กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม
รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund)
ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565
หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

นวัตกรรมและเทคโนโลยีการผลิตสารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่ายเพื่อผลิตพืชปลอดภัย

Innovation and biological substance production technology from microorganism and algae for producing safety agricultural products

กรมวิชาการเกษตร

หัวหน้าโครงการวิจัย
นางสาวภรณี สว่างศรี

พ.ศ. 2565

บทสรุปผู้บริหาร

ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ปัจจุบันภาคเกษตรกรรมของประเทศไทยประสบปัญหาผลผลิตไม่ได้คุณภาพและมาตรฐาน อันมีสาเหตุมาจากความแปรปรวนของสภาพภูมิอากาศที่มีความรุนแรง การเกิดการระบาดของศัตรูพืชอุบัติใหม่ ส่งผลกระทบต่อผลิตผลทางเกษตร นอกจากนี้การส่งออกสินค้าเกษตรไทยไปยังตลาดต่างประเทศต้องประสบปัญหาการแข่งขันและการกีดกันการค้าจากกลุ่มประเทศพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้มาตรฐานด้านสุขอนามัยและสิ่งแวดล้อม ซึ่งสาเหตุของปัญหาที่สำคัญ คือ การตกค้างของสารพิษจากการใช้สารกำจัดศัตรูพืช โดยระบบการปลูกพืชของเกษตรกรไทยส่วนใหญ่ยังใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชและสารสังเคราะห์เร่งการเจริญเติบโต เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตเป็นสำคัญโดยไม่คำนึงถึงปัญหาสารพิษตกค้าง ตลอดจนความปลอดภัยของเกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม จากรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจเกษตร และกรมวิชาการเกษตร ในปี 2562 ประเทศไทยมีปริมาณการนำเข้าสารเคมีเกษตรสูงถึง 131,308 ล้านตัน มูลค่ารวม 21,168 ล้านบาท ซึ่งนับเป็นจุดอ่อนที่สำคัญของสินค้าเกษตรไทยในตลาดโลก รวมทั้งก่อให้เกิดข้อกังวลในปริมาณการใช้สารเคมีที่มากเกินความจำเป็นและวิธีการใช้ที่ไม่ถูกต้องเหมาะสม ส่งผลให้ในปัจจุบันความต้องการใช้สารชีวภาพที่มีความปลอดภัยสูงจึงมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามสารชีวภาพทางเลือกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและควบคุมศัตรูพืชที่จำหน่ายภายในประเทศยังมีน้อย ส่วนใหญ่ยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ส่งผลให้มีราคาค่อนข้างแพง ประเด็นดังกล่าวนี้จึงเป็นข้อจำกัดของการส่งเสริมให้มีการใช้สารชีวภาพในระบบการเกษตรของไทย ดังนั้นหากมีการสนับสนุนให้มีการวิจัยและพัฒนาด้านการผลิตสารชีวภาพจากทรัพยากรภายในประเทศโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงและเทคโนโลยีสมัยใหม่ มีความปลอดภัยทดแทนสารเคมี เพื่อยกระดับมาตรฐานการผลิตพืชและผลิตภัณฑ์สู่เกษตรปลอดภัย ซึ่งหากสามารถต่อยอดการผลิตในรูปผลิตภัณฑ์ได้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อระบบการผลิตพืชของประเทศ เพื่อรองรับการขับเคลื่อนภาคการเกษตรไทยตามนโยบายการทำการเกษตรปลอดภัยและเกษตรอินทรีย์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สารชีวภาพฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์ และสารกระตุ้นชีวภาพจากสาหร่ายที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต
2. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) ในการสร้างความต้านทานและยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชอย่างจำเพาะเจาะจง
3. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลของโปรตีนบีที ผลิตภัณฑ์เอนแคปซูเลตไคติเนส และเอนไซม์เพคติเนสที่ผลิตได้จากเชื้อรา ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมศัตรูพืช
4. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่าย ทั้งในสภาพโรงเรือน และการขยายผลสู่แปลงเกษตรกร

ระเบียบวิธีวิจัย

โครงการวิจัย นวัตกรรมและเทคโนโลยีการผลิตสารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่ายเพื่อผลิตพืชปลอดภัย มีระยะเวลาดำเนินการวิจัย 3 ปี (2565-2567) ดำเนินการวิจัยมุ่งเน้น การผลิตสารชีวภาพซึ่งสังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์และสาหร่าย อันเป็นฐานทรัพยากรชีวภาพของประเทศที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อพัฒนานวัตกรรมผลิตภัณฑ์สารชีวภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต เสริมสร้างความแข็งแรง และควบคุมศัตรูพืช ที่มีความปลอดภัยสูงและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ให้สามารถต่อยอดในเชิงพาณิชย์สู่ธุรกิจชีวภาพในอนาคตได้ รวมทั้งสามารถบริหารจัดการเผยแพร่เทคโนโลยีเพื่อให้เกษตรกรเข้าถึงได้ง่าย องค์ความรู้และนวัตกรรมสามารถนำไปพัฒนาเพื่อยกระดับมาตรฐานการผลิตพืชและผลิตภัณฑ์สู่เกษตรปลอดภัย ซึ่งในปี 2565 ได้ดำเนินการวิจัยดังนี้ **1) การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม** เป็นการพัฒนาศักยภาพของจุลินทรีย์ในการผลิต phytohormones (กรดอินโดลแอซีติก และกรดแอบไซซิก) พัฒนากระบวนการผลิต ศึกษาประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเพิ่มความต้านทานของพืชในสภาวะที่ไม่เหมาะสม **2) การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารกระตุ้นชีวภาพจาก**

กรมวิชาการเกษตร

สาหร่ายเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของพืชตามแนวทางทำเกษตรอย่างยั่งยืน ศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบจากสารชีวภาพสาหร่ายเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและสร้างความแข็งแรงในพืช รวมถึงการติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลที่เป็นสัญญาณของระบบป้องกันตัวของพืช **3) การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพทางการเกษตร** เป็นการพัฒนาสารชีวภาพ RNA สายคู่ (dsRNA) โดยใช้เทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์ ซึ่งให้ความจำเพาะกับยีนเป้าหมายเพื่อยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก และ **4) การพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนไซม์และไมโครแคปซูลจากจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช** เป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนไซม์และไมโครแคปซูลจากทั้งรา และแบคทีเรีย เพื่อควบคุมศัตรูพืช เป็นการนำเทคโนโลยีเอนแคปซูเลชั่น (encapsulation) มาพัฒนาต่อยอดเพื่อให้ได้รูปแบบผลิตภัณฑ์ที่มีความคงทนในสภาพแวดล้อมได้นาน

งบประมาณที่ใช้

ได้รับงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2565 เป็นเงิน 2,247,566 บาท ระยะเวลาทำวิจัย ตั้งแต่ ตุลาคม 2564 ถึง มีนาคม 2566

ผลการวิจัย

- การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การผลิตฮอร์โมนพืชกรดแอบไซซิก คัดเลือกได้เชื้อรา *Botrytis* sp. ไอโซเลท BRDO-23 สามารถผลิตกรดแอบไซซิกในปริมาณสูงสุด ที่สภาวะปัจจัยอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส แสงสีฟ้า (Blue light) และสูตรอาหารที่ผสมน้ำมะเขือเทศผสมน้ำผลไม้ 25% สามารถกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิกได้ดี ส่วนการผลิตกรดอินโดลแอซีติก พบว่า สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้ดี จำนวน 5 ไอโซเลท โดยผลิตได้ในปริมาณสูงสุด >400 ug/ml สำหรับกรรมวิธีการผลิตกรดอินโดลแอซีติก พบว่าสูตรอาหารที่มีส่วนผสม 5mM tryptophan และ 2.5mM tryptophan + กล้วยน้ำว้า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกได้ดี การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิต พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีและสามารถผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้ในปริมาณสูง

- การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารกระตุ้นชีวภาพจากสาหร่ายเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของพืชตามแนวทางทำเกษตรอย่างยั่งยืน การศึกษาสารสกัดอัลจีเนตจากสาหร่ายทุ่นและคาราจีแนนจากสาหร่ายมงกุฎหนาม เมื่อนำไปฉีดพ่นต้นพริก พบว่าสามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสได้ จึงบ่งชี้ได้ว่าสารทั้งสองมีกลไลการทำงานโดยผ่านการกระตุ้นกระบวนการผลิตสารกลุ่มฟีนอลิกในต้นพริก สำหรับผลการทดสอบใช้สารอัลจีเนตและคาราจีแนนช่วยเพิ่มความสูงและความกว้างทรงพุ่มพริกได้ นอกจากนี้ยังสามารถลดระดับความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรกโนสพริกได้

- การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพทางการเกษตร สังเคราะห์ dsRNA ในรูปแบบ hairpin loop จากยีนของรา *C. gloeosporioides* 3 ยีน ได้แก่ Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter และ Dicer-like protein 1 พบว่า dsRNA-Cg มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุด สามารถควบคุมการเจริญของราได้ 51.67% และเมื่อนำ dsRNA ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญบนผลพริกที่ถูกปลูกเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนส พบว่า dsRNA-Cg 1,000 ng/µl สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด

- การพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนไซม์และไมโครแคปซูลจากจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช คัดเลือกได้เชื้อ *B. thurigiensis* ไอโซเลท BT99(21) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณผลึกโปรตีนและห่อหุ้มอนุภาคด้วยสารชีวภาพต่างๆ ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก พบว่า การใช้ผลึกโปรตีนของบีที มีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเฉลี่ยสูงสุด 93.34% และการใช้ผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลสูตรไคโตซานมีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเฉลี่ย 80% การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อเมทาไรเซียม เมื่อทำเอนไซม์ให้แห้งแล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพ พบว่าหนอนที่ได้รับเอนไซม์ไคติเนสจะมีขนาดเล็กและมีน้ำหนักตัวน้อย มีผลทำให้หนอนตายถึง 40% การผลิตเอนแคปซูเลตไคติเนส มีผลทำให้หนอนกระทู้ผักตายสูงสุด คือ เกาลีน Aluminium silicate ส่วนในด้านการควบคุมโรคพืช ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์เพคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma asperellum*-TC1 สามารถสร้างเอนไซม์เพคติเนสได้สูงสุด และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเน่าดำเมื่อฉีดพ่นเอนไซม์ 7 วัน ก่อนการปลูกเชื้อ โดยมีผลในการลดการเกิดรอยแผลโรคเน่าดำ

กองวิชาการฯ

ข้อมูลจุดเด่นของผลงานวิจัย

1. ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์และสภาวะปัจจัยในการผลิตกรดแอบไซซิก และกรดอินโดลแอซีติกจากจุลินทรีย์ เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร และขยายผลการผลิตในระดับ large scale ต่อไป

2. ได้ข้อมูลคุณสมบัติทางกายภาพ และกลไกการออกฤทธิ์ของสารชีวภาพอัลจีเนตและคาราจีแนนจากสาหร่าย เพื่อการประยุกต์ใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและความแข็งแรงในพืช

3. ได้กระบวนการผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ หรือ dsRNA เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกด้วยวิธี *In vitro* transcription เพื่อนำไปต่อยอดการประยุกต์ใช้ทางการเกษตร

4. ได้กระบวนการผลิตผลึกโปรตีนบีที และเอนไซม์ไคติเนส ด้วยเทคโนโลยีเอนแคปซูเลชั่น และการผลิตเอนไซม์เพคติเนสด้วยเทคโนโลยีการทำแห้ง สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการผลิตในระดับ large scale และเป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมศัตรูพืชต่อไป

ข้อเสนอแนะที่ได้จากงานวิจัย

- ข้อเสนอแนะจากผลงานวิจัย

1. การผลิตสารชีวภาพจากการเลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* และการต่อเชื้อในหลายๆ รุ่น พบว่า ส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตกรดแอบไซซิกลดต่ำลง จึงจำเป็นต้องมีวิธีการเก็บรักษาเชื้อราในระยะยาวเพื่อให้สามารถคงสภาพคุณสมบัติที่ดีต่อไป

2. การตรวจสอบยืนยันผลสารชีวภาพจากสาหร่าย สามารถวิเคราะห์โดยติดตามปริมาณสารทุติยภูมิในวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ ได้แก่ กรดซาลิซิลิก เพื่อใช้ในการบ่งชี้ประสิทธิภาพของการใช้สารชีวภาพในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงภายในพืชผ่านวิถีดังกล่าว

3. การสังเคราะห์ dsRNA ด้วยวิธี *In vitro* transcription สามารถผลิต dsRNA ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อและบนผลพริกได้ คือ dsRNA-Cg ซึ่งผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการควรทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสม ความคงทน และประสิทธิภาพของ dsRNA อีกครั้งกับการควบคุมโรคบนผลพริกที่ต้นพริกก่อนที่จะนำไปประยุกต์ใช้จริงในสภาพโรงเรือนหรือแปลงปลูกต่อไป อย่างรก็ตามการใช้เทคโนโลยีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอสายคู่จาก recombinant plasmid ในระบบ *In vivo* ควรเลือกใช้ plasmid และ competent cell ที่สามารถกระตุ้นให้ผลิต RNA ได้ จะสามารถช่วยประหยัดเวลาและลดความซับซ้อนของกระบวนการผลิตลงได้

4. การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อจุลินทรีย์ในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียบีที เอนไซม์ไคติเนส และเพคติเนส สามารถขยายผลต่อโดยนำเทคโนโลยีดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์จากเชื้อจุลินทรีย์

- ข้อเสนอแนะจากผู้วิจัย

การพัฒนาสารชีวภาพในโครงการวิจัยนี้ สามารถใช้เป็นต้นแบบและแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ กระบวนการผลิตตั้งแต่เริ่มต้นในการขยายเชื้อจุลินทรีย์ การเพิ่มปริมาณในถังหมัก ตลอดจนการทำผลิตภัณฑ์สารชีวภาพในรูปแบบต่างๆ ผงแห้ง ไมโครแคปซูล ซึ่งง่ายต่อการผลิตและการเก็บรักษา และสะดวกต่อการใช้งาน

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ประโยชน์ที่เกิดต่อผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรง เมื่อสิ้นสุดโครงการ เกษตรกร นักวิจัย หน่วยงานภาครัฐและภาคเอกชน สามารถนำองค์ความรู้ด้านการผลิตสารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่าย ไปต่อยอดขยายผลการผลิตผลิตภัณฑ์สารชีวภาพในระดับครัวเรือน และขยายผลในระดับอุตสาหกรรม เพื่อให้เกษตรกรสามารถใช้สารฮอร์โมนพืช/สารชีวภาพในราคาที่ต่ำลง เพิ่มโอกาสในเข้าถึงการใช้สารชีวภาพ ลดการใช้สารเคมี ลดต้นทุนการผลิต ส่งเสริมคุณภาพชีวิตที่ดีของเกษตรกรไทย

2. ประโยชน์ทางวิชาการ นักวิชาการ นักศึกษา และผู้สนใจด้านวิชาการสามารถนำองค์ความรู้ไปประยุกต์ใช้ในด้านวิชาการ นักวิจัยได้องค์ความรู้เกี่ยวกับการใช้สารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่าย เพื่อช่วยกระตุ้นกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชและส่งเสริมการเจริญเติบโต การผลิตโปรตีนบีที เอนแคปซูเลตไคติเนส และเอนไซม์เพคติเนสเพื่อใช้ในการควบคุมศัตรูพืชในพืชสำคัญทางเศรษฐกิจได้ สามารถนำข้อมูลไปใช้เป็นแนวทางต่อยอดเพื่อทดสอบและปรับใช้กับการผลิตพืชชนิดอื่นๆได้

3. หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ และเกิดประโยชน์ในด้านใด (เศรษฐกิจ สังคม สิ่งแวดล้อม)

3.1 ด้านนโยบาย เจ้าหน้าที่หน่วยงานภาครัฐ สามารถนำไปขยายผลส่งเสริมกระบวนการผลิตพืชปลอดภัยช่วยลด

กรมวิชาการเกษตร

ปริมาณความจำเป็นในการใช้สารเคมีในกระบวนการผลิต เนื่องจากพืชมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้นและมีความแข็งแรงมากขึ้น รองรับแนวทางการผลิตพืชปลอดภัยและพืชอินทรีย์ซึ่งนำไปสู่การเกษตรที่ยั่งยืนปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

3.2 ด้านสังคม เกษตรกร กลุ่มเกษตรกร วิสาหกิจชุมชนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตพืช โดยเทคโนโลยีที่ได้จากงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปสู่การผลิตผลิตภัณฑ์ได้เองโดยเกษตรกรก่อให้เกิดการพึ่งตนเองภายในชุมชนและเกิดความเข้มแข็ง เพิ่มทางเลือกด้านปัจจัยการผลิต เกษตรกรไม่จำเป็นต้องพึ่งพาสารเคมีสังเคราะห์แต่เพียงอย่างเดียว

3.3 ด้านเศรษฐกิจ เกษตรกร มีรายได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากลดต้นทุนการใช้สารเคมี ผลผลิตคุณภาพดีและมีความปลอดภัยเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ยกระดับคุณภาพและราคาของผลผลิต

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

ปี 2565 นำเสนอใน การประชุมวิชาการระดับชาติ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีครั้งที่ 2 มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ในวันที่ 10 มีนาคม 2566 จำนวน 1 เรื่อง “การพัฒนาเอนแคปซูเลตไคติเนสเพื่อควบคุมหนอนกระทู้ผัก” อยู่ในขั้นตอนตรวจสอบบทความ

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนวัตกรรมและเทคโนโลยีการผลิตสารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่ายเพื่อผลิตพืชปลอดภัย มุ่งเน้นการวิจัยและพัฒนานวัตกรรมผลิตภัณฑ์สารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่ายที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ควบคุมศัตรูพืช เป็นสารทางเลือกทดแทนการใช้สารเคมีซึ่งส่วนใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาแพง เป็นแนวทางในการพัฒนาปัจจัยการผลิตซึ่งช่วยเพิ่มศักยภาพในการผลิตพืชปลอดภัยแบบครบวงจรต่อไป ได้ดำเนินการภายใต้โครงการวิจัยย่อย ดังนี้ **1) การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม** ได้แก่ กรดแอบไซซิก (Abscisic acid; ABA) ผลการวิจัยพบว่า สามารถเก็บรวบรวมเชื้อราสีเทา *Botrytis* spp. และจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวโมเลกุล และการทำปฏิกิริยา Tannic acid oxidation ได้เชื้อรา *Botrytis* ทั้งสิ้น 35 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท BRDO-23 มีศักยภาพในการผลิตกรดแอบไซซิกสูงสุด ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาด พบว่าสารสกัดแบบหยาบจากอาหารเลี้ยงของ BRDO-23 มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับกรดแอบไซซิกบริสุทธิ์ ปัจจัยการเลี้ยงที่เหมาะสม พบว่าอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา แสงสีฟ้า (Blue light) สามารถกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิกได้ปริมาณมากกว่าเลี้ยงในที่มืดประมาณ 2 เท่า และน้ำมะเขือเทศผสมน้ำผลไม้ 25% สามารถกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิกได้ดีกว่า PDB ประมาณ 5 เท่า ส่วนการศึกษาฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน กรดอินโดลแอซีติก (Indole acetic acid; IAA) ซึ่งมีหน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้รวบรวมเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกจากแหล่งต่างๆ ได้ทั้งสิ้น 42 ไอโซเลท สามารถคัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้ในปริมาณสูงที่สุด 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท IAA-32, IAA-17, IAA-25, IAA-16 และ IAA-00 เมื่อจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล สามารถจำแนกได้เชื้อ *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp., *Lysinibacillus macrolides*, *Enterobacter* sp. และ *Bacillus* sp. ตามลำดับ กรรมวิธีการผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้สูตรอาหารที่เหมาะสม พบว่า การเติม 5mM tryptophan และ 2.5mM tryptophan + ผงกล้วยน้ำว้า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกได้ในปริมาณสูงกว่า 400 ug/ml และสามารถสกัดแยกกรดอินโดลแอซีติกออกจากอาหารเพื่อให้มีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธีการปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง และใช้สารละลาย Ethyl acetate การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต พบว่า ที่อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดี และสามารถผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้ในปริมาณสูง **2) การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารกระตุ้นชีวภาพจากสาหร่ายเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและความแข็งแรงในพืช** โดยการสกัดแยกอัลจีเนตจากสาหร่ายทุ่น (*Sagassum polycystum*) และคาราจีแนนจากสาหร่ายมงกุฎหนาม (*Acanthophora spicifera*) มาใช้ในการทดสอบ พบว่า สารอัลจีเนต และคาราจีแนนมีค่าร้อยละการสกัด (%Yields) เท่ากับ 44.8±6.75 และ 13.75±2.65 % ตามลำดับ การทดสอบผลการกระตุ้นกระบวนการทางสรีรวิทยาพบว่า อัลจีเนตและ คาราจีแนนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการการทำงานของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสได้ภายใน 12 ชั่วโมง โดยมีค่าความว่องไวเท่ากับ 3,147.07±752.74 และ 4,390.34±837.11 ไมโครโมลของกรดทรานส์ชินนามิกต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างจากชุดควบคุมน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญ การทดสอบใช้สารทั้ง 2 ชนิดฉีดพ่นต้นพริกในโรงเรือนทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถช่วยเพิ่มความสูงและความกว้างทรงพุ่มพริกได้ทั้ง 2 ชนิดสาร ผลการใช้สารอัลจีเนตและคาราจีแนนกระตุ้นพริกก่อน 24 ชั่วโมงก่อนได้ฉีดพ่นด้วยสารละลายสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ระดับความ

กรมวิชาการเกษตร

เข้มข้น 1x10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคได้ 46.25 และ 23.77% ตามลำดับ **3) การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพทางการเกษตร** โรคแอนแทรคโนสหรือโรคกุ้งแห้งในพริกเป็นโรคที่สำคัญ สามารถทำความเสียหายต่อผลผลิตพริกที่จำหน่ายทั้งตลาดภายในและต่างประเทศ ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์ dsRNA ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสหรือโรคกุ้งแห้งในพริก จำนวน 3 ยีน ในรูปแบบ hairpin loop ด้วยวิธี *In vitro* transcription จากยีนของรา *C. gloeosporioides* 3 ยีน ได้แก่ Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter และ Dicer-like protein 1 ซึ่งพบว่า dsRNA-Cg มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุด สามารถควบคุมการเจริญของราได้ถึง 51.67% อย่างไรก็ตามเมื่อนำ dsRNA ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญรา *C. gloeosporioides* บนผลพริกที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์ปริมาณ 1×10^6 spore/ml โดยใช้ dsRNA-Cg, dsRNA-Pot และ dsRNA-Dcl1 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 300 ng/µl, 500 ng/µl และ 1000 ng/µl พบว่า dsRNA-Cg 1,000 ng/µl สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด ส่งผลให้พริกมีระดับการเกิดโรคเท่ากับ 14.44 % รองลงมาคือ dsRNA-Pot 1,000 ng/µl และ dsRNA-Cg 500 ng/µl โดยพริกมีระดับการเกิดโรค (% DI) เท่ากับ 28.89% และ 38.89% ตามลำดับ **4) การพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนไซม์และไมโครแคปซูลจากจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช** ได้ศึกษาเชื้อแบคทีเรียบีที โดยทำการคัดเลือกได้เชื้อ *Bacillus thurigiensis* ไอโซเลท BT99(21) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเพิ่มปริมาณผลึกโปรตีนและห่อหุ้มอนุภาคด้วยสารชีวภาพต่างๆ ได้แก่ สารละลายอัลจีเนต แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และ ไคโตซาน พบว่าในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า การใช้ผลึกโปรตีนของบีที มีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเฉลี่ยสูงที่สุด 93.34% และการใช้ผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลสูตรไคโตซาน มีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเฉลี่ย 80% การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมทาไรเซียม ในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนผสมของไคตินทำเอนไซม์ให้แห้งแล้ววัด activity ของไคติเนส แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผัก พบว่าหนอนที่ได้รับเอนไซม์ไคติเนสจะมีขนาดเล็กกว่าวิธีควบคุม มีน้ำหนักตัวน้อยกว่า และไคติเนสมีผลทำให้หนอนตายถึง 40% ในขณะที่วิธีควบคุมไม่มีหนอนตาย การผลิตเอนแคปซูเลตไคติเนสได้ทำแอนแคปซูเลชั่นที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ไคติเนสกับแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง maltodextrin เกาลีน Aluminium silicate เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักพบว่าเอนแคปซูเลตไคติเนสที่มีผลทำให้หนอนกระทู้ผักตายสูงสุด คือ เกาลีน Aluminium silicate รองลงมาคือ ไคติเนสผสมกับแป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง ในด้านการควบคุมโรคพืช ได้มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์เพคติเนสจากเชื้อราไตรโครเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพเพื่อยับยั้งการเกิดโรคเน่าดำจากเชื้อราไตรโคเดอร์มาทั้งหมด 29 ไอโซเลท พบว่า *Trichoderma asperellum*-TC1 สามารถสร้างเอนไซม์เพคติเนสได้สูงสุด การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เพคติเนสด้วยวิธีการฉีดพ่นเอนไซม์ 7 วัน ก่อนการปลูกเชื้อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค พบว่า เอนไซม์เพคติเนสมีผลในการลดการเกิดรอยแผลโรคเน่าดำ โดยกรรมวิธีพ่นด้วยเอนไซม์ 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร และใบกล้วยไม้ปลูกเชื้อ (วิธีควบคุม) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลเฉลี่ยเท่ากับ 0.95 0.36 0.35 และ 1.23 เซนติเมตร ตามลำดับ

คำสำคัญ สารชีวภาพ, เทคโนโลยีชีวภาพ, จุลินทรีย์, สาหร่าย, เกษตรยั่งยืน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Abstracts

The innovation and technology research project for biochemical production from microorganisms and algae to produce safe plants focuses on the research and development of novel biological products from microorganisms and algae that are effective in stimulating and promoting plant growth and pest control as an alternative to the use of chemicals. The following sub-projects have carried out this project: **1) The research and development of plant hormone products from microorganisms to enhance plant production in unsuitable environments.** For the purpose of producing abscisic acid (ABA), *Botrytis* spp. were collected and examined for morphology, biomolecules, and tannic acid oxidation. According to the findings, there are 35 different strains of *Botrytis* spp. with the BRDO-23 isolate having the best ability to produce ABA. The germination inhibition efficacy test revealed that BRDO-23 crude extract was just as effective as pure ABA. The optimum culture factor test revealed that fungus grows best at a temperature of 24°C. Additionally, the blue light can stimulate it about twice as much as growing in the dark, and 25% tomato juice in mixed fruit juice may promote the formation of ABA nearly five times better than PDB. The investigation of the plant hormone auxin group, indole acetic acid (IAA), which regulates plant growth. Following the collection of 42 isolates, the five isolates that produced the highest amounts of indole acetic acid were chosen including IAA-32, IAA-17, IAA-25, IAA-16, and IAA-00. The bacteria can be identified using biomolecular techniques as *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp., *Lysinibacillus macrolides*, *Enterobacter* sp., and *Bacillus* sp., respectively. The process for producing IAA observed that the addition of 5 mM tryptophan and 2.5 mM tryptophan + banana can increase the efficiency of IAA synthesis up to 400 ug/ml, and IAA can be extracted from food to make it purer by adjusting pH and using an ethyl acetate solution. Furthermore, the best temperature for production, bacteria could grow and produce huge quantities of IAA at 35-40°C. **2) The development of biostimulant products from algae to promote growth and strength in plants:** The percentages of alginate and carrageenan extracted from seaweed (*Sagassum polycystum*) and crown-thorn algae (*Acanthophora spicifera*), were found to be 44.8±6.75 and 13.75±2.65%, respectively. The physiological stimulation test revealed that 1 mg/ml alginate and carrageenan could stimulate the activity of phenylalanine ammonia lyase within 12 h. The activation activities were 3,147.07±752.74 and 4,390.34±837.11 µmol of trans-cinnamic acid/h/gFW, respectively. It was discovered that these compounds at concentrations of 0.25 mg/ml could improve the height and width of the chilli when tested by spraying plants once every seven days for two months. When sprayed before being inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides* for 24 hours, alginate and carrageenan at a dosage of 0.5 mg/ml could reduce the severity of the disease by 46.25 and 23.77%, respectively. **3) The application of RNAi**

technology to the creation of biological agents for agriculture: Three genes from *C. gloeosporioides* which causes anthracnose in chilies including ceramide glucosyltransferase, suspected oligopeptide transporter, and dicer-like protein 1 were used to create dsRNA in hairpin loop form through *in vitro* transcription. The results indicated that *C. gloeosporioides* growth on the agar medium was most effectively inhibited by dsRNA-Cg, which can reduce fungus' growth by around 51.67%. However, dsRNA-Cg, dsRNA-Pot, and dsRNA-Dcl1 at different concentrations of 300, 500, and 1000 ng/µl were used to examine the growth suppression effectiveness of fungus on chilli inoculated with 1×10^6 spores/ml. The most effective inhibitor of disease severity, 1,000 ng/µl of dsRNA-Cg, was found to display the disease index at around 14.44%, while dsRNA-Pot 1,000 ng/µl and dsRNA-Cg 500 ng/µl show the disease index of chilli at 28.89% and 38.89%, respectively. **4) Development of microbial enzyme and microcapsule products for pest control:** The results that the most effective strain for producing Bt crystals was *Bacillus thurigiensis* isolate BT99(21). Then, this species was cultivated and encapsulate the particles with biological materials. The results demonstrated that chitosan-based microcapsules had a lower average death rate than Bt protein crystals for the control of cutworms. The average death rates were 93.34 and 80%, respectively. The effectiveness of chitinase produced from *Metarhizium* spp. was investigated, the results revealed that chitinase-treated worms were lighter and smaller than worms treated with control. This was then encapsulated and tested for effectiveness against cutworms. It was shown that the mortality effect of chitinase mixed with maize starch and tapioca starch was the highest, followed by chitinase encapsulated in aluminum silicate. Trichoderma black rot disease was effectively inhibited using 29 isolates of *Trichoderma* spp. pectinase production, and *T. asperellum*-TC1 was able to produce the most pectinase. An efficiency testing carried out 7 days prior to inoculation showed that pectinase was effective in reducing the incidence of black rot lesions. The mean wound diameters were 0.95, 0.36, 0.35, and 1.23 cm, respectively, for the 5, 10, and 15 g/l spray treatments and the control.

Keyword: Biological substances, Biotechnology, microorganism, algae, sustainable agriculture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย นวัตกรรมและเทคโนโลยีการผลิตสารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่ายเพื่อผลิตพืชปลอดภัย ได้รับการสนับสนุนในการจัดสรรงบประมาณให้ดำเนินการวิจัย ปี 2565 - 2567 จากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) การบริหารจัดการ การให้คำแนะนำ กลั่นกรอง และช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จากคณะผู้เชี่ยวชาญ คณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ กรมวิชาการเกษตร จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ปฏิบัติงานวิจัย ให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้บรรลุวัตถุประสงค์ ส่งผลให้งานวิจัยมีผลผลิตตามเป้าหมาย เป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาต่อยอดสู่การใช้ประโยชน์ในปีต่อไป ตลอดจนสามารถรวบรวมและจัดทำรายงานผลการทดลองเสร็จสิ้นเรียบร้อยโดยสมบูรณ์

(นางสาวภรณี สว่างศรี)
หัวหน้าโครงการวิจัย
โครงการวิจัยนวัตกรรมและเทคโนโลยีการผลิตสารชีวภาพ
จากจุลินทรีย์และสาหร่ายเพื่อผลิตพืชปลอดภัย

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	6
กิตติกรรมประกาศ	10
สารบัญ	11
สารบัญภาพ	12
สารบัญตาราง	15
บทที่ 1 บทนำ	17
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	21
บทที่ 3 ผลการศึกษา	42
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	100
เอกสารอ้างอิง	106
ภาคผนวก	108

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

โครงการย่อยที่ 1

1-1 ขั้นตอนการเก็บรวบรวมและจำแนกเชื้อราสีเทาจากสตรอเบอรี่ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ Botrytis Selective Media 42

1-2 ภาพตัวอย่างลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสีเทาที่จำแนกได้ 43

1-3 ข้อมูลทางชีวโมเลกุลจากการวิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วนของ 18S rDNA ของเชื้อราสีเทาที่จำแนกได้ 43

1-4 ขั้นตอนการสกัดกรดแอบไซซิก (ABA) จากอาหารเหลวแบบหยาบเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-MS 44

1-5 รูปภาพตัวอย่างเมล็ดหัวผักกาดและกราฟแสดงอัตราการงอกของเมล็ดหัวผักกาด 46

1-6 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการผลิต ABA ของเชื้อรา *B. cinerea* สายพันธุ์ที่จำแนกได้ 47

1-7 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการผลิต ABA 48

1-8 ผลกระทบของแสงต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการผลิต ABA 48

1-9 ผลกระทบของชนิดอาหารเลี้ยงต่อปริมาณการผลิต ABA 49

1-10 ผลกระทบของความเข้มข้นของน้ำผลไม้ในอาหารเลี้ยงต่อปริมาณการผลิต ABA 49

1-11 ผลกระทบของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อราต่อปริมาณการผลิต ABA 50

1-12 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ทดสอบการสังเคราะห์ IAA โดยใช้สารตั้งต้น tryptophan 50

1-13 การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกจากเชื้อแบคทีเรียด้วยสารละลาย Salkowski reagent เมื่อบ่มเชื้อแบคทีเรียในที่มืด 72 ชั่วโมง 51

1-14 การเปลี่ยนสีของสารละลายมาตรฐาน 3-Indoleacetic acid (IAA) ที่มีความเข้มข้น 0-90 ug/ml เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย Salkowski reagent 52

1-15 กรรมวิธีการผลิตกรดอินโดลแอซีติกและการสกัดสารให้บริสุทธิ์ 53

โครงการย่อยที่ 2

2-1 สารชีวภาพอัลจีเนต (บน) และสารชีวภาพคาราจีแนน (ล่าง) 56

2-2 ปริมาณสารชีวโมเลกุลในใบพริกที่ถูกกระตุ้นด้วยสารอัลจีเนตและคาราจีแนนที่เวลา 0, 12, 24 ,48 และ 120 ชั่วโมงหลังการทรีตสาร; ปริมาณโปรตีน (A และ B) ความว่องไวของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (C และ D) ความว่องไวของเอนไซม์เบต้า 1,3-กลูคาเนส (E และ F) และความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (G และ H) 57

2-3 ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม และแคโรทีนอยด์ในใบพริกที่ถูกกระตุ้นด้วยสารอัลจีเนตและคาราจีแนนเป็นเวลา 120 ชั่วโมง; ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (A และ B) และปริมาณแคโรทีนอยด์ (C และ D) 58

2-4 การเจริญเติบโตของต้นพริกที่ปลูกในโรงเรือนเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารทดสอบชนิดต่างๆ โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม; ความสูงต้น (A), ความกว้างของทรงพุ่ม (B), น้ำหนักต่อผล (C), ความยาวผล (D), น้ำหนักสดของต้นหลังเริ่มทดสอบเป็นเวลา 2 เดือน (E) และ น้ำหนักแห้งของต้นหลังเริ่มทดสอบเป็นเวลา 2 เดือน (F) 59

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
2-5	ดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรค (Disease Severity Index: DSI) จากเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก *C. gloeosporioides* ที่ระดับความเข้มข้น 1x10 ^{6} สปอร์/มิลลิลิตร	60
2-6	ระดับการประเมินโรคแอนแทรคโนส บนผลพริก ในระบบการปลูกพริกในโรงเรือน	61
โครงการย่อยที่ 3		
3-1	การสร้างพลาสมิดลูกผสมและการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมเพื่อการผลิต dsRNA	69
3-2	การวิเคราะห์ผลการสกัด plasmid ด้วย gel electrophoresis (1% Agarose gel)	69
3-3	แถบ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จากพลาสมิดลูกผสมที่มียีน Ceramide glucosyltransferase (เลข 1 และ 3), putative oligopeptide transporter (เลข 2 และ 4) และ Dicer-like protein 1 (เลข 5) โดย N คือ น้ำกลั่น (negative control)	70
3-4	ลำดับนิวคลีโอไทด์จากปฏิกิริยา PCR จากการวิเคราะห์ด้วย BT sequencing ของยีน Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter และ Dicer-like protein 1	72
3-5	ลักษณะโครงสร้างของ dsRNA ที่สังเคราะห์จากวิธี *In vitro* transcription (RNA secondary structure prediction: https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html)	73
3-6	ลักษณะการเจริญของรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากเพาะเลี้ยงระยะเวลา 7 วัน เมื่อยับยั้งด้วย dsRNA-Cg, dsRNA-Pot และ dsRNA-Dcl1 ที่ความเข้มข้น 300 ng/µl	74
3-7	ลักษณะสปอร์รา *C. gloeosporioides* ที่ใช้ในการปลูกเชื้อบนผลพริก	75
3-8	การประเมินการเกิดโรคบนผลพริกโดยวัดขนาดของแผลบนผลพริกเพื่อแบ่งระดับการเกิดโรคบนผลพริกสุก ทั้ง 6 ระดับ (0-9 คะแนน) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Montri *et al*., 2009)	76
3-9	การเจริญของรา *C. gloeosporioides* บนผลพริกเมื่อควบคุมด้วย (ก) dsRNA-Cg 300 ng/µl (ข) dsRNA-Cg 500 ng/µl (ค) dsRNA-Cg 1,000 ng/µl (ง) dsRNA-Pot 300 ng/µl (จ) dsRNA-Pot 500 ng/µl (ฉ) dsRNA-Pot 1,000 ng/µl (ช) dsRNA-Dcl1 300 ng/µl (ซ) dsRNA-Dcl1 500 ng/µl (ฌ) dsRNA-Dcl1 1,000 ng/µl และ (ญ) น้ำกลั่น sterile (ฏ) พริกชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ	76
โครงการย่อยที่ 4		
4-1	แสดงชนิดของบีทีที่คัดเลือกจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BT 98 (5), BT 99 (21), BT 101 (13), BT 103 (4) และBT 103	77
4-2	แสดงการเลี้ยงบีทีในอาหารเหลวเพื่อเก็บผลึกโปรตีนของบีทีที่คัดเลือกจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BT 98 (5), BT 99 (21), BT 101 (13), BT 103 (4) และBT 103	78
4-3	แสดงการทดสอบผลึกโปรตีนบีทีกับหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera exigua*	78
4-4	แสดงการเลี้ยงบีทีในอาหารเหลวเพื่อเก็บผลึกโปรตีน	81

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-5	สูตรผสมต่างๆ ในการทำ spray dry	82
4-6	การเตรียมเอนไซม์ไคติเนสใน spinner flask	83
4-7	เครื่อง VK Freezedry ที่ทำให้เอนไซม์แห้ง	84
4-8	ภาพ A แสดงลักษณะโคโลนี (colonial morphology) ของราไฟทอปธอร่ากล้วยไม้ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งวุ้นแครอท (CA agar) ภาพ B แสดงลักษณะเส้นใยของราไตรโคเดอร์มา TC1 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งวุ้นพีดีเอ (PDA) ภาพ C แสดงลักษณะโคโลนีของราไตรโคเดอร์มาไอโซเลท TC1	88
4-9	ภาพ A ลักษณะรอยโรคภายหลังทดสอบการปลูกเชื้อไฟทอปธอร่าบนใบกล้วยไม้ ภาพ B, C, D และ E แสดงกรรมวิธีทดสอบการใช้เอนไซม์เพคติเนสควบคุม เชื้อราสาเหตุโรคเน่าดำกล้วยไม้	88
4-10	แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อปฏิปักษ์ราไตรโคเดอร์มาที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยวิธี neighbor joining (NJ) ด้วยโปรแกรม MEGA 11.0 กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 100	90

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

โครงการย่อยที่ 1

1-1 ปริมาณ ABA ในอาหารเลี้ยง 50 mL ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC-MS 44
1-2 อัตราการงอกของเมล็ดหัวผักกาดในระยะ 72 ชั่วโมง (%) 45
1-3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลแอซีติกจากเชื้อแบคทีเรีย 52
1-4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตกรดอินโดลแอซีติกของเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท 54
1-5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกในอาหารสูตรต่างๆ 54
1-6 การเปรียบเทียบสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดอินโดลแอซีติก 55
1-7 ผลการจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยเทคนิคชีวโมเลกุล 55

โครงการย่อยที่ 2

-

โครงการย่อยที่ 3

3-1 ยีนที่สามารถนำมาพัฒนาออกแบบ dsRNA 62
3-2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ dsRNA ที่ออกแบบ 64
3-3 RNAi target sequences ในช่วงของ dsRNA ที่ถูกออกแบบโดยวิเคราะห์จาก mRNA ของยีน Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter และ Dicer-like protein 1 68
3-4 ความเข้มข้นของ Plasmid DNA ที่ได้จากการสกัดได้จากเซลล์ *E. Coli* 69
3-5 ความเข้มข้นของ DNA ที่ผลิตได้จากปฏิกิริยา PCR ของยีน Ceramide glucosyltransferase 70
3-6 ความเข้มข้นของ DNA ที่ผลิตได้จากปฏิกิริยา PCR ของยีน putative oligopeptide transporter 71
3-7 ความเข้มข้นของ DNA ที่ผลิตได้จากปฏิกิริยา PCR ของยีน Dicer-like protein 1 71
3-8 ความเข้มข้นของ RNA ที่ผลิตได้จากยีน Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter และ Dicer-like protein 1 ด้วยวิธี *In vitro* transcription 73
3-9 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน และประสิทธิภาพการควบคุมโรค (%) ของ dsRNA ที่ความเข้มข้น 300 ng/mL 74
3-10 ระดับการเกิดโรคของพริกจากรา *C. gloeosporioides* (1 x 10^6 spore/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน 75

โครงการย่อยที่ 4

4-1 ผลการวัดการเจริญเติบโต และค่าความเข้มข้นผลึกโปรตีนของเชื้อบีที 79
4-2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อบีทีในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในระดับห้องปฏิบัติการ 79
4-3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลึกโปรตีนของเชื้อบีทีในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในระดับห้องปฏิบัติการ 80

ศูนย์วิทยทรัพยากรเกษตร

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4-4	ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์หุ้มผลึกบีทีในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก ในระดับห้องปฏิบัติการ	83
4-5	ค่า activity ของไคติเนสที่ได้	84
4-6	ขนาดหนอนและน้ำหนักหนอนกระทู้วัย 2 หลังจากได้รับเอนไซม์ไคติเนส 1 unit/ml เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเปอร์เซนต์การตายหลังสิ้นสุดการทดลอง (เดือน กรกฎาคม 2565)	85
4-7	ค่า activity ของไคติเนสที่ได้ ในเดือนสิงหาคม 2565	85
4-8	ขนาดหนอนและน้ำหนักหนอนกระทู้วัย 2 หลังจากได้รับเอนไซม์ไคติเนส 1 unit/ml เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเปอร์เซนต์การตายหลังสิ้นสุดการทดลอง (เดือน สิงหาคม 2565)	85
4-9	ขนาดหนอนและน้ำหนักหนอนกระทู้วัย 2 หลังจากได้รับเอนไซม์ไคติเนส 1 unit/ml เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเปอร์เซนต์การตายหลังสิ้นสุดการทดลอง (เดือน สิงหาคม 2565)	86
4-10	การผลิตเอนไซม์เพคติเนส จากเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 23 ไอโซเลต บนอาหาร Czapek-Dox agar	87
4-11	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ที่ได้จากโปรแกรม BLAST ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอยีน ITS ของไตรโคเดอร์มา	89
4-12	การวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยเอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค	91
4-13	การวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค	91
4-14	การวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค	92
4-15	ขนาดของแผลที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค	93
4-16	การวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 6 วัน และหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค	93
4-17	การวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 6 วัน และหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค	94
4-18	การวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 6 วัน และหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค	94
4-19	ผลจากการวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค	95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทที่ 1 บทนำ

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

<u>วิสัยทัศน์</u>

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

<u>พันธกิจ</u>

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

2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน (โปรดเลือกเฉพาะยุทธศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับหน่วยงานของท่าน)

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคง
เพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ

☑ ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน
เน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์
คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษและภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคม
สร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคม เพิ่มโอกาสให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
คำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ
การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”

3. วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 จำนวน 2,247,566 บาท

สรุปวิชาการเกษตร

4. รายละเอียดโครงการ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

ปัจจุบันภาคเกษตรกรรมของประเทศไทยประสบปัญหาผลผลิตไม่ได้คุณภาพและมาตรฐาน อันมีสาเหตุ มาจากความแปรปรวนของสภาพภูมิอากาศที่มีความรุนแรง การเกิดการระบาดของศัตรูพืชอุบัติใหม่ ส่งผลกระทบต่อผลิตผลทางเกษตร นอกจากนี้การส่งออกสินค้าเกษตรไทยไปยังตลาดต่างประเทศต้องประสบปัญหาการแข่งขันและการกีดกันการค้าจากกลุ่มประเทศพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้มาตรฐานด้านสุขอนามัยและสิ่งแวดล้อม ซึ่งสาเหตุของปัญหาที่สำคัญ คือ การตกค้างของสารพิษจากการใช้สารกำจัดศัตรูพืช โดยระบบการปลูกพืชของเกษตรกรไทยส่วนใหญ่ยังใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชและสารสังเคราะห์เร่งการเจริญเติบโต เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตเป็นสำคัญโดยไม่คำนึงถึงปัญหาสารพิษตกค้าง ตลอดจนความปลอดภัยของเกษตรกรผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม จากรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจเกษตร และกรมวิชาการเกษตร ในปี 2562 ประเทศไทยมีปริมาณการนำเข้าสารเคมีเกษตรสูงถึง 131,308 ล้านตัน มูลค่ารวม 21,168 ล้านบาท ซึ่งนับเป็นจุดอ่อนที่สำคัญของสินค้าเกษตรไทยในตลาดโลก รวมทั้งก่อให้เกิดข้อกังวลในปริมาณการใช้สารเคมีที่มากเกินความจำเป็นและวิธีการใช้ที่ไม่ถูกต้องเหมาะสม ส่งผลให้ในปัจจุบันความต้องการใช้สารชีวภาพที่มีความปลอดภัยสูงจึงมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามสารชีวภาพทางเลือกที่มีจำหน่ายในประเทศไทยยังมีน้อย และส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ส่งผลให้มีราคาค่อนข้างแพง ประเด็นดังกล่าวนี้จึงเป็นข้อจำกัดของการส่งเสริมให้มีการใช้สารชีวภาพในระบบการเกษตรของไทย ดังนั้นหากมีการสนับสนุนให้มีการวิจัยและพัฒนาด้านการผลิตสารชีวภาพจากทรัพยากรภายในประเทศ ซึ่งหากสามารถต่อยอดการผลิตในรูปผลิตภัณฑ์ได้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อระบบการผลิตพืชของประเทศ เพื่อรองรับนโยบายการสนับสนุนการทำการเกษตรปลอดภัยและเกษตรอินทรีย์

โครงการวิจัย นวัตกรรมและเทคโนโลยีการผลิตสารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่ายเพื่อผลิตพืชปลอดภัย มุ่งเน้นการวิจัยและพัฒนานวัตกรรมผลิตภัณฑ์สารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่ายซึ่งเป็นทรัพยากรชีวภาพที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีอยู่ภายในประเทศ/ท้องถิ่น เพื่อนำมาใช้สร้างมูลค่าของวัสดุชีวภาพให้เกิดประโยชน์สูงสุดในด้านปัจจัยการผลิตพืช เพื่อทำให้พืชมีความสมบูรณ์แข็งแรง โดยมีแนวคิดเชิงป้องกัน เพื่อลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับผลผลิตหรือผลกระทบแม้จะถูกบุกรุกโดยศัตรูพืชหรือสภาพภูมิอากาศที่มีความแปรปรวน ให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพในด้านความปลอดภัยของผลผลิต สามารถทดแทน/ลดปริมาณการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ได้แก่ ฮอร์โมน สารกระตุ้นชีวภาพ และสารกำจัดศัตรูพืช โดยการนำเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงและเทคโนโลยีสมัยใหม่มาใช้ในการพัฒนาและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจจากการใช้ทรัพยากรชีวภาพที่มีภายในประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยการขับเคลื่อนด้วย BCG Economy Model และสามารถขยายผลเทคโนโลยีและนวัตกรรมสู่การใช้ประโยชน์ได้จริงเพื่อเป็นสารทางเลือกทดแทนการใช้สารเคมีซึ่งปัจจุบันต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และมีราคาแพง โดยโครงการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาปัจจัยการผลิตซึ่งจะช่วยเพิ่มศักยภาพในการผลิตพืชปลอดภัยแบบครบวงจร พร้อมทั้งส่งเสริมและสร้างความยั่งยืนในระบบนิเวศการเกษตร

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตสารชีวภาพฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์ และสารกระตุ้นชีวภาพจาก สาหร่ายที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต

2. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) ในการสร้างความต้านทานและยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชอย่างจำเพาะเจาะจง

3. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตไมโครแคปซูลของโปรตีนบีที ผลิตภัณฑ์เอนแคปซูเลตไคติเนส และเอนไซม์เพคติเนสที่ผลิตได้จากเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมศัตรูพืช

4. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่าย ทั้งในสภาพโรงเรือนและการขยายผลสู่แปลงเกษตรกร

ขอบเขตการศึกษา

โครงการวิจัย นวัตกรรมและเทคโนโลยีการผลิตสารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่ายเพื่อผลิตพืชปลอดภัย มุ่งเน้นการวิจัยและพัฒนานวัตกรรมผลิตภัณฑ์สารชีวภาพจากจุลินทรีย์และสาหร่ายซึ่งเป็นทรัพยากรชีวภาพที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีอยู่ภายในประเทศ/ท้องถิ่น เพื่อนำมาใช้สร้างมูลค่าของวัสดุชีวภาพให้เกิดประโยชน์สูงสุดในด้านปัจจัยการผลิตพืช เพื่อทำให้พืชมีความสมบูรณ์แข็งแรง โดยมีแนวคิดเชิงป้องกัน เพื่อลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับผลผลิตหรือผลกระทบแม้จะถูกบุกรุกโดยศัตรูพืช หรือสภาพภูมิอากาศที่มีความแปรปรวน ให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพในด้านความปลอดภัยของผลผลิต สามารถทดแทน/ลดปริมาณการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ได้แก่ ฮอร์โมน สารกระตุ้นชีวภาพ และสารกำจัดศัตรูพืช โดยการนำเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงและเทคโนโลยีสมัยใหม่มาใช้ในการพัฒนาและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจจากการใช้ทรัพยากรชีวภาพที่มีภายในประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนี้

1. การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เป็นการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาพัฒนาประสิทธิภาพในการผลิตสารฮอร์โมนซึ่งจะช่วยในการกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงบรรเทาความเสียหายทางการเกษตรที่เกิดขึ้นบ่อยครั้งในแต่ละปี โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สารชีวภาพฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน (กรดอินโดลแอซีติก) และกรดแอบไซซิก ซึ่งสังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์จะช่วยเสริมสร้างความทนทานต่อความเครียดของพืช สามารถพัฒนาเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตพืช ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ เช่น การขาดน้ำจากสภาวะแล้ง อุณหภูมิสูงหรือต่ำจนเกินไป ภาวะดินเค็ม เป็นต้น โดยฮอร์โมนพืชออกซินนั้น ทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโตที่ให้พืชเกิดการแบ่งตัว และยืดตัวของเซลล์ในส่วนลำต้นของพืช และกรดแอบไซซิก (Abscisic acid; ABA) เป็นฮอร์โมนพืชที่มีหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นให้พืชตอบสนองและปรับตัวต่อสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ

2. การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารกระตุ้นชีวภาพจากสาหร่ายเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต และความแข็งแรงในพืช เป็นการพัฒนาสารชีวภาพ (กรดอัลจีนิก/คาราจีแนน) จากสาหร่ายทุ่นและมงกุฎหนามซึ่งมีอยู่ในท้องถิ่นภาคใต้ โดยสามารถชักนำให้พืชสร้างสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตหรือเสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่พืชได้ เช่น สามารถสังเคราะห์แสงได้ดีขึ้น มีปริมาณผลผลิตเพิ่มมากขึ้น พืชแข็งแรงขึ้นทำให้เกิดความเสียหายลดน้อยลงเมื่อถูกบุกรุกโดยศัตรูพืช ดังนั้นการใช้ตัวกระตุ้นชีวภาพ (bio-stimulant) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในสนับสนุนกระบวนการผลิตพืชปลอดภัยและช่วยในการลดความเสี่ยงข้างต้น

3. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพทางการเกษตร เป็นการนำเทคโนโลยี RNA interference (RNAi) ซึ่งเป็นกระบวนการรบกวน RNA เป้าหมายที่มีอยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตด้วยการส่งผ่าน dsRNA เข้าไปในสิ่งมีชีวิตนั้น ก็จะส่งผลให้เกิดการรบกวนการทำงานของ RNA ภายในเซลล์ของเชื้อโรคเป้าหมาย โดยจะมีผลให้เกิดการทำลาย mRNA ยับยั้งการถอดรหัส การแปรรหัส รวมไปถึงมีการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม เป็นต้น ซึ่งปัจจุบันนี้มีความพยายามที่จะประยุกต์ใช้เทคนิคนี้มาเป็นเครื่องมือเพื่อที่จะช่วยควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพริก ซึ่งเป็นพืชที่มีการรายงานปริมาณการตกค้างของการกำจัดศัตรูพืชในผลผลิตสูงที่สุด จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาการใช้สารเคมี

4. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนไซม์และไมโครแคปซูลจากจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช เป็นการนำเทคโนโลยีเอาแคปซูเลชัน (encapsulation) และเทคโนโลยีเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาสารชีวภาพจากทั้งรา และแบคทีเรีย ซึ่งการพัฒนาไมโครแคปซูลบีที (*Bacillus thuriengiensis*) เป็นการพัฒนาต่อยอดเพื่อให้ได้รูปแบบผลิตภัณฑ์ที่มีความคงทนในสภาพแวดล้อมได้นาน รวมถึงการพัฒนาการผลิตไคติเนสจากราเมตาไรเซียมเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช มีการขยายผลการศึกษาในการขยายเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไคติเนสในถังหมักมาช่วยในพัฒนากระบวนการผลิต และพัฒนาผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลเพื่อให้มีประสิทธิภาพและความคงทน นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการผลิตเอนไซม์แพคติเนสในรูปแบบผลิตภัณฑ์พร้อมใช้เพื่อนำมาควบคุมโรคพืชในกล้วยไม้ส่งออก

ตรวจการบ้านโดย

นิยามศัพท์

ABA	Abscisic acid
BSM	Botrytis Selective Media
IAA	Indole-3-acetic acid
NaOAc	Sodium acetate
rDNA	ribosomal DNA
SDS	sodium dodecyl sulfate

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

1. วิธีการดำเนินการวิจัย

โครงการย่อยที่ 1 การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

<u>กิจกรรมที่ 1</u> เทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพกรดแอบไซซิกจากจุลินทรีย์

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาจุลินทรีย์ผลิตกรดแอบไซซิกเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

1. การรวบรวมและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Botrytis cinerea* จากผักหรือผลไม้ที่มีอาการเน่าเสียจากราสีเทา นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA และอาหาร Botrytis selective media จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิธีทางชีวโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วนของ 18S rDNA และนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

2. การคัดเลือกเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่ผลิตกรดแอบไซซิก

- นำเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่จำแนกได้ มาทดสอบเลี้ยงในอาหารเหลว PDB และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27°C ในสภาพใต้แสงขาวปกติ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำก้อนเชื้อราและอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อรา มาสกัดแบบหยาบด้วย Ethyl acetate

- นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดแบบหยาบ วัดปริมาณกรดแอบไซซิกเชิงปริมาณด้วย HPLC-MS เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของกรดแอบไซซิกบริสุทธิ์ หลังจากนั้น ทดสอบประสิทธิภาพ bioassay ของน้ำเลี้ยงจากเชื้อราตามวิธีของ Schopfer และคณะ (Schopfer and Plachy, 1984) โดยให้น้ำเลี้ยงของเชื้อราชนิดต่างๆ แก่เมล็ดผักกาดบนกระดาษเพาะเมล็ด เพาะเมล็ดผักกาดในที่มืดเป็นเวลา 72 ชั่วโมงและนับอัตราการงอกของเมล็ดผักกาด คัดเลือกเชื้อรา 1 ไอโซเลท ที่ให้น้ำเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอก และมีกรดแอบไซซิกปริมาณสูงที่สุด

3. การศึกษาปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตกรดแอบไซซิก

- ศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อราที่เหมาะสมกับการผลิตกรดแอบไซซิก นำเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่สามารถผลิตกรดแอบไซซิกในปริมาณสูงที่สุด ซึ่งคัดเลือกแล้วในข้อ 2 มาเลี้ยงทดสอบในอุณหภูมิต่างกัน โดยใช้อาหารเหลว PDB เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีกรรมวิธีการทดลอง 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่อุณหภูมิ 24 °C (control)
กรรมวิธีที่ 2 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่อุณหภูมิ 27 °C
กรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่อุณหภูมิ 30 °C
เปรียบเทียบปริมาณกรดแอบไซซิกของน้ำเลี้ยงสกัดแบบหยาบที่ได้ ด้วยวิธีวัดปริมาณโดย HPLC-MS
<u>บันทึกข้อมูล</u> น้ำหนักสดของก้อนเชื้อรา ปริมาณกรดแอบไซซิกในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ

- ศึกษาอิทธิพลของแสงในการเลี้ยงเชื้อราที่เหมาะสมกับการผลิตกรดแอบไซซิก นำเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่สามารถผลิตกรดแอบไซซิกในปริมาณสูงที่สุด ซึ่งคัดเลือกแล้วในข้อ 2 มาเลี้ยงทดสอบในอุณหภูมิที่เหมาะสมข้างต้น โดยใช้อาหารเหลว PDB มาเลี้ยงทดสอบภายใต้ปัจจัยแสงที่ต่างกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีกรรมวิธีการทดลอง 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ กรรมวิธีดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร

กรรมวิธีที่ 1 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่มืด (control)
กรรมวิธีที่ 2 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่ใต้แสงขาวปกติ
กรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่ใต้แสง blue light
เปรียบเทียบปริมาณกรดแอบไซซิกของน้ำเลี้ยงสกัดแบบหยาบที่ได้ ด้วยวิธีวัดปริมาณโดย HPLC-MS
บันทึกข้อมูล น้ำหนักสดของก้อนเชื้อรา ปริมาณกรดแอบไซซิกในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ

- ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เหมาะสมกับการผลิตกรดแอบไซซิก นำเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่คัดเลือกแล้วมาเลี้ยงทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีกรรมวิธีการทดลอง 7 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB (control)
กรรมวิธีที่ 2 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YDC
กรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมะเขือเทศ
กรรมวิธีที่ 4 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำสตรอเบอรี่
กรรมวิธีที่ 5 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำเบอรี่ผสม
กรรมวิธีที่ 6 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมะเขือเทศผสม
กรรมวิธีที่ 7 เลี้ยงเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมังคุดผสม
เปรียบเทียบปริมาณกรดแอบไซซิกของน้ำเลี้ยงสกัดแบบหยาบที่ได้ ด้วยวิธีวัดปริมาณโดย HPLC-MS
บันทึกข้อมูล น้ำหนักสดของก้อนเชื้อรา ปริมาณกรดแอบไซซิกในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ

กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพกรดอินโดลแอซีติกจากจุลินทรีย์

การทดลองที่ 2.1 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลแอซีติกจากจุลินทรีย์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

1. การศึกษาและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตกรดอินโดลแอซีติก

1.1 รวบรวมและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกจากแหล่งต่างๆ และเชื้อที่รวบรวมไว้ในห้องปฏิบัติการ ทำการคัดแยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อบนอาหาร Nutrient agar ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกได้ โดยนำจุลินทรีย์ที่รวบรวมได้จากข้างต้น โดยการวิเคราะห์และเปรียบเทียบในเชิงคุณภาพโดยวิธี Bioassay plate technique ปรับปรุงเล็กน้อยตามวิธีการของ Shrivastava and Kumar (2011) และ Bric *et al*. (1991) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient broth นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหยดลงบน paper disc (cellulose membrane ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) ที่วางบนอาหาร Nutrient agar ที่เติม 5 mM L-Tryptophan บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำแผ่น paper disc ไปวางบนเพลทแก้ว หยดสารละลาย Salkowski reagent 10 ul บ่มในที่มืด 2 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีบนแผ่น paper disc เป็นสีแดง-ชมพู

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลแอซีติกจากเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.1 นำไปเลี้ยงทดสอบในอาหารเหลว LB broth ที่เติม 5 mM L-Tryptophan ใส่หัวเชื้อตั้งต้นปริมาตร 1% ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่

กรมวิชาการเกษตร

มืดนาน 48-72 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลาย Salkowski reagent บันทึกผลดังนี้ -, +, ++, +++, ++++ จากสีเหลืองเป็นสีแดง

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลแอซีติกด้วยวิธี spectrophotometer

ทำการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลแอซีติกในเชิงปริมาณด้วยวิธี spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตร ตามวิธี Salkowski colorimetric technique ของ Glickmann and Dessaux (1995) โดยเตรียมสารละลายตั้งต้นของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จากข้อ 1.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ปรับให้มีความเข้มข้นที่เท่ากันทุกไอโซเลท นำมาปรับค่า O.D. $_{600}$ = 0.5 นำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวไปเลี้ยงทดสอบในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของ yeast extract 0.2 และ NH_4SO_4 1 กรัมต่อลิตร และ 5 mM L-Tryptophan ใส่หัวเชื้อสารละลายตั้งต้นปริมาตร 1% โดยปริมาตร ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณ โดยนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืดนาน 240 ชั่วโมง (10 วัน) บันทึกผลทุกชั่วโมง จนครบ 240 ชั่วโมง เปรียบเทียบการวิเคราะห์เชิงปริมาณของกรดอินโดลแอซีติกที่เชื้อผลิตได้ โดยมีสัดส่วนของการทำปฏิกิริยา คือ สารละลายเชื้อ 1 ml + Salkowski reagent 200 ul บ่มไว้ในที่มืดนาน 2 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยสีของสารละลาย Salkowski reagent เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง นำมาวัดค่าปฏิกิริยาด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 530 nm เปรียบเทียบกับ standard curve ของสารละลายมาตรฐาน 3-Indoleacetic acid

2. การศึกษาสภาวะปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตกรดอินโดลแอซีติก

2.1 ศึกษาชนิดและองค์ประกอบของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงจากแหล่งที่มีปริมาณอินทรีย์สารหรือโปรตีนสูง เพื่อหาแหล่งวัสดุที่เหมาะสมในการใช้ทดแทนสาร Tryptophan ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาเพื่อการสังเคราะห์ให้ได้ผลผลิตกรดอินโดลแอซีติก โดยผสมวัสดุตั้งต้นในอาหารเหลว Minimal Medium เลี้ยงนาน 7-10 วัน ตรวจวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ปริมาณกรดอินโดลแอซีติกที่จุลินทรีย์ผลิตได้ และเปรียบเทียบกับการเติม Tryptophan เป็นสารตั้งต้น วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีกรรมวิธีการทดลอง 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร Minimal Medium + 5 mM Tryptophan
กรรมวิธีที่ 2 อาหาร Minimal Medium + 2.5 mM Tryptophan
กรรมวิธีที่ 3 อาหาร Minimal Medium + 2.5 mM Tryptophan + กล้วยน้ำว้า
กรรมวิธีที่ 4 อาหาร Minimal Medium + ถั่วเหลือง
กรรมวิธีที่ 5 อาหาร Minimal Medium + รำข้าว
กรรมวิธีที่ 6 อาหาร Minimal Medium + กล้วยหอม
กรรมวิธีที่ 7 อาหาร Minimal Medium + ไข่แดง

2.2 สภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงในอาหาร NB + 5 mM L-Tryptophan วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีกรรมวิธีการทดลอง 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 2 เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

<u>บันทึกข้อมูล</u> ปริมาณสาร IAA ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ อัตราการเจริญเติบโตจุลินทรีย์ ชนิดของอาหาร/สารตั้งต้น ปัจจัยอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และเปรียบเทียบปริมาณกรดอินโดลแอซีติกที่จุลินทรีย์ผลิต

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล วิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วนของ ribosomal RNA gene นำลำดับนิวคลิอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ

3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 ในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) (เตรียม 1 ลิตร : NaCl 10 กรัม, Tryptone 10 กรัม, Yeast extract 5 กรัม, ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วย ddH_2O) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองแล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ล้างตะกอนเซลล์ โดยละลายตะกอนเซลล์ด้วย 1X TE buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วย 1XTE buffer ปริมาตร 760 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม 10 เปอร์เซ็นต์ sodium dodesyl sulfate (SDS) 40 ไมโครลิตร และ proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม 5M NaCl 100 ไมโครลิตร และ 2X CTAB (บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส) 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พลิกกลับหลอดไปมาทุก 5 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับหลอดไปมาช้าๆ นาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ค่อยๆ ดูดน้ำใสส่วนบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่ลงหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc 60 ไมโครลิตร (0.1 เท่าของสารละลาย DNA ที่ได้) ผสมให้เข้ากัน เติม isopropanol 400 ไมโครลิตร (0.6 เท่าของสารละลาย DNA ที่ได้) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer : RNase (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) [อัตราส่วน 25:1] ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ $OD_{260/280}$ และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยแยกบน 1 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ใน 1XTBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แช่แผ่นเจลในเอธิเดียมโบรไมด์ (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร) นาน 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Gel Documentation (BIORAD) บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนบริเวณ 16s rDNA โดยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ universal primer (Lane, 1991; Alm *et al*., 1996)

Forward 27F 5’ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3’

Reverse 1492R 5’ TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3’

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด PCR ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ 27F (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ 1492R (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร,Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกริยา PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 30 รอบ
55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (α)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส โดยวิธี Electrophoresis โดยผสมผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร แยกผลผลิต PCR ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์

3.3 การเตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ และการตรวจวิเคราะห์ผล

เตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดย นำผลผลิต PCR ที่เหลือจากจากข้อ 3.2 ปริมาตร 17 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc ปริมาตร 3.4 ไมโครลิตร และ 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 85 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex นาน 10 วินาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ระหว่างนี้นำมาผสมโดยพลิกกลับหลอดไปมาทุก 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน PCR ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย ddH_2O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ โดยวิธี Electrophoresis บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel (ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร)

3.4 การหาลำดับเบสในส่วนของบริเวณ 16s rDNA

3.4.1 การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1	2	ไมโครลิตร

ศรีปทุมราชภัฏ

Ready Reaction buffer	1	ไมโครลิตร
Primer 27F (5 ไมโครโมลาร์)	1.6	ไมโครลิตร
dH_2O	4.4	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	10	ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) อุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

96 องศาเซลเซียส	1 นาที	จำนวน 1 รอบ
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	จำนวน 25 รอบ
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 นาที	
4 องศาเซลเซียส	infinity (α)	

3.4.2 การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้อ 3.4.1 มาล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำปฏิกิริยาดังกล่าวใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม stock solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร : 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยตะกอนให้แห้งในที่มืด

3.4.3 การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้อยู่ที่ก้นหลอด แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ย้ายลงน้ำแข็งทันที

3.4.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.4.3 เข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

สถานที่ดำเนินการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี

กรมวิทยาศาสตร์

โครงการย่อยที่ 2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารกระตุ้นชีวภาพจากสาหร่ายเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของพืชตามแนวทางทำเกษตรอย่างยั่งยืน

กิจกรรมที่ 1 ศึกษาผลของสารชีวภาพจากสาหร่ายต่อการสร้างสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของพืช และประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาศักยภาพของสารชีวภาพจากสาหร่ายในการกระตุ้นการสร้างสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและความแข็งแรงภายในต้นพริก

1. สกัดและวิเคราะห์สารชีวภาพจากสาหร่าย

1.1 สารชีวภาพจากสาหร่ายทุ่น

เก็บ/รวบรวมตัวอย่างสาหร่ายทุ่น จากพื้นที่จังหวัดในภาคใต้หรือภาคตะวันออก นำมาสกัดกรดอัลจีนิกตามวิธีที่ปรับจาก Ali, *et al.,* 2015 ดังนี้ นำสาหร่ายมาอบแห้งแล้วบดเป็นผง ชั่งสาหร่าย 2 กรัม มาผสมใน 2% แคลเซียมคลอไรด์ นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน นำไปทรีตด้วย 40% ฟอร์มาลดีไฮด์นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 3 ครั้ง สกัดแยกอัลจีเนตโดยเติมสารละลาย 1 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนตที่มี EDTA 0.5 กรัม แช่ไว้ 48 ชั่วโมง นำไปกรอง สารละลายที่ได้นำมาตกตะกอนด้วยเอทานอล แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน นำไประเหยที่ 60 องศาเซลเซียส ข้ามคืนให้ตัวอย่างแห้ง ชั่งน้ำหนักอัลจีเนตที่สกัดได้

การบันทึกผล - ปริมาณสารชีวภาพกรดอัลจีนิกที่สกัดได้จากสาหร่ายทุ่น

- หมู่ฟังก์ชั่นที่สำคัญของสารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค FTIR โดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดอัลจีนิก

1.2 สารชีวภาพจากสาหร่ายมงกุฎหนาม

เก็บ/รวบรวมตัวอย่างสาหร่ายมงกุฎหนาม จากพื้นที่จังหวัดในภาคใต้หรือภาคตะวันออก นำมาสกัดคาราจีแนนจากสาหร่ายมงกุฎหนามตามวิธีที่ปรับจาก Pettongkhao *et al*. (2019) ดังนี้ นำสาหร่ายมาล้างทำความสะอาด นำไปอบและบดเป็นผง ชั่งน้ำหนักสาหร่าย 5 กรัม ผสมลงใน 85% เมทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนต่อเนื่องข้ามคืน นำสารละลายทิ้งไป เก็บเฉพาะสาหร่ายไปผสมในน้ำกลั่น แล้วให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมงโดยทำการกวนสารอย่างต่อเนื่อง หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,500 g นาน 10 นาที เก็บสารละลายใสที่ได้มาผสมกับ 95% เอทานอล ในอัตราปริมาตรการผสม 1:3 รอให้ตกตะกอน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,500 g เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อเก็บส่วนตะกอน นำตะกอนที่ได้มาละลายกลับด้วยน้ำกลั่น และทำการ dialyzed และนำไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง ชั่งน้ำหนักที่ได้ สารชีวภาพที่สกัดได้สามารถละลายได้ในน้ำกลั่นโดยตรงก่อนใช้งาน

การบันทึกผล - ปริมาณสารชีวภาพคาราจีแนนที่สกัดได้จากสาหร่ายมงกุฎหนาม

- หมู่ฟังก์ชั่นที่สำคัญของสารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค FTIR โดยเทียบกับสารมาตรฐานคาราจีแนน

2. การทดสอบผลของสารชีวภาพจากสาหร่ายในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุลในต้นพริกรอบปลูกที่ 1

2.1 เตรียมต้นพริกจินดาพันธุ์ ศก.13 โดยปลูกในกระถางขนาด 8x15 นิ้ว เลี้ยงในสภาพโรงเรือน อายุประมาณ 45 วัน หรือ ระยะเริ่มออกดอกสำหรับใช้ในการทดลอง

2.2 คัดเลือกต้นพริกที่มีขนาดต้นสม่ำเสมอกันมาวางเลี้ยงในห้องทดลองที่ควบคุมสภาวะแวดล้อมที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียสความชื้น 70-80% ได้รับแสงฟลูออเรสเซนส์ในช่วง 350-400 ลักซ์เหนือทรงพุ่มเป็นเวลา 12

กรมวิชาการเกษตร

ชั่วโมงต่อวันเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ต้นพริกปรับสภาพในสภาวะแวดล้อมที่ใช้ทดสอบ จึงทำการฉีดพ่นสารชีวภาพจากสาหร่ายทั้งสองชนิดตามกรรมวิธีดังนี้

2.2.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 1 ปัจจัย (สารชีวภาพกรดอัลจีนิกจากสาหร่ายทุ่น) แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กรรมวิธีๆละ3 ซ้ำๆละ 2 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่น(negative control)

กรรมวิธีที่ 2 กรดซาลิซิลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตรต่อต้น (positive control)

กรรมวิธีที่ 3 สารกระตุ้นชีวภาพกรดอัลจีนิก ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตรต่อต้น

กรรมวิธีที่ 4 สารกระตุ้นชีวภาพกรดอัลจีนิก ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตรต่อต้น

กรรมวิธีที่ 5 สารกระตุ้นชีวภาพกรดอัลจีนิก ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร40 มิลลิลิตรต่อต้น

2.2.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 1 ปัจจัย (สารชีวภาพคาราจีแนนจากสาหร่ายมงกุฎหนาม) แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กรรมวิธีๆละ3 ซ้ำๆละ 2 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่น(negative control)

กรรมวิธีที่ 2 กรดซาลิซิลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตรต่อต้น (positive control)

กรรมวิธีที่ 3 สารกระตุ้นชีวภาพคาราจีแนน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตรต่อต้น

กรรมวิธีที่ 4 สารกระตุ้นชีวภาพคาราจีแนน ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตรต่อต้น

กรรมวิธีที่ 5 สารกระตุ้นชีวภาพคาราจีแนน ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตรต่อต้น

2.3 เก็บใบพริกบริเวณปลายยอด รอบทรงพุ่ม จำนวน 10 ใบต่อต้น ในแต่ละทรีตเม้นท์ ที่เวลา 0, 12, 24, 48, และ 120 ชั่วโมงมามาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แยกตัวอย่างใบพืชเป็น 3 ส่วน ห่อด้วยกระดาษอลูมินั่มฟอล์ยชั่งน้ำหนักส่วนละ 0.5-1 กรัม จดรหัสตัวอย่าง นำตัวอย่างแช่ในไนโตรเจนเหลวทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาต่างๆของสารชีวโมเลกุลภายในพืช นำตัวอย่างไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลในลำดับต่อไป

2.4 วิเคราะห์ปริมาณสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเจริญเติบโต และความแข็งแรงของพืช ได้แก่

2.4.1 ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ

นำใบพริก 0.1 กรัมมาสกัดด้วยและวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบตามวิธีของ Shankar *et al*. (2013) โดยสกัดด้วยอะซิโตน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณโดยใช้สูตร Total chlorophyll = 20.2 (A645) + 8.02 (A 663) x V/1000x W เมื่อ A คือค่าการดูดกลืนแสง, V คือปริมาตรของสารสกัดที่ได้, W คือน้ำหนักสดของใบพริก

2.4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนรวมและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตและความแข็งแรงในต้นพริก ดำเนินการดังนี้

นำตัวอย่างใบที่บดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดยามาสกัดในบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ Tris-HCl พีเอช 7.0 (Chinnapun และ Churngchow, 2008) หมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนสารละลายใสมาใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้

2.4.2.1 ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) โดยรายงานผลเทียบกับกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

2.4.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในวิถี phenyl propanoidซึ่งเป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์และโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกันโรค และสารทุติยภูมิที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างความแข็งแรงให้แก่พืช ได้แก่ ลิกนิน โดยวิเคราะห์ตามวิธีของ Zucker (1968) รายงานผลเทียบกับกราฟมาตรฐาน trans-cinnamic acid

2.4.2.3 กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบภูมิคุ้มกันพืชและยังเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสร้างลิกนิน ตามวิธีของ Shannon et al. (1966) โดยใช้เทคนิค spectrophotometric method รายงานผลเทียบกับอัตราการเปลี่ยนแปลงสีของ o-dianisidine ต่อเวลาและ/หรือ Native PAGE enzyme activity staining

2.4.3 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารทุติยภูมิ ดังนี้

2.4.3.1 สารประกอบฟีนอลิกรวม (ตามวิธีของ Torres *et al.,* 1987) โดยใช้เทคนิค spectrophotometric method และเปรียบเทียบผลกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

2.4.3.2 กรดซาลิซิลิก สคอพอเลติน และกรดแอบไซซิกโดยใช้เทคนิค HPLC (ตามวิธีของ Ederli *et al*., 2011 และ Khompatara, 2017, 2019)

การบันทึกผล - ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารชีวโมเลกุลที่เวลาต่างๆกัน ได้แก่ ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์-ออกซิเดส สารประกอบฟีนอลิกรวม กรดซาลิซิลิก สคอพอเลติน และกรดแอบไซซิก

- บันทึกภาพลักษณะปรากฏของพืชทดสอบก่อนและหลังการทรีตสาร

สถานที่ดำเนินการทดลอง: ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ กลุ่มพัฒนาฯ สวพ.8

การทดลองที่ 1.2 การประยุกต์ใช้สารชีวภาพจากสาหร่ายในระบบการปลูกพริกในโรงเรือน

1. เตรียมเชื้อราสาเหตุโรคของพริกคือ *C. gloeosporioides* มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หรือจนเชื้อราแต่ละชนิดสร้างสปอร์ก่อนเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อให้ท่วมเส้นใยของเชื้อรา และใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมขูดสปอร์ของเชื้อราโรคพืชให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอยในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มานับความเข้มข้นด้วย heamacytometer และปรับความเข้มข้นให้ได้ที่ 1x108 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ก่อนเก็บสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้ดังกล่าวไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2. เตรียมสารชีวภาพจากสาหร่ายทุ่นและสาหร่ายมงกุฎหนาม เช่นเดียวกับวิธีการสกัดในการทดลองที่ 1.1

3. ทดสอบผลของสารชีวภาพต่อการกระตุ้นความแข็งแรงให้แก่ผลพริกในระดับห้องปฏิบัติการโดยวิธี detached fruit (ดัดแปลงจากวิธีของ Phialathounheuane et al., 2012)

3..1 เตรียมผลพริกจินดา ศก.13 ที่ได้จากแหล่งปลูกเดียวกัน มีขนาดผล และวัยใกล้เคียงกัน (จำนวน 30 ผลต่อกรรมวิธี) มาล้างทำความสะอาดที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (2%, 2 นาที) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง วางไว้ให้แห้ง จุ่มพริกในสารชีวภาพจากสาหร่าย ซึ่งสกัดในขั้นตอนที่ 2 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ น้ำกลั่นและกรดซาลิซิลิก วางทิ้งให้แห้งประมาณ 24 ชั่วโมง

3.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) แบ่งการทดลองออกเป็น 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่น (negative control)

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 2 กรดซาลิซิลิก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (positive control)
กรรมวิธีที่ 3 สารชีวภาพกรดอัลจีนิก ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 4 สารชีวภาพกรดอัลจีนิก ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 5 สารชีวภาพคาราจีแนน ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 6 สารชีวภาพคาราจีแนน ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ใช้ cork borer ขนาด 0.2 ซม. ตัดชิ้นวุ้นอาหาร PDA ซึ่งมีเส้นใยเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* ที่อายุ 5 วัน วางบนผลพริก ผลละ 1 ชิ้น นำผลพริกที่ปลูกเชื้อแล้วมาวางเรียงไว้ในกล่องพลาสติกที่สะอาดใส่ก้อนสำลีที่ชุ่มน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อวางไว้ภายในกล่องแล้วปิดฝาเพื่อรักษาความชื้นและหลีกเลี่ยงการสัมผัสรอยแผลบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประเมินความรุนแรงของโรคหลังปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน และทำการทดสอบซ้ำอีก 1 ครั้งเพื่อยืนยันผล

การบันทึกผล -ประเมินความรุนแรงของโรคหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วันตามวิธีของ Phialathounheuane et al. (2012)

- คำนวณเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเกิดโรค (disease index, %DI)

สูตรการคำนวณ Disease index (%DI) = (∑ Ni x Vi) x 100/ N x V

เมื่อ Ni=จำนวนผลที่แสดงการเกิดโรคในแต่ละระดับ
Vi = ระดับการเกิดโรค (1, 2, 3, 4, 5 หรือ 6)
V= ระดับการเกิดโรคสูงสุด
N= จำนวนผลทั้งหมดที่นำมาทดสอบ

4. การทดสอบผลของสารชีวภาพจากสาหร่ายต่อการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของต้นพริกในโรงเรือนรอบปลูกที่ 1

4.1 การทดสอบผลของสารชีวภาพจากสาหร่ายต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโต

4.1.1 การเตรียมกล้าพริกจินดา พันธุ์ ศก.13 เช่นเดียวกับการเตรียมกล้าพริกในการทดลองที่ 1.1

4.1.2 การใช้สารชีวภาพกระตุ้นการเจริญเติบโต

ทดสอบผลของสารชีวภาพจากสาหร่าย ทำโดยสารทดสอบชนิดต่างๆ มาฉีดพ่นบนต้นพริก (ใช้ต้นพริกในระยะเริ่มออกดอก) ในอัตรา 40 มิลลิลิตรต่อต้น ทำการพ่นสารชีวภาพซ้ำทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 60 วัน จากนั้นเก็บต้นทั้งหมดเพื่อวิเคราะห์ผลผลิตและการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือน้ำเปล่า โดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 6 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำๆละ 3 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่น (negative control)
กรรมวิธีที่ 2 กรดซาลิซิลิกความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (positive control)
กรรมวิธีที่ 3 สารชีวภาพกรดอัลจีนิก ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 4 สารชีวภาพกรดอัลจีนิก ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 5 สารชีวภาพคาราจีแนน ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 6 สารชีวภาพคาราจีแนน ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การบันทึกผล –ข้อมูลการเจริญเติบโตหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยสารชีวภาพจากสาหร่ายเป็นเวลา 60 วัน ได้แก่ ความสูงต้น เส้นผ่านศูนย์กลางทรงพุ่ม จำนวนกิ่งก้านที่แตกออกจากลำต้นหลัก ขนาดผล น้ำหนักผล น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น (ศิริพงษ์ และคณะ, 2554)

4.2 การใช้สารชีวภาพกระตุ้นความต้านทานต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides*

กรมวิชาการเกษตร

4.2.1 การเตรียมกล้าพริกจินดา พันธุ์ ศก.13 เช่นเดียวกับการเตรียมกล้าพริกในการทดลองที่ 1.1

4.2.2 การใช้สารชีวภาพกระตุ้นความแข็งแรง

ทดสอบผลของสารชีวภาพจากสาหร่าย ทำโดยสารทดสอบชนิดต่างๆ มาฉีดพ่นบนต้นพริก (ใช้ต้นพริกในระยะเริ่มออกดอก) ในอัตรา 40 มิลลิลิตรต่อต้น วางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง โดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 6 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำๆละ 3 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่น (negative control)

กรรมวิธีที่ 2 กรดซาลิซิลิกความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (positive control)

กรรมวิธีที่ 3 สารชีวภาพกรดอัลจีนิก ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 4 สารชีวภาพกรดอัลจีนิก ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 5 สารชีวภาพคาราจีแนน ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 6 สารชีวภาพคาราจีแนน ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.3 นำสารละลายสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides*. ที่ระดับความเข้มข้น 1x108 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาฉีดพ่นต้นพริกในทุกกรรมวิธี ในอัตรา 40 มิลลิลิตรต่อต้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงสังเกตอาการโรคที่ปรากฏบนใบหลังฉีดพ่น หากไม่ปรากฏรอยโรคดำเนินการฉีดพ่นซ้ำด้วยความเข้มข้นและอัตราการฉีดเดิม

การบันทึกผล – ประเมินระดับความรุนแรงของโรคแอนแทรกโนส ในวันที่ 15 นับจากวันแรกที่ปรากฏแผล โดยวัดพื้นที่ผิวพืชที่แสดงอาการของโรคเทียบกับพื้นที่ผิวทั้งหมด

ระดับ 0 ไม่พบอาการของโรคปรากฏบนผิวพืช

ระดับ 1 พื้นที่ผิวเป็นโรค 1-20 %

ระดับ 2 พื้นที่ผิวเป็นโรค 21-40 %

ระดับ 3 พื้นที่ผิวเป็นโรค 41-60 %

ระดับ 4 พื้นที่ผิวเป็นโรค 61-80 %

ระดับ 5 พื้นที่ผิวเป็นโรค 81–100%

(นันทิการ์ และคณะ :http://www.doa.go.th/oard8/wp-content/uploads/2019/08/v5801-22.pdf เข้าถึงเมื่อ 30 มีนาคม 2563)

สถานที่ดำเนินการทดลอง : ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสงขลา และกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ.8

กรมวิชาการเกษตร

โครงการย่อยที่ 3 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพทางการเกษตร

<u>การทดลองที่ 1</u> การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี RNAi เพื่อควบคุมรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก

1 การออกแบบยีนเป้าหมายสำหรับการศึกษา RNAi และการสังเคราะห์ RNA oligo เพื่อการยับยั้งราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส

1.1 ออกแบบ dsRNA ด้วย online design tool ได้แก่ โปรแกรม Block-iT RNAi Designer เพื่อออกแบบหา RNAi เป้าหมาย โดยยีนรา *C. gloeosporioides* เป้าหมายคือยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบการสร้าง membrane และการสังเคราะห์เส้นใยของรา ได้แก่ Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter และ Dicer-like protein 1 เป็นต้น

1.2 ทำการสังเคราะห์ plasmid ลูกผสม (recombinant plasmid) ที่เชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ออกแบบกับเวคเตอร์พาหะ pBluescript II SK+ และนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli DH5α* competent cell (GENTAUR, Belgium) ด้วยวิธี heat shock แล้วทำการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมโดยการเกลี่ยเชื้อ *E. coli* บนจานอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicillin) ความเข้มข้น 100 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำ colony ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ประกอบด้วยยาแอมพิซิลิน 100 µg /ml โดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- เก็บเซลล์แบคทีเรียโดย centrifuge 8,000 rpm 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (15-25°C) จากนั้นละลาย Pellet ใน 250 µl ของ buffer P1 จากนั้นย้ายไปใส่หลอด centrifuge 1.5-2 ml
- ใส่ 250 µl ของ buffer P2 จากนั้นทำการผสมโดยการคว่ำหงายหลอดประมาณ 4-6 ครั้งจนกระทั่งสารละลายใส แล้วจึงใส่ 350 µl buffer N3 แล้ว mix ทันทีโดยกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง ซึ่งจะได้สารละลายใส แล้วนำไป Centrifuge 10 นาที ที่ 13,000 rpm จะได้ pellet สีขาว
- นำส่วน supernatant 800 µl ใส่ spin column แล้ว Centrifuge 1 นาที ทิ้งส่วนที่กรองผ่านคอลัมน์ และล้าง Spin column ด้วย 750 µl buffer PE โดย Centrifuge 1 นาทีทิ้งส่วนกรองผ่านคอลัมน์ จากนั้น Centrifuge เพื่อเอา wash buffer ออกให้หมดเป็นเวลา 1 นาที ที่ 13,000 rpm
- นำ spin column ไปใส่หลอด 1.5 ml ใหม่แล้วละลายละลาย DNA ด้วย 50 µl buffer EB บ่มไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไป centrifuge 5 นาที แล้วนำไปเช็คผลโดย gel electrophoresis ใช้อัตราส่วน Dye : DNA (1:5 µl) mix

1.3 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา Polymerase chain reaction หรือ PCR เพื่อนำใช้เป็นต้นแบบ (Template) ในการผลิต RNA โดยใช้ Universal Primer T7 (5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3')

กรมวิชาการเกษตร

และ T3 (5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG -3') และทำการเตรียม Master mix และตั้งค่าอุณหภูมิเพื่อให้เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR Reaction

cDNA (5 ng/ µl)	1 µl
Forward primer (10 µM)	1 µl
Reverse primer (10 µM)	1 µl
2x GoTaq Green	12.5 µl
dH_2O	9.5 µl
Total	**25 µl**

PCR Condition

Pre – Denaturation	95°C	1 min	
Denaturation	95°C	30 sec	25 Cycles
Annealing	58°C	30 sec	
Extension	72°C	1.2 min	
Final- Extension	72°C	5 min	
Storage	4°C		

1.4 หากทำปฏิกิริยา PCR แล้วเกิดแถบ DNA หลายแถบ ควรนำเจลไปสกัดเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อนนำไปใช้เป็นต้นแบบในกระบวน *In vitro* transcription โดยการสกัดแถบ DNA จากเจลด้วยชุดสกัด QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, Germany) มีขั้นตอนดังนี้

- ตัดเจลในพื้นที่สะอาดด้วยมีดผ่าตัดที่สะอาด จากนั้นชั่งน้ำหนักเจลในหลอด 1.5 ml ใส่ buffer QG 3 เท่าของน้ำหนักเจล (100 mg = 100 µl)
- บ่มที่ 50°C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลาย จากนั้นทำการปั่นผสมด้วย Vortex ทุกๆ 2-3 นาที เพื่อช่วยให้ละลายเร็วขึ้น เมื่อเจลละลายแล้วตรวจสอบสีต้องเป็นสีเหลืองเหมือน buffer แต่ถ้าเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีม่วง ให้ใส่ 10 µl 3M Sodium acetate pH 5 แล้วผสมให้เข้ากันจนสารละลายกลายเป็นสีเหลือง
- จากนั้นใส่ Isopropanol 1 เท่าของเจล แล้วทำการปั่นผสมด้วย vortex แล้วนำตัวอย่าง 700 µl ใส่ใน spin column แล้ว centrifuge 1 นาที ทิ้งส่วนที่กรองผ่าน ถ้าตัวอย่าง >800 µl ให้ใส่ เพิ่มแล้วปั่นอีกรอบ ถ้าจะใช้ DNA ต่อเพื่อ sequencing, *In vitro* transcription หรือ microinjection ให้ใส่ 500 µl buffer QG ใน spin column แล้ว centrifuge 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำหลังกรอง
- จากนั้น wash ด้วย 750 µl buffer PE centrifuge 1 นาที จากนั้น centrifuge อีก 1 นาที เพื่อให้ washing buffer ออกจาก spin column แล้วนำ spin column ใส่หลอด 1.5 ml แล้ว Elute DNA โดยใส่ 50 µl buffer EB ไปตรงกลางของ membrane พักไว้ 1 นาที centrifuge 1 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร

1.5 ทำการสังเคราะห์ dsRNA ที่ออกแบบได้ออกมาโดยอาศัยหลักการ *In vitro* transcription เพื่อผลิต RNA oligo ของ ยีนรา *C. gloeosporioides* เป้าหมาย ด้วยชุดสังเคราะห์ TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermoscientific, Lithuania) โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ

- นำ DNA template 5 µl + DEPC 1 µl แล้วบ่มที่ 90°C เป็นเวลา 5 นาที ใส่สารเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ จากนั้นทำการปั่นผสมแล้วนำบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

In vitro Transcription Reaction

DEPC - treat water	4 µl
5x transcriptAid reaction buffer	4 µl
Mix dNTP	8 µl
DNA Template	2 µl
TranscriptAid Enz mix	2 µl
Total	**20 µl**

- จากนั้นนำหลอดที่ได้จากการบ่ม 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงมาใส่ 350 µl RW1 จากนั้นย้ายสารไปใส่ RNeasy column และ centrifuge 10,000 rmp เป็นเวลา 15 วินาที
- นำส่วนที่กรองผ่านคอลัมน์ทิ้ง นำสารผสม 80 µl ของ DNaseI 10 µl ใน 70 µl buffer RDD ใส่ใน column ให้โดน membrane จากนั้นนำไปบ่มที่ 20-30°C เป็นเวลา 15 นาที
- จากนั้นใส่ 350 µl buffer RW1 แล้วนำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งส่วนใสที่กรองผ่านคอลัมน์ แล้วใส่ 500 µl buffer RPE แล้วนำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นทิ้งส่วนใสที่กรองผ่านคอลัมน์
- จากนั้นใส่ 500 µl buffer RPE แล้วนำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอด 1.5 ml ใหม่ แล้วใส่ 30-50 µl RNase-free water แล้วบ่มเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดความเข้มข้นที่ 260 nm

3 การทดสอบประสิทธิภาพ dsRNA ที่สังเคราะห์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 ทำการเพาะเลี้ยงรา *C. gloeosporioides* ในอาหาร potato dextrose agar (PDA)

2.2 จากนั้นใช้ sterile cork borer เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากโคโลนี อายุ 14 วันวางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บริเวณที่ได้หยด dsRNA ที่ระดับความเข้มข้น 300 ng/mL ไว้ ซึ่งจะทำให้เส้นใยราสามารถสัมผัสกับ dsRNA ที่ต้องการจะทดสอบ (Culture bioassay of dsRNA)

2.3 วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย วิเคราะห์ประสิทธิภาพการควบคุมโรค (%) ตามวิธีการของอรุณและจุรีมาศ (2552) โดยใช้สูตรดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร

$$\text{ประสิทธิภาพการควบคุมโรค (\%)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่สภาวะควบคุม} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่ยับยั้งด้วย dsRNA}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่สภาวะควบคุม}} \times 100$$

2.4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวแปรโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% ($p < 0.05$) (SPSS version 20)

4 การวิเคราะห์หาความเข้มข้น dsRNA ที่มีผลต่อการควบคุมราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพ dsRNA ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides* บนผลพริก โดยการเตรียมราสามารถทำได้โดยมาเลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หรือจนกว่าราจะสร้างสปอร์ก่อนเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อให้ท่วมเส้นใยของเชื้อราและใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมขูดสปอร์ของราโรคพืชให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอยในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มานับความเข้มข้นด้วย haemacytometer และปรับความเข้มข้นให้ได้ที่ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (spore/ml) ก่อนเก็บสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้ดังกล่าวไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 นำผลพริกสุกสีแดงมาทำความสะอาดด้วยการแช่ในน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 10 นาน 5 นาที แล้วนำไปจุ่มในเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 70 นาน 1 นาที ทิ้งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นทำรอยแผลบนผิวของผลพริกด้วย cork borer ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm เพาะเชื้อราโดยใช้ปริมาณสปอร์ราที่ 1×10^6 spore/ml ปริมาตร 10 µl

3.3 นำ dsRNA ได้แก่ dsRNA-Cg, dsRNA-Pot และ dsRNA-Dcl1 ที่ระดับความเข้มข้น 300 ng/mL, 500 ng/mL และ 1,000 ng/mL มาหยดลงบนผลพริกที่ทำการปลูกเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 µl โดยใช้น้ำกลั่น sterile เป็นชุดควบคุม

3.4 บ่มพริกที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน นำผลพริกมาศึกษาระดับความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก โดยคะแนนการเกิดโรคและการคำนวณเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเกิดโรค (Disease index, %DI) ตามวิธีการของเพชรัตน์ และคณะ (2555) ดังนี้

คะแนนการเกิดโรค		ลักษณะอาการของแผล
0	คะแนน	ไม่พบรอยแผล ไม่พบการเจริญของเส้นใย
1	คะแนน	ขนาดแผล 1-2% เป็นแผลเน่ายุบ หรือแผลฉ่ำน้ำรอบๆ รอยปลูกที่เชื้อ หรือมีเส้นใยขึ้นบริเวณที่ปลูกเชื้อ
3	คะแนน	ขนาดแผล > 2-5% เป็นแผลเน่ายุบหรือแผลฉ่ำน้ำ 5%
5	คะแนน	ขนาดแผล > 5-15% ปรากฏ acervuli หรือแผลเน่ายุบ หรือมีเส้นใย 25%
7	คะแนน	ขนาดแผล > 15-25% ปรากฏแผลเน่ายุบ เส้นใย พร้อม acervuli
9	คะแนน	ขนาดแผล > 25% ปรากฏเส้นใยหรือมีกลุ่มของสปอร์เรียงเป็นวงรีรอบแผล

ศรีปัทมาการเกษตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเกิดโรค (Disease index, \%DI)} = \frac{\sum (Ni \times Vi) \times 100}{N \times V}$$

เมื่อ Ni = จำนวนผลที่แสดงการเกิดโรคในแต่ละระดับ

Vi = ระดับการเกิดโรค (1, 3, 5, 7, 9)

V = ระดับการเกิดโรคสูงสุด

N = จำนวนผลทั้งหมดที่นำมาทดสอบ

การบันทึกข้อมูล

- ค่าการดูดกลืนแสง (UV absorbance ที่ 260/280, 260/230)
- ความเข้มข้นของ DNA และ RNA
- บันทึกระดับความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก
- ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่แผล เพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างกลุ่มตัวอย่างควบคุมและกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับ dsRNA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

โครงการย่อยที่ 4 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพทางการเกษตร

กิจกรรมที่ 1 นวัตกรรมการผลิตไมโครแคปซูลโปรตีนจากแบคทีเรียบีทีเพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช

<u>การทดลองที่ 1.1</u> พัฒนาการผลิตผลึกโปรตีนจากแบคทีเรียบีทีให้มีประสิทธิภาพสูงเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2565)

1. การคัดเลือกเชื้อ B. thuringiensis คัดเลือก บีที ที่เก็บรวบรวมจากดินในประเทศไทยจำนวน 5 ไอโซเลท ที่มีการรายงานว่ามีความจำเพาะต่อหนอนผีเสื้อโดยเลี้ยงในอาหารแข็ง NA แล้วถ่ายเชื้อ 1 ไอโซเลท ลงในอาหารเหลว NB 10 ml. เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^8-10^9 cfu/ml. วัดปริมาณของเซลล์เริ่มต้นของเชื้อที่เตรียมได้ โดยนำมาทำ Serial dilution และ Spread plate บนอาหาร NA จากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนี และนำมาคำนวณหาปริมาณของเซลล์เริ่มต้น

2. การเตรียมผลึกโปรตีนบีทีจาก *B. Thuringiensis* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อบีทีในอาหาร CCY medium (Stewart et al., 1981) เขย่า 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน เก็บตะกอนโปรตีน โดยนำเชื้อมาปั่นเหวี่ยง ที่ 8,000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ตะกอนประกอบไปด้วยสปอร์และพาราสปอรัลบอดี้ ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น จากนั้นตกตะกอนด้วย 5 % lactose g/g และ acetone ทำให้แห้งเป็นผงละเอียด สามารถละลายน้ำได้ (Dulmage, Correa & Martinez, 1970) หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยจะต้องมีเซลล์ที่แตกมากกว่า 90 %

โดยแบ่งการทดลองเป็น 5 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 การใช้บีทีไอโซเลท ที่ 1

กรรมวิธีที่ 2 การใช้บีทีไอโซเลท ที่ 2

กรรมวิธีที่ 3 การใช้บีทีไอโซเลท ที่ 3

กรรมวิธีที่ 4 การใช้บีทีไอโซเลท ที่ 4

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 5 การใช้บีทีไอโซเลท ที่ 5

3. การทดสอบประสิทธิภาพของผลึกโปรตีนบีทีกับหนอนกระทู้ผักในระดับห้องปฏิบัติการ ตัดอาหารเทียมให้มีขนาดให้มีขนาด 0.5 x 0.5 x 0.5 ลูกบาศก์นิ้ว หยดสารละลายเชื้อ *B. thuringiensis* 1 ml ลงบนอาหารเทียม และไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4. การทดสอบประสิทธิภาพของผลึกโปรตีนของ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก นำผลึกที่ได้ไปทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera* spp. ที่ผลิตโดยกรมวิชาการเกษตรในการเลี้ยงด้วยอาหารเทียม การทดสอบทำโดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) แต่ละการทดลองทำจำนวน 3 ซ้ำ ใช้หนอนเจาะกระทู้ผักระยะที่ 2 จำนวน 15 ตัว จากนั้นนำอาหารที่เตรียมไว้มาใส่ในถ้วยซึ่งแต่ละถ้วยจะประกอบ ด้วยอาหาร 1 ชิ้น กับหนอน 5 ตัว หลังจากนั้นทำการสังเกต และนับจำนวนหนอนที่ตายที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วนำมาคำนวณหาการตายของหนอนอย่างแท้จริง

ดังสมการที่ 1 วิธีการของ Abbott's formula (1925) $p=c+(1-c)p'$

เมื่อ c คือ อัตราการตายของหนอนใน control

p'คือ อัตราการตายที่ได้จากการทดลอง

p คือ อัตราการตายอย่างแท้จริง

โดยแบ่งการทดลองเป็น 5 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 การใช้บีทีไอโซเลท ที่ 1

กรรมวิธีที่ 2 การใช้บีทีไอโซเลท ที่ 2

กรรมวิธีที่ 3 การใช้บีทีไอโซเลท ที่ 3

กรรมวิธีที่ 4 การใช้บีทีไอโซเลท ที่ 4

กรรมวิธีที่ 5 การใช้บีทีไอโซเลท ที่ 5

กรรมวิธีที่ 6 ควบคุม ใช้น้ำฉีดพ่น

การทดลองที่ 1.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลหุ้มผลึกโปรตีนของแบคทีเรียบีทีโดยใช้เทคนิค Encapsulation

การผลิตไมโครแคปซูล

ทำการเตรียมสูตรสารแขวนลอยเพื่อผลิตไมโครแคปซูลชนิดห่อหุ้ม microencapsulated โดยแบ่งการทดลองเป็นกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ผลึกโปรตีนของบีที + น้ำมันเมล็ดทานตะวัน + สารละลายอัลจีเนต + สารลดแรงตึงผิว

กรรมวิธีที่ 2 ผลึกโปรตีนของบีที + น้ำมันเมล็ดทานตะวัน + แป้งมันสำปะหลัง + สารลดแรงตึงผิว

กรรมวิธีที่ 3 ผลึกโปรตีนของบีที + น้ำมันเมล็ดทานตะวัน + แป้งข้าวเหนียว + สารลดแรงตึงผิว

กรรมวิธีที่ 4 ผลึกโปรตีนของบีที + น้ำมันเมล็ดทานตะวัน + แป้งข้าวโพด + สารลดแรงตึงผิว

กรรมวิธีที่ 5 ผลึกโปรตีนของบีที + น้ำมันเมล็ดทานตะวัน + ไคโตซาน + สารลดแรงตึงผิว

การทำแห้งแบบพ่น (spray drying)

นำสูตรผสมทั้งหมดมาพ่นให้แห้งโดยเทคนิคสเปรย์ดรายน์ (spray drying) ตรวจสอบลักษณะของไมโครแคปซูลที่ได้ด้วยกล้องจุลทัศน์แบบส่องกราด SEM เพื่อดูรูปร่างและวัดขนาดโมเลกุลของไมโครแคปซูลที่ผลิตได้

กรมวิชาการเกษตร

การทดสอบประสิทธิภาพของไมโครแคปซูลในระดับห้องปฏิบัติการ

นำผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลมาเลี้ยงแมลง โดยใช้หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera exigua*) ด้วยอาหารเทียมที่หยดไมโครแคปซูลสูตรต่าง ๆ ปริมาณกล่องละเท่า ๆ กัน ในกล่องเลี้ยงแมลงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว มีฝาครอบตัดอาหารเทียมให้มีขนาด 5 มิลลิเมตร ปล่อยหนอนกระทู้ผักกล่องละ 5 ตัว นับอัตราการตายที่ 7 วันหลังได้รับเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ RCBD ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ไมโครแคปซูลสูตร สารละลายอัลจีเนต
กรรมวิธีที่ 2 ไมโครแคปซูลสูตรแป้งมันสำปะหลัง
กรรมวิธีที่ 3 ไมโครแคปซูลสูตรแป้งข้าวเหนียว
กรรมวิธีที่ 4 ไมโครแคปซูลสูตรแป้งข้าวโพด
กรรมวิธีที่ 5 ไมโครแคปซูลสูตรไคโตซาน
กรรมวิธีที่ 6 การใช้น้ำกลั่น
กรรมวิธีที่ 7 การใช้ผลึกโปรตีนของบีที

<u>กิจกรรมที่ 2</u> การพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนแคปซูเลตไคติเนสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

<u>การทดลองที่ 2.1</u> เทคนิคการผลิตขยายไคติเนสจากราเมทาไรเซียมในระดับถังหมัก (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2566)

เตรียมการผลิตเอนไซม์ไคติเนส 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 อาหารเหลว 1.5 ลิตร + ไคติน 1%. +เมทาไรเซียม 1 มล. ระยะเวลา 3 วัน
กรรมวิธีที่ 2 อาหารเหลว 1.5 ลิตร + ไคติน 1%. +เมทาไรเซียม 1 มล. ระยะเวลา 5 วัน
กรรมวิธีที่ 3 อาหารเหลว 3.0 ลิตร + ไคติน 1% +เมทาไรเซียม 1 มล. ระยะเวลา 3 วัน
กรรมวิธีที่ 4 อาหารเหลว 3.0 ลิตร + ไคติน 1% +เมทาไรเซียม 1 มล. ระยะเวลา 5 วัน

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมเมทาไรเซียม (*Metarhizium anisoplae*) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทำการเก็บสปอร์ในน้ำกลั่นและนับจำนวนสปอร์ของเชื้อด้วย heamacytometer เตรียม stock 10^7 สปอร์/มล.
2. เตรียมอาหารเหลว โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และไคติน 1% เทอาหารเหลวลงใน spinner flask ขนาด 5 ลิตร ตามกรรมวิธีต่างๆ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 20 นาที
3. เมื่ออาหารเย็น ทำการใส่สปอร์ของราเมทาไรเซียม 10^7 สปอร์/มล. ในอาหารเหลวแต่ละกรรมวิธี
4. นำ spinner flask วางบนเครื่องกวน ตามระยะเวลาในแต่ละกรรมวิธี
5. นำอาหารเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบ ที่ 4 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 10 นาที
6. นำน้ำใสไปเข้าเครื่อง freeze dye เพื่อให้เอนไซม์อยู่ในรูปผง

- การบันทึกข้อมูล

1. ชั่งน้ำหนักเอนไซม์ไคติเนสที่ได้ในแต่ละกรรมวิธี
2. วัด activity ของเอนไซม์ไคติเนสในแต่ละกรรมวิธี โดยใช้ chitinase assay kit
3. ทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสแต่ละกรรมวิธีการผลิตกับหนอนกระทู้ผัก ใช้หนอน 10 ตัวต่อต่อกรรมวิธี โดยผสมไคติเนสในอาหารเทียมให้หนอนกระทู้ผักกิน เปรียบเทียบกับการผสมน้ำในอาหาร (วิธีควบคุม) บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก

กรมวิชาการเกษตร

ทำการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

1.ไคติเนสจากกรรมวิธีที่ 1

2.ไคติเนสจากกรรมวิธีที่ 2

3.ไคติเนสจากกรรมวิธีที่ 3

4.ไคติเนสจากกรรมวิธีที่ 4

5. วิธีควบคุม (น้ำ)

4. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

<u>การทดลองที่ 2.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนแคปซูเลตไคติเนสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก</u>

ศึกษาสารคงตัวในการตรึงรูปเพื่อผลิตไมโครแคปซูลไคติเนส

1. การศึกษาสารคงตัวเพื่อผลิตไมโครแคปซูลไคติเนส ตามกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้
    1. เอนไซม์ไคติเนส + แป้งข้าวเจ้า
    2. เอนไซม์ไคติเนส + แป้งข้าวโพด
    3. เอนไซม์ไคติเนส + แป้งมันสำปะหลัง
    4. เอนไซม์ไคติเนส + maltodextrin
    5. เอนไซม์ไคติเนส + เกาลีน
    6. เอนไซม์ไคติเนส + Aluminium Silicate
2. นำสูตรผสมทั้งหมดมาทำเป็นไมโครแคปซูลโดยเข้าเครื่อง spray dry
3. ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรผสมแต่ละสูตรกับหนอนกระทู้ผัก โดยใช้หนอนกระทู้ผักวัย 2 ที่อดอาหาร 24 ชั่วโมง กินอาหารที่มีเอนไซม์ไคติเนสในกรรมวิธีต่างๆ
    1. เอนไซม์ไคติเนส + แป้งข้าวเจ้า
    2. เอนไซม์ไคติเนส + แป้งข้าวโพด
    3. เอนไซม์ไคติเนส + แป้งมันสำปะหลัง
    4. เอนไซม์ไคติเนส + maltodextrin
    5. เอนไซม์ไคติเนส + เกาลีน
    6. เอนไซม์ไคติเนส + Aluminium Silicate
    7. เอนไซม์ไคติเนส (จากการเขย่า 3 วัน)
    8. เอนไซม์ไคติเนส (จากการเขย่า 5 วัน)
    9. วิธีควบคุม
4. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

    บันทึกข้อมูล

    -ขนาดความยาว น้ำหนักของหนอนกระทู้ผัก ก่อนและหลังได้รับเอนไซม์ไคติเนส

    -เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักทุก 24 ชม.

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 3 การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์เพคติเนสควบคุมโรคพืช (ปี 2565-2567)

การทดลองที่ 3.1 การพัฒนาการผลิตขยายเพคติเนสจากราไตรโคเดอร์มาในระดับถังหมัก (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2566)

เลี้ยงเชื้อราไตรโคเดอร์มา TC1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 1%เพคติน, 0.25%โปแตสเซียมไนเตรต, 0.1%ไดโปแตสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) และ 0.05%แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) (พีเอช 5.0) (ดัดแปลงจาก Mahmood and Rahman 2008, Bhale and Rajkonda 2012; Phutela *et al*., (2005))

1. ดูดอาหารเหลวปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อนาน ชั่วโมง เพื่อผลิตเอนไซม์เพคติเนสในอาหารเหลว นำอาหารเหลวผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยความเย็น หรือ Freeze Dry (BUCHI, GERMANY)
2. ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไฟทอปธอร่าที่แยกได้จากกล้วยไม้ เก็บสารละลายสปอร์ที่สกัดเตรียมได้จากเชื้อไฟทอปธอร่าที่เก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อเชื้อในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเอียง (slant agar) และจานอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ
3. ทดสอบประสิทธิภาพการกระตุ้นความต้านทานโรคเน่าดำในกล้วยไม้ โดยการพ่นเอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร, 10 กรัมต่อลิตร, 15 กรัมต่อลิตร, เชื้อไฟทอปธอร่า และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บนใบกล้วยไม้ให้ทั่วโดยใช้ขวดพลาสติกฉีดพ่น เก็บรักษาเอนไซม์ที่เหลือที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
4. ในเบื้องต้น กรรมวิธีทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เพคติเนสต่อการกระตุ้นความต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคที่เกิดจากราไฟทอปธอร่ากล้วยไม้ในโรงเรือนทดลองดังต่อไปนี้

ปลูกกล้วยไม้ในกระถางขนาดเล็ก 10 กระถางๆ ละ 1 ต้น ทดสอบเอนไซม์ด้วยการปลูกเชื้อต้นละ 4 ใบ 5 กรรมวิธี ได้แก่ กรรมวิธีที่ 1 พ่นเอนไซม์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ต่อเนื่อง 7 วันก่อนปักชิ้นวุ้นเส้นใยของราไฟทอปธอร่าบนใบกล้วยไม้

กรรมวิธีที่ 2 พ่นเอนไซม์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ต่อเนื่อง 7 วันก่อนปักชิ้นวุ้นเส้นใยของราไฟทอปธอร่าบนใบกล้วยไม้

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเอนไซม์ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ต่อเนื่อง 7 วันก่อนปักชิ้นวุ้นของเส้นใยราไฟทอปธอร่าบนใบกล้วยไม้

กรรมวิธีที่ 4 ปักชิ้นวุ้นเส้นใยราไฟทอปธอร่าบนใบกล้วยไม้

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยน้ำกลั่น

บันทึกขนาดรอยโรค จำนวนต้นหรือใบกล้วยไม้ที่เกิดรอยโรค

5. แบ่งระดับความรุนแรงของโรคออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0 = ไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 1 = แสดงอาการของโรค (จำนวนต้นที่ตาย) 1-25% ของจำนวนต้น/ใบทั้งหมด

ระดับ 2 = แสดงอาการของโรค (จำนวนต้นที่ตาย) ระหว่าง 26-50% ของจำนวนต้น/ใบทั้งหมด

ระดับ 3 = แสดงอาการของโรค (จำนวนต้นที่ตาย) ระหว่าง 51-75% ของจำนวนต้น/ใบทั้งหมด

ระดับ 4 = แสดงอาการของโรค (จำนวนที่ตาย) ระหว่าง 76-100% ของจำนวนต้น/ใบทั้งหมด

6. บันทึกผลเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการกระตุ้นความต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคที่เกิดจาก *Phytophthora* ของกล้วยไม้ในระดับโรงเรือนทดลอง (ปีการทดลอง 2567)
7. สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

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

❑ เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

❑ เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 3 ผลการศึกษา

3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

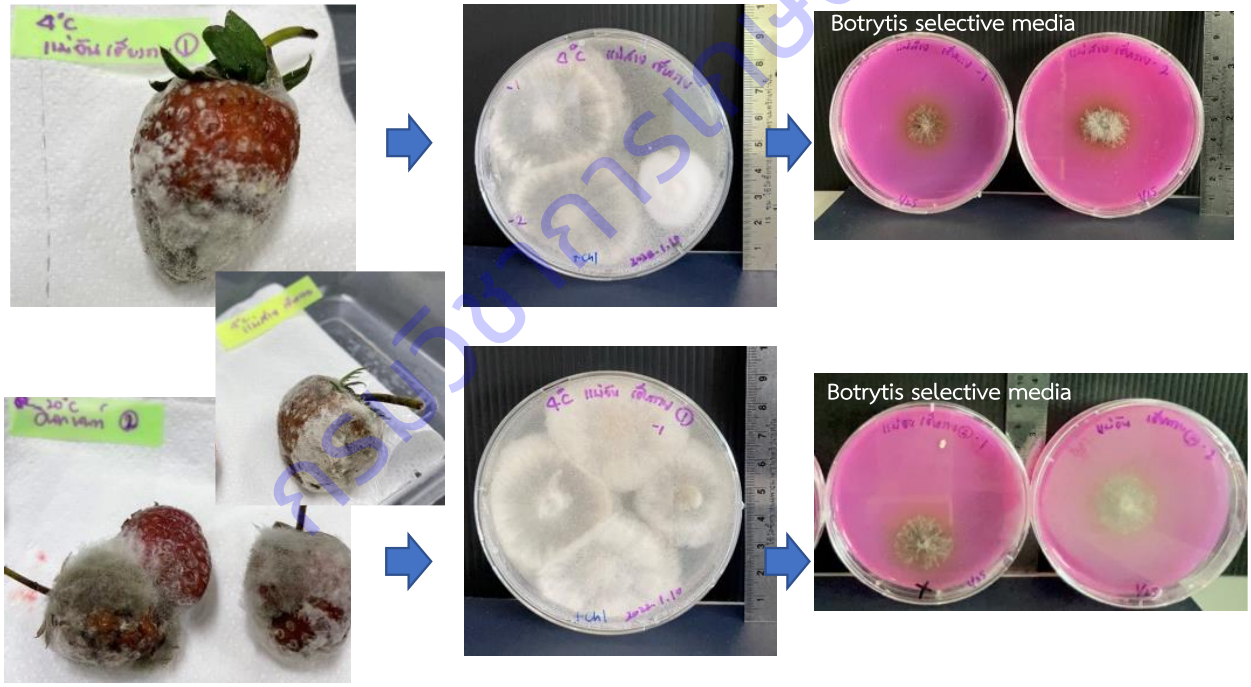
สรุปผลการดำเนินงานที่ทำได้จริง โดยให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของโครงการ (สรุปภาพรวมของโครงการ)

โครงการย่อยที่ 1 การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

<u>กิจกรรมที่ 1</u> เทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพกรดแอบไซซิกจากจุลินทรีย์

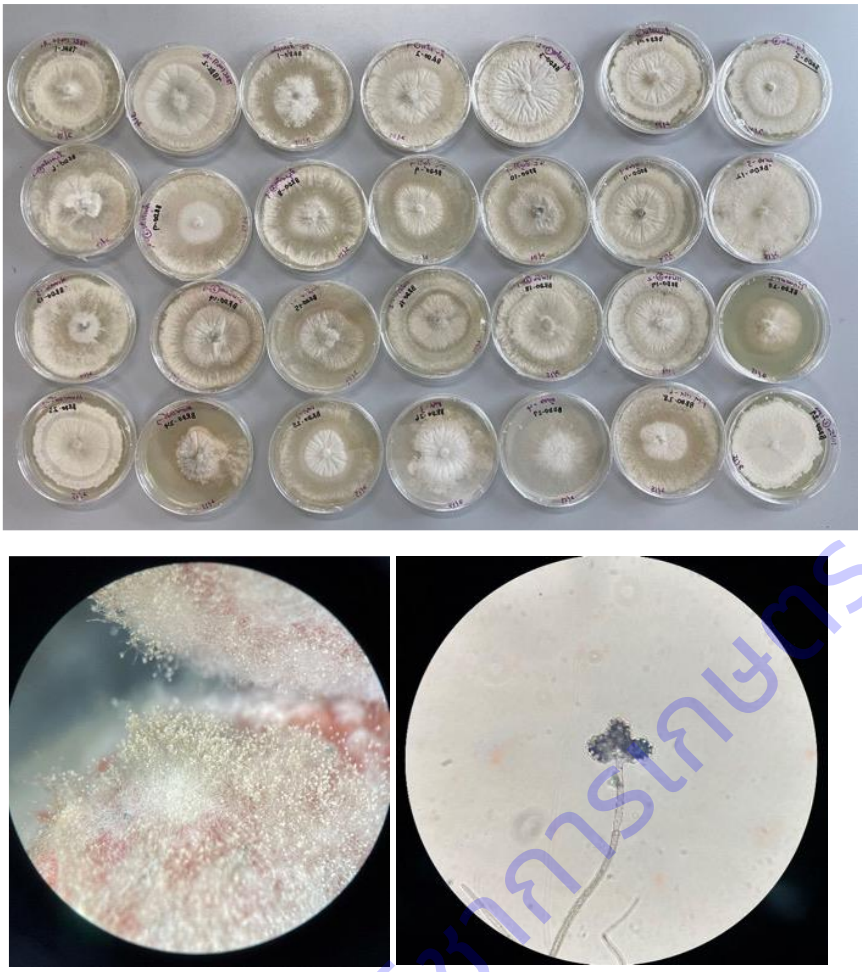
การทดลองที่ 1.1 การศึกษาจุลินทรีย์ผลิตกรดแอบไซซิกเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

ระหว่างช่วงเดือนธันวาคม ปี 2564 ถึงมีนาคม ปี 2565 รวบรวมเชื้อราจากสตรอเบอรี่ที่มีอาการเน่าเสียจากราสีเทา และจำแนกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการทำปฏิกิริยา Tannic acid oxidation โดยใช้ Botrytis Selective Media (Edwards and Seddon, 2001) (ภาพที่ 1-1) ได้เชื้อรา *Botrytis* จำนวน 35 ไอโซเลท สำหรับนำไปวิเคราะห์ลักษณะทางชีวโมเลกุลและทดสอบการผลิตกรดแอบไซซิก (ภาพที่ 1-2, 1-3)



ภาพที่ 1-1 ขั้นตอนการเก็บรวบรวมและจำแนกเชื้อราสีเทาจากสตรอเบอรี่ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ Botrytis Selective Media

ศูนย์วิทยทรัพยากร



Candidate Name	Origin
TBRC-1	TBRC 10650
TBRC-2	TBRC 10651
BRDO-1	Dec สี่มุมเมือง
BRDO-2	สี่มุมเมือง1-1
BRDO-3	สี่มุมเมือง1-2
BRDO-4	สี่มุมเมือง2-1
BRDO-5	สี่มุมเมือง2-2
BRDO-6	สี่มุมเมือง2-3
BRDO-7	สี่มุมเมือง2-4
BRDO-8	สี่มุมเมือง2-5
BRDO-9	20c ธัญสิริ-1
BRDO-10	4c ธัญสิริ-1
BRDO-11	มูเซอ-1
BRDO-12	มูเซอ-5
BRDO-13	ทุ่งหลวง โครงการหลวง-5
BRDO-14	อินทนนท์2-1
BRDO-15	แม่สาย เชียงราย1
BRDO-16	แม่สาย เชียงราย2
BRDO-17	แม่จัน เชียงราย1
BRDO-18	แม่จัน เชียงราย2-1
BRDO-19	แม่จัน เชียงราย2-2
BRDO-20	ไร่กนกพร สะเมิง2
BRDO-21	เกษตรหลวงอ่างขาง3
BRDO-22	เกษตรหลวงอ่างขาง3
BRDO-23	เกษตรแฟร์2
BRDO-24	เกษตรแฟร์3
BRDO-25	พี่เอ็ม ตาก1
BRDO-26	พี่เอ็ม ตาก3
BRDO-27	พี่เอ็ม ตาก4
BRDO-28	พี่เอ็ม ตาก6
BRDO-29	แม่จัน เชียงราย-3
BRDO-31	**4c อ่างขาง 1**
BRDO-32	**4c อ่างขาง 2**
BRDO-33	**4c ไร่กนกพร**
BRDO-34	**4c เกษตรแฟร์ 1**
BRDO-35	**4c เกษตรแฟร์ 2**
BRDO-36	**24 มีค 4c มูเซอ-1**
BRDO-37	**24 มีค 4c มูเซอ-2**

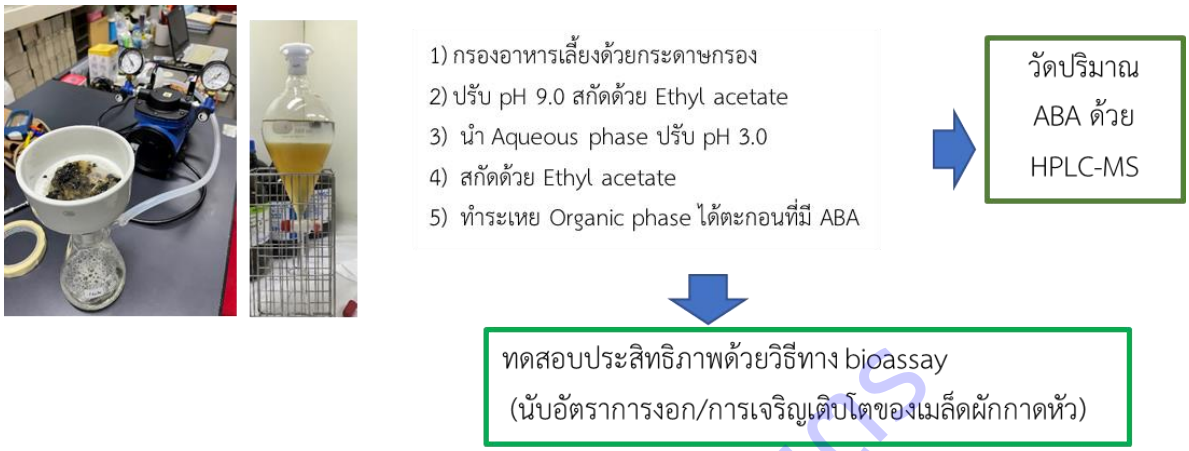
ภาพที่ 1-2 ภาพตัวอย่างลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสีเทาที่จำแนกได้

Candidate isolations	Blast result (ITS4)
BRDO-3	*Botrytis cinerea*
BRDO-8	*Botrytis cinerea*
BRDO-23	*Botrytis cinerea*
BRDO-26	*Botrytis cinerea*
BRDO-28	*Botrytis cinerea*
BRDO-29	*Botrytis cinerea*
BRDO-32	*Botrytis cinerea*

ภาพที่ 1-3 ข้อมูลทางชีวโมเลกุลจากการวิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วนของ 18S rDNA ของเชื้อราสีเทาที่จำแนกได้

กรมวิชาการเกษตร

จากนั้น นำเชื้อราสีเทาทั้งหมดข้างต้น ไปเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลว PDB 50 mL ศึกษาวิธีการสกัดกรดแอบไซซิกจากอาหารเหลวเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแอบไซซิก พบว่าการปรับ pH และใช้ Ethyl acetate เหมาะสมกับการสกัดแบบหยาบและกำจัดน้ำตาลได้ดี (ภาพที่ 1-4)



ภาพที่ 1-4 ขั้นตอนการสกัดกรดแอบไซซิก (ABA) จากอาหารเหลวแบบหยาบเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-MS

เมื่อนำสารสกัดแบบหยาบจากอาหารเลี้ยงข้างต้น กรองด้วย Nylon membrane filter 0.22 µm เติมน้ำที่มีส่วนผสมของ Methanol 1:1 ปริมาตร 1 mL ละลายตะกอนและนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแอบไซซิก (ABA) ด้วยเครื่อง HPLC-MS (SIM mode; m/z 263.15) พบว่ามีเชื้อรา *Botrytis* จำนวน 18 ไอโซเลทสามารถผลิต ABA ได้

ตารางที่ 1-1 ปริมาณ ABA ในอาหารเลี้ยง 50 mL ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC-MS

samples	conc. (ng/mL)	samples	conc. (ng/mL)	samples	conc. (ng/mL)
BRDO-2	7.294	BRDO-15	3.324	BRDO-28	1.408
BRDO-3	42.520	BRDO-18	11.73	BRDO-31	3.481
BRDO-5	4.4372	BRDO-21	37.740	BRDO-32	54.418
BRDO-6	53.860	**BRDO-23**	**84.607**	BRDO-33	9.417
BRDO-8	48.560	BRDO-24	5.750	BRDO-34	1.382
BRDO-14	5.917	BRDO-27	5.669	BRDO-35	6.505

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณ ABA สามารถคัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิตสูงสุด 1 ไอโซเลท ได้แก่ BRDO-23 สำหรับนำมาศึกษาปัจจัยการเลี้ยงเพื่อการผลิตกรดแอบไซซิกต่อไป

ในส่วนการศึกษาประสิทธิภาพของ ABA จากอาหารเลี้ยงเชื้อราในการยับยั้งการงอกของเมล็ดหัวผักกาด ได้ทดลองนำอาหารเลี้ยงเชื้อรา 5 ไอโซเลท ได้แก่ BRDO-3, BRDO-23, BRDO-26, BRDO-29 และ BRDO-32 มาสกัดแบบหยาบและละลายตะกอนในน้ำ 10 มิลลิลิตร เทลงบนจานพลาสติกที่มีเมล็ดหัวผักกาด บ่มไว้ที่สภาพมืด อุณหภูมิ 30 °C และนับอัตราการงอกของเมล็ด ผลการทดลองพบว่า อาหารเลี้ยงสกัดหยาบจาก BRDO-3 และ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

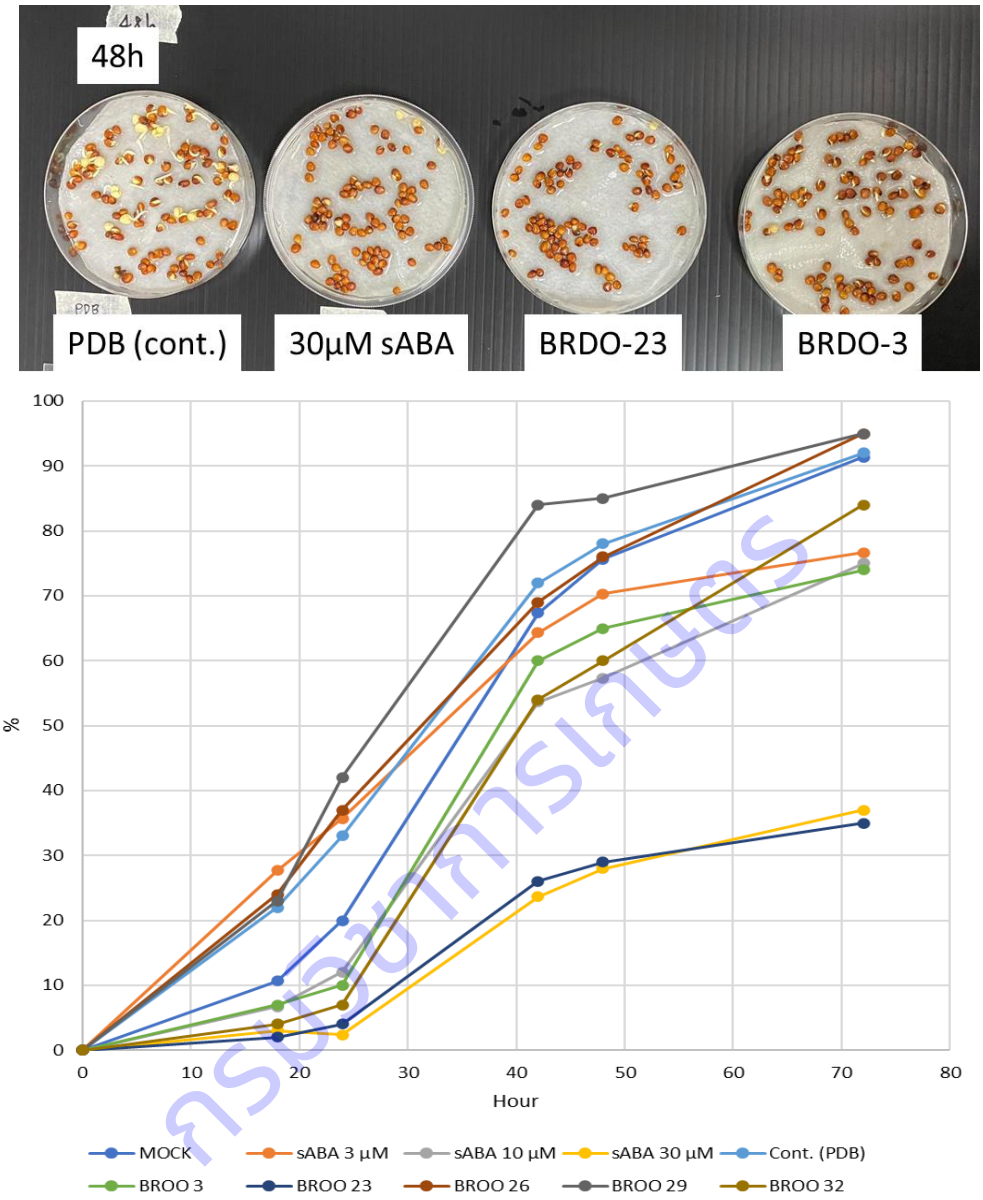
BRDO-23 มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของเมล็ดหัวผักกาดอยู่ที่ประมาณ 30% และ 60% ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรดแอบไซซิกบริสุทธิ์ (s-ABA) พบว่ามีปะสิทธิภาพใกล้เคียงกับ s-ABA ที่ความเข้มข้น 3 µM และ 10 µM ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1-2 (ภาพที่1-5)

ตารางที่ 1-2 อัตราการงอกของเมล็ดหัวผักกาดในระยะ 72 ชั่วโมง (%)

sample	Time (h)					
	0	18	24	42	48	72
MOCK	0	11	20	67	76	91
sABA 3 µM	0	28	36	64	70	77
sABA 10 µM	0	7	12	54	57	75
sABA 30 µM	0	3	2	24	28	37
Cont. (PDB)	0	22	33	72	78	92
BROO-3	0	7	10	60	65	74
BROO-23	0	2	4	26	29	35
BROO-26	0	24	37	69	76	95
BROO-29	0	23	42	84	85	95
BROO-32	0	4	7	54	60	84

3 ซ้ำ ; 100 เมล็ด/ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร

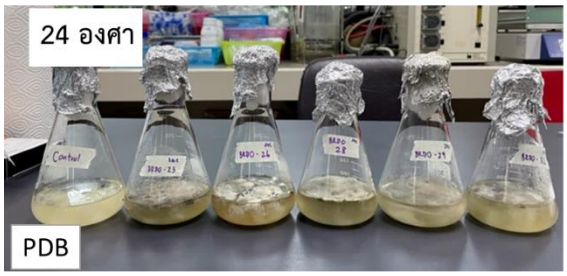


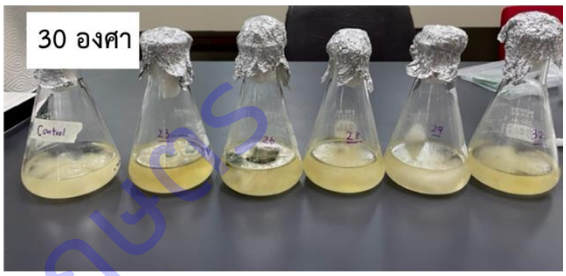
ภาพที่ 1-5 รูปภาพตัวอย่างเมล็ดหัวผักกาดและกราฟแสดงอัตราการงอกของเมล็ดหัวผักกาด

กรมวิชาการเกษตร

ในส่วนการศึกษาปัจจัยการเลี้ยงเชื้อรา *Botrytis* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ABA ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

(1) อุณหภูมิ : จากรายงานในต่างประเทศพบว่าเชื้อรา *Botrytis cinerea* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิระหว่าง 20 - 25°C (Ciliberti *et al*., 2015) เนื่องจากสภาพอากาศของบริเวณภาคกลางประเทศไทยซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ที่ 28 -30°C การเลี้ยงเชื้อรา *B.cinerea* จึงต้องใช้เครื่องปรับอากาศหรือตู้บ่มที่สามารถควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา 6 isolates ที่จำแนกได้ในอุณหภูมิ 24°C และ 30°C พบว่าเชื้อราทั้ง 6 isolates เจริญเติบโตได้ดีที่ 24°C และไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 30°C ดังตารางที่ 2 (ภาพที่ 1-6)





Mycerium dry weight (g)

Sample	24C	30C
BRDO-29	0.286	0
BRDO-32	0.278	0
BRDO-28	0.288	0
BRDO-23	0.264	0
BRDO-26	0.405	0.199

24°C	
Sample	ABA conc. (ng/mL)
BROD-3	28.77442
BROD-23	289.1721
BROD-26	1.56266
BROD-28	0.20039
BROD-29	1.08079
BROD-32	0.88283

30°C	
Sample	ABA conc. (ng/mL)
BROD-3	0.8825
BROD-23	0.5823
BROD-26	0.97546
BROD-28	0.37515
BROD-29	0.39775
BROD-32	0.35201

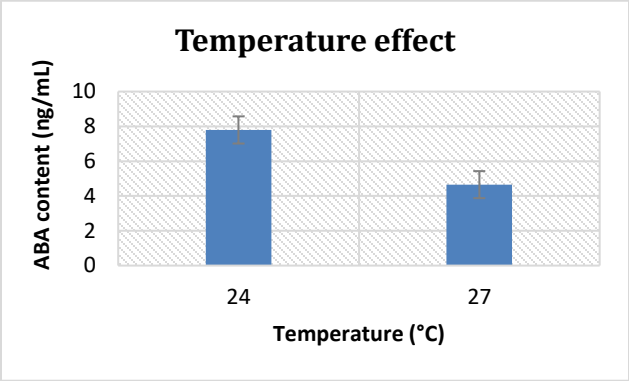
ภาพที่ 1-6 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการผลิต ABA ของเชื้อรา *B.cinerea* สายพันธุ์ที่จำแนกได้

กรมวิชาการเกษตร

นอกจากนี้ เมื่อนำไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิตสูงสุด BRDO-23 มาเลี้ยงเปรียบเทียบในอุณหภูมิ 24°C และ 27°C พบว่าที่อุณหภูมิ 24°C เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการผลิต ABA มากกว่าที่ 27°C (ภาพที่ 1-7)

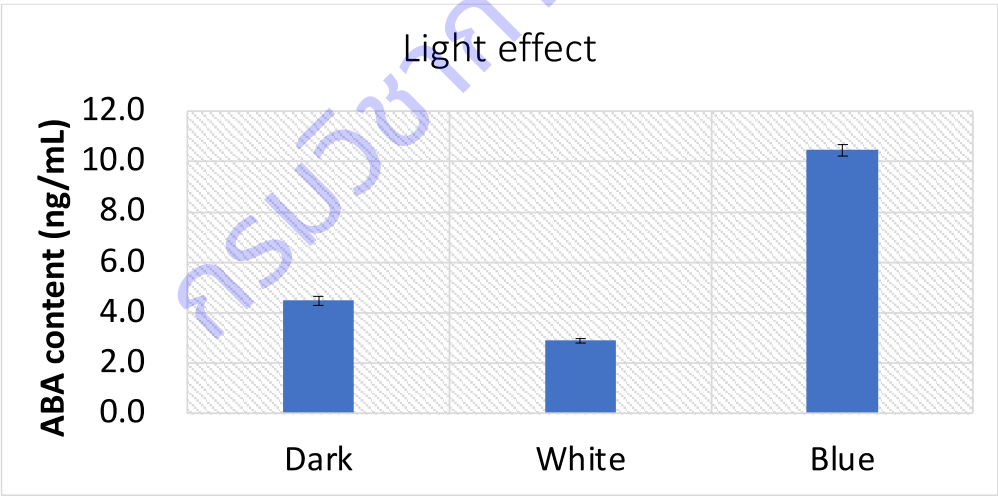
Sample	mycelium dry weight (g)
24 °C (1)	0.23
24 °C (2)	2.72
24 °C (3)	0.83
24 °C (4)	0.81
24 °C (5)	0.35
average	0.99

Sample	mycelium dry weight (g)
27 °C (1)	0.46
27 °C (2)	0.03
27 °C (3)	0.43
27 °C (4)	0.56
27 °C (5)	0.63
average	0.42



ภาพที่ 1-7 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการผลิต ABA

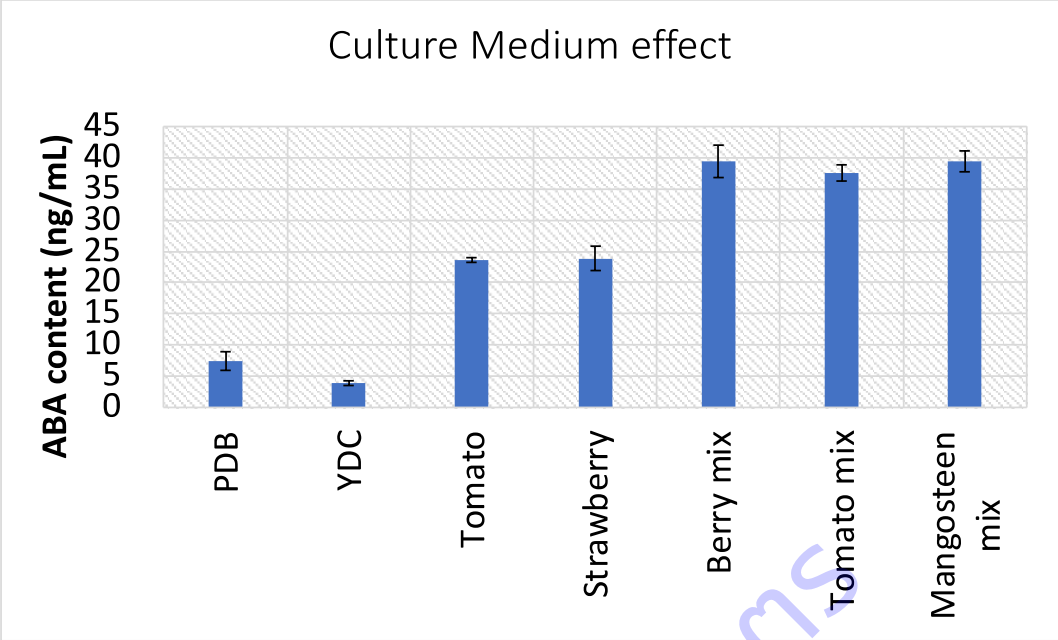
(2) แสง : จากการเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท BRDO-23 ในสภาพที่มืด เปรียบเทียบกับในสภาพแสงสีขาวและสภาพแสงสีฟ้า เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าการให้**แสงสีฟ้า** สามารถกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิกได้ปริมาณมากกว่าเลี้ยงในที่มืดประมาณ 2 เท่า ทั้งนี้ยังพบว่าปริมาณ ABA ที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยงภายใต้แสงสีขาวมีปริมาณน้อยที่สุด (ภาพที่ 1-8)



ภาพที่ 1-8 ผลกระทบของแสงต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการผลิต ABA

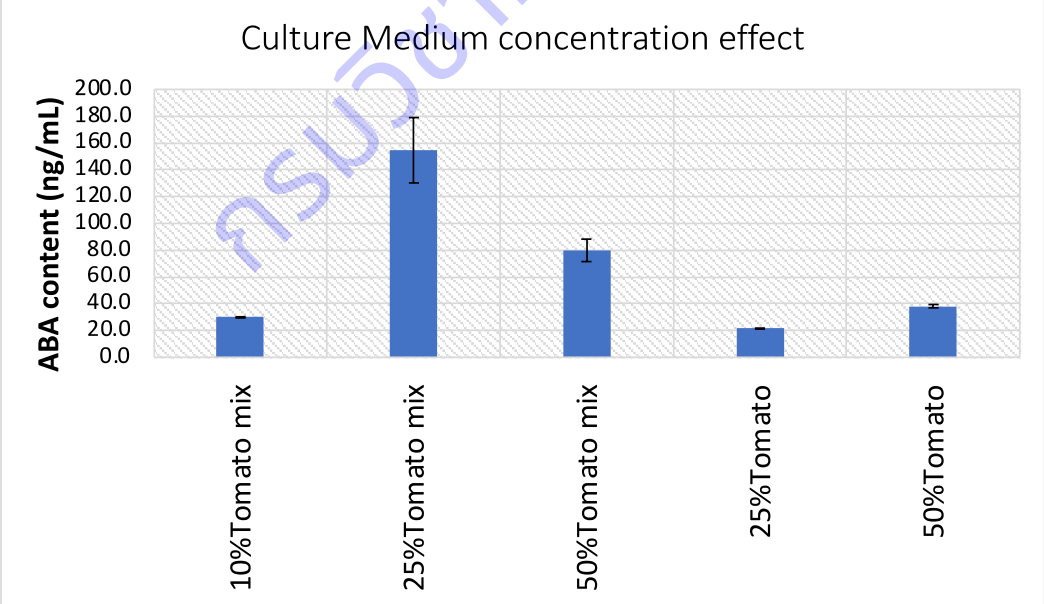
(3) อาหารเลี้ยง : จากรายงานในต่างประเทศพบว่าเชื้อรา *B. cinerea* เจริญเติบโตได้ดีในผลไม้ที่ผนังเซลล์มีปริมาณ pectin สูง (Boddy L., 2016) จากการศึกษาการกระตุ้นการผลิต ABA โดยใช้น้ำผลไม้ชนิดต่างๆ พบว่าน้ำผลไม้รวม (Berry mix, Tomato mix, Mangosteen mix) สามารถกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิกได้ดีกว่า PDB (ภาพที่ 1-9)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1-9 ผลกระทบของชนิดอาหารเลี้ยงต่อปริมาณการผลิต ABA

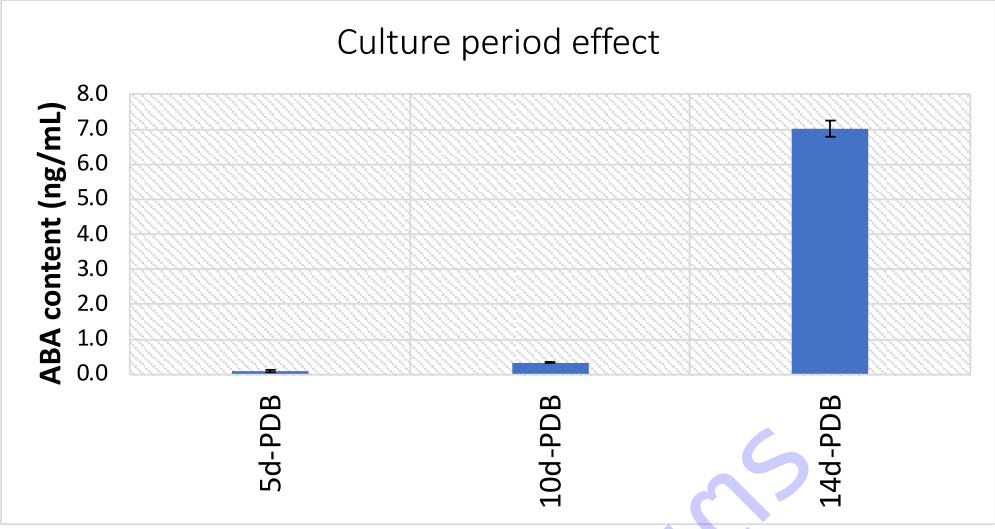
นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มข้นของน้ำผลไม้ในอาหารเลี้ยง พบว่าเมื่อผสมน้ำมะเขือเทศผสมน้ำผลไม้ (Tomato mix) 98% ต่อน้ำ ที่อัตราส่วน 1 : 4 หรือที่ความเข้มข้น 25% สามารถกระตุ้นการผลิต ABA ได้มากที่สุด (ภาพที่ 1-10)



ภาพที่ 1-10 ผลกระทบของความเข้มข้นของน้ำผลไม้ในอาหารเลี้ยงต่อปริมาณการผลิต ABA

กรมวิชาการเกษตร

(4) ระยะเวลาในการเลี้ยง : เมื่อเลี้ยงเชื้อราในน้ำมะเขือเทศผสมน้ำผลไม้ตามปัจจัยข้างต้น พบว่าเชื้อรามีการผลิตกรดแอบไซซิกตั้งแต่วันที่ 10 และเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 14 ของการเลี้ยง (ภาพที่ 1-11)

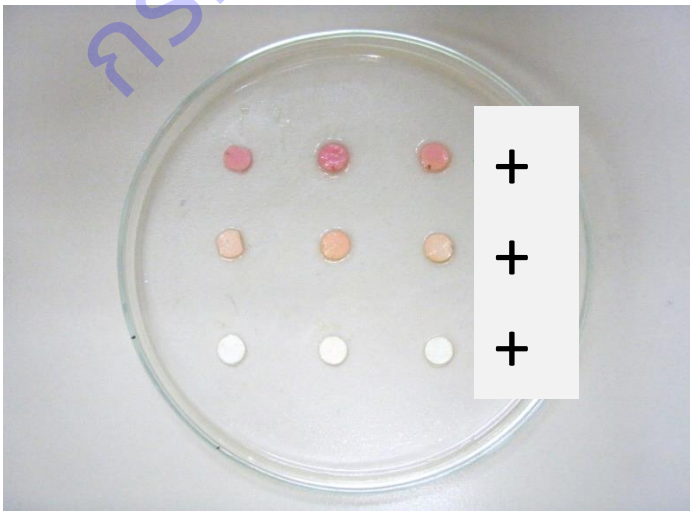


ภาพที่ 1-11 ผลกระทบของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อราต่อปริมาณการผลิต ABA

<u>กิจกรรมที่ 2</u> การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพกรดอินโดลแอซีติกจากจุลินทรีย์

1. การศึกษาและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตกรดอินโดลแอซีติก (indole acetic acid; IAA)

1.1 รวบรวมเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติก (indole acetic acid; IAA) จากแหล่งต่างๆ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติก พบว่า เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์และเปรียบเทียบการผลิตสาร IAA ในเชิงคุณภาพโดยวิธี Bioassay plate technique (ภาพที่ 1-12) สามารถคัดเลือกได้เชื้อแบคทีเรียทั้งสิ้น 42 ไอโซเลท เพื่อนำมาวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไป



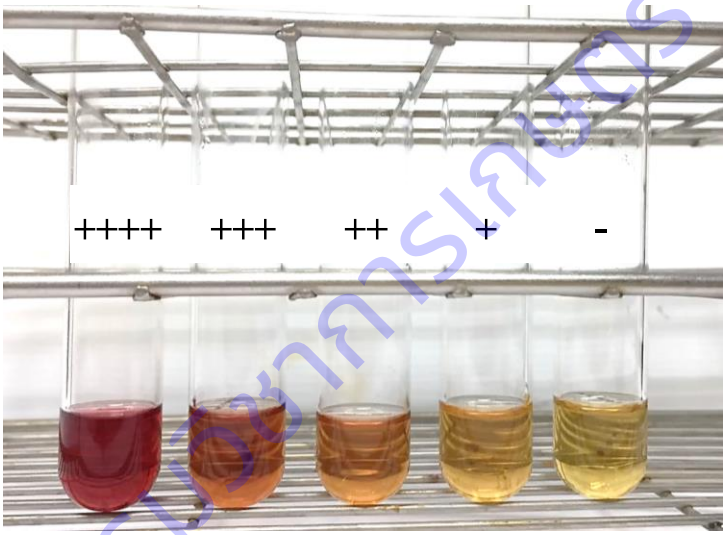
ภาพที่ 1-12 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ทดสอบการสังเคราะห์ IAA โดยใช้สารตั้งต้น tryptophan

กรมวิชาการเกษตร

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลแอซีติกจากเชื้อแบคทีเรีย

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติก โดยการนำเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 42 ตัวอย่าง ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.1 นำไปเลี้ยงทดสอบในอาหารเหลว LB broth ที่เติม 5 mM L-Tryptophan เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืดนาน 48-72 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลาย Salkowski reagent จากสีเหลืองเป็นสีแดง-ชมพู สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียได้ 12 ไอโซเลท (ภาพที่ 1-13)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดอินโดลอะซิติกด้วยสารละลาย Salkowski reagent เมื่อบ่มเชื้อแบคทีเรียในที่มืด 72 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติก ได้ในปริมาณสูงกว่า 48 ชั่วโมง โดยสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการกรดอินโดลแอซีติกได้ดี ในระดับ +++ และ ++++ จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลท IAA-16, IAA-17, IAA-25, IAA-32 และ IAA-00 ดังตารางที่ 1-3



ภาพที่ 1-13 การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกจากเชื้อแบคทีเรีย ด้วยสารละลาย Salkowski reagent เมื่อบ่มเชื้อแบคทีเรียในที่มืด 72 ชั่วโมง

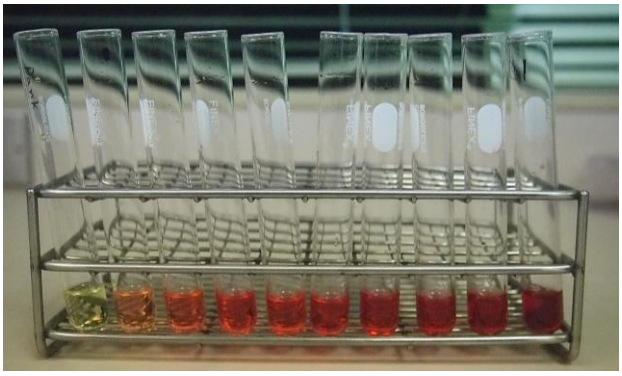
กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1-3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลแอซีติกจากเชื้อแบคทีเรีย

ไอโซเลท	ผลการทดสอบ	
	48 hr.	72 hr.
IAA-00	+	+++
IAA-5	+	++
IAA-12	++	++
IAA-16	+++	++++
IAA-17	++	+++
IAA-19	+	++
IAA-21	+	+
IAA-25	++	+++
IAA-29	+	+
IAA-32	++	+++
IAA-36	+	++
IAA-43	+	++

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลแอซีติกด้วยวิธี spectrophotometer

ผลการตรวจวิเคราะห์และเปรียบเทียบการผลิตกรดอินโดลแอซีติกในเชิงปริมาณด้วยวิธี spectrophotometer ตามวิธี Salkowski colorimetric technique ของ Glickmann and Dessaux (1995) แล้วบ่มในที่มืด 2 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยสีของสารละลาย Salkowski reagent เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง เมื่อวัดค่าปฏิกิริยาด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 530 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ของสารละลายมาตรฐาน 3-Indoleacetic acid (IAA) ที่มีความเข้มข้น 0-90 ug/ml ดังภาพที่ 1-14



ภาพที่ 1-14 การเปลี่ยนสีของสารละลายมาตรฐาน 3-Indoleacetic acid (IAA) ที่มีความเข้มข้น 0-90 ug/ml เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย Salkowski reagent

กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบการผลิตกรดอินโดลแอซีติก พบว่า ของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้ดี โดยเมื่อบ่มเชื้อครบ 240 ชั่วโมง สามารถผลิตได้สูงที่สุด คือ ไอโซเลท IAA-32 มีค่าการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติก เท่ากับ 384 ug/ml รองลงมา คือ IAA-17, IAA-25, IAA-16 และ IAA-00 ค่าการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติก เท่ากับ 377, 351.1, 308.4 และ 275.9 ug/ml ดังตารางที่ 1-4

2. การศึกษาสภาวะปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตกรดอินโดลแอซีติก

2.1 ศึกษาชนิดและองค์ประกอบของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงจากแหล่งที่มีปริมาณอินทรีย์สารหรือโปรตีนสูง เพื่อหาแหล่งวัสดุที่เหมาะสมในการใช้ทดแทนสาร Tryptophan ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาเพื่อการสังเคราะห์ให้ได้ผลผลิตกรดอินโดลแอซีติก ได้แก่ ถั่วเหลือง รำข้าว ไข่แดง กล้วยหอม กล้วยน้ำว้า เปรียบเทียบกับ Tryptophan โดยผสมวัสดุตั้งต้นในอาหารเหลว Minimal *Medium* เลี้ยงนาน 7-10 วัน ตรวจวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย บันทึกผลการทดสอบหลังจากหยดสารละลาย Salkowski reagent 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มในที่มืด 2 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร พบว่า อาหาร Minimal + กล้วยน้ำหว้า 30 g/L +tryptophan 20 ml/L มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ดี ดังตารางที่ 1-5

2.2 ศึกษาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลอะซิติกที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีองค์ประกอบของ Tryptophan ตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร วัดการเจริญเติบโตของเซลล์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer พบว่า ที่อุณหภูมิ 35-40 องศาสเซลเซียส มีผลต่อการเจริญเติบโต และแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์กรดอินโดลอะซิติกได้ดีกว่าอุณหภูมิ 30 องษสเซลเซียส ดังตารางที่ 1-6

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล วิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วนของ ribosomal RNA gene นำลำดับนิวคลิอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ ดังตารางที่ 1-7

อย่างไรก็ตามการสกัดแยกกรดอินโดลอะซิติกออกจากอาหารเพื่อให้มีความบริสุทธ์ยิ่งขึ้น ด้วยวิธีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง และใช้สารละลาย Ethyl acetate (ภาพที่ 1-15)

อาหารเหลว+tryptophan อาหารเหลว+tryptophan+กล้วย กรองตะกอนเซลล์ออก สกัดกรดอินโดลอะซิติก

ภาพที่ 1-15 กรรมวิธีการผลิตกรดอินโดลแอซีติกและการสกัดสารให้บริสุทธิ์

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1-4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตกรดอินโดลอะซิติกของเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก (ug/ml)								
	48 hr.	72 hr.	96 hr.	120 hr.	144 hr.	168 hr.	192 hr.	216 hr.	240 hr.
IAA-16	29.75	89.88	193	226	260	260	250	277.2	308.4
IAA-17	10.73	50.28	140	210	220	290	300	356.7	377.0
IAA-25	8.604	43.72	103	188	250	290	300	329.0	351.1
IAA-32	35.42	150	255	292	290	290	320	347.2	384.0
IAA-00	15.099	22.57	67.87	97.66	114.7	153.94	186.28	229.2	275.9

ตารางที่ 1-5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณการสังเคราะห์กรดอินโดลอะซิติกในอาหารสูตรต่างๆ

ไอโซเลท	ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก (ug/ml)						
	Minimal medium + 2.5mM tryptophan	Minimal medium + 5mM tryptophan	Minimal medium +2.5mM tryptophan +กล้วยน้ำหว้า 30 g/L	Minimal medium + กล้วยหอม 30 g/L	Minimal medium + ถั่วเหลือง 10 g/L	Minimal medium + รำข้าว 10 g/L	Minimal medium + ไข่แดง 10 ml/L
IAA-16	185.7	361.5	310.5	293.1	11.63	18.65	24
IAA-17	110.6	284.5	397.3	313.8	6.929	9.511	74.4
IAA-25	205.1	337.2	417.9	227.1	13.80	12.06	81.80
IAA-32	147.02	347.02	133.84	168.26	13.24	21.05	133
IAA-00	105.9	298.11	441.6	289.9	15.00	17.68	28.43

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1-6 การเปรียบเทียบสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดอินโดลแอซีติก

ไอโซเลท	IAA (µg/ml.)			การเจริญเติบโตของเซลล์ (OD_{600})		
	30 °C	35°C	40°C	30°C	35°C	40°C
IAA-16	485.9	458.8	729.8	1.304	1.042	1.152
IAA-17	474.0	489.1	484.1	1.26	1.286	1.226
IAA-25	474.9	711.2	711.8	1.17	0.968	1.2
IAA-32	466.7	441.6	749.2	1.124	1.07	1.156
IAA-00	462.6	489.0	725.2	1.25	0.8	1.166

ตารางที่ 1-7 ผลการจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยเทคนิคชีวโมเลกุล

ไอโซเลท	สปีชีส์	เปอร์เซ็นต์ Identity	Accession Number
IAA-16	*Enterobacter* sp.	100	MK600539.1
IAA-17	*Bacillus* sp.	99	KT981881.1
IAA-25	*Lysinibacillus macroides*	100	MT071730.1
IAA-32	*Bacillus megaterium*	99	GU125638.1
IAA-00	*Bacillus* sp.	99	EU912460.1

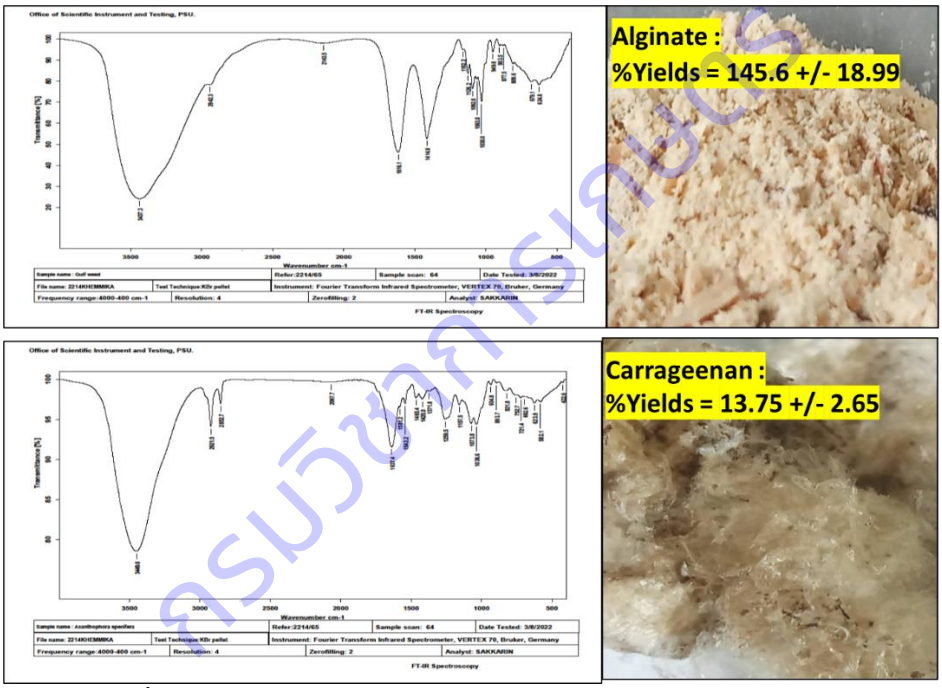
กรมวิชาการเกษตร

โครงการย่อยที่ 2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารกระตุ้นชีวภาพจากสาหร่ายเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของพืชตามแนวทางทำเกษตรอย่างยั่งยืน

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาศักยภาพของสารชีวภาพจากสาหร่ายในการกระตุ้นการสร้างสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและความแข็งแรงภายในต้นพริก

ผลการดำเนินการเป็นไปตามแผนการดำเนินงานตามลำดับตั้งแต่กระบวนการเตรียมผลิตสารชีวภาพ การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี การนำสารชีวภาพมาทดสอบกับต้นพริก ดังนี้

1. ได้เก็บรวบรวมสาหร่ายทุ่นและสาหร่ายมงกุฎหนาม จาก จ.สงขลา จ.เพชรบุรี จ.ภูเก็ต และ จ.ชุมพร โดยสามารถเก็บสาหร่าย 2 ชนิด นำมาสกัดและผลิตเป็นสารชีภาพต้นแบบระดับห้องปฏิบัติการจำนวน 2 ชนิดสาร ได้แก่ สารชีวภาพอัลจีเนต และสารชีวภาพคาราจีแนน โดยมีร้อยละของปริมาณสารที่สกัดได้ (%Yields) เท่ากับ 44.8 +/- 6.75 และ 13.75 +/- 2.65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ตามลำดับ นำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีโดยใช้เทคนิค FTIR จำแนกหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ สำหรับบ่งชี้คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ได้ผล (ภาพที่ 2-1)

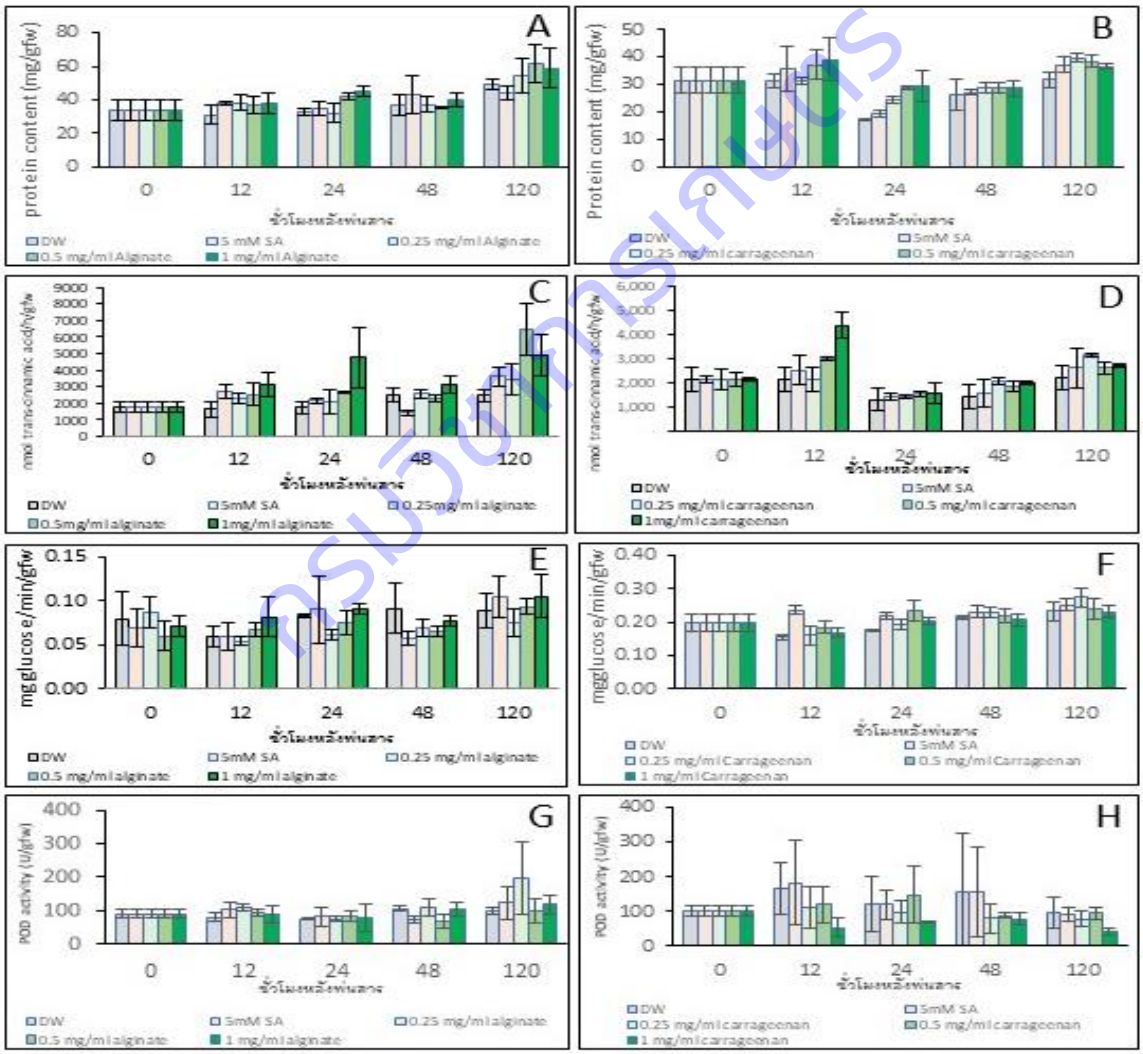


ภาพที่ 2-1 สารชีวภาพอัลจีเนต (บน) และสารชีวภาพคาราจีแนน (ล่าง)

2. การวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลที่ถูกสร้างขึ้นภายในต้นพริก โดยดำเนินการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมของเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมมโมเนียไลเอส เอนไซม์กลูคาเนส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แสดงผล (ภาพที่ 2-2, 2-3) พบว่าเมื่อพริกได้รับการกระตุ้นด้วยสารชีวภาพอัลจีเนต (ภาพที่ 4A, 4C, 4E และ 4G) มีการเพิ่มปริมาณโปรตีนขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมงในชุดใบที่ได้รับสารชีวภาพอัลจีเนต 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับความว่องไวของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเพิ่มขึ้นในชุดใบที่ได้รับสารชีวภาพอัลจีเนตความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตั้งแต่เวลา 12 ชั่วโมงหลังฉีดพ่น โดยมีค่าความว่องไวของเอนไซม์เท่ากับ 3,147.07 + 752.74 ไมโครโมลกรดทรานส์ซินนามิกต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักสด ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่า

กรมวิชาการเกษตร

ความว่องไวของเอนไซม์กลูคาเนสและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในช่วงเวลาดังกล่าวไม่พบความแตกต่างในทุกชุดทดสอบ สำหรับการใช้สารชีวภาพคาราจีแนนกระตุ้นต้นพริก (ภาพที่ 2-2B, D, F และ G) พบว่าปริมาณโปรตีนในใบที่ได้รับการกระตุ้นด้วยคาราจีแนนทุกความเข้มมีปริมาณเพิ่มขึ้นในต่างจากชุดควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่พบการเพิ่มความว่องไวของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมมโมเนียไลเอสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ในชุดใบที่ได้รับคาราจีแนนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีระดับความว่องไวเท่ากับ 4,390.34 + 837.11 ไมโครโมลกรดทรานส์ชินนามิกต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักสด ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามไม่พบการเพิ่มความว่องไวของเอนไซม์กลูคาเนสและเปอร์ออกซิเดสในทุกชุดใบในทุกช่วงเวลา ผลการทดสอบในรอบปลูกที่ 1 บ่งชี้ว่าสารชีวภาพทั้งสองชนิดมีแนวโน้มกระตุ้นกระบวนการสังเคราะห์สารในวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ (phenyl propanoid pathway) โดยพบสัญญาณการเพิ่มความว่องไวของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักซึ่งมีบทบาทเป็นตัวกำหนดความเร็วของปฏิกิริยา (rate limiting step) โดยคาราจีแนนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ผลการกระตุ้นได้รวดเร็วกว่าการใช้สารอัลจีเนต

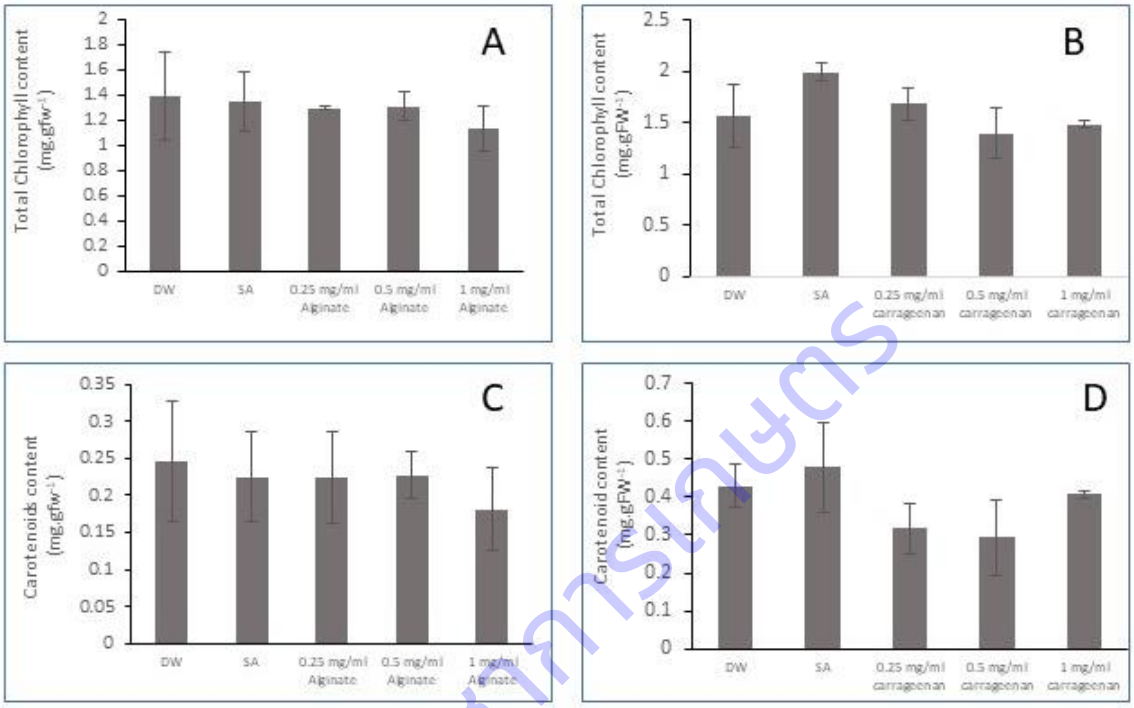


ภาพที่ 2-2 ปริมาณสารชีวโมเลกุลในใบพริกที่ถูกกระตุ้นด้วยสารอัลจีเนตและคาราจีแนนที่เวลา 0, 12, 24 ,48 และ 120 ชั่วโมงหลังการทรีตสาร; ปริมาณโปรตีน (A และ B) ความว่องไวของเอนไซม์ฟินิลอะลานีน

กรมวิชาการเกษตร

แอมโมเนียไลเอส (C และ D) ความว่องไวของเอนไซม์เบต้า 1,3-กลูคาเนส (E และ F) และความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (G และ H)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณรงควัตถุได้แก่ ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมและแคโรทีนอยด์ในชุดใบพริกที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารชีวภาพจากสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด (ภาพที่ 2-3) พบว่าไม่มีความแตกต่างในทุดชุดใบที่ทดสอบในรอบที่ 1



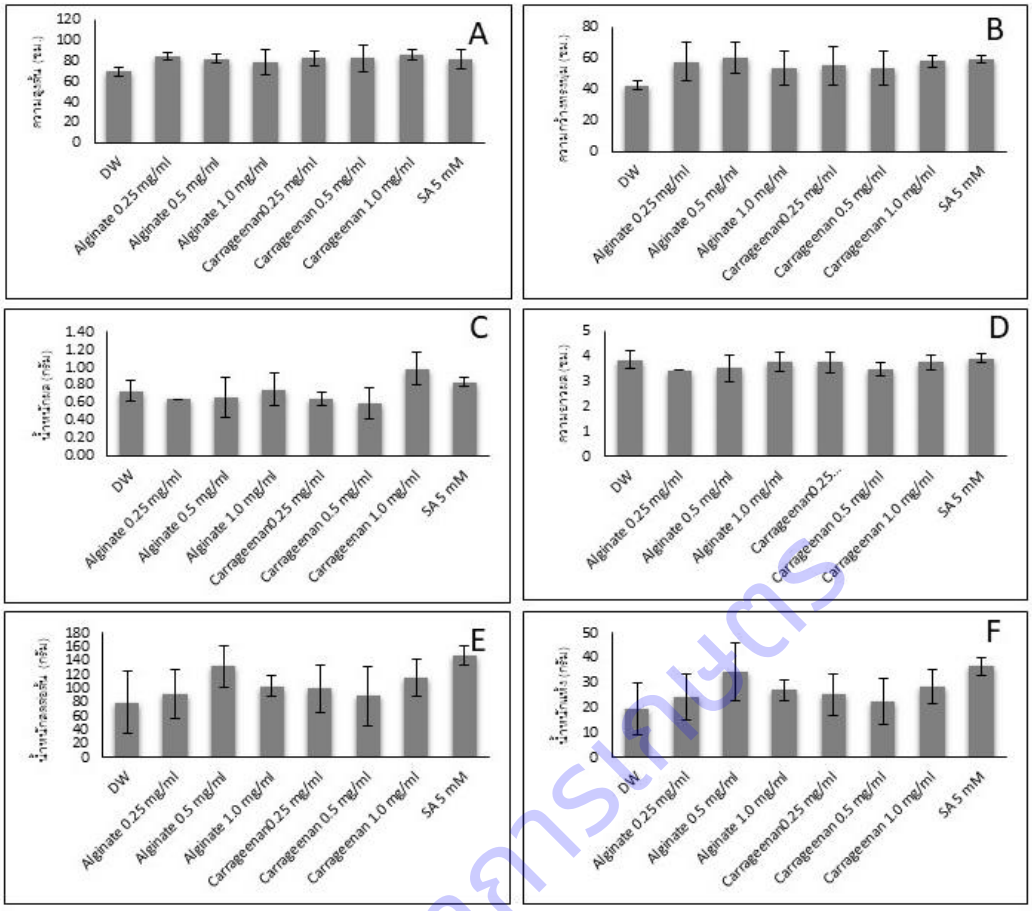
ภาพที่ 2-3 ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม และแคโรทีนอยด์ในใบพริกที่ถูกกระตุ้นด้วยสารอัลจีเนตและคาราจีแนนเป็นเวลา 120 ชั่วโมง; ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (A และ B) และปริมาณแคโรทีนอยด์ (C และ D)

การทดลองที่ 1.2 การประยุกต์ใช้สารชีวภาพจากสาหร่ายในระบบการปลูกพริกในโรงเรือน

1.2.1 ผลการกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นพริก

ผลการทดสอบใช้สารชีวภาพอัลจีเนตและคาราจีแนนกับพริกที่ปลูกในโรงเรือนในรอบปลูกที่ 1 หลังการฉีดพ่นทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าสารชีวภาพทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มช่วยเพิ่มความสูงและขนาดของทรงพุ่มต้นพริกได้ ขณะที่คาราจีแนนเฉพาะความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรมีแนวโน้มช่วยเพิ่มน้ำหนักของผลพริก สำหรับน้ำหนักมวลของต้นพริกทั้งแบบสดและแบบแห้งพบว่าไม่แตกต่างกันสำหรับรอบการทดสอบนี้ (ภาพที่ 2-4)

กรมวิชาการเกษตร

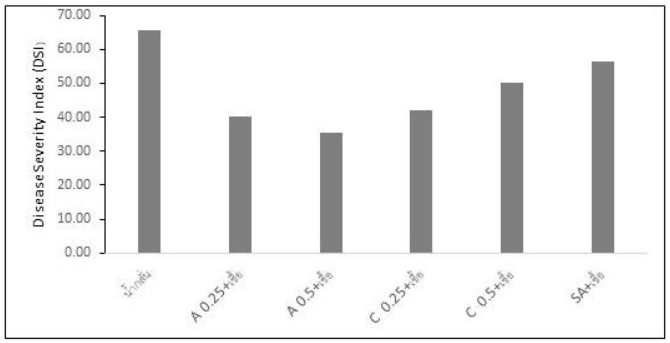


ภาพที่ 2-4 การเจริญเติบโตของต้นพริกที่ปลูกในโรงเรือนเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารทดสอบชนิดต่างๆ โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม; ความสูงต้น (A), ความกว้างของทรงพุ่ม (B), น้ำหนักต่อผล (C), ความยาวผล (D), น้ำหนักสดของต้นหลังเริ่มทดสอบเป็นเวลา 2 เดือน (E) และ น้ำหนักแห้งของต้นหลังเริ่มทดสอบเป็นเวลา 2 เดือน (F)

1.2.2 ผลการประเมินการใช้สารชีวภาพจากสาหร่ายในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริก (*C. gloeosporioides*) ในระบบการปลูกพริกในโรงเรือน โดยการใช้สารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ระดับความเข้มข้น 1x10 ^{6} สปอร์/มิลลิลิตร ในระยะต้นกล้าพริกอายุ 2 เดือน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน พบว่าสารชีวภาพอัลจีเนตและสารชีวภาพคาราจีแนน สามารถช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคได้ โดยสารชีวภาพอัลจีเนตที่ความเข้มข้น 0.25และ0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งแสดงอาการของโรคเพียง 40.14 และ 35.25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่ สารชีวภาพคาราจีแนนที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบระดับความรุนแรงของโรค 41.97 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยชุดควบคุมด้วยน้ำกลั่น (negative control)และชุดควบคุมด้วยกรดซาลิซิลิก (positive control) แสดงอาการของโรคถึง 65.59 และ 56.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 2-5) ซึ่งผลพริกแสดงอาการของโรครุนแรงที่สุดในชุดควบคุม แต่เมื่อพ่นสารชีวภาพจากสาหร่ายทุนก่อน

กรมวิชาการเกษตร

24 ชั่วโมง และตามด้วยเชื้อสาเหตุโรค สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการพ่นเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 2-6)



ภาพที่ 2-5 ดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรค (Disease Severity Index : DSI) จากเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก *C. gloeosporioides* ที่ระดับความเข้มข้น 1x10 ^{6} สปอร์/มิลลิลิตร

ชุดควบคุม (negative control) : น้ำกลั่น + เชื้อ

ชุดควบคุม (positive control : กรดซาลิซิลิกความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิตร (SA+เชื้อ)

สารชีวภาพอัลจีเนต 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิตร : A 0.25+ เชื้อ

สารชีวภาพอัลจีเนต 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิตร : A 0.5+ เชื้อ

สารชีวภาพคาราจีแนน 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิตร : C 0.25+ เชื้อ

สารชีวภาพคาราจีแนน 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิตร : C 0.5+ เชื้อ

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2-6 ระดับการประเมินโรคแอนแทรคโนส บนผลพริก ในระบบการปลูกพริกในโรงเรือน

กรมวิชาการเกษตร

โครงการย่อยที่ 3 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพทางการเกษตร

อาร์เอ็นเอสายคู่ หรือ dsRNA ถูกออกแบบจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชของรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกด้วย RNAi designer software เพื่อการศึกษากระบวนการ RNAi โดยยีนเป้าหมายมี 9 ยีน ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง Dicer-like protein 1, Dicer-like protein 2, Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter, Nitrogen metabolite repression protein nmr, Nitrogen regulatory protein area, Cytochrome P450 4Z1, Conidiophore development protein hymA และ Lipase 1 ดังตารางที่ 3-1 จากนั้นนำข้อมูลมาออกแบบเพื่อทำให้ได้ dsRNA ที่มีความเหมาะสมสำหรับนำมาศึกษากระบวนการเกิดการรบกวนการทำงานของ RNA จำนวน 12 sequences ดังตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-1 ยีนที่สามารถนำมาพัฒนาออกแบบ dsRNA

ลำดับที่	ยีน	บทบาทหน้าที่
1	Ceramide glucosyltransferase	Catalyzes the final step in the biosynthesis of the membrane lipid glucosylceramide (GluCer), the transfer of glucose to ceramide (Probable). Glucosylceramides play important roles in growth, differentiation and pathogenicity. Contribution to fungal pathogenesis is host-dependent.
2	putative oligopeptide transporter	Cgopt1-silenced mutants in *Colletotrichum gloeosporioides* produced less spores, had reduced pigmentation, and were less pathogenic to plants than the wild-type strain. IAA enhanced spore formation and caused changes in colony morphology in the wild-type strain, but had no effect on spore formation or colony morphology of the cgopt1-silenced mutants.
3	Dicer-like protein 1	Loss of penetration ability into the host cells, instead of the decreased growth rate, was the main cause for the impaired pathogenicity of the ΔDcl1, Δ1Dcl2 double mutant.
4	Dicer-like protein 2	Loss of penetration ability into the host cells, instead of the decreased growth rate, was the main cause for the impaired pathogenicity of the ΔDcl1, Δ1Dcl2 double mutant.

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3-1 ยีนที่สามารถนำมาพัฒนาออกแบบ dsRNA

ลำดับที่	ยีน	บทบาทหน้าที่
5	Nitrogen metabolite repression protein nmr	Deletion of *nmrA* slowed the growth of *A. flavus* but significantly increased conidiation and sclerotia production. Moreover, seed infection experiments indicated that *nmrA* is required for the invasive virulence of *A. flavus*.
6	AREA Nitrogen regulatory protein areA	Mutation of AREA (*CgareA*) affects growth, sporulation, nitrogen regulation, and pathogenicity in *Colletotrichum gloeosporioides*.
7	Cytochrome P450 4Z1	Cytochrome P450s (CYPs), heme-containing monooxygenases, play important roles in a wide variety of metabolic processes important for development as well as biotic/trophic interactions in most living organisms.
8	Conidiophore development protein hymA	HymA is thus highly conserved in evolution and probably serves similar functions. The fact that hym A is required for conidiophore development in *A. nidulans* suggests that homologous genes in other organisms might also be involved in morphogenesis.
9	Lipase 1	Involvement of extracellular lipases in fungal pathogenesis in pathogenic fungi. A lipase, Lip1 from *Botrytis cinerea*, which causes grey mould on various plants, was thought to be required for fungal penetration and infection. Lesion formation on inoculated tomato leaves caused by *B. cinerea* was completely suppressed when anti-lipase antibodies were added to a conidial suspension prior to inoculation.

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3-2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ dsRNA ที่ออกแบบ

Sequence ของ dsRNA
1. 498 nt from Ceramide glucosyltransferase in total synthesis 1130 nt to generate 498 dsRNA CTGGAGCACGTTTGTTTACATTGTACAATCCATTGGCATCTTCAGAATCTTCAAATCCTACTCCTA CCCCCCGAGACCCGCCGTGTCGTCTTCCCTCAAGAAAGAAGATGTCCCGCACATCACCGTTATTCG TCCCGTCAAGGGCCTCGAGCATGGCCTCTACGACTGCATTGCTTCCTCATTCCGACAAAACTACCC CGCCGACAAGATGACCATCTACCTCTGTGTAGCCGAGAAGAGTGACCCCGCATACCCTGTGCTGAA GAAGGTCGTGGAGGACTTCCCCGGCTTCGATGCCCACGTGCTCGTGGAAGATGAAGACCCTTTGCT GCACGGCCAGTCAGGCCACATCGACAACCTCGGACCGAACCCTAAGGTCAGGAACATTAGTCGTGC CTACCGTGAGGCAAAGGGCGACATCATCTGGGTCATGGACTGCAATATCTGGATCAGCAAGGGAGT CGCCGGGCGCATGGTGGACAAGCTTCTTGGTTATGAGTGAGCCTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTT TTTTTTTGTTCTTTTTGCCGAATAGTGTACCCACTGGAGATTTGTTGGCCATGCAAATAAATGGAA GGGACTGACAAGATTGTGAAATTGTTCAAAACACACAGTCATAACCAAGAAGCTTGTCCACCATGC GCCCGGCGACTCCCTTGCTGATCCAGATATTGCAGTCCATGACCCAGATGATGTCGCCCTTTGCCT CACGGTAGGCACGACTAATGTTCCTGACCTTAGGGTTCGGTCCGAGGTTGTCGATGTGGCCTGACT GGCCGTGCAGCAAAGGGTCTTCATCTTCCACGAGCACGTGGGCATCGAAGCCGGGGAAGTCCTCCA CGACCTTCTTCAGCACAGGGTATGCGGGGTCACTCTTCTCGGCTACACAGAGGTAGATGGTCATCT TGTCGGCGGGGTAGTTTTGTCGGAATGAGGAAGCAATGCAGTCGTAGAGGCCATGCTCGAGGCCCT TGACGGGACGAATAACGGTGATGTGCGGGACATCTTCTTTCTTGAGGGAAGACGACACGGCGGGTC TCGGGGGGTAGGAGTAGGATTTGAAGATTCTGAAGATGCCAATGGATTGTACAATGTAAACAAACG TGCTCCAG
2. 357 nt from Ceramide glucosyltransferase in total synthesis 848 nt to generate 357 dsRNA GGACCGAACCCTAAGGTCAGGAACATTAGTCGTGCCTACCGTGAGGCAAAGGGCGACATCATCTGG GTCATGGACTGCAATATCTGGATCAGCAAGGGAGTCGCCGGGCGCATGGTGGACAAGCTTCTTGGT TATGAGGCTGACGGCAAACAAGTCAAGCCCTACAAGTTTGTCCACCTGCTGCCCATCGTCGTCGAC ACTGTTTCTCCTCGCGATGCTCATAGCCGGGACACACAGACCCTGCTTTCGTCAGGGCCCGAACCT GACTCCTACCAAAGCCATAACGGATCCGTGTTGGACTATGCACGAACCCAGGGCGGTGGACGTCTC GACGAGATGTTTATGGCTACGACACATGTGAGCCTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGT TCTTTTTGCCGAATAGTGTACCCACTGGAGATTTGTTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGAC AAGATTGTGAAATTGTTCAAAACACACAGATGTGTCGTAGCCATAAACATCTCGTCGAGACGTCCA CCGCCCTGGGTTCGTGCATAGTCCAACACGGATCCGTTATGGCTTTGGTAGGAGTCAGGTTCGGGC CCTGACGAAAGCAGGGTCTGTGTGTCCCGGCTATGAGCATCGCGAGGAGAAACAGTGTCGACGACG ATGGGCAGCAGGTGGACAAACTTGTAGGGCTTGACTTGTTTGCCGTCAGCCTCATAACCAAGAAGC TTGTCCACCATGCGCCCGGCGACTCCCTTGCTGATCCAGATATTGCAGTCCATGACCCAGATGATG TCGCCCTTTGCCTCACGGTAGGCACGACTAATGTTCCTGACCTTAGGGTTCGGTCC
3. 404 nt from putative oligopeptide transporter in total synthesis 942 nt to generate 404 dsRNA CTTGTCCCGCTTTATGCGACCATTGTTGCTGTTCTCATGGCCCTTCTGCTCAGCATTATGGGCGTC AGAGCACTGGGTGAGACGGACTTAAATCCTGTGTCGGGAATCAGTAAACTGGCGCAGCTGTTCTTT GCCCTTATAATACCACAGTCGCATAAGTCTAGTGTATTGATCAACCTTGTGGCGGGTGCAGTGTCC GAAGCAGGTGCTCTACAAGCCGGGGACCTCATGCAGGACTTAAAGACTGGTCATCTTCTCGGTGCC GCACCTAATGCTCAGTTTTGGGGACAGGTTATTGGCGCAACGGCTGGTGCTGTCGTGAGCGCCCTT GTCTACCAATTATACGCGGCAAGTGGAAGGCTAACAATCGACTGGTACAGGGTCTATGCAATTCCT GGTGATCTGTGAGCCTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTTTGCCGAATAGTGT ACCCACTGGAGATTTGTTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGTGAAATTGTTCA AAACACACAGAGATCACCAGGAATTGCATAGACCCTGTACCAGTCGATTGTTAGCCTTCCACTTGC CGCGTATAATTGGTAGACAAGGGCGCTCACGACAGCACCAGCCGTTGCGCCAATAACCTGTCCCCA AAACTGAGCATTAGGTGCGGCACCGAGAAGATGACCAGTCTTTAAGTCCTGCATGAGGTCCCCGGC TTGTAGAGCACCTGCTTCGGACACTGCACCCGCCACAAGGTTGATCAATACACTAGACTTATGCGA CTGTGGTATTATAAGGGCAAAGAACAGCTGCGCCAGTTTACTGATTCCCGACACAGGATTTAAGTC CGTCTCACCCAGTGCTCTGACGCCCATAATGCTGAGCAGAAGGGCCATGAGAACAGCAACAATGGT CGCATAAAGCGGGACAAG

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Sequence ของ dsRNA
4. 475 nt from Dicer-like protein 1 in total synthesis 1084 nt to generate 475 dsRNA CGGCAGCCGTGCAGAAACTTCGAGAGATTGTCAAGAATCACGAGTTCAGTGAAGTCTTGCCGACAC CTGATCACCTTTCAACCAAGGTGCTTCGTCTGTGGGAGGAACTTCGTGCGCGTTTCTCCCAACCCA CCGATCACAAGTGTATTGTTTTCGTTGACATGCGCCTGACAGCCCTGCTCTTGACCGACTTATTCC GCCAAGAGGCCACGAAACTTCCGTTCCTCAACGCTGAGTTTCTGATTGGAAGTCGACCCGATTCTG GCGCAGCCAACATGTCGTTCAAAGAACAAGTCCTAACCATTTCCAAGTTCAGACACGGCAAAGTCA ACTGCCTGTTTGCAACGCAGGTTGCAGAAGAAGGAATAGACATTCCGGACTGCAGTATCGTCATTC GCTTTGATCTATACAGGTCTGCGATCCAGTACATTCAGTCGAAAGGTCGCGCACGTAGAGCGGAAT CAGAGTACCTTACGTGAGCCTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTTTGCCGAAT AGTGTACCCACTGGAGATTTGTTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGTGAAATT GTTCAAAACACACAGGTAAGGTACTCTGATTCCGCTCTACGTGCGCGACCTTTCGACTGAATGTAC TGGATCGCAGACCTGTATAGATCAAAGCGAATGACGATACTGCAGTCCGGAATGTCTATTCCTTCT TCTGCAACCTGCGTTGCAAACAGGCAGTTGACTTTGCCGTGTCTGAACTTGGAAATGGTTAGGACT TGTTCTTTGAACGACATGTTGGCTGCGCCAGAATCGGGTCGACTTCCAATCAGAAACTCAGCGTTG AGGAACGGAAGTTTCGTGGCCTCTTGGCGGAATAAGTCGGTCAAGAGCAGGGCTGTCAGGCGCATG TCAACGAAAACAATACACTTGTGATCGGTGGGTTGGGAGAAACGCGCACGAAGTTCCTCCCACAGA CGAAGCACCTTGGTTGAAAGGTGATCAGGTGTCGGCAAGACTTCACTGAACTCGTGATTCTTGACA ATCTCTCGAAGTTTCTGCACGGCTGCCG
5. 454 nt from Dicer-like protein 2 in total synthesis 1042 nt dsRNA to generate 454 dsRNA GAATATGGAGGCCGAGATGAAGCGGCAGTATGAACAACAAGAGCGGGAGCTCGAGCATTTGCAACA GATTGAAGAGACGGAGGAACTGGCAGAGATGCAGTTTAACGTTGAGACAACGGGAGCGCTTTTGGA TCTCGACAACGCAAAATCACATCTTGATCATTTCTGCCGAATCCTGTCTCCCGGGGAGTTTATCGA CTGGCGTCCTGACTACATTTTGAAGAAGCTTGACAACACGGATGCTCCGGATCTGAGGTATACGGT TGTTCTTCCAAGCTACCTTCCCGCCGAAGTACGATCTGCCGAGAGCAAATCAACGTGGAAGTCTGA AAAGAACGCGATGAAAGACGCTGCATTTCAGGCCTACGTAGCTCTTTATCGGGCAGGCCTCGTCAA CGACAATCTTCTGCCCTTCAAGCCAGAGGACTTTGTTCCCGGAGTGGACAAGAGGGCTGTGAGCCT TTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTTTGCCGAATAGTGTACCCACTGGAGATTTG TTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGTGAAATTGTTCAAAACACACAGAGCCCT CTTGTCCACTCCGGGAACAAAGTCCTCTGGCTTGAAGGGCAGAAGATTGTCGTTGACGAGGCCTGC CCGATAAAGAGCTACGTAGGCCTGAAATGCAGCGTCTTTCATCGCGTTCTTTTCAGACTTCCACGT TGATTTGCTCTCGGCAGATCGTACTTCGGCGGGAAGGTAGCTTGGAAGAACAACCGTATACCTCAG ATCCGGAGCATCCGTGTTGTCAAGCTTCTTCAAAATGTAGTCAGGACGCCAGTCGATAAACTCCCC GGGAGACAGGATTCGGCAGAAATGATCAAGATGTGATTTTGCGTTGTCGAGATCCAAAAGCGCTCC CGTTGTCTCAACGTTAAACTGCATCTCTGCCAGTTCCTCCGTCTCTTCAATCTGTTGCAAATGCTC GAGCTCCCGCTCTTGTTGTTCATACTGCCGCTTCATCTCGGCCTCCATATTC
6. 254 nt from Nitrogen metabolite repression protein in total synthesis 642 nt to generate 254 dsRNA ACCGAAGTAAACTCAAATCCCAACGTCACCGTCCTTGTCGGCGAGCTCTACACAAGACACAAGCCT ACGCCCGACAACAGAGACGTGACAACAAACGGTCCCATCTCCGGCGTAGGCGTGAACCATGACTTG ATCAACGATCTCTTCCGCGGCGTCCAGCTCGCCTTCATCAACACCACATTTTATGGAGACGAGTTC CAAATCGGCAAGGCACTTGCCGATGCCGCAAAGAAGGCAGGTGTTCAGCACTACGTGTGAGCCTTT CTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTTTGCCGAATAGTGTACCCACTGGAGATTTGTT GGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGTGAAATTGTTCAAAACACACAGACGTAGTG CTGAACACCTGCCTTCTTTGCGGCATCGGCAAGTGCCTTGCCGATTTGGAACTCGTCTCCATAAAA TGTGGTGTTGATGAAGGCGAGCTGGACGCCGCGGAAGAGATCGTTGATCAAGTCATGGTTCACGCC TACGCCGGAGATGGGACCGTTTGTTGTCACGTCTCTGTTGTCGGGCGTAGGCTTGTGTCTTGTGTA GAGCTCGCCGACAAGGACGGTGACGTTGGGATTTGAGTTTACTTCGGT

dsRNA Thailand

Sequence ของ dsRNA
7. 265 nt from Nitrogen metabolite repression protein in total synthesis 664 nt to generate 265 dsRNA TGTCGGGATATTTGTTCGCGCTGTACTGATAGCGGGTACCTCGAAAACTGCATCAAAGACATATCC CATCGGAAGTCCCAAGATCTCTTTCGGGGAGTTGGCCAGTGTCTTCTCTAGTACGACAGGCATTCC CGCTCGCTTTGAGAGCGTTGGTCTGGAGGACTGGACGTCTACTGTTGTGTCCGTGGCCGGGGAGGG CTTTAAAGAGGACATCCGGCAAATGGTGCAATGGGTTGCCCATGCGCCTACAGATAAGATATGCTA CGTGAGCCTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTTTGCCGAATAGTGTACCCACT GGAGATTTGTTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGTGAAATTGTTCAAAACACA CAGGTAGCATATCTTATCTGTAGGCGCATGGGCAACCCATTGCACCATTTGCCGGATGTCCTCTTT AAAGCCCTCCCCGGCCACGGACACAACAGTAGACGTCCAGTCCTCCAGACCAACGCTCTCAAAGCG AGCGGGAATGCCTGTCGTACTAGAGAAGACACTGGCCAACTCCCCGAAAGAGATCTTGGGACTTCC GATGGGATATGTCTTTGATGCAGTTTTCGAGGTACCCGCTATCAGTACAGCGCGAACAAATATCCC GACA
8. 282 nt from Nitrogen metabolite repression protein in total synthesis 698 nt to generate 282 dsRNA TGTCGGGTTTGGGAGTCGAGATGGTTTCGGCGGACCTGAACAACAAAGATTCACTGGTGAAGGCTT TCAAGGGGTCATACGCCGTGTTCGCCGTGACCAACTACTGGGAGACGCTAGACATGCAGGTGGAGA TCCAGCAGGGCAAGAACATCGCCGACGCTTCCAAGGAAACGGACGTAAAGTTCCTCATCTGGAGCT CGCAGCTCAACATCAAGAAGCTTTCCAACGGCGTGTTGTCGGACCTTTACCATTTTGACAGCAAGG CTATCGTGGAAGAGTACAGTGAGCCTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTTTGC CGAATAGTGTACCCACTGGAGATTTGTTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGTG AAATTGTTCAAAACACACAGTGTACTCTTCCACGATAGCCTTGCTGTCAAAATGGTAAAGGTCCGA CAACACGCCGTTGGAAAGCTTCTTGATGTTGAGCTGCGAGCTCCAGATGAGGAACTTTACGTCCGT TTCCTTGGAAGCGTCGGCGATGTTCTTGCCCTGCTGGATCTCCACCTGCATGTCTAGCGTCTCCCA GTAGTTGGTCACGGCGAACACGGCGTATGACCCCTTGAAAGCCTTCACCAGTGAATCTTTGTTGTT CAGGTCCGCCGAAACCATCTCGACTCCCAAACCCGACA
9. 324 nt from AREA generate in total synthesis 782 nt to generate 324 dsRNA GCCCTCTTCGTTGAACCCGTCAGATTTCTATTCGCCCCCGGGATCGGCTTATCATTCCACTGTATC GACGCCGCACCCCATGCCCGATAACGACAACTTCTACTTTGGATCGATGGATATGCGCGGCCAGAG GTCGCAAAACTTCCGCCCGGGCTCTCAGAACATGGGAAGCCAAATGAACCAGCAGTTCATGTACAA CAATGCGAACGGGAACCCCATGTTCCCTGCATCTGCTCCTACTACGGAGTCTGTATCCGCCTTCAG CAGTGCGACCAGTCCTTTTGGGCACATTGATCCGACGCAAGTCTTTCAGCAAGATCATTCGTGAGC CTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTTTGCCGAATAGTGTACCCACTGGAGATT TGTTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGTGAAATTGTTCAAAACACACAGGAAT GATCTTGCTGAAAGACTTGCGTCGGATCAATGTGCCCAAAAGGACTGGTCGCACTGCTGAAGGCGG ATACAGACTCCGTAGTAGGAGCAGATGCAGGGAACATGGGGTTCCCGTTCGCATTGTTGTACATGA ACTGCTGGTTCATTTGGCTTCCCATGTTCTGAGAGCCCGGGCGGAAGTTTTGCGACCTCTGGCCGC GCATATCCATCGATCCAAAGTAGAAGTTGTCGTTATCGGGCATGGGGTGCGGCGTCGATACAGTGG AATGATAAGCCGATCCCGGGGGCGAATAGAAATCTGACGGGTTCAACGAAGAGGGC
10. 547 nt from Cytochrome P450 4Z1 in total synthesis 1228 nt to generate 547 dsRNA TCCCCTTCATTGTTGCCTTCTTTCAGTGTACGCTGGGAGCGACGACGGCTTGGACAGGCCTTGGAT GTCTTTCTCGGCGACGTTATTCGACGGAAATTCGATCTCTACAAAGCAGATAGTAACACGGCAAGT CGGAGTATCCTCGCCCTCAGCCTCAAAGACATCAACATGCTCACTCAACCCATTATGGACGACATC ATCAGCGCATTGAAGACATTCCTGTTCGCTGGGCACGACACGACGAGCATCCTGCTGCAATGGGCT TTATACGAACTTTCAAGCAACCCGCACACACTTGCGCGCATGCGGTACGAATTGGACCAGGTTTTA GGCCAGAGCGCTGATCTAGATCATGTCTTTGAAGTAATCAATAAAGGCGGAGAAGAGGTCGTCGGT CAGCTGAAATACACGTCTGCAGTCATAAAGGAGGTTTTGCGGTTGCATCCTCCAGCTGCGACAGCG AGATACTCCCCTCCGGGAACCGGATTTCATTTGACTATGCCCGATGGAAGCCGTATCTGCGCCGAC GACTTAATGCTATACAACGGTGAGCCTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTTTG

FOR RESEARCH PURPOSES

Sequence ของ dsRNA
CCGAATAGTGTACCCACTGGAGATTTGTTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGT GAAATTGTTCAAAACACACAGCGTTGTATAGCATTAAGTCGTCGGCGCAGATACGGCTTCCATCGG GCATAGTCAAATGAAATCCGGTTCCCGGAGGGGAGTATCTCGCTGTCGCAGCTGGAGGATGCAACC GCAAAACCTCCTTTATGACTGCAGACGTGTATTTCAGCTGACCGACGACCTCTTCTCCGCCTTTAT TGATTACTTCAAAGACATGATCTAGATCAGCGCTCTGGCCTAAAACCTGGTCCAATTCGTACCGCA TGCGCGCAAGTGTGTGCGGGTTGCTTGAAAGTTCGTATAAAGCCCATTGCAGCAGGATGCTCGTCG TGTCGTGCCCAGCGAACAGGAATGTCTTCAATGCGCTGATGATGTCGTCCATAATGGGTTGAGTGA GCATGTTGATGTCTTTGAGGCTGAGGGCGAGGATACTCCGACTTGCCGTGTTACTATCTGCTTTGT AGAGATCGAATTTCCGTCGAATAACGTCGCCGAGAAAGACATCCAAGGCCTGTCCAAGCCGTCGTC GCTCCCAGCGTACACTGAAAGAAGGCAACAATGAAGGGGA
11. 458 nt from Conidiophore development protein hymA in total synthesis 1050 nt to generate 458 dsRNA TGGCTTGATTGAGGAGGATCTTCTTTACTTACTTGCCGTAAATCTCTGGCGCTTACCGTTCGAATC CCGCAAAGATACCCAGGTTATCTTCTCCTACGTCTTCCGTTTCCGCCCTCCAACCGGCTCGCCTAA GAGCGACCCTCTCGCTCTGTCCTACGTTGTCAACAACCGCCCGCAAGTTTTGCTGGAACTTTGTCG AGGGTACGAGCACAAGGAGAGCGCAACGCCTGCCGGTTCCGTTCTCCGAGAAGTCCTTAAATCAGA AGCCGCCGCCGCCATAATCTTGTACGATGACAATGAAGAATCTGGATCTAGCAATAAAGGTATCAA TTTGATTGACCGAGACCGCCGTCAAAGCGGCGACGGCGTCTTTTGGAGGTTTTTTGACTGGATCGA CAAGAGCTCTTTCGAAGTCGCTGCGGATGCCTTCACCACGTTTAGAGAACTTCTTACGAAACGTGA GCCTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTTTGCCGAATAGTGTACCCACTGGAGA TTTGTTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGTGAAATTGTTCAAAACACACAGGT TTCGTAAGAAGTTCTCTAAACGTGGTGAAGGCATCCGCAGCGACTTCGAAAGAGCTCTTGTCGATC CAGTCAAAAAACCTCCAAAAGACGCCGTCGCCGCTTTGACGGCGGTCTCGGTCAATCAAATTGATA CCTTTATTGCTAGATCCAGATTCTTCATTGTCATCGTACAAGATTATGGCGGCGGCGGCTTCTGAT TTAAGGACTTCTCGGAGAACGGAACCGGCAGGCGTTGCGCTCTCCTTGTGCTCGTACCCTCGACAA AGTTCCAGCAAAACTTGCGGGCGGTTGTTGACAACGTAGGACAGAGCGAGAGGGTCGCTCTTAGGC GAGCCGGTTGGAGGGCGGAAACGGAAGACGTAGGAGAAGATAACCTGGGTATCTTTGCGGGATTCG AACGGTAAGCGCCAGAGATTTACGGCAAGTAAGTAAAGAAGATCCTCCTCAATCAAGCCA	
12. 400 nt from Lipase 1 in total synthesis 934 nt to generate 400 dsRNA CGACGCATGAGGCAGATGGTCTCTTCAGAGGTGTGATCGCAAGCAGTCCATATATGGCAACTCAGC CTCAATTCGATGGCGCTCGGCCCACAAAGCAATACCGAAGTCTGGCTGAGCGTGTTGGGTGTACAA CTTCGAAGGACTCCACTTCTATCTTTTCCTGCCTGCAAAACGTCGACTCAGTCACTCTTCAGAATG CGAGTGACTGGGTGAGTACACAGGGTCGCTACGGGCAGTGGGCATGGGGGCCAGTTATTGATGGGA AACTCGTAAAGGACATTCCTCCGAATCAACTCGCGAAGGCCAAGGCCCACGGCGTAAATCTGCTCA CCAGCAATGTTGCGGACGAGGGTCCGTATTTTACCCCGCAGAACATTACATCCCAGGCAGGCTTTG TATCGTGAGCCTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTTTGCCGAATAGTGTACCC ACTGGAGATTTGTTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGTGAAATTGTTCAAAAC ACACAGGATACAAAGCCTGCCTGGGATGTAATGTTCTGCGGGGTAAAATACGGACCCTCGTCCGCA ACATTGCTGGTGAGCAGATTTACGCCGTGGGCCTTGGCCTTCGCGAGTTGATTCGGAGGAATGTCC TTTACGAGTTTCCCATCAATAACTGGCCCCCATGCCCACTGCCCGTAGCGACCCTGTGTACTCACC CAGTCACTCGCATTCTGAAGAGTGACTGAGTCGACGTTTTGCAGGCAGGAAAAGATAGAAGTGGAG TCCTTCGAAGTTGTACACCCAACACGCTCAGCCAGACTTCGGTATTGCTTTGTGGGCCGAGCGCCA TCGAATTGAGGCTGAGTTGCCATATATGGACTGCTTGCGATCACACCTCTGAAGAGACCATCTGCC TCATGCGTCG	

ตัวอย่าง

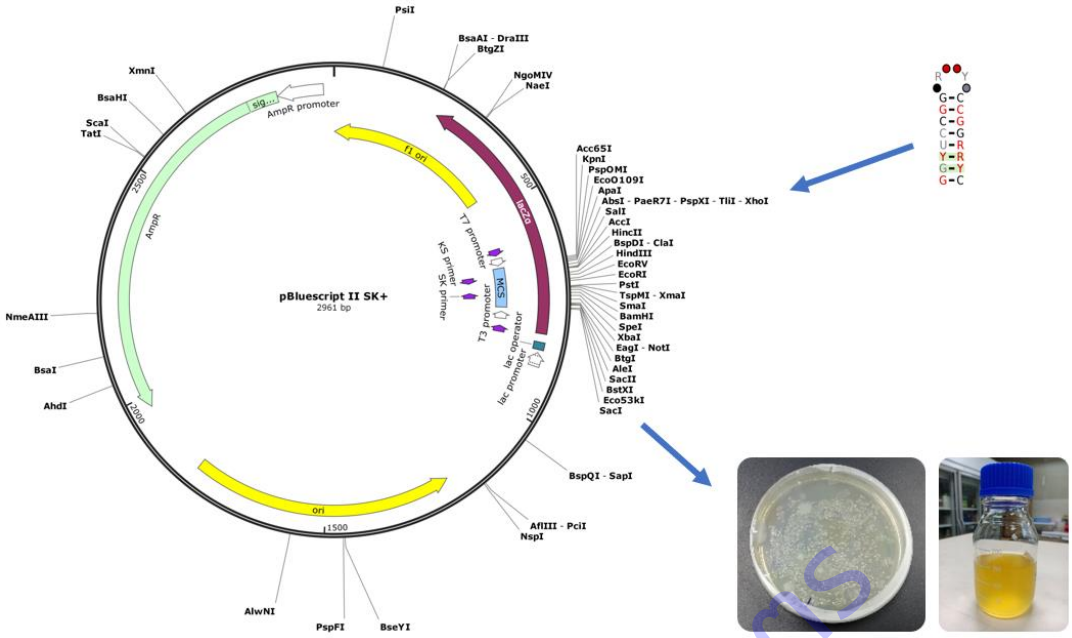
อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการวิเคราะห์พบว่า dsRNA ที่ออกแบบจากยีน Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter และ Dicer-like protein 1 มีแนวโน้มสามารถส่งผลให้เกิดกระบวนการ RNAi ได้ดีที่สุด ดังตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-3 RNAi target sequences ในช่วงของ dsRNA ที่ถูกออกแบบโดยวิเคราะห์จาก mRNA ของยีน Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter และ Dicer-like protein 1

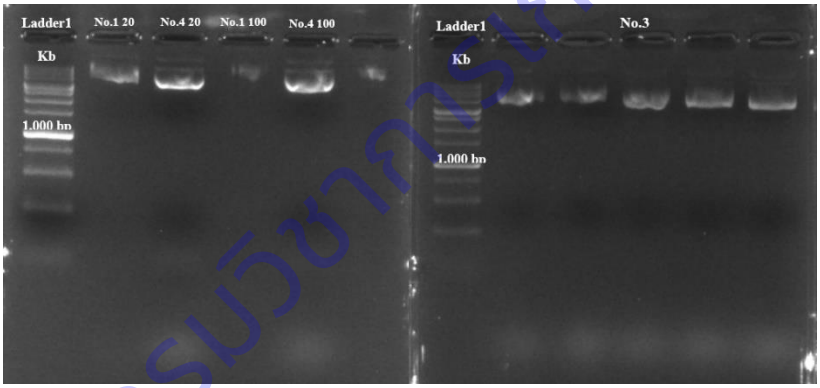
No.	Start	Sequence (DNA)	GC (%)	Rank
Ceramide glucosyltransferase (Gene ID: 69007837)				
1	53	GGAGCACGTTTGTTTACATTGTAC	40	5
2	207	CCTCTACGACTGCATTGCTTCCTCA	52	5
3	415	CCGAACCCTAAGGTCAGGAACATTA	48	5
4	521	GCATGGTGGACAAGCTTCTTGGTTA	48	5
Putative oligopeptide transporter (Gene ID: 69022791)				
1	1458	TGTCCCGCTTTATGCGACCATTGTT	48	5
2	1572	GGCGCAGCTGTTCTTTGCCCTTATA	52	5
3	1574	CGCAGCTGTTCTTTGCCCTTATAAT	44	5
Dicer-like protein 1 (Gene ID: 69015152)				
1	1355	CAGCCGTGCAGAAACTTCGAGAGAT	52	5
2	1398	CAGTGAAGTCTTGCCGACACCTGAT	52	5
3	1669	CACGGCAAAGTCAACTGCCTGTTTG	52	5

จากนั้นเมื่อทำการสังเคราะห์ plasmid ลูกผสมที่เชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ออกแบบจากยีน Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter และ Dicer-like protein 1 กับเวคเตอร์พาหะ pBluescript II SK+ แล้วนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ด้วยวิธี heat shock ทำการคัดเลือกเซลล์ที่มี plasmid ลูกผสม โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 µg/ml (ภาพที่ 3-1) จากนั้นทำการสกัด plasmid ซึ่งผลการวิเคราะห์ผลบน agarose gel และ nanodrop (ภาพที่ 3-2) ดังตารางที่ 3-4

กรมวิทยาศาสตร์



ภาพที่ 3-1 การสร้างพลาสมิดลูกผสมและการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมเพื่อการผลิต dsRNA



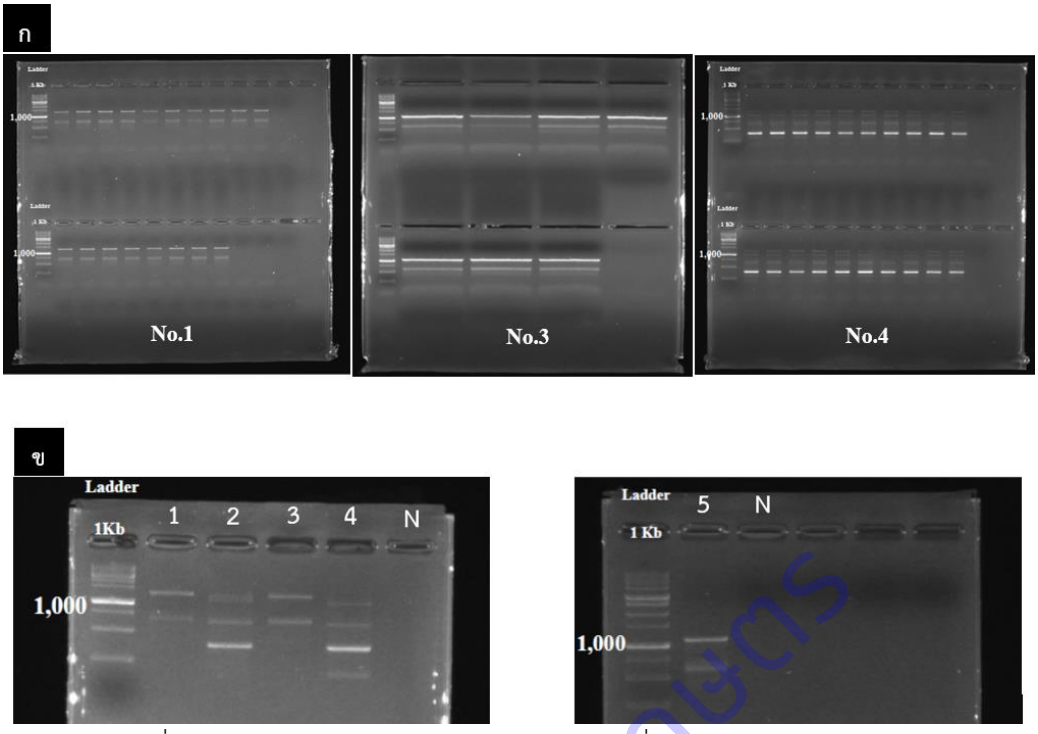
ภาพที่ 3-2 การวิเคราะห์ผลการสกัด plasmid ด้วย gel electrophoresis (1% Agarose gel)

ตารางที่ 3-4 ความเข้มข้นของ Plasmid DNA ที่ได้จากการสกัดได้จากเซลล์ *E. coli*

No.	ID	260/280 ratio	DNA concentration (ng/µl)
1	No.1	1.845 - 1.9537	190.19 - 385.09
2	No.3	1.8168 - 1.9089	99.03 - 212.11
3	No.4	1.8137 - 1.9527	221.82 - 305.86

จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR เพื่อนำใช้เป็นต้นแบบในการผลิต RNA ด้วย *In vitro* transcription ซึ่งลักษณะแถบ DNA และความเข้มข้นที่ผลิตได้ (ภาพที่ 3-3) ดังตารางที่ 3-5, 3-6, 3-7

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3-3 แถบ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จากพลาสมิดลูกผสมที่มียีน Ceramide glucosyltransferase (เลข 1 และ 3), putative oligopeptide transporter (เลข 2 และ 4) และ Dicer-like protein 1 (เลข 5) โดย N คือ น้ำกลั่น (negative control)

ตารางที่ 3-5 ความเข้มข้นของ DNA ที่ผลิตได้จากปฏิกิริยา PCR ของยีน Ceramide glucosyltransferase

No.	ID	260/280 ratio	DNA concentration (ng/µl)
1	No.1-1	1.9677	11.7308
2	No.1-2	1.8445	68.2692
3	No.1-3	1.7923	63.0769
4	No.1-4	1.8067	118.0769
5	No.1-5	1.8053	23.4615
6	No.1-6	1.8582	75.0962
7	No.1-7	1.8059	85.8654
8	No.1-8	1.900	40.0962
9	No.1-9	1.875	10.0962
10	No.1-10	1.9697	6.25

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 3-6 ความเข้มข้นของ DNA ที่ผลิตได้จากปฏิกิริยา PCR ของยีน putative oligopeptide transporter

No.	ID	260/280 ratio	DNA concentration (ng/µl)
1	No.3-1	1.8189	118.75
2	No.3-2	2.0167	23.2692
3	No.3-3	1.835	117.1154
4	No.3-4	1.8181	67.2115
5	No.3-5	1.8451	69.1346
6	No.3-6	1.8771	52.6923

ตารางที่ 3-7 ความเข้มข้นของ DNA ที่ผลิตได้จากปฏิกิริยา PCR ของยีน Dicer-like protein 1

No.	ID	260/280 ratio	DNA concentration (ng/µl)
1	No.4-1	1.8598	38.2692
2	No.4-2	1.8122	7.5962
3	No.4-3	1.8295	39.3269
4	No.4-4	1.8141	85.6731
5	No.4-5	2.8077	42.1154
6	No.4-6	1.8061	61.1538
7	No.4-7	1.8828	12.4038
8	No.4-8	1.8712	29.4231
9	No.4-9	1.8292	29.1346
10	No.4-10	1.818	33.2692

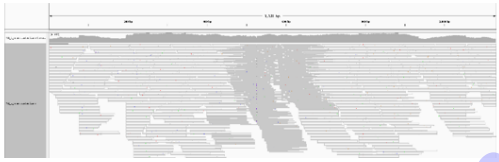
อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีแถบดีเอ็นขึ้นหลายแถบ คือ Ceramide glucosyltransferase (No.1) จะมีแถบ DNA 2 ช่วงขนาด ได้แก่ 1250bp และ 700bp, Putative oligopeptide transporter (No.3) จะมีแถบ DNA 2 ช่วงขนาด ได้แก่ 1250bp และ 700bp และ Dicer-like protein 1 จะมีแถบ DNA 4 ช่วงขนาด ได้แก่ 1250bp, 1000bp, 700bp และ 400bp จากปฏิกิริยา PCR ดังนั้นจึงทำการตัดเจลของแต่และแถบ DNA ออกมาเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องก่อนนำไปใช้เป็นต้นแบบเพื่อสังเคราะห์ RNA ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย BT sequencing (Barcode Taq Sequencing) พบว่าแต่ละแถบ DNA มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน และเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบไว้ (ภาพที่ 3-4) แสดงว่าเป็น Sequence เดียวกันแต่อาจมีฟอร์มหรือโครงสร้างที่ต่างกัน ได้แก่ double strand, single strand และ multimers เป็นต้น (Nwokeoji *et al*., 2019)

กรมวิชาการเกษตร

Name of sample: N1-1 & N1-2

The sequence of the PCR primers replaces the template sequence.

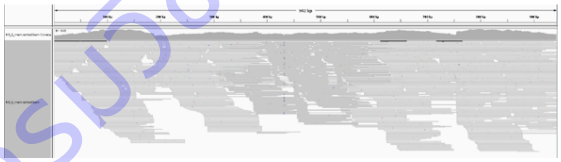
CTGGAGCACGTTTGTTTACATTGTACAATCCATTGGCATCTTCAGAATCTTCAAATCCTACTCCTACCCCCCGAGACCCGCCGTGTCGTCT
TCCCTCAAGAAAGAAGATGTCCCGCACATCACCGTTATTCGTCCCGTCAAGGGCCTCGAGCATGGCCTCTACGACTGCATTGCTTCCTCAT
TCCGACAAAACTACCCCGCCGACAAGATGACCATCTACCTCTGTGTAGCCGAGAAGAGTGACCCCGCATACCCTGTGCTGAAGAAGGTCG
TGGAGGACTTCCCCGGCTTCGATGCCCACGTGCTCGTGGAAGATGAAGACCCTTTGCTGCACGGCCAGTCAGGCCACATCGACAACCTCG
GACCGAACCCTAAGGTCAGGAACATTAGTCGTGCCTACCGTGAGGCAAAGGGCGACATCATCTGGGTCATGGACTGCAATATCTGGATCA
GCAAGGGAGTCGCCGGGCGCATGGTGGACAAGCTTCTTGGTTATGAGTGAGCCTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTT
TGCCGAATAGTGTACCCACTGGAGATTTGTTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGTGAAATTGTTCAAAACACACAGTC
ATAACCAAGAAGCTTGTCCACCATGCGCCCGGCGACTCCCTTGCTGATCCAGATATTGCAGTCCATGACCCAGATGATGTCGCCCTTTGCC
TCACGGTAGGCACGACTAATGTTCCTGACCTTAGGGTTCGGTCCGAGGTTGTCGATGTGGCCTGACTGGCCGTGCAGCAAAGGGTCTTCA
TCTTCCACGAGCACGTGGGCATCGAAGCCGGGGAAGTCCTCCACGACCTTCTTCAGCACAGGGTATGCGGGGTCACTCTTCTCGGCTACA
CAGAGGTAGATGGTCATCTTGTCGGCGGGGTAGTTTTGTCGGAATGAGGAAGCAATGCAGTCGTAGAGGCCATGCTCGAGGCCCTTGACG
GGACGAATAACGGTGATGTGCGGGACATCTTCTTTCTTGAGGGAAGACGACACGGCGGGTCTCGGGGGGTAGGAGTAGGATTTGAAGATT
CTGAAGATGCCAATGGATTGTACAATGTAAACAAACGTGCTCCAG



Name of sample: N3-1 & N3-2

The sequence of the PCR primers replaces the template sequence.

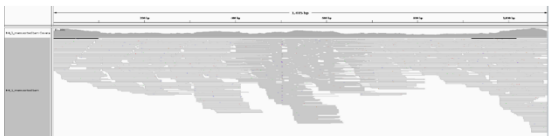
CTTGTCCCGCTTTATGCGACCATTGTTGCTGTTCTCATGGCCCTTCTGCTCAGCATTATGGGCGTCAGAGCACTGGGTGAGACGGACTTAA
ATCCTGTGTCGGGAATCAGTAAACTGGCGCAGCTGTTCTTTGCCCTTATAATACCACAGTCGCATAAGTCTAGTGTATTGATCAACCTTGT
GGCGGGTGCAGTGTCCGAAGCAGGTGCTCTACAAGCCGGGGACCTCATGCAGGACTTAAAGACTGGTCATCTTCTCGGTGCCGCACCTAA
TGCTCAGTTTTGGGGACAGGTTATTGGCGCAACGGCTGGTGCTGTCGTGAGCGCCCTTGTCTACCAATTATACGCGGCAAGTGGAAGGCT
AACAATCGACTGGTACAGGGTCTATGCAATTCCTGGTGATCTGTGAGCCTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTTGCCG
AATAGTGTACCCACTGGAGATTTGTTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGTGAAATTGTTCAAAACACACAGAGATCAC
CAGGAATTGCATAGACCCTGTACCAGTCGATTGTTAGCCTTCCACTTGCCGCGTATAATTGGTAGACAAGGGCGCTCACGACAGCACCAG
CCGTTGCGCCAATAACCTGTCCCCAAAACTGAGCATTAGGTGCGGCACCGAGAAGATGACCAGTCTTTAAGTCCTGCATGAGGTCCCCGG
CTTGTAGAGCACCTGCTTCGGACACTGCACCCGCCACAAGGTTGATCAATACACTAGACTTATGCGACTGTGGTATTATAAGGGCAAAGAA
CAGCTGCGCCAGTTTACTGATTCCCGACACAGGATTTAAGTCCGTCTCACCCAGTGCTCTGACGCCCATAATGCTGAGCAGAAGGGCCAT
GAGAACAGCAACAATGGTCGCATAAAGCGGGACAAG



Name of sample: N4-1 & N4-4

The sequence of the PCR primers replaces the template sequence.

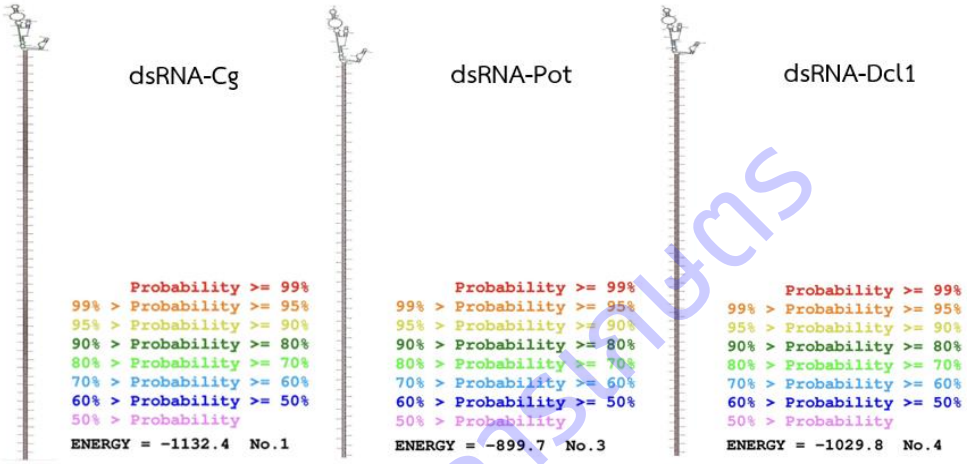
CGGCAGCCGTGCAGAAACTTCGAGAGATTGTCAAGAATCACGAGTTCAGTGAAGTCTTGCCGACACCTGATCACCTTTCAACCAAGGTGC
TTCGTCTGTGGGAGGAACTTCGTGCGCGTTTCTCCCAACCCACCGATCACAAGTGTATTGTTTTCGTTGACATGCGCCTGACAGCCCTGCT
CTTGACCGACTTATTCCGCCAAGAGGCCACGAAACTTCCGTTCCTCAACGCTGAGTTTCTGATTGGAAGTCGACCCGATTCTGGCGCAGCC
AACATGTCGTTCAAAGAACAAGTCCTAACCATTTCCAAGTTCAGACACGGCAAAGTCAACTGCCTGTTTGCAACGCAGGTTGCAGAAGAAG
GAATAGACATTCCGGACTGCAGTATCGTCATTCGCTTTGATCTATACAGGTCTGCGATCCAGTACATTCAGTCGAAAGGTCGCGCACGTAG
AGCGGAATCAGAGTACCTTACGTGAGCCTTTCTTCTTGCCTCTCTTTGTTTTTTTTTTGTTCTTTTTGCCGAATAGTGTACCCACTGGAGAT
TTGTTGGCCATGCAAATAAATGGAAGGGACTGACAAGATTGTGAAATTGTTCAAAACACACAGGTAAGGTACTCTGATTCCGCTCTACGTG
CGCGACCTTTCGACTGAATGTACTGGATCGCAGACCTGTATAGATCAAAGCGAATGACGATACTGCAGTCCGGAATGTCTATTCCTTCTTC
TGCAACCTGCGTTGCAAACAGGCAGTTGACTTTGCCGTGTCTGAACTTGGAAATGGTTAGGACTTGTTCTTTGAACGACATGTTGGCTGCG
CCAGAATCGGGTCGACTTCCAATCAGAAACTCAGCGTTGAGGAACGGAAGTTTCGTGGCCTCTTGGCGGAATAAGTCGGTCAAGAGCAGG
GCTGTCAGGCGCATGTCAACGAAAACAATACACTTGTGATCGGTGGGTTGGGAGAAACGCGCACGAAGTTCCTCCCACAGACGAAGCACC
TTGGTTGAAAGGTGATCAGGTGTCGGCAAGACTTCACTGAACTCGTGATTCTTGACAATCTCTCGAAGTTTCTGCACGGCTGCCG



ภาพที่ 3-4 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากปฏิกิริยา PCR จากการวิเคราะห์ด้วย BT sequencing ของยีน Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter และ Dicer-like protein 1

กรมวิชาการเกษตร

จากนั้นจึงนำ DNA ที่ได้ไปทำการสังเคราะห์ dsRNA ด้วยวิธี *In vitro* transcription จากยีนรา *C. gloeosporioides* เป้าหมาย จำนวน 3 sequences ได้แก่ dsRNA-Cg (No.1), dsRNA-Pot (No. 3) และ dsRNA-Dcl1 (No. 4) โดย dsRNA-Cg สังเคราะห์จาก 498 nt ของยีน Ceramide glucosyltransferase เมื่อออกแบบและสังเคราะห์ให้เกิดลักษณะโครงสร้างแบบ hairpin loop แล้วจะได้ 1130 nt ส่วน dsRNA-Pot สังเคราะห์มาจาก 404 nt ของยีน putative oligopeptide transporter เมื่อออกแบบและสังเคราะห์แล้วจะได้ 942 nt ในขณะที่ dsRNA-Dcl1 สังเคราะห์มาจาก 475 nt ของยีน Dicer-like protein 1 เมื่อออกแบบและสังเคราะห์แล้วจะได้ 1084 nt โดยลักษณะโครงสร้างและความเข้มข้นของ dsRNA ที่สังเคราะห์ได้ ดังตารางที่ 3-8 (ภาพที่ 3-5)



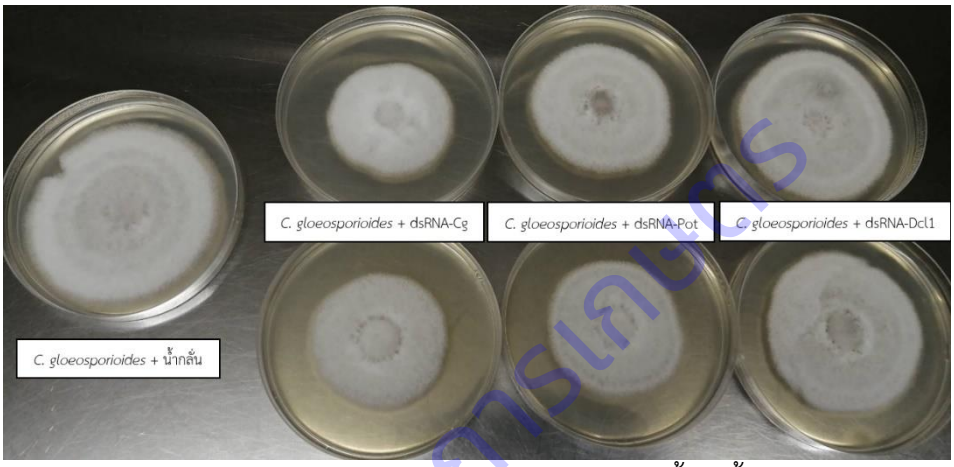
ภาพที่ 3-5 ลักษณะโครงสร้างของ dsRNA ที่สังเคราะห์จากวิธี *In vitro* transcription (RNA secondary structure prediction: https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html)

ตารางที่ 3-8 ความเข้มข้นของ RNA ที่ผลิตได้จากยีน Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter และ Dicer-like protein 1 ด้วยวิธี *In vitro* transcription

No.	ID	260/230 ratio	RNA concentration (ng/µl)
1	No.1-1	2.0269	1397.4038
2	No.1-2	2.0414	711.5385
3	No.1-3	2.0358	1425.4808
4	No.3-1	2.0531	940.4808
5	No.3-2	2.0089	868.4615
6	No.3-3	2.0308	1757.4038
7	No.4-1	2.0456	1049.1346
8	No.4-2	2.0078	1017.4038
9	No.4-3	2.0051	978.0769

กรมวิชาการเกษตร

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ sterile cork borer เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากโคโลนี อายุ 14 วัน นำมาวางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่ได้หยด dsRNA ไว้ ที่ระดับความเข้มข้น 300 ng/mL ปริมาตร 10 µl ซึ่งทำให้เส้นใยราสามารถสัมผัสกับ dsRNA ที่ต้องการจะทดสอบ ซึ่งผลการวิเคราะห์การยับยั้งการเกิดโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 3-6) ดังตารางที่ 3-9 โดยพบว่า dsRNA-Cg มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด สามารถควบคุมการเจริญของราได้ถึง 51.67% รองลงมาคือ dsRNA-Pot และ dsRNA-Dcl1 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของราประมาณ 44.02% และ 22.86% ตามลำดับ



ภาพที่ 3-6 ลักษณะการเจริญของรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อยับยั้งด้วย dsRNA-Cg, dsRNA-Pot และ dsRNA-Dcl1 ที่ความเข้มข้น 300 ng/µl

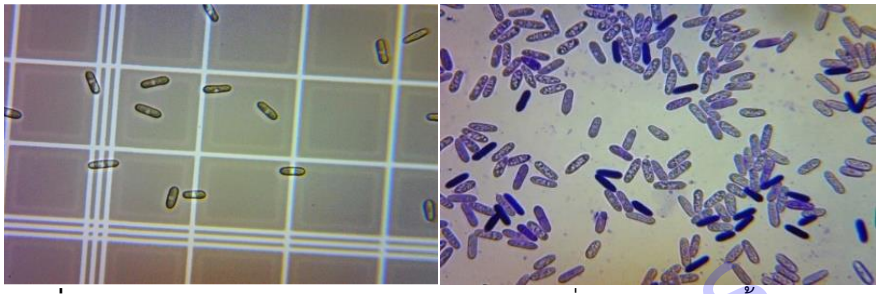
ตารางที่ 3-9 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน และประสิทธิภาพการควบคุมโรค (%) ของ dsRNA ที่ความเข้มข้น 300 ng/mL

สารที่ใช้ทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีรา (ซม.)*	ประสิทธิภาพการควบคุม (%)*
น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)	8.17 ± 0.09^{a}	0^{d}
dsRNA-Cg	3.95 ± 0.12^{d}	51.67 ± 1.61^{a}
dsRNA-Pot	4.57 ± 0.15^{c}	44.02 ± 2.25^{b}
dsRNA-Dcl1	6.30 ± 0.69^{b}	22.86 ± 9.29^{c}

*ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 5 ซ้ำ โดยค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันแต่มีตัวอักษรต่างกันแสดงค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ dsRNA ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญรา *C. gloeosporioides* บนผลพริกที่ถูกปลูกเชื้อด้วยสปอร์ปริมาณ 1×10^{6} spore/ml (ภาพที่ 3-7) โดยใช้ความเข้มข้นของ dsRNA-Cg, dsRNA-Pot และ dsRNA-Dcl1 ที่ระดับความเข้มข้น 300 ng/µl, 500 ng/µl และ 1000 ng/µl พบว่า dsRNA ที่

ระดับความเข้มข้นต่างกันมีผลทำให้การเจริญของรา *C. gloeosporioides* บนผลพริกต่างกัน โดย dsRNA-Cg 1,000 ng/µl สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด ส่งผลให้พริกมีระดับการเกิดโรค (disease index, %DI) เท่ากับ 14.44% รองลงมาคือ dsRNA-Pot 1,000 ng/µl และ dsRNA-Cg 500 ng/µl โดยจะทำให้พริกมีระดับการเกิดโรค (% DI) เท่ากับ 28.89% และ 38.89 ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์ระดับการเกิดโรคบนผลพริกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ดังตารางที่ 3-8 (ภาพที่ 3-9)

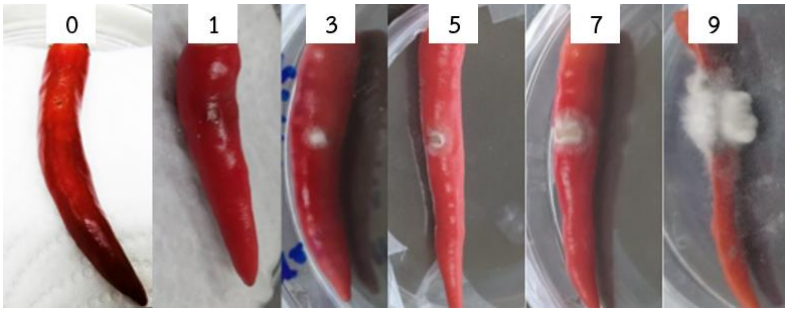


ภาพที่ 3-7 ลักษณะสปอร์รา *C. gloeosporioides* ที่ใช้ในการปลูกเชื้อบนผลพริก

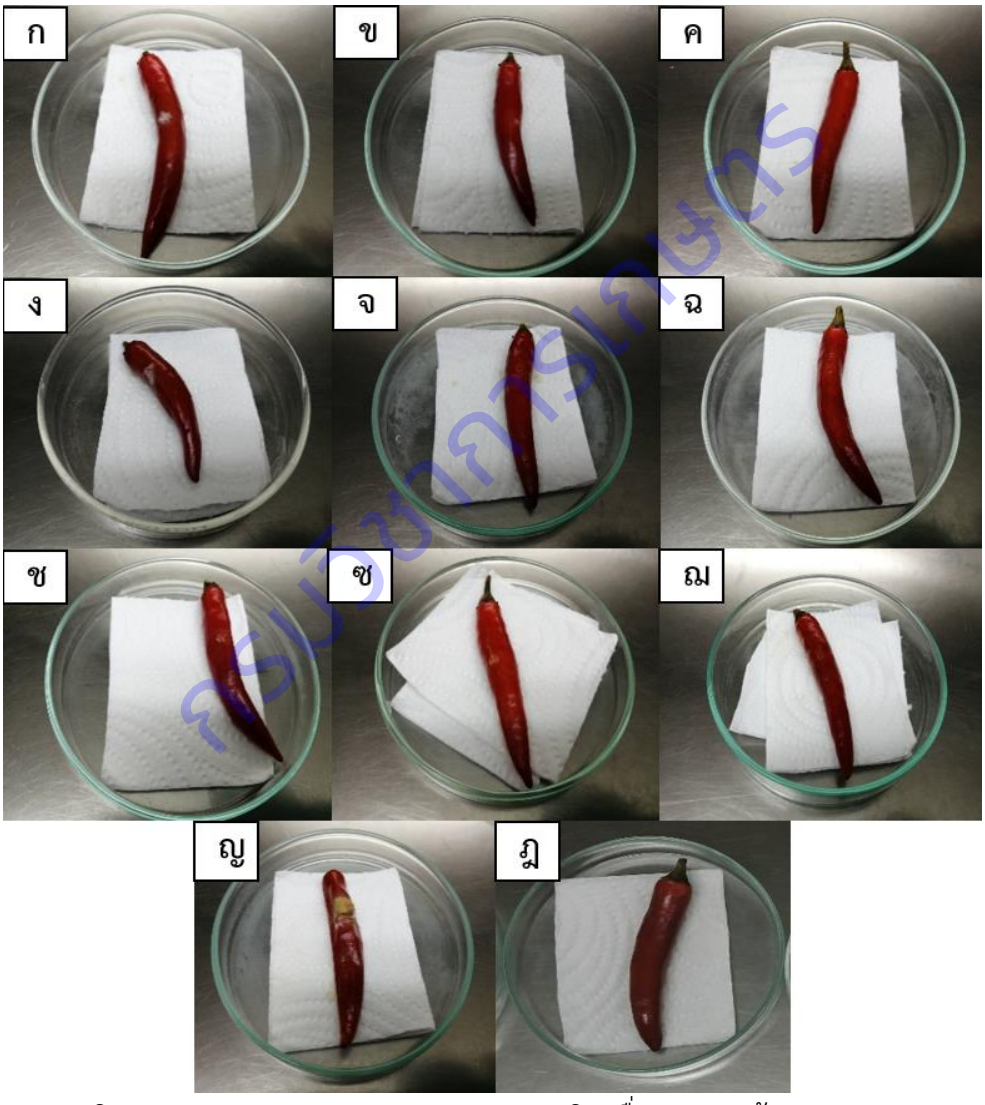
ตารางที่ 3-10 ระดับการเกิดโรคของพริกจากรา *C. gloeosporioides* (1×10^6 spore/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน

สารที่ใช้ทดสอบ	ระดับความรุนแรงของโรคบนผลพริก						ระดับการเกิดโรค (% DI)
	0	1	3	5	7	9	
น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)	0	0	0	1	2	7	88.89
dsRNA-Cg 300 ng/µl	0	0	3	4	2	1	57.78
dsRNA-Cg 500 ng/µl	1	3	2	2	1	1	38.89
dsRNA-Cg 1,000 ng/µl	5	2	2	1	0	0	14.44
dsRNA-Pot 300 ng/µl	0	0	1	3	5	1	68.89
dsRNA-Pot 500 ng/µl	0	1	3	4	1	1	51.11
dsRNA-Pot 1,000 ng/µl	2	3	2	2	1	0	28.89
dsRNA-Dcl1 300 ng/µl	0	0	2	2	6	1	74.44
dsRNA-Dcl1 500 ng/ µl	0	1	3	3	2	1	53.33
dsRNA-Dcl1 1,000 ng/µl	1	1	2	3	2	1	50

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3-8 การประเมินการเกิดโรคบนผลพริกโดยวัดขนาดของแผลบนผลพริกเพื่อแบ่งระดับการเกิดโรคบนผลพริกสุก ทั้ง 6 ระดับ (0-9 คะแนน) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Montri *et al*., 2009)

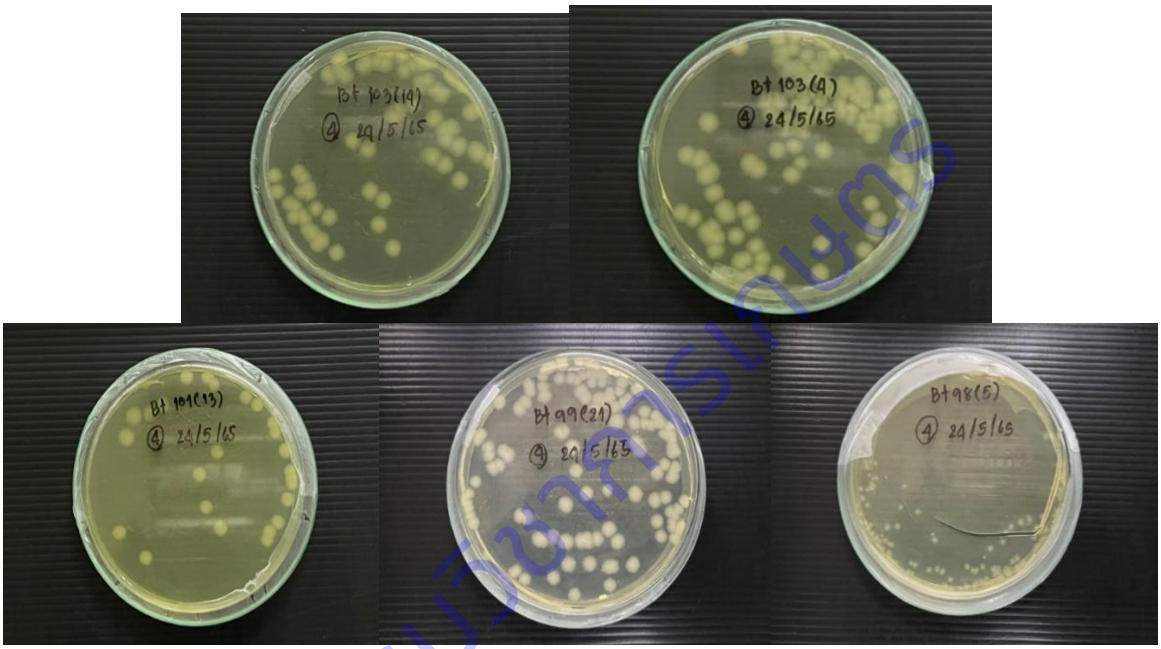


ภาพที่ 3-9 การเจริญของรา *C. gloeosporioides* บนผลพริกเมื่อควบคุมด้วย (ก) dsRNA-Cg 300 ng/µl (ข) dsRNA-Cg 500 ng/µl (ค) dsRNA-Cg 1,000 ng/µl (ง) dsRNA-Pot 300 ng/µl (จ) dsRNA-Pot 500 ng/µl (ฉ) dsRNA-Pot 1,000 ng/µl (ช) dsRNA-Dcl1 300 ng/µl (ซ) dsRNA-Dcl1 500 ng/µl (ฌ) dsRNA-Dcl1 1,000 ng/µl และ (ญ) น้ำกลั่น sterile เมื่อ (ฎ) คือพริกชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ

กรมวิชาการเกษตร

โครงการย่อยที่ 4 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนไซม์และไมโครแคปซูลจากจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช
กิจกรรมที่ 1 นวัตกรรมการผลิตไมโครแคปซูลโปรตีนจากแบคทีเรียบีทีเพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช
การทดลองที่ 1.1 พัฒนาการผลิตผลึกโปรตีนจากแบคทีเรียบีทีให้มีประสิทธิภาพสูงเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช
1. การคัดเลือกเชื้อ *B. thuringiensis*

คัดเลือก บีที ที่เก็บรวบรวมจากดินในประเทศไทยจำนวน 5 ไอโซเลทที่มีการรายงานว่ามีความจำเพาะต่อหนอนผีเสื้อโดยเลี้ยงในอาหารแข็ง NA แล้วถ่ายเชื้อ 1 ไอโซเลท ลงในอาหารเหลว NB 10 ml. เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^8-10^9 cfu/ml. วัดปริมาณของเซลล์เริ่มต้นของเชื้อที่เตรียมได้ (ภาพที่ 4-1)

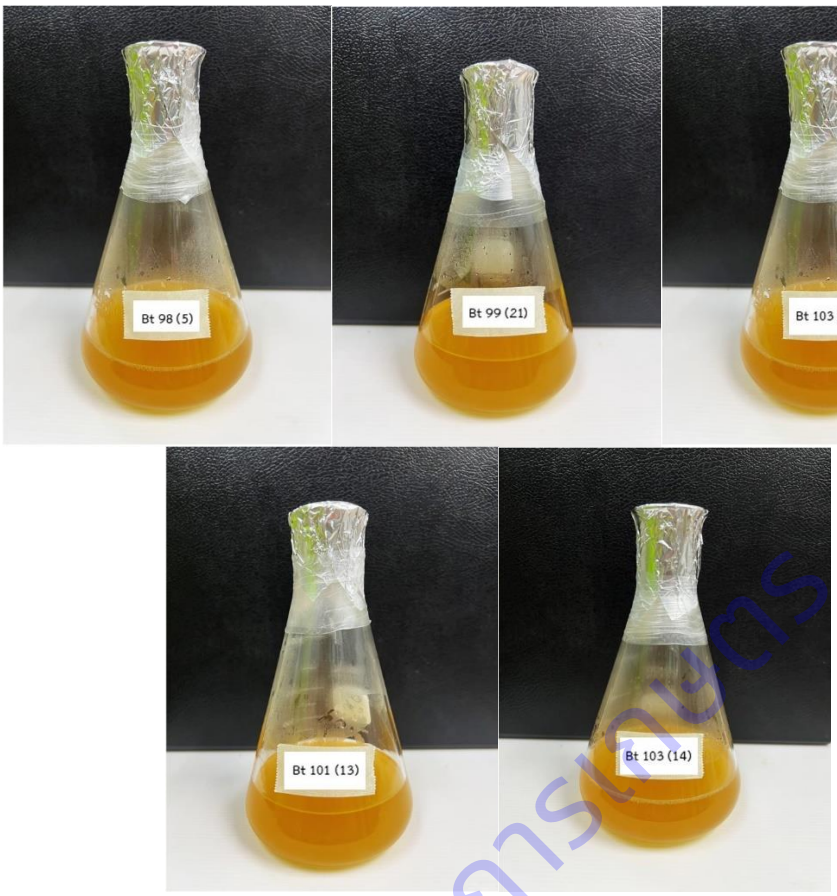


ภาพที่ 4-1 แสดงชนิดของบีทีที่คัดเลือกจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BT 98 (5), BT 99 (21), BT 101 (13), BT 103 (4) และBT 103

2. การเตรียมผลึกโปรตีนบีทีจาก *B. Thuringiensis*

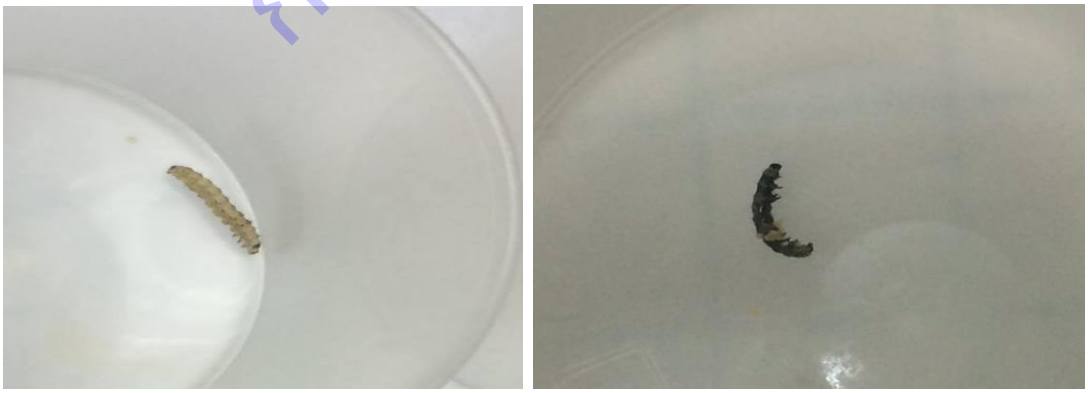
โดยเพาะเลี้ยงเชื้อบีทีในอาหาร CCY medium (Stewart *et al*., 1981) เขย่า 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน (ภาพที่ 4-2)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 4-2 แสดงการเลี้ยงบีทีในอาหารเหลวเพื่อเก็บผลึกโปรตีนของบีทีที่คัดเลือกจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BT 98 (5), BT 99 (21), BT 101 (13), BT 103 (4) และBT 103

3. การทดสอบประสิทธิภาพของผลึกโปรตีนบีทีกับหนอนกระทู้ผักในระดับห้องปฏิบัติการ (ภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4.3 แสดงการทดสอบผลึกโปรตีนบีทีกับหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera exigua*

กรมวิชาการเกษตร

จากการศึกษาผลการวัดการเจริญเติบโต และค่าความเข้มข้นผลึกโปรตีนของเชื้อบีทีที่ได้รับคัดเลือกจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BT 98 (5), BT 99 (21), BT 101 (13), BT 103 (4) และBT 103 (14) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และ CCY พบว่าไอโซเลท BT 99 (21) มีการเจริญเติบโต และค่าความเข้มข้นผลึกโปรตีนสูงที่สุด 3.132 2.461 และ 2.414 2.169 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ผลการวัดการเจริญเติบโต และค่าความเข้มข้นผลึกโปรตีนของเชื้อบีที

Isolate BT	ค่าความเข้มข้น (OD_{600}) nm				
	Blank	NB	CCY	NB(NaOH)	CCY(NaOH)
BT 98(5)	0	2.873	1.452	2.322	0.489
BT 99(21)	0	3.132	2.461	2.414	2.169
BT 101(13)	0	2.881	1.468	2.244	0.457
BT 103(4)	0	2.871	1.492	2.216	0.454
BT 103(14)	0	2.886	1.864	2.334	1.641

หมายเหตุ : Nutrient Broth (NB), CCY medium (CCY), Blank (น้ำกลั่น)

จากการศึกษาผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อบีทีที่ได้รับคัดเลือกจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ Bt 98 (5), Bt 99 (21), Bt 101 (13), Bt 103 (4) และBt 103 (14) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และ CCY ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม หลังจากหยดสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อบีทีลงบนอาหารเทียม 72 ชั่วโมง พบว่ามีสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียบีทีไอโซเลท Bt 99 (21) และBt 103 (14) เท่านั้นที่มีความสามารถในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก โดยไอโซเลท Bt 99 (21) และBt 103 (14) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CCY มีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเฉลี่ยสูงกว่าสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียบีทีที่เลี้ยงในอาหาร NB และชุดควบคุมไม่มีผลทำให้หนอนกระทู้ผักตาย ดังตารางที่ 4-2

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4-2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อบีทีในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในระดับห้องปฏิบัติการ

Isolate BT	อัตราการตายของหนอนกระทู้ผัก					
	อาหารเลี้ยงเชื้อ NB			อาหารเลี้ยงเชื้อ CCY		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
BT 98(5)	0	0	0	0	0	0
BT 99(21)	0	6.67	6.67	0	6.67	20
BT 101(13)	0	0	0	0	0	0
BT 103(4)	0	0	0	0	0	0
BT 103(14)	0	6.67	13.33	0	13.33	20
Control	0	0	0	0	0	0

ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลึกโปรตีนของเชื้อบีทีที่ได้รับคัดเลือกจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ Bt 98 (5), Bt 99 (21), Bt 101 (13), Bt 103 (4) และBt 103 (14) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และ CCY ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่าหลังจากหยดสารแขวนลอยผลึกโปรตีนลงบนอาหารเทียม 72 ชั่วโมง สารแขวนลอยผลึกโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียบีทีทั้ง 5 ไอโซเลท มีความสามารถในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก โดยไอโซเลท Bt 99 (21) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CCY มีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเฉลี่ยสูงที่สุด 46.67 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลึกโปรตีนของเชื้อบีทีในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในระดับห้องปฏิบัติการ

Isolate BT	อัตราการตายของหนอนกระทู้ผัก					
	อาหารเลี้ยงเชื้อ NB (NaOH)			อาหารเลี้ยงเชื้อ CCY (NaOH)		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
BT 98(5)	0	6.67	20	0	13.33	20
BT 99(21)	**13.33**	**26.67**	**26.67**	**26.67**	**40**	**46.67**
BT 101(13)	0	6.67	6.67	13.33	13.33	13.33
BT 103(4)	0	6.67	6.67	13.33	20	20
BT 103(14)	0	6.67	13.33	0	6.67	20
Control	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ : Nutrient Broth (NB), CCY medium (CCY), Control (น้ำกลั่น)

กรมวิชาการเกษตร

<u>การทดลองที่ 1.2</u> การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลหุ้มโปรตีนและสปอร์ของบีทีโดยใช้เทคนิค Encapsulation การผลิตปริมาณมาก

1. เพาะเลี้ยงเชื้อบีทีในอาหาร CCY medium (Stewart *et al*., 1981) ปริมาณมาก กวนที่ความเร็ว 1-300 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เก็บตะกอนโปรตีนแล้วนำไปสกัดแยกผลึกแล้วไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สูตรต่าง ๆ (ภาพที่ 4-4)

ภาพที่ 4-4 แสดงการเลี้ยงบีทีในอาหารเหลวเพื่อเก็บผลึกโปรตีน

2. การผลิตไมโครแคปซูล

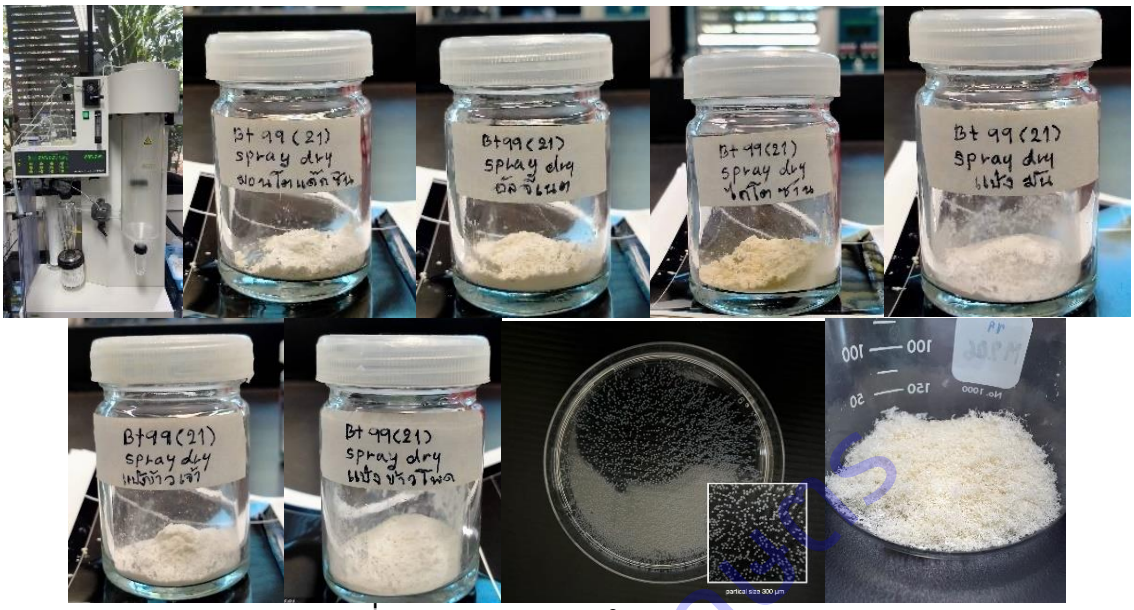
ทำการเตรียมสูตรสารแขวนลอยเพื่อผลิตไมโครแคปซูลชนิดห่อหุ้ม microencapsulated โดยแบ่งการทดลองเป็นกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ผลึกโปรตีนของบีที + น้ำมันเมล็ดทานตะวัน + สารละลายอัลจีเนต + สารลดแรงตึงผิว
กรรมวิธีที่ 2 ผลึกโปรตีนของบีที + น้ำมันเมล็ดทานตะวัน + แป้งมันสำปะหลัง + สารลดแรงตึงผิว
กรรมวิธีที่ 3 ผลึกโปรตีนของบีที + น้ำมันเมล็ดทานตะวัน + แป้งข้าวเจ้า + สารลดแรงตึงผิว
กรรมวิธีที่ 4 ผลึกโปรตีนของบีที + น้ำมันเมล็ดทานตะวัน + แป้งข้าวโพด + สารลดแรงตึงผิว
กรรมวิธีที่ 5 ผลึกโปรตีนของบีที + น้ำมันเมล็ดทานตะวัน + ไคโตซาน + สารลดแรงตึงผิว

กรมวิชาการเกษตร

การทำแห้งแบบพ่น (spray drying)

นำสูตรผสมทั้งหมดมาพ่นให้แห้งโดยเทคนิคสเปรย์ดรายน์ (spray drying) ได้ลักษณะผลิตภัณฑ์ (ภาพที่ 4-5)



ภาพที่ 4-5 สูตรผสมต่างๆ ในการทำ spray dry

3. การทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผัก นำผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลมาเลี้ยงแมลง โดยใช้หนอนกระทู้ผัก (Spodoptera exigua) ด้วยอาหารเทียมที่หยดไมโครแคปซูลสูตรต่าง ๆ ปริมาณกล่องละเท่า ๆ กัน ในกล่องเลี้ยงแมลงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว มีฝาครอบ ตัดอาหารเทียมให้มีขนาด 5 มิลลิเมตร ปล่อยหนอนกระทู้ผักกล่องละ 5 ตัว นับอัตราการตายที่ 7 วันหลัง ได้รับเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ RCBD ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ไมโครแคปซูลสูตร สารละลายอัลจีเนต
กรรมวิธีที่ 2 ไมโครแคปซูลสูตรแป้งมันสำปะหลัง
กรรมวิธีที่ 3 ไมโครแคปซูลสูตรแป้งข้าวเจ้า
กรรมวิธีที่ 4 ไมโครแคปซูลสูตรแป้งข้าวโพด
กรรมวิธีที่ 5 ไมโครแคปซูลสูตรไคโตซาน
กรรมวิธีที่ 6 การใช้น้ำกลั่น
กรรมวิธีที่ 7 การใช้ผลึกโปรตีนของบีที

ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์หุ้มผลึกบีทีในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ดังตารางที่ 4 ที่พบว่าหลังจากหยดสารแขวนลอยผลิตภัณฑ์หุ้มผลึกบีทีลงบนอาหารเทียม 6 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์หุ้มผลึกบีทีทั้ง 6 ชนิด มีความสามารถในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก การใช้ผลึกโปรตีนของบีที มีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเฉลี่ยสูงที่สุด 93.34 เปอร์เซ็นต์และการใช้ผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลสูตรไคโตซาน มีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเฉลี่ย 80 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4-4

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4-4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์หุ้มผลึกบีทีในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในระดับห้องปฏิบัติการ

แบบของสารห่อหุ้ม	2 วัน	4 วัน	6 วัน
กรรมวิธีที่ 1 ไมโครแคปซูลสูตร สารละลายอัลจีเนต	13.33	46.67	46.67
กรรมวิธีที่ 2 ไมโครแคปซูลสูตรแป้งมันสำปะหลัง	6.67	46.67	46.67
กรรมวิธีที่ 3 ไมโครแคปซูลสูตรแป้งข้าวเจ้า	6.67	46.67	46.67
กรรมวิธีที่ 4 ไมโครแคปซูลสูตรแป้งข้าวโพด	6.67	46.67	46.67
กรรมวิธีที่ 5 ไมโครแคปซูลสูตรไคโตซาน	13.33	46.67	80
กรรมวิธีที่ 6 การใช้น้ำกลั่น	0	0	0
กรรมวิธีที่ 7 การใช้ผลึกโปรตีนของบีที	26.67	46.67	93.34

กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนแคปซูเลตไคติเนสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลองที่ 2.1 เทคนิคการผลิตขยายไคติเนสจากราเมทาไรเซียมในระดับถังหมัก

ทำการผลิตเอนไซม์จากเชื้อเมทาไรเซียม โดยนำเชื้อเมทาไรเซียมมาเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นเก็บสปอร์เชื้อราเตรียม stock ให้ได้ 107 สปอร์/มิลลิลิตร เติมไคติน 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB นำไปเข้าใส่ใน spinner flask ขนาด 3 ลิตร ตามกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อาหารเหลว 1.5 ลิตร + ไคติน 1%. +เมทาไรเซียม 1 มล. ระยะเวลา 3 วัน

กรรมวิธีที่ 2 อาหารเหลว 1.5 ลิตร + ไคติน 1%. +เมทาไรเซียม 1 มล. ระยะเวลา 5 วัน

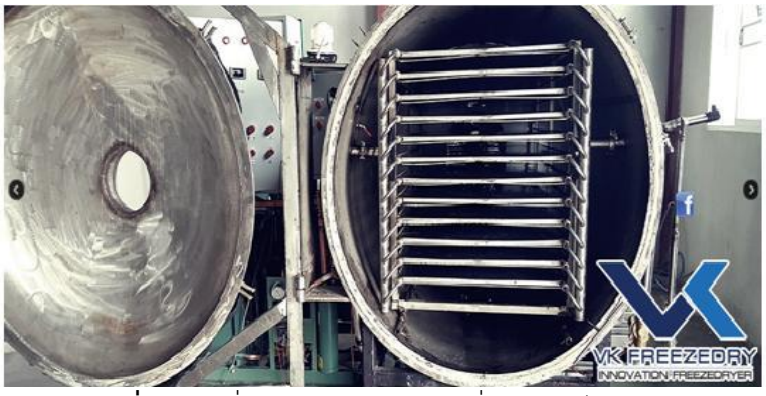
กรรมวิธีที่ 3 อาหารเหลว 3.0 ลิตร + ไคติน 1% +เมทาไรเซียม 1 มล. ระยะเวลา 3 วัน

กรรมวิธีที่ 4 อาหารเหลว 3.0 ลิตร + ไคติน 1% +เมทาไรเซียม 1 มล. ระยะเวลา 5 วัน

ภาพที่ 4-6 การเตรียมเอนไซม์ไคติเนสใน spinner flask

จากนั้นนำไปนำปั่นเหวี่ยงที่ 1000 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บน้ำใส ส่งไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง VK freezedry โดยใช้สภาวะดังนี้ Condenser - 40 C, Temp product -20 C, Temp product out 28 C Pressure vacuum 30 pa, Runtime 72 hr

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 4-7 เครื่อง VK Freezedry ที่ทำให้เอนไซม์แห้ง

เมื่อได้ตัวอย่างแห้งของเอนไซม์แต่ละกรรมวิธีแล้วนำมาวัดค่า activity ของไคติเนสที่ได้ ด้วย chitinase activity kit ดังตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ค่า activity ของไคติเนสที่ได้

ที่	กรรมวิธี	ค่าที่วัดได้
1	ไคติเนส (PDB 3 ml เขย่าเชื้อ 3 วัน)	1.14
2	ไคติเนส (PDB 3 ml เขย่าเชื้อ 5 วัน)	1.23
3	ไคติเนส (PDB 1.5 ml เขย่าเชื้อ 3 วัน)	1.38
4	ไคติเนส (PDB 1.5 ml เขย่าเชื้อ 5 วัน)	2.27

ในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ทำการผลิตใน spinner flask ในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนผสมของไคตินปริมาตร 1.5 และ 3 ลิตร ที่ระยะเวลา 3 และ 5 วัน ทำเอนไซม์ให้แห้งแล้ววัด activity ของไคติเนส แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผัก พบว่าหนอนที่ได้รับเอนไซม์ไคติเนสจะมีขนาดเล็กกว่าวิธีควบคุม และมีน้ำหนักตัวน้อยกว่า และไคติเนสมีผลทำให้หนอนตาย กรรมวิธีที่ทำให้หนอนตายมากที่สุดคือการผลิตไคติเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB 3 ml เขย่าเชื้อ 5 วัน ทำให้หนอนตายถึง 40% ในขณะที่วิธีควบคุมไม่มีหนอนตาย ดังตารางที่ 4-6

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4-6 ขนาดหนอนและน้ำหนักหนอนกระทู้วัย 2 หลังจากได้รับเอนไซม์ไคติเนส 1 unit/ml เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเปอร์เซนต์การตายหลังสิ้นสุดการทดลอง (เดือน กรกฎาคม 2565)

ที่	กรรมวิธี	ขนาดหนอน ค่าเฉลี่ย (cm)	น้ำหนักหนอน ค่าเฉลี่ย (กรัม)	% การตาย
1	ไคติเนส (PDB 3 ml เขย่าเชื้อ 3 วัน)	2.42 abc	0.21 ab	22.5 abc
2	ไคติเนส (PDB 3 ml เขย่าเชื้อ 5 วัน)	2.27ab	0.16 a	40.0 a
3	ไคติเนส (PDB 1.5 ml เขย่าเชื้อ 3 วัน)	2.55 bc	0.30 bc	17.5 abc
4	ไคติเนส (PDB 1.5 ml เขย่าเชื้อ 5 วัน)	2.27 ab	0.19 a	30.0 ab
5	วิธีควบคุม (น้ำ)	2.68 C	0.32 c	0 c

การทดลองที่ 2-2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนแคปซูเลตไคติเนสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก

ในการผลิตเอนแคปซูเลตไคติเนสได้ทำการทดสอบเบื้องต้น โดยทำแอนแคปซูเลชั่นที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ไคติเนสกับ Maltodextrin โดยพ่นแห้งแบบฝอย แล้วนำไปวัด activity เปรียบเทียบกับกรรมวิธีผลิตไคติเนสแล้วทำให้แห้งแบบ freeze dry และไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักพบว่าเอนแคปซูเลตไคติเนสมีผลทำให้หนอนกระทู้ผักตายได้ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติให้ค่าแต่ละกรรมวิธีไม่ต่างกัน แต่จะต่างจากวิธีควบคุม ดังตารางที่ 4-7, 4-8

ตารางที่ 4-7 ค่า activity ของไคติเนสที่ได้ ในเดือนสิงหาคม 2565

ที่	**กรรมวิธี**	**ค่าที่วัดได้**
1	ไคติเนส (เขย่าเชื้อ 3 วัน) +maltodrexrin ทำ spray dry	0.796
2	ไคติเนส (เขย่าเชื้อ 5 วัน) +maltodrexrin ทำ spray dry	0.848
3	ไคติเนส (เขย่าเชื้อ 3 วัน) ทำ Freeze dry	0.837
4	ไคติเนส (เขย่าเชื้อ 3 วัน) ทำ Freeze dry	0.976

ตารางที่ 4-8 ขนาดหนอนและน้ำหนักหนอนกระทู้วัย 2 หลังจากได้รับเอนไซม์ไคติเนส 1 unit/ml เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเปอร์เซนต์การตายหลังสิ้นสุดการทดลอง (เดือน สิงหาคม 2565)

ที่	**กรรมวิธี**	**ขนาดหนอน ค่าเฉลี่ย (cm)**	**น้ำหนักหนอน ค่าเฉลี่ย (กรัม)**	**% การตาย**
1	ไคติเนส (เขย่าเชื้อ 3 วัน) + maltodrexrin ทำ spray dry	2.38 abc	0.20 a	12.5 abc
2	ไคติเนส (เขย่าเชื้อ 5 วัน) + maltodrexrin ทำ spray dry	2.25ab	0.19 a	15.0 abc
3	ไคติเนส (เขย่าเชื้อ 3 วัน) ทำ Freeze dry	2.57 bc	0.25 abc	27.5 abc
4	ไคติเนส (เขย่าเชื้อ 5 วัน) ทำ Freeze dry	2.14 a	0.16 a	7.5 bc
5	วิธีควบคุม (น้ำ)	2.68 C	0.32 c	0 c

กรมวิชาการเกษตร

จากนั้นได้ทำการทดสอบกับ กับ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง maltodextrin เกาลีน Aluminium silicate เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักพบว่าเอนแคปซูเลตไคติเนสที่มีผลทำให้หนอนกระทู้ผักตายสูงสุดคือ เกาลีน Aluminium silicate รองลงมาคือไคติเนสผสมกับ แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง แต่แป้งข้าวโพดกับแป้งมันสำปะหลังจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ ดังตารางที่ 4-9

ตารางที่ 4-9 ขนาดหนอนและน้ำหนักหนอนกระทู้วัย 2 หลังจากได้รับเอนไซม์ไคติเนส 1 unit/ml เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเปอร์เซนต์การตายหลังสิ้นสุดการทดลอง (เดือน สิงหาคม 2565)

ที่	กรรมวิธี	ขนาดหนอน ค่าเฉลี่ย (cm)	น้ำหนักหนอน ค่าเฉลี่ย (กรัม)	% การตาย
1	ไคติเนส + แป้งข้าวเจ้า	2.70 bc	0.27 bc	7.5 ab
2	ไคติเนส + แป้งข้าวโพด	2.43 cd	0.20 c	22.5 ab
3	ไคติเนส + แป้งมันสำปะหลัง	2.40 cd	0.19 c	22.5 ab
4	ไคติเนส + maltodextrin	2.77 bc	0.33 b	20.0 ab
5	ไคติเนส + เกาลีน	2.76 bc	0.33 b	25.0 b
6	ไคติเนส +Aluminium Silcate	2.82 b	0.29 bc	25.0 b
7	ไคติเนส (เขย่าเชื้อ 3 วัน)	2.63 bcd	0.25 bc	12.5 ab
8	ไคติเนส (เขย่าเชื้อ 5 วัน)	2.30 d	0.19 c	15.5 ab
9	วิธีควบคุม (น้ำ)	3.38 a	0.43 a	0 a

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 3 การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์เพคติเนสควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 3.1 การพัฒนาการผลิตขยายเพคติเนสจากราไตรโคเดอร์มาในระดับถังหมัก

1. จากค่าอัตราส่วนการสร้างวงใส (clear zone) ดังตารางที่ 4-10 และโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (ค่า HC) ที่ประกอบด้วยเพคตินและ Czapek medium ด้วยวิธีวิเคราะห์ Dual culture assay ไอโซเลท TC1 ให้ค่า HC สูงสุด ได้เอนไซม์เพคติเนสชนิดผงด้วยวิธีการทำให้แห้งด้วยความเย็นจากราไตรโคเดอร์มาไอโซเลท TC1 ในระดับถังหมัก (Freeze Dryer, FD200 Eastern Herb and VK, Buchi Germany) ภายใต้สภาวะเครื่อง ได้แก่ Temp product -20C Condenser -40C Temp Product out 28C Pazzervaccum 30pa ผลการวิเคราะห์ราไตรโคเดอร์มาไอโซเลท TC1 ระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนบนริเวณยีน ITS ในฐานข้อมูล NCBI, (หมายเลขเข้าถึง) GenBank accession number OP808224 และ OP808225)

2. จากการทดลอง ต้นกล้วยไม้ในกรรมวิธีพ่นด้วยเอนไซม์ ไม่พบแสดงอาการตายจากโรคเน่าดำ แต่แสดงลักษณะโรคเน่าดำหรือโรคดอกเน่าดำที่ใบกล้วยไม้ ส่วนกรรมวิธีปลูกเชื้อสาเหตุโรคไฟทอปธอร่า พบว่า แสดงรอยโรคที่รุนแรงกว่า

ตารางที่ 4-10 การผลิตเอนไซม์เพคติเนส จากเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 23 ไอโซเลต บนอาหาร Czapek-Dox agar

Isolate number	RANKS	Average[1]
T-1	1	7.73 a[1/]
T-2	8	6.40 abc
T-3	14	5.60 bc
T-4	2	6.70 ab
T-6	3	6.67 ab
T-7	3	6.67 ab
T-10	16	5.27 cd
T-12	6	6.53 abc
T-13	11	6.17 bc
T-16	15	5.40 bc
T-17	13	5.67 bc
T-18	18	1.35 e
T-19	18	1.35 e
T-20	17	4.00 d
T-21	12	5.83 bc
T-22	10	6.27 bc
T-23	5	6.60 abc
T-24	4	6.63 abc
T-25	9	6.37 bc
T-26	7	6.50 abc
T-27	3	6.67 ab
T-28	11	6.17 bc
T-29	2	6.70 ab

กรมวิชาการเกษตร

A

B C

ภาพที่ 4-8 ภาพ A แสดงลักษณะโคโลนี (colonial morphology) ของราไฟทอปธอร่ากล้วยไม้ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งวุ้นแครอท (CA agar) ภาพ B แสดงลักษณะเส้นใยของราไฟทอปธอร่าบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งวุ้นพีดีเอ (PDA) ภาพ C แสดงลักษณะโคโลนีของราไตรโคเดอร์มาไอโซเลท TC1

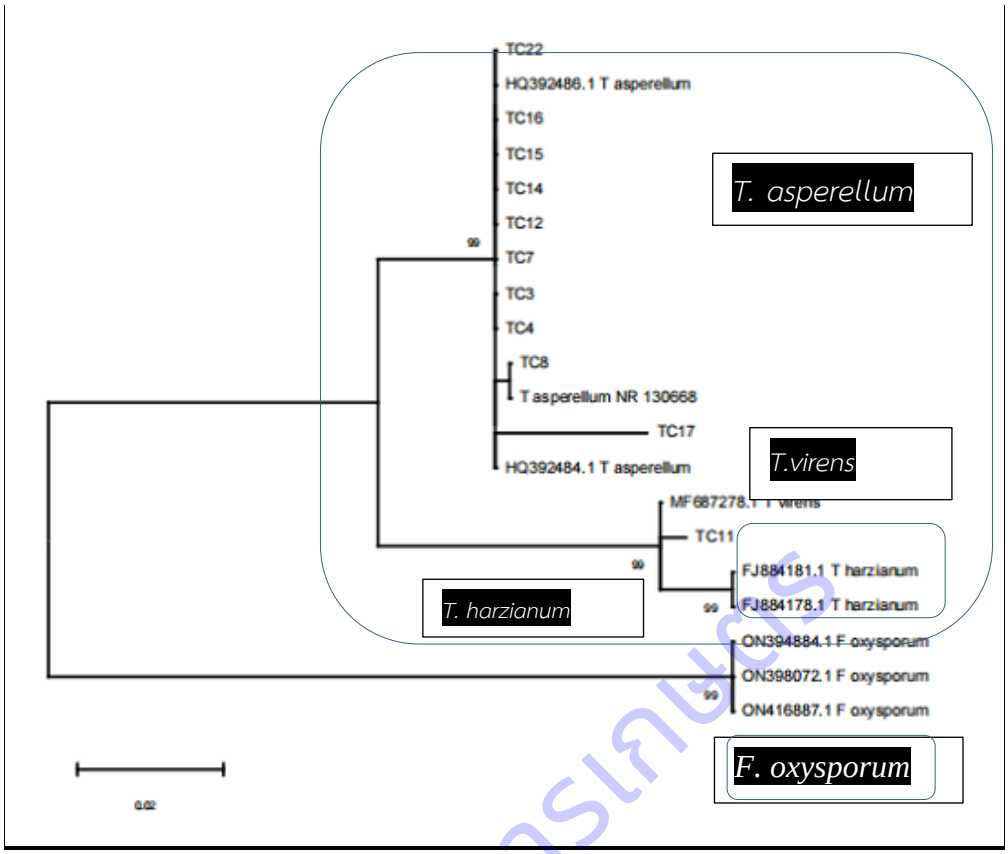
ภาพที่ 4-9 ภาพ A ลักษณะรอยโรคภายหลังทดสอบการปลูกเชื้อไฟทอปธอร่าบนใบกล้วยไม้ ภาพ B, C, D แสดงกรรมวิธีทดสอบการใช้เอนไซม์เพคติเนสควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเน่าดำกล้วยไม้ ภาพ E ปลูกเชื้อไฟทอปธอร่า และ ภาพ F พ่นด้วยน้ำเปล่า

3. ผลการจำแนกชนิดของราไตรโคเดอร์มาที่ใช้ศึกษา ได้แก่ *Trichoderma asperellum* มีความยาวของชิ้นยีนส่วนบริเวณ small subunit 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1 และ large subunit 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, complete sequence (GenBank accession number OP808224 ถึง OP799962) ดังตารางที่ 4-11

ตารางที่ 4-11 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ที่ได้จากโปรแกรม BLAST ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอยีน ITS ของไตรโคเดอร์มา

หมายเลข	หมายเลขเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS	จีนัส สปีซีส์	แหล่งที่มา
TC1A	OP808224	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC1-1A	OP808225	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC4	OP799948	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC4-1	OP799949	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC7	OP799950	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC8	OP799951	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC8-1	OP799952	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC9	OP799953	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC9-1	OP799954	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC11	OP799955	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC11-1	OP799956	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC15	OP799957	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC15-1	OP799958	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC16	OP799959	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC16-1	OP799960	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC22	OP799961	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550
TC22-1	OP799962	*Trichoderma asperellum*	Tadsanaporn *et al*., 2550

ศรีนครินทรวิโรฒ



ภาพที่ 4-10 แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อปฏิปักษ์ไตรโคเดอร์มาที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยวิธี neighbor joining (NJ) ด้วยโปรแกรม MEGA 11.0 กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 100

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4-12 การวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยเอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

ขนาดรอยโรคภายหลังการพ่นด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 5g/L ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 1	เอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 5g/L คลุมด้วยถุงความชื้นนาน 48 ชม.					
ต้นที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ผลรวมรอยโรค	ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4		4.57
1	1.00	1.00	1.20	1.00	4.20	1
2	0.80	1.20	1.50	1.00	4.50	1.1
3	1.00	1.00	0.80	1.00	3.80	1
4	1.00	1.00	1.20	1.00	4.20	1
5	1.00	0.90	1.00	1.00	3.90	1
6	1.20	1.00	1.20	1.10	4.50	1.1
7	1.00	1.20	1.00	1.00	4.20	1
8	1.30	1.10	1.50	1.00	4.90	1.2
9	1.10	1.10	0.90	1.00	4.10	1
10	1.00	0.60	0.70	0.90	3.20	0.8
ค่าเฉลี่ย	1.04	1.01	1.10	1.00	4.15	4.57

ตารางที่ 4-13 การวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

ขนาดรอยโรคภายหลังการพ่นด้วยเอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 10g/L ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

กรรมวิธี	เอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 10g/L คลุมด้วยถุงความชื้นนาน 48 ชม.หน่วยเซนติเมตร (ซม.)					
ต้นที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ผลรวมรอยโรค	ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4		5.1
1	1.0	1.1	1.0	1.1	4.2	1
2	1.0	1.0	1.0	1.0	4.0	1
3	1.2	1.4	1.2	1.1	4.9	1.2
4	1.4	1.3	1.3	1.1	5.1	1.2
5	1.0	1.0	1.4	1.0	4.4	1.1
6	1.3	1.2	1.5	1.0	5.0	1.25
7	1.0	1.0	1.0	1.2	4.2	1.1
8	1.5	1.2	1.3	1.2	5.2	1.3
9	1.2	1.4	1.2	1.0	4.8	1.2
10	1.5	1.0	1.4	1.5	5.4	1.3
ค่าเฉลี่ย	1.21	1.16	1.23	1.12	4.72	5.10

กองวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4-14 การวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

ขนาดรอยโรคภายหลังการพ่นด้วยเอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 15g/L ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 3	เอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 15g/L คลุมด้วยถุงความชื้นนาน 48 ชม.					
ต้นที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ผลรวมรอยโรค	ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4		4.6
1.0	1.5	1.3	1.0	1.2	5.0	1.25
2.0	0.8	0.9	1.0	7.0	3.7	0.9
3.0	1.0	1.0	1.0	7.0	4.0	1
4.0	1.2	1.2	0.8	0.7	3.9	1
5.0	1.0	1.0	0.7	1.0	3.7	0.9
6.0	0.7	1.2	0.8	1.0	3.7	0.9
7.0	1.1	1.2	0.8	1.0	4.1	1
8.0	1.0	1.0	1.2	1.2	4.4	1.1
9.0	1.0	0.8	0.8	1.0	3.6	0.9
10.0	1.3	1.0	0.8	1.0	4.1	1
ค่าเฉลี่ย	1.06	1.06	0.89	2.21	4.02	4.60

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4-15 ขนาดของแผลที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

กรรมวิธีที่ 4	**กรรมวิธีปลูกเชื้อไฟทอปธอร่านาน 48 ชม.**					
	กรรมวิธีปลูกเชื้อสาเหตุโรค					
ต้นที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ผลรวมรอยโรค	ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4		4.7
1*	1.0	1.0	1.2	1.0	4.2	1.1
2*	1.0	1.0	1.1	1.3	4.4	1.1
3*	1.5	1.2	0.9	1.1	4.6	1.2
ค่าเฉลี่ย	1.17	1.07	1.07	1.13	4.40	4.70

ตารางที่ 4-16 การวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 6 วัน และหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

ขนาดรอยโรคภายหลังการพ่นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 5 g/L ที่ระยะเวลา 6 วัน

กรรมวิธีที่ 1	เอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 5g/L คลุมด้วยถุงความชื้น 48 ชม.					
ต้นที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ผลรวมรอยโรค	ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4		4.57
1	1.20	1.40	1.40	1.10	5.10	1.27
2	1.10	1.20	1.50	1.00	4.80	1.2
3	1.20	1.10	1.00	1.00	4.30	1.0
4	1.10	1.30	1.20	1.20	4.80	1.2
5	1.20	1.10	1.10	1.10	4.50	1.1
6	1.20	1.20	1.20	1.20	4.80	1.2
7	1.10	1.40	1.00	1.00	4.50	1.1
8	1.30	1.20	1.50	1.20	5.20	1.3
9	1.20	1.20	1.00	1.00	4.40	1.1
10	1.00	0.80	1.00	1.00	3.80	0.95
เฉลี่ย	1.16	1.19	1.19	1.08	4.62	4.57

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4-17 การวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 6 วัน และหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

ขนาดรอยโรคภายหลังการพ่นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 10 g/Lที่ระยะเวลา 6 วัน

กรรมวิธีที่	เอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 10g/L หน่วยเซนติเมตร (ซม.)					
ต้นที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ผลรวมรอยโรค	ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4		5.1
1	1.1	1.2	1.3	1.3	4.9	1.2
2	1.1	1.2	1.2	1.2	4.7	1.1
3	1.5	1.4	1.4	1.2	5.5	1.3
4	1.5	1.3	1.5	1.3	5.6	1.4
5	1.2	1.2	1.5	1.2	5.1	1.2
6	1.4	1.3	1.5	1.2	5.4	1.3
7	1.2	1.2	1.2	1.2	4.8	1.2
8	1.5	1.3	1.3	1.2	5.3	1.3
9	1.2	1.4	1.2	1.1	4.9	1.2
10	1.5	1.0	1.5	1.7	5.7*	1.4
ค่าเฉลี่ย	1.32	1.25	1.36	1.26	5.19	5.10

ตารางที่ 4-18 การวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 6 วัน และหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

ขนาดรอยโรคภายหลังการพ่นด้วยเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 15 g/L ที่ระยะเวลา 6 วัน

กรรมวิธีที่ 3	เอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 15g/L					
ต้นที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ผลรวมรอยโรค	ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5.4	4.6
1	1.5	1.3	1.1	1.5		1.3
2	1.1	1.1	1.2	1.0	4.4	1.1
3	1.3	1.2	1.2	1.2	4.9	1.2
4	1.3	1.2	1.1	1.0	4.6	1.1
5	1.2	1.3	1.1	1.0	4.6	1.1
6	1.0	1.5	1.1	1.2	4.8	1.2
7	1.5	1.2	1.1	1.2	5.0	1.25
8	1.3	2.0	1.2	1.2	5.7	1.4
9	1.0	1.0	0.9	0.9	3.8	1
10	1.3	1.0	0.8	1.0	4.1	1
ค่าเฉลี่ย	1.250	1.280	1.080	1.120	4.730	4.60

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4-19 ผลจากการวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

ขนาดรอยโรคภายหลังการปลูกเชื้อไฟทอปธอร่าที่ระยะเวลา 6 วัน

กรรมวิธีที่ 4						
ต้นที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ใบที่	ผลรวมรอยโรค	ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4		4.7
1*	1.1	1.1	1.2	1.2	4.6	1.15
2*	1.0	1.0	1.5	1.3	4.8	1.20
3*	2.0	1.3	1.3	1.1	5.7	1.43
4	1.3	1.1	1.3	1.2		1.45
ค่าเฉลี่ย	1.30	1.10	1.30	1.20	5.03	4.70

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
4. ต้นแบบผลิตภัณฑ์หรือเทคโนโลยี/กระบวนการใหม่หรือนวัตกรรมทางสังคม 4.4 เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ระดับห้องปฏิบัติการ	5	กระบวนการใหม่	4. ต้นแบบผลิตภัณฑ์หรือเทคโนโลยี/กระบวนการใหม่หรือนวัตกรรมทางสังคม 4.4 เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ระดับห้องปฏิบัติการ	7	กระบวนการใหม่	1. สายพันธุ์จุลินทรีย์ วิธีการเลี้ยงและปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิก (ภาคผนวก 2) 2. สายพันธุ์จุลินทรีย์และวิธีการผลิตกรดอินโดลแอซีติกในปริมาณสูง (ภาคผนวก 2) 3. วิธีการสกัด คุณสมบัติทางกายภาพ และกลไกการออกฤทธิ์ของสารชีวภาพจากสาหร่าย (สารชีวภาพอัลจีเนตจากสาหร่ายทุ่น และสารชีวภาพคาราจีแนนจากสาหร่ายมงกุฎหนาม) ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและความแข็งแรงในพริก (ภาคผนวก 2) 4. การใช้ประโยชน์จากอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์เพื่อการประยุกต์ใช้ทางการเกษตร (โดยการผลิต exogenous dsRNA เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริก) (ภาคผนวก 2)	ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ และกรรมวิธีการกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิก ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพ และวิธีการผลิตกรดอินโดลแอซีติก ได้วิธีการสกัดสารชีวภาพอัลจีเนตและคาราจีแนน และการกระตุ้นการเจริญเติบโตและความแข็งแรงในพริก โดยสามารถกระตุ้นการเพิ่มปริมาณโปรตีนในพริกพร้อมทั้งกระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโอมเนียไลเอสได้ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ช่วยเพิ่มความสูงกับขนาดทรงพุ่มของต้นพริก ได้วิธีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์เพื่อการผลิต dsRNA ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์ (RNAi) ในด้านการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
						5. กรรมวิธีการผลิตผลึกโปรตีนบีทีจากเชื้อ *B. thuringiensis* (ภาคผนวก 2)	ได้วิธีการเลี้ยงบีทีในอาหารเหลวเพื่อเก็บผลึกโปรตีน จากเชื้อ *B. thuringiensis*
						6. กรรมวิธีการผลิตเอนไซม์ไคติเนส จากจุลินทรีย์ (ภาคผนวก 2)	ได้วิธีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสในอาหารที่มีส่วนผสมของไคตินเป็นองค์ประกอบ
						7. กรรมวิธีการผลิตเอนไซม์เพคติเนส จากจุลินทรีย์ (ภาคผนวก 2)	3. ผลิตเอนไซม์เพคติเนสในระดับถังหมัก และผ่านกรรมวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dry)

กรมวิชาการเกษตร

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
- กรมวิชาการเกษตร มีองค์ความรู้เกี่ยวกับเทคโนโลยีการผลิตกรดอินโดลแอซีติกซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นสารชีวภาพทางเลือกเพื่อการใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรต่อไป - นักวิจัย หน่วยงานภาครัฐและเอกชน สามารถนำองค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีการผลิตและกระบวนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบไปพัฒนาต่อยอดการผลิตกรดอินโดลแอซีติกสารชีวภาพอื่นๆต่อไป	2568-2570

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

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านเศรษฐกิจ : ลดต้นทุนการใช้สารเคมีในการควบคุมโรค เป็นทางเลือกหนึ่งในการปลูกพืชที่มีประสิทธิภาพ ทำให้เกษตรกรสามารถผลิตพริกไร้สารปนเปื้อน ผลผลิตพริกที่ได้มีคุณภาพ สวยงาม ปลอดภัย ปราศจากปัญหาโรคแอนแทรคโนส ส่งผลให้ราคาผลผลิตสูงขึ้น และการใช้สารชีวภัณฑ์และสารทดแทนสารเคมีเป็นเกษตรที่มีความปลอดภัย ไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพเกษตรกรและผู้บริโภค ส่งเสริมให้เกษตรกรมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น ซึ่งองค์ความรู้ด้านการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตสารชีวภาพเพื่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนส สามารถเผยแพร่สู่สาธารณชนเพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์ ทั้งยังเป็นต้นแบบในการพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ	2570
ด้านสังคม :	
ด้านสิ่งแวดล้อม :	

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

กรมวิชาการเกษตร

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการ/กระบวนการผลักดันงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (โปรดแนบหลักฐานเชิงประจักษ์การนำผลงานไปใช้ประโยชน์)

1. เทคโนโลยีการผลิต IAA และ ABA สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการผลิตในระดับ large scale และนำไปสู่การใช้ประโยชน์ทั้งในภาคการเกษตร เป็นทางเลือกในการช่วยทดแทนและลดปริมาณการใช้สารเคมีเกษตร

2. กระบวนการใหม่ในการผลิต exogenous dsRNA เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริก ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์ (RNAi) โดยโครงการฯ ได้จัดทำคู่มือแสดงกระบวนการผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ หรือ dsRNA เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกด้วยวิธี *In vitro* transcription (ภาคผนวกที่ 2) เพื่อเป็นคู่มือในการผลิต dsRNA ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ ด้านวิชาการ โดย นักวิชาการเกษตร อาจารย์ นักศึกษา นักวิชาการ และผู้สนใจด้านวิชาการ อย่างไร สามารถนำองค์ความรู้จากคู่มือแสดง

กระบวนการใหม่ระดับห้องปฏิบัติการในการผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ หรือ dsRNA เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริก ประยุกต์ใช้ในงานวิชาการกับพืชชนิดอื่นๆ

3. หน่วยงานมีองค์ความรู้ในด้านการผลิตสารชีวภาพ ที่จะสามารถนำไปต่อยอดและขยายผลเพื่อเป็นทางเลือกให้กับเกษตรกร ในการใช้สารชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ช่วยเพิ่มศักยภาพของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

4. หน่วยงานมีองค์ความรู้ที่สามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยสู่สาธารณชน เพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์ ทั้งยังเป็นแนวทางในการนำองค์ความรู้ที่ได้ไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยต่อไป

กลุ่มเป้าหมาย คือ หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ เกษตรกร นักวิจัย นักวิชาการกรมวิชาการเกษตร บริษัทเอกชน ฯลฯ

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผลและอภิปรายผล

โครงการย่อยที่ 1 การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนพืชจากจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

สรุปผล

- การผลิตกรดแอบไซซิกจากจุลินทรีย์

จากการรวบรวมเชื้อราจากสตรอเบอรี่ที่มีอาการเน่าเสียจากราสีเทา และจำแนกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวโมเลกุลและลักษณะการทำปฏิกิริยา Tannic acid oxidation โดยใช้ Botrytis Selective Media ได้เชื้อรา *Botrytis cinerea* จำนวน 35 ไอโซเลท สำหรับนำไปทดสอบการผลิตกรดแอบไซซิก ผลการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตกรดแอบไซซิกด้วยเครื่อง HPLC-MS พบว่ามีเชื้อรา *Botrytis cinerea* จำนวน 18 ไอโซเลทที่สามารถผลิตกรดแอบไซซิกได้ จากนั้น คัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิตสูงสุดจากการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว PDB และวิเคราะห์ปริมาณกรดแอบไซซิกซ้ำอีกครั้ง พบว่าไอโซเลท BRDO-23 มีศักยภาพในการผลิตกรดแอบไซซิกสูงที่สุด นอกจากนี้ จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาด พบว่าสารสกัดแบบหยาบจากอาหารเลี้ยงของ BRDO-23 มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกได้ดีเช่นเดียวกับกรดแอบไซซิกบริสุทธิ์ เมื่อศึกษาปัจจัยการเลี้ยง ได้แก่ อุณหภูมิ แสง และชนิดอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิก พบว่าอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราที่สุด แสงสีฟ้า (Blue light) สามารถกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิกได้ปริมาณมากกว่าเลี้ยงในที่มืดประมาณ 2 เท่า และน้ำมะเขือเทศผสมน้ำผลไม้ ที่ความเข้มข้น 25% สามารถกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิกได้ดีกว่า PDB ประมาณ 5 เท่า

- การผลิตกรดอินโดลอะซิติกจากจุลินทรีย์

การรวบรวมเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกจากแหล่งต่างๆ ได้จำนวน 42 ไอโซเลท สามารถคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลแอซีติก โดยวิเคราะห์ประสิทธิภาพการผลิตทั้งในเชิงคุณภาพด้วยวิธี Bioassay plate technique และเชิงปริมาณด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 530 nm ตามวิธี Salkowski colorimetric technique สามารถคัดเลือกได้แบคทีเรียไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้ในปริมาณสูงที่สุด 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท IAA-32, IAA-17, IAA-25 IAA-16, และ IAA-00 เมื่อนำมาจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล สามารถจำแนกได้เชื้อ *Bacillus megaterium* *Bacillus* sp., *Lysinibacillus macrolides Enterobacter* sp., และ *Bacillus* sp. ตามลำดับ สำหรับกรรมวิธีการผลิตกรดอินโดลแอซีติก ได้สูตรอาหารที่เหมาะสม พบว่า การเติม 5mM tryptophan และ 2.5mM tryptophan+กล้วยน้ำว้า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์กรดอินโดลอะซิติกได้ในปริมาณสูง >400 ug/ml และสามารถสกัดแยกกรดอินโดลอะซิติกออกจากอาหารเพื่อให้มีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยวิธีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง และใช้สารละลาย Ethyl acetate การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดี และสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ในปริมาณสูง

อภิปรายผล

เชื้อรา *Botrytis cinerea* ไอโซเลท BRDO-23 มีศักยภาพในการผลิตกรดแอบไซซิกสูงที่สุด เมื่อเลี้ยงด้วยปัจจัยที่เหมาะสมจะมีค่าเฉลี่ยปริมาณการผลิตอยู่ที่ประมาณ 150 ng/mL ทั้งนี้ ปริมาณกรดแอบไซซิกที่วิเคราะห์ได้จากการสกัดอาหารเลี้ยงในแต่ละครั้งยังมีความแปรปรวน จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ปริมาณการสูญเสียกรดแอบ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ไซซิกระหว่างขั้นตอนการสกัด เพื่อให้สามารถคำนวณปริมาณกรดแอบไซซิกอย่างถูกต้อง สำหรับการวางแผนการผลิตในปริมาณมากต่อไป

การผลิตกรดอินโดลแอซีติกจากเชื้อแบคทีเรียได้ในปริมาณสูงที่สุด >400 ug/ml ที่สภาะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยสามารถสกัดแยกกรดอินโดลอะซิติกออกจากสารละลายอาหารเหลวได้ด้วยการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง และใช้สารละลาย Ethyl acetate ทำให้กรดอินโดลอะซิติกอมีความบริสุทธ์ยิ่งขึ้น ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะเป็นแนวทางในการผลิตกรดอินโดลอะซิติกจากเชื้อแบคทีเรียอย่างมีศักยภาพและได้สารฮอร์โมนในปริมาณสูง

โครงการย่อยที่ 2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารกระตุ้นชีวภาพจากสาหร่ายเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและความแข็งแรงในพืช

สรุปผล

การศึกษาข้อมูลการผลิตสารชีวภาพจากสาหร่ายและผลการนำไปทดสอบกระตุ้นสารชีวโมเลกุลในพริกควบคู่กับการนำไปทดสอบใช้จริงกับต้นพริกในระดับโรงเรือน รอบปีที่ 1 สามารถสกัดอัลจีเนตจากสาหร่ายทุ่นและคาราจีแนนจากสาหร่ายมงกุฎหนามตามลำดับ โดยได้ค่าร้อยละการสกัดได้เท่ากับ 44.8 +/- 6.75 และ 13.75 +/- 2.65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสารชีวภาพอัลจีเนตและคาราจีแนนสามารถกระตุ้นสารชีวโมเลกุลในต้นพริก ได้แก่ เอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส โดยมีความแตกต่างจากชุดควบคุมน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญ

การทดสอบใช้สารชีวภาพอัลจีเนตและคาราจีแนนฉีดพ่นต้นพริกทุกๆ 7 วันเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าสามารถช่วยเพิ่มความสูงและความกว้างทรงพุ่มพริกได้ โดยมีความแตกต่างจากชุดควบคุมน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญ

การกระตุ้นพริกในระยะให้ผลผลิตด้วยสารชีวภาพอัลจีเนตและคาราจีแนนก่อน 24 ชั่วโมง สามารถลดระดับความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้โดยสารชีวภาพอัลจีเนตให้ผลการใช้ลดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคได้ดีกว่าสารชีวภาพคาราจีแนนที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน

อภิปรายผล

จากผลการทดลองภายใต้โครงการย่อยนี้ซึ่งพบว่า สารชีวภาพต้นแบบระดับห้องปฏิบัติการได้แก่ สารชีวภาพอัลจีเนต และสารชีวภาพคาราจีแนน มีร้อยละการสกัดได้ของสารทั้งสองชนิดจากวัตถุดิบสาหร่ายเท่ากับ 44.8 +/- 6.75 และ 13.75 +/- 2.65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ให้เห็นถึงแนวโน้มปริมาณสารที่สกัดได้จากสาหร่ายทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันประมาณสามเท่า โดยอัลจีเนตสามารถสกัดจากวัตถุดิบสาหร่ายทุ่นได้ปริมาณมากกว่าและกระบวนการสกัดมีความซับซ้อนน้อยกว่า อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงผลการนำไปใช้กระตุ้นสารชีวโมเลกุลในต้นพริกพบว่าสารชีวภาพทั้งสองชนิดให้ผลในการส่งเสริมการกระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสได้ในระดับที่สูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับวิถีฟินิลโพรพานอยด์ซึ่งเป็นวิถีที่มีการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟีนอลิกหลากหลายชนิด โดยเฉพาะกรดซาลิซิลิกซึ่งเป็นสารโมเลกุลสัญญาณ (signal molecule) ของระบบการป้องกันตนเองในพืช ดังนั้นในขั้นตอนการศึกษาควรมีการวิเคราะห์ปริมาณกรดซาลิซิลิกควบคู่ไปด้วยเพื่อยืนยันผล อย่างไรก็ตามไม่พบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์กลูคาเนสและเปอร์ออกซิเดสบ่งชี้ว่าการกระตุ้นโดยสารชีวภาพจากสาหร่ายทั้งสองชนิดในการทดลองนี้ไม่ผ่านวิถีการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม Pathogenesis-related proteins (PR-protein) ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการได้รับเชื้อโรค ความเครียด หรือสารกระตุ้นบางชนิด โดยเอนไซม์กลูคาเนส ถูกจำแนกเป็นเอนไซม์ PR-2 และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสถูกจำแนกเป็นเอนไซม์ PR-9 ภายใต้ระบบนี้ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณรงควัตถุ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ทั้งคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ซึ่งบ่งชี้ถึงศักยภาพในการสังเคราะห์แสงได้พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างชุดใบที่ได้รับการกระตุ้นเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ดังนั้นจากการทดสอบในรอบการปลูกที่ 1 สามารถบ่งชี้ได้ว่าสารชีวภาพทั้งสองชนิดมีกลไกในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในต้นพริกผ่านกระบวนการสังเคราะห์สารในวิถีฟินิลโพพานอยด์ แต่ไม่ผ่านวิธีการสังเคราะห์สารในกลุ่ม PR-protein เมื่อพิจารณาผลการใช้สารชีวภาพกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นพริกพบว่าสารชีวภาพทั้งสองชนิดทุกความเข้มข้นมีผลกระตุ้นการเพิ่มความสูงและขนาดทรงพุ่มของต้นพริกที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำทุกๆ 7 วันเป็นเวลา 60 วัน แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตในรายการตรวจสอบอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าสารทั้งสองชนิดสามารถช่วยลดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคอันเนื่องจากเชื้อ *C. gloeosporioides*. ได้ ในลักษณะการใช้งานแบบกระตุ้นพืชล่วงหน้าเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนที่พืชจะได้ถูกเชื้อก่อโรคเข้าทำลาย โดยสารชีวภาพอัลจีเนตให้ผลการใช้ลดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคได้ดีกว่าสารชีวภาพคาราจีแนนที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ทั้งนี้กระบวนการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่จำเป็นต้องสร้างความมั่นใจในประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนการนำไปเผยแพร่ในวงกว้าง ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบซ้ำต่างช่วงเวลาหรือต่างสถานที่ก่อนการพิจารณาสรุปยืนยันผลการใช้งานผลิตภัณฑ์

โครงการย่อยที่ 3 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพทางการเกษตร

สรุปผล

การสังเคราะห์ dsRNA ด้วยวิธี *In vitro* transcription จากยีนรา *C. gloeosporioides* เป้าหมาย 3 ยีน ได้แก่ Ceramide glucosyltransferase, putative oligopeptide transporter และ Dicer-like protein 1 ซึ่งจะได้ dsRNA-Cg (No.1), dsRNA-Pot (No. 3) และ dsRNA-Dcl1 (No. 4) พบว่า dsRNA-Cg มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุด สามารถควบคุมการเจริญของราได้ถึง 51.67% รองลงมาคือ dsRNA-Pot และ dsRNA-Dcl1 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของราประมาณ 44.02% และ 22.86% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ dsRNA ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญรา *C. gloeosporioides* บนผลพริกที่ถูกปลูกเชื้อด้วยสปอร์ปริมาณ 1×10^6 spore/ml โดยใช้ dsRNA-Cg, dsRNA-Pot และ dsRNA-Dcl1 ที่ระดับความเข้มข้น 300 ng/µl, 500 ng/µl และ 1000 ng/µl พบว่า dsRNA ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันมีผลทำให้การเจริญของรา *C. gloeosporioides* บนผลพริกต่างกัน โดย dsRNA-Cg 1,000 ng/µl สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด ส่งผลให้พริกมีระดับการเกิดโรคเท่ากับ 14.44 % รองลงมาคือ dsRNA-Pot 1,000 ng/µl และ dsRNA-Cg 500 ng/µl โดยจะทำให้พริกมีระดับการเกิดโรค (% DI) เท่ากับ 28.89% และ 38.89 ตามลำดับ

อภิปรายผล

การสังเคราะห์ dsRNA ด้วยวิธี *In vitro* transcription จากยีนรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกสามารถผลิต dsRNA ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อและบนผลพริกได้ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับผลการยังยั้งการเกิดโรคบนผลพริก ซึ่งสาเหตุอาจมาจากความเข้มข้น dsRNA อาจต่ำเกินไป และชิ้นส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้ออาจดูดซึม dsRNA เข้าไปด้วย จึงทำให้มีปริมาณ dsRNA บนผิววุ้นลดลงทำให้ราสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ในขณะที่เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญรา *C. gloeosporioides* บนผลพริกที่ถูกปลูกเชื้อด้วยสปอร์ปริมาณ 1×10^6 spore/ml พบว่า dsRNA-Cg 1,000 ng/µl สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด รองลงมาคือ dsRNA-Pot 1,000 ng/µl และ dsRNA-Cg 500 ng/µl ส่วน dsRNA-Dcl1

1,000 ng/µl สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้เพียง 50% ซึ่งผลที่ได้เกิดจากการวิเคราะห์ในผลพริกที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นก่อนที่จะนำไปประยุกต์ใช้จริงในสภาพโรงเรือนหรือแปลงปลูกจำเป็นต้องทดสอบประสิทธิภาพอีกครั้งกับการควบคุมโรคบนผลพริกที่ต้นพริก

โครงการย่อยที่ 4 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนไซม์และไมโครแคปซูลจากจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช

สรุปผล

- การผลิตไมโครแคปซูลโปรตีนจากแบคทีเรียบีทีเพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช

คัดเลือก *Bacillus thurigiensis* จำนวน 5 ไอโซเลท ที่สามารถกำจัดหนอนผีเสื้อ ได้แก่ BT 103 (14), BT103(4), BT101(13), BT99(21) และ BT98(5) เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ พบว่า BT99(21) มีประสิทธิภาพสูงสุด ได้ นำไปเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเพิ่มปริมาณผลึกโปรตีน CCY medium ดัดแปลง ได้ผลึกปริมาณมาก สามารถนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณและนำไปห่อหุ้มอนุภาคด้วยสารชีวภาพต่าง ๆ ได้แก่ สารละลายอัลจีเนต แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และไคโตซาน พบว่าในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ที่พบว่าหลังจากหยดสารแขวนลอยผลิตภัณฑ์หุ้มผลึกบีทีลงบนอาหารเทียม 6 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์หุ้มผลึกบีทีทั้ง 6 ชนิด มีความสามารถในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก โดยการใช้ผลึกโปรตีนของบีทีมีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเฉลี่ยสูงที่สุด 93.34 เปอร์เซ็นต์และการใช้ผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลสูตรไคโตซานมีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเฉลี่ย 80 เปอร์เซ็นต์

- การพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนแคปซูเลตไคติเนสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

การผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ทำการผลิตใน spinner flask ในอาหารเหลว PDB ที่มีส่วนผสมของไคตินปริมาตร 1.5 และ 3 ลิตร ที่ระยะเวลา 3 และ 5 วัน ทำเอนไซม์ให้แห้งแล้ววัด activity ของไคติเนส แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผัก พบว่าหนอนที่ได้รับเอนไซม์ไคติเนสจะมีขนาดเล็กกว่าวิธีควบคุม และมีน้ำหนักตัวน้อยกว่า และไคติเนสมีผลทำให้หนอนตาย กรรมวิธีที่ทำให้หนอนตายมากที่สุดคือการผลิตไคติเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB 3 ml เขย่าเชื้อ 5 วัน ทำให้หนอนตายถึง 40% ในขณะที่วิธีควบคุมไม่มีหนอนตาย

ในการผลิตเอนแคปซูเลตไคติเนส ในเบื้องต้นได้ทำแอนแคปซูเลชั่นที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ไคติเนสกับ Maltodextrin โดยพ่นแห้งแบบฝอย แล้วนำไปวัดactivity เปรียบเทียบกับกรรมวิธีผลิตไคติเนสแล้วทำให้แห้งแบบ freeze dry และไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักพบว่าเอนแคปซูเลตไคติเนสมีผลทำให้หนอนกระทู้ผักตายได้ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติให้ค่าแต่ละกรรมวิธีไม่ต่างกัน แต่จะต่างจากวิธีควบคุม จากนั้นได้ทำการทดสอบกับแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง maltodextrin เกาลีน Aluminium silicate เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักพบว่าเอนแคปซูเลตไคติเนสที่มีผลทำให้หนอนกระทู้ผักตายสูงสุด คือ เกาลีน Aluminium silicate รองลงมาคือไคติเนสผสมกับ แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง แต่แป้งข้าวโพดกับแป้งมันสำปะหลังจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ

- การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์เพคติเนสควบคุมโรคพืช

เชื้อราสาเหตุโรคไฟทอปธอร่าที่แยกได้จากกล้วยไม้บนจานอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อแข็งแครอท (CA agar) และการยืนยันการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนบริเวณ ITS ยืนยันสปีชีส์ของราไฟทอปธอปธอร่า เมื่อทำการทดสอบการปลูกเชื้อไฟทอปธอร่าบนใบกล้วยไม้ลูกผสมสกุลแวนด้า พบว่า เชื้อราสาเหตุโรคไฟทอปธอร่าสามารถก่อให้เกิดรอยโรคบนใบกล้วยไม้ มีลักษณะรอยหรือจุดแผลสีน้ำตาลเข้มแผ่ขยายและใบเหี่ยวเมื่อปล่อยให้ระยะเวลาผ่านไปรากจะมีลักษณะฉ่ำน้ำ สีน้ำตาลเข้ม

สำนักวิทยบริการฯ

เชื้อราไตรโคเดอร์มาไอโซเลต TC1 ให้ระดับการผลิตเอนไซม์เพคติเนสสูงสุด พิจารณาจากค่า HC (Hydrolysis capacity จากการทดลองการสร้างวงใสของโคโลนี สามารถใช้เทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์ผงเอนไซม์ด้วยวิธีการทำให้แห้งด้วยความเย็น เมื่อทำการทดสอบการควบคุมโรคเน่าดำหรือโรคดอกเน่าดำกล้วยไม้ด้วยการใช้เอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้นที่กำหนด 7 วัน ก่อนการปลูกเชื้อ ผลการทดสอบโดยพบว่ากรรมวิธีพ่นด้วยเอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร, 10 กรัมต่อลิตร และ 15 กรัมต่อลิตร เทียบกับการปลูกเชื้อด้วยไฟทอปธอร่า (positive control) และกรรมวิธีเปรียบเทียบน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งไม่พบอาการโรค

อภิปรายผล

ในการศึกษาการผลิตผลิตภัณฑ์จากเชื้อบีที เอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์เพคติเนส พบว่าสามารถทำการผลิตผลิตภัณฑ์ทั้งสามชนิดได้ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพแล้ว พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักและเชื้อราได้ ซึ่งการศึกษานี้เป็นการศึกษาในปีแรกของโครงการ ทั้งนี้ในปีต่อไปจะมีการศึกษาถึงการเก็บรักษาและการนำไปใช้ในโรงเรือนและแปลงเกษตรกรต่อไป

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

1. ฮอร์โมนพืชกรดแอบไซซิกและกรดอินโดลแอซีติกที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เมื่ออยู่ในรูปสารละลายแบบหยาบจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้ง่าย ดังนั้น หากต้องเก็บรักษาสารฮอร์โมนพืชเพื่อการทดสอบประสิทธิภาพ ควรดำเนินการสกัดฮอร์โมนพืชเหล่านี้จากอาหารเลี้ยง และเก็บในรูปสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดหรือเก็บในตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น methanol หรือ DMSO เป็นต้น

2. ควรมีการตรวจสอบยืนยันผลการวิเคราะห์โดยติดตามปริมาณสารทุติยภูมิในวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ ได้แก่ กรดซาลิซิลิก และในกรณีมีความจำกัดของเครื่องมือแลบงบประมาณเกิดขึ้น อาจพิจารณาปรับรายการวิเคราะห์อื่นเพิ่มเติมเพื่อใช้ในการบ่งชี้ประสิทธิภาพของการใช้สารชีวภาพในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงภายในพืชผ่านวิถีดังกล่าว

3. การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุในใบพริกควรดำเนินการในพริกที่ได้รับแสงตามธรรมชาติแทนการวิเคราะห์ร่มกับเอนไซม์ซึ่งดำเนินการทดสอบในห้องควบคุมสิ่งแวดล้อมซึ่งมีปริมาณความเข้มแสงน้อยกว่าแสงธรรมชาติ และเพิ่มระยะเวลาในการติดตามเก็บตัวอย่างวิเคราะห์รงควัตถุในใบให้นานขึ้น เช่น เก็บทุกๆ15 วันหลังจากเริ่มฉีดพ่นสาร จนกระทั่งถึงช่วงเวลาสิ้นสุดการทดสอบ

4. ควรศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของวัตถุดิบธรรมชาติที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆกันเพื่อประเมินความแตกต่างในการนำวัตถุดิบสาหร่ายมาสกัดเพื่อใช้ประโยชน์จากสารสำคัญ

5. การสังเคราะห์ recombinant plasmid หรือ พลาสมิดลูกผสมต้องใช้ระยะเวลานาน เนื่องจากชิ้นส่วน gene ที่ใส่ไปจะมีลักษณะเป็น hairpin loop ทำให้กระบวนสังเคราะห์ทำได้ยาก กระบวนการในการสังเคราะห์จะมีขั้นตอนซับซ้อน จึงต้องวางแผนในการดำเนินงานให้ดี ซึ่งหากจะผลิตในระบบ *In vivo* ควรเลือกใช้ plasmid และ competent cell ที่สามารถกระตุ้นให้ผลิต RNA ได้ จะสามารถช่วยประหยัดเวลาและลดความซับซ้อนของกระบวนการผลิตลงได้

6. การสังเคราะห์ recombinant plasmid หรือ พลาสมิดลูกผสมโดยใช้ cloning vector เพื่อผลิต dsRNA ให้มีลักษณะเป็น hairpin loop นั้น เป็นกระบวนสังเคราะห์ทำได้ยากและซับซ้อน และลักษณะ DNA

ศรีวิชาการเกษตร

ต้นแบบ หรือ DNA template ที่จะใช้สามารถเกิดได้หลายรูปแบบ ดังนั้น ควรตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อนที่จะนำไปใช้เพื่อสังเคราะห์ RNA ต่อไป

7. ขั้นตอนการใช้เครื่องการทำให้แห้งด้วยความเย็น (Freeze Dryer) ต้องมีการจัดเตรียมล่วงหน้า การขนส่งและการคัดแยกตัวอย่างที่รวดเร็ว รวมทั้งปริมาตรที่จำกัดการนำตัวอย่างเข้าเครื่องผลิตเอนไซม์แต่ละครั้ง จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า การผลิตผงเอนไซม์โดยวิธีการทำแห้งด้วยความเย็นให้ผลการทดลองที่ดี อย่างไรก็ตาม เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนการผลิตเอนไซม์ในระดับผงเอนไซม์ จำเป็นต้องเก็บรักษาผงเอนไซม์อย่างรวดเร็ว เพื่อคงสภาพเอนไซม์ให้อยู่สภาพที่ดีต่อไป

ข้อเสนอแนะสำหรับผู้กำหนดแผนงบประมาณวิจัย

กรณีงานวิจัยที่ใช้งบประมาณได้ตามแผนการใช้จ่ายงบประมาณ โปรดพิจารณาจัดสรรงบประมาณในงวดต่อไปตามกำหนดการ เพื่อไม่ให้เกิดการชะงักของการทำงาน งบประมาณที่มาไม่ตรงตามที่กำหนด ทำให้การทดลองบางอย่างต้องเลื่อนไป เนื่องจากต้องรองบประมาณในการจัดซื้อสารเคมี และจ้างเหมาแรงงาน

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

1. ปัญหาด้านเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกในระยะยาวและมีการต่อเชื้อหลายรุ่น ส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตสารที่ต้องการมักจะต่ำลง จึงต้องทำการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณมากเพียงพอ เพื่อให้คงประสิทธิภาพการผลิตสารสูง และลดความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการแสดงออกของประสิทธิภาพการผลิตสารที่ลดลง

2. การได้รับงบประมาณล่าช้าในงวดที่ 2 ส่งผลกระทบต่อการขับเคลื่อนงานวิจัย เนื่องจากจำเป็นต้องใช้ในการจ้างหน่วยงานภายนอกดำเนินการในขั้นตอนของกระบวนการผลิตสารชีวภาพซึ่งทางห้องปฏิบัติการไม่มีเครื่องมือ (ขั้นตอนการ freeze dry ตัวอย่าง) ส่งผลกระทบต่อการได้มาซึ่งสารชีวภาพสำหรับนำไปใช้ทดสอบ รวมทั้งการเช่าเหมาใช้เครื่องมือวิเคราะห์แทนเครื่องมือ HPLC ที่ชำรุด

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล อนันต์ หิรัญสาลี และสุชีลา เตชะวงศ์เสถียร. 2555. การคัดเลือกพันธุ์พริกต้านทานโรคแอนแทรคโนสในแนวกว้าง. *วารสารแก่นเกษตร* 40(4): 41–47.

นันทิการ์ เสนแก้ว อภิญญา สุราวุธ อาริยา จูดคง ประสพ โชคตันไทย และ อุดร เจริญแสง. ศึกษาการระบาดของศัตรูพริกภายใต้ความแปรปรวนของสภาวะภูมิอากาศในพื้นที่จังหวัดพัทลุง. สืบค้นจาก http://www.doa.go.th/oard8/wp-content/uploads/2019/08/v5801-22.pdf [เข้าถึงเมื่อ 30 มีนาคม 2563]

ศิริพงษ์ คุ้มภัย และ พรพิมล อธิปัญญาคม. 2554. โรคแอนแทรกโนส. *คู่มือโรคผัก.*สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชกรมวิชาการเกษตร.กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. หน้า 3-4.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ และ จุรีมาศ วงศ์ศรีรัตน์. 2552. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกชี้ฟ้า (*Colletotrichum gloeosporioides*) โดยยีสต์ที่แยกได้จากผักและผลไม้. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์* 9(1): 120-131.

Ali, M.L., Ehsan S. N. and B. Hamid, 2015. Comparison of Extraction Different Methods of Sodium Alginate from Brown Alga Sargassum sp. Localized in the Southern of Iran. *J. Applied Biotechnology Reports*. 2 (2), 251-255.

Alm, E.W., Oerther, D.B., Larsen, N., Stahl, D.A. and L. Raskin. 1996. The oligonucleotide probe database. *Appl Environ Microbiol*. 62, 3557–3559

Bhale, U.N. and J.N. Rajkonda. 2012. Enzymatic activity of *Trichoderma* species. *Novus Natural Science Research*. 1(4): 1-8.

Boddy L. 2016. Pathogens of Autotrophs. *The Fungi* (Third Edition), 245-292.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72, 248–254.

Bric, J.M., Bostock, R.M. and S.E. Silverstone. 1991. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol*., 57, 535-538.

Chinnapun, D. and N. Churngchow. 2008.Induction of peroxidase, scopoletin, phenolic compounds and resistance in *Hevea brasiliensis* by elicitin and a novel protein elicitor purified from *Phytophthora palmivora*. Physiol. Mol. Plant Pathol.72: 179-187.

Ciliberti, N., Fermaud, M., Roudet, J. and V. Rossi. 2015. Environmental conditions affect *Botrytis cinerea* infection of mature grape berries more than the strain or transposon genotype. *Phytopathology* 105, 1090–1096.

Ederli, L., Madeo, L., Calderini, O., Gehring, C., Moretti, C., Buonaurio, R., Paolocci, F. and S. Pasqualini. 2011. The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinase CRK20 modulates host responses to *Pseudomonas syringae*pv. tomato DC3000 infection. *J. Plant Physiol*. 168, 1784–1794.

กรมวิชาการเกษตร

Glickmann, E. and Y. Dessaux. 1995. A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*. 61, 793-796.

Khompatara, K. 2017. *Systemic Acquired Resistance in Heveabrasiliensis Induced by the Seaweed Extract from Sargassumpolycystum*. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Biochemistry. Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

Khompatara, K., Pettongkhao, S., Kuyyogsuy, A., Deenamo, N. and N. Churngchow. 2019. Enhanced resistance to leaf fall disease caused by *Phytophthorapalmivora* in rubber tree seedling by *Sargassumpolycystum*extract. *Plants*, 8(6), 168.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics.* John Wiley and Sons, New York, 115-175.

Mahmood, S., and R. Rahman. 2008. Production and partial characterization of extracellular alpha-amylase by *Trichoderma viride*. *Bangladesh. J. Microl. Biol.* 26(2): 99-103.

Montri, P., Taylor, P.J.W. and O. Mongkolporn. 2009. Pathotypes of *Colletotrichum capsici,* the causal agent of chili anthracnose in Thailand. *Plant Disease*., 93: 17–20.

Nwokeoji, A.O., Kumar, S., Kilby, P.M., Portwood, D.E., Hobbs, J.K. and M.J. Dickman. 2019. Analysis of long dsRNA produced in vitro and in vivo using atomic force microscopy in conjunction with ion-pair reverse-phase HPLC. *Analyst*, 144(16), 4985-4994.

Pettongkhao, S., Bilanglod, A., Khompatara, K. and N. Churngchow. 2019. Sulphated polysaccharide from *Acanthophoraspicifera* induced *Heveabrasiliensis* defense responses against *Phytophthorapalmivora* infection. *Plants*, 8(3),73.

Phialathounheuane, K. Thummabenjapone, P., Hiransalee, A. and S. Techawongstien. 2012. Screening chilli cultivars for broad spectrum resistance to anthracnose. *KhonKaen Agr. J.* 40 (4): 41-47.

Shankar, T., Sivakumar, T., Asha, G., Sankaralingam, S. and V. Meenakshi Sundaram. 2013. Effect of PSB on Growth and Development of Chilli and Maize Plants. *World Appl. Sci. J.* 26 (5): 610-617.

Shannon, L.M., Kay, E. and J.Y. Lew. 1966. Peroxidase isozymes from horseradish roots isolation and physical properties. *J. Biol. Chem*. 241, 2166–2172.

Shrivastava U.P. and A. Kumar. 2011. A Simple and Rapid Plate Assay for the Screening of Indole-3-acetic Acid (IAA) Producing Microorganisms. *Int. j. appl. biol. pharm*. 2:120-123.

Torres, A.M., Mau-Lastovicka, T. and R. ezaaiyan. 1987. Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. J. Agric. Food Chem. 35, 921–925.

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

ตารางผนวก1-1 ตารางแสดงน้ำหนักของเส้นใยเชื้อราไอโซเลท BRDO-23 ที่เลี้ยงภายใต้ปัจจัยแสงที่ต่างกัน

Sample	mycelium dry weight (g)
Dark (1)	0.256
Dark (2)	0.392
Dark (3)	0.123
Dark (4)	0.461
Dark (5)	0.404
average	0.33

Sample	mycelium dry weight (g)
Blue (1)	0.146
Blue (2)	0.017
Blue (3)	0.15
Blue (4)	0.341
Blue (5)	0.118
average	0.15

Sample	mycelium dry weight (g)
White (1)	0.419
White (2)	0.31
White (3)	0.075
White (4)	0.149
White (5)	0.175
average	0.23

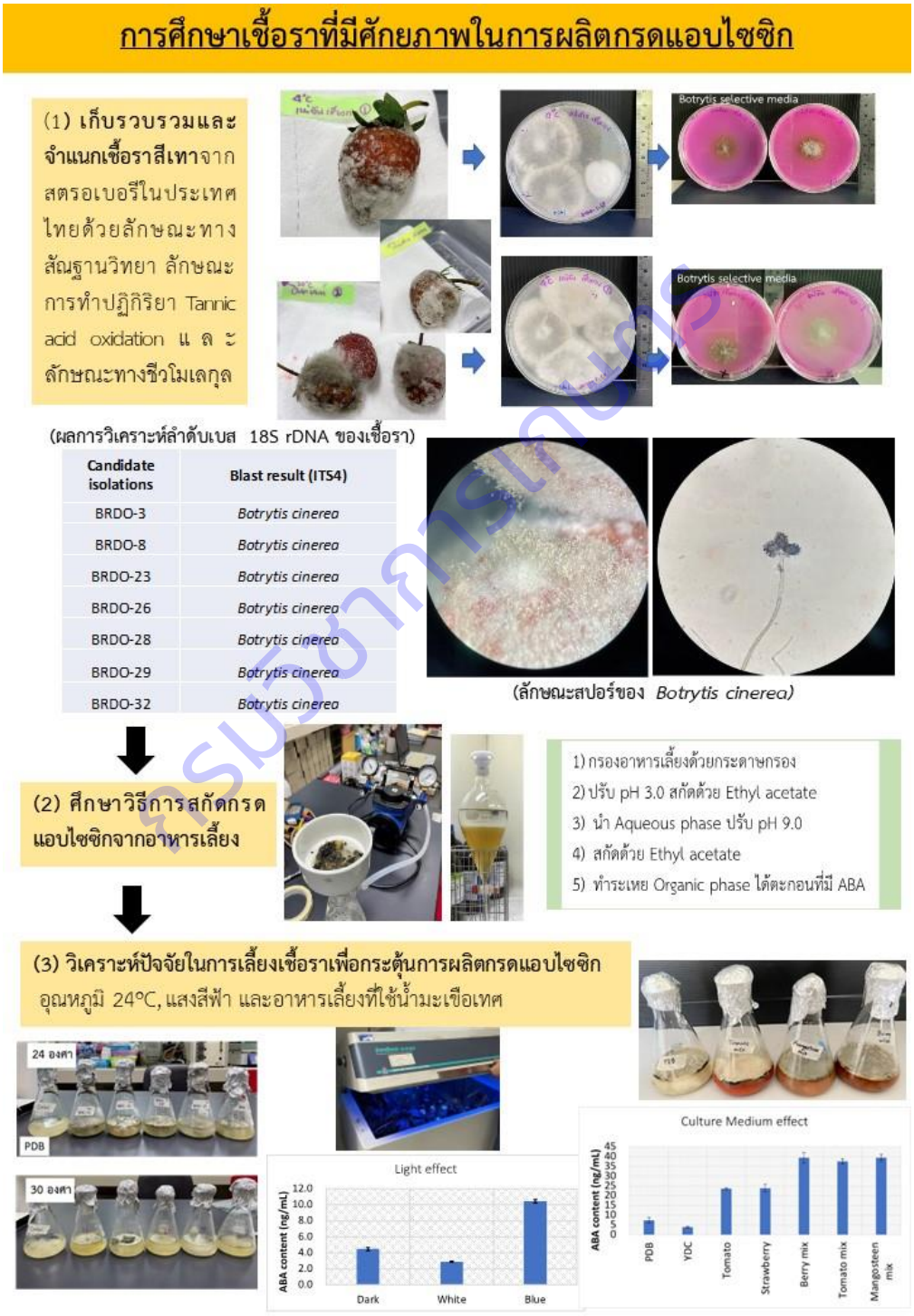
กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก 2

หลักฐานเชิงประจักษ์ของผลผลิตที่ได้ จากข้อ 3.2 โดยให้เรียงข้อมูลหลักฐานตามผลผลิตที่แสดงในตาราง

เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์ วิธีการเลี้ยงและปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิก 1 กระบวนการ



กรมวิชาการเกษตร

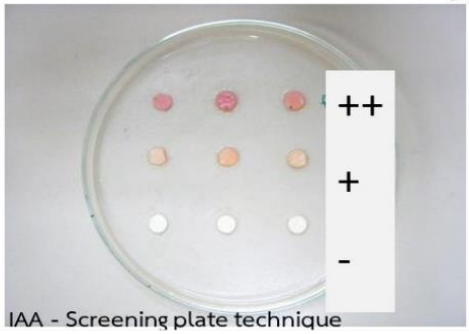
2. สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพ และวิธีการผลิตกรดอินโดลแอซีติก 1 กระบวนการ

จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตกรดอินโดลอะซิติก

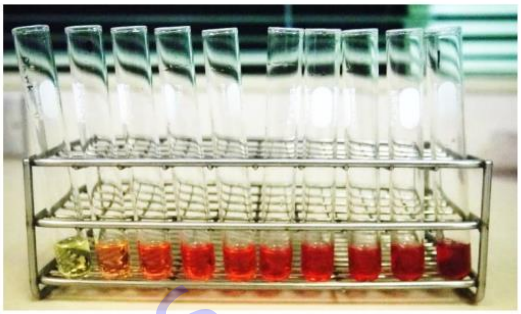
รวบรวมและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จากแหล่งต่างๆ

เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเหลว

ทดสอบการสังเคราะห์ IAA โดยใช้สารตั้งต้น tryptophan



IAA - Screening plate technique



ทดสอบศักยภาพการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกเชิงปริมาณที่สภาวะอุณหภูมิและอาหารที่มีองค์ประกอบของ Tryptophan ชนิดต่างๆ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

ผลการจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยเทคนิคชีวโมเลกุล

ไอโซเลท	สปีชีส์	เปอร์เซ็นต์ Identity	Accession Number
IAA-16	*Enterobacter* sp.	100	MK600539.1
IAA-17	*Bacillus* sp.	99	KT981881.1
IAA-25	*Lysinibacillus macroides*	100	MT071730.1
IAA-32	*Bacillus megaterium*	99	GU125638.1
IAA-00	*Bacillus* sp.	99	EU912460.1

อาหารเหลว+tryptophan

อาหารเหลว+tryptophan+กล้วย

กรองตะกอนเซลล์ออก

สกัดกรดอินโดลอะซิติก

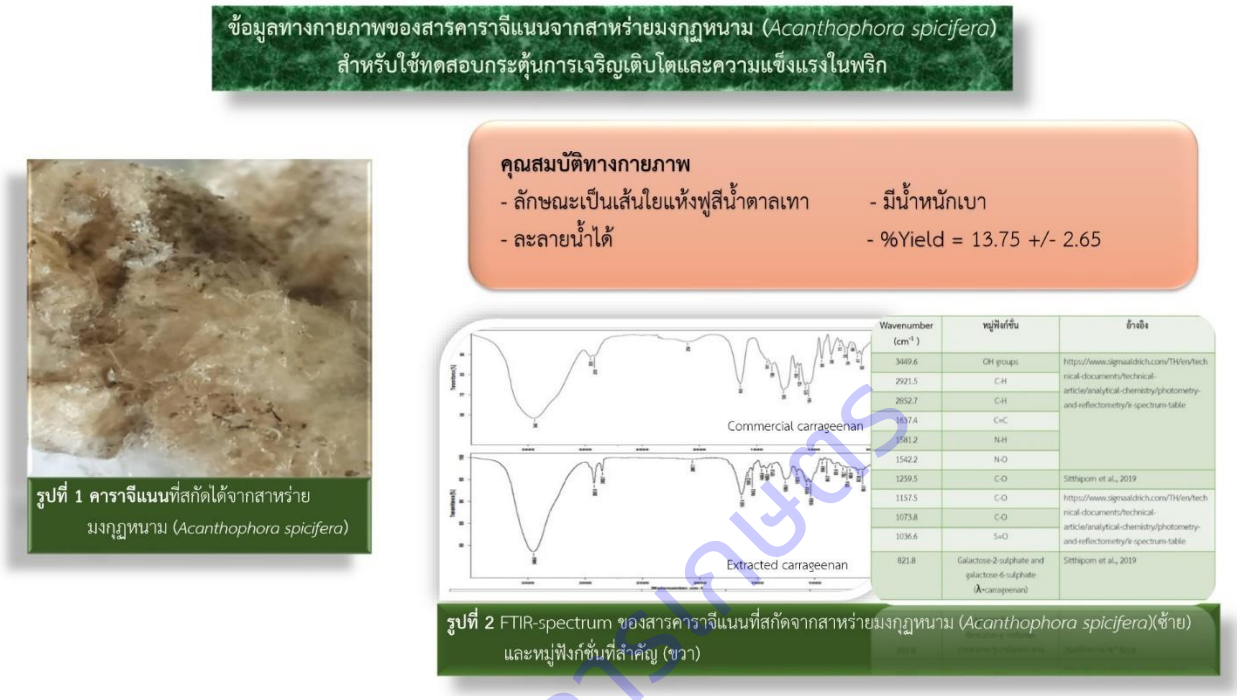
กรรมวิธีการผลิตกรดอินโดลแอซีติกและการสกัดสารให้บริสุทธิ์

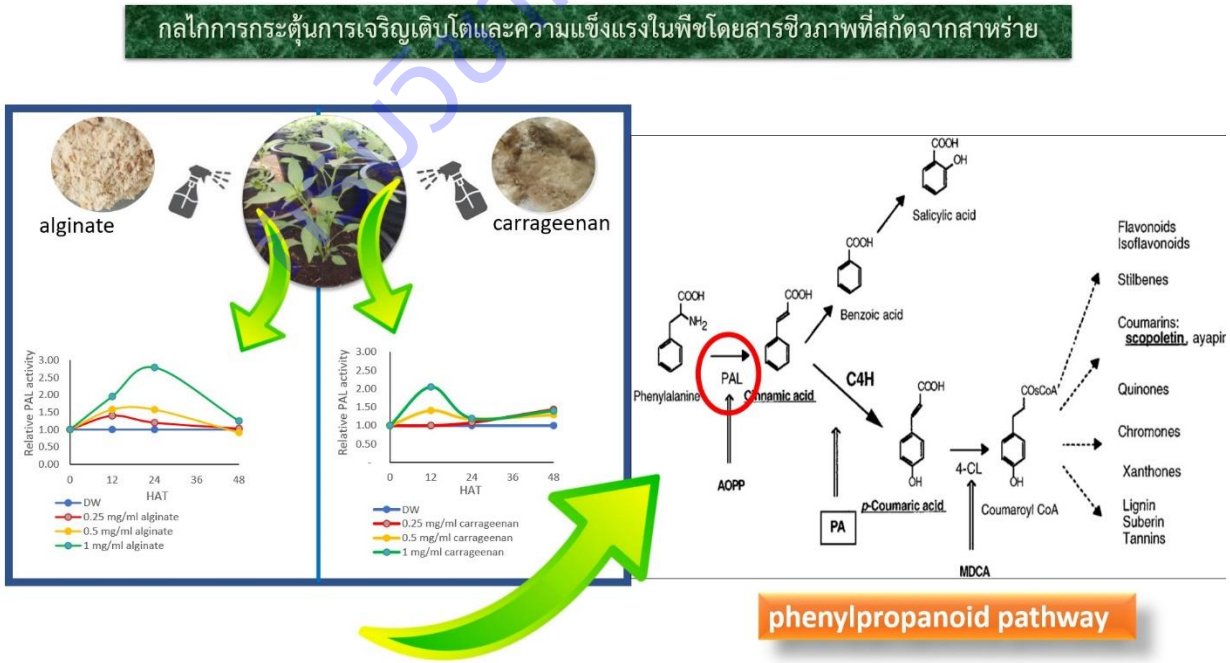
ขั้นตอนการสกัดสาร

- ปรับ pH 3.0 สกัด IAA ด้วย Ethyl Acetate
- นำสารละลาย ปรับ pH 9.0
- สกัดด้วย Ethyl Acetate
- ทำการระเหย Organic phase

กรมวิชาการเกษตร

3. วิธีการสกัด คุณสมบัติทางกายภาพ และกลไกการออกฤทธิ์ของสารชีวภาพจากสาหร่ายในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและความแข็งแรงภายในพริก 1 กระบวนการ
https://www.facebook.com/profile.php?id=100064832977032



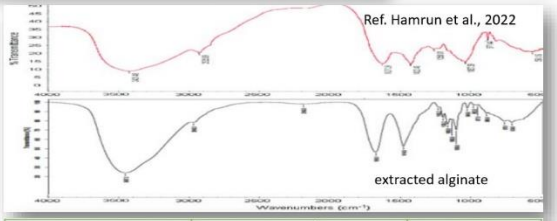


ข้อมูลทางกายภาพของสารอัลจีเนตจากสาหร่ายทุ่น (*Sargassum polycystum*) สำหรับใช้ทดสอบกระตุ้นการเจริญเติบโตและความแข็งแรงในพริก

คุณสมบัติทางกายภาพ

- ลักษณะเป็นผงละเอียดสีครีม
- ละลายน้ำได้ดี
- %Yield = 44.8 +/- 6.75

รูปที่ 1 อัลจีเนตที่สกัดได้จากสาหร่ายทุ่น (*Sargassum polycystum*)



Wavenumber (cm-1)	หมู่ฟังก์ชั่น	อ้างอิง
3437.3	Hydroxyl (OH)	Hamrun et al., 2022
2942.3	C-H aliphatic	
1616.1	COO-asymmetric	
1414.9	COO-symmetrical	
1126.2	C-OH	
1092.8	C-OH	
1030.0	C-OH	
949.6	C-O striching Uronic acid	

รูปที่ 2 FTIR-spectrum ของสารอัลจีเนตที่สกัดจากสาหร่ายทุ่น (Sargassum polycystum) (บน) และหมู่ฟังก์ชั่นที่สำคัญ (ล่าง)

กรมวิชาการเกษตร

4. การใช้ประโยชน์จากอาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์เพื่อการประยุกต์ใช้ทางการเกษตร 1 กระบวนการ

กระบวนการผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ หรือ dsRNA เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกด้วยวิธี *In vitro* transcription

กระบวนการผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกด้วยวิธี *In vitro* transcription

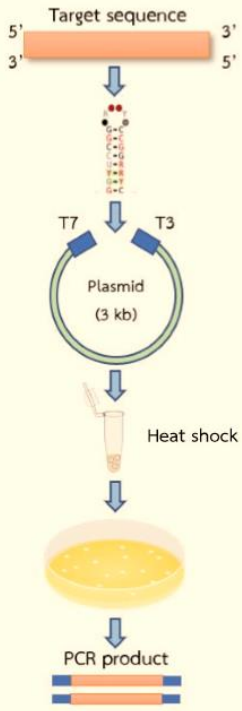
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ปี 2565

(1) สังเคราะห์พลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ที่เชื่อมต่อชิ้นส่วน DNA ที่ออกแบบจากยีนรา *C. gloeosporioides* เป้าหมายเข้ากับเวคเตอร์พาหะ แล้วนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli DH5α* competent cell ด้วยวิธี Heat shock

(2) คัดเลือกเซลล์ลูกผสมโดยการเกลี่ยเชื้อ *E. coli* บนอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ Ampicillin 100 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

(3) นำโคโลนีที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิด

(4) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR เพื่อนำใช้เป็นต้นแบบ (Template) ในการผลิต RNA โดยใช้ Universal Primer T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3') และ T3 (5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG -3') โดยเตรียมสารและตั้งค่าอุณหภูมิเพื่อการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้



PCR Reaction

cDNA (5 ng/ µl)		1 µl
Forward primer (10 µM)		1 µl
Reverse primer (10 µM)		1 µl
2x GoTaq Green		12.5 µl
dH_2O		9.5 µl
	Total	25 µl

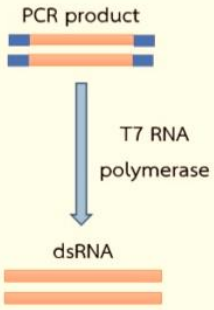
PCR Condition

Pre – Denaturation	95°C	1 min	
Denaturation	95°C	30 sec	25 Cycles
Annealing	58°C	30 sec	
Extension	72°C	1.2 min	
Final- Extension	72°C	5 min	

กรมวิชาการเกษตร

(5) สังเคราะห์ dsRNA โดยอาศัยหลักการ *In vitro* transcription เพื่อผลิต RNA oligo ด้วยชุดสังเคราะห์ TranscriptAid T7 High Yield Transcription โดยใช้สารเคมีในปฏิกิริยาดังนี้

DEPC - treat water	1 µl
5x transcriptAid reaction buffer	4 µl
Mix dNTP	8 µl
DNA Template	5 µl
TranscriptAid Enz mix	2 µl
Total	20 µl

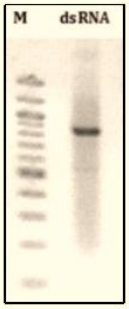


(6) โดยขั้นตอนการสังเคราะห์เริ่มจากบ่ม DNA template ที่ 90°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใส่สารเคมีในปฏิกิริยาเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ทำการปั่นผสมแล้วนำบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

(7) จากนั้นย้ายสารไปใส่คอลัมน์ RNeasy และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งน้ำส่วนที่กรองผ่านคอลัมน์ จากนั้นนำสารผสม 80 µl ของ DNaseI 10 µl ใน 70 µl buffer RDD ใส่ใน column บ่มที่ 20-30°C เป็นเวลา 15 นาที

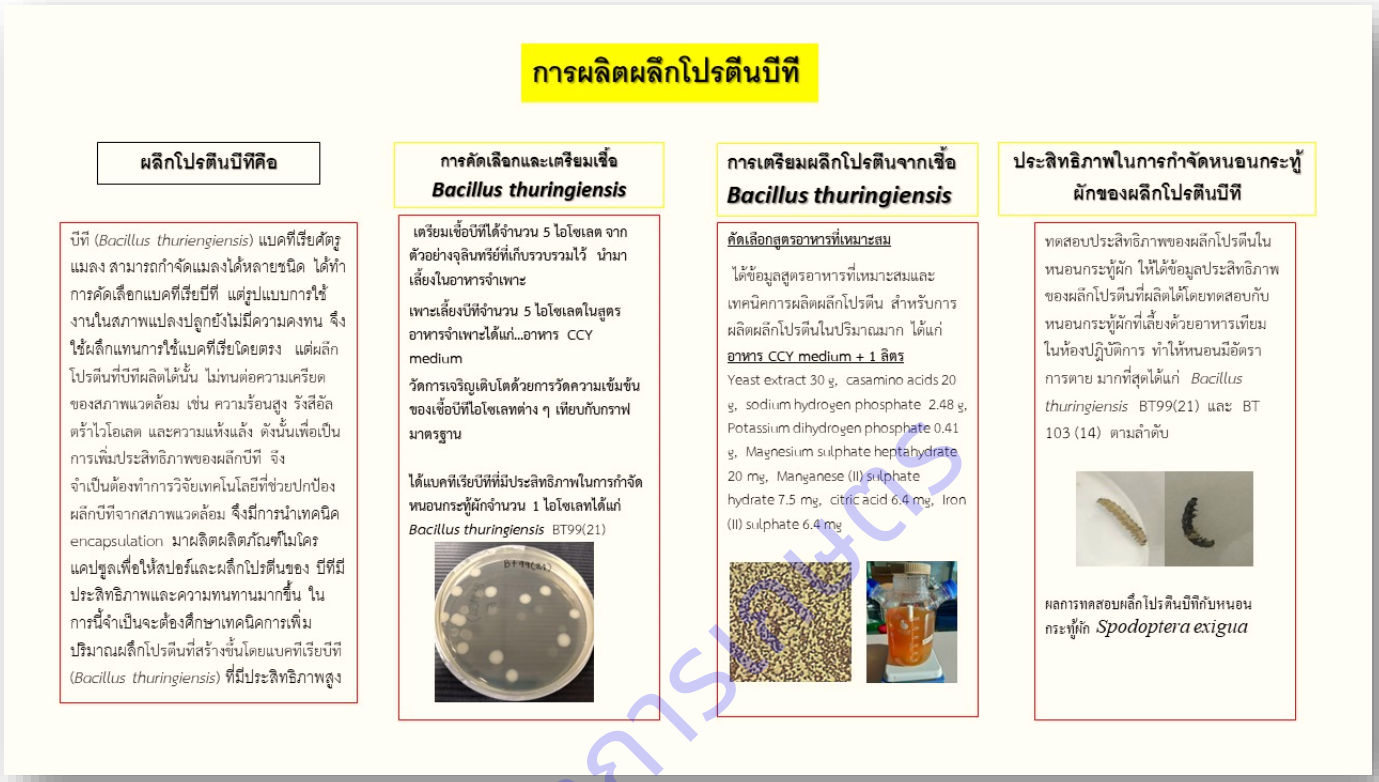
(8) ใส่ 350 µl buffer RW1 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งน้ำส่วนที่กรองผ่านคอลัมน์ แล้วใส่ 500 µl buffer RPE แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งน้ำส่วนที่กรองผ่านคอลัมน์แล้วใส่ 500 µl buffer RPE แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

(9) ทำการย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอด 1.5 ml ใหม่ แล้วใส่ 30-50 µl RNase-free water แล้วบ่มเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ dsRNA ที่สังเคราะห์ได้บน 1-2% Agarose gel และวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 260 nm



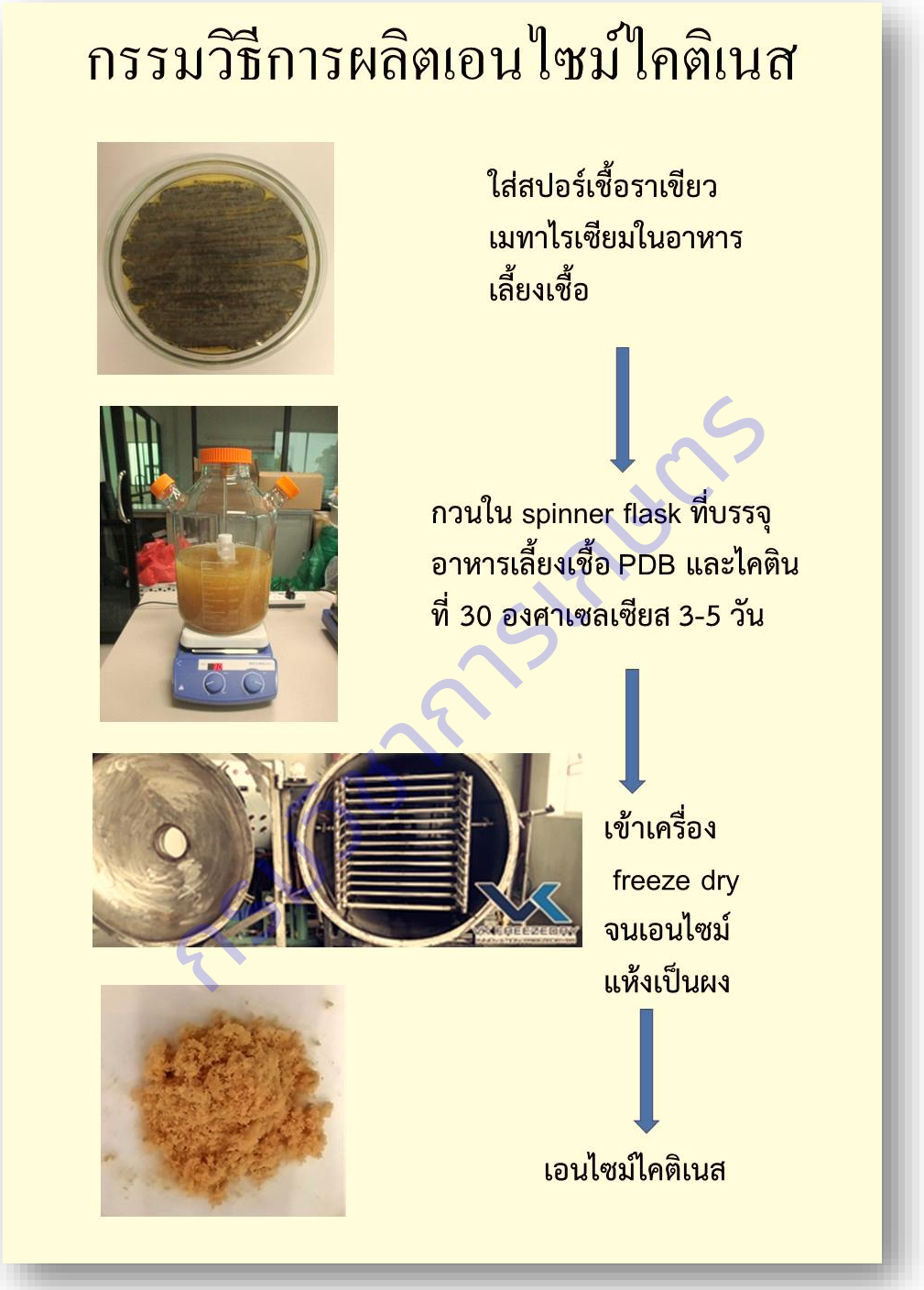
กรมวิชาการเกษตร

5. กรรมวิธีการผลิตผลึกโปรตีนบีทีจากเชื้อ *B. thuringiensis* 1 กระบวนการ



กรมวิชาการเกษตร

6. กรรมวิธีการผลิตเอนไซม์ไคติเนส จากจุลินทรีย์ 1 กระบวนการ



สำนักวิทยบริการฯ

7. กรรมวิธีการผลิตเอนไซม์เพคติเนส จากจุลินทรีย์ 1 กระบวนการ

การผลิตขยายเพคติเนสจากราไตรโคเดอร์มา

Trichoderma TC1 isolate

[สังเกตบริเวณใสรอบโคโลนี (Clear zone)] TC1 ให้เพคติเนสสูงที่สุด

TC1 ในอาหารเหลว Czapek+1% เพคติน ปริมาตร 20 ลิตร ผ่านการทำให้แห้งด้วยความเย็น

ด้วยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น

(Freeze Dryer) (Buchi, Thailand) เครื่อง Freeze Drying Alpha 1-2 LD PLUS

เก็บรักษาผงเอนไซม์ในสภาพที่ไม่โดนแสง [ระยะสั้นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส]

[ระยะยาวที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส]

กรมวิชาการเกษตร