



วิทยานิพนธ์

การประเมินผลกระทบของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต่อระบบนิเวศ
ของเชื้อแบคทีเรียบริเวณรากพืช

**ASSESSING THE EFFECTS OF TRANSGENIC PAPAYA ON
THE ECOLOGY OF RHIZOSPHERE BACTERIA**

นางสาวกษมา ชูสังข์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การประเมินผลกระทบของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมต่อระบบนิเวศของเชื้อแบคทีเรีย
บริเวณรากพืช

Assessing the Effects of Transgenic Papaya on the Ecology of Rhizosphere Bacteria

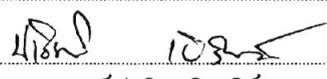
นามผู้วิจัย นางสาวกษมา ชูสังข์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิชัย ไมสิตรัตน, Ph.D.)

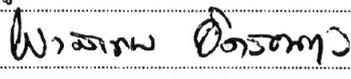
กรรมการ

( อาจารย์ปาริชาติ เบิร์นส, Ph.D.)

กรรมการ

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

( รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์วินัย อางคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 5 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2550

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การประเมินผลกระทบของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมต่อระบบนิเวศของเชื้อแบคทีเรียบริเวณ
รากพืช

Assessing the Effects of Transgenic Papaya on the Ecology of Rhizosphere Bacteria

โดย

นางสาวกษมา ชูสังข์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2550

กษมา ชูสังข์ 2550: การประเมินผลกระทบของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต่อระบบนิเวศของเชื้อ
แบคทีเรียบริเวณรากพืช ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประชานกรรมการที่ปรึกษา:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชัย โฆสิตรัตน, Ph.D. 87 หน้า

การศึกษาผลกระทบของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม สายพันธุ์แยกแวกที่ต้านทานต่อโรคใบค่างวง
แหวน ต่อกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบรากและความสามารถในการเหนี่ยวนำหรือขับไล่กลุ่มประชากร
แบคทีเรียบริเวณรากพืช ภายใต้ในสภาวะ โรงเรือน โดยทดลองปลูกมะละกอในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง
12 นิ้ว 7 กระถาง วางกระถางในลักษณะดาวกระจาย กระถางกลางปลูกมะละกอปกติในดินปลูกมะละกอทั่วไป
เชื่อมต่อกับกระถางรอบนอก 6 กระถางด้วยท่อพีวีซีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นิ้ว ยาว 12 นิ้ว ที่ปลูกมะละกอดัดแปลง
พันธุกรรมหรือมะละกอปกติ ในดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ทำการเก็บตัวอย่างดินทุกๆ 30 วันตั้งแต่ หลัง
ย้ายปลูก 60 วันจนถึงมะละกออายุ 210 วัน เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินรวมถึงกลุ่มประชากรแบคทีเรีย
และโอกาสการถ่ายยีนจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมไปยังแบคทีเรียรอบราก การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ดิน
พบว่าค่า pH ค่าการนำไฟฟ้า ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง ของดินที่ปลูกมะละกอ
ดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอปกติ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณและชนิดของเชื้อแบคทีเรีย
รอบรากไม่พบความแตกต่าง การวิเคราะห์เปรียบเทียบ โครงสร้างกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบรากตาม
คุณสมบัติทางสรีรวิทยา (community level physiological profiles (CLPP)) จากการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่าง
กัน 95 ชนิด (Biology GN2) กลุ่มประชากรแบคทีเรียระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติใน
แต่ละเดือนจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค Amplified rDNA restriction analysis
(ARDRA) ของแบคทีเรียรอบรากจากพืชทั้งสองกลุ่มมีความเหมือนกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่ระดับ 70% การ
ประเมินโอกาสการถ่ายยีนจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมไปยังแบคทีเรียโดยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่
ครอบคลุมส่วนของยีน 35S promoter และ *npI* และการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารปฏิชีวนะ
Kanamycin ตรวจไม่พบการถ่ายยีน จากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมไปยังแบคทีเรีย จากผลการประเมินแสดง
พบว่ามะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์แยกแวกมีผลกระทบต่อกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบราก
พืช ทั้งชนิดและปริมาณ และ ไม่พบความแตกต่างในการชักนำหรือไล่เชื้อแบคทีเรียที่เคลื่อนที่มาจากดินปลูกพืช
ปกติ ไปยังกระถางที่ปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์แยกแวก 116/5 และมะละกอสายพันธุ์แยกแวก
เมื่อทดลองภายใต้สภาวะ โรงเรือนระบบปิด

กษมา ชูสังข์
ลายมือชื่อนิสิต


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

29 / พ.ค. / 2550

Kasama Chusang 2007: Assessing the Effects of Transgenic Papaya on the Ecology of Rhizosphere Bacteria. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Wichai Kositratana, Ph.D. 87 pages.

Transgenic papaya resistant to papaya ringspot virus (PRSV) was investigated for the effect on the rhizosphere bacteria community under containment conditions. The attraction or repulsion of rhizosphere bacteria to transgenic papaya was tested by growing papaya in the native soil in the pot with a diameter of 12 inches and the pot was connected with six equally distributed side arms, with PVC tubes diameter of 2 inches, to surrounded-pots which filled with sterilized soils. Transgenic and non-transgenic papaya plants were grown in each pot by completely randomized design. Rhizosphere soil samples were taken every 30 days interval until reached the premature fruit stage. Bacterial population structure was determined by using the community-level physiological profiles (CLPP) which based on the utilization of 95 carbon sources (Biolog GN2). Soil samples were also investigated for bacterial species diversity. The pH value, electrical conductivity, organic matter major elements and minor elements content were not significant different among soil samples. The CLPP results revealed that the population profile of rhizosphere bacteria from transgenic papaya and non-transgenic papaya were closely related in each sampling time. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) indicated that the similarity of rhizosphere bacteria around transgenic papaya soil and nontransgenic papaya soils was around 70%. The investigating of horizontal gene transfer between transgenic papaya to rhizosphere bacteria was not detected all of soil sample. The results indicated that the transgenic papaya had a limited effect on rhizosphere bacteria community and transgenic papaya was neither attract nor repel the rhizosphere bacteria under the containment conditions.

Kasama Chusang

Student's signature



Thesis Advisor's signature

29 / May / 2007

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชัย โฆสิตรัตน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา
ที่อบรมให้ความรู้และดูแลเอาใจใส่อย่างดีตลอดมา ขอขอบพระคุณ ดร.ปาริชาติ เบิร์นส กรรมการ
ที่ปรึกษาวิชาเอก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชณี สงประยูร กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และ
ดร.วชิรญา อิ่มสบาย ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาและคำแนะนำใน
การศึกษาและทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัย
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่ให้
ทุนการศึกษาและสนับสนุนการค้นคว้าวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณกลุ่มงานวิจัยด้าน
พืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
กำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์แบกนวล116/5
ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณคุณจุฑาทาเทพ วัชรไชยคุปต์ และคุณชาลินี คงสวัสดิ์ และเพื่อนๆ ทุกคนที่มี
ส่วนช่วยเหลือในการทำงานและด้านอื่นๆ

ขอขอบคุณคุณพีรสิทธิ์ สุรเกียรติชัย ที่เป็นกำลังใจและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ที่ดี
ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณแม่กั้งแก้ว และคุณพ่อปฎิคม ชูสังข์ และน้องปานคม
ชูสังข์ ที่อบรมเลี้ยงดูให้การศึกษา และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

กษมา ชูสังข์

เมษายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
อุปกรณ์	14
วิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	30
สรุปและข้อเสนอแนะ	58
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	60
ภาคผนวก	69
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	87

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณรากมะละกอเพื่อการวิเคราะห์ ตั้งแต่มะละกออายุ 60 วันจนถึงมะละกออายุ 210 วัน	18
2	แสดงแหล่งคาร์บอนใน Biolog GN2 plates	23
3	แสดงชนิดและจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด	27
4	การเปรียบเทียบความชื้นในดิน ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณอินทรีย์วัตถุและธาตุอาหาร	31
5	เปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียรอบรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ	34
6	แสดงชนิดของเชื้อที่จำแนกพบบริเวณรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ	35
7	Total Variance Explained	46
ตารางผนวกที่		
1	Loading Factor ภาพที่ 3 (ตัวอย่างดิน มะละกออายุ 60 วัน)	76
2	Loading Factor ภาพที่ 4 (ตัวอย่างดินมะละกออายุ 90 วัน)	77
3	Loading Factor ภาพที่ 5 (ตัวอย่างดินมะละกออายุ 120 วัน)	79
4	Loading Factor ภาพที่ 6 (ตัวอย่างดินมะละกออายุ 150 วัน)	82
5	Loading Factor ภาพที่ 7 (ตัวอย่างดินมะละกออายุ 180 วัน)	84
6	Loading Factor ภาพที่ 8 (ตัวอย่างดินมะละกออายุ 210 วัน)	85

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การปลูกมะละกอในกระถางทดลองที่มีลักษณะดาวกระจาย 7 กระถาง โดย กระถางกลางปลูก มะละกอปกติในดินที่ไม่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ เชื่อมต่อไปยัง กระถางรอบนอก 6 กระถางที่ปลูก มะละกอตัดแปลงพันธุกรรม (GM) 3 กระถาง ร่วมกับมะละกอปกติ (Non-GM) 3 กระถางในดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ	17
2	เปรียบเทียบลักษณะ โคลิโคนีแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากสารละลายดิน บนอาหาร เลี้ยงเชื้อ NGA ระหว่างมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม (ก) และมะละกอปกติ (ข) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	34
3	กราฟแสดงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จาก CLPP จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA เมื่อมะละกออายุ 60 วัน เพื่อประเมินกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบราก มะละกอตัดแปลงพันธุกรรม (จุดวงกลมสีดำ: GM) และมะละกอปกติ (จุดวงกลมสีขาว: Non-GM) โดย Component ที่ 1 สามารถอธิบายความผัน แปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 24.81% Component ที่ 2 สามารถอธิบายความ ผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 13.65%	40
4	กราฟแสดงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จาก CLPP จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA เมื่อมะละกออายุ 90 วัน เพื่อประเมินกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบราก มะละกอตัดแปลงพันธุกรรม (จุดวงกลมสีดำ: GM) และมะละกอปกติ (จุดวงกลมสีขาว: Non-GM) โดย Component ที่ 1 สามารถอธิบายความผัน แปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 41.6% Component ที่ 2 สามารถอธิบายความ ผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 14.42%	41

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
5	กราฟแสดงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จาก CLPP จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA เมื่อมะละกออายุ 120 วัน เพื่อประเมินกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบราก มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (จุดวงกลมสีดำ: GM) และมะละกอปกติ (จุดวงกลมสีขาว: Non-GM) โดย Component ที่ 1 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 57.15% Component ที่ 2 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอนของ 13.42%	42
6	กราฟแสดงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จาก CLPP จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA เมื่อมะละกออายุ 150 วัน เพื่อประเมินกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบราก มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (จุดวงกลมสีดำ: GM) และมะละกอปกติ (จุดวงกลมสีขาว: Non-GM) โดย Component ที่ 1 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 43.7% Component ที่ 2 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 13.13%	43
7	กราฟแสดงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จาก CLPP จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA เมื่อมะละกออายุ 180 วัน เพื่อประเมินกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบราก มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (จุดวงกลมสีดำ: GM) และมะละกอปกติ (จุดวงกลมสีขาว: Non-GM) โดย Component ที่ 1 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอนของ 17.99% Component ที่ 2 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอนของ 15.1%	44
8	กราฟแสดงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จาก CLPP จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA เมื่อ มะละกออายุ 210 วัน เพื่อประเมินกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบราก มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (จุดวงกลมสีดำ: GM) และมะละกอปกติ (จุดวงกลมสีขาว: Non-GM) โดย Component ที่ 1 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 40.56% Component ที่ 2 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 26.26%	45

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเทคนิค ARDRA ด้วยเอนไซม์ <i>MspI</i> (ก) และ <i>HhaI</i> (ข) สัญลักษณ์ GM: มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม, Non-GM: มะละกอปกติ หมายเลข 1-6 คือ มะละกออายุ 60-210 วัน Marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน	49
10	เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเทคนิค ARDRA ด้วยเอนไซม์ <i>HinfI</i> (ก) และ <i>MseI</i> (ข) สัญลักษณ์ GM: มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม, Non-GM: มะละกอปกติ หมายเลข 1-6 คือ มะละกออายุ 60-210 วัน Marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน	50
11	เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเทคนิค ARDRA ด้วยเอนไซม์ <i>RhaI</i> สัญลักษณ์ GM: มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม, Non-GM: มะละกอปกติ หมายเลข 1-6 คือ มะละกออายุ 60-210 วัน Marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน	51
12	Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม GM และ มะละกอปกติ Non-GM ตั้งแต่มะละกออายุ 60 วัน (1) ถึง มะละกออายุ 210 วัน (6) ที่ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ <i>HhaI</i> , <i>MseI</i> , <i>MspI</i> , <i>RhaI</i> และ <i>HinfI</i> คำนวณค่า Similarity ด้วย Dice Similarity coefficient และสร้างแผนภูมิ Dendrogram ด้วยวิธี UPGMA	52
13	เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากดินรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (ก) และดินรอบรากมะละกอปกติ (ข) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (ซ่าย) และอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีสารปฏิชีวนะ Kanamycin (ขวา)	55
14	การตรวจสอบโอกาสที่จะเกิดการถ่ายยีนจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมไปยังแบคทีเรียรอบราก ด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจในส่วนต่อของ 35S promoter และยีน <i>npII</i> ซึ่งเป็นยีนเป้าหมาย (879bp) และ 16S rDNA เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย (1500bp)	56

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 15 ประสิทธิภาพของเทคนิค PCR ในการตรวจสอบโอกาสที่จะเกิดการถ่ายยีนโดย
ตรวจส่วนของ 35S promoter และยีน *npII* ซึ่งเป็นเป้าหมาย (876bp) และมี
16S rDNA เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย (1500bp) ใช้เชื้อ *E.coli* ที่มีพลาสมิด
p2CMCP ที่ทราบปริมาณของเชื้อที่แน่นอน

57

การประเมินผลกระทบของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมต่อระบบนิเวศของเชื้อ แบคทีเรียบริเวณรากพืช

Assessing the Effects of Transgenic Papaya on the Ecology of Rhizosphere Bacteria

คำนำ

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์มีพัฒนาการก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะศาสตร์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology) ในการศึกษาการแสดงออกของยีนและการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่เป็นเป้าหมายเพื่อนำความรู้ดังกล่าวนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกและในการปรับปรุงพันธุ์ทั้งพืชและสัตว์ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (Genetic Engineering) โดยการถ่ายยีนจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งเข้าสู่สิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมาจากแหล่งที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิงเช่นจากจุลินทรีย์เข้าสู่พืช เป็นการผสมข้ามเผ่าพันธุ์ (Cross Breeding) เพื่อให้มีลักษณะที่ต้องการพืชและสัตว์ที่ได้รับการถ่ายยีนเรียกว่าพืชหรือสัตว์ที่ตัดแปลงพันธุกรรม (Transgenic plant และ Transgenic animal) เรียกโดยรวมว่า GMOs (Genetically Modified Organism) ได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มาใช้กันอย่างกว้างขวาง เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตเวชภัณฑ์ เกษษภัณฑ์ การกำจัดของเสียในสภาพแวดล้อม การผลิตพืชและสัตว์ทางการเกษตร เช่น ข้าวโพดที่ต้านทานต่อหนอนเจาะลำต้น ถั่วเหลืองต้านทานสารกำจัดวัชพืช ฝ้ายที่ต้านทานต่อหนอนเจาะสมอฝ้ายและข้าวสีทองที่มีวิตามินเอสูง เป็นต้น

ในประเทศไทยได้มีการใช้เทคนิคดังกล่าวในการปรับปรุงพันธุ์มะละกอให้มีความต้านทานต่อไวรัสใบด่างวงแหวน ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญที่สุดของการผลิตมะละกอในประเทศไทย และแหล่งผลิตอื่นๆทั่วโลก โรคใบด่างวงแหวนเกิดจากเชื้อไวรัส (papaya ringspot virus) ที่อยู่ในกลุ่ม Potyvirus มีการถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อนหลายชนิดเป็นพาหะ มะละกอตัดแปลงพันธุกรรมสร้างขึ้นจากการถ่ายยีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสบางส่วนคือ โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein)

เข้าสู่โครโมโซมของมะละกอทำให้มะละกอเกิดความต้านทานต่อโรคดังกล่าว (นุชนาถ และคณะ, 2548) แต่พืชตัดแปลงพันธุกรรมไม่เป็นที่ยอมรับให้ปลูกเป็นการค้าเนื่องจากผู้บริโภคยังมีความกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่อาจเกิดขึ้นจากมะละกอตัดแปลง

พันธุกรรม ดังนั้นในการนำไปปลูกในสภาพแวดล้อมจริงเพื่อให้มีความแน่ใจว่ามะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและผลผลิตต่างๆที่ได้มาจากเทคโนโลยีสมัยใหม่ มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม จึงจำเป็นต้องมีการประเมินความเสี่ยงทางด้านความปลอดภัยของพืชและสิ่งมีชีวิตตัดแปลงพันธุกรรมที่มีต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

การตรวจสอบและประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ (Biosafety) ของสิ่งมีชีวิตตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมนั้น จำเป็นต้องมีการประเมินความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและต่อสิ่งแวดล้อมทางด้านระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ ในด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภคคือการตรวจสอบปริมาณและชนิดของโปรตีน ทางด้านสิ่งแวดล้อมนั้นจะประเมินผลกระทบต่อระบบนิเวศ เช่นต่อชนิดและปริมาณของสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้องกับมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบกับมะละกอปกติ รวมถึงโอกาสที่จะเกิดการถ่ายยีนจากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมสู่สิ่งแวดล้อม (horizontal gene transfer) โดยงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะประเมินความปลอดภัยในการปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมทางด้านสิ่งแวดล้อม โดยวิเคราะห์ถึงผลกระทบต่อประชากรของจุลินทรีย์ดินบริเวณรอบรากมะละกอ โดยเฉพาะระบบนิเวศของเชื้อแบคทีเรีย

เนื่องจากแบคทีเรียมีความไวต่อกระบวนการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (transformation) ตามธรรมชาติอยู่แล้ว อีกทั้งแบคทีเรียนั้นสัมผัสโดยตรงอย่างใกล้ชิดกับพืชตัดแปลงพันธุกรรมทั้งขณะพืชมีชีวิตและในรูปเศษซากพืช ดังนั้นการประเมินความปลอดภัยของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมนั้นจะเปรียบเทียบประชากรของแบคทีเรียทางด้านปริมาณ ชนิดของแบคทีเรีย การศึกษาในกลุ่มประชากร โดยความแตกต่างทางสรีรวิทยา (Community level physiological profile, CLPP) รวมทั้งตรวจสอบการถ่ายยีนจากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมสู่แบคทีเรียบริเวณรอบรากพืช เพื่อป้องกันถึงผลกระทบของการปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมต่อระบบนิเวศของเชื้อแบคทีเรีย อีกทั้งเป็นข้อมูลหนึ่งในการนำไปใช้พิจารณาการทดลองในภาคสนามจนถึงในขั้นการปลดปล่อยสู่สภาพแวดล้อมเพื่อปลูกมะละกอเป็นการค้าต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบผลกระทบจากการปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่ส่งผลกระทบต่อประชากร และระบบนิเวศของแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากพืช โดยรวมทั้งชนิด ปริมาณ รวมถึงกลุ่มประชากรแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการถ่ายยีนจากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมสู่เชื้อแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรอบราก

ตรวจเอกสาร

มะละกอ

มะละกามีชื่อวิทยาศาสตร์ *Carica papaya* Linn. สกุล *Carica* วงศ์ Caricaceae ลักษณะทั่วไป เป็นพืชที่อยู่ในเขตร้อนเป็นพรรณไม้พุ่มยืนต้นเนื้ออ่อนมีแหล่งกำเนิดมาจากเขตร้อนของทวีปอเมริกา และได้แพร่กระจายมายังทวีปเอเชียในปี ค.ศ. 1600หรือในปี พ.ศ. 2143 (ทวีเกียรติ, 2527) ลำต้นสูงประมาณ 5-7 เมตร ลำต้นตั้งตรงแตกใบเป็นกลุ่มบริเวณปลายยอด อาจพบแขนงย่อยบ้าง 1-2 กิ่ง ทุกส่วนของมะละกอจะมียางสีขาวใบหยักลึกเข้าหากกลางใบ 7-11 หยัก สีเขียว ใบไม้ก้านใบกลมวงและค่อนข้างยาวดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่คนละต้นมีสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ผลมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันตามแต่ละพันธุ์ แต่โดยทั่วไปผลจะมีรูปร่างกลมป้อมจนถึงรียาว เมื่อดิบสีเขียว พอสุกจะมีเนื้อสีเหลือง สีส้มหรือสีแดง มีเมล็ดภายในจำนวนมากมีสีดำหรือน้ำตาล ในการให้ผลผลิตหลังจากปลูกประมาณ 4-8 เดือน เมื่อต้นอายุมากขึ้นผลผลิตจะลดลง (วัฒนา, 2531)

มะละกอเป็นไม้ผลที่คนนิยมรับประทาน โดยผลดิบนำมาปรุงอาหารเช่น ส้มตำ แกงส้ม ส่วนผลสุกนิยมนำมารับประทานสด มะละกอดิบมีเอนไซม์ปาเปน (Papain) และไคโมปาเปน (chymopapain) เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ นิยมใช้มากในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การฟอกหนัง เครื่องสำอาง ยารักษาโรค อาหารกระป๋อง การทำเบียร์ เป็นต้น มะละกอสุกสีเหลืองส้มปนแดง กลิ่นหอมหวานมีวิตามินเอช่วยบำรุงสายตา วิตามินซี ธาตุเหล็ก แคลเซียม และฟอสฟอรัสสูงอีกด้วย มะละกออุดมไปด้วยสารเบต้าแคโรทีนช่วยต้านมะเร็งและให้กากใยอาหารที่ช่วยระบบขับถ่าย แก้อาการท้องผูก จากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของมะละกอสุก พบว่าประกอบด้วยน้ำ 88 % น้ำตาล 10 % โปรตีน 0.5 % ไขมัน 0.1 % กรดอินทรีย์ 0.1 % (ประพันธ์, 2525)

ประเทศผู้ผลิตมะละกอที่สำคัญของโลก ได้แก่ บราซิล เม็กซิโก อินโดนีเซีย อินเดีย ฟิลิปปินส์ และในประเทศไทยซึ่งมีการปลูกมะละกอกระจายทั่วไปในภาคต่างๆ เพื่อใช้บริโภคและอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง มะละกอที่ปลูกเป็นการค้า จะมีแหล่งปลูกในจังหวัดราชบุรี นครปฐม สมุทรสงคราม กาญจนบุรี สุพรรณบุรี จันทบุรี ชุมพร และสุราษฎร์ธานี เป็นต้น (วัฒนา, 2531)

โรคใบด่างวงแหวนของมะละกอ

ราวปี พ.ศ.2519 มีการพบโรคใบด่างวงแหวนของมะละกอแพร่ระบาดในประเทศไทยเป็นครั้งแรกในจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น ขอนแก่น ร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์ จากนั้นได้ถูกกลายพันธุ์ระบาดลงมาจนถึงแหล่งปลูกใหญ่ในภาคกลาง คือ จังหวัดราชบุรี นครปฐม สมุทรสาคร ในราวปี พ.ศ.2526 และได้ทวีความรุนแรงจนถึงปัจจุบันกลายเป็นโรคระบาดที่มีความสำคัญของมะละกอ พบแพร่ระบาดไปทุกภาคของประเทศไทย ส่งผลกระทบต่อการผลิตมะละกออย่างมาก

โรคใบด่างวงแหวนของมะละกอนั้นเกิดจากเชื้อไวรัส papaya ringspot virus (PRSV) โดยเชื้อไวรัสสามารถเข้าทำลายมะละกอได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต (วิชัย และคณะ, 2545) อาการของโรคนั้นจะขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของพืชที่ถูกทำลาย ความแข็งแรงของต้นพืช อุณหภูมิสภาพแวดล้อม ตลอดจนสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส อาการพบได้ทั้งที่บนใบ ลำต้น ก้าน และผล อาการที่พบโดยทั่วไปคือใบด่างสีเขียวสลับสีเหลือง เนื้อใบไม่เรียบเป็นคลื่น (puckering) หรือบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง (distortion) ในสภาพอากาศเย็นอาการของโรคจะรุนแรงขึ้น ใบด่างอย่างชัดเจน (mosaic) บนผลมีอาการคล้ายกับบนต้นและก้านใบเป็นจุดสีเขียวข้ำน้ำหรือเป็นขีดเล็กๆ และอาการจุดวงแหวน (ringspot) สีเขียวพบมาก ชัดเจนบนผลจุดวงแหวนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อผลสุกผิวของผลขรุขระ เนื้อภายในแข็งและเน่าเมื่อผลเริ่มสุกปริมาณน้ำตาลในผลลดลง ต้นที่เป็นโรคจะมีข้อสั้นลง (เรื่อนันท์, 2544)

การถ่ายทอดโรค การถ่ายทอดเชื้อ PRSV ในธรรมชาติอาศัยแมลงในวงศ์ Aphideae ได้แก่ เพี้ยอ่อนชนิดต่างๆ เป็นพาหะ เช่น เพี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*) (Jensen, 1949) เพี้ยอ่อนยาสูบ (*Myzus persicae*) (Conover, 1964) เพี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis craccivora*) ในลักษณะ non-persistent กระบวนการถ่ายทอดโรคโดยแมลงพาหะที่ต้องการ helper component คือ โปรตีน (amorphous inclusion body, AI) ซึ่งสร้างขึ้นในเซลล์พืชอาศัยรหัสจากเชื้ออาร์เอ็นเอไวรัส ถ่ายทอดด้วยวิธีกล สามารถถ่ายทอดโรคทางรากได้ 2-3 % (เรื่อนันท์, 2544)

มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานต่อโรคใบด่างวงแหวน

มะละกอกับเป็นพืชที่สามารถเจริญได้ทั่วไปในพื้นที่เขตร้อน รวมถึงการปลูกมะละกอในฮาวาย (Gonsalves, 1998) โรคใบด่างวงแหวนมีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในแหล่งปลูกมะละกอโดยมีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ ซึ่งมะละกอส่วนใหญ่ไม่ต้านทานต่อโรคดังกล่าว (Gonsalves and Ishii, 1980) มีการศึกษาใช้เชื้อสายพันธุ์ที่เกิดโรคไม่รุนแรงปลูกเชื้อเพื่อป้องกันการทำลายของไวรัสใบด่างวงแหวน ควบคุมและป้องกันโรคใบด่างวงแหวนในฮาวาย (Yeh and Gonsalves, 1984) สายพันธุ์รุนแรง (cross protection) ในไต้หวันและประเทศไทย (วิชัย และคณะ, 2545) มีรายงานความสำเร็จในการถ่ายยีน โปรตีนห่อหุ้มไวรัสเข้าสู่มะละกอพันธุ์ Sunrise, Sunset และ Kapoho (Fitch *et al.*, 1990) ในปี ค.ศ. 1992 คณะผู้วิจัยนี้ได้พัฒนามะละกอสายพันธุ์ Sunup ที่มีเนื้อสีแดงและ Rainbow ที่มีเนื้อสีเหลือง ให้มีความต้านทานต่อโรคใบด่างวงแหวนซึ่งสามารถเจริญได้ในพื้นที่ที่หลากหลายใน Pima เนื่องจากให้ผลผลิตได้มากกว่าสายพันธุ์อื่น อีกทั้งมีการยืนยันความสามารถในการต้านทานโรคใบด่างวงแหวนในแปลงทดลอง ในปี ค.ศ. 1998 หรือ ในปี พ.ศ. 2541 ได้เผยแพร่และแจกจ่ายเมล็ดพันธุ์ให้แก่เกษตรกรฮาวายปลูกเป็นการค้า

ความก้าวหน้าของการพัฒนาพันธุ์มะละกอด้านต้านทานโรคสำหรับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2538 ดร.นงลักษณ์ ศรีนทุ นักวิชาการกรมวิชาการเกษตรเดินทางไปปฏิบัติงานในมหาวิทยาลัยคอร์เนล เพื่อสร้างมะละกอดัดต่อสารพันธุกรรมแล้วในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2540 ดร.นงลักษณ์ ได้นำพืชและเนื้อเยื่อมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมกลับประเทศไทย และทำการศึกษาต่อในโรงเรือนทดลองเพื่อคัดเลือกต้นที่มีความต้านทานต่อ PRSV แล้วจึงนำไปทดสอบในแปลงทดลองในสภาพธรรมชาติ ในปี พ.ศ. 2543 ถึงปัจจุบัน โดยมะละกอแสดงความต้านทาน PRSV ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์เปรียบเทียบที่เป็นโรครุนแรงถึง 72 เท่า การดำเนินงานทดลองในสภาพแปลงจนถึงปัจจุบันดำเนินการที่สถานีทดลองพืชสวนขอนแก่น

ปัจจุบันการวิจัยพัฒนามะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในประเทศไทย ได้มีการดำเนินการวิจัยทั้งสิ้น 3 แห่ง คือ

1. หน่วยปฏิบัติการพันธุ์วิศวกรรมด้านพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต

กำแพงแสน ดำเนินการวิจัยพัฒนามะละกอดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์แขกนวลให้การต้านทานโรคใบด่างวงแหวน และยังมีคุณสมบัติในการเก็บรักษา โดยการทำให้สุกช้าเพื่อยืดอายุในการวางจำหน่าย

2. สถานีทดลองพืชสวนขอนแก่น กรมวิชาการเกษตร ดำเนินการทดลองปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม ในมะละกอ 2 สายพันธุ์ คือ แขนงवलและแขนงดำ ที่ได้ทำการตัดแปลงพันธุกรรมให้มีความต้านทานต่อไวรัสใบด่างวงแหวนระหว่าง 90-100 %

3. สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ดำเนินการศึกษาวัยขั้นพื้นฐานเกี่ยวกับกลไกความต้านทานต่อโรคใบด่างวงแหวนของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2547)

การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชตัดแปลงพันธุกรรม

ปัจจุบันมีการอนุญาตให้มีการปลูกพืชตัดแปลงพันธุกรรมอย่างแพร่หลาย จึงมีความห่วงใยเกี่ยวกับผลกระทบจากการปลูกพืชตัดแปลงพันธุกรรมต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการถ่ายทอดยีนสู่สิ่งแวดล้อมหรือผลกระทบอื่นที่มีต่อระบบนิเวศวิทยา และความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศวิทยา โดยจะเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกสายพันธุ์ปกติทั่วไป (Conner *et al.*, 2003) การประเมินโอกาสที่จะเกิดความเสียหายเพื่อนำไปใช้ในการจัดระบบป้องกันผลเสียที่เกิดหรือทั้ง 2 อย่าง การประเมินความเสี่ยงที่เกิดขึ้นควรทำการประเมินในหลายๆด้าน (Kaplan and Garrick, 1981) ไม่นานมานี้มีการตื่นตัวในการประเมินความเสี่ยงของการปลูกพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ประชากรจุลินทรีย์ในดินเปรียบเทียบกับพืชปกติ แต่ยังไม่พบผลกระทบดังกล่าวอย่างชัดเจน โดยอาจเป็นผลจากการไม่มีผลกระทบ หรือจากวิธีการศึกษาวิเคราะห์ยังไม่ชี้ชัดให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างพืชและจุลินทรีย์รอบรากพืช มีการนำวิธีใหม่ๆมาใช้ในการประเมินผลกระทบของการปลูกพืชตัดแปลงพันธุกรรมต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งวัดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่น จากความแตกต่างทางสรีรวิทยาในการใช้แหล่งคาร์บอนมาวิเคราะห์โครงสร้างของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ (community-level physiological profiles (CLPP)) (Conner *et al.*, 2003; Garland and Mills, 1991)

ในประเทศไทยได้มี นโยบายในการศึกษาประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชตัดแปลงพันธุกรรมเช่นกัน โดยใช้มะละกอตัดแปลงพันธุกรรมเป็นตัวอย่างในการประเมินทั้งทางด้านสิ่งแวดล้อมและที่มีต่อผู้บริโภค ทางด้านสิ่งแวดล้อม คือการศึกษาผลกระทบของการปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่มีต่อจุลินทรีย์ดิน รวมถึงผลกระทบที่มีต่อวงจรชีวิตของแมลงที่มีประโยชน์ในธรรมชาติ ทางจุลินทรีย์ดินนั้นจะศึกษาวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบทั้งชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ในดิน เปรียบเทียบระหว่างมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมกับมะละกอปกติ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2547)

จุลินทรีย์บริเวณรอบราก (Rhizosphere microbes)

ในปี 1904 Hiltner ได้กล่าวถึงจุลินทรีย์บริเวณรอบรากพืช (rhizosphere microbes) ว่า จุลินทรีย์ดังกล่าวได้รับอิทธิพลจากรากพืชโดยตรง รากพืชนั้น (rhizosphere) แบ่งเป็น 2 ส่วนคือ บริเวณรอบนอกรากพืช (ectorhizosphere) และบริเวณผิวรากพืช (endorhizosphere) ส่วนของ บริเวณผิวรากพืช มีการอธิบายในหลายส่วนที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์สิ่งแวดล้อม เช่น ส่วนบริเวณ ชั้นเมือก (mucoïd) บริเวณผิวรากคือชั้น epidermal ของเนื้อเยื่อรากรวมถึงรากขนอ่อนและส่วนของ cortical cells (Sørensen, 1997) การเจริญของจุลินทรีย์บริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) จะได้รับสารอาหารจากรากพืช เนื่องจากรากพืชจะปล่อยสารประกอบอินทรีย์ต่างๆออกมา รวมถึงเซลล์พืชที่ตายบริเวณปลายราก (Lynch and Whipps, 1990; Bowen and Rovira, 1991) สารประกอบดังกล่าวช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริเวณรอบรากพืช รวมถึงโครงสร้างของประชากรจุลินทรีย์ในดิน ชนิดของจุลินทรีย์และปริมาณของประชากร แสดงให้เห็นว่า สารประกอบอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมานั้นมีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน ระหว่างรากพืชและ จุลินทรีย์รอบรากพืช จากหลักการนี้จึงได้มีการนำมาใช้ในการวิเคราะห์ พิจารณากลุ่มประชากร จุลินทรีย์ธรรมชาติ (Griffiths *et al.*, 1999; Jaeger *et al.*, 1999) โดยพืชในธรรมชาติแต่ละชนิดนั้น จะมีการปลดปล่อยสารที่เฉพาะเจาะจง จึงมีผลต่อชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์รอบรากพืชซึ่งก็จะมี ความเฉพาะเจาะจงเช่นกัน (Bowen and Rovira, 1991; Lynch and Whipps, 1990)

การศึกษาผลกระทบในการปลูกคาโนล่า (*Brassica napus*) ดัดแปลงพันธุกรรม ที่ทำให้ ด้านทานต่อสารควบคุมวัชพืช จำนวน 4 ชนิดปลูกทดลองในพื้นที่ 4 แห่ง ศึกษาผลกระทบที่มีต่อ ความหลากหลายของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ดิน โดยเก็บตัวอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ปี เพื่อทำการ วิเคราะห์กลุ่มโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ community-level physiological profile (CLPP) โดยใช้ ระบบ BIOLOG ในการศึกษาและประเมินผลด้วยวิธีทางสถิติ principal component analysis พบว่าจุลินทรีย์ที่พบภายในราก และบริเวณผิวรากของคาโนล่าดัดแปลงพันธุกรรมบางสายพันธุ์ แตกต่างไปจากสายพันธุ์ปกติ ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากการปลดปล่อยโปรตีนจากการถ่ายยีนที่ทำให้ ด้านทานสาร glyphosate มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์รอบราก (Dunfield and Germida, 2001) เช่นเดียวกันกับที่มีรายงานในถั่วเหลืองที่ถ่ายยีน glyphosate มีผลทำให้รา *Fusarium* ซึ่งเป็นเชื้อโรคที่อยู่ในดิน (soil-borne pathogen) เข้าทำลายถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม ได้ดีกว่าถั่วเหลืองปกติ (Kremer *et al.*, 2000)

ระบบและเทคนิคที่ใช้ในการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์

1. BIOLOG system

BIOLOG system คือ ระบบที่ใช้ศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์และจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ ระบบ BIOLOG นั้นพัฒนามาจากวิธีการตรวจวัดค่าเมตาบอลิซึม คล้ายคลึงกับเทคนิค plaque biofilm microcosms เป็นรูปแบบ (Profile) ที่ได้จากการใช้สารประกอบ dental plaque เพื่อตรวจสอบจุลินทรีย์แบบ plaque biofilm microcosms ซึ่งระยะเวลาในการบ่มเชื้อและปัจจัยภายนอกต่างมีผลกระทบต่อการวิเคราะห์เป็นอย่างมาก จึงนำระบบ BIOLOG มาใช้ในการจัดกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จากการใช้แหล่งคาร์บอน ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวใกล้เคียงกับเทคนิค dental plaque biofilm และการวิเคราะห์หา predominantly anaerobic ของกลุ่มจุลินทรีย์ (Anderson *et al.*, 2002) ประชากรจุลินทรีย์ในดินมีกลไกการเจริญที่ขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารที่ใช้โดยเฉพาะกับแหล่งคาร์บอน หลักการดังกล่าวนำไปสู่การพัฒนาเป็นวิธีการเพื่ออธิบายและหาลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ รวมถึงมวลสารของจุลินทรีย์ ปริมาณไนโตรเจนกิจกรรมของจุลินทรีย์, ฐานฐานวิทยา และความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ (Zak *et al.*, 1994; Tiedje *et al.*, 1999; Teri *et al.*, 2002)

ระบบ BIOLOG ยังเป็นวิธีที่ใช้สำหรับจำแนกจุลินทรีย์ประเภท heterotrophic อาศัยการใช้แหล่งของคาร์บอนที่แตกต่างกันของจุลินทรีย์ เมื่อเกิดการใช้แหล่งคาร์บอนดังกล่าวจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสาร tetrazolium dye ที่ใช้เป็นดัชนีแสดงให้เห็นถึงการ ใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ BIOLOG จึงเป็นวิธีที่ใช้จัดจำแนกได้อย่างรวดเร็ว (Garland and Mills, 1991) ลักษณะของ Biolog plate เป็น microtiter plate ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 95 ชนิดที่ใช้ในการตรวจสอบกลุ่มจุลินทรีย์ทำให้การตรวจสอบเป็นไปอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยอาศัยรูปแบบลักษณะความสามารถในการเจริญในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของกลุ่มจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมโดยตรง แต่ระบบ BIOLOG อาจมีปัญหาการตรวจวัดที่เกิดจากความเข้มข้นของเชื้อที่มากหรือน้อยเกินไปอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองที่ไม่เป็นไปตามความเป็นจริงตามธรรมชาติ (Konopka *et al.*, 1998)

การศึกษาข้อมูลทางด้านการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ (metabolic potential) มีความสำคัญเนื่องจากช่วยให้มีความเข้าใจบทบาทของจุลินทรีย์ในแต่ละสิ่งแวดล้อมที่ต่างกััน การนำระบบ BIOLOG มาใช้ในการอธิบายข้อมูลดังกล่าว ต้องคำนึงถึงหลักสำคัญในการ

วิเคราะห์ คือ ปัจจัยต่างๆ ที่จะส่งผลกระทบต่อตัวอย่าง จำนวนซ้ำ สภาวะแวดล้อมในการบ่มและการวิเคราะห์ทางสถิติในการประมวลผล (Mafham *et al.*, 2002) ได้มีการนำเอาระบบ BIOLOG มาประยุกต์เพื่อประเมินความแตกต่างของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์บริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ของมันฝรั่งและถั่วเหลืองที่ปลูกในระบบการปลูกพืชแบบไร้ดิน (Hydroponic) โดยใช้ตัวอย่างสารละลายที่ปลูกพืชมาใส่ใน Biolog plate ที่มีแหล่งของคาร์บอนที่แตกต่างกัน 95 ชนิด หลังจากนั้นนำ Biolog plate ไปบ่มบนในอุณหภูมิที่เหมาะสม และวัดค่าที่ได้จาก redox-sensitive dye ที่ช่วงความยาวคลื่น 590 nm (Garland, 1996)

ในการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์นั้น ได้มีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่าง GN2 และ Eco plates เพื่อจำแนกกลุ่มจุลินทรีย์ประเภทที่ใช้ออกซิเจน และ heterotrophic โดยนำตัวอย่างน้ำเก็บจากสภาพธรรมชาติ 6 ตัวอย่างมาทดสอบ ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการแยกกลุ่มจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน โดยมีการนำค่าที่ได้จากการแสดงสีที่เกิดจากการใช้อาหารของจุลินทรีย์ (average well color development (AWCD)) ที่วัดวิเคราะห์สีทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทำการประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติ principle component analysis (PCA) (Choi and Fred, 1999) การศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่อาศัยหลักกลไกการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ด้วย ระบบ BIOLOG โดยทดสอบระดับความเข้มข้นของตัวอย่างที่แตกต่างกันคือ 10^{-1} และ 10^{-2} ใน Biolog GN และ GP microtiter plate ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลายที่แตกต่างกันสามารถแสดงให้เห็นการทำงานที่แตกต่างกันของกลุ่มจุลินทรีย์ ดังนั้นในการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตที่อยู่รวมกันในธรรมชาติจึงจำเป็นต้องเลือกปริมาณเชื้อที่เหมาะสมได้ใกล้เคียงในสภาพจริง (Heerden *et al.*, 2002)

Larkin (2003) ได้ศึกษาผลกระทบจากการปลูกมันฝรั่งที่มีต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินภายในระยะเวลาในการปลูก 2-3 ปี โดยศึกษาถึงจำนวนจุลินทรีย์จากสารละลายดิน โดยการใช้อาหารที่หลากหลายในการคัดเลือก วิเคราะห์กิจกรรมของจุลินทรีย์ด้วย fluorescent diacetate hydrolysis (FDA) การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารขับเคลื่อน (substrate utilization profiles) จากการใช้ Biolog GN2 plate และ วิเคราะห์องค์ประกอบของ Fatty acid methyl ester profiles (FAME) มาตรวจสอบ

Huaiying *et al.* (2002) ได้วิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในชุดดินสีแดงที่มาจาก 8 แหล่งที่มีสภาพภูมิอากาศเดียวกัน คือ เมือง Longyon จังหวัด Zhejeng ทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศจีน เพื่อตรวจสอบและปรับปรุงการใช้ประโยชน์ที่ดิน โดยใช้ระบบ BIOLOG มาประเมินโครงสร้างของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ เนื่องจาก Biolog test plates มีค่าความเป็นกรดต่างใกล้เคียง

กับในธรรมชาติและมีแหล่งคาร์บอนที่เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ในความเข้มข้นสูง มาวิเคราะห์ประชากรของจุลินทรีย์ เพื่อแบ่งกลุ่มประชากรจากการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิดของจุลินทรีย์

2. การคำนวณค่า Community Level Physiological Profile (CLPP)

เทคนิคการวิเคราะห์กลุ่มประชากร โดยดูจากความแตกต่างทางสรีรวิทยา CLPP พัฒนาจากระบบ BIOLOG ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 เพื่อแยกชนิดของกลุ่มแบคทีเรียโดยมีจุดสำคัญจากการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 95 ชนิดใน microtiter plate

Grayston *et al.* (2004) ใช้เทคนิควิเคราะห์ค่า community level physiological profile (CLPP), ค่า phospholipid fatty acid (PLFA) profile และ %เบส G+C ของ DNA มาวิเคราะห์ประเมินหาปริมาณและกิจกรรมของกลุ่มจุลินทรีย์จากดินทุ่งหญ้าในที่สูง 3 ระดับจาก 10 แหล่งที่มีความแตกต่างทางภูมิประเทศในประเทศอังกฤษ การวิเคราะห์ประเมินโดยวิธี Canonical varieties analysis (CVA) ของเทคนิค CLPP และ PLFA สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในทุ่งหญ้าที่มีความแตกต่างในด้านการจัดการดิน และตำแหน่งของแหล่งเก็บดินได้ผลดี และเทคนิค PLFA ให้ผลดีกว่าในการแยกดินจากแหล่งที่มีการดูแลจัดการในระดับที่ต่างกัน ได้ Classen *et al* (2003) ใช้ถาดอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ Biolog GN2, GP2, Eco, SFN2 และ SFP2 (Biolog GN plate, Biolog Inc., Hayward, USA) ทดสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน 2 ตัวอย่าง โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 5 ระดับ พบว่า Eco plate มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

การประเมินกลุ่มจุลินทรีย์ด้วยค่า CLPP จากระบบ BIOLOG ของตัวอย่างดินจากทุ่งหญ้าในมลรัฐ California พบว่าวิธีการตรวจสอบหาความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์ที่อาศัยค่า CLPP นั้นจำนวนซ้ำในการเก็บตัวอย่างดินมีความสำคัญกว่าจำนวนซ้ำของ CLPP plate (Balser *et al.*, 2002) หลักสำคัญของการวิเคราะห์ค่า CLPP มาจากพื้นฐานการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (Konopka *et al.*, 1998) วิธีตรวจสอบโดยอาศัยค่า CLPP นั้นมีความสะดวก ง่ายต่อการใช้ รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายไม่สูง อีกทั้งเมื่อนำค่า CLPP สามารถแสดงให้เห็นการกระจายตัวได้ดีเมื่อ เปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ในการแสดงถึงการกระจายตัวของกลุ่มจุลินทรีย์ (Haack *et al.*, 1995; Garland, 1996; Balser, 2002)

เทคนิค CLPP มีการวิเคราะห์ประเมินด้วยวิธีทางสถิติที่มีหลายตัวแปร (multivariate statistical) เช่น วิธี principal components analysis (PCA) เพื่อประเมินระดับความสัมพันธ์ของตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม วิธี multivariate analysis สามารถใช้ข้อมูลจากรูปแบบการแสดงสีของตัวอย่างแต่ละตัวอย่างซึ่งเป็นค่าที่วัดได้จากช่วงเวลาบ่มเชื้อหลายๆระยะ (Garland, 1997)

นำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ยของการแสดงสีในแต่ละช่องของ Biolog plate (average well color development) มีสูตรดังนี้ $AWCD = (C-R)/\{[\Sigma(C-R)]/95\}$ โดยค่า C คือค่าการแสดงสีในแต่ละช่อง (optical density measurement) R คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม (control well) และ n คือ จำนวนของแหล่งของคาร์บอนที่แตกต่างกัน (Garland and Mills, 1991)

การวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์โดยใช้ความสามารถในการใช้แหล่งของคาร์บอนที่แตกต่างกันซึ่งเกิดจากการปฏิกิริยารีดอกซ์ของสี่ tetrazolium ที่เป็น อินดิเคเตอร์ ได้มีการนำหลักการดังกล่าวมาแยกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในตัวอย่างสารละลายของ รั้วพืช และ มันฝรั่งที่ปลูกในระบบปลูกพืชไร่นา นำค่าที่วัดได้มาหาความสัมพันธ์โดยวิธีทางสถิติ principal component analysis (PCA) และ discriminate function analysis (DFA) แสดงให้เห็นความสัมพันธ์อย่างชัดเจนในการจัดแบ่งกลุ่ม CLPP ได้ (Garland *et al.*, 2000)

Dunfield and Germida (2004) ศึกษาผลกระทบของการปลูกคาโนล่า (*Brassica napus*) ด้ดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ที่มีต่อกับความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ดินบริเวณรอบรากโดยใช้เทคนิค CLPP ร่วมกับการวิเคราะห์ Fatty acid methyl ester (FAME) จุลินทรีย์รอบรากต้นคาโนล่า (*Brassica napus*) ด้ดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานสารกำจัดวัชพืช โดยวิเคราะห์ต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ปี (1998-1999) ที่ปลูกใน 4 พื้นที่ของรัฐ Saskatchewan ในประเทศ Canada การการวิเคราะห์ CLPP พบว่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณรอบราก (rhizosphere) และที่อยู่ในราก (root interior) ของคาโนล่าด้ดแปลงพันธุกรรมต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช glyphosate สายพันธุ์ Quest มีกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่วิเคราะห์โดย CLPP และ FAME ที่แตกต่างไปจากคาโนล่าปกติสายพันธุ์ Excel ซึ่งคาดว่ากลุ่มประชากรแบคทีเรียที่แตกต่างเกิดจากสารที่รากปลดปล่อย (root exudates) ออกมามากกว่าที่จะเกิดจากโปรตีนที่แสดงออกจากรากต้านทานต่อ glyphosate ซึ่งปลดปล่อยในปริมาณที่ต่ำ (minor component)

3. เทคนิค Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

มีการศึกษาความหลากหลายของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับการดำรงชีวิตของหญ้า *Halophila stipulacea* โดยศึกษาจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่เพิ่มปริมาณ โดยเทคนิค PCR แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิค (Amplified rDNA Restriction Analysis, ARDRA) จัดกลุ่มโดยอาศัยรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่แตกต่างจากการใช้เอนไซม์ *Hinf*I และ *Hpa* II ในการตัดชิ้นดีเอ็นเอ 103 โคลน สามารถจัดกลุ่มจากรูปแบบการตัดได้ 58 กลุ่มที่แตกต่างกัน และนำโคลนชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดไปหาลำดับเบสเพื่อยืนยันผลการศึกษากลุ่มประชากรแบคทีเรียด้วยเทคนิค ARDRA (Weidner *et al.*, 1996) ได้มีการนำเทคนิค ARDRA มาศึกษาความแตกต่างของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในกระบวนการ modified Ludzack-Ettinger (MLE) ที่เก็บตัวอย่างมาจากน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมมาบำบัดด้วยวิธี waste water treatment plants (WWTPs) โดยเก็บตัวอย่างทั้งกระบวนการ oxic และ anoxic มาศึกษาโดยใช้เอนไซม์ *Alu*I และ *Msp*I ในการตัด 16S rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้ ซึ่งเทคนิค ARDRA สามารถตรวจสอบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันในโคลนน้ำเสียได้ (Gich *et al.*, 2000)

Hsieh and Pan (2006) ประยุกต์นำเทคนิค ARDRA มาศึกษาผลกระทบของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานต่อไวรัสใบด่างวงแหวนที่มีต่อ จุลินทรีย์ดิน ทั้งบริเวณชั้นผิวดิน 0-15 เซนติเมตร และดินชั้นล่าง 15-30 เซนติเมตร มีการเก็บตัวอย่างดินรอบบริเวณที่ปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ วิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP), amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) และ denaturing gradient gel electrophoresis analysis (DGGE) จากเทคนิคดังกล่าวที่ใช้ตรวจสอบ พบว่ากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในดินชั้นบนและดินชั้นล่าง ของดินมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ และดินต่างนั้น พบว่ามีความคล้ายคลึงของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์มากกว่า 80 % แสดงให้เห็นว่าการปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมอาจมีผลกระทบที่ต่ำมากต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ดิน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พื้นที่ใช้ทดลอง

1.1 มะละกอสายพันธุ์แขกนวล

1.2 มะละกอสายพันธุ์แขกนวลที่ตัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน โดยถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (coat protein) โดยวิธี bombardment สายพันธุ์ 116/5 R4 (นุชนาถ และคณะ, 2548)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ทดลองในโรงเรือนปิด

2.1 ดินผสม (ดิน:ขี้เถ้าแกลบ:ปุ๋ยหมัก:ขุยมะพร้าว, 6:4:2:4) ที่ไม่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ

2.2 ดินผสม (ดิน:ขี้เถ้าแกลบ:ปุ๋ยหมัก:ขุยมะพร้าว, 6:4:2:4) ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.3. ภาชนะพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว จำนวน 28 ภาชนะ (7ภาชนะต่อ ภาชนะทดลอง 1 ชุด)

2.4. ท่อ PVC ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นิ้ว ความยาว 12 นิ้ว 24 ชิ้น (6ชิ้นต่อภาชนะทดลอง 1 ชุด)

2.5. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน (auger)

3. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร Nutrient glucose agar (NGA)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร Nutrient agar (NA)

3.3 สารปฏิชีวนะ kanamycin

3.4 เครื่องวิเคราะห์จุลินทรีย์ระบบ BIOLOG และ Biolog plate 2 ชนิด (Biolog Inc., Hayward, USA)

3.4.1 GN2 plate

3.4.2 GP2 plate

3.5 เครื่อง Thermal cycler (PCR)

3.6 เครื่อง gel documentation system พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล

3.7 ชุดเครื่องมือ gel electrophoresis

3.8 คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อตรวจสอบโอกาสในการถ่ายยีน โดยมีส่วนของยีน 35S promoter ที่เชื่อมต่อกับยีนต้านทานต่อ Kanamycin (*mpII*) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยา PCR จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 867bp

35S kana 1f: 5'-CACGACACACTTGTCTACTCC-3'

35S kana 2r: 5'-GCTCTTCGTCCAGATCAT-3'

3.9 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจขยายยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วยไพรเมอร์ และ (Weisburg *et al.*, 1991)

fD1 : 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

rP2 : 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACT-3'

3.10 Restriction endonuclease

3.10.1 *Mse* I (New England BioLabs Inc., England)

3.10.2 *Hinf* I (New England BioLabs Inc., England)

3.10.3 *Rsa* I (Fermentas Ins., USA.)

3.10.4 *Msp* I (Fermentas Ins., USA.)

3.10.5 *Hha* I (Fermentas Ins., USA.)

วิธีการ

1. การเตรียมดินและการเพาะกล้ามะละกอ

เตรียมดินที่ใช้ในการปลูกมะละกอมืออัตราส่วนดังนี้ ดิน:ขี้เถ้าแกลบ:ปุ๋ยหมัก:ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 6:4:2:4 โดยปริมาตรแล้วจึงนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดมะละกอทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอกปกติ สายพันธุ์ละ 80 เมล็ด แช่ในสารละลาย KNO_3 ความเข้มข้น 1 N เป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดงอกสม่ำเสมอ (วิชัย และคณะ, 2542) นำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้ในถาดเพาะกล้า ใส่มล็ด 2-3 เมล็ดต่อหลุมและรดน้ำตาม เมื่อดันกล้าอายุประมาณ 2 สัปดาห์ จึงย้ายไปปลูกในกระถางขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้วเพื่อรอนำไปปลูกในกระถางทดลองจริงเมื่อดันกล้าแข็งแรง

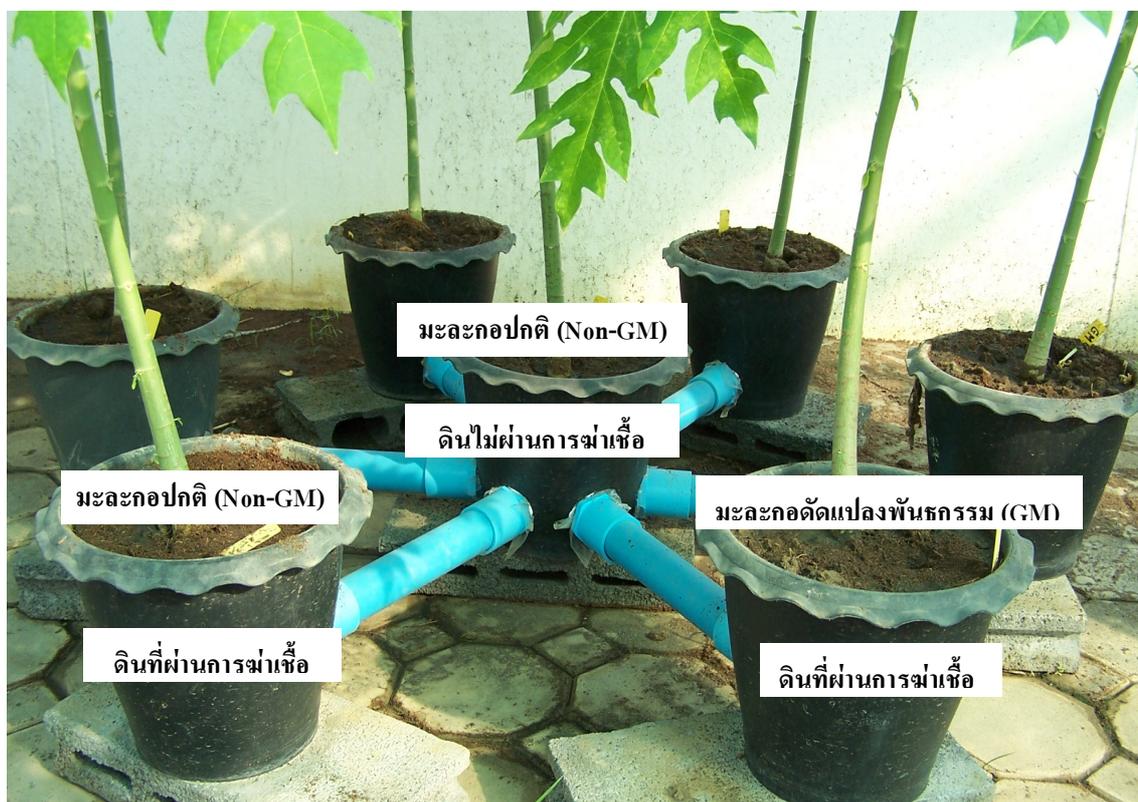
2. การออกแบบการทดลอง

ออกแบบกระถางเพื่อประเมินผลกระทบของการปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมว่ามีผลกระทบในการเหี่ยวหรือยับยั้งกลุ่มประชากรแบคทีเรีย โดยออกแบบกระถางที่มีลักษณะ ดาวกระจาย (ภาพที่ 1) จำนวน 4 ชุด ทั้ง 4 ชุดมีลักษณะเหมือนกันโดยกระถาง 1 ชุดถือเป็น 1 ซ้ำ ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอกปกติ แต่ละชุดกระถางจะประกอบด้วยกระถางขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว 7 กระถาง กระถางกลาง 1 กระถาง กระถางรอบนอก 6 กระถาง โดยแต่ละ กระถางจะเจาะรูทางด้านข้างของกระถางเพื่อต่อกับท่อพลาสติก PVC ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นิ้ว ยาว 12 นิ้ว เชื่อมต่อถึงกัน ระหว่างกระถางตรงกลางและกระถางรอบนอกโดยดัดแปลงวิธีการจาก Rasmann *et al.* (2005) กระถางกลางนั้นปลูกมะละกอกปกติในดินที่ไม่ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ เพื่อเป็นแหล่งของแบคทีเรีย ส่วนกระถางรอบนอกจะปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมร่วมกับ มะละกอกปกติในดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อเพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย อีกทั้งมีการควบคุมความชื้น เพื่อให้จุลินทรีย์เดินทางจากกระถางกลางไปกระถางรอบนอก โดยการเจาะรูบริเวณก้นกระถาง ซึ่ง กระถางกลางนั้นจะไม่มี การเจาะรูที่ก้นกระถาง เพื่อให้ความชื้นมากกว่ากระถางโดยรอบ

โดยแบ่ง Treatment เป็น 2 คือ

1. Treatment ที่ 1 คือ มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์แบกนวล 116/5 R4
2. Treatment ที่ 2 คือ มะละกอกปกติสายพันธุ์แบกนวล

วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง Treatment มะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติที่มีผลต่อประชากรแบคทีเรีย และธาตุอาหารในดินด้วยวิธีทางสถิติ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %



ภาพที่ 1 การปลูกมะละกอในกระถางทดลองที่มีลักษณะดาวกระจาย 7 กระถาง โดยกระถางกลางปลูก มะละกอปกติในดินที่ไม่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ เชื่อมต่อไปยังกระถางรอบนอก 6 กระถางที่ปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม (GM) 3 กระถาง ร่วมกับมะละกอปกติ (Non-GM) 3 กระถางใน ดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ

3. การดูแลและให้ปุ๋ย

การให้ปุ๋ยมะละกอ เริ่มใส่เมื่อต้นกล้ามะละกอมีอายุ 45 วัน โดยใส่ปุ๋ยยูเรียจำนวน 2 ๘/ต้น ในระยะแรกจำนวน 2 ครั้งเพื่อบำรุงต้น และใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 เมื่อต้นมีอายุ 1 เดือน ปริมาตร 3-5 ๘/ต้น ทุกๆ 15 วัน และปุ๋ยน้ำสูตร 21-21-21 และธาตุอาหารเสริมต่างๆในปริมาณ 6-7 ๘/น้ำ 1 ลิตร มีการให้ทางใบร่วมกับการใส่ปุ๋ยลงดินตลอดระยะเวลา 6 เดือน การให้น้ำโดยให้น้ำวันละ 2 ครั้ง ปริมาตร 500 ml/ต้น ในช่วงเช้า และเย็น ด้วยน้ำประปา

4. การควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าของมะละกอ

เนื่องจากโรคโคนเน่ารากเน่าของมะละกอ ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pythium* spp. และ *Phytophthora* spp. เป็นปัญหาเกี่ยวกับการปลูกมะละกอ ทำให้ต้นเกิดอาการ โคนเน่ารากเน่าตาย ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราเมทาแลกซิล (Metalaxyl) ในปริมาณ 3 g/น้ำ 1 ลิตร ในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนตุลาคม โดยราดสารป้องกันกำจัดเชื้อราให้กับต้นมะละกอทุก สัปดาห์แรกของเดือน ในอัตรา 500 ml/ต้น

5. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากในระดับความลึกจากผิวดิน 0-15 เซนติเมตร โดยประมาณ ด้วยอุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน (auger) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากพืช 3 จุด/กระถาง เก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 3 กระถางของแต่ละ treatment ใน 1 ชุดกระถาง แล้วผสม คลุกเคล้าตัวอย่างดินทั้ง 3 กระถางเป็น 1 ซ้ำของ treatment มะละกอตัดแปลงพันธุ์กรรมและ มะละกอปกติ เริ่มเก็บตัวอย่างดินตั้งแต่มะละกออายุ 60 วัน เก็บตัวอย่างดินติดต่อกัน 30 วันจน มะละกอมีอายุ 210 วัน ดังตารางที่ 1 เก็บรักษาตัวอย่างดินโดยนำตัวอย่างเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอนำไปวิเคราะห์ต่อ

ตารางที่ 1 การเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณรากมะละกอเพื่อการวิเคราะห์ ตั้งแต่มะละกออายุ 60 วัน จนถึงมะละกออายุ 210 วัน

ครั้งที่	ตัวอย่าง	อายุของต้นมะละกอ	สัญลักษณ์
1	มะละกอตัดแปลงพันธุ์กรรม, มะละกอปกติ	มะละกออายุ 60 วัน	GM1, Non-GM1
2	มะละกอตัดแปลงพันธุ์กรรม, มะละกอปกติ	มะละกออายุ 90 วัน	GM2, Non-GM2
3	มะละกอตัดแปลงพันธุ์กรรม, มะละกอปกติ	มะละกออายุ 120 วัน	GM3, Non-GM3
4	มะละกอตัดแปลงพันธุ์กรรม, มะละกอปกติ	มะละกออายุ 150 วัน	GM4, Non-GM4
5	มะละกอตัดแปลงพันธุ์กรรม, มะละกอปกติ	มะละกออายุ 180 วัน	GM5, Non-GM5
6	มะละกอตัดแปลงพันธุ์กรรม, มะละกอปกติ	มะละกออายุ 210 วัน	GM6, Non-GM6

6. การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดิน

6.1 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นดิน

วิเคราะห์ปริมาณชื้นของดิน โดยการนำตัวอย่างดินมาชั่งน้ำหนักก่อนการอบแห้ง นำดินไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนน้ำหนักดินคงที่ จากนั้นคำนวณโดยหาปริมาณความชื้นโดยใช้สูตร

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักดินก่อนอบ} - \text{น้ำหนักดินหลังอบ}}{\text{น้ำหนักดินหลังอบ}} \times 100$$

6.2 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือค่าความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของดิน โดยการนำดินมาผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ทำการละลายดินและน้ำให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที และตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ให้สารละลายตกตะกอน วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของด้วยเครื่อง pH meter

6.3 การวิเคราะห์ปริมาณ ไนโตรเจนทั้งหมด

โดยวิธีการสกัดด้วยวิธีของ Kjeldahl ซึ่งเป็นวิธีที่มีลักษณะ wet oxidation เมื่อสกัดไนโตรเจนทั้งหมดออกมาโดยการเปลี่ยนแปลงอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นสารอนินทรีย์ไนโตรเจน แล้วนำไปหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (สารอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน) ด้วยการกลั่นและใช้ boric acid เป็น indicator แล้วนำไปทำการไตเตรทเพื่อหาปริมาณไนโตรเจนโดยการทำปฏิกิริยากลับต่าง (Bremner, 1960; Jones, 1991)

6.4 การวิเคราะห์ค่าฟอสฟอรัส

การวิเคราะห์ค่าฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลาย Bray I หรือ II ด้วยการที่นำสารละลายกรดมาทำปฏิกิริยากับฟอสฟอรัสในดินเพื่อแยกฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินออกมา นำฟอสฟอรัสที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วย Molybdenum blue ซึ่งสารดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับฟอสฟอรัสและเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืน

คลื่นแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่นที่ 882 nm และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Bray and Kurtz, 1945; Olsen and Sommers, 1982)

6.5 การวิเคราะห์ค่าโพแทสเซียม

การวิเคราะห์ค่าโพแทสเซียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้และโพแทสเซียมที่สามารถละลายน้ำได้ โดยวิธีการสกัดด้วยวิธี Equilibrium extraction นำสารละลายได้จากสกัดไปตรวจวัดด้วยเครื่อง Atomic Absorption spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 766.5 nm โดยส่งตรวจวิเคราะห์ที่ ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

7. การวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืช

7.1 หาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียรอบราก

7.1.1 การตรวจนับปริมาณโคโลนีและแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดิน 5 g มาละลายในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 95 ml นำสารละลายดินมาเจือจางให้ได้ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ดังกล่าว ดูดสารละลายดินที่มีความเข้มข้น 10^{-4} ปริมาตร 100 μ l เติบบนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) (beef extract 3g., peptone 5 g., glucose 2.5 g. และ agar 15 g. ต่ออาหาร 1 L) (Schaad *et al.*, 2001) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วตรวจนับโคโลนีของแบคทีเรียและสังเกตโคโลนีที่มีความแตกต่างกัน เพื่อนำเชื้อแบคทีเรียมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธีการนำเชื้อเจือจางในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและนำไป streak บนอาหาร คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นและ streak ซ้ำอีกจำนวน 2 ครั้ง รวม 3 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง NGA เพื่อศึกษาคุณสมบัติเชื้อต่อไป

7.1.2 การศึกษาพื้นฐานวิทยาจากเชื้อแบคทีเรีย

เป็นขั้นตอนการศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย โดยดูจากโคโลนีที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็ง จากนั้นศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อด้วยการย้อมสีเชื้อด้วยวิธีของแกรม

(Gram Staining) และต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด compound เพื่อดูรูปร่างและจำแนกชนิดของเชื้อเบื้องต้น (Schaad *et al.*, 2001) ขั้นแรกนำลูปเขี่ยเชื้อมาละลายบนหยดน้ำบนกระจกสไลด์และตรึงด้วยความร้อน แล้วจึงย้อมด้วยสี crystal violet ในครั้งแรก หลังจากนั้นทำการตรึงสีให้ติดเซลล์ด้วยสารละลายไอโอดีนเป็นเวลา 1 นาที ถ้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 % จากนั้นย้อมตามด้วยสี safranin O นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบที่เรียกรวมบวกจะติดสีม่วงของ crystal violet ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของ safranin O บันทึกรูปร่างของเชื้อเพื่อการจดจำแนกขั้นต่อไป

7.1.3 การจดจำแนกเชื้อด้วยระบบ BIOLOG

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อจดจำแนก (identify) ด้วยระบบ BIOLOG ตามคำแนะนำของผู้ผลิต มีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ทราบชนิดแกรมบวกหรือแกรมลบ มาทำการทดลองโดยเชื้อแกรมลบนำมาเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็ง NA (beef extract 3 g., peptone 5 g. และ agar 15 g. ต่ออาหาร 1 L) เชื้อแกรมบวกนั้นเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็ง Bacteria universal glow (BUG) ที่มี Sodium thioglycolate เพื่อลดการสร้างเมือกที่ทำให้เกิดการจับตัวกันของกลุ่มเซลล์ โดยบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหากเป็นเชื้อแกรมลบ ต้องทดสอบแยกชนิดย่อยลงไปจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Oxidase ทดสอบโดยใช้แผ่นทดสอบสำเร็จรูป Bactident[®] Oxidase (Merck, Germany) เมื่อทราบสมบัติของเชื้อเบื้องต้นแล้ว นำเชื้อมาละลายในสารละลาย inoculation fluid (0.40 % NaCl, 0.03 % Pluronic F-68, 0.02 % Gellan Gum) ปรับค่าการดูดกลืนแสงตามชนิดการติดสีแกรมของเชื้อ นำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย เติมลงใน Biolog plate สำหรับแกรมลบใช้ถาดอาหารชนิด GN2 หรือแกรมบวกใช้ถาดอาหารชนิด GP2 ปริมาตร 150 μ l/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นระยะเวลา 4-6 และ 12-24 ชั่วโมง ตามแต่ชนิดของเชื้อ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 nm เพื่อวัดสีจากการใช้แหล่งคาร์บอน ทำให้สี tetrazolium dye ที่มีอยู่ในอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้เกิดสี ตรวจสอบสีที่เกิดด้วยเครื่อง microplate reader (Vmax Molecular Devices, UK) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Microlog's software 4.2 (Biolog Inc., USA) เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อ

7.2 การวิเคราะห์การจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรียโดยความแตกต่างทางสรีรวิทยา (Community Level Physiological Profiles, (CLPP))

การวิเคราะห์จัดกลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยความแตกต่างทางสรีรวิทยา หรือ CLPP รายงาน โดย Garland and Mills (1991) วิธีการ โดยสังเขปดังนี้

นำสารละลายดินที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นระดับความเข้มข้น 10^{-4} ใส่ลงใน Biolog plate ชนิด GN2 (ตารางที่ 2) ในปริมาตร 150 μ l/หลุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C วัดการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงการใช้อาหารของเชื้อ หลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง โดยการใช้แหล่งคาร์บอนของกลุ่มแบคทีเรีย ทำให้สี tetrazolium dye ที่มีอยู่ในแหล่งคาร์บอนเกิดรีดิวซ์เปลี่ยนเป็นสีม่วง สามารถตรวจสอบด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 590 nm (Garland, 1996) นำค่าวิเคราะห์ที่ได้ไปคำนวณค่าเฉลี่ยในการเกิดสี (Average Well Color Development (AWCD)) ตามวิธีการของ (Garland and Mills, 1991; Doi, 2003)

คำนวณค่าเฉลี่ยในการเกิด Average Well Color Development (AWCD) แต่ละแหล่งคาร์บอนโดยใช้สูตร

$$AWCD = (C-R)/\{\sum(C-R)/95\}$$

โดยนำค่าที่วัดได้จากการเกิดสี (C) ของตัวอย่างเชื้อในดิน ลบด้วยค่าที่วัดได้จากการเกิดสีของน้ำ หรือตัวอย่างมาตรฐาน (R) หารด้วยแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้งหมด 95 แหล่ง ดังสูตร จากนั้นนำค่า AWCD ที่ได้รับในการวัดทุกช่วงเวลาข้างต้น มาวิเคราะห์ร่วมกับพันธุ์มะละกอ, แหล่งคาร์บอน และ ระยะเวลาต่างๆในการใช้แหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน 4 กลุ่ม ที่เคลือบอยู่ใน Biolog plate ชนิด GN2 ร่วมกับการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปรด้วยวิธี PCA และใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) เพื่อจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรีย เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ระหว่างมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมกับมะละกอปกติในระยะต่างๆ หลังการปลูกมะละกอ

ตารางที่ 2 แสดงแหล่งคาร์บอนใน Biolog GN2 plates

<u>Carbohydrates</u>	<u>Carboxylic acids</u>	<u>Amino acids</u>	<u>Amines</u>
N-Acetyl-d-galactosamine	Acetic acid	D-Alanin	Phenyethylamine
N-Acetyl-d-glucosamine	Cis-aconitic-acid	L-Alanine	Putrescine
Adonitol	Citric acid	L-Alanyl-glycine	2-Aminocethanol
L-Arabinose	Formic acid	L-Asparagine	
D-Arabitol	D-Galactonic acid lacticin	L-Aspartic acid	<u>Amides</u>
D-Cellobiose	D-Galacturonic acid	L-Glutamic acid	Succinamic acid
<i>i</i> -Eryhritol	D-Gluconic acid	Glycyl-L-aspartic acid	Glucuronamide
D-Fructose	D-Glucosaminic acid	Glycyl-L-glutamic acid	L-Alaninamide
L-Fucose	D-Glucuronic acid	L-Histidine	
D-Galactose	α -Hydroxybutyric acid	Hydroxy-l-proline	<u>Alcohols</u>
Gentiobiose	β -Hydroxybutyric acid	L-Leucine	2,3-Butanediol
α -d-Glucose	γ -Hydroxybutyric acid	L-Ornithine	Glycerol
m-Inositol	<i>p</i> -Hydroxyphenylacetic acid	Phenylalanine	
α -d-lactose	Itaconic acid	L-Proline	<u>Aromatic chemical</u>
Lactulose	α -Ketobutyric acid	L-Pyroglutamic-acid	Inosine
Maltose	α -Ketoglutaric acid	D-Serine	Urocanic acid
D-Mannitol	α -Ketovaleric acid	L-Serine	Thymidine
D-Mannose	D,L-Lactic acid	L-Threonine	Uridine
D-Melibiose	Malonic acid	D,L-Carnitine	
β -methy-d-glucoside	Propionic acid	γ -Aminobutyric acid	<u>Esters</u>
D-Psicose	Quinic acid		Mono-methylsuccinate
D-Raffinose	D-Saccharic acid	<u>Phosphorylated chemicals</u>	Methylpyruvate
L-Rhamnose	Sebacic acid	D,L- α -Glycerol Phosphate	
D-Sorbitol	Succinic acid	α -D-Glucose-1-Phosphate	<u>Polymers</u>
Sucrose		D-Glucose-6-Phosphate	Glycogen
D-Trehalose			α -Cyclodextrin
Turanose		<u>Brominated chemicals</u>	Dextrin
Xylitol		Bromosuccinic acid	Tween 80
			Tween 40

ที่มา: ดัดแปลงจาก Garland and Mills, 1991

8. เปรียบเทียบวิธีการสกัด จีโนมิคดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

นำสารละลายดินที่เจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-4} ปริมาตร 100 μl เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นละลายเชื้อที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็งด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารแขวนลอยเชื้อมาเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ เติสารละลายไสส่วนบนทิ้ง นำตะกอนเซลล์ไปสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี CTAB ซึ่งเป็นวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Ausubel *et al.* (1995) โดยเปรียบเทียบที่แตกต่าง 4 วิธี คือ

8.1 วิธี CTAB

นำตะกอนเซลล์มาละลายใน TE buffer (10mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA) ปริมาตร 567 μl เติม 10 % SDS (Sodium dodecyl sulfate) ปริมาตร 30 μl และ Proteinase K (20mg/ml) ปริมาตร 3 μl ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 5M NaCl ปริมาตร 100 μl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม CTAB/NaCl ปริมาตร 80 μl (10% CTAB ใน 0.7M NaCl) ผสมให้เข้ากันอย่างเบา บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที กำจัดโปรตีนด้วยโดยเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนไสด้านบนใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนโปรตีนอีกครั้งด้วย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ไสในอัตราเท่ากับ ปริมาตรของสารละลายส่วนไสผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 9,727 x g เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายไสใส่หลอดใหม่ และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isoamyl alcohol ใน ปริมาตร 0.6 ส่วนของปริมาตรทั้งหมดของสารละลายส่วนไส บ่มที่ -20°C เป็นเวลา 30 นาที นำไป หมุนเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 9,727 x g เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml จำนวน 2 รอบ ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำสะอาดที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 μl นำไปใช้ทดลองหรือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

8.2 วิธี Modified CTAB

นำตะกอนเซลล์มาละลายใน TE buffer (10 mM Tris, pH8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 467 μl เติม 10 % SDS (Sodium dodecyl sulfate) ปริมาตร 30 μl และ Proteinase K (20mg/ml) ปริมาตร 3 μl ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 5M NaCl ปริมาตร 100 μl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม CTAB/NaCl (10% CTAB ใน 0.7 M NaCl) 80 μl ให้เข้ากันอย่าง

เบา บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกำจัดโปรตีนโดยเติม phenol : chloroform (50:50) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรผสมให้เข้ากันนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 9,727 x g เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 รอบ ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม 3M (Sodium acetate, pH5.2) ในอัตราส่วน 1:10 ของปริมาตรส่วนใสผสมให้เข้ากัน ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isoamyl alcohol ในปริมาตร 0.6 ส่วนของปริมาตรทั้งหมดของสารละลายส่วนใส บ่มที่ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอ 9,727 x g เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml จำนวน 2 รอบ ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำสะอาดที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 µl นำไปใช้ทดลองหรือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

8.3 วิธี Sodium dodecyl sulfate (SDS)/Lysozyme

นำตะกอนเซลล์มาละลายใน Lysis buffer (10 mg. lysozyme ใน Tris-EDTA, pH7.6) 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate) ปริมาตร 30 µl และ Proteinase K (20mg/ml) ปริมาตร 9 µl ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง, บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือ บ่มที่ 95°C เป็นเวลา 15 นาที เติม 5M NaCl ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติม CTAB/NaCl (10% CTAB ใน 0.7 M NaCl) ปริมาตร 50 µl ผสมให้เข้ากันอย่างเบา บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกำจัดโปรตีนด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ในอัตราส่วน 1:1 ของปริมาตรผสมให้เข้ากันนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 9,727 x g เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 รอบ ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 1:1 ของปริมาตรสารละลายใส บ่มที่ -20°C เป็นเวลา 30 นาที เหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอ 9,727 x g เป็นเวลา 15 นาที เท isoamyl alcohol ที่ล้างแอลกอฮอล์ 70 % ปริมาตร 1 ml จำนวน 2 รอบ ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำสะอาดที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 µl นำไปใช้ทดลองหรือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (Honore-Bouakline *et al.*, 2003)

8.3 วิธี Silica

นำตะกอนเซลล์มาละลายด้วย Lysis buffer (120 g. guanidine thiocyanate ใน 100 ml 0.1M Tris-HCl, pH 6.4, 22 ml ของ 0.2 M EDTA, pH 8.0 และ 2.6 g Triton X-100) ปริมาตร 250 µl และ silica ปริมาตร 40 µl ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 10 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอน silica ที่ 9,727 x g เป็นเวลา 20 วินาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน silica ด้วย silica buffer (12% guanidine thiocyanate, Tris-HCl,

pH6.4) ล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วจึงล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย acetone จากนั้นตากตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 5 นาทีให้แห้งแล้วละลายตะกอนด้วย สารละลาย 12 mM Tris-HCl, pH7.4 ปริมาตร 50 μ l (Boom *et al.*, 1990)

เปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 4 วิธี

- 1) วัดปริมาณด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงความช่วงคลื่น 260/280
- 2) คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

9. เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Amplified ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

สกัดจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติที่สกัดดีเอ็นเอโดยวิธี SDS/Lysozyme ตั้งแต่มะละกออายุ 60 วัน ถึง 210 วัน แยกเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอจากแบคทีเรียรอบรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม 6 ตัวอย่าง มะละกอปกติ 6 ตัวอย่าง นำดีเอ็นเอที่ได้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยนำดีเอ็นเอความเข้มข้น 50 ng เดิมในสารละลาย Reaction ทั้งหมด 25 μ l ประกอบไปด้วย 10X PCR buffer 2.5 μ l, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 0.25 mM, คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อ 16S rDNA (fD1 5' CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3' และ rP2 5' CCC GGG ATC CAA GCT TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (Weisburg *et al.*, 1991) ชนิดละ 0.40 mM เพื่อเป็น internal standard ให้ทราบว่าปฏิกิริยา PCR มีประสิทธิภาพ และ 1U Taq DNA polymerase ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 μ l ต่อส่วนผสมของปฏิกิริยารวม 25 μ l จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ PCR ขนาด 1,500 bp มาตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจง 5 ชนิด

ตารางที่ 3 แสดงชนิดและจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด

เอนไซม์	จุดตัด
<i>Mse</i> I	T/TAA
<i>Hinf</i> I	G/ANTC
<i>Msp</i> I	C/CGG
<i>Hha</i> I	GCG/C
<i>Rsa</i> I	GT/AC

ปฏิบัติการในการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ใช้ตามคำแนะนำของผู้ผลิต (New England BioLabs Inc., England; Fermentas Ins., USA.) นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย PCR ปริมาตร 10 μ l, 10x cutting buffer ปริมาตร 2 μ l และ เอนไซม์ 5 U ผสมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แยกขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 3% NuSieve® 3:1 Agarose ที่สภาวะความต่างศักย์คงที่ 150V เป็นเวลา 4.30 ชั่วโมง นำแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene tools (Syngene, Cambridge, UK) และด้วยสายตาควบคู่กัน ให้คะแนนแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี binary data โดยมีแถบดีเอ็นเอให้เป็น '1' ไม่มีแถบดีเอ็นเอให้เป็น '0' นำค่าดังกล่าวไปคำนวณค่า Dice similarity coefficient และสร้างแผนภูมิ Dendogram ด้วยวิธี UPGMA โดยโปรแกรม Gene Directory (Syngene, Cambridge, UK)

10. หา Gene Horizontal Transfer

10.1 ตรวจสอบโอกาสที่จะเกิดการถ่ายยีนด้านทานต่อสารปฏิชีวนะจากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม ไปสู่แบคทีเรียรอบราก

นำตัวอย่างดิน 5 g มาละลายในสารละลาย 0.85% NaCl 95 ml นำสารละลายดินมาละลายให้ได้ในระดับความเข้มข้นต่างๆด้วย 0.85% NaCl แล้วจึงนำสารละลายดินความเข้มข้น 10^{-4} ปริมาตร 100 μ l เลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient glucose agar (NA) ปกติและบนอาหาร NA ที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin 10 mg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงเปรียบเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียระหว่างอาหารทั้ง 2 ชนิด โดยตรวจสอบตัวอย่างแบคทีเรียรอบรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม 24 ตัวอย่าง และมะละกอปกติ 24 ตัวอย่าง

10.2 ตรวจสอบ 35S promoter และ *nptII* (ยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี SDS/Lysozyme เป็นต้นแบบ PCR (polymerase chain reaction) ในการติดตามตรวจสอบ 35S promoter และยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin (*nptII*) โดยนำดีเอ็นเอความเข้มข้น 50 ng ใส่ในสารละลาย Reaction ทั้งหมด 25 μ l ประกอบไปด้วย 10X PCR buffer 2.5 μ l, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 0.25 mM, คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงที่ครอบคลุมบางส่วนของ 35S promoter และ *nptII* ซึ่งออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Fast PCR (Fast PCR, Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland) (35 kana 1f 5' CAC GAC ACA CTT GTC TAC TCC 3' และ 35 kana 2r 5' GCT CTT CGT CCA GAT CAT 3') ความเข้มข้น 0.20 mM, คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อ 16S rDNA (fD1 5' CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3' และ rP2 5' CCC GGG ATC CAA GCT TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (Weisburg *et al.* 1991) ความเข้มข้น 0.40 mM เพื่อเป็น internal standard ให้ทราบว่า PCR reaction มีประสิทธิภาพ และ 1U *Taq* DNA polymerase ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 μ l ต่อส่วนผสมของปฏิกิริยารวม 25 μ l ใช้ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียรอบรากมะละกอปกติเปรียบเทียบกับพลาสมิด p2CMCP ที่ส่งถ่ายเข้าสู่มะละกอตัดแปลงพันธุกรรม

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที, ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 51°C เป็นเวลา 45 วินาที, และขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที ทำซ้ำขั้นที่ 1 ถึง 3 จำนวน 30 รอบ และขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ โดยเครื่อง Thermal cycler (Biometra® Thermal cycler, Gottingen, Germany.) และตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ในการแยกแแถบดีเอ็นเอ โดยย้อมแแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง gel documentation system โดยตรวจสอบตัวอย่างแบคทีเรียรอบรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม 24 ตัวอย่าง มะละกอปกติ 24 ตัวอย่าง

10.3 ประสิทธิภาพในการตรวจสอบ 35S promoter และ ยีน *nptII* ด้วยเทคนิค PCR

นำสารละลายดินมาเจือจางในระดับความเข้มข้น 10^{-4} ปริมาตร 100 μ l บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเจริญหลังจากนั้นนำน้ำผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ml ล้างโคโลนีแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหารจำนวน 3 plate นำสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียที่ละลายได้มาผสมให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่หลอด centrifuge ปริมาตร 1 ml โดยทำ serial dilution และเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารนับจำนวนโคโลนีที่เจริญเพื่อให้ทราบปริมาณเชื้อแน่นอน (78,000

โคโลนี) เดิมเชื้อ *E.coli* ที่มีพลาสมิด p2CMCP ที่ทราบปริมาณ โคโลนีของเชื้อที่แน่นอนในระดับความเข้มข้น 10^0 (680 โคโลนี), 10^{-1} (340 โคโลนี), 10^{-2} (170 โคโลนี) , 10^{-3} (80 โคโลนี) , 10^{-4} (35 โคโลนี), 10^{-5} (13 โคโลนี), 10^{-6} (6 โคโลนี), 10^{-7} (3 โคโลนี) นำสารละลายเชื้อทั้ง 2 ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี SDS/Lysozyme นำมาตรวจหาชิ้น 35S promoter และ *mpII* ด้วยเทคนิค PCR ดังวิธีการที่กล่าวในข้อ 10.2

สถานที่ทำการวิจัย

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ. 2548-เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2549

ผลและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์ทางเคมีของดิน

ผลการวิเคราะห์ทางเคมีตัวอย่างดิน ความชื้น ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity (EC)) ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ธาตุอาหารหลักและรอง โดยวิเคราะห์ตัวอย่างดิน บริเวณรอบราก เมื่อมะละกออายุ 60-90 วัน อายุ 120-150 วัน อายุ 180-210 วัน ตามลำดับ ดังตารางที่ 4 ความชื้นในดินของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ มีค่าอยู่ในช่วง 26.11-29.81% พบว่าความชื้นในแต่ละช่วงอายุของมะละกอนั้น ไม่แตกต่างกันมากนัก อีกทั้งไม่มีความแตกต่างกันระหว่างมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ แสดงว่าการรักษาระดับความชื้นของดินที่ปลูกในโรงเรือนนั้นอยู่ในระดับที่คงที่ ค่า pH อยู่ในช่วง 5.11-5.52 ค่าการนำไฟฟ้า (EC) อยู่ในช่วง 0.882-1.617 dS/m ค่า%อินทรีย์วัตถุอยู่ในช่วง 6.31-8.39% ค่า%ไนโตรเจนทั้งหมด 0.115-0.141% ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในช่วง 205.72-384.49 mg/kg ปริมาณโพแทสเซียม 232.07-324.73 mg/kg ปริมาณแคลเซียม 2481.68-3385.28 mg/kg ปริมาณแมกนีเซียม 314.70-374.17 mg/kg

จากผลการวิเคราะห์คุณสมบัติดินพบว่า ค่า pH จัดอยู่ในระดับที่เป็นกรด ซึ่งอาจเนื่องมาจากปริมาณของอินทรีย์วัตถุในดินสูงมาก (เทียนชัย, 2539) ส่งผลให้ดินเป็นกรด ค่าการนำไฟฟ้าต่ำแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณสารละลายเกลือต่ำจัดว่าเป็นดินไม่เค็ม ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูง ปริมาณโพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม ที่เป็นประโยชน์มีปริมาณสูงถึงสูงมาก อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ดินด้วยวิธีทางสถิติ T-test นั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

การวิเคราะห์สมบัติดินนั้นเพื่อตรวจสอบผลกระทบของการปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมว่ามีผลต่อปริมาณธาตุอาหาร และปฏิกิริยาดินในดินหรือไม่ เปรียบเทียบกับมะละกอปกติ ซึ่งขัดแย้งกับรายงานเกี่ยวกับการปลูกถั่วอัลฟ่าตัดแปลงพันธุกรรมที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่สูงขึ้นซึ่งแสดงถึงการลดลงของระดับกิจกรรมของแบคทีเรียในดิน และระดับการเปลี่ยนแปลงฟอสฟอรัสให้เป็นสารอาหารของพืชในดิน (Donegan *et al.*, 1995) โดยในการศึกษาผลกระทบของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่มีต่อสมบัติของดินนั้นพบว่าไม่มีผลกระทบดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับมะละกอปกติ

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบความชื้นในดิน ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณอินทรีย์วัตถุและธาตุอาหารของดินที่ปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอปกติ

ตัวอย่างดิน	ความชื้นในดิน (%)		EC (dS/m)	อินทรีย์วัตถุ (%)	ไนโตรเจนทั้งหมด (%)	ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์			
	pH (1:1) ²					โพแทสเซียม (mg/kg)	แคลเซียม (mg/kg)	แมกนีเซียม (mg/kg)	
มะละกออายุ 60-90 วัน (ระยะต้นกล้า)									
GM ¹	29.81	5.42	0.882	8.396	0.115	252.188	247.675	2808.477	354.281
Non-GM ¹	28.86	5.41	1.107	7.265	0.109	205.722	232.07	2751.752	341.372
มะละกออายุ 120-150 วัน (ระยะติดดอก)									
GM	27.43	5.17	1.519	6.318	0.122	384.489	315.792	2481.686	335.04
Non-GM	26.55	5.2	1.502	6.655	0.122	333.464	324.734	3385.279	374.175
มะละกออายุ 180-210 วันระยะติดผลดิบ (ระยะติดผลดิบ)									
GM	27.99	5.52	0.968	8.225	0.141	381.834	271.04	2595.761	314.704
Non-GM	26.11	5.11	1.617	6.578	0.122	298.213	319.188	2561.788	333.929
CV%	7.67	3.38	26.25	13.28	7.37	18.54	13.99	9.09	4.15
T-test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

1/ GM: มะละกอตัดแปลงพันธุกรรม 116/5, Non-GM: มะละกอปกติ

2/ ค่า pH ที่วัดได้จากการละลายดินในน้ำในอัตราส่วน 1:1

2. การวิเคราะห์ทางชีวภาพของดิน

2.1 การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียรอบรากมะละกอจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ

จากการตรวจสอบพบว่าปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอตั้งแต่ มะละกออายุ 60 วัน ถึงมะละกออายุ 210 วัน ดังภาพที่ 2 และตารางที่ 5 โดยมะละกอตัดแปลง พันธุกรรมและมะละกอปกติมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียรอบรากอยู่ในช่วง 4 ± 0.42 - 4 ± 0.75 , 4 ± 0.37 - $4 \pm 0.62 \times 10^5$ Colony forming unit (CFU)/1g ของดิน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียระหว่างมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ นั้นไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Cowgill *et al.*, (2002) ที่พบว่ามันฝรั่งที่มีการตัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้ต้านทานต่อไต้เดือนฝอยนั้นมีการวิเคราะห์ค่า Phospholipids fatty acid (PLFA) พบว่ามีผลในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราบริเวณรอบรากมันฝรั่งดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบกับมันฝรั่งปกติ

ในปี 2004 Dunfield และ Germida ได้รวบรวมงานวิจัยที่พิจารณาผลกระทบของพืชตัดแปลงพันธุกรรม ด้วยวิธีการต่างๆ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวนประชากรสิ่งมีชีวิตบริเวณรากพืชตัดแปลงพันธุกรรม (rhizosphere) พบว่าการศึกษาส่วนใหญ่ไม่แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของประชากรสิ่งมีชีวิตรอบรากของพืชตัดแปลงพันธุกรรมรอบราก (Griffiths *et al.*, 1999)

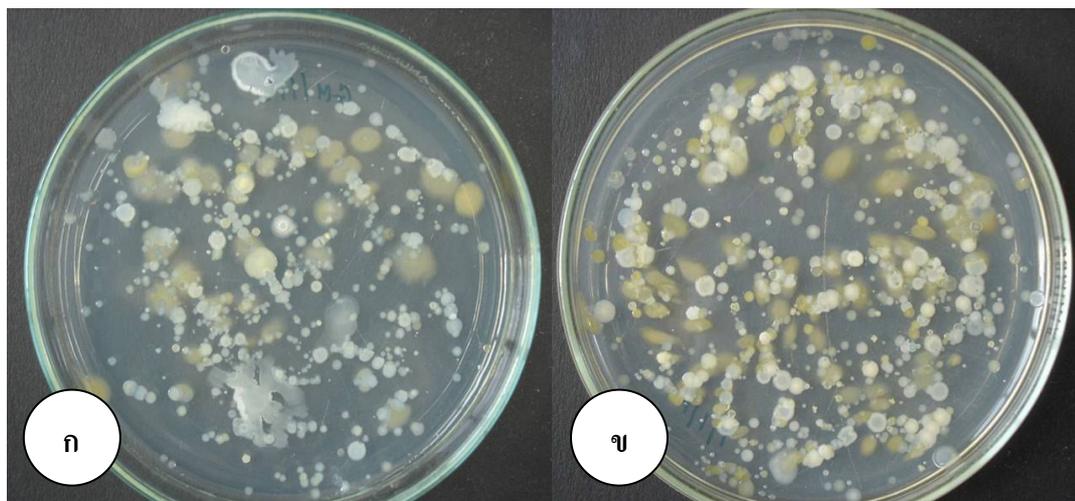
Kowalchuk *et al.* ในปี 2003 ได้สรุปว่าผลกระทบของพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่อาจมีต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินนั้นเป็นไปได้เล็กน้อยมาก โดยถ้าจะเกิดขึ้นได้ น่าจะเกิดใน 2 ลักษณะ คือ

- 1) พืชตัดแปลงพันธุกรรมอาจสร้างสารขึ้น แล้วสารดังกล่าวซึมผ่านออกมาทางรากของพืชแล้วส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในดิน
- 2) การตัดแปลงพันธุกรรมของพืชอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพเนื้อเยื่อพืช (Escher *et al.*, 2000) การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช อาจส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ที่กินเข้าไป

2.2 เปรียบเทียบจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอ

หลังจากตรวจนับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกัน เพื่อมาจัดจำแนกชนิดของเชื้อ (Identify) ด้วยระบบ BIOLOG[®] โดยจัดจำแนกเชื้อได้ 33 ไอโซเลท จากการเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียในช่วงระยะเวลาตั้งแต่มะละกออายุ 60 วัน จนถึงมะละกออายุ 210 วัน พบว่าเชื้อที่พบทั้ง 33 ไอโซเลท แบ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ 21 ไอโซเลท เป็นเชื้อชนิดแกรมบวก 12 ไอโซเลท เป็นเชื้อที่ได้จำแนกเชื้อ 33 ชนิด และพบว่าทั้งในมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ ซึ่งอาจพบในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน ตามตารางที่ 6 เชื้อที่จำแนกได้เป็นเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มที่พบในระบบนิเวศทั่วไป การเปรียบเทียบจำแนกเชื้อด้วยระบบ BIOLOG เพื่อศึกษาแนวโน้มของเชื้อแบคทีเรียที่พบในดินทั้งสองกรรมวิธี ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่

ซึ่งจากการทดลองตรวจสอบปริมาณและชนิดของแบคทีเรียพบว่า กลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยในดินที่ตรวจพบโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ และจำแนกเชื้อโดยระบบ BIOLOG จากดินปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมไม่แตกต่างไปจากที่ตรวจพบในดินที่ปลูกมะละกอปกติ โดยเชื้อที่ตรวจพบในดินที่ปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม ก็ตรวจพบได้ในมะละกอปกติเช่นกัน ซึ่งให้ผลคล้ายการศึกษาของ Griffiths *et al.* (1999)



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะโคโลนีแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากสารละลายดิน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (ก) และมะละกอปกติ (ข) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ

ตัวอย่าง	จำนวนโคโลนีโดยเฉลี่ย(10^5)cfu/g					
	กันยายน	ตุลาคม	พฤศจิกายน	ธันวาคม	มกราคม	กุมภาพันธ์
GM ¹	4 ± 0.42^2	4 ± 0.77	4 ± 0.44	4 ± 0.47	4 ± 0.45	4 ± 0.37
Non-GM ¹	4 ± 0.37	4 ± 0.89	4 ± 0.66	4 ± 0.45	4 ± 0.27	4 ± 0.41
T-test	NS	NS	NS	NS	NS	NS

1/ GM: มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม116/5, Non-GM: มะละกอปกติ

2/ ค่าตัวเลขที่วิเคราะห์จากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ตารางที่ 6 แสดงชนิดของเชื้อที่จำแนกพบบริเวณรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ชนิดของเชื้อ	แกรม
1	2GM2 ^{1,2} , 17Non-GM1 ^{1,2}	<i>Pseudomonas viridilivida</i>	ลบ
2	22GM6, 9Non-GM	<i>Sphingobacterium thalpophilum</i>	ลบ
3	23GM6, 16Non-GM3	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	ลบ
4	3GM3, 2Non-GM5	<i>Achromobacter cholinophagum</i>	ลบ
5	13GM2, 3Non-GM5	<i>Pseudomonas nitroreducensiazelaica</i>	ลบ
6	4GM2, 15Non-GM2	<i>Serratia marcescens</i>	ลบ
7	14GM2, 15Non-GM2	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ลบ
8	6GM4, 16Non-GM3	<i>Pseudomonas fluorescens biotype G</i>	ลบ
9	5GM6, 18Non-GM3	<i>Pseudomonas fulva</i>	ลบ
10	8GM5, 1Non-GM5	<i>Pantoea dispersa</i>	ลบ
11	6GM4, 2Non-GM5	<i>Pseudomonas maculicola</i>	ลบ
12	3GM1, 9Non-GM2	<i>Chryseobacterium scophthalmum</i>	ลบ
13	3GM3, 10Non-GM6	<i>Pseudomonas bureopolis(sterotrophomonas)</i>	ลบ
14	13GM3, 17Non-GM6	<i>Cardiobacterium hominis</i>	ลบ
15	1GM4, 12Non-GM6	<i>Pantoea stewartii ss stewartii</i>	ลบ
16	3GM6, 14Non-GM6	<i>Burkholderia cepacia</i>	ลบ

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ชนิดของเชื้อ	แกรม
17	1GM5 ^{1,2} , 18Non-GM5 ^{1,2}	<i>Pectobacterium cypripedii</i>	ลบ
18	8GM6, 15Non-GM3	<i>Empedobacter brevis</i>	ลบ
19	1GM3, 16Non-GM4	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	ลบ
20	14GM3, 15Non-GM2	<i>Aciodovorax delafieldii</i>	ลบ
21	1GM1, 16Non-GM4	<i>Mycobacterium testaceum</i>	ลบ
22	4GM3, 2Non-GM6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	บวก
23	1GM5, 19Non-GM5	<i>Staphylococcus warneri</i>	บวก
24	4GM5, 14Non-GM5	<i>Staphylococcus arlettae</i>	บวก
25	3GM3, 5Non-GM3	<i>Arthrobacter ilicis</i>	บวก
26	10GM3, 12Non-GM3	<i>Gordonia rubroportnctus</i>	บวก
27	8GN6, 3Non-GM6	<i>Rhodococcus australis</i>	บวก
28	4GM7, 17Non-GM4/2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	บวก
29	3GM4, 17Non-GM4/1	<i>Clavibacter agropyri</i>	บวก
30	8GM4, 13Non-GM7	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	บวก
31	9GM6, 21Non-GM7	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	บวก
32	7GM6, 15Non-GM3	<i>Kocuria rosea</i>	บวก
33	10GM4, 13Non-GM7	<i>Bacillus megaterium</i>	บวก

1/ GM: มะละกอตัดแปลงพันธุกรรม116/5, Non-GM: มะละกอปกติ

2/ รหัสไอโซเลท ประกอบด้วยลำดับในการไอโซเลท-ตัวอย่าง GM หรือ Non-GM-ครั้ง
ในการเก็บตัวอย่าง

2.3 การศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (Community level-physiological profiles (CLPP))

จากภาพที่ 3-8 แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์กลุ่มประชากรแบคทีเรียที่แบ่งโดยความแตกต่างทางสรีรวิทยา (CLPP) ในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (วงกลมสีดำ) และมะละกอปกติ (วงกลมสีขาว) ซึ่งระยะตำแหน่งของสัญญาณจะแสดงความใกล้เคียงในการใช้แหล่งคาร์บอน

จากดินที่ปลูกมะละกอายุ 60 วัน (ระยะต้นกล้า) ประชากรแบคทีเรียระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติสามารถจัดกลุ่มออกเป็นสองกลุ่ม ซึ่งประชากรแบคทีเรียมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติส่วนใหญ่เกาะกลุ่มกัน มีเพียงบางส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรียมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติที่แยกกลุ่มออกไป (ภาพที่ 3) โดย Component ที่ 1 และ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ สามารถอธิบายความผันแปรของการใช้แหล่งคาร์บอน 24.81 และ 13.65% ตามลำดับ ดังตารางผนวกที่ 1 พบว่ามีการใช้แหล่งคาร์บอนใน กลุ่ม Carbohydrates กลุ่ม Carboxylic acids กลุ่ม Amino acids กลุ่ม Aromatic chemicals กลุ่ม Brominated chemicals กลุ่ม Alcohol กลุ่ม Polymers กลุ่ม Esters และ กลุ่ม Phosphorylated chemicals

จากดินที่ปลูกมะละกอายุ 90 วัน (ระยะต้นกล้า) ประชากรแบคทีเรียระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติสามารถจัดกลุ่มออกเป็นสองกลุ่ม ซึ่งประชากรแบคทีเรียมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติส่วนใหญ่เกาะกลุ่มกัน มีเพียงบางส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรียมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แยกกลุ่มออกไป (ภาพที่ 4) โดย Component ที่ 1 และ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ สามารถอธิบายความผันแปรของการใช้แหล่งคาร์บอน 41.6 และ 14.42% ตามลำดับ ดังตารางผนวกที่ 2 พบว่ามีการใช้แหล่งคาร์บอนใน กลุ่ม Carbohydrates กลุ่ม Amines กลุ่ม Carboxylic acids กลุ่ม Amino acids กลุ่ม Aromatic chemicals กลุ่ม Brominated chemicals กลุ่ม Alcohols กลุ่ม Polymers กลุ่ม Esters และ กลุ่ม Phosphorylated chemicals

จากดินปลูกมะละกอายุ 120 วัน (ระยะติดดอก) ประชากรแบคทีเรียระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติส่วนใหญ่สามารถกลุ่มกัน มีเพียงบางส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรียมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติบางส่วนที่แยกกลุ่มออกไป (ภาพที่ 5) โดย

Component ที่ 1 และ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ สามารถอธิบายความผันแปรของการใช้แหล่งคาร์บอน 57.15 และ 13.42% ตามลำดับ ดังตารางผนวกที่ 3 พบว่ามีการใช้แหล่งคาร์บอนใน กลุ่ม Carbohydrates กลุ่ม Amines กลุ่ม Carboxylic acids กลุ่ม Amino acids กลุ่ม Aromatic chemicals กลุ่ม Brominated chemicals กลุ่ม Alcohols กลุ่ม Polymers กลุ่ม Esters กลุ่ม Phosphorylated chemicals กลุ่ม Amides

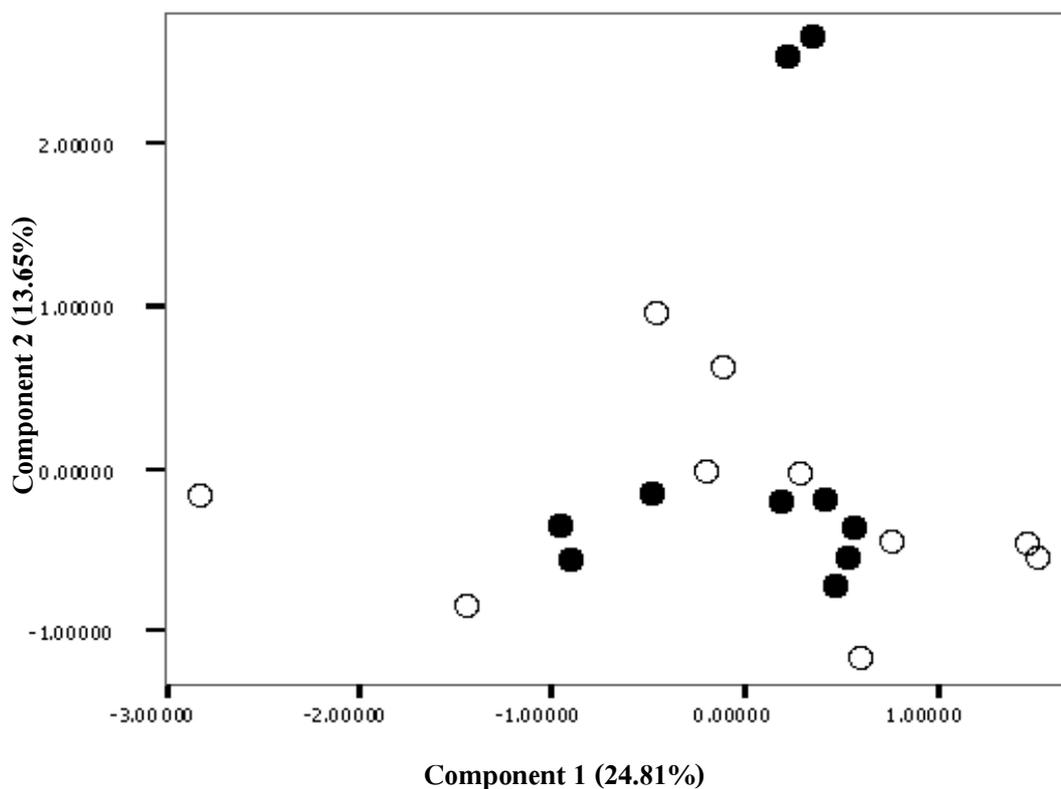
จากดินปลูกมะละกออายุ 150 วัน (ระยะติดดอก) ประชากรแบคทีเรียระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติส่วนใหญ่เกาะกลุ่มกัน มีเพียงบางส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรียมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติบางส่วนที่แยกกลุ่มออกไป (ภาพที่ 6) โดย Component ที่ 1 และ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ สามารถอธิบายความผันแปรของการใช้แหล่งคาร์บอน 43.7 และ 13.13% ตามลำดับ ดังตารางผนวกที่ 4 พบว่ามีการใช้แหล่งคาร์บอนใน กลุ่ม Carbohydrates กลุ่ม Amines กลุ่ม Carboxylic acids กลุ่ม Amino acids กลุ่ม Aromatic chemicals กลุ่ม Brominated chemicals กลุ่ม Alcohols กลุ่ม Polymers กลุ่ม Esters กลุ่ม Phosphorylated chemicals กลุ่ม Amides

จากดินปลูกมะละกออายุ 180 วัน (ระยะติดผลดิบ) ประชากรแบคทีเรียระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติส่วนใหญ่เกาะกลุ่มกัน มีเพียงบางส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรียมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติบางส่วนที่แยกกลุ่มออกไป (ภาพที่ 7) โดย Component ที่ 1 และ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ สามารถอธิบายความผันแปรของการใช้แหล่งคาร์บอน 17.99 และ 15.1% ตามลำดับ ดังตารางผนวกที่ 5 พบว่ามีการใช้แหล่งคาร์บอนใน กลุ่ม Carbohydrates กลุ่ม Amines กลุ่ม Carboxylic acids กลุ่ม Amino acids กลุ่ม Aromatic chemicals กลุ่ม Alcohols กลุ่ม Polymers กลุ่ม Esters

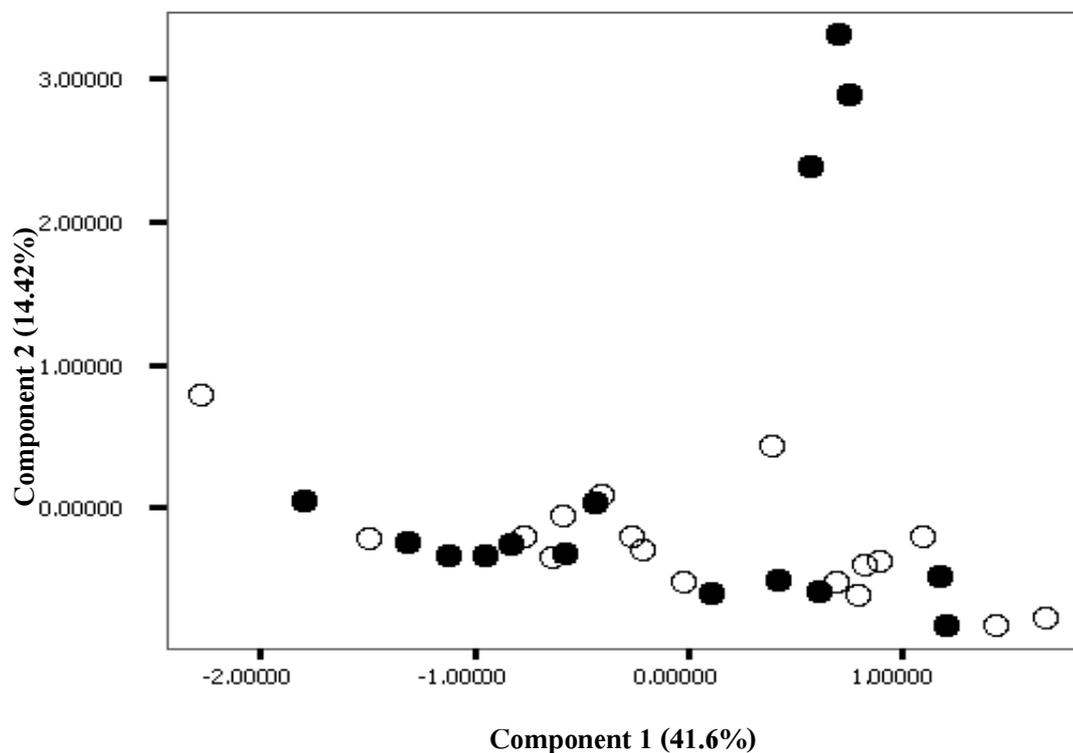
จากดินปลูกมะละกออายุ 210 วัน (ระยะติดผลดิบ) ประชากรแบคทีเรียระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติส่วนใหญ่เกาะกลุ่มกัน มีเพียงบางส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรียมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติบางส่วนที่แยกกลุ่มออกไป (ภาพที่ 8) โดย Component ที่ 1 และ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ สามารถอธิบายความผันแปรของการใช้แหล่งคาร์บอน 40.56 และ 26.26% ตามลำดับ ดังตารางผนวกที่ 6 พบว่ามีการใช้แหล่งคาร์บอนใน กลุ่ม Carbohydrates กลุ่ม Amines กลุ่ม

Carboxylic acids กลุ่ม Amino acids กลุ่ม Aromatic chemicals กลุ่ม Brominated chemicals
กลุ่ม Alcohols กลุ่ม Polymers กลุ่ม Estersกลุ่ม Phosphorylated chemicals กลุ่ม Amides

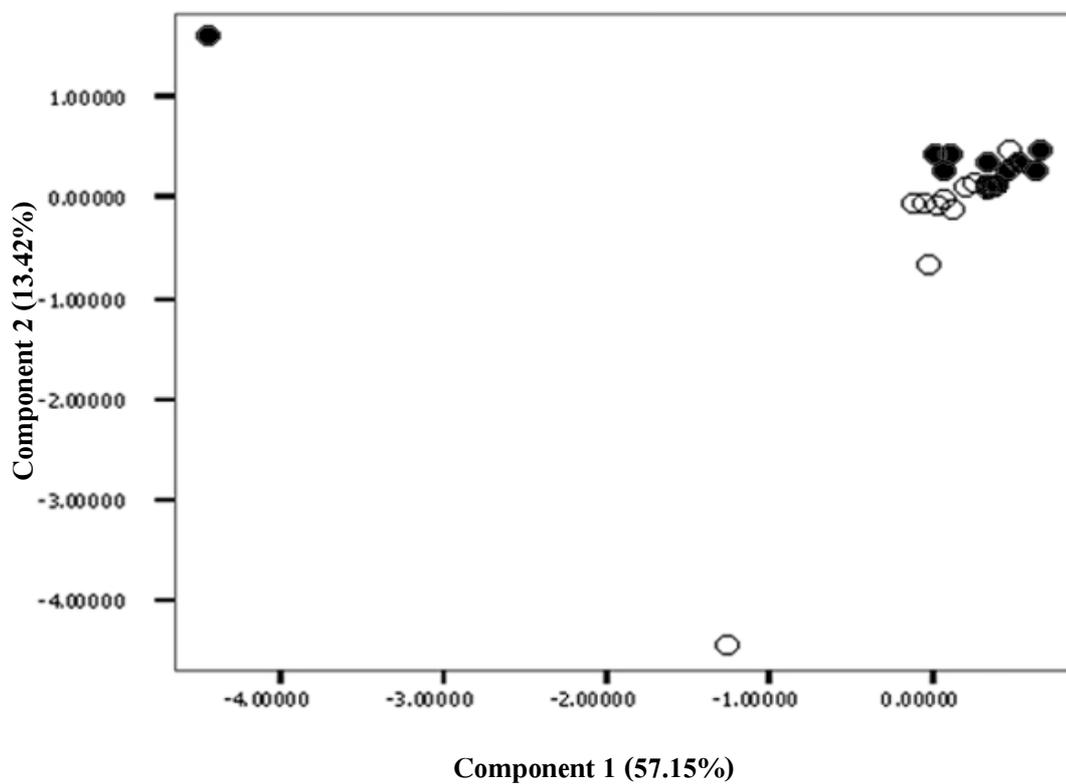
จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า รูปแบบ (profile) ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอปกติ ในแต่ละเดือนนั้นไม่มีความแตกต่างกันของกลุ่มประชากรแบคทีเรียจากดินทั้งสองแหล่งปลูก แต่หากเปรียบเทียบรูปแบบของกลุ่มประชากรแบคทีเรีย ที่วิเคราะห์ระหว่างเดือน จะพบความแตกต่างกันของรูปแบบการจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรีย ในแต่ละช่วงได้โดยไม่ว่าจะมาจากดินของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมหรือมะละกอปกติ เนื่องจากปัจจัยภายนอกที่ไม่สามารถควบคุมได้ในแต่ละช่วงการเก็บตัวอย่าง เช่น อุณหภูมิภายในโรงเรือนปลูกพืช ขนาดของกระถางที่จำกัดสารที่ปลดปล่อยจากราก อายุพืช ต้นไม้ และปริมาณความชื้น เป็นต้น (Grayston *et al.*, 2004)



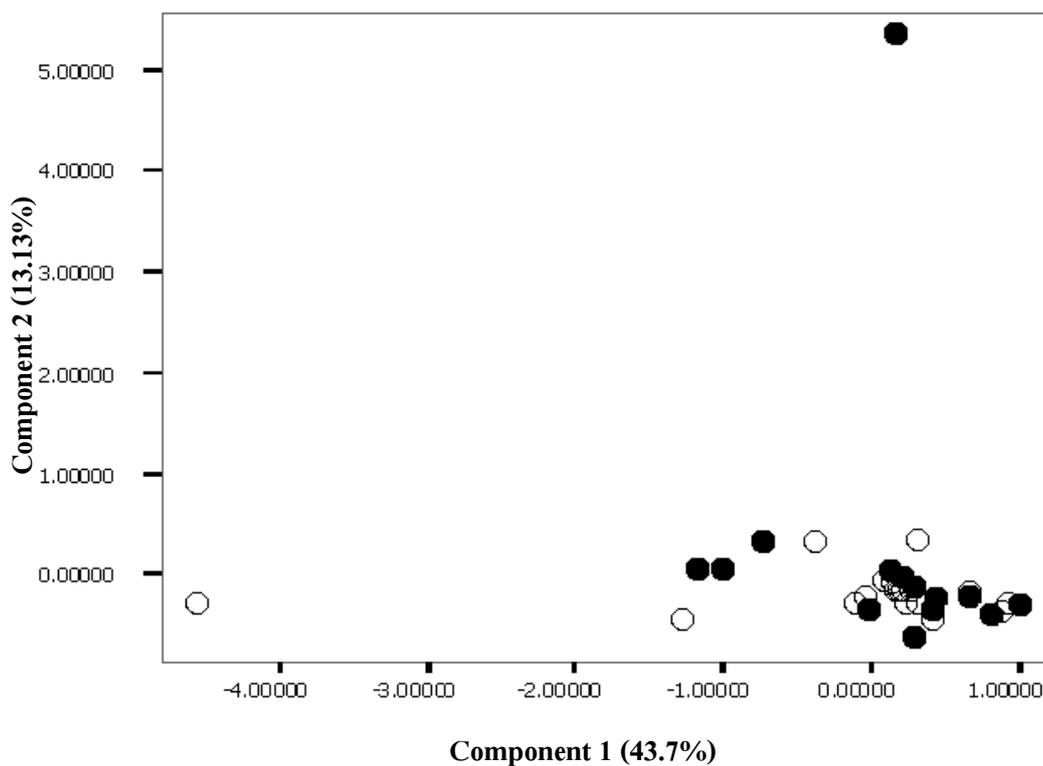
ภาพที่ 3 กราฟแสดงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จาก CLPP จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA เมื่อมะละกออายุ 60 วัน เพื่อประเมินกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม (จุดวงกลมสีดำ: GM) และมะละกอปกติ (จุดวงกลมสีขาว: Non-GM) โดย Component ที่ 1 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 24.81% Component ที่ 2 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 13.65 %



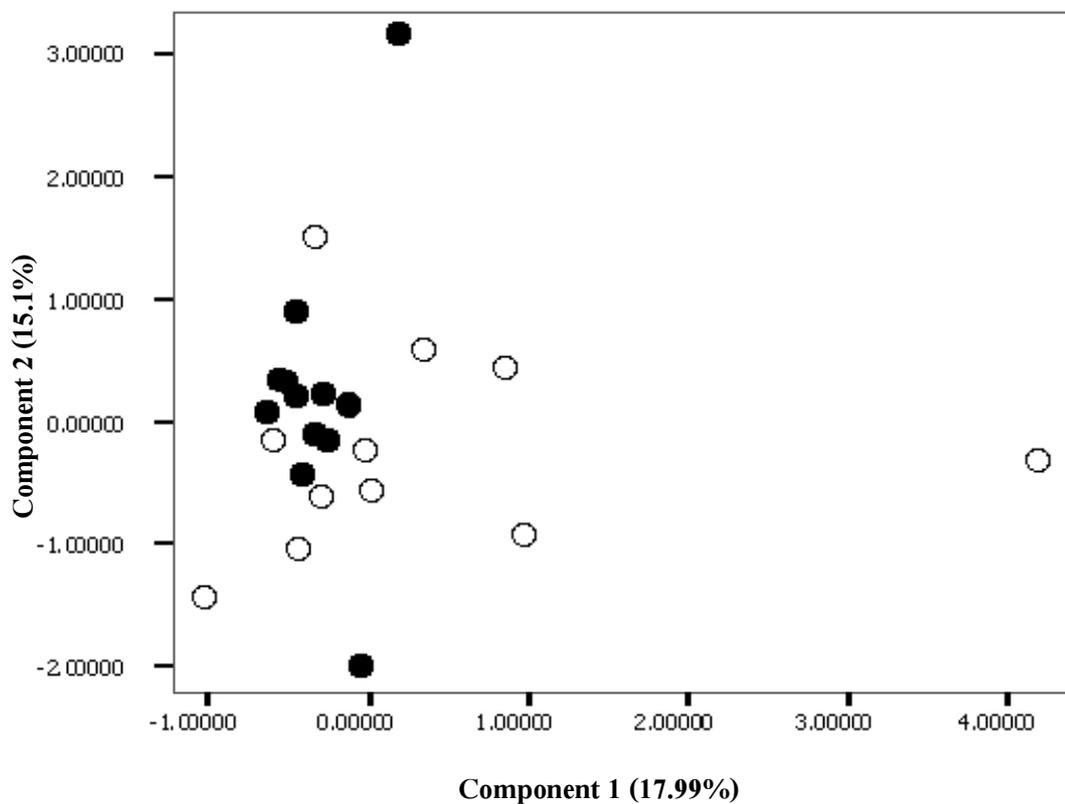
ภาพที่ 4 กราฟแสดงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จาก CLPP จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA เมื่อมะละกออายุ 90 วัน เพื่อประเมินกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (จุดวงกลมสีดำ: GM) และมะละกอปกติ (จุดวงกลมสีขาว: Non-GM) โดย Component ที่ 1 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 41.6 % Component ที่ 2 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 14.42%



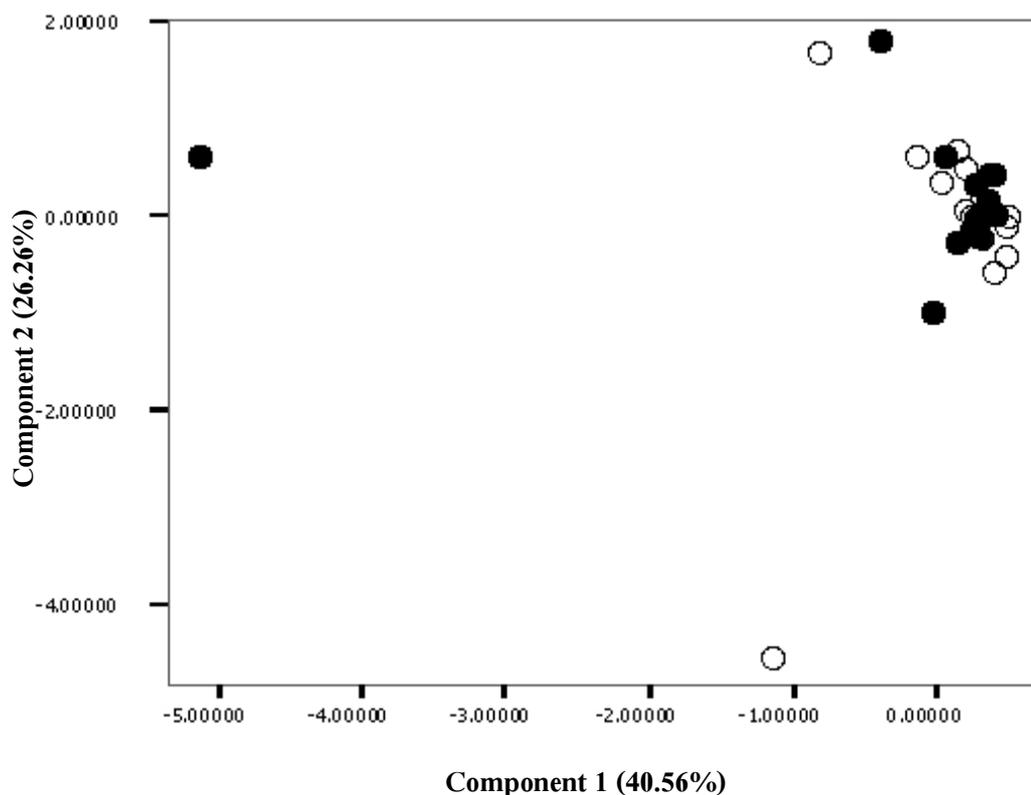
ภาพที่ 5 กราฟแสดงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จาก CLPP จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA เมื่อมะละกออายุ 120 วัน เพื่อประเมินกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (จุดวงกลมสีดำ: GM) และมะละกอปกติ (จุดวงกลมสีขาว: Non-GM) โดย Component ที่ 1 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 57.15% Component ที่ 2 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอนของ 13.42%



ภาพที่ 6 กราฟแสดงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จาก CLPP จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA เมื่อมะละกออายุ 150 วัน เพื่อประเมินกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบรากมะละกอ ดัดแปลงพันธุกรรม (จุดวงกลมสีดำ: GM) และมะละกอปกติ (จุดวงกลมสีขาว: Non-GM) โดย Component ที่ 1 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 43.7% Component ที่ 2 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 13.13 %



ภาพที่ 7 กราฟแสดงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จาก CLPP จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA เมื่อมะละกออายุ 180 วัน เพื่อประเมินกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม (จุดวงกลมสีดำ: GM) และมะละกอปกติ (จุดวงกลมสีขาว: Non-GM) โดย Component ที่ 1 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอนของ 17.99% Component ที่ 2 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอนของ 15.1%



ภาพที่ 8 กราฟแสดงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จาก CLPP จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA เมื่อมะละกออายุ 210 วัน เพื่อประเมินกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (จุดวงกลมสีดำ: GM) และมะละกอปกติ (จุดวงกลมสีขาว: Non-GM) โดย Component ที่ 1 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 40.56% Component ที่ 2 สามารถอธิบายความผันแปรในการใช้แหล่งคาร์บอน 26.26%

ตารางที่ 7 Total Variance Explained

ค่า Eigenvalues และ % of Variance ของตัวอย่างดินมะละกออายุ 60 วัน			
Component	Total	% of Variance	Cumulative %
1	23.571	24.811	24.811
2	12.966	13.649	38.460
3	10.539	11.093	49.553
ค่า Eigenvalues และ % of Variance ของตัวอย่างดินมะละกออายุ 90 วัน			
1	39.523	41.603	41.603
2	13.695	14.416	56.019
3	8.786	9.248	65.268
ค่า Eigenvalues และ % of Variance ของตัวอย่างดินมะละกออายุ 120 วัน			
1	54.296	57.153	57.153
2	12.744	13.415	70.568
3	4.976	5.238	75.807
ค่า Eigenvalues และ % of Variance ของตัวอย่างดินมะละกออายุ 150 วัน			
1	41.516	43.701	43.701
2	12.473	13.130	56.830
3	8.720	9.179	66.009
ค่า Eigenvalues และ % of Variance ของตัวอย่างดินมะละกออายุ 180 วัน			
1	17.090	17.989	17.989
2	14.316	15.069	33.058
3	11.885	12.511	45.569
ค่า Eigenvalues และ % of Variance ของตัวอย่างดินมะละกออายุ 210 วัน			
1	38.532	40.560	40.560
2	24.950	26.263	66.823
3	8.715	9.174	75.997

2.4 เปรียบเทียบวิธีการสกัด จีโนมิคดีเอ็นเอ

เปรียบเทียบสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง NGA ด้วยวิธีสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ 4 วิธี คือ 1) วิธี CTAB, 2) วิธี Modified CTAB, 3) วิธี Sodium dodecyl sulfate (SDS)/Lysozyme, 4) วิธี Silica โดยแต่ละวิธีมีการทำซ้ำ 13 ซ้ำ และตรวจสอบคุณภาพโดยนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260/280 nm นำปริมาณดีเอ็นเอ มาเปรียบเทียบปริมาณจีโนมิคดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีที่สามารถสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ จากแบคทีเรียได้ปริมาณมากที่สุด คือ วิธี SDS/Lysozyme

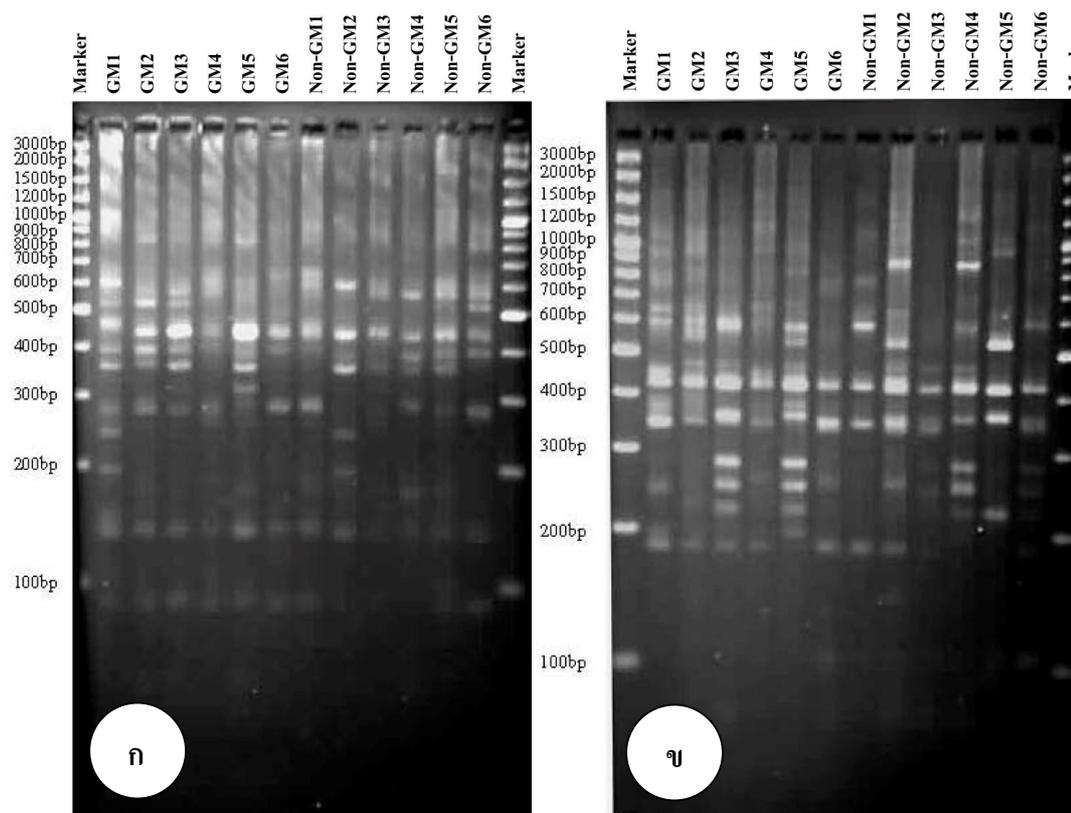
2.5 ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Amplified ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

จากที่สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/Lysozyme นำดีเอ็นเอดังกล่าวมาศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค Amplified ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) ด้วยการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอ ในส่วนของ 16S rDNA และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด *MseI*, *HinfI*, *MspI*, *HhaI*, *RsaI* แล้วจึงนำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดแล้วมาตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธี agarose gel electrophoresis ด้วย NuSieve® 3:1 Agarose ที่ความเข้มข้น 3 %

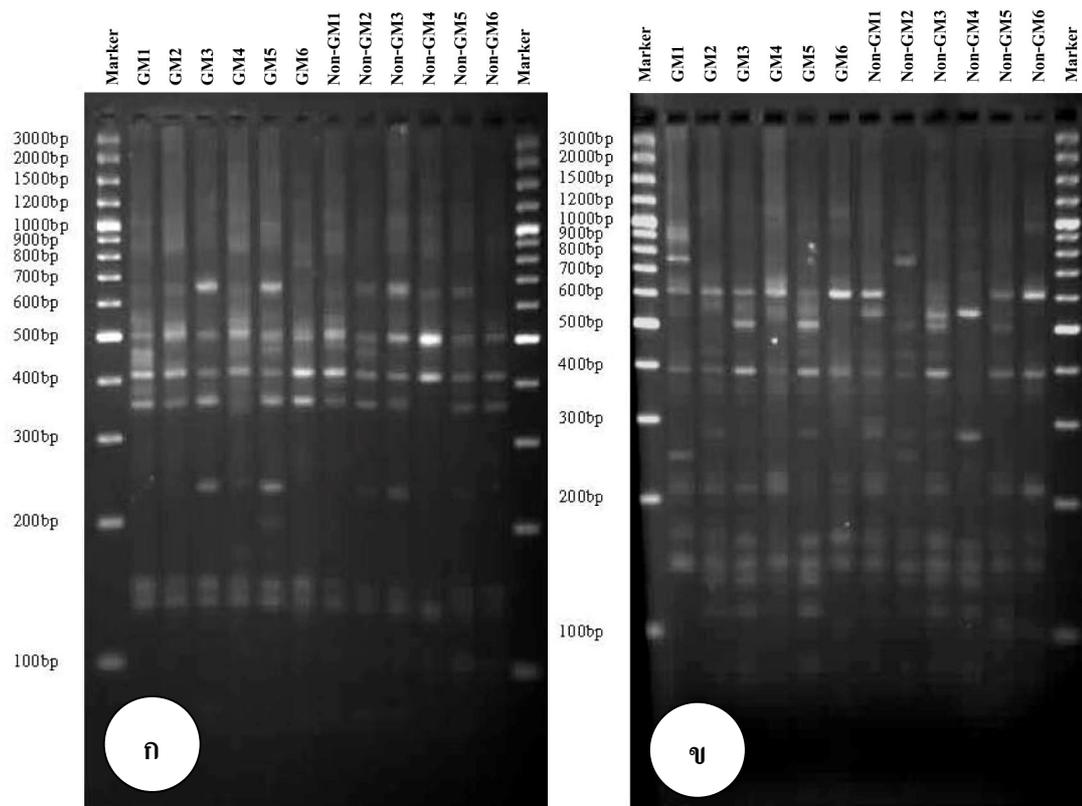
จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene Tool เพื่อให้คะแนนแถบของดีเอ็นเอ แล้วจึงนำไปสร้างแผนภูมิ Dendrogram ด้วยโปรแกรม Gene Directory

เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียรอบรากที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด *MseI*, *HinfI*, *MspI*, *HhaI*, *RsaI* มาวิเคราะห์รวมกันพบว่าที่ค่า similarity 70% กลุ่มเชื้อแบคทีเรียรอบรากในทุกๆเดือนของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม (Non-GM) และมะละกอปกติ (GM) สามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ที่ค่า similarity ที่มากกว่า 70% นั้นสามารถแยกกลุ่มประชากรแบคทีเรียได้เป็น 2 กลุ่ม โดยในกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกลุ่มแบคทีเรียในเดือน Non-GM6 (มะละกออายุ 210 วัน), GM6 (มะละกออายุ 210 วัน), GM1 (มะละกออายุ 60 วัน), GM4 (มะละกออายุ 150 วัน), Non-GM1 (มะละกออายุ 60 วัน), GM2 (มะละกออายุ 90 วัน), Non-GM5 (มะละกออายุ 180 วัน) ในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยกลุ่มแบคทีเรียในเดือน Non-GM3 (มะละกออายุ 120 วัน), GM3 (มะละกออายุ 120 วัน), GM5 (มะละกออายุ 180 วัน), Non-GM4 (มะละกออายุ 150 วัน), Non-GM2 (มะละกออายุ 90 วัน) ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มประกอบไปด้วยมะละกอตัดแปลง

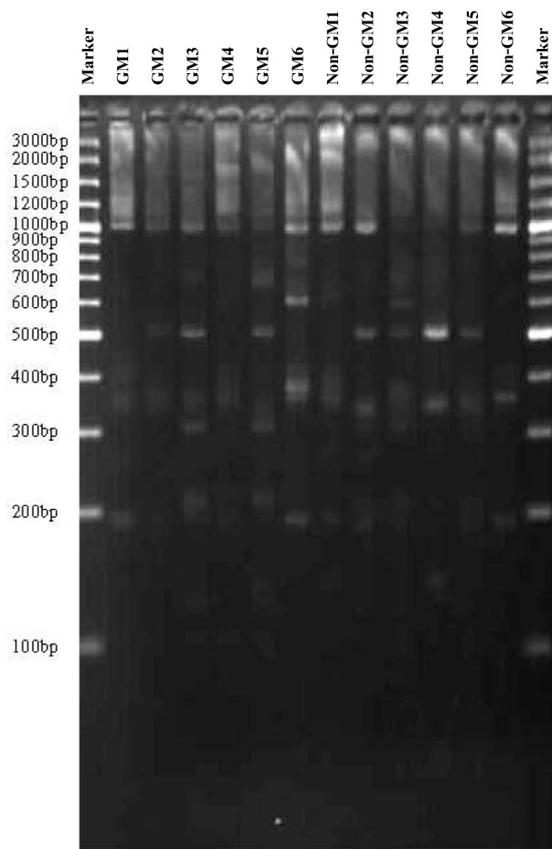
พันธุกรรม (GM) และมะละกอปกติ (Non-GM) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Hsieh and Pan (2006) ที่พบว่า การปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรคใบด่างวงแหวนส่งผลกระทบน้อยมากต่อจุลินทรีย์ในดิน



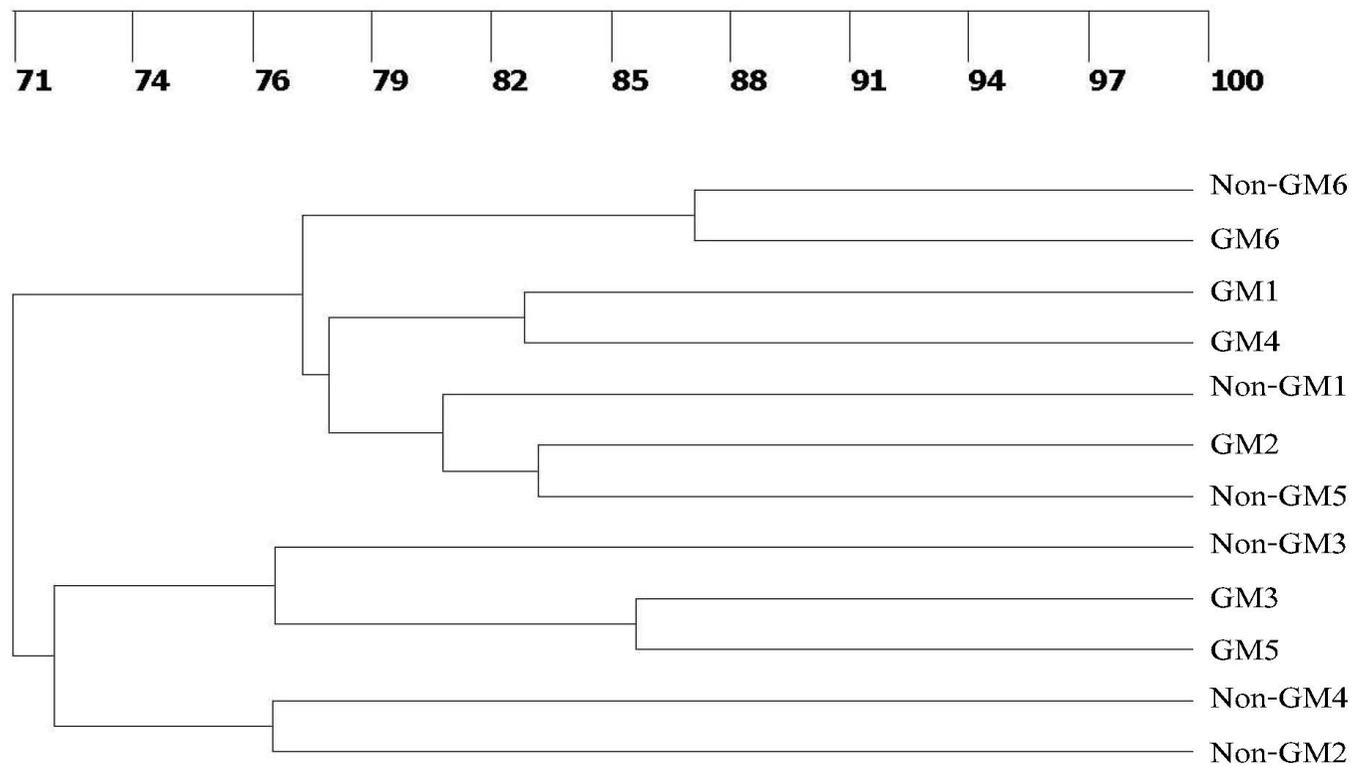
ภาพที่ 9 เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเทคนิค ARDRA ด้วยเอนไซม์ *MspI* (ก) และ *HhaI* (ข) สัญลักษณ์ GM: มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม, Non-GM: มะละกอปกติ หมายเลข 1-6 คือ มะละกออายุ 60-210 วัน Marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน



ภาพที่ 10 เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเทคนิค ARDRA ด้วยเอนไซม์ *HindI* (ก) และ *MseI* (ข) สัญลักษณ์ GM: มะละกอตัดแปลงพันธุกรรม, Non-GM: มะละกอปกติ หมายเลข 1-6 คือ มะละกออายุ 60-210 วัน Marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน



ภาพที่ 11 เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเทคนิค ARDRA ด้วยเอนไซม์ *RhaI* สัญลักษ์ณ์ GM: มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม, Non-GM: มะละกอกปกติ หมายเลข 1-6 คือ มะละกออายุ 60-210 วัน Marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน



ภาพที่ 12 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม GM และ มะละกอปกติ Non-GM ตั้งแต่มะละกออายุ 60 วัน (1) ถึงมะละกออายุ 210 วัน (6) ที่ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *HhaI*, *MseI*, *MspI*, *RhaI* และ *HinfI* คำนวณค่า Similarity ด้วย Dice Similarity coefficient และสร้างแผนภูมิ Dendrogram ด้วยวิธี UPGMA

3. ทา Gene Horizontal Transfer

3.1 ตรวจสอบโอกาสที่จะเกิดการถ่ายยีนด้านทานต่อสารปฏิชีวนะ จากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ไปยังแบคทีเรียรอบรากโดยการเพาะเชื้อ

จากการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถด้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin บนอาหาร NA ที่มี kanamycin 10 mg/ml พบว่าไม่มีเชื้อแบคทีเรียรอบรากที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin จากตัวอย่างดินทั้ง 48 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม 24 ตัวอย่าง แบคทีเรียรอบรากมะละกอปกติ 24 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 13

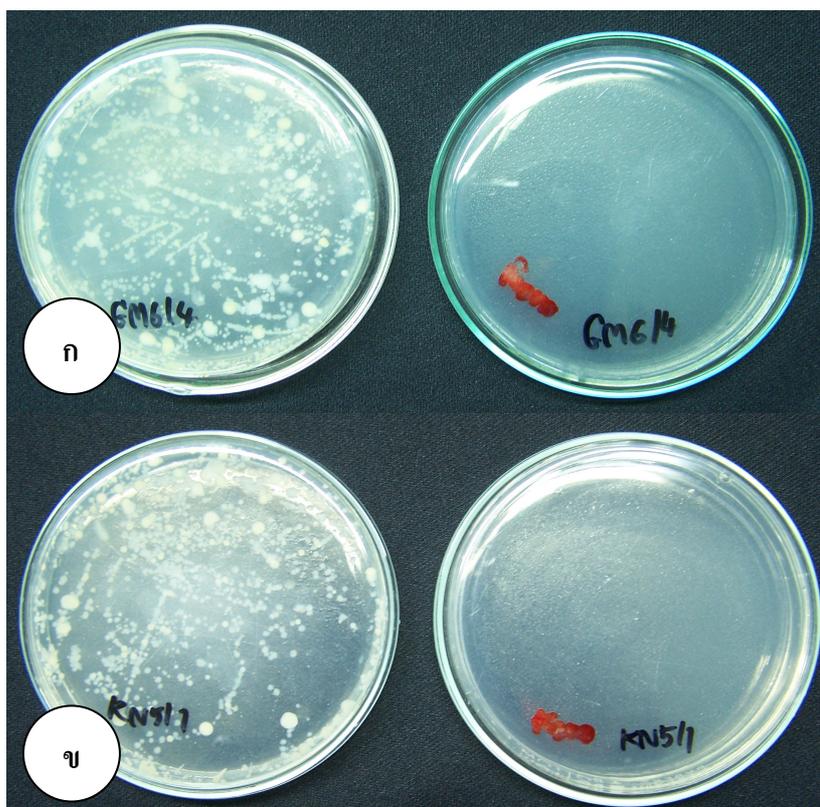
3.2 ตรวจหา 35S promoter และ *npII* (ยีนด้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin)

จากที่สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/Lysozyme นำดีเอ็นเอดังกล่าวมาตรวจสอบหาโอกาสในการถ่ายยีนจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ไปสู่แบคทีเรียรอบราก โดยตรวจสอบจากเทคนิค PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ 35S promoter และยีน *npII* ซึ่งได้มีการออกแบบไพรเมอร์ที่มีส่วนของของ 35S promoter และส่วนของยีน *npII* (35 kana 1f และ 35 kana 2r) โดยขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จะมีขนาด 879 bp และใช้ 16S rDNA เป็น internal standard เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของ PCR reaction จากการตรวจสอบตัวอย่างจากดีเอ็นเอที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียจำนวน 48 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค PCR ไม่พบการถ่ายยีน (ไม่พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 879 bp) จากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม สู่แบคทีเรียรอบราก ดังภาพที่ 14

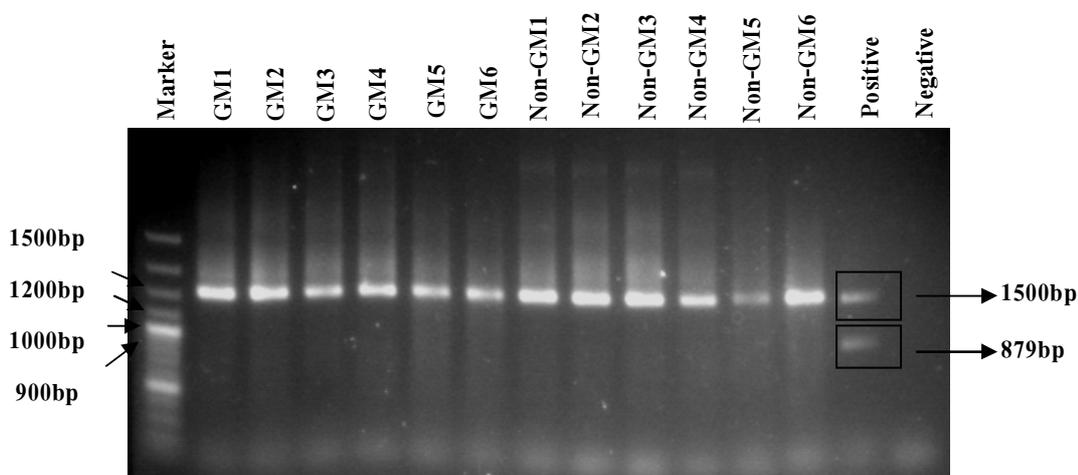
3.3 ประสิทธิภาพในการตรวจหา 35S promoter และ *npII*

นำสารละลายเชื้อมาผสมกับเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด p2CMCP ที่ทราบปริมาณเชื้อที่แน่นอนระดับความเข้มข้น $10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/Lysozyme เพื่อนำมาตรวจหา ยีน 35S promoter และ *npII* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่คือ 35 kana 1f และ 35 kana 2r และใช้ 16S เป็น internal standard เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของ PCR reaction พบว่าสามารถตรวจสอบได้ในระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^{-5} หรือในอัตราส่วนระหว่างเชื้อจากแบคทีเรียในดิน 6,000 โคโลนี : เชื้อ *E. coli* 1 โคโลนี (ได้จากการคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างปริมาณเชื้อแบคทีเรียในดิน 78,000 โคโลนี ต่อปริมาณเชื้อ *E. coli* ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^{-5} หรือ 13 โคโลนี) ดังภาพที่ 15

เนื่องจากมีรายงานศึกษาพบการถ่ายทอดยีนจากพืชตัดแปลงพันธุกรรมไปยังเชื้อจุลินทรีย์ดินในสภาพการทดลองในห้องปฏิบัติการ ในระดับที่ต่ำมาก (Conner *et al.*, 2003, Kurtland *et al.*, 2003) ดังนั้นการทดลองนี้จึงออกแบบเพื่อตรวจสอบที่เฉพาะเจาะจง โดยตรงยีนบริเวณที่ครอบคลุม 35S promoter ซึ่งมาจากเชื้อไวรัส cauliflower mosaic virus ร่วมกับยีนที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อ Kanamycin (Neomycin Phosphotransferase II, *nptII*) และเลือกใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา เนื่องจากสามารถตรวจในความไวที่สูงกว่า วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ ซึ่งตรวจได้ในระดับความไวเพียง 10^{-8} ถึง 10^{-11} ของการเกิด Horizontal gene transfer (HGT) ต่อแบคทีเรีย 1 เซลล์ และอาจต่ำถึง 10^{-16} ถึง 10^{-17} ได้ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจโดยเทคนิคทางอนุชีววิทยา เช่น เทคนิค PCR ทำให้ช่วยแก้ไขปัญหาการตรวจสอบการเกิด Horizontal gene transfer ได้ เนื่องจากมีความไวที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหาร (Kawalchuk *et al.*, 2003)



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากดินรอบรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม (ก) และดินรอบรากมะละกอปกติ (ข) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (ซ้าย) และอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีสารปฏิชีวนะ Kanamycin (ขวา)



ภาพที่ 14 การตรวจสอบโอกาสที่จะเกิดการถ่ายยีนจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมไปยังแบคทีเรียรอบราก ด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจในส่วนต่อของ 35S promoter และยีน *npII* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมาย (879bp) และ 16S rDNA เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย (1500bp)

Marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100bp)

GM1 คือ เชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมอายุ 60 วัน

GM2 คือ เชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมอายุ 90 วัน

GM3 คือ เชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมอายุ 120 วัน

GM4 คือ เชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมอายุ 150 วัน

GM5 คือ เชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมอายุ 180 วัน

GM6 คือ เชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมอายุ 210 วัน

Non-GM1 คือ เชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอปกติอายุ 60 วัน

Non-GM2 คือ เชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอปกติอายุ 90 วัน

Non-GM3 คือ เชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอปกติอายุ 120 วัน

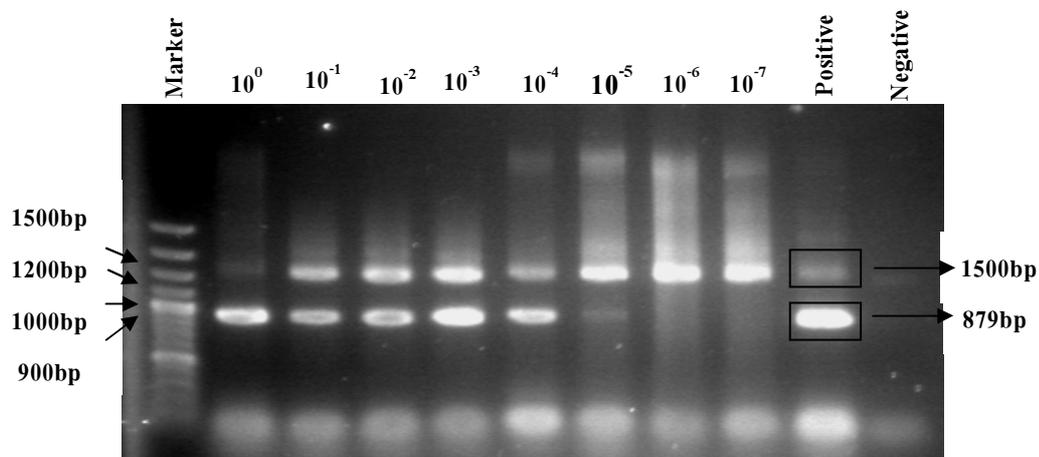
Non-GM4 คือ เชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอปกติอายุ 150 วัน

Non-GM5 คือ เชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอปกติอายุ 180 วัน

Non-GM6 คือ เชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอปกติอายุ 210 วัน

Positive คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *E coli* ที่มีพลาสมิด p2CMCP

Negative คือ น้ำ



ภาพที่ 15 ประสิทธิภาพของเทคนิค PCR ในการตรวจสอบโอกาสที่จะเกิดการถ่ายยีนโดยตรวจสอบส่วนต่อของ 35S promoter และยีน *nptII* ซึ่งเป็นเป้าหมาย (876bp) และมี 16S rDNA เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย (1500bp) ใช้เชื้อ *E.coli* ที่มีพลาสมิด p2CMCP ที่ทราบปริมาณของเชื้อที่แน่นอน

Marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

10^0 มีปริมาณเชื้อ *E.coli* 680 โคโลนีต่อเชื้อแบคทีเรียจากดิน 78,000 โคโลนี

10^{-1} มีปริมาณเชื้อ *E.coli* 340 โคโลนีต่อเชื้อแบคทีเรียจากดิน 78,000 โคโลนี

10^{-2} มีปริมาณเชื้อ *E.coli* 170 โคโลนีต่อเชื้อแบคทีเรียจากดิน 78,000 โคโลนี

10^{-3} มีปริมาณเชื้อ *E.coli* 80 โคโลนีต่อเชื้อแบคทีเรียจากดิน 78,000 โคโลนี

10^{-4} มีปริมาณเชื้อ *E.coli* 35 โคโลนีต่อเชื้อแบคทีเรียจากดิน 78,000 โคโลนี

10^{-5} มีปริมาณเชื้อ *E.coli* 13 โคโลนีต่อเชื้อแบคทีเรียจากดิน 78,000 โคโลนี

10^{-6} มีปริมาณเชื้อ *E.coli* 6 โคโลนีต่อเชื้อแบคทีเรียจากดิน 78,000 โคโลนี

10^{-7} มีปริมาณเชื้อ *E.coli* 3 โคโลนีต่อเชื้อแบคทีเรียจากดิน 78,000 โคโลนี

Positive คือ ดีเอ็นเอที่ได้จากเชื้อ *E.coli* ที่มีพลาสมิด p2CMCP

Negative คือ น้ำ

สรุปและข้อเสนอแนะ

การประเมินผลกระทบของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมต่อแบคทีเรียรอบราก เปรียบเทียบกับมะละกอปกติ โดยปลูกมะละกอในกระถางที่มีลักษณะเป็นแบบดาวกระจายซึ่งจะมีการเชื่อมต่อกันระหว่างกระถางกลาง ปลูกมะละกอปกติในดินที่ไม่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ที่เป็นแหล่งของแบคทีเรียไปยังกระถางรอบนอก ที่ปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมร่วมกับมะละกอปกติ ในโรงเรือนระบบปิด พบว่าการวิเคราะห์สมบัติดิน pH ค่าการนำไฟฟ้า (EC) ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ปริมาณธาตุอาหารหลักและปริมาณธาตุอาหารรอง เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างดินจากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ รวมถึงเมื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของเชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติในช่วงระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่มะละกออายุ 60 วัน (ระยะต้นกล้า) จนถึงระยะที่มะละกออายุ 210 วัน (ระยะติดผลดิบ) ไม่พบว่ามีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจและจำแนกเชื้อได้ พบทั้งในมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ

การประเมินกลุ่มโครงสร้างประชากรแบคทีเรียด้วยคุณสมบัติทางสรีรวิทยา (CLPP) ของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม นั้นมีความใกล้เคียงกับกลุ่มประชากรแบคทีเรียของมะละกอปกติ แสดงให้เห็นจากรูป 3-8 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งสองใกล้เคียงกัน จากตำแหน่งของจุดศูนย์กลางระหว่างแบคทีเรียรอบรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ จากผลการประเมินผลกระทบของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม นั้นไม่มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดในแง่ของประชากรแบคทีเรียรอบรากมะละกอ เมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากรเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเทคนิค ARDRA กลุ่มเชื้อมีความใกล้เคียง โดยมีค่า Similarity ระดับ 70% โดยแยกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีการกระจายตัวสูงโดยประกอบด้วยกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบรากของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติอยู่ร่วมกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรแบคทีเรียจากทั้งสองแหล่งไม่แตกต่างกัน

การตรวจสอบโอกาสในการถ่ายยีนจากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมไปยังแบคทีเรียรอบราก นั้น ไม่พบว่ามีเชื้อที่สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะและไม่พบยีน 35S promoter และ *npII* ยีนจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับยีนดังกล่าว

การทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่ามะละกอตัดแปลงพันธุกรรมไม่ส่งผลกระทบในการ
เหนียวหรือขับ ไล่แบคทีเรียรอบราก จากการวิเคราะห์ปริมาณ ชนิด และกลุ่มประชากร
แบคทีเรีย จึงอาจสรุปได้ว่า การปลูกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมนั้นมีระดับผลกระทบที่ต่ำมากต่อ
ระบบนิเวศของแบคทีเรียบริเวณรอบราก ในสภาวะโรงเรือนปิด อย่างไรก็ตามการนำมะละกอ
ตัดแปลงพันธุกรรมไปปลูกในสภาพแวดล้อม นั้นจำเป็นต้องมีการประเมินความปลอดภัยในด้าน
ต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลด้านการประเมินความปลอดภัยของพืชตัดแปลงพันธุกรรม โดยงานวิจัยนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการประเมินความปลอดภัยของพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มีผลต่อสิ่งแวดล้อม จึง
สามารถนำเทคนิคและวิธีการ ไปประยุกต์ใช้ในการประเมินผลกระทบของพืชตัดแปลงพันธุกรรม
ทางด้านจุลินทรีย์ดินในอนาคต อันจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์พืชตัดแปลงพันธุกรรมมา
ใช้ในเชิงการค้าต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- วัฒนา สวรรยาธิปิติ. 2531. การปลูกมะละกอ. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- ทวีเกียรติ ยิ้มสวัสดิ์. 2527. มะละกอ. กรุงเทพมหานครการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- เทียนชัย สุวรรณเวช. 2539. เคมี่ของดิน. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- นุชนาถ วารินทร์, ศรีเมฆ ชวโงพงพาง, อัญญา บุญชด, กนกวรรณ รมยานนท์, ราตรี รอดอารีย์, วิชัย โนมสิตรัตน, สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2546. มะละกอพันธุ์ใหม่ด้านทานไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ. การประชุมวิชาการครั้งที่ 41, 3-7 ก.พ. 2546 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ประพันธ์ นันระไชย. 2525. แนวทางการปรับปรุงพันธุ์มะละกอ. รายงานการประชุมสัมมนาการเกษตรภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ มะละกอ ครั้งที่ 1. สำนักงานการเกษตรและสหกรณ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ท่าพระ, ขอนแก่น.
- เรื่อนันท์ พูลพิพิธ. 2544. การโคลนยีนและความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนเรพลิเคสของเชื้อไวรัสใบด่างแหวนมะละกอในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.
- วิชัย โนมสิตรัตน, นลอง แบบประเสริฐ, อติศักดิ์ บ้วนกียาพันธุ์, รัชณี สงประยูร, กุลวดี เรืองพาณิชย์, สุจินต์ ภัทรภูวดล, สมนึก เชื้อวงศ์สกุล, สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2545. มะละกอและโรคใบด่างวงแหวน. โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีเพื่อการผลิตส่วนขยายพันธุ์พืชคุณภาพดี. ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2546. การวิจัยพัฒนามะละกอดัดแปลง พันธุกรรมของประเทศไทย. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่อง การวิจัย พัฒนา และ ทดสอบความปลอดภัยมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในประเทศไทย. 23 สิงหาคม 2547 ณ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จ.ปทุมธานี.

Anderson, S.A., C.H. Sissons, M.J. Coleman and L. Wong. 2002. Application of carbon source utilization patterns to measure the metabolic similarity of complex dental plaque biofilm microcosms. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 5779-5783.

Ausubel, F.; Brent, R; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. and Struhl, K. 1995. **Short Protocols in Molecular Biology**. John Wiley and Sons, New York. p.757

Balser, T.C., J.W. Kirchner and M.K. Firestone. 2002. Methodological variability in microbial community level physiological profiles. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 66: 519-523.

Boom, C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-van Dillen and J. van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.** 2: 495-503.

Bowen, G.D. and A.D. Rovira. 1991. The rhizosphere, the hidden half of the hide Half, pp. 641-629. *In* Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi, Eds. **Plant Roots, The Hidden Half**, Marcel Dekker, Inc. New York.

Bray, R.H. and L.t. Kurtz. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. **Soil Sci.** 59: 39-45.

- Bremner, J.M. 1960. Determination of nitrogen in soil by the kjeldahl method. **J. Agric. Sci.** 55: 11-33.
- Classen, T.A., S.I. Boyle, K.E. Haskins, S.T. Overby, S.T. Overby and S.C. Hart. 2003. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. **FEMS Microbiol. Ecol.** 44: 319-328.
- Cowgill, E.S., R.D. Barpett, D.T. Kiezebrink and H.J. Atkinson. 2002. The effect of transgenic nematode resistance on non-target organisms in the potato rhizosphere. **J. Appl. Ecol.** 39: 915-915.
- Choi, K-H. and F.C. Dobbs. 1999. Comparison of two kinds of biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. **J. Microbiol. Methods** 36: 203-213.
- Conner, J.A., T.R. Glare and J. P. Nap. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. **Plant Journal** 33: 19-46.
- Conover, R.A. 1964. Distortion ringspot, a severe virus disease of papaya in Florida. **Proc. Fla. State Hort. Soc.** 77: 440-444.
- Doi, R. 2003. Application of the antibiotic disk diffusion method to multivariate profiling of soil bacterial community: comparing the power to discriminate different soil and dimension of the discrimination with that of the BIOLOG method. **Brazilian Journal of Microbiology** 34: 313-320.

- Donegan, K.K., C.J. Palm, V.J. Fieland, L.A. Porteous, L.M. Ganio, D.L. Schaller, L.Q. Bucao and R.J. Seidler. 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki endotoxin. **Appl. Soil Ecol.** 2: 111-124.
- Dunfield, K.E. and J.J. Germida. 2001. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *brassica napus*. **FEMS Microbiol. Ecol.** 38: 1-9.
- Dunfield, K.E. and J.J. Germida. 2004. Impact of genetically modified crops on soil and plant associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality** 33: 806-815.
- Escher, N., B. Käch and W. Nentwig. 2000. Decomposition of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize by microorganisms and woodlice *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). **Basic and Applied Ecology** 1: 191-199
- Fitch, M.M., R.M. Manshardt, D. Gonsalves, J.I. Slightom and J.C. Sanford. 1990. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports** 9: 189-194.
- Garland, J.L. and A.L. Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 2351-2359.

- Garland, J.L., A.L. Mills and J.S. Young. 2000. Relative effectiveness of kinetic analysis vs single point readings for classifying environmental samples based on community-level physiological profiles (clpp). **Soil Biol. Biochem.** 33: 1059-1066.
- Garland, J.L. 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential c source utilization. **Soil Biol. Biochem.** 28: 213-221.
- Garland, J.L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. **FEMS Microbiol. Ecol.** 24:289-300.
- Gich F.B., E. Amer, J.B. Figueras, C.A. Abella, M.D. Balaguer, M. Poch. 2000. Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis(ardra). **Interntl. Microbiol.** 3: 103-106
- Gonsalves, D. and M. Ishii. 1980. Purification and serology of papaya ringspot virus. **Phytopathology.** 70: 1028-1032.
- Gonsalves, D. 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. **Annu. Rev. Phytopathol.** 36: 415-437.

Grayston, S.J., C.D. Campbell., R.D. Bardgett, J.L. Mawdsley, C.D. Clegg, K. Ritz, B.S.

Griffiths, J.S. Rodwell, S.J. Edwards, W.J. Davies, D.J. Elston and P. Millard. 2004.

Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques.

Appl. Soil Ecol. 25: 63-84.

Griffiths, B. S., K. Ritz, N. Ebbelwhite and G. Dobson. 1999. Soil microbial community

Structure : effects of substrate loading rates. **Soil Biol. Biochem.** 1: 145-153.

Haack, S. K., H. Garchow, M. J. Klug, and L. J. Forney. 1995. Analysis of factors affecting the

accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source

utilization patterns. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1458-1468.

Heerden, J. V., C. Korf, MM. Ehlers and TE. Cloete. 2002. Biolog for the determination of

diversity in microbial communities. **Water SA** 28: 0378-4738.

Honoré-Bouakline, S., J.P. Vincensini and V. Giacuzzo. 2003. Rapid diagnosis of

extrapulmonary tuberculosis by PCR: Impact of sample preparation and DNA

extraction. **J. Clin. Microbiol.** 41:2323-2329.

Hsieh, Y.-T. and T.-M. Pan. 2006. Influence of planting papaya ringspot virus resistant

transgenic papaya on soil microbial biodiversity. **J.Agric. Food Chem.** 54: 130-137.

Huaiying, Y., H. Changyong and H. Zhenli. 2002. Application of biolog sole carbon source

utilization test in Chinese red soils. **World Congress of Soil Science** 710: 1-8.

- Jaeger III, C. H., S.E Lindow, W. Miller, E. Clark and M.K Firestone. 1999. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 2685-2690.
- Jones, Jr. J.B. 1991. Kjeldahl method for nitrogen determination. **Micro-Macro Publishing** Athens Georgia. p.79
- Jensen, D.D. 1949. Papaya ringspot virus and its insect vector relationships. **Phytopathology** 39: 212-220.
- Kaplan, S., and B.J. Garrick. 1981. On the quantitative definition of risk. **Risk Anal.** 1: 11-27.
- Kawalchuk, G.A., M. Bruinsma and J.A. van Veen. 2003. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants. **Trands Ecol. Evol.** 18: 403-410.
- Konopka, A., L. Oliver and R.F. Jr. Turco. 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. **FEMS Microbiol. Ecol.** 35: 103-115.
- Kremer, R.J., P.A. Donald, A.J Keaster and H.C. Minor. 2000. Herbicide impact on *Fusarium* spp. And soybean cyst nematode in glyphosate-tolerant soybean. Annual Meeting Abstracts, 64th **Annual Meeting of the Soil Science Society of America**, Minneapolis, M.N.
- Kurtland, C.G., B. Canback and O.G. Berg. 2003. Horizontal gene transfer: a critical view. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 100: 9658-9662.

- Larkin, Robert P. 2003. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles. **Soil Biol. Biochem.** 35: 1451-1466.
- Lynch J. M. and J. M. Whipps. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant and Soil** 129: 1-10.
- Mafham-Preston, J., L. Boddy and P. F. Randerson. 2002. Analysis of microbial functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles-a critique. **FEMS Microbiol. Ecol.** 42: 1-14.
- Olsen, S.R. and L.E. Sommers. 1982. Phosphorous. pp.403-430. *In* A.I. Page. Ed. Method of Soil Analysis, part2,. **Agronomy monograph** no.9, Madison, Wis.
- Rasmann, S., T.G. Kollner, J. Degenhardt, I. Hiltbold, S. Toepfer, U. Kuhlman, J. Gershenzon and T.C.J. Turlings. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature** 434: 732-734.
- Schaad, N.M., J.B. Jone and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Plant Pathogenic Bacteria. **American Phytopathological Society Press**, St. Paul, Minnesota.
- Sørensen, J. 1997. The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. pp. 21-46. *In* J.D. van Elsas, E.M.H. Wellington and J.T. Trevors, Eds. **Modern Soil Microbe.** Marcel Dekker. New York.

Tiedje, J.M., S.A. Brempong, K. Nusslein, , T.L Marsh and S.J. Flynn. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. **Appl. Soil. Ecol.** 13:109-122.

Wachkinson, R. 1991. Describing risk. p368-377. *I*: M.A. Levin and H.S. Strauss, Eds. **Environmental Release of Organisms.** Risk Assessment in Genetic Engineering., New York, NY: McGraw-Hill.

Weidner, S., W. Arnold and A. Pühler. 1996. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16s rRNA genes. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 766-771

Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.** 173: 697-703.

Yeh S.D., and D. Gonsalves. 1984. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. **Phytopathology** 74: 1086-1091.

Zak, J.C., M.R. Willig, D.L. Moorhead and H. Wildman. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biol. Biochem.** 26: 1101-1108.

ภาคผนวก

วิธีการคำนวณหา Community-level Physiological Profile (CLPP) ด้วยโปรแกรม SPSS

1. ข้อมูลที่อ่านได้จากเครื่อง Biolog

gm2/1													
	96												
a	0	21	762	46	531	390	498	733	1180	2	641	360	
b	276	296	472	616	480	687	880	434	604	442	569	414	
c	801	416	166	634	290	578	475	409	692	769	355	260	
d	8	643	921	27	684	849	440	437	554	20	339	29	
e	304	252	97	355	-2	572	298	199	907	865	226	334	
f	36	397	55	6	236	361	248	375	442	691	47	152	
g	331	582	119	340	225	338	447	-4	161	168	194	634	
h	298	150	3	50	142	214	181	21	245	96	644	422	

2. นำค่าความสามารถในการดูดกลืนแสง มาคำนวณค่าเฉลี่ยในการเกิด Average Well Color Development (AWCD) แต่ละแหล่งคาร์บอน โดยใช้สูตร

$$AWCD = (C-R)/\{\sum(C-R)/95\}$$

โดยนำค่าที่วัดได้จากการเกิดสี (C) ของตัวอย่างเชื้อในดิน ลบด้วยค่าที่วัดได้จากการเกิดสีของน้ำหรือตัวอย่างมาตรฐาน (R)หารด้วยแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้งหมด 95 แหล่ง

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
	alfa-cyclodextrin	glycogen	tween-40	tween-80	n-acetyl-d-	n-acetyl-d-	adonms		l-arabinose d-	arabitol	d-cellobios	l-erythritol	d-fructose H
GM1/24hr	-0.1810	0.1810	3.0762	1.4476	3.0762	-0.1810	0.1810	0.00					1.2667
GM1/48hr	-0.0629	1.8240	0.0377	0.4780	1.4970	-0.0629	2.5285	2.21					0.7673
GM1/72hr	0.0188	2.2041	0.0566	1.2417	1.0492	0.5737	2.0833	3.61					0.7850
GM1/96hr			0.1228	1.4176	1.0412	1.3295	1.9569	3.15					0.7902
GM2/24hr			0.3423	0.1843	0.8162	1.0006	3.0280	-0.0263	0.3160	0.1317	1.7378	0.0000	1.1585
GM2/48hr			0.0906	0.6829	1.0278	2.0520	3.0903	1.1636	1.0661	0.6829	1.5817	0.0070	0.7386
GM2/72hr	0.0273	1.1505	0.1001	0.9357	1.0176	2.1226	2.0406	2.1062	1.8204	0.8173	1.3271	0.0346	2.4375
GM2/96hr	0.0298	1.2003	0.0953	1.1362	1.1065	1.9910	1.8823	1.9210	2.0193	0.6567	1.4415	0.0417	2.5212
Non-GM1/24hr	-0.2384	0.4768	1.7879	1.4304	2.8607	0.0000	0.4768	0.1192	0.1192	0.2384	0.1192	0.3576	0.5960
Non-GM1/48hr	-0.0283	0.7365	0.1133	0.9820	1.9262	-0.0189	1.3691	1.4730	0.0850	1.4069	0.0661	-0.0283	0.7459
Non-GM1/72hr	0.0135	1.5857	0.0843	1.3934	1.8691	0.4251	1.6937	2.6080	1.2078	2.0985	1.1066	0.0371	0.8367
Non-GM1/96hr	0.0624	2.0200	0.3344	1.4448	1.8684	0.9320	1.7658	3.0122	1.4314	1.7837	1.3065	0.1806	0.8941
Non-GM2/24hr	-0.7270	0.2423	0.9694	1.4541	5.0893	0.2423	-0.2423	-0.2423	1.6964	0.2423	0.2423	0.4847	-0.2423
Non-GM2/48hr	0.1375	1.0450	0.6325	1.5813	0.7425	0.1100	0.7425	3.3550	0.0000	0.9625	0.6738	0.0825	1.6363
Non-GM2/72hr	0.0927	1.4387	0.2176	2.5389	1.0317	1.0720	1.9264	2.6155	0.1048	1.5556	1.5596	0.0363	1.7692
Non-GM2/96hr	-0.0302	1.8680	0.2293	2.5349	0.9294	0.8268	2.1365	2.6888	0.9234	1.3821	1.3731	0.0151	1.9404
GM3/24hr	-1.9934	0.3322	5.3156	2.6578	7.6412	0.0000	0.0000	-0.3322	4.3189	0.3322	0.3322	0.3322	0.9967
GM3/48hr	-0.0098	1.3360	0.1170	1.1897	1.2287	0.0663	1.1019	2.8767	0.0488	1.7163	0.1755	0.1755	0.6046
GM3/72hr	-0.0227	1.6161	0.0491	1.2952	0.9251	1.2234	1.2159	2.2203	-0.0189	1.1441	1.3065	0.3965	0.9138
GM3/96hr	-0.0516	1.7147	0.0136	1.6794	0.9729	1.4185	1.2229	2.6794	-0.0516	0.7718	1.3968	0.4348	0.9321
GM4/24hr	0.0000	0.3864	0.9661	0.9017	3.6068	0.1288	0.2576	0.1288	0.1932	0.1288	0.1288	0.1288	0.3220
GM4/48hr	0.0371	0.9640	0.1261	1.2013	1.4534	0.0371	0.8231	1.4831	0.0593	1.3867	0.7712	-0.0074	0.6600
GM4/72hr	0.0535	1.0386	0.0692	1.4445	1.4068	0.7396	1.4068	2.7349	0.2581	1.6019	1.0417	0.0220	0.8781

ตัวอย่างดิน

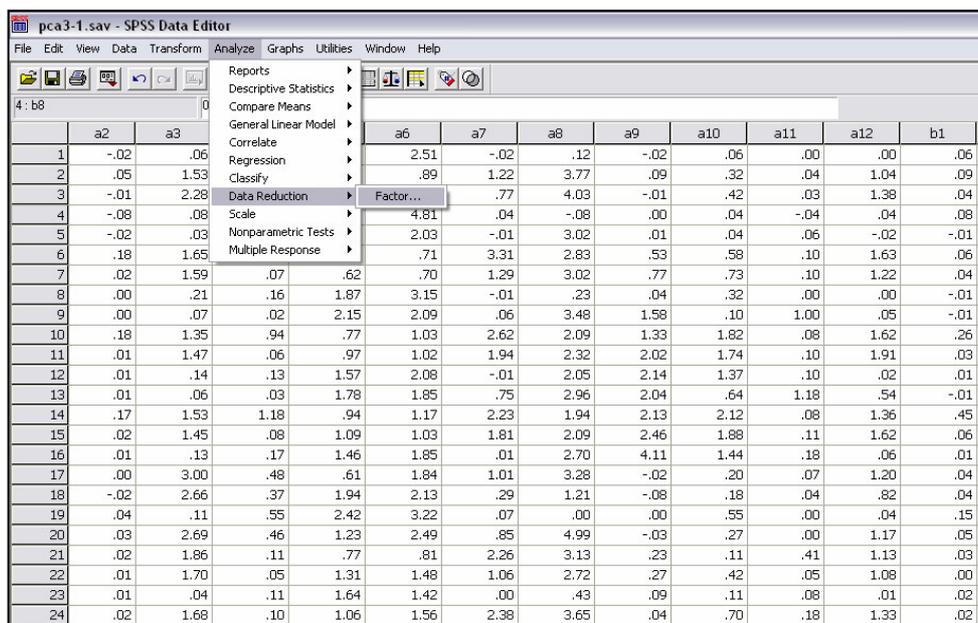
แหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด

3. นำข้อมูลค่า AWCD ของแต่ละคาร์บอน เข้าโปรแกรม SPSS เพื่อคำนวณจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรียจากการใช้แหล่งคาร์บอน

	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7
1	-.02	.06	.27	1.97	2.51	-.02	.12	-.02	.06	.00	.00	.06	.19	-.06	-.04	.00	2.70	-.04
2	.05	1.53	.33	.80	.89	1.22	3.77	.09	.32	.04	1.04	.09	1.01	1.01	1.01	.43	1.05	.86
3	-.01	2.28	.22	.55	.96	.77	4.03	-.01	-.42	.03	1.38	.04	1.18	.03	.38	.39	1.43	1.43
4	-.08	.08	.69	2.02	4.81	.04	-.08	.00	.04	-.04	.04	.08	.12	-.04	.08	.00	1.98	.04
5	-.02	.03	.04	1.86	2.03	-.01	3.02	.01	.04	.06	-.02	-.01	.31	-.03	-.03	.01	2.14	.00
6	.18	1.65	.68	.72	.71	3.31	2.83	.53	.58	.10	1.63	.06	.61	.98	.98	.76	.62	1.19
7	.02	1.59	.07	.62	.70	1.29	3.02	.77	.73	.10	1.22	.04	.79	.53	1.00	.91	.84	2.02
8	.00	-.21	.16	1.87	3.15	-.01	.23	.04	.32	.00	.00	-.01	.13	-.03	.25	.07	1.29	.69
9	.00	.07	.02	2.15	2.09	.06	3.48	1.58	.10	1.00	.05	-.01	.47	.57	.09	.64	2.03	.16
10	.18	1.35	.94	.77	1.03	2.62	2.09	1.33	1.82	.08	1.62	.26	2.09	1.37	1.37	.70	1.73	1.26
11	.01	1.47	.06	.97	1.02	1.94	2.32	2.02	1.74	.10	1.91	.03	2.01	.61	.77	.81	1.41	2.01
12	.01	.14	.13	1.57	2.08	-.01	2.05	2.14	1.37	.10	.02	.01	1.23	.04	.41	1.55	.93	2.76
13	.01	.06	.03	1.78	1.85	.75	2.96	2.04	.64	1.18	.54	-.01	.63	.82	.21	.86	1.96	.78
14	.17	1.53	1.18	.94	1.17	2.23	1.94	2.13	2.12	.08	1.36	.45	2.44	1.68	1.68	.72	2.23	1.42
15	.02	1.45	.08	1.09	1.03	1.81	2.09	2.46	1.88	.11	1.62	.06	2.56	.58	1.23	.80	2.07	2.15
16	.01	.13	.17	1.46	1.85	.01	2.70	4.11	1.44	.18	.06	.01	1.49	.07	.50	2.11	.84	3.53
17	.00	3.00	.48	.61	1.84	1.01	3.28	-.02	.20	.07	1.20	.04	1.31	.02	.11	.15	1.82	.09
18	-.02	2.66	.37	1.94	2.13	.29	1.21	-.08	.18	.04	.82	.04	1.27	-.04	.06	.33	2.35	-.02
19	.04	.11	.55	2.42	3.22	.07	.00	.00	.55	.00	.04	.15	.15	.04	.07	.04	1.83	.22
20	.03	2.69	.46	1.23	2.49	.85	4.99	-.03	.27	.00	1.17	.05	1.62	.03	.13	.41	1.95	.05
21	.02	1.85	.11	.77	.81	2.26	3.13	.23	.11	.41	1.13	.03	.84	.03	.92	.91	.90	1.18
22	.01	1.70	.05	1.31	1.48	1.06	2.72	.27	.42	.05	1.08	.00	1.00	.01	.76	.89	1.12	.07
23	.01	.04	.11	1.64	1.42	.00	.43	.09	.11	.08	.01	.02	.06	-.01	.03	.04	1.80	.25
24	.02	1.68	.10	1.06	1.56	2.38	3.65	.04	.70	.18	1.33	.02	.83	.66	.92	1.00	.83	.60
25	.02	1.60	.06	.94	.95	2.21	2.15	1.03	.39	.51	1.70	.05	2.56	.25	.87	.84	1.33	1.13
26	.02	1.90	.04	1.37	1.44	1.86	2.10	1.20	.26	.52	1.87	.03	1.32	.50	.67	.84	.78	.51
27	.01	.21	.06	1.37	1.41	.00	1.31	2.53	.04	1.45	.09	.01	.13	.07	.34	.05	1.59	.62
28	.02	1.42	.09	1.37	1.46	2.10	2.62	.62	1.60	.22	2.15	.03	2.66	.55	.86	.75	1.40	.85
29	.02	1.54	.05	1.12	1.15	2.04	1.85	1.37	1.48	.46	1.57	.04	2.80	.48	1.46	.79	1.95	1.26
30	.02	1.46	.04	1.32	1.49	1.92	1.94	1.53	1.85	.77	1.63	.03	2.14	.73	1.00	.79	1.21	.65

4. คำสั่งของ SPSS for Windows สำหรับเทคนิค Factor Analysis

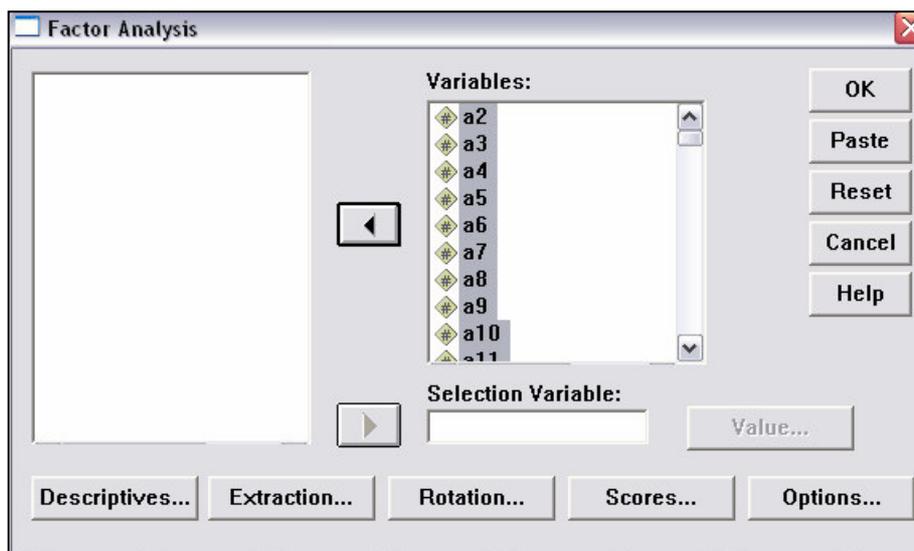
4.1 เลือกคำสั่ง Analysis → Data Reduction → Factor



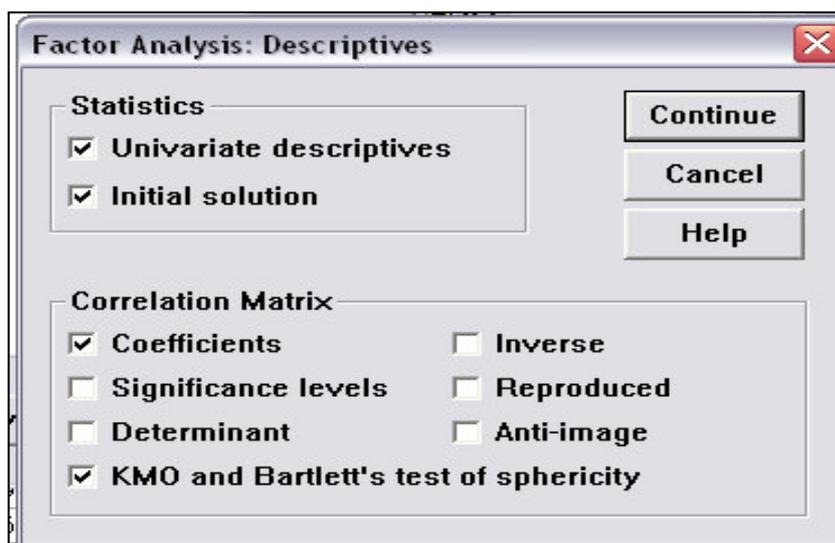
The screenshot shows the SPSS Data Editor window with the 'Analyze' menu open, navigating to 'Data Reduction' and then 'Factor...'. The data table below is a correlation matrix for variables a2 through a11.

	a2	a3	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	b1
1	-.02	.06	2.51	-.02	.12	-.02	.06	.00	.00	.06
2	.05	1.53	.89	1.22	3.77	.09	.32	.04	1.04	.09
3	-.01	2.28	.77	4.03	-.01	-.01	.42	.03	1.38	.04
4	-.08	.08	4.81	.04	-.08	.00	.04	-.04	.04	.08
5	-.02	.03	2.03	-.01	3.02	.01	.04	.06	-.02	-.01
6	.18	1.65	.71	3.31	2.83	.53	.58	.10	1.63	.06
7	.02	1.59	.07	.62	.70	1.29	3.02	.77	.73	.10
8	.00	.21	.16	1.87	3.15	-.01	.23	.04	.32	.00
9	.00	.07	.02	2.15	2.09	.06	3.48	1.58	.10	1.00
10	.18	1.35	.94	.77	1.03	2.62	2.09	1.33	1.82	.08
11	.01	1.47	.06	.97	1.02	1.94	2.32	2.02	1.74	.10
12	.01	.14	.13	1.57	2.08	-.01	2.05	2.14	1.37	.10
13	.01	.06	.03	1.78	1.85	.75	2.96	2.04	.64	1.18
14	.17	1.53	1.18	.94	1.17	2.23	1.94	2.13	2.12	.08
15	.02	1.45	.08	1.09	1.03	1.81	2.09	2.46	1.88	.11
16	.01	.13	.17	1.46	1.85	.01	2.70	4.11	1.44	.18
17	.00	3.00	.48	.61	1.84	1.01	3.28	-.02	.20	.07
18	-.02	2.66	.37	1.94	2.13	.29	1.21	-.08	.18	.04
19	.04	.11	.55	2.42	3.22	.07	.00	.55	.00	.04
20	.03	2.69	.46	1.23	2.49	.85	4.99	-.03	.27	.00
21	.02	1.86	.11	.77	.81	2.26	3.13	.23	.11	.41
22	.01	1.70	.05	1.31	1.48	1.06	2.72	.27	.42	.05
23	.01	.04	.11	1.64	1.42	.00	.43	.09	.11	.08
24	.02	1.68	.10	1.06	1.56	2.38	3.65	.04	.70	.18

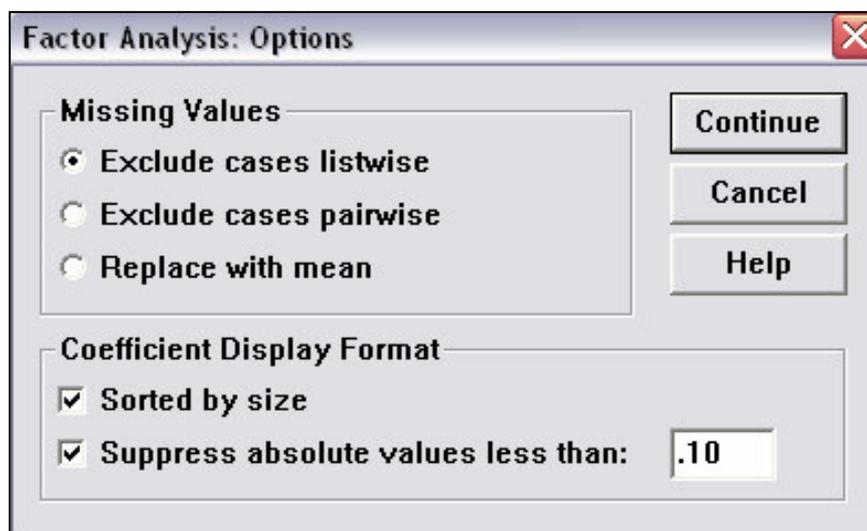
4.2 Variables ใส่ตัวแปรการใช้แหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด



4.3 เลือกร Descriptives...



4.4 เลือกร Extraction...



4.5 เลือก Rotation...

Factor Analysis: Rotation

Method

None Quartimax

Varimax Equamax

Direct Oblimin Promax

Delta: Kappa

Display

Rotated solution Loading plot(s)

Maximum Iterations for Convergence:

Continue
Cancel
Help

4.6 เลือก Scores...

Factor Analysis: Factor Scores

Save as variables

Method

Regression

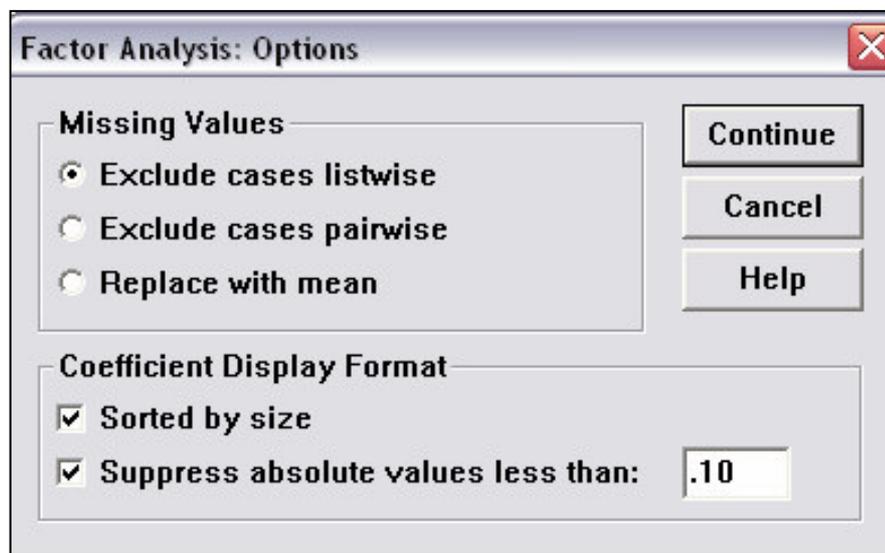
Bartlett

Anderson-Rubin

Display factor score coefficient matrix

Continue
Cancel
Help

4.7 เลือก Option...



4.8 เลือก OK เพื่อให้ระบบประมวลผล

ตารางผนวกที่ 1 Loading Factor ภาพที่ 3 (ตัวอย่างดิน มะละกออายุ 60 วัน)

แหล่งคาร์บอน	Component 1	แหล่งคาร์บอน	Component 2
Bromosuccinic-acid	-0.937	Glycerol	0.955
Urocanic-acid	-0.870	α -D-Glucose-1-phosphate	0.876
D-Galacturonic-acid	-0.851	Inosine	0.846
D,L-Lactic acid	-0.839	L-Arabinose	0.842
m-Inositol	0.834	Uridine	0.823
Acetic acid	-0.811	D-Serine	0.818
cis-Aconitic acid	-0.784	β -Methy-D-Glucoside	0.760
D-Glucosaminic acid	0.776	D-Mannose	0.728
β -hydroxybutyric-acid	-0.768	D-Fuctose	0.701
D-Melibiose	0.767	Sucrose	0.700
γ -hydroxybutyric-acid	-0.742	N-Acetyl-D-galactosamine	0.638
D-Raffinose	0.736	Citric acid	-0.618
Maltose	0.722	Adonitol	-0.521
D-Trehalose	0.646	L-Glutamic acid	-0.518
Xylitol	0.640	Succinic acid mono methyl ester	-0.508
L-Rhamnose	0.600	D-Saccharic acid	-0.496
Tween-40	0.599		
Pyruvic acid methyl ester	-0.575		
D,L- α -Glycerol-phosphate	0.548		
Succinic acid	-0.528		
D-Cellobiose	0.493		
D-Gluconic acid	-0.461		

ตารางผนวกที่ 2 Loading Factor ภาพที่ 4 (ตัวอย่างดินมะละกออายุ 90 วัน)

แหล่งคาร์บอน	Component 1	แหล่งคาร์บอน	Component 2
L-Fucose	-0.937	Glycyl-L-glutamic acid	0.916
D-Trehalose	0.925	L-Threonine	0.906
D-Cellobiose	0.915	Glycyl-L-aspartic acid	0.884
D-Mannose	0.911	Glycogen	0.858
Phenethylamine	-0.910	α -Cyclodextrin	0.854
Putrescine	-0.909	α -D-Lactose	0.831
L-Rhamnose	0.901	i-Erythritol	0.820
Sucrose	0.895	α -Hydroxybutyric acid	0.797
D-L-Lactic acid	-0.893	α -Ketobutyric acid	0.786
Maltose	0.889	L-Alaninamide	0.714
cis-Aconitic acid	-0.886	Xylitol	0.666
α -Keto glutaric acid	-0.879	L-Fucose	0.660
β -Hydroxybutyric acid	-0.869		
D-Melibiose	0.864		
Glycerol	0.858		
Quinic acid	-0.856		
β -Methy-D-glucoside	0.853		
N-Acetyl-D-galactosamine	0.846		
L-Proline	-0.844		
D-Raffinose	0.838		
γ -Aminobutyric acid	-0.834		
Succinic acid	-0.832		
D-Sorbitol	0.831		
Inosine	0.827		
D-Galactose	0.826		
L-Asparagine	-0.819		
D-Fructose	0.800		
Thymidine	0.795		

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	Component 1	แหล่งคาร์บอน	Component 2
D-Glucuronic acid	0.777		
Urocanic acid	-0.777		
Hydroxy-L-proline	-0.770		
D-Serine	0.753		
Tween-80	-0.738		
L-Aspartic acid	-0.726		
Gentiobiose	0.720		
L-Glutamic acid	-0.717		
2-Aminocethanol	-0.705		
Tween-40	-0.690		
Pyruvic acid methyl ester	0.685		
Bromosuccinic acid	-0.676		
α -D-Glucose-L-phosphate	0.671		
L-Arabinose	0.650		
D-Mannitol	0.630		
D-Glucosaminic acid	0.626		
D-saccharic acid	-0.602		
L-Pyroglutamic acid	-0.578		
Uridine	0.500		
Succinic acid mono methyl ester	-0.500		

ตารางผนวกที่ 3 Loading Factor ภาพที่ 5 (ตัวอย่างดินมะละกออายุ 120 วัน)

แหล่งคาร์บอน	Component 1	แหล่งคาร์บอน	Component 2
α -Cyclodextrin	0.975	cis-Aconitic acid	-0.972
Acetic acid	0.975	Quinic acid	-0.944
D,L- α -Glycerol phosphate	0.972	L-Proline	-0.939
D,L-Carnitine	0.971	L-Aspartic acid	-0.917
Glycyl-L-aspartic acid	0.961	Bromosuccinic acid	-0.915
Propionic acid	0.959	Pyruvic acid methyl ester	-0.833
Thymidine	0.956	α -Hydroxybutyric acid	0.795
D-Serine	0.955	D-Alanin	-0.788
Succinamic acid	0.955	Succinic acid mono methyl ester	0.708
L-Threonine	0.953	L-Alanine	-0.617
α -D-Lactose	0.949	m-Inositol	0.585
L-Alaninamide	0.942	Lactulose	0.570
α -Ketobutyric acid	0.926		
Glycyl-L-glutamic acid	0.923		
Uridine	0.919		
D-Cellobiose	0.914		
Dextrin	0.911		
L-Arabinose	-0.908		
N-Acetyl-D-galactosamine	0.900		
Glycogen	0.897		
L-Alanylglycine	0.896		
Succinic acid	0.895		
α -D-Glucose	-0.886		
Tween-80	-0.883		
γ -Hydroxybutyric acid	0.877		
D-Melibiose	-0.875		
Phenylalanine	0.875		
D-Glucosaminic acid	0.872		
L-Leucine	0.870		

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	Component 1	แหล่งคาร์บอน	Component 2
L-Serine	0.869		
γ -Aminobutyric acid	0.862		
D-Galactonic acid lactinic	0.845		
L-Pyroglutamic acid	0.844		
2,3-Butanediol	-0.843		
D,L-Lactic acid	-0.839		
D-Fructose	-0.838		
Itaconic acid	0.825		
Glycerol	0.823		
Glucuronamide	-0.822		
D-Mannitol	0.810		
D-Galactose	0.810		
Phenyethylamine	0.793		
D-Arabitol	0.791		
Putrescine	0.790		
D-Psicose	-0.787		
i-Eryhritol	-0.761		
L-Ornithine	0.757		
Formic acid	0.756		
Malonic acid	0.756		
α -Ketovaleric acid	-0.754		
Sebacic acid	0.749		
Hydroxy-L-proline	0.728		
Xylitol	0.716		
L-Fucose	-0.684		
Inosine	0.679		
Citric acid	0.676		
Turanose	-0.672		

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	Component 1	แหล่งคาร์บอน	Component 2
Turanose	-0.672		
D-Saccharic acid	0.667		
L-Histidine	0.634		
D-Galacturonic acid	0.632		
β -Hydroxybutyric acid	-0.599		
D-Glucose-6-phosphate	0.594		
α -Ketoglutaric acid	-0.537		
L-asparagine	0.489		

ตารางผนวกที่ 4 Loading Factor ภาพที่ 6 (ตัวอย่างดินมะละกออายุ 150 วัน)

แหล่งคาร์บอน	Component 1	แหล่งคาร์บอน	Component 2
Acetic acid	0.949	D- Psicose	0.953
L-Leucine	0.933	I-Eryhritol	0.947
α -Cyclodextrin	0.933	Succinamic acid	0.938
Phenyethylamine	0.928	Bromosuccinic acid	0.910
D-Serine	0.916	Lactulose	0.889
Uridine	0.916	L-Arabinose	0.784
α -Ketobutyric acid	0.916	α -Hydroxybutyric acid	0.782
Phenylalanine	0.904	α -Ketovaleric acid	0.694
L-Pyroglutamic acid	0.904	Tween-80	0.610
Propionic acid	0.894		
L-Threonine	0.887		
L-Histidine	0.885		
Glycogen	-0.876		
L-Ornithine	0.872		
Succinic acid mono methyl ester	0.871		
Malonic acid	0.865		
Glycerol	0.849		
D,L-Carnitine	0.837		
α -Ketoglutaric acid	-0.836		
Sebacic acid	0.822		
L-Aspartic acid	0.821		
2-Aminocethanol	0.818		
L-Serine	0.817		
D-Gluconic acid	-0.809		
Formic acid	0.791		
Thymidine	0.782		
Itaconic acid	0.777		
L-Alanyl-glycine	0.769		
Inosine	0.768		
Maltose	0.765		

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	Component 1	แหล่งคาร์บอน	Component 2
Maltose	0.765		
Glucuronamide	0.748		
Sucrose	0.730		
Turanose	0.727		
Citric acid	0.725		
p-Hydroxyphenylacetic acid	0.724		
L-Alaninamide	0.703		
D-Mannitol	0.695		
α -D-Glucose-L-Phosphate	0.677		
D-Galactose	0.661		
L-Glutamic acid	-0.655		
Urocanic acid	0.629		
L-Asparagine	0.628		
Gentiobiose	0.618		
D-Glucosaminic acid	0.603		
D-Arabitol	0.603		
D-Mannose	0.601		
L-Alanine	0.573		
Hydroxy-L-Proline	0.566		
D-Saccharic acid	0.561		

ตารางผนวกที่ 5 Loading Factor ภาพที่ 7 (ตัวอย่างดินมะละกออายุ 180 วัน)

แหล่งคาร์บอน	Component 1	แหล่งคาร์บอน	Component 2
Phenylalanine	0.950	Urocanic acid	0.821
p-Hydroxyphenylacetic acid	0.913	L-Aspartic acid	-0.819
Glycogen	0.896	L-Histidine	0.812
Formic acid	0.886	D-Galactonic acid lactone	0.788
β -Hydroxybutyric acid	0.818	α -Ketoglutaric acid	-0.755
D,L-Lactic acid	0.762	2-Aminocethanol	0.750
Pyruvic acid methyl ester	0.648	D-Galacturonic acid	0.731
Quinic acid	0.647	L-Pyroglutamic acid	-0.718
α -D-Glucose	0.644	Sucrose	0.713
D,L-Carnitine	-0.566	Putrescine	-0.649
L-Asparagine	-0.566	Malonic acid	-0.639
2,3-Butanediol	0.556	Tween-80	0.638
Adonitol	0.494	L-Proline	0.566
		α -Ketovaleric acid	-0.544
		Succinic-acid	-0.478

ตารางผนวกที่ 6 Loading Factor ภาพที่ 8 (ตัวอย่างดินมะละกออายุ 210 วัน)

แหล่งคาร์บอน	Component 1	แหล่งคาร์บอน	Component 2
n-Acetyl-D-galactosamine	0.970	D-Galacturonic acid	-0.949
γ -hydroxybutyric-acid	0.942	D-Saccharic acid	-0.943
α -cyclodextrin	0.919	Citric acid	-0.917
Tween-80	-0.912	α -Keto-glutaric acid	-0.912
Dextrin	0.886	Quinic acid	-0.905
L-Leucine	0.872	L-Asparagine	-0.904
Inosine	0.861	L-Aspartic acid	-0.891
Tween-40	-0.848	α -Keto-butyric acid	0.874
Glycogen	-0.846	D,L-Lactic acid	-0.868
L-Arabinose	-0.844	D-Alanin	-0.847
α -D-Lactose	0.840	Putrescine	-0.813
Succinamic acid	0.836	L-Alaninamide	0.804
L-Fucose	0.834	Urocanic acid	-0.781
L-Omithine	0.830	D-Gluconic acid	-0.779
D,L-Carnitine	0.822	L-Glutamic acid	-0.755
Lactulose	0.822	2,3-Butanediol	0.754
i-Erythritol	0.818	L-Proline	-0.752
Glycyl-L-aspartic acid	0.816	L-Alanine	-0.738
L-Serine	0.810	Phenylalanine	0.738
Sebacic acid	0.808	α -hydroxybutyric_acid	0.673
α -D-Glucose-1-phosphate	0.804	Gentiobiose	0.645
D- Psicose	0.800	p-Hydroxyphenylacetic acid	0.642
D-Glucosaminic acid	0.800	L-Threonine	0.637
α -Ketovaleic acid	-0.795	β -methy-d-glucoside	0.625
D-Mannose	0.793	Uridine	0.622
Thymidine	0.791	Formic acid	0.595
Itaconic acid	0.787	2-Aminocethanol	-0.519
α -D-Glucose	0.784	Xylitol	0.499
D-Trehalose	0.779		

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	Component 1	แหล่งคาร์บอน	Component 2
Turanose	0.775		
cis-Aconitic acid	0.754		
D-Arabitol	0.742		
Adonitol	0.741		
Glucuronamide	-0.734		
Bromosuccinic acid	-0.724		
D-Melibiose	0.692		
L-Rhamnose	0.687		
Acetic acid	-0.680		
N-Acetyl-D-glucosamine	0.668		
Propionic acid	-0.640		
Succinic acid	0.585		

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ -นามสกุล	นางสาวกษมา ชูสังข์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	1 พฤศจิกายน พ.ศ.2523
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ปฐพีวิทยา), สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนผู้ช่วยนักวิจัย ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน