารสำคัญมอสคาติลินในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายในระบบ Bioreactor

นำ plb ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาทดสอบสารควบคุมการเจริญเติบโตจำนวน 2 ชนิด คือ Methyl jasmonate และ Salicylic acid ที่มีความเข้มข้น 3 ระดับ เพื่อทดสอบการเพิ่มของปริมาณสารสำคัญ Moscatilin พบว่า ระยะเวลาการเลี้ยงทดสอบ 1 เดือน plbs ที่เลี้ยงในสูตรอาหารทั้ง 7 สูตร ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกัน โดย plbs ยังมีสีเขียว แต่ไม่มีการเพิ่มปริมาณของ plbs (ภาพที่ 47) เมื่อทดสอบนาน 2 เดือน พบว่า plbs เริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำ ซึ่งเกิดจากสูตรอาหารหลักที่เลือกใช้เป็นสูตรอาหาร ½ MS ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับกล้วยไม้สกุลหวาย ขณะนี้ได้ปรับสูตรอาหารหลักเป็นสูตรอาหาร VW เพื่อทดสอบการสะสารสำคัญมอสคาติลินในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายต่อไป



ภาพที่ 47 การทดสอบการสะสมปริมาณสารสำคัญ moscatilin ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายในสูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต

ก. โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS (control)
ข. โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ร่วมกับ Salicylic acid 50 uM
ค. โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ร่วมกับ Salicylic acid 75 uM
ง. โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ร่วมกับ Salicylic acid 100 uM
จ. โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ร่วมกับ Methyl jasmonate 50 uM
ฉ. โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ร่วมกับ Methyl jasmonate 75 uM
ช. โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ร่วมกับ Methyl jasmonate 100 uM

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 การพัฒนาชุดตรวจสอบสารปนเปื้อนทางการเกษตรอย่างรวดเร็วเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชปลอดภัย

กิจกรรมที่ 1 วิจัยและพัฒนาชุดตรวจโลหะหนักที่ตกค้างในขมิ้นชันและไพล

การทดลองที่ 1.1 การพัฒนาชุดตรวจแคดเมียมและตะกั่วในขมิ้นชันและไพล

1. การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว

คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่สามารถจับกับสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่วจากคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว ปั่นแยกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ไม่จับกับสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่วออกโดยใช้ *Vivaspin 500* เนื่องจากดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า MWCO ของ Vivaspin และยังคงอยู่ในหลอด จากนั้นนำ aptamer- Cd/Pb complex ไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ aptF และ aptR เพื่อเพิ่มปริมาณ aptamer- Cd/Pb complex และนำไปใช้ในการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ที่สามารถจับกับสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว อีก 15 รอบ

2. การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่วด้วยเทคนิค ELAA

ทดสอบความสามารถในการจับกับสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่วด้วยเทคนิค indirect ELAA พบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 10 โคลน สามารถจับกับสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมได้ โดยมีค่า S/N ration อยู่ในช่วง 2.00-7.31 (ตารางที่ 4) และดีเอ็นเอแอปตาเมอร์จำนวน 8 โคลน ที่สามารถจับกับสารมาตรฐานโลหะหนักตะกั่ว โดยมีค่า S/N ration อยู่ในช่วง 1.20-7.69 (ตารางที่ 5) เมื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณสุ่มมีความแตกต่างกัน จึงทำให้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์มีโครงสร้างทุติยภูมิ (ภาพที่ 48) ที่ประกอบด้วย loop และ hairpin ที่แตกต่างกัน ซึ่งโครงสร้างที่ประกอบด้วย loop และ hairpin เหล่านี้ เป็นโครงสร้างที่มีส่วนสำคัญในการจับกับสารเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Michaud *et al*., 2003)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 ผลการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมเทียบกับบัฟเฟอร์ ด้วยวิธี indirect ELAA

DNA aptamer	ค่า OD_{405}		S/N ratio*
	สารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียม	บัฟเฟอร์	
Cd1B10	1.005	0.138	7.31
Cd1B11	1.616	0.285	5.68
Cd1D6	0.777	0.169	4.61
Cd1H4	0.384	0.112	3.43
Cd1H8	0.165	0.101	3.43
Cd1C4	1.814	0.541	3.35
Cd1B11	0.308	0.103	3.00
Cd1D8	0.398	0.134	2.97
cd21	0.747	0.325	2.30
Cd1C1	0.205	0.103	2.00

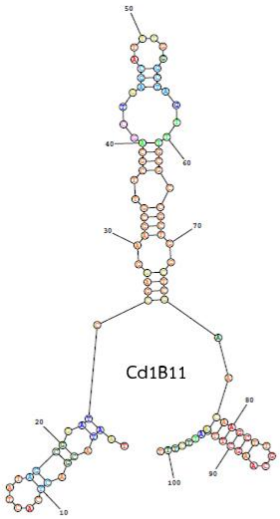
*S/N ratio (signal-to-noise ratio) = OD_{405} ของสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียม / OD_{405} ของบัฟเฟอร์

ตารางที่ 5 ผลการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐานโลหะหนักตะกั่วเทียบกับบัฟเฟอร์ ด้วยวิธี indirect ELAA

DNA aptamer	ค่า OD_{405}		S/N ratio*
	สารมาตรฐานโลหะหนักตะกั่ว	บัฟเฟอร์	
Pb1B3	0.708	0.092	7.69
Pb1D4	0.301	0.115	2.63
Pb1B5	0.261	0.116	2.25
pb11	0.240	0.112	2.18
pb24	0.308	0.170	1.81
pb10	0.138	0.091	1.51
pb9	0.180	0.131	1.37
Pb1G10	0.294	0.246	1.20

*S/N ratio (signal-to-noise ratio) = OD_{405} ของสารมาตรฐานโลหะหนักตะกั่ว / OD_{405} ของบัฟเฟอร์

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 48 โครงสร้างทุติยภูมิของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารโลหะหนักแคดเมียม โคลน Cd1B11 วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม RNA structure Web server http://RNAstructureWeb/Servers/Predict1/ .

กิจกรรมที่ 2 วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในพืชผัก

การทดลองที่ 2.1 การพัฒนาชุดตรวจสารคาร์บาริลและไซเพอร์เมทรินในพืชผัก

1. การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อสารมาตรฐานคาร์บาริลและไซเพอร์เมทริน

คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่สามารถจับกับสารมาตรฐานคาร์บาริลและไซเพอร์เมทรินจากคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่ว ปั่นแยกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ไม่จับกับสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่วออกโดยใช้ *Vivaspin* นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่คัดเลือกได้จากเทคนิค SELEX 15 รอบ เชื่อมต่อกับ pGEM-T Vector คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวได้ 376 โคโลนี นำไปพ่วงกับ Biotin ด้วยปฏิกิริยา PCR (DNA aptamer-biotin) จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการจับกับสารมาตรฐานคาร์บาริลและไซเพอร์เมทริน ด้วยเทคนิค ELAA

2 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารมาตรฐานโลหะหนักแคดเมียมและตะกั่วด้วยเทคนิค ELAA

ทดสอบความสามารถในการจับกับสารมาตรฐานคาร์บาริลและไซเพอร์เมทรินด้วยเทคนิค indirect ELAA พบดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 13 โคลน สามารถจับกับสารมาตรฐานคาร์บาริลได้ โดยมีค่า S/N ration อยู่ในช่วง 2.21-11.68 (ตารางที่ 6) และดีเอ็นเอแอปตาเมอร์จำนวน 22 โคลน ที่สามารถจับกับสารมาตรฐานไซเพอร์เมทริน โดยมีค่า S/N ration อยู่ในช่วง 2.02-17.399 (ตารางที่ 7) เมื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณสุ่มมีความแตกต่างกัน จึงทำให้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์มีโครงสร้างทุติยภูมิ (ภาพที่ 49) ที่ประกอบด้วย loop และ hairpin ที่แตกต่างกัน

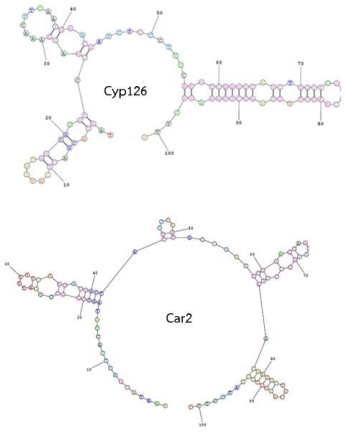
กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6 ผลการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐานคาร์บาริลเทียบกับบัฟเฟอร์ ด้วยวิธี indirect ELAA

DNA aptamer	ค่า OD_{405}		S/N ratio*
	สารมาตรฐานคาร์บาริล	บัฟเฟอร์	
car18	1.221	0.105	11.68
car2	1.954	0.211	9.28
car26	1.847	0.290	6.37
car10	0.975	0.204	4.79
car4	1.128	0.236	4.78
car20	1.147	0.290	3.95
car6	1.430	0.395	3.62
car21	0.447	0.130	3.45
car31	0.920	0.277	3.33
car22	0.837	0.261	3.21
car8	0.487	0.187	2.60
car12	0.632	0.270	2.34
car27	0.882	0.399	2.21

*S/N ratio (signal-to-noise ratio) = OD_{405} ของสารมาตรฐานคาร์บาริล / OD_{405} ของบัฟเฟอร์

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 49 โครงสร้างทุติยภูมิของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารไซเพอร์เมทริน โคลน Cyp126 และ สารคาร์บาริล โคลน Car2 วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม RNA structure Web server http://RNAstructureWeb/Servers/Predict1/ .

ตารางที่ 7 ผลการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐานไซเพอร์เมทรินเทียบกับบัฟเฟอร์ ด้วยวิธี indirect ELAA

DNA aptamer	ค่า OD_{405}		S/N ratio*
	สารมาตรฐานไซเพอร์เมทริน	บัฟเฟอร์	
cyp14	1.730	0.100	17.39
cyp16	1.279	0.126	10.15
cyp43	0.916	0.107	8.56
cyp96	1.942	0.264	7.35
cyp49	1.278	0.187	6.85
cyp108	1.234	0.183	6.76
cyp15	0.591	0.089	6.64
cyp32	0.976	0.155	6.30
cyp24	0.663	0.120	5.55
cyp7	0.630	0.121	5.23
cyp126	1.361	0.299	4.55
cyp8	0.808	0.181	4.46
cyp3	0.441	0.105	4.22
cyp125	0.591	0.145	4.08
cyp54	0.469	0.123	3.83
cyp73	0.325	0.095	3.43
cyp63	0.255	0.101	2.52
cyp18	0.316	0.126	2.50
cyp71	0.355	0.151	2.35
cyp9	0.182	0.106	2.15
cyp112	0.306	0.145	2.11
cyp62	0.297	0.147	2.02

*S/N ratio (signal-to-noise ratio) = OD_{405} ของสารมาตรฐานไซเพอร์เมทริน/ OD_{405} ของบัฟเฟอร์

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำเพื่อผลิตพืชปลอดภัยและยั่งยืน

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนามะละกอต้านทานไวรัสจุดวงแหวนด้วยเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ

การทดลองที่ 1.1 พัฒนาระบบกระตุ้นการกลายของยีนแบบแม่นยำด้วยเทคนิค CRISPR/Cas

1. การถ่าย sgRNA เข้าสู่เนื้อเยื่อมะละกอแขกดำศรีสะเกษ

1.1. การสร้างเวกเตอร์ด้วยวิธี Gateway cloning

สำหรับวิธี Gateway cloning ออกแบบการสร้างชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นชุดแสดงออกของ sgRNA สำหรับเวกเตอร์ 2 ชนิด คือ RG6 สำหรับการแสดงออกของยีนของ *Cas12a* ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่ม Cas9 ที่มีประสิทธิภาพการแก้ไขยีนในพืช (เวกเตอร์ pDE-ttLbCas12a ที่มียีนคัดเลือกต้านทานสาร Gentmicin และ RG7 สำหรับการแสดงออกของยีน *SaCas9* ซึ่งผลิตเอนไซม์ Cas9 จากแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (pDE-SaCas9 ที่มียีนคัดเลือกต้านทานสาร G418

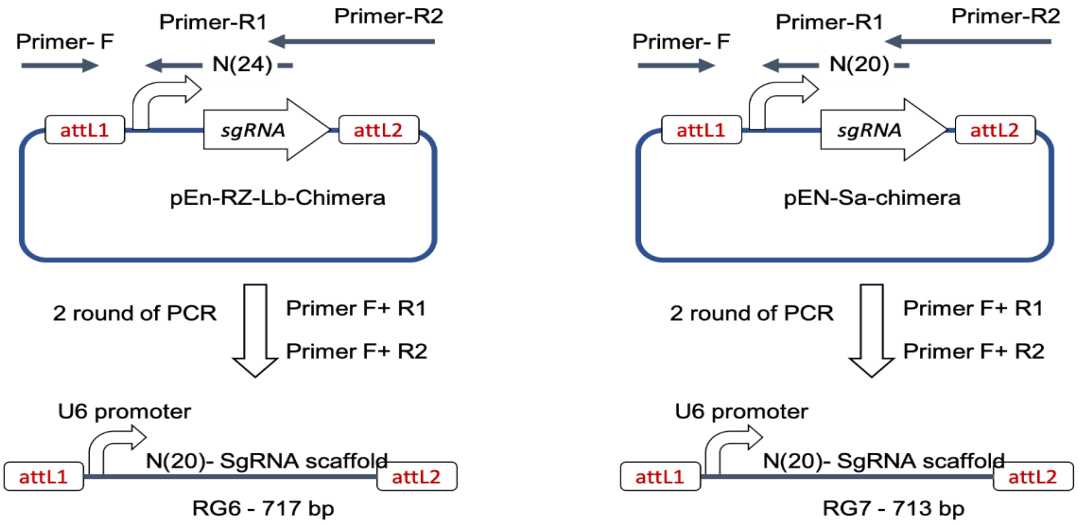
จากการสร้างชิ้นดีเอ็นเอ RG6 และ RG7 ตามภาพที่ 50 โดยการพีซีอาร์จากเวกเตอร์ต้นแบบ pEN-RZ-Lb-chimera และ pEN-Sa-chimera ตามลำดับ โดยมีการออกแบบให้ไพรเมอร์มีส่วนของลำดับเบสบริเวณ guide RNA เป็นเบส N จำนวน 24 และ 20 ตามลำดับ และทำพีซีอาร์ 2 รอบ ให้ได้ลำดับเบสส่วนปลายชิ้นมีลำดับเบสเป็น attl1 และ attL2 ซึ่งเป็นลำดับเบสสำหรับใช้ในปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์เป้าหมายด้วยเอนไซม์ LR Clonase ภาพที่ 51 แสดงผลการพีซีอาร์ รอบที่ 1 และ รอบที่ 2 ซึ่งได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอตามที่คาดหวัง จากนั้นตัดแถบชิ้นดีเอ็นเอ สกัดให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดเจล และนำไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพด้วย Nanodrop

เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่มีชุดการแสดงออกสำหรับ RG6 และ RG7 ไปเชื่อมต่อเข้าสู่เวกเตอร์ ผ่านปฏิกิริยา LR clonase ตามภาพที่ 52 และนำไปถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน พบว่าได้โคโลนีที่ต้านทานสารปฏิชีวนะคัดเลือกมากกว่า 1000 โคโลนีต่อเพลท และเมื่อทดสอบปฏิกิริยาและถ่ายโอนเข้า *E. coli* ซ้ำหลายครั้ง พบว่ายังสามารถสร้าง vector library จำนวนมากได้อย่างคงที่ ดังนั้นวิธีการสร้าง vector library ด้วยวิธี Gateway cloning จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ

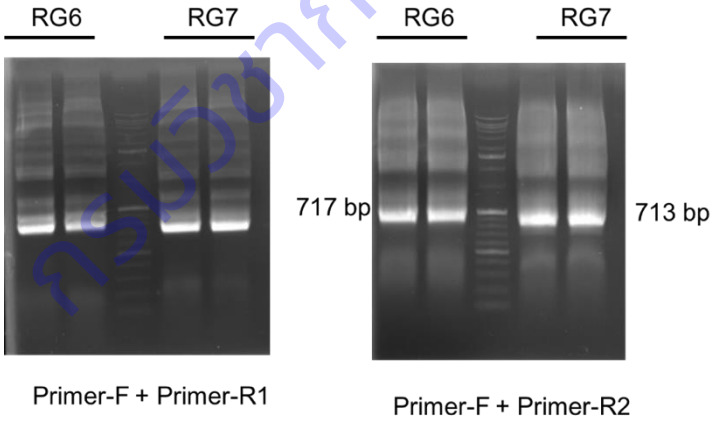
จากนั้นจึงทดสอบการสกัดพลาสมิดออกจากโคลน vector library โดยการเก็บเกี่ยวเซลล์จากเพลทโดยตรง ด้วยการขูดเพลทและสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด พบว่าสามารถสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ได้ที่ช่วงความเข้มข้น 400-600 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ที่ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อการสกัด 1 ครั้ง จาก 1 เพลท

เมื่อนำพลาสมิด vector library ที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสของ RG6 และ RG7 พบว่า ลำดับเบสที่ออกแบบให้เป็น N(24) ของ RG6 และ N(20) ของ RG7 มีลักษณะเป็นเบสผสมทั้ง 4 ชนิด ตลอดความยาวตำแหน่งเบสส่วนที่เป็น random guide sequence (ภาพที่ 54) แสดงให้เห็นว่าเวกเตอร์ที่สร้างขึ้นมีส่วนของ random guide ที่เป็นแบบสุ่มจำนวน 24 และ 20 จริง ตามที่ออกแบบไว้ ดังนั้นสุดท้ายจึงเลือกวิธี Gateway cloning เป็นวิธีหลักในการสร้าง vector library สำหรับการแก้ไขยีนแบบสุ่มต่อไป

กรมวิทยาศาสตร์

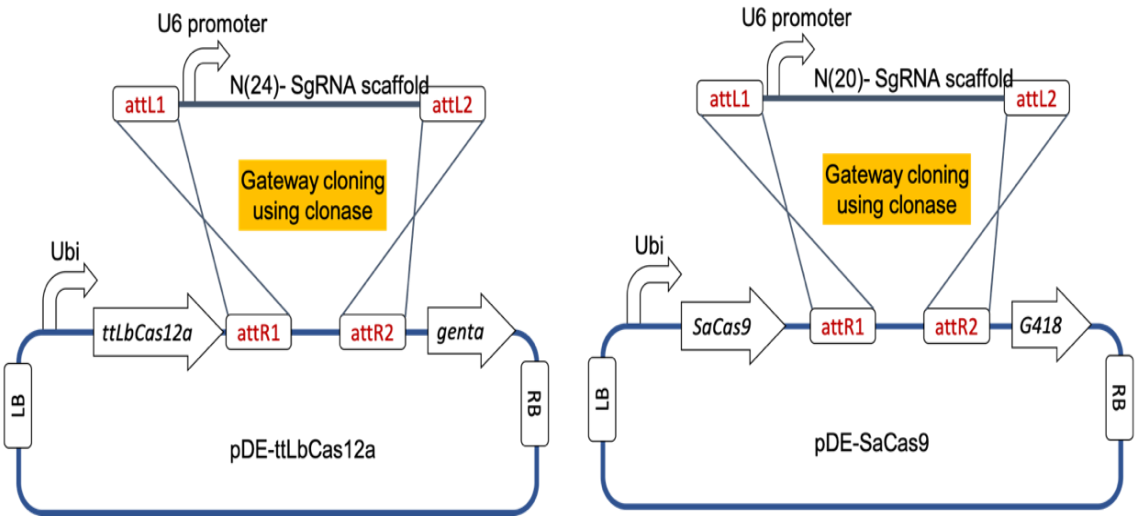


ภาพที่ 50 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอชุดยีน sgRNA แบบสุ่มที่มีลำดับเบส attL1 และ attL2 ด้วยวิธีพีซีอาร์ ชุดยีน RG6 และ RG7 สร้างโดยการพีซีอาร์ 2 ครั้ง โดยใช้ เวกเตอร์ pEN-RZ-Lb-Chimera และ pEN-Sa-Chimera เป็นเทมเพลท ได้เป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาด 717 และ 713 คู่เบส ตามลำดับ ทั้งนี้ไพรเมอร์ Primer-R1 ของ RG6 และ RG7 มีการออกแบบให้ลำดับเบสบริเวณ sgRNA เป็น N (ผสม A/G/C/T) จำนวน 24 และ 20 เบส ตามลำดับ สุดท้ายชิ้นดีเอ็นเอ RG6 และ RG7 ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ U6, sgRNA แบบสุ่ม, เทอร์มิเนเตอร์ และขนาบหน้าหลังด้วยลำดับเบส attL1-attL2 สำหรับใช้ในปฏิกิริยา LR clonase

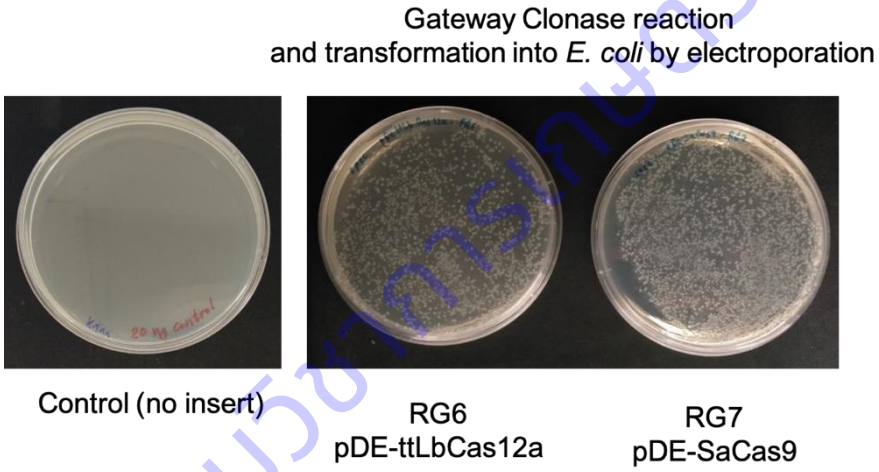


ภาพที่ 51 ผลการสร้างชิ้นดีเอ็นเอ RG6 และ RG7 ด้วยวิธีพีซีอาร์ 2 รอบ (ซ้าย) พีซีอาร์รอบที่ 1 ด้วยไพรเมอร์ Primer-F และ Primer-R1 นำมาแยกขนาดด้วยเจลอะกาโรสอิเล็กโทฟอรีซิส แล้วตัดแถบดีเอ็นเอมาสกัดให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 2 (ขวา) ด้วยไพรเมอร์ Primer-F และ Primer-R2 จากนั้นแยกขนาดด้วยเจลและสกัดให้บริสุทธิ์อีกครั้ง ก่อนทำไปใช้ในปฏิกิริยา Gateway cloning ในขั้นถัดไป

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 52 ปฏิกิริยา Gateway cloning สำหรับการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ RG6 และ RG7 เข้าสู่เวกเตอร์ pDE-ttLbCas12a และ pDE-SaCas9 ที่ตำแหน่งแลกเปลี่ยนระหว่าง attL และ attR ด้วยเอนไซม์ clonase



กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 53 ผลการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ RG6 และ RG7 เข้าสู่เวกเตอร์ หลังจากการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ตัวควบคุมเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีการเติมชิ้นดีเอ็นเอ (เวกเตอร์เปล่า)

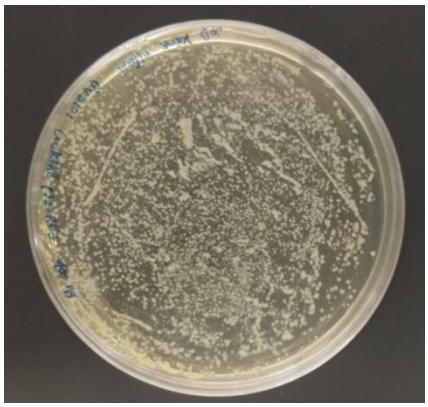
ภาพที่ 54 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ vector library แบบ RG6 (บน) และ RG7 (ล่าง) ที่บริเวณ sgRNA โดยแสดงตำแหน่งโปรโมเตอร์ U6, random guide และ sgRNA scaffold โดยตำแหน่ง random guide ปรากฏเป็นสัญญาณลำดับเบส 4 ชนิด A/G/T/C ผสมกัน แสดงว่าเวกเตอร์ที่สร้างขึ้นมีลักษณะเป็นเวกเตอร์ผสมที่มี sgRNA รูปแบบสุ่ม (sgRNA ของ RG6 ที่ใช้ ttLbCas12a และ RG7 ที่ใช้ SaCas9 มีการจัดเรียงรูปแบบโครงสร้างภายใน sgRNA ที่แตกต่างกัน)

1.2 การถ่ายโอนเวกเตอร์ผสมเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม

เมื่อนำเวกเตอร์ที่สร้างได้จากวิธี Gateway cloning ปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม มาถ่ายโอนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมพบว่าสามารถสร้างโคโลนีอะโกรแบคทีเรียมที่มีเวกเตอร์แบบผสมมากกว่า 1000 โคโลนี กระจายอยู่เต็มเพลท (ภาพที่ 55) โคโลนีบนเพลทนี้สามารถเก็บเกี่ยวมากระจายในสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการถ่ายโอนชุดยีนคริสเปอร์เข้าสู่เซลล์พืชได้ทันที การใช้โคโลนีอะโกรแบคทีเรียมที่สร้างขึ้นนี้ มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้เซลล์ที่ได้จากเพลทที่ถ่ายโอนเวกเตอร์มาใช้ถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง ไม่ควรนำไปใช้เลี้ยงต่อ เนื่องจากจะทำให้เกิดการเจริญของโคลนใดโคลนหนึ่ง ทำให้เวกเตอร์ที่สร้างขึ้นไม่เป็นแบบสุ่ม

จาก vector library ที่ได้สกัดได้จาก *E. coli* จำนวน 1 หลอดทดลอง มีความเข้มข้น ประมาณ 400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีปริมาตร 50 ไมโครลิตร ดังนั้น จากเวกเตอร์ 1 หลอด จะสามารถนำมาใช้ถ่ายโอนสร้างเซลล์อะโกรแบคทีเรียมที่มีเวกเตอร์แบบสุ่มได้จำนวนถึง 50 เพลท สำหรับการถ่ายโอนยีนสู่เซลล์พืชได้ถึง 50 ครั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร



ภาพที่ 55 ตัวอย่างเพลทอะโกรแบคทีเรียมที่ได้จากการถ่ายโอนเวกเตอร์แบบสุ่มด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม ลงเพลทด้วยเซลล์ทั้งหมดจากการถ่ายโอน 1 ครั้ง คัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ rifampicin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

การทดลองที่ 1.2 พัฒนาการชักนำต้นและการขยายพันธุ์มะละกอด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การเพาะเมล็ดมะละกอในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด/ชิ้นส่วน ดังนี้ แบ่งเป็นการฟอกเนื้อเยื่อ 3 แบบ คือ 1) การฟอกเมล็ดมะละกอแล้วเพาะให้งอกในสภาพปลอดเชื้อ มีอัตราการงอกต่ำ (15-25%) และใช้เวลาในการงอกนานเกิน 30 วัน 2) การฟอกเนื้อเยื่อต้นมะละกอ โดยเพาะเมล็ดจนได้ต้นอ่อนอายุประมาณ 15-30 วัน เลือกต้นที่มีความยาว hypocotyl 2.5-4 ซม. มีใบแท้อย่างน้อย 2-4 ใบ นำมาฟอกฆ่าเชื้อแล้วเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มีอัตราการปนเปื้อน 1-5% และ 3) การฟอกเมล็ดมะละกอที่ได้จากผลมะละกอสุกอย่างน้อย 80% แล้วผ่าเมล็ดในผลออกมาฟอกซ้ำ มีอัตราการงอก 80-90% และมีความปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ 0%

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> ศึกษาเนื้อเยื่อชิ้นใบมะละกอก่อนและหลังเพื่อการถ่ายยีนแบบการยิงอนุภาค

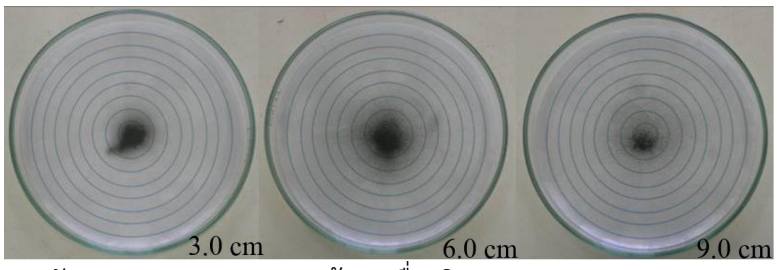
1. ผลการทดลองระยะห่างของการยิงของอนุภาค

จากการทดลองการยิงอนุภาคทังสเตนบนกระดาษกรองที่วางบนเพลตวุ้นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องยิง PDS-1000/He (BioRad gun) ที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 650 psi ในระยะ 3 6 และ 9 เซนติเมตร โดยใช้อนุภาคทังสเตนที่ละลายด้วยแอลกอฮอล์ 20 ไมโครลิตร พบว่า ที่ระยะ 3 เซนติเมตร พบการกระจายของอนุภาคทังสเตนบริเวณตรงกลางอย่างหนาแน่น ภายในรัศมี 0.5-1 ซม. ระยะ 6 ซม. พบว่าอนุภาคทังสเตนกระจายตัวมากขึ้น ในรัศมี 1-1.5 เซนติเมตร และการยิงอนุภาคทังสเตนที่ระยะ 9 เซนติเมตร พบว่าอนุภาคทังสเตนกระจายตัวมากที่สุด เห็นได้ชั้นที่รัศมี 2.0 ซม.

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 8 แสดงระยะการกระจายตัวของอนุภาคทังสเตนที่ระยะห่างระหว่างแท่นยิงกับเพลตที่แตกต่างกัน

ระยะห่างระหว่างแท่นยิงกับเพลต (ซม.)	การกระจายตัวของอนุภาค (ซม.)
3	1.0
6	1.5
9	2.0



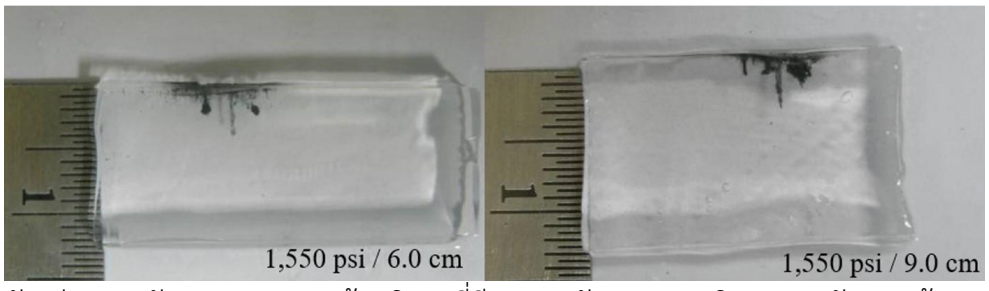
ภาพที่ 56 การยิงอนุภาคทังสเตนบนกระดาษกรองด้วยเครื่องยิงแบบ PDS-1000/He (BioRad gun) ที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 650 psi ในระยะ 3, 6 และ 9 ซม.

2. ผลการทดลองรัศมีของการยิงของอนุภาค

จากการทดลองยิงทังสเตนบนเพลตวุ้นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องยิงแบบ PDS-1000/He (BioRad gun) ที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 650, 1,100 และ 1,550 psi ที่ระยะ 6 และ 9 เซนติเมตร จากนั้นนำเพลตวุ้นมาตัดตามขวางในบริเวณที่มีอนุภาคทังสเตน เพื่อส่องดูระยะทางการยิงเข้าไปที่วุ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พบว่า เมื่อแรงดันก๊าซฮีเลียมเพิ่มขึ้น และระยะห่างระหว่างแท่นยิงกับเพลตเพิ่มขึ้น (ในการทดลองนี้) ค่าเฉลี่ยของระยะทางที่อนุภาคเคลื่อนที่จะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 8, ภาพที่ 56)

ตารางที่ 9 แสดงระยะทางที่อนุภาคทังสเตนเคลื่อนที่ได้ (มม.) ที่ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียมแตกต่างกัน

ระยะห่างระหว่างแท่นยิงกับเพลต (ซม.)	ค่าเฉลี่ยระยะทางที่อนุภาคเคลื่อนที่ (มม.)		
	แรงดันก๊าซฮีเลียม (psi)		
	650	1,100	1,550
6	1.25	1.42	1.53
9	1.69	1.60	1.92



ภาพที่ 57 ตัวอย่างภาพตัดตามขวางเพลตวุ้นบริเวณที่มีอนุภาคทังสเตน การยิงอนุภาคทังสเตนด้วยเครื่องยิงแบบ PDS-1000/He (BioRad gun) ที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,550 psi ในระยะ 6 และ 9 ซม.

กรมวิชาการเกษตร

3. ผลการทดลองจำนวนเนื้อเยื่อต่อการยิงอนุภาค 1 ครั้ง

ในการทดลองนี้ได้บันทึกผลการทดลองโดยให้เปอร์เซ็นต์พื้นที่การเข้าของอนุภาคทังสเตนบนแผ่นใบมะละกอที่วางบนเพลตวุ้นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ 0 20 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 57) พบว่า เปอร์เซ็นต์พื้นที่การเข้าของอนุภาคทังสเตนบนชิ้นส่วนแผ่นใบมะละกอ

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยพื้นที่การเข้าของอนุภาคทังสเตนบนชิ้นแผ่นใบมะละกอต่อการยิงอนุภาค 1 ครั้ง

จำนวนชิ้นแผ่นใบต่อเพลต (ชิ้น)	พื้นที่การเข้าของอนุภาคทังสเตน (%)
5	29.33
10	21.00
20	10.67

4. ผลการศึกษาความเข้มข้นของทังสเตนสำหรับการยิงอนุภาค

จากการทดสอบข้างต้น ได้เลือกใช้จำนวนชิ้นส่วนเนื้อเยื่อใบ 10 ชิ้น ใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมเพื่อการยิงที่ 1100 psi ระยะห่าง 6 ซม. เปรียบเทียบความเข้มข้นของทังสเตนที่ 30% 15% และ 6% (คำนวณจากการเจือจางอนุภาคทังสเตน 0.015 กรัม ด้วยเอธานอลปริมาตร 50 100 และ 250 ไมโครลิตร)

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยพื้นที่การข้าวของอนุภาคทังสเตนที่ความเข้มข้น 3 ระดับ โดยใช้จำนวนชิ้นส่วนเนื้อเยื่อใบ 10 ชิ้น แรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1100 psi และระยะห่าง 6 ซม.

ความเข้มข้นของอนุภาคทังสเตน (%)	พื้นที่การเข้าของอนุภาคทังสเตน (%)
30	21
15	10
6	5.2

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

- ผลการเพาะเลี้ยง hypocotyl บนอาหารทดลอง 12 สูตร พบว่า สามารถชักนำให้ชิ้นส่วน hypocotyl เกิดแคลลัส ได้ในระดับที่แตกต่างกันไป โดยสูตรอาหารที่ให้ปริมาณแคลลัสที่มากที่สุดได้แก่สูตรที่ 9 ให้คะแนนการเกิดแคลลัสค่าเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 5.00 รองลงมาได้แก่สูตรที่ 6 ให้คะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 4.00 (ตารางที่ 12) และในขณะเดียวกันอาหารทดลองสูตรที่ 9 ก็ให้ผลการเกิดรากสูงที่สุดมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 3.75 โดยอาหารทดลองที่มีการเติม BA ไม่พบว่าชักนำให้เกิดรากจากชิ้นส่วน hypocotyle ได้

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 12 คะแนนค่าเฉลี่ยการเกิดแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน hypocotyl บนอาหารทดลองจำนวน 12 สูตร ให้แสงเป็นเวลา 16 ชม.ต่อวัน อายุ 65 วัน

	อาหารสูตร MS		ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย
	BA (มก./ล.)	NAA (มก./ล.)	คะแนนการเกิดแคลลัส	คะแนนการเกิดราก
สูตรที่ 1	0	0	0.75	0.75
สูตรที่ 2	0.1	0	0.50	0
สูตรที่ 3	0.3	0	0.50	0
สูตรที่ 4	0.5	0	1.50	0
สูตรที่ 5	0	0.05	3.00	1.50
สูตรที่ 6	0.1	0.05	4.00	0
สูตรที่ 7	0.3	0.05	2.25	0
สูตรที่ 8	0.5	0.05	2.75	0
สูตรที่ 9	0	0.10	5.00	3.75
สูตรที่ 10	0.1	0.10	0.75	0
สูตรที่ 11	0.3	0.10	2.50	0
สูตรที่ 12	0.5	0.10	0.50	0

- ผลการเพาะเลี้ยงยอด (shoot tip) และข้อ (node) บนอาหารทดลอง 12 สูตร พบว่า ในส่วนของการชักนำยอดจากชิ้นส่วนยอด (shoot tip) สูตรอาหารที่ให้ผลดีที่สุดคือสูตรที่ 8 ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.50 ยอดต่อชิ้น รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 7 และ 11 ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากันเท่ากับ 3.25 ยอดต่อชิ้น และในส่วนของการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อ (node) สูตรอาหารที่ให้ผลดีที่สุดคือสูตรที่ 12 ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 11.17 ยอดต่อชิ้น รองลงมาคือสูตรที่ 11 ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 8.33 ยอดต่อชิ้น (ตารางที่ 13)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 13 คะแนนค่าเฉลี่ยการเกิดยอดและแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอด (shoot tip) และข้อ (node) บนอาหารทดลองจำนวน 12 สูตร ให้แสงเป็นเวลา 16 ชม.ต่อวัน อายุ 60 วัน

	อาหารสูตร MS		ยอด (shoot tip)		ข้อ (node)	
	BA (มก./ล.)	NAA (มก./ล.)	ค่าเฉลี่ยคะแนนการเกิดยอด	ค่าเฉลี่ยคะแนนการเกิดแคลลัส	ค่าเฉลี่ยคะแนนการเกิดยอด	ค่าเฉลี่ยคะแนนการเกิดแคลลัส
สูตรที่ 1	0	0	1.00	0	1.00	0
สูตรที่ 2	0.1	0	1.50	0	1.17	0
สูตรที่ 3	0.3	0	3.00	0	2.00	0
สูตรที่ 4	0.5	0	2.75	2.00	2.50	2.50
สูตรที่ 5	0	0.05	1.00	3.00	1.00	1.17
สูตรที่ 6	0.1	0.05	1.00	0	1.33	2.33
สูตรที่ 7	0.3	0.05	3.25	2.50	3.17	3.33
สูตรที่ 8	0.5	0.05	3.50	1.75	2.17	3.50
สูตรที่ 9	0	0.10	1.00	2.50	0.67	2.83
สูตรที่ 10	0.1	0.10	1.00	1.00	1.33	2.17
สูตรที่ 11	0.3	0.10	3.25	2.25	8.33	3.50
สูตรที่ 12	0.5	0.10	1.50	0	11.17	3.83

ภาพที่ 58 เกณฑ์การให้คะแนนการเกิดแคลลัส และราก

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาเทคนิคตรวจสอบพืชจากเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ

การทดลองที่ 2.1 พัฒนาชุดตรวจสอบการปลอมปนมะละกอที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำโดยเทคนิค SHERLOCK

1 การสังเคราะห์ crRNA และ โครงสร้าง crRNA

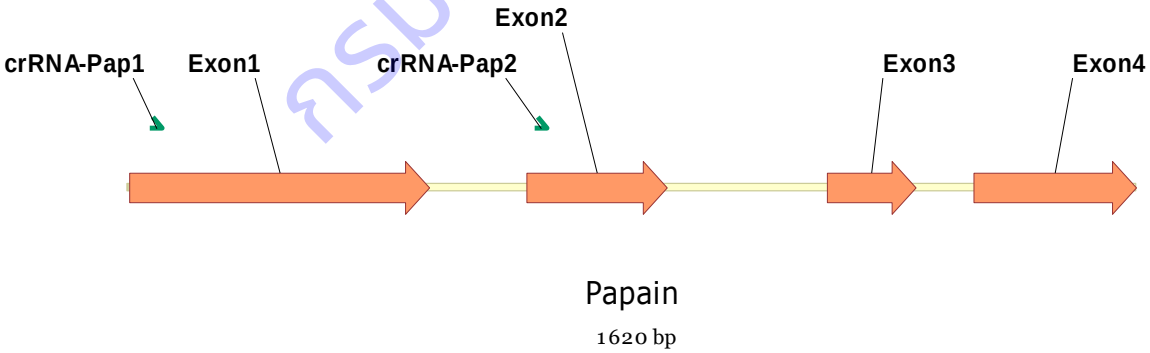
การสังเคราะห์ crRNA เพื่อใช้เป็นตัวจับ dsDNA ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ Hairpin loop ซึ่งจะจับกับโปรตีน Cas12 A และ ส่วน Target sequence 3 ชนิดยีน คือ 1. ยีน Papaine 2. Promoter 35S 3. Terminator NOS

ตารางที่ 14 แสดงการสังเคราะห์ crRNA เพื่อใช้เป็นตัวจับ dsDNA

Name	crRNA sequence 5' - 3'	PAM site
crRNA-Pap1	TAATTTCTACTAAGTGTAGATATTTCAAAGTTGCTTTTCGT	TTTA
crRNA-Pap2	TAATTTCTACTAAGTGTAGATCAGCTGTTGCAACTATAGAG	TTTT
crRNA-35S1	TAATTTCTACTAAGTGTAGATTTGTGAAGATAGTGGAAAAG	TTTA
crRNA-35S2	TAATTTCTACTAAGTGTAGATAACAAAGGGTAATATCCGGA	TTTC
crRNA-NOS1	TAATTTCTACTAAGTGTAGATTGTTGAATTACGTTAAGCAT	TTTC
crRNA-NOS2	TAATTTCTACTAAGTGTAGATATACGCGATAGAAAACAAAA	TTTA

1.1 ออกแบบ crRNA ผ่านโปรแกรม ApE – A plasmid Editor v 2.0.61 เป็น RNA ชนิดที่ใช้เพื่อเป็นตัวจับ dsDNA ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ Hairpin loop ซึ่งจะจับกับโปรตีน Cas12 A มีรายละเอียด Sequence ดังนี้คือ TAATTTCTACTAAGTGTAGAT และ ส่วน Target sequence 3 ชนิดยีน คือ 1. ยีน Papaine 2. Promoter 35S 3. Terminator NOS ดังภาพ เพื่อใช้สั่งสังเคราะห์ RNA

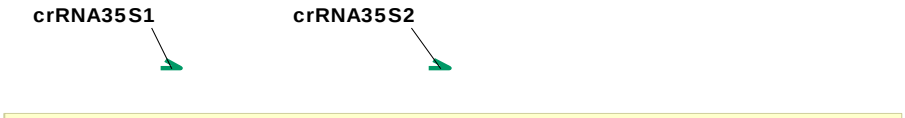
1.2 ออกแบบ crRNA โดย ค้นหาตำแหน่งจาก รายละเอียดพันธุกรรม ยีน Papaine 2 ตำแหน่งคือ exon 1 มี PAM site คือ TTTA และ exon 2 มี PAM site คือ TTTT



ภาพที่ 59 แสดงตำแหน่งที่ออกแบบสำหรับตัดยีน Papain บน Exon 1 และ Exon 2

1.3 ออกแบบ crRNA โดย ค้นหาตำแหน่งจาก รายละเอียดพันธุกรรม promoter 35S 2 ตำแหน่ง มี PAM site คือ TTTA และ TTTC

กรมวิชาการเกษตร

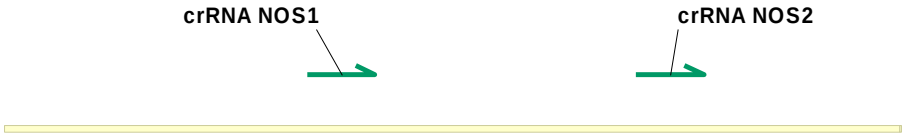


35S pCXSN50

891 bp

ภาพที่ 60 แสดงตำแหน่งที่ออกแบบสำหรับตัด Promoter 35S

1.4 ออกแบบ crRNA โดย ค้นหาตำแหน่งจาก รายละเอียดพันธุกรรม Terminator NOS 2 ตำแหน่ง มี PAM site คือ TTTC และ TTTA



NOS terminator pCXSN50

264 bp

ภาพที่ 61 แสดงตำแหน่งที่ออกแบบสำหรับตัด Terminator NOS

2. ดำเนินการออกแบบและสังเคราะห์ Single strand DNA Reporter

ทำการออกแบบ single strand DNA reporter ให้มีรหัส ttatt ซึ่งเป็นสายรหัสที่ Cas12a สามารถตรวจจับและตัดได้ โดยติด ตัวปล่อยแสงฟลูออเรสเซน FAM ที่ 5'และติดตัวดูดแสง Quencher ที่ 3' สำหรับ FQ-Reporter เพื่อใช้ในการตรวจจับโดยวิธี Fluorescence และ ดำเนินการออกแบบและสังเคราะห์ Single strand DNA Reporter ให้มีรหัส tattttatttttatt และติดกับ FAM ที่ 5' และ ติดโมเลกุล Biotin ที่ 3' เพื่อใช้ดปิน FB-Reporter สำหรับการทดสอบแบบ Lateral flow

ตารางที่ 15 แสดง แสดงการออกแบบ Reporter และติดสัญญาณโมเลกุล ประเภทต่างๆ

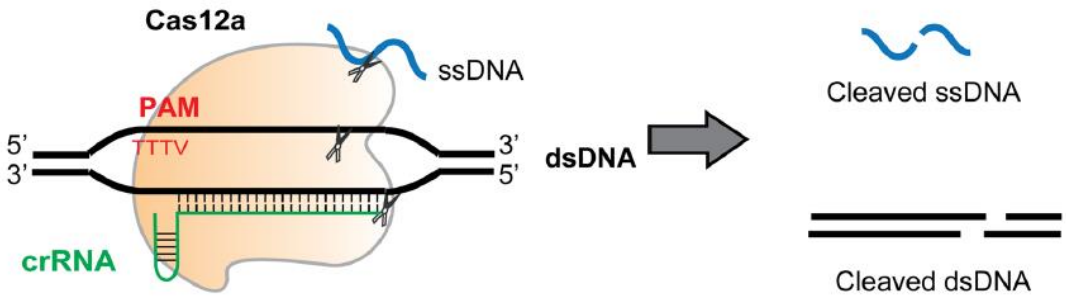
Primer name	**sequence (5'-3')**	**Purpose**
FQ-reporter	5'-6-FAM -ttatt-Quencher-3'	ssDNA reporter for fluorescence detection
FB-reporter	5'-6-FAM -ttattttattttatt-Biotin-3'	ssDNA reporter for lateral flow assay

3. การทดสอบ Nuclease activity เบื้องต้น กับ crRNA ที่สังเคราะห์

ทำการทดสอบ Nuclease activity เบื้องต้น กับ crRNA ที่สังเคราะห์ ดังภาพที่ 20 จากนั้นผสมสารต่างๆ เพื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องตามลำดับที่แสดงในตารางที่ 9 บ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิ 25^{0}C เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมซับสเตรต DNA 30 nM (Plasmid PCXSN50) 3 µl (ปริมาตรสุดท้าย 30 µl) ผสมให้เข้ากันและปั่นตกตะกอนโดย microfuge บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15-30 นาที เติม Proteinase K 1 µl ลงในแต่ละ

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นเป็นจังหวะใน microfuge บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ดำเนินการวิเคราะห์โดย Gel electrophoresis จากผลการทดลองพบว่า เกิดปฏิกิริยาตัด Plasmid PCXSN 50 ที่ตัวอย่างที่ 6 และ 7 ซึ่งมี crRNA ชนิด 35S-1และ 35S-2 พบเกิดปฏิกิริยาการตัด และพบ แบน Plasmid DNA ที่ถูกตัดเป็นสายเดี่ยว ขนาด 10,802 bp (ภาพที่ 21)

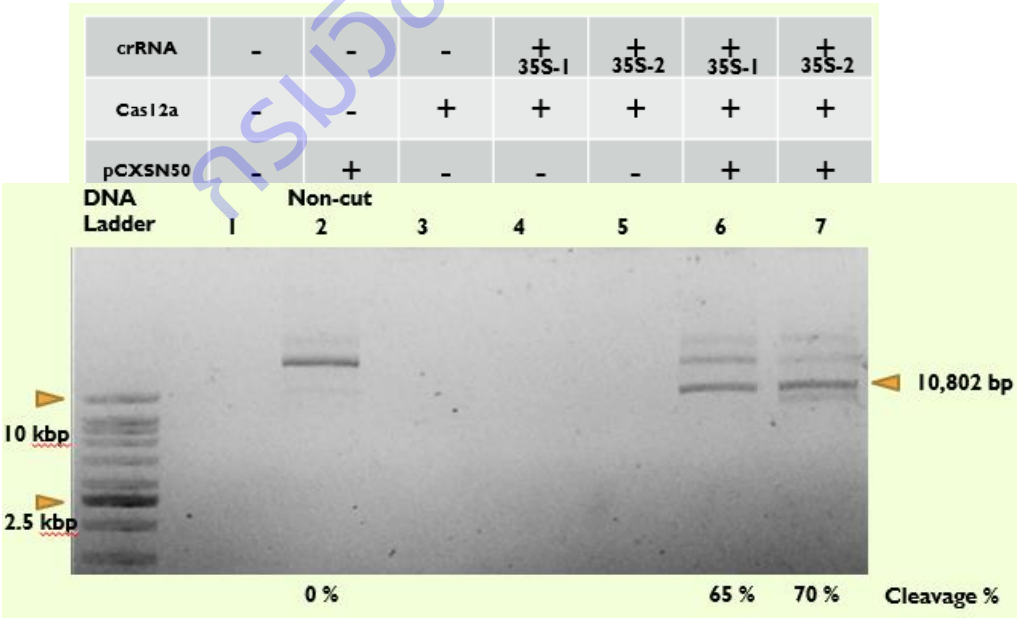


ภาพที่ 62 แสดงกระบวนการ dual nuclease ของ Cas12a เพื่อตัด DNA เป้าหมายและ ssDNA ที่ไม่ใช่เป้าหมาย

ตารางที่ 16 แสดงส่วนผสม เพื่อใช้ทดสอบ Nuclease activity

COMPONENT	AMOUNT
Nuclease-free water	20 µl
NEBuffer r2.1 Reaction Buffer (10X)	3 µl
300 nM gRNA	3 µl (30 nM final)
1 µM EnGen Lba Cas12a (Cpf1)	1 µl (~30 nM final)
Total Reaction Volume	**27 µl**

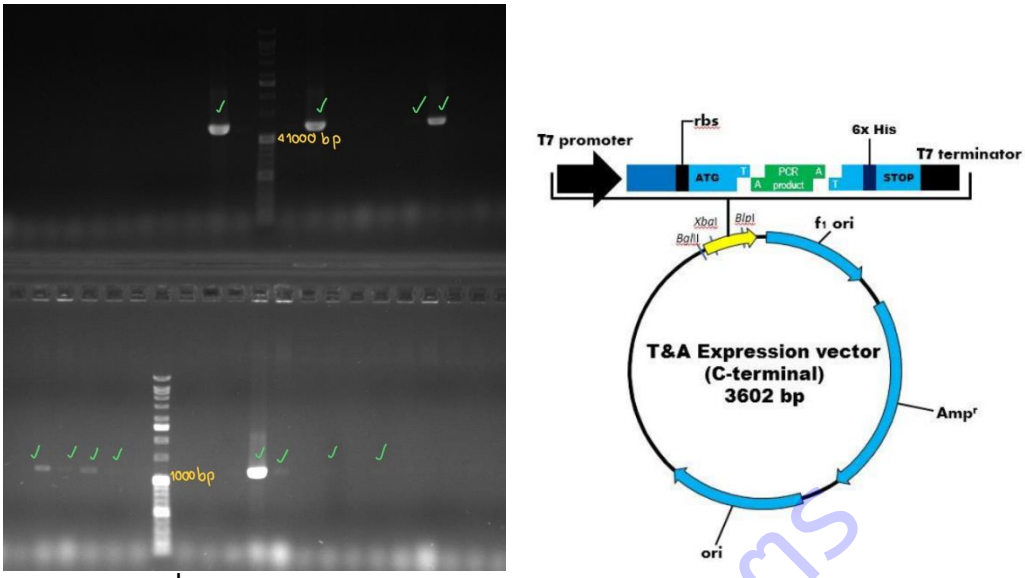
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 63 แสดงผลการตัด Plasmid PCXSN50 โดย Nuclease activity cpf1

4. การตรวจสอบทิศการ Clone ชิ้น Insert เข้าสู่ Expression vector

ดำเนินการ Clone ยีน cpf1 หรือ cas12a เข้าสู่ Overexpression vector ถ่ายเวคเตอร์เข้าสู่เชื้อ DH5α ตรวจพบ Colony PCR เป็น Positive ซึ่งมี Insert ไปในทิศทางที่ถูกต้อง ขนาด 1,000 bp (ภาพที่ 64) ดำเนินการตัดแบนและส่งตรวจ Sequence ต่อไปเพื่อยืนยันความถูกต้อง



ภาพที่ 64 แสดงผลการตรวจสอบการโคลนยีน cpf1 เข้าสู่ Expression Vector

การทดลองที่ 2.2 พัฒนาชุดตรวจสอบอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค LFICS สำหรับถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ

1. การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ที่มีความจำเพาะกับยีน *FAD2-1B* บริเวณที่มีการปรับแต่งยีน และยีน *Lectin* ของถั่วเหลือง โดยใช้โปรแกรม Primer designing tool – NCBI ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ไพรเมอร์สำหรับตรวจวิเคราะห์ยีน FAD2-1B และ ยีน Lectin

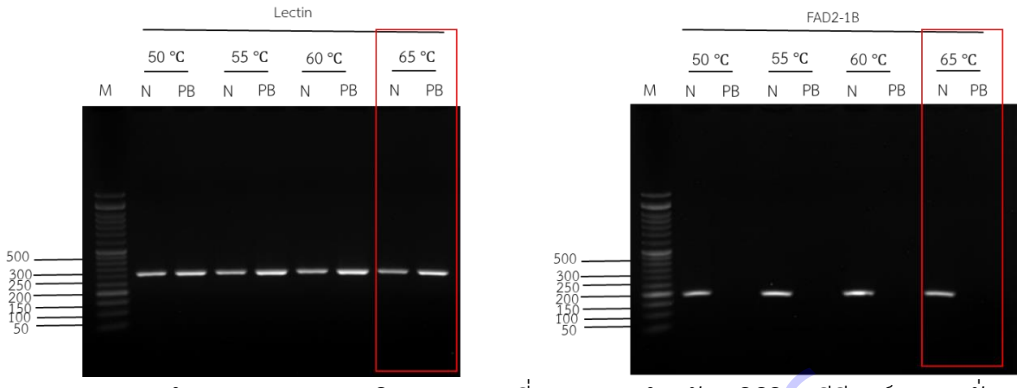
Gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Product size
FAD2-1B	FAD2-1BF	GCC ACC ACT CCA ACA CGG	250
	FAD2-1BR	GGG TCT GCC AGA GAC ATT GA	
Lectin	LectinF	GCT ATT GTG ACC TCC TCG GG	304
	LectinR	ACT CAA CAG CGA CGA CTT GA	

2. การศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสม

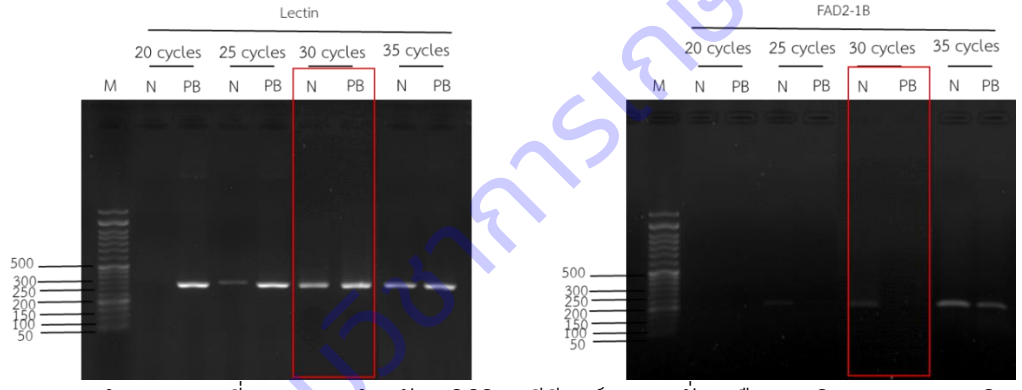
ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอ *FAD2-1B* ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 2 µl 10xbuffer ปริมาตร 2 µl dNTP ปริมาตร 2 µl ไพรเมอร์ (10 µM) ด้าน Forward ปริมาตร 0.4 µl ไพรเมอร์ (10 µM) ด้าน Reverse ปริมาตร 0.4 µl Extaq DNA polymerase (TAKARA) ปริมาตร 0.1 µl และน้ำปราศจากไอออนปราศจากเชื้อ ปริมาตร 13.1 µl ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 µ

กรมวิชาการเกษตร

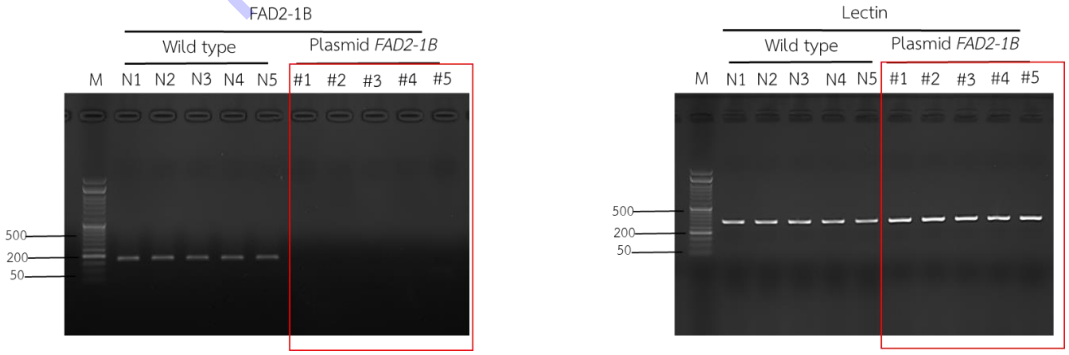
นำพลาสมิดดีเอ็นเอ *FAD2-1B* ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วนำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle ที่ตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้ Pre-denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้น Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้น Annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้น Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที (จำนวน 30) รอบ และ ขั้น Post-extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที (จำนวน 1 รอบ) ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส (Gel electrophoresis)



ภาพที่ 65 แสดงความจำเพาะและอุณหภูมิannealingที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (N = ถั่วเหลืองปกติ, PB = พลาสมิดFAD2-1B วัสดุทดสอบถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ)



ภาพที่ 66 แสดงจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (N = ถั่วเหลืองปกติ, PB = พลาสมิดFAD2-1B วัสดุทดสอบถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ)

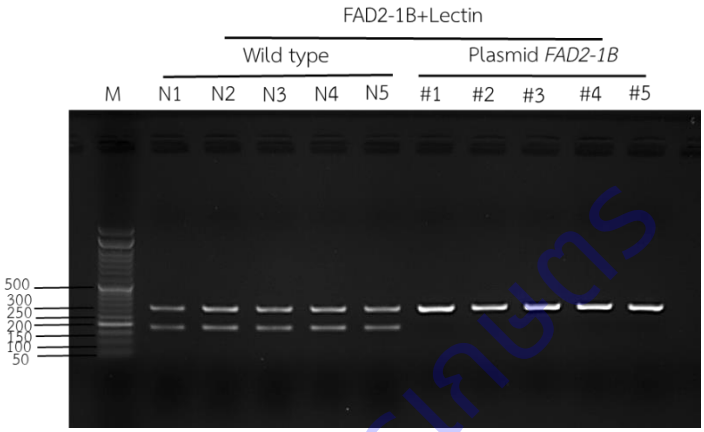


ภาพที่ 67 แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาแบบSimplex PCR กับตัวอย่างทดสอบจำนวน 5 ตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

3. การศึกษาการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดยเทคนิค PCR สำหรับปฏิกิริยาแบบ 2 ยีน (Duplex PCR)

ทำการเพิ่มคู่ไพรเมอร์ Lectin เข้าไปในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในคู่ไพรเมอร์ของ FAD2-1B ในปฏิกิริยาแบบ 2 ยีน ทำการเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 2 µl 10xbuffer ปริมาตร 2 µl dNTP ปริมาตร 2 µl ไพรเมอร์ FAD3_T1 (10 µM) ด้าน Forward ปริมาตร 0.4 µl ไพรเมอร์ FAD2-1B (10 µM) ด้าน Reverse ปริมาตร 0.4 µl ไพรเมอร์ Lectin (10 µM) ด้าน Forward ปริมาตร 0.4 µl ไพรเมอร์ Lectin (10 µM) ด้าน Reverse ปริมาตร 0.4 µl Extaq DNA polymerase (TAKARA) ปริมาตร 0.1 µl และน้ำปราศจากไอออนปราศจากเชื้อ ปริมาตร 12.3 µl ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 µl นำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle ที่ตั้งโปรแกรมการทำงานเช่นเดียวกับการทำปฏิกิริยาแบบยีนเดียว

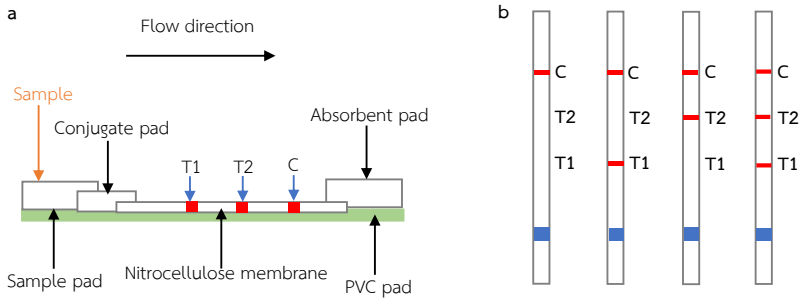


ภาพที่ 68 แสดงผลการทดสอบเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดยเทคนิค PCR สำหรับปฏิกิริยาแบบ Duplex PCR ของยีน *FAD2-1B* และ ยีน *Lectin* กับตัวอย่างทดสอบจำนวน 5 ตัวอย่าง

4. การออกแบบชุดทดสอบLFICS และติดฉลากสีโพรบ

ชุด LFIC ประกอบด้วยแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่แผ่นใยแก้วเมนเบรนคอนจูเกต (Conjugate pad) แผ่นตัวอย่าง (Sample pad) และแผ่นดูดซับ (Adsorbed pad) แสดงดังในภาพที่ 5 พ่นสารละลาย anti-FITC capture antibody เคลือบแถบทดสอบ (Test-line) ที่ 1 (T1) เพื่อจับฉลากสี Fluorescein isothiocyanate (FITC) และพ่นสารละลาย anti-DIG capture antibody ลงบนแถบทดสอบที่ 2 (T2) สำหรับจับฉลากสี Digoxigenin (DIG) ส่วนแถบควบคุม (Control-line) เคลือบด้วย anti-mouse lgG antibody โดยเชื่อมต่อกับอนุภาคทอง (gold nanoparticle) และเคลือบ anti-Biotin capture antibody เพื่อให้เกิดแถบสีนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ออกแบบและทดสอบแล้ว มาติดโพรบด้านปลาย 5’ ของสายไพรเมอร์ ดังนี้ตารางที่ 18

กรมวิชาการเกษตร



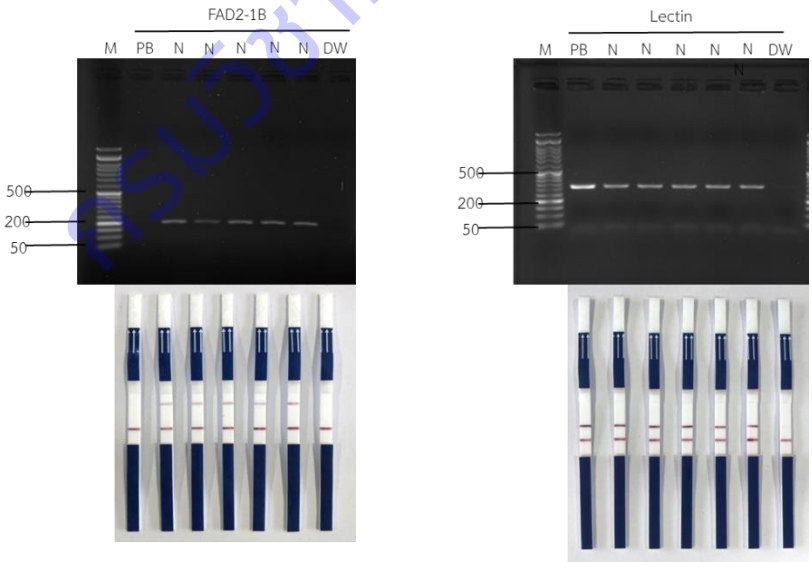
ภาพที่ 69 แสดงการออกแบบชุด LFICS เพื่อทดสอบยีน *FAD2-1B* (Test line 1) และ *Lectin* (Test line2)

ตารางที่ 18 แสดงไพรเมอร์ที่ติดฉลากสีเพื่อใช้เป็นโพรบในชุด LFICS

Name	Labeled probe sequence	Target gene
FITCFAD2-1BF	5'-[FITC]GCCACCACTCCAACACGG -3'	FAD2-1B
Biotin FAD2-1B	5'-[Biotin]GGGTCTGCCAGAGACATTGA -3'	
FITCLectinF	5'-[FITC]GCTATTGTGACCTCCTCGGG -3'	Lectin
DIGLectinR	5'-[DIG]ACTCAACAGCGACGACTTGA -3'	

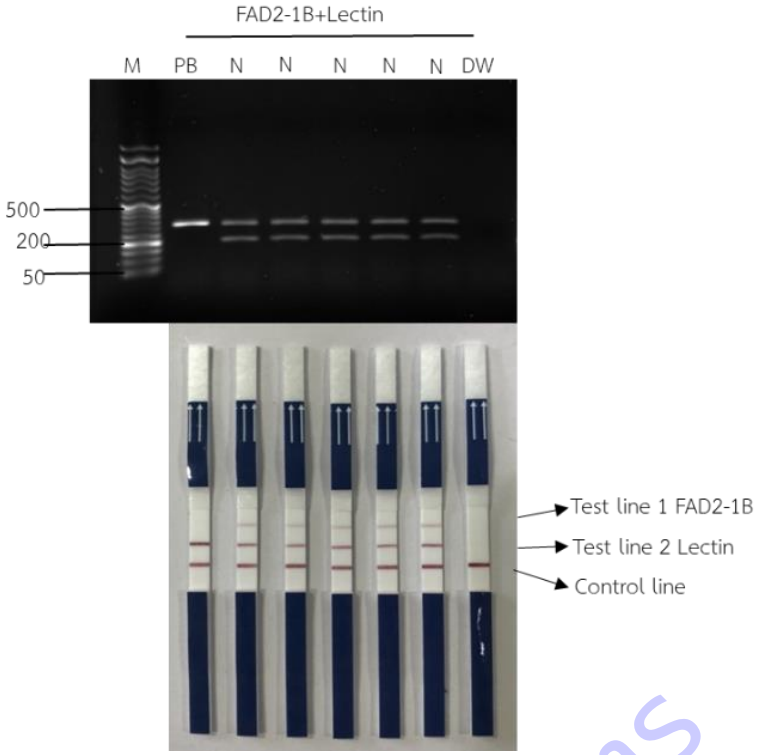
5. การทดสอบชุด LFICS ในปฏิกิริยาแบบ Simplex PCR และ Duplex PCR

นำผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 10 µl หยดลงชุด LFICS จากนั้นตามด้วยการหยดบัฟเฟอร์ 3 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที โดยทำการเปรียบเทียบกับการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเจลอะกาโรส



ภาพที่ 70 แสดงผลการทดสอบชุด LFICS ในปฏิกิริยาแบบ Simplex PCR ของยีน FAD2-1B และ ยีน Lectin (N = ถั่วเหลืองปกติ, PB = พลาสมิดFAD2-1B วัสดุทดสอบถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

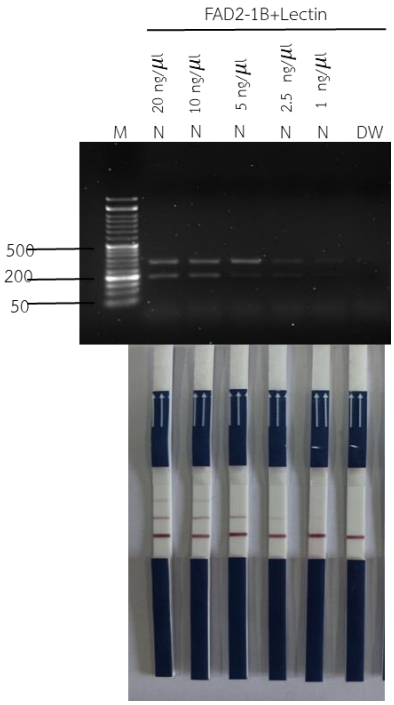


ภาพที่ 71 แสดงผลการทดสอบชุด LFICS ในปฏิกิริยาแบบ Duplex PCR ของยีน FAD2-1B และ ยีน Lectin (N = ถั่วเหลืองปกติ, PB = พลาสมิดFAD2-1B วัสดุทดสอบถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำ)

6. การศึกษาปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบในชุด LFICS

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นดีเอ็นเอของถั่วเหลืองที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบยีน FAD2-1B และ ยีน Lectin ในชุด LFICS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 20 10 5 2.5 และ 1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่แสดงแถบทั้งสองแถบของยีน FAD2-1B และ ยีน Lectin ในชุด LFICS จึงสามารถระบุค่า LOD ของชุดทดสอบถั่วเหลืองที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำที่ระดับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

กรมวิชาการเกษตร

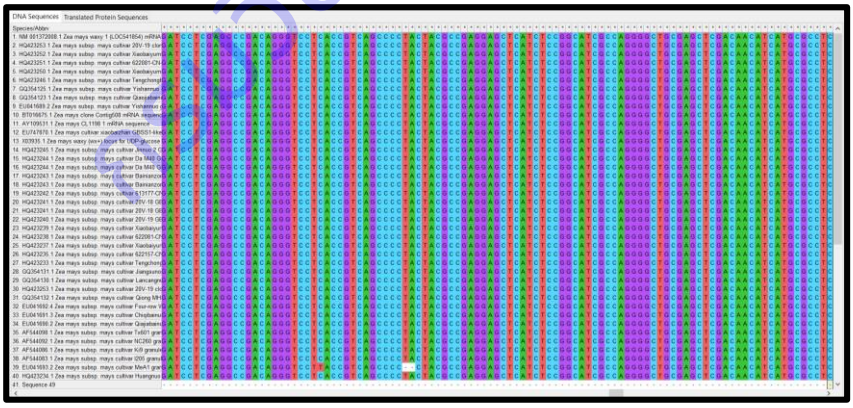


ภาพที่ 72 แสดงผลความเข้มข้นดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบในชุด LFICS

การทดลองที่ 2.3 พัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองข้าวโพดที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR

1. การออกแบบไพร์เมอร์และโพรบที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดปรับแต่งจีโนม

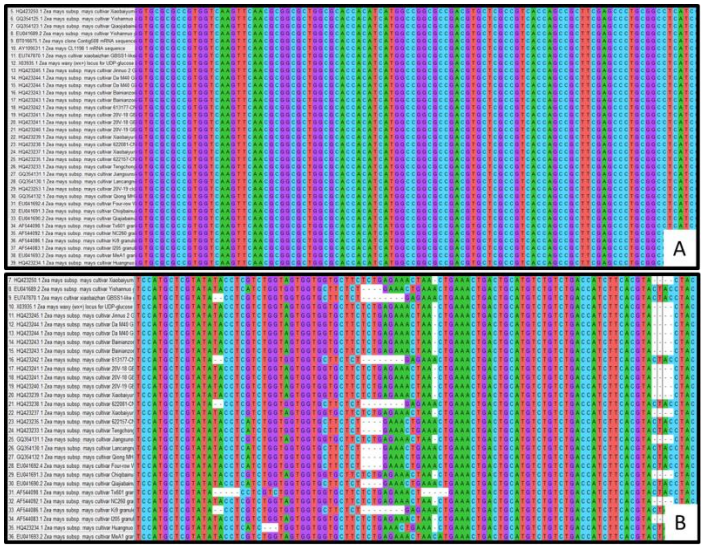
จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Waxy บนฐานข้อมูล NCBI จากข้าวโพด 40 ลำดับฐานข้อมูล (accession Number) มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังภาพที่ 73



ภาพที่ 73 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Waxy1 ที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI

แล้วนำมาออกแบบไพรเมอร์ และโพรบให้ครอบคลุมบริเวณที่มีความเหมือน และแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ Primer3 (https://www.primer3plus.com/) ดังภาพที่ 2 ซึ่งชุดไพรเมอร์ และโพรบ Wx1-7 ที่ออกแบบจากบริเวณยีน Waxy ที่มีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และชุด

ไพรเมอร์ และโพรบ Wx8 เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณยีน Waxy ที่มีความเหมือนกันนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่1 และได้แสดงภาพชิ้นพลาสมิดเป้าหมาย Wx1-Wx8 ที่ทำการออกแบบดังปรากฏในภาพที่ 74



ภาพที่ 74 การออกแบบไพรเมอร์ และโพรบ โดย (A.) บริเวณยีน Waxy ที่มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และ (B.) บริเวณยีน Waxy ที่มีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 19 ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบจากบริเวณยีน Waxy

Primer/Probe name		Nucleotide	side (bp)
Wx1-F		GGAACGGACTACAGGGACAA	192
Wx1-R		AGAGCAACTACCAGTCCCAC	
	Wx1-P	ACGACTGGCACACCGGCCCT	
Wx2-F		TTGGGGAAAGACCGAGGAGA	274
Wx2-R		CCGCTTTCTGCATCCACAAC	
	Wx2-P	CAGTCCCACGGCATCTACAG	
Wx3-F		TGGAACGGACTACAGGGACA	231
Wx3-R		AGACCGCTTTCTGCATCCA	
	Wx3-P	AGAGCAACTACCAGTCCCAC	
Wx4-F		GTTGACCACCCACTGTTCCT	272
Wx4-R		CAGTCCCACGGCATCTACAG	
	Wx4-P	ACGACTGGCACACCGGCCCT	
Wx5-F		CAAGGATCCTGAGCCTCAAC	151
Wx5-R		CAAGAGCAACTACCAGTCCC	
	Wx5-P	ACGACTGGCACACCGGCCCT	
Wx6-F		GATGGGAGACAGGTACGAGA	127
Wx6-R		ACCGAGGAGAAGATCTACGG	
	Wx6-P	ACCACCCACTGTTCCTGGA	
Wx7-F		ACAAGTACATCGCCGTGAAG	200
Wx7-R		TCATGGAGATGGTGGAGGAC	
	Wx7-P	GAGCAGAAGGGACCCGACGT	
Wx8-F		GGGCACGGGCAAGAAGAAGTT	193
Wx8-R		GATGCGATACGGAACGCCCTGCG	
	Wx8-P	GACGTGCTCGCCGTCACCA	

กรมวิชาการเกษตร

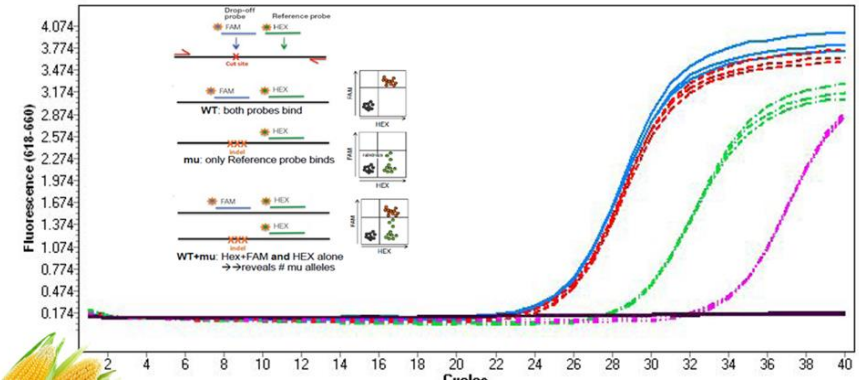
ดำเนินการส่งสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และสร้างพลาสมิดจำลอง โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ส่งให้บริษัททำการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และสร้างพลาสมิดจำลองขึ้น และนำพลาสมิดที่ได้มาใช้ทดสอบปฏิกิริยา และหาสภาพวะที่เหมาะสมในการตรวจหายีน Waxy ในข้าวโพด

ภาพที่ 75 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบที่ทำการออกแบบด้วยโปรแกรม Primer3

การสร้างพลาสมิดจากยีน Waxy ของข้าวโพด โดยการใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลเชื้อพันธุกรรม NCBI เพื่อสร้างพลาสมิดจำลองในการใช้ตรวจหายีน Waxy ในข้าวโพดด้วยเทคนิค digital droplet PCR ได้ชิ้นพลาสมิดเป้าหมายทั้งหมด 8 ชิ้น ไพรเมอร์ และโพรบทั้งหมด 8 ชุด โดยชิ้นพลาสมิดเป้าหมาย ชุดไพรเมอร์และโพรบ Wx1-Wx7 ที่ออกแบบจากบริเวณยีน Waxy ของข้าวโพดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่าง และชิ้นพลาสมิดเป้าหมาย ไพรเมอร์และโพรบ Wx8 ออกแบบจากบริเวณยีน Waxy ของข้าวโพดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

2. การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์และโพรบที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดปรับแต่งจีโนม

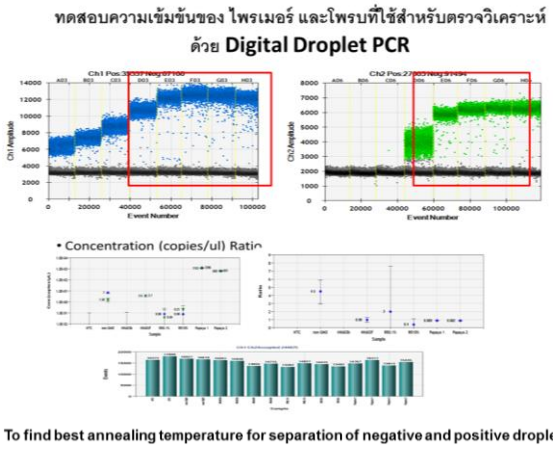
ทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของชุดไพร์เมอร์และโพรบที่ออกแบบมากับตัวอย่างพลาสมิคข้าวโพดทั้ง 5 ตัวอย่างพืช ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดย ใช้ความเข้มข้น DNA ของตัวอย่างที่สกัดได้ที่ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตรเพื่อศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์โพรบทั้ง 2 คู่ ในลำดับเบื้องต้น ผลการทดสอบพบว่า ไพรเมอร์มีความจำเพาะสามารถตรวจพบตำแหน่งยีนของข้าวโพดที่ไม่ถูกปรับแต่งจีโนมได้ และในส่วนของข้าวโพดที่ปรับแต่งจีโนมไม่สามารถตรวจพบยีนที่ขาดหายไปได้อย่างถูกต้อง



ภาพที่ 76 การตรวจจับตำแหน่งยีนส่วนของข้าวโพดปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิค Real-time PCR

ลิขสิทธิ์การเกษตร

หลังจากดำเนินการตรวจสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค Real-time PCR แล้วจึงนำไพรเมอร์และโพรบมาทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Digital Droplet PCR โดยพบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสม เหมือนกับเทคนิค Real time PCR



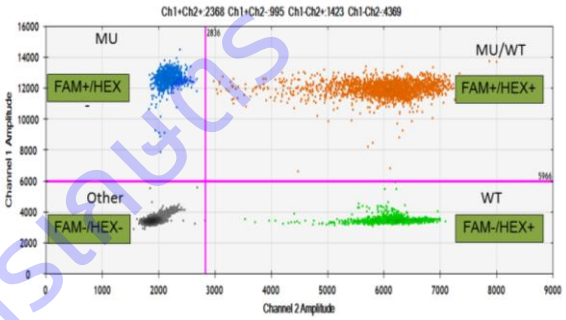
Component	Simplex (ul)		Multiplex
	MU	WT	
2X ddPCR supermix for probe	12.5	12.5	12.5
50 uM MU probe (FAM)	0.125	-	0.125
50 uM MU primer forward	0.45	-	0.45
50 uM MU primer reverse	0.45	-	0.45
50 uM WT probe (HEX)	-	0.125	0.125
50 uM WT primer forward	-	0.45	0.45
50 uM WT primer reverse	-	0.45	0.45
Template	6.25	6.25	6.25
Water	5.225	5.225	4.2
Total Volume	25 ul		25 ul

Cycling Step	Temperature	Time	# Cycles
Enzyme activation	95° C	10 min	1
Denaturation	94° C	30 sec	40
Annealing	62-52° C	60 sec	
Final Extension	98° C	10 min	1

IMPORTANT: Set cycling ramp rate to 2.0 deg C per sec, or equivalent

58-60 C เหมาะสม สำหรับ **Simplex DDPCR** ทั้ง **WT** และ **MU**

60 C เหมาะสม สำหรับ **Multiplex DDPCR**



ภาพที่ 77 องค์ประกอบที่เหมาะสมสำหรับดำเนินงาน Digital Droplet PCR

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output) ของปี 2565

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
ได้ต้นแบบผลิตภัณฑ์ (Prototype) ระดับห้องปฏิบัติการ	1	ต้นแบบ	ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	1	ต้นแบบ		
1. เทคโนโลยีการผลิตต้นมันสำปะหลังปลอดโรค			1. เทคโนโลยีการผลิตต้นมันสำปะหลังปลอดโรค			เป็นต้นแบบเทคโนโลยีการผลิตมันสำปะหลังปลอดโรค มีขั้นตอน ประกอบด้วยเทคโนโลยีหรือกระบวนการใหม่ ดังนี้ **1) เทคโนโลยีการผลิตต้นมันสำปะหลังปลอดโรค** 1. เตรียมท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 2. ฟอกฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3. ทดสอบอาหาร 4. ตรวจสอบหาเชื้อ CMD ด้วยเทคนิค PCR 5. ทดสอบต้นมันสำปะหลังในอุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ 6. ตัดเนื้อเยื่อส่วน apical meristem ชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ 7. ทดสอบสารปฏิชีวนะ ระยะเวลา 1 เดือน ก่อนจะนำต้นไปตรวจหาเชื้อ CMD ด้วยเทคนิค PCR (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.1 และผนวก 3.1)	ได้เทคโนโลยีการผลิตต้นมันสำปะหลังปลอดโรค ในมันสำปะหลัง 2 พันธุ์ ได้แก่ ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50
						2) กระบวนการเพาะเลี้ยงมันสำปะหลังในระบบ TIB เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงมันสำปะหลังในระบบ TIB มีขั้นตอนดังนี้	ได้กระบวนการเพาะเลี้ยงมันสำปะหลังนธุ์ระยอง 72 ในระบบ TIB ระยะเวลาและการเติมอาหารที่เหมาะสม

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
						1. เตรียมท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 จากแหล่งปลูกที่สะอาดไม่มีการระบาดของโรค 2. ฟอกฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3. ชักนำให้เกิดยอดใหม่ 4. ทดสอบการเลี้ยงในระบบ TIB 5. การทดสอบระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 (อยู่ในระหว่างการจัดทำแผ่นพับ)	ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นมันสำปะหลังในระบบ TIB
						3) วิธีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นวิธีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มีขั้นตอนดังนี้ 1. เตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ bacterial culture filtrate (Bacillus sp.) สารสกัดไคโตซานจากเปลือกกุ้ง สารสกัดโปรตีน กรดอะมิโนลิวูลินิคจาก recombinant E. coli 2. เก็บรวบรวมตัวอย่างมันสำปะหลังพันธุ์ที่แสดงอาการของโรคใบด่าง 3.. ตรวจสอบต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรคและต้นพันธุ์มันสำปะหลังที่เป็นโรคเพื่อใช้ในการทดสอบ 4. ทำการทดสอบผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านทาน/ทนทานต่อการแสดงออกของโรคใบด่างมันสำปะหลัง (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.2)	ได้วิธีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ bacterial culture filtrate (Bacillus sp.) สารสกัดไคโตซานจากเปลือกกุ้ง สารสกัดโปรตีน กรดอะมิโนลิวูลินิคจาก recombinant E. coli สำหรับใช้ในการทดสอบการต้านทาน/ทนทานต่อการแสดงออกของโรคใบด่างมันสำปะหลังต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
						4) วิธีการผลิตdsRNA ในการควบคุมแมลงหวี่ขาวยาสูบด้วยเทคโนโลยี RNAi เป็นวิธีการผลิตdsRNA ในการควบคุมแมลงหวี่ขาวยาสูบด้วยเทคโนโลยี RNAi มีขั้นตอนดังนี้ 1. เพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวยาสูบในห้องปฏิบัติการ 2. สืบค้นและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางชีววิทยาของแมลงหวี่ขาว 3. ออกแบบโมเลกุลของ dsRNAs 4. สังเคราะห์ยีน 6 ยีน แล้วนำยีนทั้งหมด ใส่เข้าในเวคเตอร์ pET21a vector จากนั้นจะนำไปทดสอบกับแมลงหวี่ขาวยาสูบและ ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในแมลงต่อไป (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.3)	ได้วิธีการผลิต dsRNA ในแบคทีเรีย E. coli สายพันธุ์ DH5 α สำหรับควบคุมแมลงหวี่ขาวยาสูบด้วยเทคโนโลยี RNAi
						5) วิธีการและรูปแบบสำหรับตรวจวิเคราะห์โรคใบด่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค LAMP-LFICS เป็นวิธีการและรูปแบบสำหรับตรวจวิเคราะห์โรคใบด่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค LAMP-LFICS มีขั้นตอนดังนี้ 1. ออกแบบโพรบและไพรเมอร์ สำหรับเทคนิค LAMP และ RCA ที่ใช้กับ Lateral flow 2. หาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยาในเทคนิค LAMP	ได้วิธีการและรูปแบบสำหรับตรวจวิเคราะห์โรคใบด่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค LAMP-LFICS

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
						3. ดำเนินการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายและรวดเร็วต่อเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง 4. ดำเนินการเปรียบเทียบเทมเพลต เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเชื้อ SLCMV ที่เป็นสาเหตุโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.4)	
						6) รีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและโปรตีน replicase ของไวรัส CMD สำหรับใช้คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและโปรตีน replicase ของไวรัส CMD ที่โคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและโปรตีน replicase ของไวรัส CMV เข้าสู่ expression vector (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.5)	ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและโปรตีน replicase ของไวรัส CMD สำหรับใช้คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์
ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	12	กระบวนการ	ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	12	กระบวนการ		
1. สูตรอาหารสำหรับการเกิดต้นขมิ้นชันในสภาพปลอดเชื้อ			1. สูตรอาหารสำหรับการเกิดต้นขมิ้นชันในสภาพปลอดเชื้อ			เป็นสูตรอาหารสำหรับการเกิดต้นขมิ้นชันในสภาพปลอดเชื้อ (อยู่ในระหว่างการจัดทำแผ่นพับ)	ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นขมิ้นชันและเพิ่มปริมาณยอดของขมิ้นชันสำหรับการเกิดต้นขมิ้นชันในสภาพปลอดเชื้อ

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
2. ชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการสะสมสารสำคัญในเหง้าจิ๋วขมิ้นชัน			2. ชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการสะสมสารสำคัญในเหง้าจิ๋วขมิ้นชัน			เป็นชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการสะสมสารสำคัญในเหง้าจิ๋วขมิ้นชัน (อยู่ในระหว่างการจัดทำแผ่นพับ)	ได้ชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการสะสมสารสำคัญ curcuminในเหง้าจิ๋วขมิ้นชัน
3. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตและเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย			3. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตและเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย			เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตและเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ได้แก่ สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำ plb ของกล้วยไม้ สูตรอาหารและสารกลุ่มcytokinin ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณของ plb ในระบบ Bioreactor และสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดสารสำคัญ moscatilin ใน plb ของกล้วยไม้ (อยู่ในระหว่างการจัดทำแผ่นพับ)	ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตและเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย
4. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียม			4. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียม			เป็นกระบวนการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียม มีขั้นตอนดังนี้ 1. สังเคราะห์คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 2. คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐาน ด้วยเทคนิค Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) จำนวน 15 รอบ โคลนเข้าเวคเตอร์ จำนวน ตัวอย่างละ 190 โคลน 3. นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จำนวน 380 โคลน คัดเลือกการจับสารมาตรฐานด้วยเทคนิค ELAA (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.6)	ได้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียม

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
5. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักตะกั่ว			5. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักตะกั่ว			เป็นกระบวนการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักตะกั่ว มีขั้นตอนดังนี้ 1. สังเคราะห์คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 2. คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐาน ด้วยเทคนิค Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) จำนวน 15 รอบ โคลนเข้าเวคเตอร์ จำนวน ตัวอย่างละ 190 โคลน 3. นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จำนวน 380 โคลน คัดเลือกการจับสารมาตรฐานด้วยเทคนิค ELAA (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.7)	ได้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักตะกั่ว
6. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง คาร์บาริล (carbaryl)			6. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง คาร์บาริล (carbaryl)			เป็นกระบวนการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง คาร์บาริล (carbaryl) มีขั้นตอนดังนี้ 1. สังเคราะห์คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 2. คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐาน ด้วยเทคนิค Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) จำนวน 15 รอบ โคลนเข้าเวคเตอร์ จำนวน ตัวอย่างละ 190 โคลน 3. นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จำนวน 380 โคลน คัดเลือกการจับสารมาตรฐานด้วยเทคนิค ELAA (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.8)	ได้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง คาร์บาริล (carbaryl)

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
7. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin)			7. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin)			เป็นกระบวนการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin) มีขั้นตอนดังนี้ 1. สังเคราะห์คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 2. คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐาน ด้วยเทคนิค Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) จำนวน 15 รอบ โคลนเข้าเวคเตอร์ จำนวน ตัวอย่างละ 190 โคลน 3. นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จำนวน 380 โคลน คัดเลือกการจับสารมาตรฐานด้วยเทคนิค ELAA (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.9)	ได้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin)
8. ชุดยีน gRNA สำหรับปรับแต่งยีนมะละกอให้ต้านทานโรคจุดวงแหวน และวิธีส่งถ่ายยีนให้มะละกอกลายพันธุ์			8. ชุดยีน gRNA สำหรับปรับแต่งยีนมะละกอให้ต้านทานโรคจุดวงแหวน และวิธีส่งถ่ายยีนให้มะละกอกลายพันธุ์			เป็นการสร้างชุดยีน gRNA สำหรับปรับแต่งยีนมะละกอให้ต้านทานโรคจุดวงแหวน และวิธีส่งถ่ายยีนให้มะละกอกลายพันธุ์ มีขั้นตอนดังนี้ 1. วิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ และทำการออกแบบเวคเตอร์สำหรับเทคนิค CRISPR/Cas 2. ศึกษาและทดสอบตำแหน่งเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับถ่ายฝากยีน 3. ทดสอบระบบพาหะสำหรับการถ่ายฝากเวคเตอร์ 4. ศึกษาวิธีการถ่ายฝากยีนในรูปแบบต่างๆ เช่น อะโกรแบคทีเรียม หรือ การยิงอนุภาคในเนื้อเยื่อ	ได้ชุดยีน gRNA สำหรับปรับแต่งยีนมะละกอให้ต้านทานโรคจุดวงแหวน และวิธีส่งถ่ายยีนให้มะละกอกลายพันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
						5. ศึกษาวิธีตรวจสอบเนื้อเยื่อคัดเลือกที่ได้รับการถ่ายฝากยีนด้วยเทคนิค PCR (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.10)	
9. สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะละกอ และวิธีการชักนำการเกิดยอดจาก hypocotyl และเนื้อเยื่อใบก่อนและหลังการยิงอนุภาคทังสเตน			9. สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะละกอ และวิธีการชักนำการเกิดยอดจาก hypocotyl และเนื้อเยื่อใบก่อนและหลังการยิงอนุภาคทังสเตน			เป็นการทดสอบสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะละกอ และวิธีการชักนำการเกิดยอดจาก hypocotyl โดยทดลองสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดมะละกอจำนวนมาก ได้แก่ ชิ้นส่วน hypocotyl ชิ้นส่วนยอดที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อต้นมะละกออายุ 60-90 วัน และชิ้นส่วนข้อที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อต้นมะละกออายุ 60-90 วัน (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.11)	ได้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วิธีการชักนำการเกิดยอดจาก hypocotyl และเนื้อเยื่อใบก่อนและหลังการยิงอนุภาคทังสเตน สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่มะละกอต่อไป
10. โปรตีน Recombinant expression Cas12a และผลการทดสอบ Cas12a เพื่อนำไปพัฒนาการตรวจยีนกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค SHERLOK			10. โปรตีน Recombinant expression Cas12a และผลการทดสอบ Cas12a เพื่อนำไปพัฒนาการตรวจยีนกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค SHERLOK			เป็นกระบวนการผลิตโปรตีน Recombinant expression Cas12a และผลการทดสอบ Cas12a เพื่อนำไปพัฒนาการตรวจยีนกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค SHERLOK ได้รายละเอียดดังนี้ - ได้ Reporter ทั้งแบบ FB และ FQ - ได้ กระบวนการสังเคราะห์ crRNA - ได้ crRNA จากการการสังเคราะห์แบบ In vitro - ได้ crRNA-cas12a แบบ In vitro เบื้องต้น และ Plasmid สำหรับ สังเคราะห์เอนไซม์ Cas12a - ได้ เอนไซม์ Cas12a สังเคราะห์ได้เบื้องต้น	ได้โปรตีน Recombinant expression Cas12a และผลการทดสอบ Cas12a เพื่อนำไปพัฒนาการตรวจยีนกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค SHERLOK ต่อไป

ศรีวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
						- ได้กระบวนการทำ เอนไซม์ Cas12a ที่สังเคราะห์ได้ ให้บริสุทธิ์ (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.12)	
11. เวคเตอร์จำลองรูปแบบยีนการกลายพันธุ์ของถั่วเหลืองและสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อนำไปตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค LFICS			11. เวคเตอร์จำลองรูปแบบยีนการกลายพันธุ์ของถั่วเหลืองและสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อนำไปตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค LFICS			เป็นกระบวนการผลอตเวคเตอร์จำลองรูปแบบยีนการกลายพันธุ์ของถั่วเหลืองและสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ 1. ออกแบบ plasmid DNA ที่ใช้เป็นวัสดุทดสอบของ ยีน FAD2-1A FAD2-1B และ FAD3A และเพิ่มปริมาณใน E.coli competent cell เพื่อใช้เป็น stock เก็บไว้ใช้เป็นวัสดุอ้างอิงทดสอบ 2. ทดสอบความจำเพาะต่อตำแหน่งยีนที่มีการปรับแต่งของยีน กับพลาสมิดที่ออกแบบและถั่วเหลืองปกติที่ไม่ผ่านการปรับแต่งยีน 3. ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย 4. ทดสอบไพรเมอร์ที่ติดฉลากสีเพื่อแสดงผลการเพิ่มยีนเป้าหมาย 5. ทดสอบไพรเมอร์ที่ติดฉลากสีเพื่อแสดงผลการเพิ่มยีนเป้าหมายในระดาษทดสอบ LFICS ของคู่ยีน FAD2-1B กับ lictin (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.13)	มีเวคเตอร์จำลองรูปแบบยีนการกลายพันธุ์ของถั่วเหลืองและสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับการตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค LFICS

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
12. ได้ชุดไพรเมอร์และสภาวะการตรวจคัดกรองข้าวโพดกลายพันธุ์แบบแม่นยำด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR			12. ได้ชุดไพรเมอร์และสภาวะการตรวจคัดกรองข้าวโพดกลายพันธุ์แบบแม่นยำด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR			เป็นกระบวนการทดสอบชุดไพรเมอร์และสภาวะการตรวจคัดกรองข้าวโพดกลายพันธุ์แบบแม่นยำด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR มีขั้นตอนดังนี้ 1.ตรวจสอบข้อมูลของลำดับเบสของพลาสมิด และคัดเลือกไพร์เมอร์และโพรบจำนวน 2 ชุด ที่สามารถตรวจสอบได้กับพลาสมิดทั้ง 6 กลุ่มของข้าวโพดปรับแต่งจีโนม 2.ทดสอบระบบสภาวะของปฏิกิริยาในการตรวจคัดกรองข้าวโพดปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR โดยศึกษาปริมาณและความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ 3.ทดสอบระบบสภาวะของปฏิกิริยาในการตรวจคัดกรองข้าวโพดปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR อุณหภูมิขั้นตอน annealing และโปรแกรมในการทดสอบด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.14)	มีชุดไพรเมอร์และสภาวะการตรวจคัดกรองข้าวโพดกลายพันธุ์แบบแม่นยำสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR

*** ใส่ผลผลิตที่ได้ตามคำรับรอง**

**** หลักฐานเชิงประจักษ์ของผลผลิตให้แสดงรายละเอียดในภาคผนวก และแนบไฟล์ เรียงตามลำดับผลผลิต**

กรมวิชาการเกษตร

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์

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

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านเศรษฐกิจ :	
ด้านสังคม :	
ด้านสิ่งแวดล้อม :	

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

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการ/กระบวนการผลักดันงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (โปรดแนบหลักฐานเชิงประจักษ์การนำผลงานไปใช้ประโยชน์ โดยชี้แจงรายละเอียดไว้ในภาคผนวก และแนบไฟล์หลักฐาน)

ด้านวิชาการ

นักวิชาการ นักวิจัย ของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง และหน่วยงานภายในกรมวิชาการเกษตร ได้รับองค์ความรู้เรื่อง “เทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรคใบด่าง” ในงานประชุมติดตามแผน เมื่อวันที่ 13 ธันวาคม 2565 (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 3.1)

นักวิชากร นักวิจัย นักศึกษา ภาครัฐ ภาคเอกชน มหาวิทยาลัย ได้รับองค์ความรู้จากการตีพิมพ์ผลงานวิจัย เรื่อง “การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองกรดโอเลอิกสูงที่ผ่านการปรับแต่งยีน FAD3A ด้วยเทคนิค Duplex PCR” ในการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 14 ภายใต้หัวข้อ “วิจัยสร้าง Inovation and Technology เพื่อรองรับสังคมไทยยุค Digital World ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม เมื่อวันที่ 7-8 กรกฎาคม 2565 (หลักฐานดังไฟล์ภาคผนวก 2.13)

*** คำจำกัดความการนำใช้ประโยชน์ในแต่ละด้าน**

1. ด้านนโยบายและสาธารณะ การนำความรู้จากงานวิจัยไปใช้ในกระบวนการกำหนดนโยบาย อาจเป็นนโยบายระดับประเทศ ระดับภูมิภาค ระดับจังหวัด ระดับท้องถิ่นการใช้ประโยชน์ด้านนโยบายจะรวมทั้ง

กรมวิชาการเกษตร

การนำองค์ความรู้ไปสังเคราะห์เป็นนโยบายหรือทางเลือกเชิงนโยบาย (Policy options) แล้วนำนโยบายนั้นไปสู่ผู้ใช้ประโยชน์ในวงกว้างเพื่อประโยชน์ของสังคม และประชาชนทั่วไป เพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตของประชาชน สร้างสังคมคุณภาพ และส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม

2. **ด้านพาณิชย์/เศรษฐกิจ** เป็นผลงานวิจัยที่เน้นสร้างนวัตกรรม เทคโนโลยี ผลิตภัณฑ์ใหม่ หรือการพัฒนาจากสิ่งที่มีอยู่เดิม โดยเป็นการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเชิงพาณิชย์หรือลดการนำเข้าเทคโนโลยีจากต่างประเทศ หรือนำไปสู่การพัฒนารูปแบบธุรกิจใหม่ โดยมีเป้าหมายเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม เพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตและบริการ

3. **ด้านสังคมและชุมชน** การนำกระบวนการ วิธีการ องค์ความรู้ การเปลี่ยนแปลงการเสริมพลัง อันเป็นผลกระทบ ที่เกิดจากการวิจัยและพัฒนาชุมชน ท้องถิ่นพื้นที่ ไปใช้ให้เกิดประโยชน์การขยายผลต่อชุมชน ท้องถิ่น หรือรวมถึงสังคมอื่น

4. **ด้านวิชาการ** เป็นผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการ การนำองค์ความรู้จากผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ระดับชาติหนังสือ ตำรา บทเรียน ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ การเรียนรู้ การเรียนการสอนในวงนักวิชาการและผู้สนใจด้านวิชาการ รวมถึงการนำผลงานวิจัยไปวิจัยต่อยอดสื่อสาธารณะ การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ ผ่านทางหนังสือพิมพ์ / วารสาร / โทรทัศน์ / วิทยุ / คู่มือ / แผ่นพับ การฝึกอบรม และสื่อสังคมออนไลน์ต่าง ๆ เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผลและอภิปรายผล

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 เทคโนโลยีชีวภาพและนวัตกรรมการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลัง

สรุปผล ได้ต้นแบบผลิตภัณฑ์ (Prototype) ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 1 ต้นแบบ คือ ต้นแบบเทคโนโลยีการผลิตต้นมันสำปะหลังปลอดโรค ประกอบด้วยเทคโนโลยีและกระบวนการ ดังนี้

1. ได้ต้นแบบเทคโนโลยีการผลิตต้นมันสำปะหลังปลอดโรค สรุปรายละเอียด ดังนี้ การเตรียมท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU50) จากแหล่งปลูกที่สะอาดไม่มีการระบาดของโรคและมีความตรงตามพันธุ์ นำมาปลูกในโรงเรือนเพื่อชักนำให้เกิดยอด แล้วนำยอดอ่อน มาฟอกฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้ชิ้นส่วนตายอดและตาข้าง แล้วนำชิ้นส่วนตายอดทดสอบในอาหารที่มี salicylic acid ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 mg/l นาน 1 เดือน พบว่า ความเข้มข้นที่ 30 และ 40 mg/l มีผลต่อการเกิดยอดใหม่ หรือทำให้เกิดต้นแคระแกร็น จากนั้นนำใบ ไปตรวจสอบหาเชื้อ CMD ด้วยเทคนิค PCR แล้วทดสอบต้นมันสำปะหลัง ในอุณหภูมิและสภาพแส่งาต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 36°C / 32°C และอุณหภูมิ 38° C/34°C เมื่อครบระยะเวลา 1 หรือ 2 สัปดาห์ตามกำหนด ต้นยังคงเจริญเติบโตได้ดีในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (growth chamber) ไม่มีอาการต้นเหี่ยว หรือต้นตาย จากนั้นนำต้นไปฟอกฆ่าเชื้อเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเมื่อเกิดต้นใหม่จะนำไปตรวจหาเชื้อ CMD ด้วยเทคนิค PCR แล้วนำต้นมันสำปะหลัง มาตัดเนื้อเยื่อส่วน apical meristem ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้มีขนาดประมาณ 1-2 มม. เมื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ พบว่า apical meristem จะพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้เมื่อระยะเวลานาน 2 เดือน จากนั้นจะนำต้นที่เกิดขึ้นไปตรวจหาเชื้อ CMD ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป การทดสอบสารปฏิชีวนะ Ribavarin ความเข้มข้น 0, 15, 20, 25 และ 30 mg/l ระยะเวลานาน 2 เดือน จากนั้นย้ายต้นมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ระยะเวลา 1 เดือน ก่อนจะนำต้นไปตรวจหาเชื้อ CMD ด้วยเทคนิค PCR

2. ได้กระบวนการเพาะเลี้ยงมันสำปะหลังในระบบ TIB สรุปรายละเอียด ดังนี้ การเตรียมท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 จากแหล่งปลูกที่สะอาดไม่มีการระบาดของโรคและมีความตรงตามพันธุ์ นำมาปลูกในโรงเรือนเพื่อชักนำให้เกิดยอด 2. นำยอดอ่อนของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 จากโรงเรือน มาฟอกฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการใช้ชิ้นส่วนตายอด และตาข้างของมันสำปะหลัง3. ชักนำให้เกิดยอดใหม่ในอาหาร MS และเพิ่มปริมาณยอดในสูตรอาหาร MS+BA 1 mg/l เพื่อให้มีปริมาณต้นเพียงพอสำหรับนำไปทดสอบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ TIB4. นำต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยอด ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร มาทดสอบการเลี้ยงในระบบ TIB ประกอบด้วย 4 สูตรอาหาร ได้แก่ สูตรที่ 1 ½ MS + BA 0.5 mg/l สูตรที่ 2 ½ MS + BA 1 mg/l สูตรที่ 3 MS + BA 0.5 mg/l สูตรที่ 4 MS + BA 1 mg/lเมื่อครบระยะเวลา 1 เดือน นำต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ที่ผ่านการทดสอบสูตรอาหารต่างๆ ในระบบ TIB เปลี่ยนมาชักนำให้ต้นมีขนาดใหญ่และเกิดรากในอาหารสูตร MS พบว่า ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 จะเจริญเติบโตได้ดีในสูตรอาหาร MS ในขณะที่สูตรอาหาร 1/2 MS ต้นจะมีลักษณะฉ่ำน้ำ5. การ

กรมวิชาการเกษตร

ทดสอบระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 โดยมีกรรมวิธีต่างๆ จำนวน 6 กรรมวิธี คือ การเติมอาหาร 5, 10 และ 15 นาที และการเติมอาหารทุก 2 หรือ 4 ชั่วโมง ขณะนี้ได้ดำเนินการทดสอบที่ระยะเวลา การเติมอาหาร 5 นาที ทุก 2 ชั่วโมง พบว่า ต้นจะมีอาการฉ่ำน้ำ ใบกรอบและหลุดร่วงได้ง่าย

3. ได้วิธีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สรุปรายละเอียด ดังนี้ การเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ bacterial culture filtrate (*Bacillus* sp.) สารสกัดไคโตซานจากเปลือกกุ้ง สารสกัดโปรตีน กรดอะมิโนลิวูลินิคจาก recombinant *E. coli* 2. สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมันสำปะหลังพันธุ์ 81, 89 ที่แสดงอาการของโรคใบด่าง ในแปลงมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง 3. สังเคราะห์ไพรเมอร์ CpSLC_F, CpSLC_R ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ SLCMV 4. ตรวจสอบต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรคและต้นพันธุ์มันสำปะหลังที่เป็นโรคเพื่อใช้ในการทดสอบ โดยการตรวจสอบด้วยการสกัดสารพันธุกรรมแล้วทำปฏิกิริยา pcr ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (ไพรเมอร์ pSLC_F, CpSLC_R) กับเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่าง SLCMV สามารถเพิ่มผลผลิต pcr ซึ่งมีขนาด~750 คู่เบส ส่วนต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค 'สามารถเพิ่มผลผลิต PCR ได้เฉพาะไพรเมอร์ ITS1,ITS4 เท่านั้น 5. ทำการทดสอบผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านทาน/ทนทานต่อการแสดงออกของโรคใบด่างมันสำปะหลัง วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วยกรรมวิธี การแช่ท่อนพันธุ์ในสารชีวภาพดังนี้ bacterial culture filtrate (*Bacillus* sp.) สารสกัดไคโตซาน สารสกัดโปรตีน กรดอะมิโนลิวูลินิค กรดซาลิไซลิก SHAM+กรดซาลิไซลิก และทำการปลูกเพื่อสังเกตการแสดงออกของโรค และวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลที่มีการเปลี่ยนแปลง เปรียบเทียบกับชุดควาบคุม (ไม่ใช้สาร) อยู่ระหว่างการทดสอบและเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง

4. ได้วิธีการผลิตdsRNA ในการควบคุมแมลงหวี่ขาวยาสูบด้วยเทคโนโลยี RNAi สรุปรายละเอียด ดังนี้ ทำการเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวยาสูบในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดสอบ Bioassay และขอความร่วมมือการใช้ประชากรแมลงหวี่ขาวยาสูบจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องภายในกรมวิชาการเกษตร 2. ศึกษา สืบค้นและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางชีววิทยาของแมลงหวี่ขาว ออกแบบโมเลกุลของ dsRNAs เพื่อทำการ knock down กลุ่มยีนของแมลงหวี่ขาวที่คัดเลือกไว้ จำนวน 6 ชนิดได้แก่ยีน 1) Acetylcholine receptor subunit α , 2) Alpha glucosidase 1 3) Aquaporin 1 4) Heat shock protein 70 5) Trehalase1 6) Trehalose transporter1 สังเคราะห์ยีน 6 ยีน แล้วนำยีนทั้งหมด ใส่เข้าในเวคเตอร์ pET21a vector ซึ่งเป็นเวคเตอร์ชนิด blunt end แล้วนำไปใส่ในแบคทีเรีย E. coli สายพันธุ์ DH5 α เพื่อนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ RNAi จากนั้นจะนำไปทดสอบกับแมลงหวี่ขาวยาสูบและ ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในแมลงต่อไป

5. ได้วิธีการและรูปแบบสำหรับตรวจวิเคราะห์โรคใบด่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค LAMP-LFICS สรุปรายละเอียด ดังนี้ ออกแบบโพรบและไพรเมอร์ สำหรับเทคนิค LAMP และ RCA ที่ใช้กับ Lateral flow-Immunochromatographic strip และศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยาในเทคนิค LAMP เพื่อตรวจสอบโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง หาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยาในเทคนิค LAMP เพื่อตรวจสอบโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง เปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายและรวดเร็วต่อเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง และเปรียบเทียบเทมเพลต เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเชื้อ SLCMV

กรมวิชาการเกษตร

6. ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและโปรตีน replicase ของไวรัส CMD สำหรับใช้คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ สรุปรายละเอียด ดังนี้ ออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและโปรตีน replicase ของไวรัส CMV และโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและโปรตีน replicase ของไวรัส CMD เข้าสู่ expression vector และสังเคราะห์คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส CMV ด้วยเทคนิค Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) จำนวน 15 รอบ โคลนเข้าเวคเตอร์

อภิปรายผล

การดำเนินงานในส่วนของการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรค โดยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อใช้ความร้อนที่สูงต้นมันสำปะหลังจะเกิดอาการเหี่ยว แต่การใช้สารปฏิชีวนะ Ribavirin สามารถทำให้ต้นมันสำปะหลังปลอดโรคใบด่างได้ การใช้ Salicylic acid ความเข้มข้น 30 และ 40 mg/l มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นมันสำปะหลัง และเมื่อตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุของโรคใบด่างด้วยเทคนิค PCR ไม่พบเชื้อสาเหตุของโรคด่าง สำหรับการขยายต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรคด้วยเทคนิค Temporary Immersion Bioreactor (TIB) สูตรอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 คือ สูตรอาหาร MS ร่วมกับการใส่ BA เมื่อย้ายสู่อาหารแข็ง คือ สูตรอาหาร ½ MS ในพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 คือ MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/l เมื่อย้ายต้นมันสำปะหลังไปยังอาหารแข็ง พบว่า อาหารสูตร ½ MS หรือ MS ที่มี BA 1 mg/l จะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ส่วนสารออกออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีแนวโน้มสร้างความทนทานให้ท่อนมันสำปะหลังที่ติดเชื้อ SLCMV สามารถเจริญเติบโตได้ดี ได้แก่ bacterial culture (*Bacillus* sp.) เอนไซม์ไคติเนส (recombinant *E. coli*) สารสกัดโปรตีนจากถั่วเหลือง ALA skim milk ascobic acid และ Thiamime ซึ่งมีผลทำให้การแสดงอาการของโรคใบด่างน้อยกว่าการไม่แช่สารเลย

การดำเนินงานปลูกมันสำปะหลังเพื่อเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือนด้วยอาหารธรรมชาติคือต้นมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่แมลงหวี่ขาวชอบ เช่น CMR89 และ มะเขือเปราะเจ้าพระยา และการทดสอบประสิทธิภาพของ dsRNA ที่สังเคราะห์ กับแมลงหวี่ขาวยาสูบ เพื่อคัดเลือกแบบของโมเลกุลที่มีศักยภาพในการกำจัดแมลง ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณ dsRNAs ปริมาณมากได้ อยู่ในระหว่างการออกแบบโมเลกุล dsRNAs เพิ่มเติม การออกแบบไพรเมอร์จาก เชื้อ Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) บริเวณ AV1 gene เพื่อใช้ทำปฏิกิริยา PCR RPA และ ตำแหน่ง outer ของ LAMP โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากเชื้อ SLCMV-KU มี ขนาดประมาณ 771 bp และไพรเมอร์ที่ออกแบบจากเชื้อ SLCMV-DOA1 มี ขนาดประมาณ 600 bp สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ในส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR RPA และ outer LAMP รวมถึงโปรแกรมตามที่ได้ศึกษาทดลองและพบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ SLCMV 100 เปอร์เซ็นต์ การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase จากไวรัส SLCMV ในใบมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง พบแถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase ขนาด 780 และ 1035 คู่เบส ซึ่งสามารถนำไปทำการ

กรมวิชาการเกษตร

เพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และยีน replicase และชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน และ รีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และโปรตีน replicase ที่ได้ มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับที่คำนวณไว้ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อไป

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 การเพิ่มศักยภาพการผลิตสารสำคัญให้ปลอดภัยจากสารปนเปื้อนในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สรุปผล ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 3 กระบวนการ คือ

1. ได้สูตรอาหารสำหรับการเกิดต้นขมิ้นชันในสภาพปลอดเชื้อ สรุปรายละเอียด ดังนี้ เก็บรวบรวมตัวอย่างเหง้าขมิ้นชันพันธุ์ตรัง1 (ขมิ้นทอง) จาก ศวส.ตรัง และแปลงเกษตรกร จ.พังงา เก็บตัวอย่างเหง้าขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 2 (ขมิ้นด้วง) จากแปลงเกษตรกร อ.ร่อนพิบูลย์ จ.นครศรีธรรมราช นำเหง้าขมิ้นชันทั้งสองพันธุ์มาเพาะในโรงเรือนให้เกิดต้นอ่อนโดยใช้ระยะเวลา 3 เดือน นำต้นอ่อนที่เกิดขึ้นไปฟอกฆ่าเชื้อ นำต้นอ่อนของขมิ้นชันมาฟอกฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งต้นอ่อนจะเกิดขึ้นโดยใช้เวลานาน 2 เดือน 5. นำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของขมิ้นชันมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS+BA 3 mg/l ระยะเวลา 3 เดือน เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก นำต้นขมิ้นชันที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ทดสอบในสูตรอาหารสำหรับการสร้างเหง้าจิ๋ว ระยะเวลา 4 เดือน ประกอบด้วย 1) สูตรอาหาร MS ความเข้มข้น 1 เท่า สภาพอาหารแข็ง (control) 2) สูตรอาหาร MS ความเข้มข้น 1 เท่า สภาพอาหารเหลว 3) สูตรอาหาร MS ความเข้มข้น ½ เท่า สภาพอาหารเหลว 4) สูตรอาหาร MS ความเข้มข้น ½ เท่า สภาพอาหารแข็ง ขณะนี้ดำเนินการทดสอบในสูตรอาหารได้ 2 เดือน พบว่า ในอาหารเหลวลักษณะต้นจะเกิดอาการฉ่ำน้ำ ใบกรอบ ใบเหลือง ในขณะที่อาหารแข็งไม่เกิดอาการดังกล่าว เมื่อครบระยะเวลาจะเช็คผลการเกิดเหง้าจิ๋วต่อไป

2. ได้ชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการสะสมสาระสำคัญในเหง้าจิ๋วขมิ้นชัน สรุปรายละเอียด ดังนี้ นำต้นขมิ้นชันที่ปลอดเชื้อมาทดสอบชักนำสารสำคัญ ในสูตรอาหารต่างๆ ระยะเวลา 4 เดือน ได้แก่ 1) สูตรอาหาร MS (Control) 2) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA 3 mg/l3) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA 5 mg/l 4) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ Methyl jasmonate 3 mg/l 5) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ Methyl jasmonate 5 mg/l 6) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ Salicylic acid 3 mg/l 7) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ Salicylic acid 5 mg/l ขณะนี้ดำเนินการทดสอบในสูตรอาหารได้ 1 เดือน เมื่อครบระยะเวลาจะนำไปตรวจปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค UHPLC เพื่อหาปริมาณสาร curcumin ต่อไป

3. ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตและเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย สรุปรายละเอียด ดังนี้ นำต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์เอียสกุลมาเลี้ยงในโรงเรือน เพื่อให้เกิดหน่ออ่อน นำหน่อกล้วยไม้มาฟอกฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ชิ้นส่วนตาอ่อนและตาข้างของหน่อกล้วยไม้ นำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างมาเลี้ยงในอาหารสำหรับการชักนำให้เกิดโปรโตคอร์ม (plb) ใช้ระยะเวลานาน 4 เดือน นำ plb ที่เกิดขึ้นมาเลี้ยงในสูตรอาหาร VW สำหรับการเพิ่มปริมาณ plb โดยต้องย้ายเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ ทดสอบสูตรอาหารร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในระบบ Bioreactor จำนวน 7 สูตร ระยะเวลา 3 เดือน 1) สูตรอาหาร VW (control) 2) สูตรอาหาร VW ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L 3) สูตรอาหาร VW ร่วมกับ TDZ ความ

กรมวิชาการเกษตร

เข้มข้น 1 mg/L 4) สูตรอาหาร 1/2 MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L 5) สูตรอาหาร 1/2 MS ร่วมกับ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 mg/L 6) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L 7) สูตรอาหาร MS ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 mg/L คัดเลือก plb ให้มีขนาดใกล้เคียงกันมาทดสอบในสูตรอาหารดังกล่าวได้ ระยะเวลา 1 เดือน พบว่ายังไม่มีการเปลี่ยนแปลง ทดสอบชนิดของสารที่ชักนำสารสำคัญ moscatilin ใน plb ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ระยะเวลา 3 เดือน 1) สูตรอาหาร ½ MS (control) 2) สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ Salicylic acid ความเข้มข้น 50 µM 3) สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ Salicylic acid ความเข้มข้น 75 µM 4) สูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับ Salicylic acid ความเข้มข้น 100 µM คัดเลือก plb ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาทดสอบในสูตรอาหารต่างๆ ซึ่งขณะนี้ดำเนินการได้ 2 สัปดาห์ พบว่ายังไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อครบกำหนดระยะเวลาจะนำไปตรวจสอบปริมาณสาร moscatilin ด้วยเทคนิค UHPLC

อธิปรายผล

การดำเนินงานวิจัยสภาพอาหารแข็งที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 50 g/l มีผลต่อการเกิดรากขนาดใหญ่ของขมิ้นชันและสามารถพัฒนาเป็น micro rhizome ได้ ส่วนสภาพอาหารเหลว พบว่า สูตรอาหาร MS จะทำให้ต้นมีการเจริญเติบโตด้านความสูงและแตกกอได้ การชักนำให้ขมิ้นชันสะสมสารสำคัญในสูตรอาหาร MS ร่วมกับ Methyl jasmonate หรือ Salicylic acid ทำให้ขมิ้นชันเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน การผลิตโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BA จะทำให้สามารถเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มได้ การชักนำการสะสมสารสำคัญมอสคาติลินในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย จากการทดสอบในสูตรอาหารหลัก ½ MS พบว่า เป็นสูตรอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย การพัฒนาเหง้าจิ๋วของขมิ้นชันเกิดจากการใช้ปริมาณน้ำตาลซูโครส 50 g/l จะพบการพัฒนาของส่วนรากได้มากกว่าการใช้น้ำตาลซูโครส 30 g/l และการผลิตโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายในระบบ Bioreactor หรือการใช้อาหารเหลว พบว่า สูตรอาหารหลักที่เหมาะสมคือ สูตร Vacin and Went (VW) มากกว่าการเลือกใช้สูตร MS และการเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มทำได้โดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 การพัฒนาชุดตรวจสอบสารปนเปื้อนทางการเกษตรอย่างรวดเร็วเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชปลอดภัย

สรุปผล ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 4 กระบวนการ คือ

1. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียม สรุปรายละเอียด ดังนี้ สังเคราะห์คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อโลหะหนักแคดเมียม คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐานแคดเมียม ด้วยเทคนิค Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) จำนวน 15 รอบ โคลนเข้าเวคเตอร์ จำนวนตัวอย่างละ 190 โคลน นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จำนวน 380โคลน คัดเลือกการจับสารมาตรฐานแคดเมียม ด้วยเทคนิค ELAA

กรมวิชาการเกษตร

2. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักตะกั่ว สรุปรายละเอียด ดังนี้ สังเคราะห์คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อโลหะหนักตะกั่ว คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐาน ด้วยเทคนิค Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) จำนวน 15 รอบ โคลนเข้าเวคเตอร์ จำนวน ตัวอย่างละ 190 โคลน นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จำนวน 380โคลน คัดเลือกการจับสารมาตรฐานตะกั่ว ด้วยเทคนิค ELAA

3. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง คาร์บาริล (carbaryl) สรุปรายละเอียด ดังนี้ สังเคราะห์คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อ สารคาร์บาริล คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารคาร์บาริล ด้วยเทคนิค Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) จำนวน 15 รอบ โคลนเข้าเวคเตอร์ จำนวน ตัวอย่างละ 190 โคลน นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จำนวน 380โคลน คัดเลือกการจับสารมาตรฐานคาร์บาริล ด้วยเทคนิค ELAA

4. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin) สรุปรายละเอียด ดังนี้ สังเคราะห์คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารไซเพอร์เมทริน คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อสารมาตรฐาน ไซเพอร์เมทริน ด้วยเทคนิค Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) จำนวน 15 รอบ โคลนเข้าเวคเตอร์ จำนวน ตัวอย่างละ 190 โคลน 3. นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จำนวน 380โคลน คัดเลือกการจับสารมาตรฐานไซเพอร์เมทริน ด้วยเทคนิค ELAA

อภิปรายผล

การดำเนินวิจัยในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณสุ่มของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์แต่ละโคลนมีความแตกต่างกัน จึงทำให้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์มีโครงสร้างทุติยภูมิ ที่ประกอบด้วย loop และ hairpin ที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งโครงสร้างที่ประกอบด้วย loop และ hairpin เหล่านี้ เป็นโครงสร้างที่มีส่วนสำคัญในการจับกับสารเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการกลายพันธุ์แบบแม่นยำเพื่อผลิตพืชปลอดภัยและยั่งยืน

สรุปผล ได้เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 5 กระบวนการ คือ

1. ชุดยีน gRNA สำหรับปรับแต่งยีนมะละกอให้ต้านทานโรคจุดวงแหวน และวิธีส่งถ่ายยีนให้มะละกอกลายพันธุ์ สรุปรายละเอียด ดังนี้ วิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ และทำการออกแบบเวคเตอร์สำหรับเทคนิค CRISPR/Cas 2 ศึกษาและทดสอบตำแหน่งเนื้อเยื้อที่เหมาะสมสำหรับถ่ายฝากยีน ทดสอบระบบพาหะสำหรับการถ่ายฝากเวคเตอร์ ศึกษาวิธีการถ่ายฝากยีนในรูปแบบต่างๆ เช่น อะโกรแบคทีเรียม หรือ การยิงอนุภาคในเนื้อเยื่อมะละกอ.ศึกษาวิธีตรวจสอบเนื้อเยื่อคัดเลือกที่ได้รับการถ่ายฝากยีนด้วยเทคนิค PCR

2. สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะละกอ และวิธีการชักนำการเกิดยอดจาก hypocotyl และเนื้อเยื่อใบก่อนและหลังการยิงอนุภาคทังสเตน สรุปรายละเอียด ดังนี้ ต้นกล้ามะละกอที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอด

เชื้อ ที่ประสบผลสำเร็จคือการใช้เมล็ดที่ได้จากฟอกผลมะละกอสุก (อย่างน้อย 80%) แล้วผ่าเมล็ดในผลออกมาฟอกซ้ำ มีอัตราความงอก 80-90% และมีความปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ 0% ต้นมะละกอในสภาพปลอดเชื้อที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อส่วนยอด (shoot tip) และข้อ (node) ประสบความสำเร็จคือมีชีวิตรอดและไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ 80-85% การทดลองสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดมะละกอจำนวนมาก ได้แก่ ชิ้นส่วน hypocotyl ชิ้นส่วนยอดที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อต้นมะละกออายุ 60-90 วัน และชิ้นส่วนข้อที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อต้นมะละกออายุ 60-90 วัน

3. โปรตีน Recombinant expression Cas12a และผลการทดสอบ Cas12a เพื่อนำไปพัฒนาการตรวจยีนกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค SHERLOK สรุปรายละเอียด ดังนี้ RPA Primer เพื่อเพิ่มปริมาณ Target DNA- ได้ Reporter ทั้งแบบ FB และ FQ กระบวนการสังเคราะห์ crRNA- นำcrRNA จากการการสังเคราะห์แบบ In vitro- ได้ผลทดสอบ RPA reaction จาก RPA Primer เบื้องต้น- ได้ crRNA-cas12a แบบ In vitro เบื้องต้นได้ Plasmid สำหรับ สังเคราะห์เอนไซม์ Cas12a- ได้ เอนไซม์ Cas12a สังเคราะห์ได้เบื้องต้น- ได้ เอนไซม์ Cas12a ที่สังเคราะห์ได้ในปริมาณสูง- ได้กระบวนกาทำ เอนไซม์ Cas12a ที่สังเคราะห์ได้ ให้บริสุทธิ์

4. เวคเตอร์จำลองรูปแบบยีนการกลายพันธุ์ของถั่วเหลืองและสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อนำไปตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค LFICS สรุปรายละเอียด ดังนี้ ออกแบบ plasmid DNA ที่ใช้เป็นวัสดุทดสอบของ ยีน FAD2-1A FAD2-1B และ FAD3A และเพิ่มปริมาณใน E.coli competent cell เพื่อใช้เป็น stock เก็บไว้ใช้เป็นวัสดุอ้างอิงทดสอบ ทดสอบความจำเพาะต่อตำแหน่งยีนที่มีการปรับแต่งของยีน FAD 2-1A FAD2-1B และ FAD3A กับพลาสมิดที่ออกแบบและถั่วเหลืองปกติที่ไม่ผ่านการปรับแต่งยีน- ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย FAD2-1A FAD2-1B และ FAD3A ด้วย simplex PCR สอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย FAD2-1A FAD2-1B และ FAD3A คู่กับยีนอ้างอิงถั่วเหลือง lectin ด้วย douplex PCR ทดสอบไพรเมอร์ที่ติดฉลากสีเพื่อแสดงผลการเพิ่มยีนเป้าหมายในระดาษทดสอบ LFICS ของคู่ยีน FAD2-1B กับ lictin- ทดสอบไพรเมอร์ที่ติดฉลากสีเพื่อแสดงผลการเพิ่มยีนเป้าหมายในระดาษทดสอบ LFICS ของคู่ยีน FAD2-1B กับ lictin

5. ได้ชุดไพรเมอร์และสภาวะการตรวจคัดกรองข้าวโพดกลายพันธุ์แบบแม่นยำด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR สรุปรายละเอียด ดังนี้ ตรวจสอบข้อมูลของลำดับเบสของพลาสมิด และคัดเลือกไพร์เมอร์และโพรบจำนวน 2 ชุด ที่สามารถตรวจสอบได้กับพลาสมิดทั้ง 6 กลุ่มของข้าวโพดปรับแต่งจีโนม ทดสอบระบบสภาวะของปฏิกิริยาในการตรวจคัดกรองข้าวโพดปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR โดยศึกษาปริมาณและความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์3.ทดสอบระบบสภาวะของปฏิกิริยาในการตรวจคัดกรองข้าวโพดปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR อุณหภูมิขั้นตอน annealing และโปรแกรมในการทดสอบด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR

กรมวิชาการเกษตร

อภิปรายผล

การดำเนินงานวิจัยในส่วนของเวกเตอร์ Gateway cloning สามารถถ่ายโอนชุดยีนคริสเปอร์เข้าสู่เซลล์พืชได้ทันที การใช้โคโลนีอะโกรแบคทีเรียมที่สร้างขึ้นนี้ มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้เซลล์ที่ได้จากเพลทที่ถ่ายโอนเวกเตอร์มาใช้ถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง ไม่ควรนำไปใช้เลี้ยงต่อ เนื่องจากจะทำให้เกิดการเจริญของโคลนใดโคลนหนึ่ง ทำให้เวกเตอร์ที่สร้างขึ้นไม่เป็นแบบสุ่ม ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดมะละกอเพื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ สามารถทำได้ แต่จำนวนเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วงอกในสภาพปลอดเชื้อมีจำนวนน้อยมาก ทั้งที่ในขั้นตอนการทดสอบความงอก ความแข็งแรงและความสมบูรณ์ของเมล็ด ได้ผลดีมากถึงร้อยละ 99 การทดสอบ Nuclease activity เบื้องต้น กับ crRNA ที่สังเคราะห์ ต้องทำซ้ำ ซึ่งโดยปกติแล้วการทดลองในระบบ Invitro นั้นต้องทดสอบกับ PCR Product ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น Plasmid แต่ CPF 1 สามารถตัดได้ด้วยจึงควรมีการทดสอบต่อยอดถึงรูปแบบความสามรถในการตัดแบบอื่นๆ เช่น Genome เป็นต้น

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์พืชที่ได้จากเทคโนโลยีปรับแต่งจีโนม (Genome editing) มีมากมายหลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับข้อมูลจากแหล่งที่มาของตัวอย่างว่าทราบมากน้อยเพียงใด หากไม่ทราบเลยว่าตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบมีการปรับแต่งยีนใดที่ตำแหน่งใด จะทำให้การตรวจสอบนั้นยากและใช้ค่าใช้จ่ายสูงมาก กรณีที่ทราบตำแหน่งของยีนและลำดับเบสที่ขาดหายไป สามารถใช้เทคนิค PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งที่ถูกปรับแต่ง ซึ่งการปรับแต่งยีนนั้นมีได้ทั้งการเพิ่มขึ้นของลำดับเบสใหม่หรือการขาดหายไปของลำดับเบสเดิม Carroll (2017) การตรวจสอบด้วย PCR นั้นง่ายและต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ต่ำ โดยการตรวจวิเคราะห์นิยมตรวจยีนอ้างอิงจำเพาะพืชนั้น ๆ เช่น กรณีตรวจถั่วเหลืองนิยมใช้ยีน Lectin เป็นยีนอ้างอิง เทคนิค Duplex PCR จะช่วยประหยัดเวลาและต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ให้สามารถตรวจสอบยีนเป้าหมายสองยีนได้ในปฏิกิริยาเดียว โดยในตัวอย่างของถั่วเหลืองปรับแต่งจีโนมจะแสดงแถบดีเอ็นเอของยีน Lectin เท่านั้น ในขณะที่ถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการปรับแต่งจีโนมจะแสดงแถบดูเอ็นเอสองแถบ (Long et al., 2021) ทั้งนี้การออกแบบไพรเมอร์จะต้องคำนึงถึงขนาดผลผลิตปฏิกิริยา PCR ให้มีขนาดต่างกันเพื่อให้แยกแถบดีเอ็นเอชัดเจนในเจลอะกาโรส วัสดุทดสอบมาตรฐาน (Certified reference material) สำหรับพืชปรับแต่งจีโนมในปัจจุบันนั้นยังไม่มีการจำหน่าย ทำให้การตรวจวิเคราะห์จะต้องมีวัสดุทดสอบที่มีความคงทน พลาสมิดดีเอ็นเอจึงนิยมถูกใช้เป็นวัสดุทดสอบงานด้านดีเอ็นเอ โดยมีความสะดวกที่สามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสจำเพาะ สามารถเลือกเวคเตอร์ที่ต้องการโคลนและเพิ่มปริมาณเพื่อเก็บไว้ใช้เองได้ เป็นการลดต้นทุนการจัดซื้อวัสดุทดสอบมีความคงทนและลดความคลาดเคลื่อนของผลการทดสอบ ชุด LFICS เป็นเทคนิคที่ง่ายและสะดวกในการตรวจพืชที่ต้องการทราบความแตกต่างที่ไม่สามารถสามารถแยกได้ด้วยตาเปล่าแต่มีดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายที่แตกต่างกัน เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือไม่มากและไม่ต้องอาศัยเทคนิคความชำนาญสูงในการตรวจวิเคราะห์ (Koczula and Gallotta, 2016) การสร้างพลาสมิดจากยีน Waxy ของข้าวโพด โดยการใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลเชื้อพันธุกรรม

NCBI เพื่อสร้างพลาสมิดจำลองในการใช้ตรวจหายีน Waxy ในข้าวโพดด้วยเทคนิค digital droplet PCR ไพรเมอร์มีความจำเพาะสามารถตรวจพบตำแหน่งยีนของข้าวโพดที่ไม่ถูกปรับแต่งจีโนมได้ และในส่วนของข้าวโพดที่ปรับแต่งจีโนมไม่สามารถตรวจพบยีนที่ขาดหายไปได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้พบว่าไพรเมอร์โพรบมีความจำเพาะกับเทคนิค Digital Droplet PCR

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

1. ทำการกำจัดแมลงศัตรูของมันสำปะหลังที่ติดมากับท่อนพันธุ์ เพื่อลดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับต้นมันสำปะหลัง

2. .เนื่องจากต้นแบบชุดตรวจวิเคราะห์นี้เป็นการตรวจจากดีเอ็นเอ ดังนั้น ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจึงเป็นขั้นตอนสำคัญ โดยควรจะมีการทดสอบหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เพื่อลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ ในระยะต่อไปเพื่อให้ชุด LFICS มีความสมบูรณ์ก่อนการใช้งาน สภาวะของปฏิกิริยาและต้นแบบที่ได้จากชุดทดสอบถั่วเหลืองโอลิอิกสูงควรมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ก่อนที่จะนำไปใช้งานจริง เพื่อให้ทราบถึงค่าสำคัญต่างๆ เช่น ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (LOD) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าความคงทนของวิธีการทดสอบ (Robustness) ค่าความสามารถในการทำซ้ำ (Repeatability) เพื่อจัดทำเป็นคู่มือการใช้งานชุดทดสอบ ในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมควรมีการใช้เทคนิคอื่นเพิ่มเติมที่สามารถเพิ่มปริมาณยีนโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือ เช่น การใช้เทคนิค RPA (Recombinase Polymerase Amplification)

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

แมลงศัตรูของมันสำปะหลัง เช่น เพลี้ยแป้ง และไรแดง เข้าทำลายในช่วงการทดสอบและเก็บข้อมูล ส่งผลทำให้การเก็บข้อมูลล่าช้า มีความแปรปรวน และทำให้ต้นมันสำปะหลังเกิดความเสียหาย

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

Agrawal, G.K., Rakwal, R., Tamogami, S., Yonekura, M., Kubo, A. and Saji, H. 2002. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. Plant Physiology and Biochemistry. 40: 1061-1069.

Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N, Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., Mukherjee, S.K. 2003. RNA interference: biology, mechanism, and applications. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 657–685.

Michaud, 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.

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.

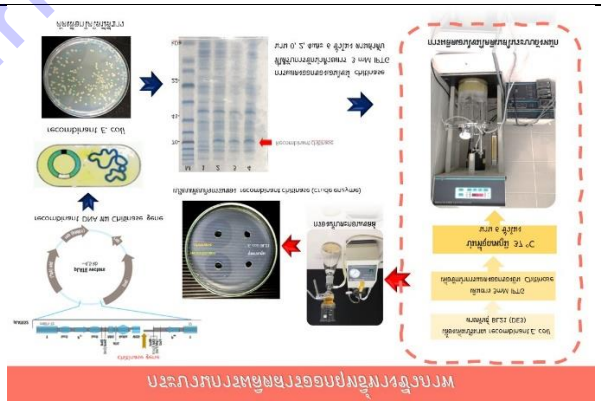
กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

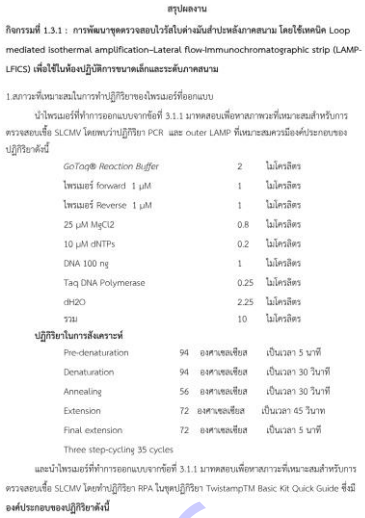
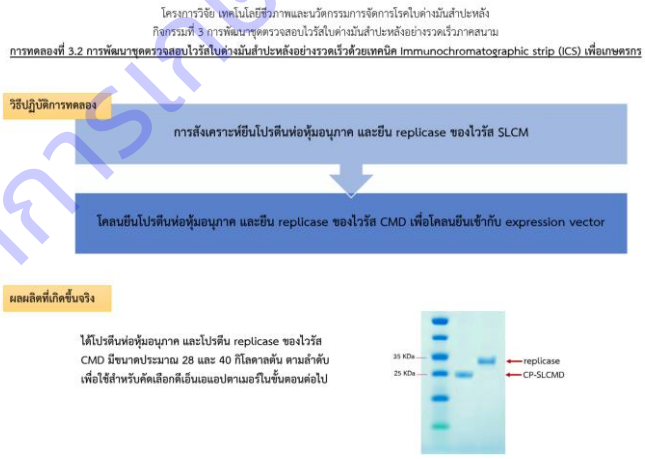
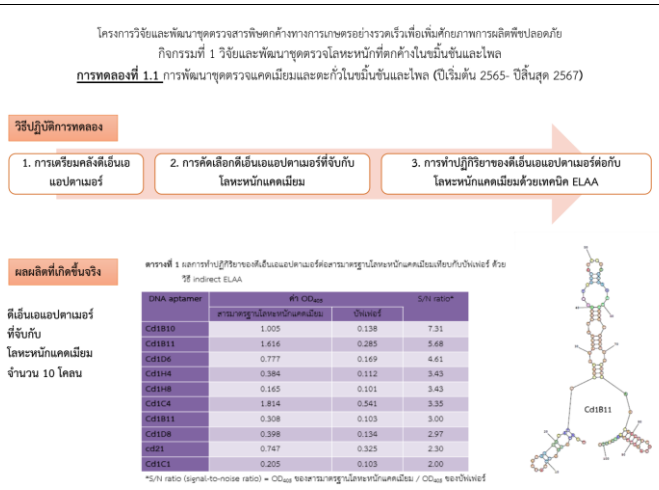
ภาคผนวก 1 สิ่งที่แสดงประกอบเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับเนื้อหาผลงานวิจัย

- ไม่มี -

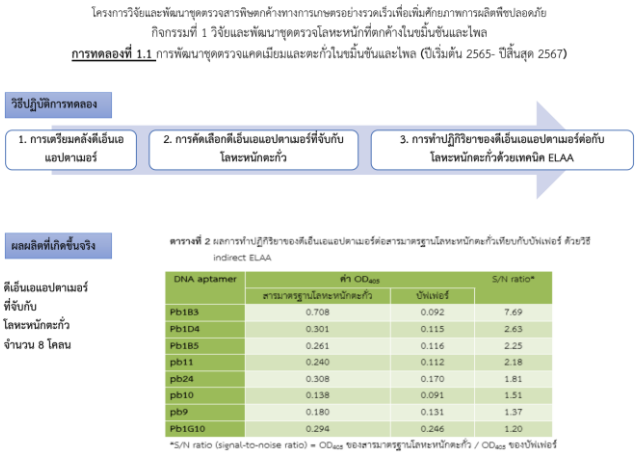
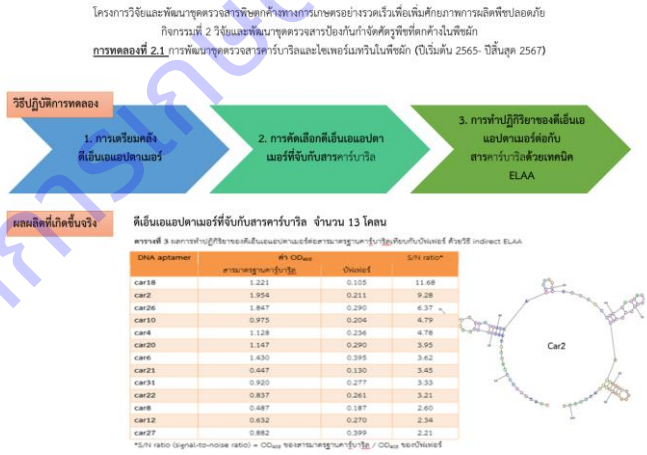
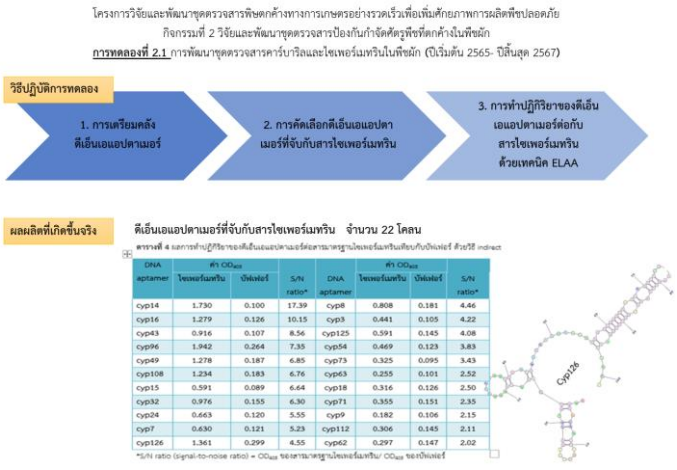
ภาคผนวก 2 หลักฐานเชิงประจักษ์ของผลผลิตที่ได้ จากข้อ 3.2 โดยให้เรียงข้อมูลหลักฐานตามผลผลิตที่แสดงในตาราง

ชื่อไฟล์เอกสารหลักฐาน	ประเภทผลผลิต	ผลผลิต	ภาพ
ผนวก 2.1	ต้นแบบผลิตภัณฑ์ (Prototype) ระดับห้องปฏิบัติการ	เทคโนโลยีการผลิตต้นมันสำปะหลังปลอดโรค	
ผนวก 2.2	ต้นแบบผลิตภัณฑ์ (Prototype) ระดับห้องปฏิบัติการ	วิธีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	
ผนวก 2.3	ต้นแบบผลิตภัณฑ์ (Prototype) ระดับห้องปฏิบัติการ	วิธีการผลิต dsRNA ในการควบคุมแมลงหวี่ขาวยาสูบด้วยเทคโนโลยี RNAi	

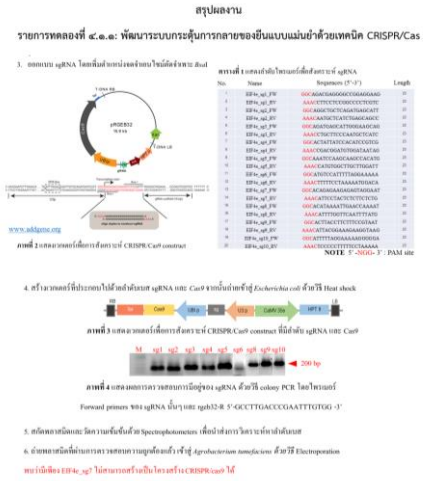
กรมวิชาการเกษตร

ชื่อไฟล์เอกสารหลักฐาน	ประเภทผลผลิต	ผลผลิต	ภาพ
ผนวก 2.4	ต้นแบบผลิตภัณฑ์ (Prototype) ระดับห้องปฏิบัติการ	วิธีการและรูปแบบสำหรับตรวจวิเคราะห์โรคใบด่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค LAMP-LFICS	
ผนวก 2.5	ต้นแบบผลิตภัณฑ์ (Prototype) ระดับห้องปฏิบัติการ	รีคอมบิแนนท์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและโปรตีน replicase ของไวรัส CMD สำหรับใช้คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์	
ผนวก 2.6	เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักแคดเมียม	

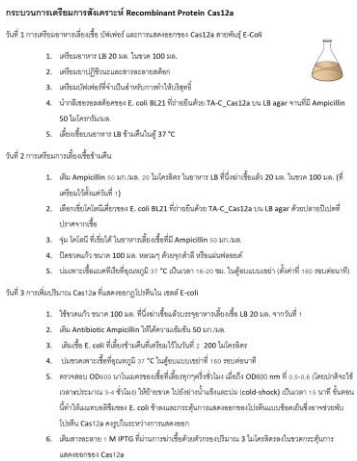
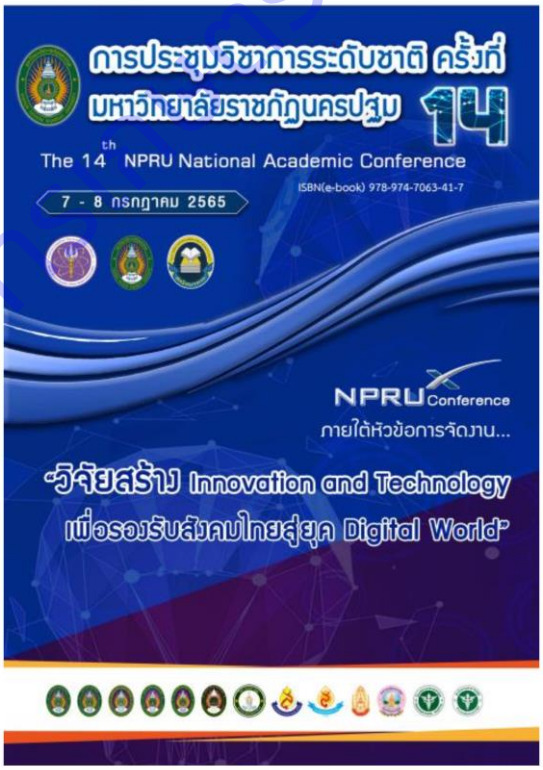
กรมวิชาการเกษตร

ชื่อไฟล์เอกสารหลักฐาน	ประเภทผลผลิต	ผลผลิต	ภาพ
ผนวก 2.7	เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโลหะหนักตะกั่ว	
ผนวก 2.8	เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง คาร์บาริล (carbaryl)	
ผนวก 2.9	เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับสารเคมีกำจัดแมลง ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin)	

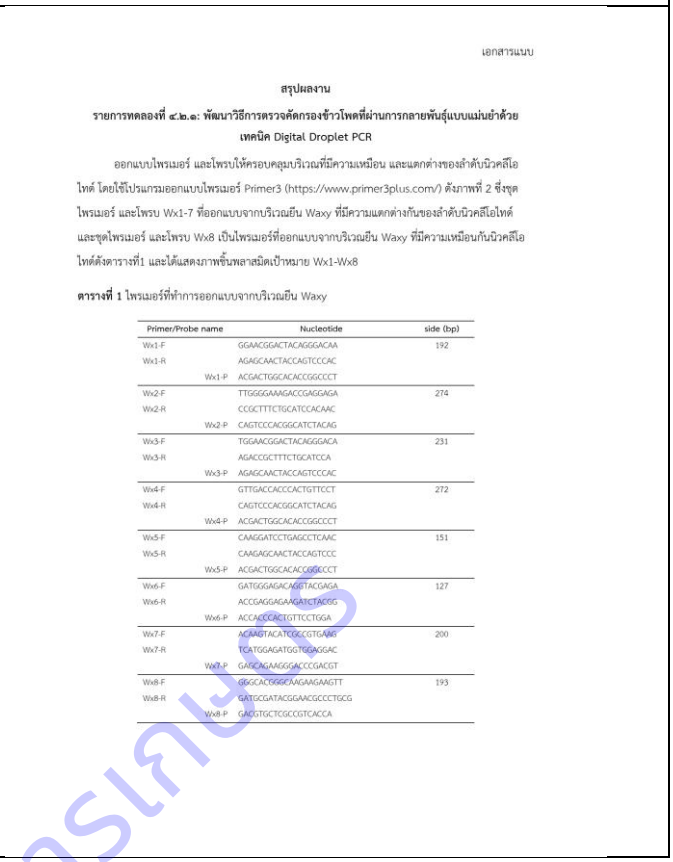
กรมวิชาการเกษตร

ชื่อไฟล์เอกสารหลักฐาน	ประเภทผลผลิต	ผลผลิต	ภาพ
ผนวก 2.10	เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	ชุดยีน gRNA สำหรับปรับแต่งยีนมะละกอให้ต้านทานโรคจุดวงแหวน และวิธีส่งถ่ายยีนให้มะละกอกลายพันธุ์	
ผนวก 2.11	เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะละกอและวิธีการชักนำการเกิดยอดจาก hypocotyl และเนื้อเยื่อใบก่อนและหลังการยิงอนุภาคทังสเตน	

กรมวิชาการเกษตร

ชื่อไฟล์เอกสารหลักฐาน	ประเภทผลผลิต	ผลผลิต	ภาพ
ผนวก 2.12	เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	โปรตีน Recombinant expression Cas12a และผลการทดสอบ Cas12a เพื่อนำไปพัฒนาการตรวจยีนกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค SHERLOK	
ผนวก 2.13	เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	เวคเตอร์จำลองรูปแบบยีนการกลายพันธุ์ของถั่วเหลืองและสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อนำไปตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค LFICS	

กรมวิชาการเกษตร

ชื่อไฟล์เอกสารหลักฐาน	ประเภทผลผลิต	ผลผลิต	ภาพ
ผนวก 2.14	เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	ได้ชุดไพรเมอร์และสภาวะการตรวจคัดกรองข้าวโพดกลายพันธุ์แบบแม่นยำด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR	

เอกสารแนบ

สรุปผลงาน

รายการทดลองที่ ๔.๒.๑: พัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองข้าวโพดที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบแม่นยำด้วยเทคนิค Digital Droplet PCR

ออกแบบไพรเมอร์ และโพรบให้ครอบคลุมบริเวณที่มีความเหมือน และแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ Primer3 (https://www.primer3plus.com/) ดังภาพที่ 2 ซึ่งชุดไพรเมอร์ และโพรบ Wx1-7 ที่ออกแบบจากบริเวณยีน Waxy ที่มีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และชุดไพรเมอร์ และโพรบ Wx8 เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณยีน Waxy ที่มีความเหมือนกันนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่1 และได้แสดงภาพขึ้นพลาสมิดเป้าหมาย Wx1-Wx8

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบจากบริเวณยีน Waxy

Primer/Probe name		Nucleotide	side (bp)
Wx1-F		GGAACGGACTACAGGGACAA	192
Wx1-R		AGAGCAACTACCAGTCCCAC	
	Wx1-P	ACGACTGGCACACCGGCCCT	
Wx2-F		TTGGGGAAAGACCGAGGAGA	274
Wx2-R		CCGCTTTCTGCATCCACAAC	
	Wx2-P	CAGTCCCACGGCATCTACAG	
Wx3-F		TGGAACGGACTACAGGGACA	231
Wx3-R		AGACCGCTTTCTGCATCCA	
	Wx3-P	AGAGCAACTACCAGTCCCAC	
Wx4-F		GTTGACCACCCACTGTTCCT	272
Wx4-R		CAGTCCCACGGCATCTACAG	
	Wx4-P	ACGACTGGCACACCGGCCCT	
Wx5-F		CAAGGATCCTGAGCCTCAAC	151
Wx5-R		CAAGAGCAACTACCAGTCCC	
	Wx5-P	ACGACTGGCACACCGGCCCT	
Wx6-F		GATGGGAGACAGGTACGAGA	127
Wx6-R		ACCGAGGAGAAGATCTACGG	
	Wx6-P	ACCACCCACTGTTCCTGGA	
Wx7-F		ACAAGTACATCGCCGTGAAG	200
Wx7-R		TCATGGAGATGGTGGAGGAC	
	Wx7-P	GAGCAGAAGGGACCCGACGT	
Wx8-F		GGGCACGGGCAAGAAGAAGTT	193
Wx8-R		GATGCGATACGGAACGCCCTGCG	
	Wx8-P	GACGTGCTCGCCGTCACCA	

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก 3 หลักฐานเชิงประจักษ์ของการนำผลงานไปใช้ประโยชน์

การถ่ายทอดเทคโนโลยี

เรื่อง “เทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์มันสำปะหลังปลอดโรคใบด่าง”

(ตามหลักฐานไฟล์ผนวก 3.1)

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก 4 หลักฐานการปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

- ไม่มี -