



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การประเมินผลทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับ
การถ่ายยีน antisense CPACO

Allelopathic Assessment of Transgenic *Dendrobium* Possessed Antisense CPACO Gene

นามผู้วิจัย นางสาวชมภูณัฐ ลิ้มประสาท

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรศิริ เลี้ยงสกุล, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทน์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงห์ มหาวินิจฉัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การประเมินผลทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุกรรม
ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO*

Allelopathic Assessment of Transgenic *Dendrobium* Possessed Antisense *CPACO* Gene

โดย

นางสาวมณูช ลิ้มประสาธ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชมภูษ ลัมประสาท 2557: การประเมินผลทางอัลลีโลพาตีของกล้วยไม้สกุลหวาย
ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO ปริญญาวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการ
สหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
เสริมศิริ จันทรเปรม, Ph.D. 77 หน้า

การประเมินผลทางอัลลีโลพาตีของพืชดัดแปลงพันธุกรรมเป็นวิธีการหนึ่งในการ
ประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ การประเมินผลดังกล่าวนี้มีความสำคัญสำหรับการพิจารณาหา
แนวทางการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมในสภาพธรรมชาติ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ
ประเมินกิจกรรมทางอัลลีโลพาตีของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรม คือ *Dendrobium*
Sonia 'Bom 17' และ *Dendrobium Sonia* 'Earsakul' ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense 1-
aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (CPACO) ซึ่งได้มาจากมะละกอ โดยประเมิน
ผลกระทบที่อาจมีผลต่อพืชปลูกตามหลังและจุลินทรีย์รอบราก ด้วย 4 เทคนิค คือ 1) เทคนิค
sandwich method และ 2) เทคนิค soil germination เพื่อประเมินผลทางอัลลีโลพาตีต่อการ
เจริญเติบโตของผักกาดหอม 3) เทคนิค plate cultivation เพื่อประเมินผลทางอัลลีโลพาตีต่อกลุ่ม
ประชากรจุลินทรีย์รอบราก ทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท และเชื้อรา และ 4) เทคนิค high
performance liquid chromatography เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบโครมาโทแกรมของสารประกอบ
ฟีนอลิกระหว่างกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีน ผลการทดลองพบว่า กล้วยไม้
สกุลหวายมีผลทางอัลลีโลพาตียับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดหอม แต่เมื่อเปรียบเทียบผล
ทางอัลลีโลพาตีระหว่างกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนพบว่าไม่มีความ
แตกต่างทางสถิติ และเมื่อตรวจสอบประชากรจุลินทรีย์ในกาบมะพร้าวที่ใช้เป็นวัสดุปลูกกล้วยไม้
พบว่า กล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนไม่ส่งผลกระทบต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์เมื่อเปรียบเทียบกับ
กล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นอกจากนี้รูปแบบโครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิก
ในส่วนของใบและดอกของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนมีความคล้ายคลึงกันกับในกล้วยไม้ปกติที่
ไม่ได้รับการถ่ายยีนเช่นกัน

Chompunut Limprasat 2014: Allelopathic Assessment of Transgenic *Dendrobium* Possessed Antisense *CPACO* Gene. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Sermsiri Chanprame, Ph.D. 77 pages.

Allelopathic assessment on transgenic plants is one of the key elements in environmental biosafety assessments. It is important to consider how the transgenic plants are deliberately released to the environment. This study is aimed to evaluate allelopathic activity of transgenic orchids, *Dendrobium* Sonia 'Bom 17' and *Dendrobium* Sonia 'Earsakul' that were transformed with antisense papaya *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (CPACO)* from papaya. The allelopathic effects on sequential crop and surrounding microorganisms were assessed based on 4 techniques including; i) sandwich method and ii) soil germination method to determine allelopathy on growth of lettuce, iii) plate cultivation technique to determine allelopathy effects on the surrounding microorganisms including bacteria, actinomycetes and fungi, and finally, iv) high performance liquid chromatography technique to compare chromatogram pattern of phenolic compounds between transgenic and non-transgenic orchids. The result revealed that *Dendrobium* orchid had allelopathic activity on lettuce but there was no significantly different in allelopathy between transgenic and non-transgenic orchids. The evaluation of microorganism population in orchid planting material, which is coconut husk, confirmed that transgenic orchids had no impact on microorganism, compared with the non-transgenic orchid. The chromatogram pattern of phenolic compounds from leaf and flower of transgenic and non transgenic orchid lines are also similar.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสริมศิริ จันทรเปรม ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.สนธิชัย จันทรเปรม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรศิริ เลี้ยงสกุล
กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาทั้งในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนแก้ไข
วิทยานิพนธ์ จนกระทั่งสำเร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จุลภาค
คุ่นวงศ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.ชาลินี กองสวัสดิ์
ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้ความกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและ
วิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่
ให้การสนับสนุนทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัยและงบประมาณในการทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืชและการถ่ายยีน
ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัยให้แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง และญาติทุกคนในครอบครัวที่คอยให้
ความรัก กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษาแก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จลุล่วงด้วยดีตลอดมา

ชมภูณัฐ ลีมประสาท

ตุลาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	23
อุปกรณ์	23
วิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	33
สรุปและข้อเสนอแนะ	63
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	64
ภาคผนวก	74
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	77

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ผลทางอัลลีโลพาที่จากส่วนของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวาย สายพันธุ์ ‘เอียสกุล’ ต้นปกติ (AEC) และสายต้นดัดแปลงพันธุกรรม 4 สายต้น คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4 ต่อการเจริญเติบโตของ ผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทดสอบโดยวิธี sandwich method ใช้น้ำหนักตัวอย่างแห้งของกล้วยไม้ 10 มิลลิกรัม ในการศึกษา ครั้งที่ 1 ตุลาคม 2555 ครั้งที่ 2 มิถุนายน 2556 และครั้งที่ 3 ตุลาคม 2556	36
2 ผลทางอัลลีโลพาที่จากส่วนของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวาย สายพันธุ์ ‘เอียสกุล’ ต้นปกติ (AEC) และสายต้นดัดแปลงพันธุกรรม 4 สายต้น คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4 ต่อการเจริญเติบโตของ ผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทดสอบโดยวิธี sandwich method ใช้น้ำหนักตัวอย่างแห้งของกล้วยไม้ 50 มิลลิกรัม ในการศึกษา ครั้งที่ 1 ตุลาคม 2555 ครั้งที่ 2 มิถุนายน 2556 และครั้งที่ 3 ตุลาคม 2556	38
3 สรุปการศึกษาผลทางอัลลีโลพาที่ของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลง พันธุกรรม สายพันธุ์เอียสกุลที่มีต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม ศึกษาด้วยวิธี sandwich method	40
4 ผลทางอัลลีโลพาที่จากส่วนของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวาย สายพันธุ์ ‘บอม 17’ ต้นปกติ (ABC) และสายต้นดัดแปลงพันธุกรรม 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 ต่อการเจริญเติบโตของ ผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทดสอบโดยวิธี sandwich method ใช้น้ำหนักตัวอย่างแห้งของกล้วยไม้ 10 มิลลิกรัม ในการศึกษา ครั้งที่ 1 ตุลาคม 2555 ครั้งที่ 2 มิถุนายน 2556 และครั้งที่ 3 ตุลาคม 2556	43

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
5 ผลทางอัลลีโลพาที่จากส่วนของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวาย สายพันธุ์ ‘บอม 17’ ต้นปกติ (ABC) และสายต้นดัดแปลงพันธุกรรม 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 ต่อการเจริญเติบโตของ ผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทดสอบโดยวิธี sandwich method ใช้น้ำหนักตัวอย่างแห้งของกล้วยไม้ 50 มิลลิกรัม ในการศึกษา ครั้งที่ 1 ตุลาคม 2555 ครั้งที่ 2 มิถุนายน 2556 และครั้งที่ 3 ตุลาคม 2556	45
6 สรุปการศึกษาผลทางอัลลีโลพาที่ของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลง พันธุกรรม สายพันธุ์บอม 17 ที่มีต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม ศึกษาด้วยวิธี sandwich method	47
7 สรุปผลปฏิสัมพันธ์ของผลทางอัลลีโลพาที่จากส่วนของใบและดอก ของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ ‘เอียสกุล’ ต้นปกติ (AEC) และสายต้น ดัดแปลงพันธุกรรม 4 สายต้น คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4 ต่อ การเจริญเติบโตของผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทดสอบโดยวิธี sandwich method ทดสอบโดยใช้น้ำหนักตัวอย่างแห้งของกล้วยไม้ 10 และ 50 มิลลิกรัม ในการศึกษา 3 ครั้ง	50
8 สรุปผลปฏิสัมพันธ์ของผลทางอัลลีโลพาที่จากส่วนของใบและดอก ของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ ‘บอม 17’ ต้นปกติ (ABC) และสายต้น ดัดแปลงพันธุกรรม 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 ต่อ การเจริญเติบโตของผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทดสอบโดยวิธี sandwich method ทดสอบโดยใช้น้ำหนักตัวอย่างแห้งของกล้วยไม้ 10 และ 50 มิลลิกรัม ในการศึกษา 3 ครั้ง	51
9 การประเมินเปอร์เซ็นต์การงอก และการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอม เมื่อปลูกทดสอบในดินปลูกที่มีส่วนผสมของกาบมะพร้าวเก่าที่ใช้ปลูก กล้วยไม้สายพันธุ์เอียสกุล และบอม 17 ทั้งที่ดัดแปลงพันธุกรรมและ กล้วยไม้ปกติมาแล้วเป็นเวลา 1 ปี	53

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
10	ปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำสกัดวัสดุปลูกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอเซียสกุลและ บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense <i>CPACO</i> และกล้วยไม้สกุลหวายปกติที่ไม่ได้ รับการถ่ายยีน (AEC และ ABC) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี plate cultivation method
56	
ตารางผนวกที่	
1	องค์ประกอบของอาหารสูตร Peptone Tryptone Yeast Extract Glucose (PTYG) สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีท
75	
2	องค์ประกอบของอาหารสูตร Oxytetracycline Glucose Yeast Extract (OGYE) สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อรา
75	
3	องค์ประกอบของสารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์
76	

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลไกการสังเคราะห์และการควบคุมการสร้างเอทิลีน	7
2	การทดสอบผลทางอัลลีโลพาธีโดยวิธี sandwich method	29
3	โครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานในสารสกัดกล้วยไม้ สกุลหวายจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-DAD ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	60
4	โครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ในสารสกัด ส่วนใบ และดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ เอียสกุล (AE) จากต้นกล้วยไม้ ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (AEC) และต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense <i>CPACO</i> จำนวน 4 สายต้น คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4	61
5	โครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ในสารสกัด จากส่วนใบ และดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ บอม 17 (AB) จากต้นกล้วยไม้ ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ABC) และต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense <i>CPACO</i> จำนวน 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4	62

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CFU	=	colony forming units
DMRT	=	Duncant's New Multiple Range Tests
GMOs	=	genetically modified organisms
HPLC	=	high performance liquid chromatography
MΩ	=	mega ohm
OGYE	=	oxytetracycline glucose yeast extract
PTYG	=	peptone tryptone yeast extract glucose

การประเมินผลทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรม
ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO

Allelopathic Assessment of Transgenic *Dendrobium*
Possessed Antisense CPACO Gene

คำนำ

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะด้านเทคโนโลยีชีวภาพในการศึกษาการแสดงออกของยีนและการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่เป็นเป้าหมาย เพื่อนำความรู้ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม พืชดัดแปลงพันธุกรรม (Genetically Modified Plant: Transgenic plant) หมายถึงพืชที่ผ่านกระบวนการตัดแต่งสารพันธุกรรมโดยมนุษย์ ด้วยวิธีการให้ยีนที่ต้องการ สอดแทรกเข้าสู่พันธุกรรมพืช เพื่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะบางอย่าง ปัจจุบันมีการพัฒนาพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อผลิตเชิงเกษตรกรรมในประเทศต่างๆ ทั่วโลก แต่การที่พืชดัดแปลงพันธุกรรมยังไม่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคบางกลุ่ม รวมทั้งข้อกังวลถึงผลกระทบทางสภาพแวดล้อมที่อาจเกิดขึ้น ทำให้ประเทศไทยยังไม่อนุญาตให้มีการเพาะปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2551) ดังนั้น ในการดำเนินการเพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่จะนำออกปลูกจะไม่สร้างผลกระทบใดๆ เกินระดับที่ยอมรับได้นั้น การตรวจสอบความปลอดภัยทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพ เช่น การประเมินผลในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือนระบบปิดที่มีการตรวจวิเคราะห์ในเรื่องต่างๆ การประเมินผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจนมั่นใจว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรมนั้นปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมจึงเป็นกระบวนการที่สำคัญ

การทดสอบอัลลีโลพาที เป็นวิธีการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการวิธีการหนึ่ง โดยใช้วิธีการทดสอบเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่อาจมีต่อพืชปกติ หรือความสัมพันธ์ระหว่างพืชและจุลินทรีย์ เพื่อตอบ โจทย์ที่มีข้อกังวลว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรมอาจมีการสังเคราะห์สารเคมีบางชนิดที่ต่างไปจากเดิม หรืออาจมีสารประเภทอัลลีโลพาติก ซึ่งสามารถสร้างผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตอื่นในระบบนิเวศเดียวกัน และมีศักยภาพที่จะทำให้เกิดผลกระทบวงกว้างได้หลายรูปแบบ

นอกจากนี้ การทดสอบอัลลีโลพาตียังเป็นประเด็นที่น่าสนใจและมีการศึกษาทดลองกัน อย่างกว้างขวางในปัจจุบัน จากประเด็นนี้งานวิจัยนี้จึงมีการประยุกต์ใช้การประเมินผลทาง อัลลีโลพาตีเพื่อเป็นส่วนหนึ่งในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของกล้วยไม้สกุลหวาย คัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase* จาก มะละกอ (CPACO) ด้วยเทคนิค antisense โดยศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือนชีวนิรภัย เพื่อประเมินผลกระทบของพืชคัดแปลงพันธุกรรมต่อความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์และ พืชปลูกที่อยู่ร่วมกันในสภาพแวดล้อมเดียวกันกับกล้วยไม้คัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจ ผลของการถ่ายยีนต่อการเกิดกิจกรรมทางอัลลีโลพาตี โดยการประเมินกิจกรรมทางอัลลีโลพาตีใน กล้วยไม้สกุลหวายคัดแปลงพันธุกรรมเทียบกับกล้วยไม้สกุลหวายปกติ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของกิจกรรมทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน *CPACO* โดยเทคนิค antisense ที่มีต่อพืชปลูกตามหลังและที่มีต่อประชากรจุลินทรีย์รื้อรอบราก เปรียบเทียบกับผลการศึกษาในกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบโครมาโทแกรมสารประกอบฟีนอลิกในกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน *CPACO* โดยเทคนิค antisense เปรียบเทียบกับผลการศึกษาในกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

การตรวจเอกสาร

1. พืชดัดแปลงพันธุกรรม (GM plant)

สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม หมายถึง สิ่งมีชีวิตที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม ที่เรียกว่า ดีเอ็นเอ ซึ่งไม่ได้เกิดขึ้นตามธรรมชาติ แต่เป็นฝีมือมนุษย์ที่ได้ใช้เทคโนโลยีชีวภาพ สมัยใหม่ไปเลือกยีน (genes) ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น แล้วนำมาใส่เข้าไปใน สิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง โดยที่สิ่งมีชีวิตทั้งสองอย่างนี้ไม่จำเป็นต้องเป็นชนิดเดียวกัน (ประธาน, 2543) ซึ่งพืชดัดแปลงพันธุกรรม หรือพืชจีเอ็ม (Genetically Modified Plant: GM plant) คือ พืชที่ได้รับการ ดัดแปลงหรือการตัดต่อยีนที่มาจากสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์หรือใกล้เคียงกันเข้าสู่พืชด้วยกระบวนการ พันธุวิศวกรรม เพื่อให้ได้พืชที่มีลักษณะตรงตามความต้องการหรือมีลักษณะพิเศษ (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และ สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2548) เช่น ข้าวโพดต้านทานหนอนเจาะลำต้น ถั่วเหลืองต้านทานสารกำจัดวัชพืช ฝ้ายต้านทาน หนอนเจาะสมอฝ้าย ข้าวสีทองวิตามินเอสูง เป็นต้น

พืชดัดแปลงพันธุกรรมมีการผลิตเชิงพาณิชย์ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1996 และ James (2013) ผู้ก่อตั้งและประธานคณะกรรมการบริหารองค์กรไอซ่า (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications: ISAAA) รายงานว่า ปัจจุบันมีจำนวนพื้นที่ปลูกและชนิดของพืช ดัดแปลงพันธุกรรมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง สะท้อนให้เห็นถึงความก้าวหน้าและประโยชน์ของพืช ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีต่อประสิทธิภาพการผลิต สิ่งแวดล้อม สุขภาพ และสังคม ที่ได้รับการยอมรับ จากเกษตรกร ผู้บริโภคและสังคม ทั้งในประเทศอุตสาหกรรมและประเทศกำลังพัฒนา การเพิ่มขึ้น ของพื้นที่ปลูกดังกล่าวนี้จะเป็นแนวทางสำคัญที่มีผลต่อการใช้และการยอมรับพืชดัดแปลง พันธุกรรมทั่วโลกในอนาคต อย่างไรก็ตาม การใช้ประโยชน์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรมนี้ ผู้บริโภค บางส่วนยังคงมีความกังวลถึงความปลอดภัยของพืชดังกล่าว ส่งผลให้เกิดงานวิจัยจำนวนมาก เพื่อ พิสูจน์ความปลอดภัยของพืชดัดแปลงพันธุกรรม

ในปัจจุบันได้มีการดัดแปลงพันธุกรรมของพืชหลายชนิด ซึ่งมีทั้งที่เป็นพืชอาหารและไม่ใช่อาหาร เช่น การสร้างพืชที่ผลิตผลสุกแก่ช้า ซึ่งพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่สร้างขึ้นจะมีกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการสุกแก่เกิดขึ้นช้าลง หยุดลง หรือมีการสังเคราะห์สารเคมีบางชนิดมาชะลอกระบวนการสุกแก่ ทำให้ผลไม้สุกช้าลง ดอกไม้เหี่ยวช้าลง หรือผลไม้สุกแต่ไม่เน่า ลักษณะผลิตผลดังกล่าวทำให้เกษตรกรหรือผู้ค้าสามารถควบคุมปริมาณ

ผลผลิตที่จะออกสู่ตลาด ซึ่งทำให้ราคาผลิตผลมีเสถียรภาพมากขึ้น ตัวอย่างของพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่วางตลาดแล้ว ได้แก่ คาร์เนชั่น เมลอน มะเขือเทศ (สมจินต์, ม.ป.ป.) เป็นต้น

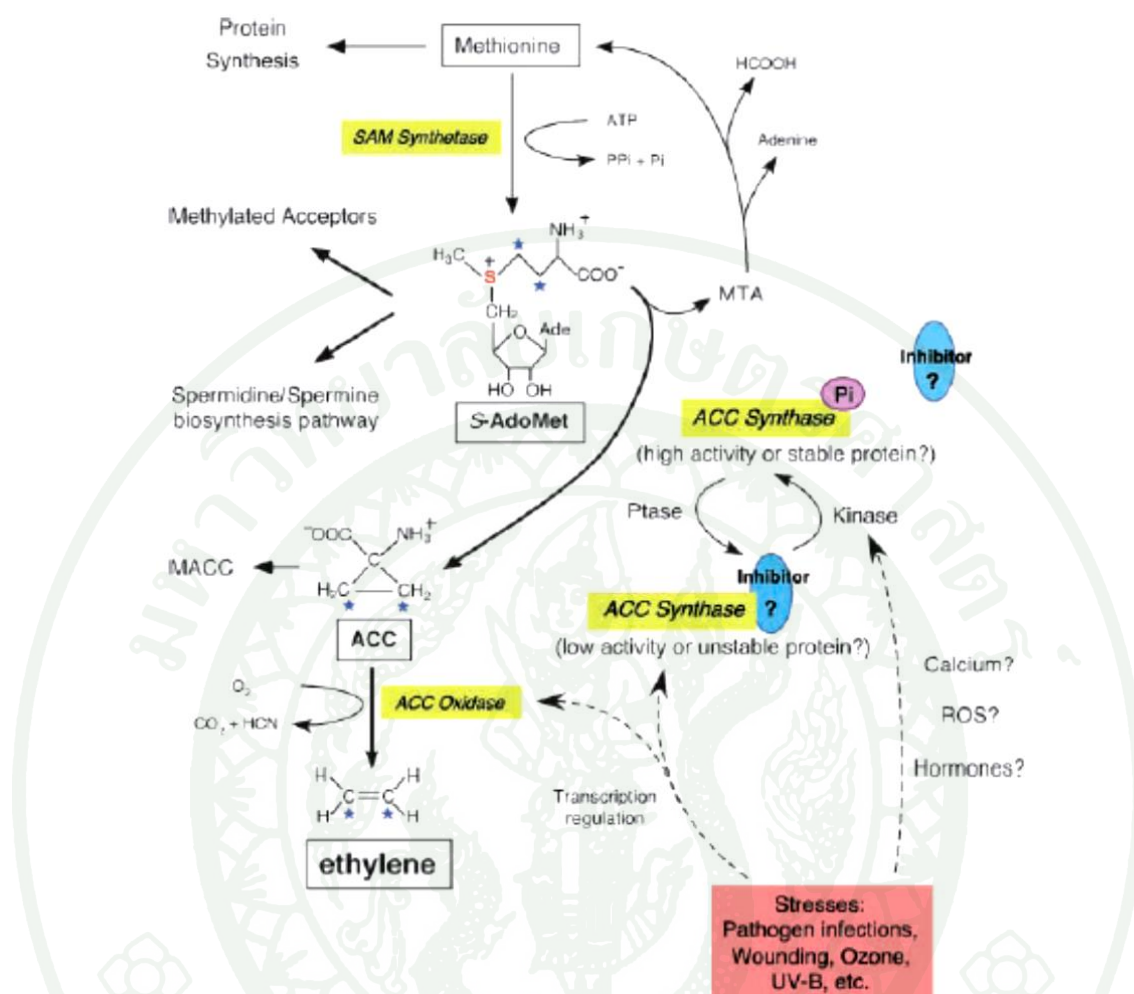
2. กล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุกรรม

กล้วยไม้จัดเป็นพืชที่มีความสำคัญอันดับหนึ่งของสินค้าประเภทไม้ดอกไม้ประดับของไทย ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่ใหญ่ที่สุดในทวีปเอเชีย ซึ่งประกอบด้วยกล้วยไม้สกุลหวาย แวนด้า แคทลียา ม็อคคาร่า รongเท้ารี ตลอดจนกล้วยไม้พื้นเมืองชนิดต่างๆ ทั้งที่มีการค้าขายและการส่งออกกล้วยไม้ในรูปกล้วยไม้ตัดดอก ต้นและต้นกล้าในสภาพปลอดเชื้อ และผลิตภัณฑ์จากดอกกล้วยไม้ โดยมีแนวโน้มการส่งออกเพิ่มขึ้นน่ายินดีเข้าประเทศเป็นอย่างมาก ทำให้มีการพัฒนาพันธุ์ให้ได้พันธุ์ใหม่ที่หลากหลายเป็นที่พอใจของผู้บริโภค ปัจจุบันจึงมีการสนับสนุนการวิจัยกล้วยไม้ในด้านต่างๆ เพื่อแก้ปัญหาการปลูกเลี้ยงและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเพื่อให้ได้กล้วยไม้ที่มีคุณภาพและมาตรฐานตรงกับความต้องการของตลาด

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย แหล่งปลูกเลี้ยงที่สำคัญ ได้แก่ กรุงเทพมหานคร สมุทรสาคร นครปฐม นนทบุรี และราชบุรี เป็นต้น ในธุรกิจการค้าขายไม้ดอกไม้ประดับในตลาดโลกนั้น มาตรฐานและคุณภาพของดอกไม้เป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องพิจารณาเป็นอันดับแรก เพราะเปรียบเสมือนเครื่องหมายรับประกันสินค้าที่สร้างความพึงพอใจและความมั่นใจแก่ผู้บริโภค ซึ่งข้อสำคัญคือ อายุการใช้งาน หรืออายุการปักแจกันที่เหมาะสม ซึ่งรักชนก (2549) ได้ถ่ายยีน *ACC oxidase (ACO)* โดยเทคนิค antisense โดยใช้ยีน *ACO* ที่ได้จากมะละกอ เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายตัดดอกสายพันธุ์ที่นิยมทางการค้า 2 สายพันธุ์ คือ โซเนีย ‘บอม 17’ และ โซเนีย ‘เอียสกุล’ โดยยีน *ACO* นี้เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *ACC oxidase* ที่ใช้ในการผลิตเอทิลีน (ภาพที่ 1) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญต่อคุณภาพดอกไม้ ผลของฮอร์โมนมีส่วนสำคัญที่เร่งให้ดอกไม้เสื่อมสภาพเร็ว การถ่ายยีน *ACO* แบบ antisense มีผลทำให้กล้วยไม้ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีนมีการผลิตเอทิลีนลดลง เนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์ *ACC oxidase* ต่ำกว่ากล้วยไม้ปกติ

ต่อมา ปิยนุช (2553) ได้ศึกษาต่อเนื่องถึงการคงอยู่ของยีนและลักษณะทางสรีระของกล้วยไม้สกุลหวาย 2 สายพันธุ์ดังกล่าว เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า จากการใช้เทคนิค polymerase chain reaction แสดงผลการคงอยู่ของยีน antisense *CPACO* ในสายต้นต่างๆ จำนวน 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสุ่มบางสายต้นมาตรวจสอบด้วย

เทคนิค Southern hybridization สามารถยืนยันผลการคงอยู่ของยีนได้ และจากการศึกษาในเบื้องต้นถึงการแสดงออกของยีนดังกล่าว พบว่ามีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACO และกล้วยไม้ไม่มีการสร้างเอทิลีนต่ำกว่าปกติ ทำให้ดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* มีอายุการปักแจกันนานขึ้นประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน สำหรับลักษณะทางสรีระพบว่า กล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* มีการเจริญเติบโตในภาพรวมทั้งทางด้าน จำนวนใบ ความสูงลำลูกกล้วย ความกว้างลำลูกกล้วย และจำนวนลำต้อออกใกล้เคียงกับกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จากงานวิจัยที่ต่อเนื่องจากรักชนก (2549) และปิยนุช (2553) ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สามารถคัดเลือกสายต้นกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวนสายพันธุ์ละ 4 สายต้น เพื่อนำออกปลูกในโรงเรือนชีวนิรภัย ซึ่งเป็นสายต้นที่นำมาใช้ในการประเมินอัลลีโลพาตีในงานวิจัยนี้



ภาพที่ 1 กลไกการสังเคราะห์และการควบคุมการสร้างเอทิลีน

ที่มา: Kevin *et al.* (2002)

3. ความปลอดภัยทางชีวภาพ (Biosafety)

ปัจจุบัน เทคโนโลยีการดัดแปลงพันธุกรรมมีบทบาทในการวิจัยและพัฒนาอย่างมาก หน่วยงานหลายแห่งทั้งภาครัฐและเอกชน มีการดำเนินงานเกี่ยวกับการวิจัยและการพัฒนา เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่หรือพันธุวิศวกรรม เพื่อใช้ประโยชน์ทั้งด้านเกษตรกรรม การแพทย์และ สาธารณสุข การอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม และการพัฒนาอุตสาหกรรม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต ให้มีต้นทุนการผลิตต่ำลง ขณะที่ผลผลิตสูง หรือเกิดประโยชน์คุ้มค่ามากขึ้น

ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพเกี่ยวกับการตัดต่อยีนในสิ่งมีชีวิต ได้ก่อให้เกิด ประโยชน์แก่มนุษย์อย่างมาก แต่ก็อาจส่งผลกระทบต่อมนุษย์ สัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อมโดยรวมได้ ด้วย ผู้บริโภคจึงเกิดความกังวลต่อการใช้ประโยชน์สิ่งมีชีวิตตัดต่อพันธุกรรม ข้อกังวลที่มี เช่น เสถียรภาพของยีน แหล่งยีนที่นำมาจากจุลินทรีย์ที่อาจมีโอกาสดกลายพันธุ์เป็นยีนก่อโรค ยีนที่มี โอกาสหลุดไปสู่พืชหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ ได้ ด้วยเหตุนี้ มาตรการที่ใช้ในการดูแลความปลอดภัยในการดำเนินงานด้านพันธุวิศวกรรม หรือ มาตรการด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosafety) จึงเป็นสิ่งสำคัญ

การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรมจึงเป็นแนวความคิดใน การพิจารณาผลกระทบและประเมินความเสี่ยง หรืออันตรายต่อความปลอดภัยของสุขภาพมนุษย์ และความหลากหลายทางชีวภาพอันอาจเกิดในการวิจัยและพัฒนา การเคลื่อนย้าย การจัดการ และ การใช้ประโยชน์สิ่งมีชีวิตที่ได้รับการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม (genetically modified organisms: GMOs) (สุทัศน์, 2542)

ดังนั้น งานวิจัยทางพันธุวิศวกรรมและสิ่งมีชีวิตที่มีการตัดต่อยีน จึงต้องผ่านการทดสอบ ความปลอดภัยทางชีวภาพ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับภาคสนามอย่างละเอียดถี่ถ้วน เพื่อ สร้างความเข้าใจที่ถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์และสามารถอธิบายให้สาธารณชนยอมรับได้ ก่อนที่ จะมีการอนุญาตให้นำมาใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะการประเมินความปลอดภัยที่เกี่ยวกับสุขภาพ อนามัยของมนุษย์และสัตว์ที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม (คณะกรรมการ เทคนิคด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ, 2556)

ในกรณีของการประเมินผลกระทบของพืชดัดแปลงพันธุกรรมต่อสิ่งแวดล้อมนั้น ในการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรม มักมีข้อกังวลถึงความปลอดภัยและผลที่จะเกิดกับสิ่งแวดล้อม รวมทั้งผู้บริโภคบางกลุ่มมีความเชื่อว่าเป็นสิ่งอันตราย ทำให้มีกลุ่มต่อต้านการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรม สำหรับประเทศไทยนั้นมีการศึกษาเกี่ยวกับพืชดัดแปลงพันธุกรรมหลายชนิด แต่ในขณะนี้ไม่มีเพียงนโยบายให้ทำการทดลองในระดับโรงเรือนได้แต่ยังไม่อนุญาตให้ปลูกเป็นการค้า และหากนำเข้าเมล็ดพันธุ์ต้องมีการรับรองเรื่องสุขภาพ แต่ในอนาคตประเทศไทยอาจไม่สามารถหลีกเลี่ยงพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้ ซึ่งแรงกดดันระหว่างประเทศจะทำให้ประเทศไทยต้องตัดสินใจ แต่ก่อนที่จะถึงจุดนั้นต้องมีความชัดเจนในเรื่องของศักยภาพบุคลากรภาครัฐและภาคเอกชนที่จะคุ้มครองสุขภาพและสิ่งแวดล้อมในเรื่องที่เกี่ยวกับพืชดัดแปลงพันธุกรรม ศักยภาพของไทยในการพัฒนาพืชดัดแปลงพันธุกรรม ระบบการคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาที่ไม่ทำให้เกิดการผูกขาดพันธุ์พืชดัดแปลงพันธุกรรม และระบบคุ้มครองการแพร่กระจายของพืชดัดแปลงพันธุกรรมตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงความปลอดภัยทางชีวภาพ ซึ่งหมายถึงการประเมินและบริหารจัดการพืชดัดแปลงพันธุกรรมไม่ให้เกิดความเสียหายต่อระบบเกษตรกรรม (ศิริลักษณ์, 2552)

Rieger *et al.* (1999) ได้เสนอแนวทาง การประเมินความเสี่ยงอันเกิดขึ้นได้จากพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยมุ่งไปที่ความเสี่ยงหลัก 4 ประการ ได้แก่

1. การที่พืชดัดแปลงพันธุกรรมอาจกลายเป็นวัชพืชที่สามารถบุกรุกพืชอื่นที่ขึ้นตามธรรมชาติ
2. การถ่ายเทของยีนข้ามระหว่างพืชดัดแปลงพันธุกรรมกับพืชธรรมชาติ
3. ความเสถียรในการแสดงออกของยีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรม
4. การที่ผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรมอาจก่อให้เกิดพิษหรืออาการแพ้ในมนุษย์และสัตว์ได้

Kowalchuk *et al.* (2003) ได้ให้ความเห็นว่า ผลกระทบของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่อาจมีต่อจุลินทรีย์ในดินนั้น อาจเกิดขึ้นใน 2 ลักษณะ คือ

1. พืชดัดแปลงพันธุกรรมอาจสร้างสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งอาจซึมผ่านทางราก แล้วส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในดิน

2. การดัดแปลงพันธุกรรมอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในดิน

ปัจจุบันในต่างประเทศมีการอนุญาตให้มีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมอย่างแพร่หลาย จึงมีผู้ให้ความสนใจศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบจากการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการถ่ายทอดยีนสู่สิ่งแวดล้อมหรือผลกระทบอื่นที่มีต่อระบบนิเวศ และความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ โดยเปรียบเทียบกับพืชปลูกสายพันธุ์ปกติทั่วไป (Conner *et al.*, 2003) การประเมินโอกาสที่จะเกิดความเสี่ยง เพื่อนำไปใช้ในการจัดการป้องกันผลกระทบทั้งสองด้าน ซึ่งการประเมินความเสี่ยงที่เกิดขึ้นควรทำการประเมินในหลายๆ ด้าน (Kaplan and Garrick, 1981) ซึ่งมีรายงานการศึกษาวิจัยเพื่อประเมินว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรมไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยเทคนิคการประเมินอัลลีโลพาตี เช่น งานวิจัยในยุคาลิปดัส (Kikuchi *et al.*, 2009) และกุหลาบ (Nakamura *et al.*, 2011)

4. อัลลีโลพาตี (Allelopathy)

คำว่า อัลลีโลพาตี (allelopathy) มาจากรากศัพท์ภาษากรีก 2 คำ คือ alleon หมายถึงซึ่งกันและกัน และ pathos หมายถึงเดือดร้อนหรือทำให้เกิดอันตราย ปรากฏการณ์อัลลีโลพาตี เป็นปฏิกิริยาทางชีวเคมีของพืชและจุลินทรีย์ มีผลทั้งในด้านการยับยั้งและการกระตุ้นปฏิกิริยาทางเคมีทำให้เกิดผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของพืชและจุลินทรีย์ (Rice, 1984) Putnam (1985) ได้อธิบายความหมายของอัลลีโลพาตีว่าเป็นผลกระทบของพืชชั้นสูงชนิดหนึ่งที่มีผลต่อการงอก การเจริญเติบโตและการพัฒนาการของพืชอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งอาจจะส่งผลดีในด้านการกระตุ้นหรือส่งผลเสียในด้านการยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของพืชชนิดอื่น รวมทั้งจุลินทรีย์ และ Joungh and Chung (2000) เรียกสารเคมีที่พืชปลดปล่อยออกมาและแสดงฤทธิ์อัลลีโลพาตีว่า สารอัลลีโลเคมีคอล (allelochemical) หรือ สารอัลลีโลพาติก (allelopathic compound) ต่อมา Fitter (2003) และ Inderjit and Duke (2003) ได้เพิ่มความหมายของอัลลีโลพาตีว่า คือ กลไกการควบคุมการอยู่

รอดหรือการตาย โดยสารอัลลิโลพาติกที่ปลดปล่อยออกมาจากพืชมีผลต่อสังคมพืช และมีบทบาทสำคัญในธรรมชาติและในการจัดการระบบนิเวศ และสมาคมอัลลิโลพาทีนานาชาติ (International Allelopathy Society: IAS) ให้ความหมายของอัลลิโลพาทีว่าเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่พืช สหรัย รา และแบคทีเรียสร้างขึ้น แล้วสารเหล่านั้นมีผลต่อระบบชีววิทยาและการเกษตร (จรรยา, 2544)

สมชาติ (2542) รายงานว่า ในพืชต่างชนิดกันจะสร้างสารอัลลิโลพาติกที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ในเนื้อเยื่อพืชและส่วนของพืชที่ต่างกัน จะสร้างสารอัลลิโลพาติกในปริมาณที่ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางด้านพืช ดิน และสภาพแวดล้อม ปรากฏการณ์อัลลิโลพาทีสามารถพบได้ทั่วไปโดยเฉพาะระบบนิเวศการเกษตร ซึ่งเป็นระบบนิเวศที่มีการศึกษาถึงผลทางอัลลิโลพาทีกันอย่างกว้างขวาง เช่น อัลลิโลพาทีต่อพืชปลูก วัชพืช และจุลินทรีย์ เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการระบบการเกษตร ช่วยให้ได้ผลผลิตมากขึ้น ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และนำไปสู่การพัฒนาทางการเกษตรแบบยั่งยืนต่อไป (Duke and Lydon, 1993)

5. การปลดปล่อยสารอัลลิโลพาติกจากพืช

การปลดปล่อยสารอัลลิโลพาติกจากพืชออกสู่สิ่งแวดล้อมมีหลายวิธีการ ได้แก่

5.1 การระเหย (volatilization) สารอัลลิโลพาติกที่พืชสร้างขึ้นจะระเหยออกมาจากส่วนต่างๆ ของพืชสู่บรรยากาศ แล้วไปมีผลกระทบต่อพืชอื่นๆ เช่น สารกลุ่มเทอร์พีน (terpene) จาก *Salvia leucophylla* และสารเทอร์พีนอยด์จาก *Artemisia californica* ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้หลายชนิด (Rice, 1984) และจากการศึกษาในพืชบลูฮาวาย (*Otacanthus* spp.) พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชนี้ประกอบด้วยสารในกลุ่ม monoterpenoids และ sesquiterpenoids ซึ่งอยู่ในกลุ่มสาร terpenoid ที่จัดเป็นกลุ่มของสารอัลลิโลพาติกนั้น ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืช (Ronse et al., 1997)

5.2 การปลดปล่อยทางราก (exudation from roots) พืชสามารถปลดปล่อยสารอัลลิโลพาติกออกจากรากสู่สิ่งแวดล้อม และสารเหล่านี้อาจไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชชนิดอื่น เช่น ข้าว (*Oryza sativa*) สามารถปลดปล่อยสาร momilactone B ออกมาทางรากและส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและลำต้นของเมล็ด cress (*Lepidium sativum* L.) นอกจากนี้สาร

momilactone B ยังส่งผลต่อการพักตัวของเมล็ด ชัยยังการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าพืชที่อยู่ใกล้เคียงอีกด้วย (Kato-Noguchi, 2003)

5.3 การชะล้าง (leaching) เกิดจากผลการชะล้างโดยหมอก น้ำฝนหรือน้ำค้าง ทำให้สารที่ละลายน้ำได้จากส่วนของต้นพืชละลายลงดิน การชะล้างเกิดได้จากหลายส่วน เช่น ใบสด ราก หรือแม้กระทั่งส่วนของซากที่อยู่ในดิน เช่น มีรายงานว่าน้ำชะล้างจากราก *Chenopodium murale* ที่สะสมอยู่บริเวณดินมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของลำต้นข้าว (Inderjit and Duke, 2003)

5.4 การสลายตัวของซากพืช (decomposition of plant residue) เป็นการปลดปล่อยสารออกจากส่วนต่างๆ ของพืชที่ร่วงหล่นลงบนพื้นดิน หรือทับถมในดินจนเกิดการเน่าเปื่อยตามธรรมชาติ หรือถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในดินในสภาพที่มีออกซิเจน ทำให้ปลดปล่อยสารอัลลีโลพาติกออกมาหลายชนิด และส่งผลกระทบต่อพืชชนิดอื่นทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น การสลายตัวของรากอัลฟัลฟา (*Medicago sativa* L.) มีผลทำให้การพัฒนาของเมล็ดหญ้าคาลดลง (Abdul-Rahman and Habib, 2005)

6. ผลกระทบของสารอัลลีโลพาติก

ผลของสารอัลลีโลพาติกนั้นอาจเกิดจากผลรวมของสารหลายชนิดทำปฏิกิริยาร่วมกัน มีผลกระทบต่อกระบวนการหนึ่ง หรือหลายกระบวนการในลักษณะพร้อมๆ หรือต่อเนื่องกัน ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการต่างๆ ในพืช ได้แก่ การแบ่งตัวและการขยายขนาดของเซลล์ การทำงานของฮอร์โมน การดูดซึมธาตุอาหารของพืช การสังเคราะห์แสงและกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการหายใจ การสังเคราะห์โปรตีน ความสามารถในการยอมให้สารซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (permeability) การสังเคราะห์ leghaemoglobin และการตรึงไนโตรเจน (Rizvi and Rizvi, 1992)

เมื่อสารอัลลีโลพาติกถูกปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชอื่นได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ผลกระทบทางตรงจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึม (metabolism) ของพืช ส่วนผลกระทบทางอ้อมจะเป็นผลที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดิน ความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหาร การเปลี่ยนแปลงประชากรและกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตในดิน ทั้งที่เป็นอันตรายและเป็นประโยชน์ (Rizvi and Rizvi, 1992)

ดวงพร (2543) อธิบายถึงผลกระทบของอัลลีโลพาทีว่ามี 2 ระดับ คือ

1. ระดับปฐมภูมิ เกิดจากเศษซากพืชที่มีสารพิษถูกย่อยสลายหรือถูกน้ำฝนชะ รวมทั้งสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างระหว่างการย่อยสลายเศษซากพืช แล้วมีผลต่อการเจริญของพืชอีกชนิดที่อยู่ในดินนั้น เช่น terpenes และ flavonoids ในต้น *Teucrium royleanum* (Baruah *et al.*, 1994) และ mycotoxins ซึ่งเป็นกลุ่มสารพิษที่สร้างขึ้นจากเชื้อรา (Mizutani, 1989) เป็นต้น

2. ระดับทุติยภูมิ เกิดจากการที่พืชสร้างและปลดปล่อยสารพิษออกมาขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ ไม่รุนแรงเท่ากับสารพิษจากเศษซากพืช ผลกระทบที่เห็นชัดเจน เช่น การปล่อยสารพิษจากต้น *Juglans nigra* จะมีสารพิษที่ทำลายมะเขือเทศได้ (ชาญ, 2536) และดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) ซึ่งมีสารประกอบทางเคมีหลายชนิดที่แตกต่างกันตามส่วนต่างๆ ของพืช (Lorenzo *et al.*, 2002; Parejo *et al.*, 2005) และส่วนที่เป็นน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ซึ่งพบมากที่บริเวณใบและดอก (Soule, 1993) การสกัดสารจากส่วนต่างๆ ของดาวเรือง หรือการใช้ส่วนต่างๆ ของดาวเรืองโดยตรงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้วยกันหลายด้าน เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Tereschuk *et al.*, 1997) ใช้เป็นสารกำจัดแมลง (จรงค์ศักดิ์ และ มณฑิณี, 2555; Dharmagadda *et al.*, 2005) รวมถึงกำจัดวัชพืช จากการศึกษาของ Batish *et al.* (2007) พบว่า การใช้ใบแห้งของดาวเรือง (*T. minuta*) มีผลทำให้การงอกและการเติบโตของวัชพืชในแปลงนาข้าวลดลง เป็นต้น

7. วิธีการที่ใช้ในการศึกษาผลทางอัลลีโลพาที

การศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีในระดับห้องปฏิบัติการ มักใช้วิธีการทดสอบทางชีวภาพที่มีวัตถุประสงค์หลักในการทดสอบต่างกัน ดังนี้

7.1 การตรวจสอบผลทางอัลลีโลพาทีต่อพืชอื่น

7.1.1 การตรวจสอบโดยเทคนิค sandwich method

เทคนิค sandwich method เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Fujii (1994) เทคนิคนี้เป็นการทดสอบผลทางชีวภาพ เพื่อทดสอบกิจกรรมทางอัลลีโลพาทีของพืชในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการใช้สารสกัดจากตัวอย่างพืชหรือการใช้ชิ้นส่วนพืชขอบแห่งวางแทรกตรงกลางระหว่างชั้นอาหารวุ้น และวางเมล็ดพืชทดสอบ เช่น ผักกาดหอม บนผิวหน้าอาหารวุ้น บ่มไว้ในสภาพมืด แล้วตรวจสอบ

ผลการปลดปล่อยสารระเหยจากตัวอย่างพืชอย่างช้าๆ โดยเปรียบเทียบผลการเจริญเติบโตของต้นกล้าพืชทดสอบ ซึ่งอาจเป็นไปได้ทั้งด้านการยับยั้งหรือการส่งเสริมการเจริญเติบโต เทคนิค sandwich method นี้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบตัวอย่างพืชจำนวนมากได้ภายในระยะเวลาอันสั้น มีรายงานการทดสอบด้วยวิธีนี้ เช่น การทดสอบใน *Juglans nigra* L. (Jose and Gillespie, 1998) ใน *Eucalyptus camaldulensis* (Shiraishi *et al.*, 2002; Fujii *et al.*, 2003, 2004) และใน *Cucurbita pepo* L. cv. Scarletta (Qasem and Issa, 2010) เป็นต้น

7.1.2 การตรวจสอบโดยวิธี soil germination method

เทคนิค soil germination method เป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจในการประเมินผลทางอัลลีโลพาตีที่มีการปลดปล่อยออกจากรากพืช ซึ่งสามารถใช้สำหรับการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชคัดแปลงพันธุกรรมต่อการประเมินความเสี่ยงอันอาจเกิดขึ้นได้ต่อพืชปลูกตามหลังภายใต้สภาพโรงเรือน ซึ่งมีรายงานการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ เช่น การตรวจสอบใน *Eucalyptus camaldulensis* (Kikuchi *et al.*, 2009)

7.2 การตรวจสอบผลทางอัลลีโลพาตีต่อจุลินทรีย์รอบราก

เทคนิคการเพาะเชื้อและการนับจำนวนเซลล์ในจานเพาะเชื้อ (plate cultivation method หรือ plate count method) เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ตรวจสอบปริมาณประชากรจุลินทรีย์ที่อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากผลทางอัลลีโลพาตี วิธีนี้ใช้กันแพร่หลายสำหรับการนับเซลล์ที่ยังมีชีวิต โดยเฉพาะแบคทีเรีย ทำโดยการเพาะเชื้อแบบเซลล์แขวนลอยลงในจานอาหารวุ้นเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไปบ่มที่สภาพแวดล้อมและระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อตรวจสอบจำนวนโคโลนีจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น วิธีการที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เทคนิค pour plate ทำโดยการทำเชื้อให้เจือจางลงเรื่อยๆ และนำไปผสมกับวุ้นที่หลอมเหลวและเย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส ในจานอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเทคนิค spread plate ซึ่งทำโดยนำเชื้อที่เจือจางเหมาะสมแล้วมากระจายบนผิวอาหารแข็งด้วย spreader รูปตัว L เป็นต้น ปกติการนับจำนวนเซลล์มักรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น (Colony Forming Units: CFU) ต่อมิลลิลิตร มากกว่าที่จะบอกเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร (ดวงพร, 2545)

วิธีการนับจำนวนจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนโคโลนี มีพื้นฐานจากข้อสมมติ 3 อย่าง คือ เซลล์จุลินทรีย์หนึ่งเซลล์เจริญและแบ่งตัวเพื่อสร้างโคโลนีเดียว เชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น (original inoculum) มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) และไม่มีเซลล์ใดๆ ที่อยู่รวมกัน (no aggregate) วิธีนี้ทำง่าย นับจำนวนได้ดีแม้ว่าจะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์น้อย และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งจากตัวอย่างน้ำและดิน แต่ข้อจำกัดในการใช้ plate count method คือ ต้องคำนึงถึงอาหารที่ใช้ และสภาพแวดล้อมการบ่ม (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2548)

การนับเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารมีความสำคัญต่อความสำเร็จมาก คือ ต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ไม่มากหรือน้อยเกินไป โดยทั่วไปจะนับเฉพาะจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 20-200 โคโลนีเท่านั้น ดังนั้น เพื่อให้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารอยู่ในช่วงดังกล่าว ควรทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นหลายๆ ครั้ง โดยทั่วไปนิยมเจือจางโดยทำเป็นลำดับ (serial dilution) ลำดับละ 10 เท่า แล้วทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่แต่ละระดับการเจือจางลงบนจานอาหาร เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนจานอาหารแล้ว นับจำนวน และสามารถนำผลมาคำนวณหาจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่างได้ ทั้งนี้ การนับจำนวนเซลล์จะได้ผลดีเพียงใด ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การสุ่มเก็บตัวอย่าง ชนิดของแบคทีเรียและความสามารถที่จะเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเชื้อ จำนวนซ้ำของการทดลอง และความละเอียดรอบคอบในการตรวจนับ เป็นต้น (ศิริพรรณ, 2550)

สำหรับรายงานการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในดินนั้น สายพิน (2547) อธิบายว่า จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า เมื่อเจริญรวมกันเป็นกลุ่มเป็นก้อนหรือโคโลนีบนอาหารแข็งจึงจะสามารถมองเห็นได้ โดยหลักการถือว่า 1 โคโลนี เจริญมาจากจุลินทรีย์ 1 เซลล์ การนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารแข็ง เรียกว่า agar plate count method เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการหาปริมาณจุลินทรีย์ในดิน โดยนำสารสกัดจากดินตัวอย่างที่เป็นแหล่งอาศัยที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ดินมาเพาะเลี้ยงในปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสม เช่น ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาพแวดล้อมและระยะเวลาในการบ่มเชื้อ เป็นต้น

จุลินทรีย์ในดินมีปริมาณมาก ส่วนใหญ่มักจะเกาะอยู่กับอนุภาคดิน และมีหลายชนิดปะปนกัน จึงมักจะต้องทำให้ดินตัวอย่างเจือจางเป็นสารแขวนลอยและเกลี่ยให้กระจายอย่างสม่ำเสมอบนผิวหน้าอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เรียกว่า dilution plate method ชนิดและจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่นับได้จะแตกต่างกันไปตามปัจจัยที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ

จุลินทรีย์ที่นับได้มักจะต่ำกว่าที่เป็นจริง แต่วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่เจริญเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซีท เป็นต้น

แบคทีเรียในดินเป็นจุลินทรีย์พวกโปรคาริโอติกเซลล์ มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวขนาด 0.001 - 0.005 มิลลิเมตร ขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว ในดินที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียอาจพบถึง 10^7 เซลล์ต่อดินแห้ง 1 กรัม การหาปริมาณแบคทีเรียในดินทำได้โดยวิธี dilution plate method จากสารสกัดดินที่มีความเจือจางเหมาะสม แล้วเกลี่ยให้กระจายบนอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และบ่มในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียดิน นับปริมาณโคโลนีแบคทีเรียที่ตรวจสอบได้ (สายพิน, 2547)

ส่วนการตรวจสอบปริมาณเชื้อราในดิน ซึ่งจัดเป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอติกเซลล์ มีความแตกต่างกันมากในด้านรูปร่าง ขนาดโครงสร้างและการสืบพันธุ์ มีทั้งเป็นเซลล์เดี่ยวและหลายเซลล์ เชื้อราในดินพบทั้งที่เป็นสาย (mycelium) และในรูปของสปอร์ (spore) การหาปริมาณของเชื้อราใช้วิธีเช่นเดียวกับแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิค dilution plate method แต่ความต้องการปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อจะแตกต่างกัน คือ โคโลนีของเชื้อรามีขนาดใหญ่เจริญแผ่กว้างได้รวดเร็วมก และต้องการความชื้นมากกว่าแบคทีเรีย (สายพิน, 2547)

สำหรับการตรวจสอบปริมาณแอคติโนมัยซีทในดิน ซึ่งจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีลักษณะร่วมของแบคทีเรียและเชื้อรา เนื่องจากคุณสมบัติที่เป็นโปรคาริโอติกเซลล์ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 1 ไมครอน ขนาดโคโลนีใกล้เคียงกับแบคทีเรีย เส้นใยบางส่วนฝังอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เกาะกันแน่น สร้างสปอร์แห้งเป็นฝุ่นคล้ายแป้งอยู่บนโคโลนี สำหรับการตรวจสอบปริมาณของแอคติโนมัยซีทสามารถใช้วิธีเช่นเดียวกับแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิค dilution plate method ดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น (สายพิน, 2547)

การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ดินในกรณีของการปลูกพืชตัดแปลงพันธุกรรมนั้น ส่วนใหญ่แล้วการประเมินความเสี่ยงของการปลูกพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มีต่อโครงสร้างและหน้าที่ของประชากรจุลินทรีย์ดินเปรียบเทียบกับพืชปกติ มักจะเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์รอบรากพืช (rhizosphere microbes) ซึ่งอาจได้รับผลกระทบจากรากพืชโดยตรง โดยสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ จากรากพืช มีผลต่อการเจริญเติบโต โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดิน ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ดิน แสดงให้เห็นว่า สารประกอบอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมานั้นมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างรากพืชและ

จุลินทรีย์รอบรากพืช จากหลักการนี้จึงได้มีการนำมาใช้ศึกษาวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในดินที่มีการปลูกพืชตัดแปลงพันธุกรรมหลายรายงาน เช่น

Germida (n.d.) ทดสอบอิทธิพลของคาโนลาตัดแปลงพันธุกรรมที่อาจมีผลเกี่ยวข้องกับปริมาณประชากรจุลินทรีย์ดินและจุลินทรีย์ในรากพืช และส่งผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ดิน ซึ่งผลการทดลอง พบว่า คาโนลาตัดแปลงพันธุกรรมนี้มีผลเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นได้ในระยะเวลาชั่วคราวและมีความผันแปรได้ ทั้งนี้ ประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับดินและพืชนี้ไม่เพียงแต่ได้รับอิทธิพลจากชนิดพันธุ์พืชและการสอดแทรกยีนเข้าสู่ต้นพืช แต่ยังเกิดได้จากปัจจัยสภาพแวดล้อม เช่น สภาพพื้นที่แปลงปลูก และวันที่เก็บตัวอย่าง เป็นต้น

Siciliano and Germida (1999) แยกเชื้อและจำแนกลักษณะของแบคทีเรียในดินปลูกคาโนลา (*Brassica napus*) พบว่า องค์ประกอบของประชากรจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากคาโนลาพันธุ์ Quest ซึ่งเป็นคาโนลาตัดแปลงพันธุกรรมให้มีลักษณะต้านทานสารกำจัดวัชพืช basta มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ดั้งเดิม คือ *B. napus* พันธุ์ Excel และ *B. rapa* พันธุ์ Parkland และพบว่าการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางอนุกรมวิธานของประชากรจุลินทรีย์ดินรอบรากพืชด้วย

Dunfield and Germida (2001) ศึกษากลุ่มประชากรแบคทีเรียในรากคาโนลาตัดแปลงพันธุกรรม เพื่อยืนยันผลการศึกษาของ Siciliano and Germida อีกครั้ง พบว่า ประชากรแบคทีเรียในรากคาโนลาตัดแปลงพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืช basta ยังคงมีความแตกต่างกับประชากรแบคทีเรียในรากคาโนลาพันธุ์ดั้งเดิมทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *B. napus* พันธุ์ Excel และ *B. rapa* พันธุ์ Parkland

สำหรับการทดลองในประเทศไทย กษมา (2550) ศึกษาผลกระทบของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์เขกนวลที่ต้านทานโรคใบด่างวงแหวน ต่อกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบรากในสถานะโรงเรือน พบว่า ปริมาณและชนิดของเชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติไม่มีความแตกต่างกัน และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบโครงสร้างกลุ่มประชากรรอบรากตามคุณสมบัติทางสรีรวิทยา พบว่า กลุ่มประชากรแบคทีเรียที่อาศัยอยู่รอบรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติในแต่ละเดือนจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

8. การศึกษารูปแบบการสร้างสารอัลลิโลพาติกโดยเทคนิค HPLC

เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นวิธีการหนึ่งในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น เพื่อทดสอบกิจกรรมทางอัลลิโลพาติกของพืชในระดับห้องปฏิบัติการ โดยอาศัยการเปรียบเทียบลักษณะ โครมาโทแกรมของสารในตัวอย่างพืช ซึ่งวิธีนี้สามารถแสดงผลการตรวจสอบได้ดี มีความไวสูง มีความน่าเชื่อถือทั้งด้านการประเมินเชิงคุณภาพและการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารที่สนใจ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

เบญญา (2553) อธิบายว่า โดยหลักการแล้ว เครื่อง HPLC เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับการแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) กับ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับ mobile phase หรือ stationary phase สารประกอบตัวใดที่สามารถเข้ากันได้ดีกับ mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้เร็ว สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับ mobile phase หรือเข้ากันได้ดีกับ stationary phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้ช้า ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง สารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด สัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโทแกรม

เบญญา (2553) อธิบายว่า ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

1. mobile phase/solvent ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่เฟสอยู่กับที่ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งกระบวนการแยกจะเกิดขึ้นภายในคอลัมน์
2. pump ทำหน้าที่ ดึงตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ HPLC
3. injector/auto-sampler ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ HPLC

4. column ภายในบรรจุด้วยเฟสอยู่กับที่ มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล ทำให้เกิดกระบวนการแยกองค์ประกอบของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่กับเฟสอยู่กับที่

5. detector เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก

สำหรับรายงานการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น โดยวิธี HPLC นี้ ในกล้วยไม้ Tatsuzawa *et al.* (2005) ศึกษาการจำแนกและการกระจายสารกลุ่ม anthocyanins ในกล้วยไม้สกุลหวายชนิดต่างๆ (*Dendrobium* spp.) ด้วยเทคนิค HPLC และตรวจสอบที่ค่าการดูดกลืนแสง 530 นาโนเมตร พบการกระจายของรงควัตถุ anthocyanins เฉพาะในบางชนิด แต่ไม่พบใน *Den. affine*

Zhang *et al.* (2006) พัฒนาวิธีการวิเคราะห์สาร metabolite ที่อยู่ในกลุ่มอนุพันธ์ของ coumarin 3 ชนิด ใน *Dendrobium thyrsiflorum* โดยใช้เทคนิค HPLC-DAD ระบบ gradient ของ 0.5% acetic acid และ acetonitrile ซึ่งวิเคราะห์โดยเทียบค่า retention time และ spectrum กับสารมาตรฐาน พบว่า คุณภาพสารตัวอย่างขึ้นอยู่กับชนิดของส่วนที่นำมาตรวจสอบและการเก็บตัวอย่างที่ต่างกันจากสถานที่ต่างกัน ซึ่งพบว่าดอกมีปริมาณสารสูงสุด 94.8 มิลลิกรัมต่อกรัม ร่องลงมาคือ ใบ 32.7 มิลลิกรัมต่อกรัม ลำต้น 29.3 มิลลิกรัมต่อกรัม และราก 1.47 มิลลิกรัมต่อกรัม ดังนั้น ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน สภาพการปลูก และระยะเวลาการเก็บตัวอย่างเช่นกัน

Yang *et al.* (2006) วิเคราะห์สารประกอบฟีนอล 11 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย bibenzyls 5 ชนิด phenanthrenes 3 ชนิด และ fluorenenes 3 ชนิด ที่เป็นองค์ประกอบหลักในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* โดยใช้ HPLC-DAD ด้วยระบบ gradient ของ acetonitrile และ 0.01% trifluoroacetic acid พบว่า วิธีนี้สามารถแยกสารได้ดีที่ค่า retention time นาน 45 นาที จึงนำมาใช้ในการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลในกล้วยไม้ *Dendrobium* อีก 31 ชนิดที่มีสรรพคุณทางยา พบว่ามีความแตกต่างการกระจายฟีนอลและปริมาณความเข้มข้นในชนิดพันธุ์ที่ทดสอบ

นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เทคนิค HPLC ช่วยในการศึกษาองค์ประกอบของสารในพืชปกติเทียบกับพืชดัดแปลงพันธุกรรม เช่น Diogo *et al.* (2009) วิเคราะห์สารสกัดจากกระเม็ง

(*Eclipta alba*) โดยศึกษาสารสกัดจากกระเม็งตามธรรมชาติและกระเม็งดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ LBA 9402 เพื่อใช้ในการผลิตยาต้านเอนไซม์ phospholipases A₂ ในพืชมุข และด้านความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อของพืชมุข สารสกัดจากส่วนเหนือดินและส่วนรากกระเม็งตามธรรมชาติ และกระเม็งดัดแปลงพันธุกรรมถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จากการวิเคราะห์กระเม็งตามธรรมชาติ พบว่าส่วนเหนือดินมีสาร coumestan wedelolactone เข้มข้นสูง ขณะที่ส่วนรากพบสาร demethylwedelolactone เข้มข้นสูง สำหรับในต้นดัดแปลงพันธุกรรม ส่วนรากของ clone ที่ 19 มีความเข้มข้นของ coumestan สูงกว่าส่วนอื่น

9. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาผลทางอัลลิโอฟาตี

แม้ว่าการศึกษาผลทางอัลลิโอฟาตีในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธีการทดสอบต่างๆ กัน จะมีความยากในการตรวจสอบหรือศึกษา เนื่องจากพืชต้องเจริญเติบโตด้วยกัน และยากที่จะแยกระหว่างการตอบสนองที่เกิดจากการแข่งขันและการตอบสนองที่เกิดโดยอัลลิโอฟาตีได้ แต่ก็เป็นที่ที่น่าสนใจและมีผลการศึกษาค้นคว้ากันอย่างกว้างขวาง เช่น

Fujii *et al.* (2003) ตรวจสอบผลของกิจกรรมทางอัลลิโอฟาตีในตัวอย่างพืชที่มีสรรพคุณทางยา 239 ชนิด โดยใช้วิธี sandwich method ซึ่งวิธีนี้มีประโยชน์สำหรับการตรวจสอบตัวอย่างพืชจำนวนมากในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากพืชมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ คือ ผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L. Great Lakes 366) โดยสารสกัดจากพืช 223 ชนิด มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของรากผักกาดหอม ซึ่งพืชวงศ์ Annonaceae Euphorbiaceae Guttiferae Leguminosae และ Myrtaceae สามารถยับยั้งการเจริญของรากผักกาดหอมมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจากพืช 17 ชนิด กลับมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากผักกาดหอม และเมื่อใช้สารสกัดจากตัวอย่างพืชน้ำหนัก 50 มิลลิกรัม พบว่าพืชวงศ์ Leguminosae และ Myrtaceae ยับยั้งการเจริญของรากผักกาดหอมได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์

Anjum *et al.* (2010) ได้ทำการประเมินกิจกรรมทางอัลลิโอฟาตีของพืชที่ใช้ทางการแพทย์ โดยใช้เทคนิค sandwich method และใช้ผักกาดหอมเป็นพืชทดสอบ ซึ่งมีการประเมินผลทั้งด้านการยับยั้งและการกระตุ้นอัตราการงอกของเมล็ด การเจริญเติบโตทางยอดและราก ผลการทดลองพบว่า ส่วนของใบมีผลยับยั้งและกระตุ้นการเจริญของผักกาดหอมได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่นำมาตรวจสอบ โดยเฉพาะ *Albizia lebbek* และ *Broussonetia papyrifera* พบว่า มีผลยับยั้งการเจริญทางยอดและรากของผักกาดหอมได้มากกว่าพืชชนิดอื่นๆ

Pukclai and Kato-Noguchi (2010) ศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีของพืชที่มีสรรพคุณเป็นสมุนไพรไทย 11 ชนิดต่อการเจริญของต้นกล้าพืชทดสอบ 5 ชนิด คือ cress (*Lepidium sativum* L.) ผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L.) ถั่ว alfalfa (*Medicago sativa* L.) หญ้า timothy (*Phleum pratense* L.) และหญ้าปล้องข้าวนก (*Digitaria sanguinalis* L.) โดยใช้เทคนิค bioassay พบว่า น้ำสกัดจากพืชนั้นมีผลยับยั้งการเจริญด้านความยาวของรากและยอดต้นกล้าพืชทดสอบทุกชนิดแตกต่างกัน โดยกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa*) มีผลการยับยั้งการเจริญของต้นกล้า cress และถั่ว alfalfa สูงสุด ส่วนชะพลู (*Piper samentosum*) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) และบอระเพ็ด (*Tinospora tuberculata*) มีแนวโน้มทางอัลลีโลพาทีที่ยับยั้งการเจริญของผักกาดหอมสูงสุด รองลงมาคือ ยับยั้งการเจริญของหญ้า timothy และหญ้าปล้องข้าวนก ตามลำดับ ดังนั้น ผลการยับยั้งทางอัลลีโลพาทีของพืชสมุนไพรไทยจึงขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์พืชทดสอบ ซึ่งมีผลดีสำหรับการแยกและการจัดจำแนกชนิดสารอัลลีโลพาติกต่อไป

Ahmad *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีของ *Teucrium royleanum* โดยทดสอบการยับยั้งการเจริญของเมล็ดผักกาดหอมด้วยเทคนิค sandwich method และใช้เทคนิค dish pack method เพื่อการประเมินน้ำมันหอมระเหย ผลการทดลองพบว่า สารทุติยภูมิจากต้น *T. royleanum* มีคุณสมบัติทางอัลลีโลพาที มีความเป็นพิษต่อพืช และสามารถใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสารกำจัดวัชพืชได้

Morikawa *et al.* (2012) ได้ศึกษากิจกรรมทางอัลลีโลพาทีของพืชพื้นเมืองในประเทศเปรู 170 ชนิด โดยใช้วิธี sandwich method พบว่า พืชบางชนิดมีผลการยับยั้งการเจริญเติบโตสูง เช่น *Aristeguietia ballii*, *Diplostephium foliosissimum* (Asteraceae) และ *Spondias mombin* (Anacardiaceae) โดยมีผลยับยั้งการเจริญของรากต้นกล้าผักกาดหอมมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีในพืชตัดแปลงพันธุกรรมนั้นมีรายงานค่อนข้างน้อย โดย Taniguchi *et al.* (2008) ทำการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของต้นปอปลาร์ (*Liriodendron tulipifera*) ตัดแปลงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณเซลลูโลสในลำต้น พบว่า ต้นปอปลาร์ตัดแปลงพันธุกรรมมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าต้นปอปลาร์พันธุ์ปกติ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจน ส่วนการประเมินกิจกรรมทางอัลลีโลพาที พบว่า ต้นปอปลาร์ตัดแปลงพันธุกรรมไม่มีการผลิตสารอัลลีโลพาติกที่เป็นอันตราย และจากการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพทั้งหมดสรุปได้ว่า ต้นปอปลาร์ตัดแปลงพันธุกรรมไม่มีผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพ

Kikuchi *et al.* (2009) ทำการทดสอบผลทางอัลลีโลพาทีในยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน *CodA* เพื่อตรวจสอบความปลอดภัยทางชีวภาพ โดย 4 วิธีการ คือ sandwich bioassay, soil germination, gas chromatography เพื่อศึกษาสารระเหยในพืช และ high performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อศึกษา phenolic compounds จากใบพืช ผลจากการตรวจสอบทั้ง 4 วิธี พบว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างพืชตัดแปลงพันธุกรรมและพืชปกติ

นอกจากนี้ Nakamura *et al.* (2011) ทำการประเมินความเสี่ยงด้านสิ่งแวดล้อมของกุหลาบตัดแปลงพันธุกรรม เพื่อการผลิต delphinidin เปรียบเทียบกับกุหลาบพันธุ์ปกติที่ไม่ได้รับการตัดแปลงพันธุกรรม โดยศึกษาในกุหลาบ (*Rosa hybrida*) 2 สายพันธุ์ ที่มีอยู่ทั้งในประเทศญี่ปุ่นและออสเตรเลีย ซึ่งมีการปรับเปลี่ยนยีนดอกให้มียีนแอนโทไซยานินสูงด้วยยีน *flavonoid 3',5'-hydroxylase* จากต้นไวโอเล็ต (*Viola tricolor*) และยีน *anthocyanin 5-acyltransferase* จากต้นแวมยูรา (*Torenia fournieri*) ผลการทดลองตรวจสอบการผลิตสารอัลลีโลพาติกในกุหลาบตัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธีทางชีวภาพ คือ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นที่อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตบริเวณใกล้เคียง อาจโดยการยับยั้งการงอกของเมล็ดพืช หรือมีผลเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ ซึ่งการศึกษาเปรียบเทียบนี้ทำโดยการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ดิน และการเจริญของพืชทดสอบ พบว่า ต้นกุหลาบตัดแปลงพันธุกรรมไม่มีการผลิตสารอัลลีโลพาติก และพบว่าต้นกุหลาบป่าพันธุ์พื้นเมืองของประเทศญี่ปุ่นมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับกุหลาบตัดแปลงพันธุกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

1.1 กล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 2 สายพันธุ์ ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์ควบคุม คือ

กล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย ‘บอม17’ (*Dendrobium Sonia* ‘Bom 17’)

กล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย ‘เอียสกุล’ (*Dendrobium Sonia* ‘Earsakul’)

1.2 กล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรม 2 สายพันธุ์ ซึ่งเกิดจากการถ่ายยีน antisense *CPACO* จากมะละกอ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เป็นพาหะ ที่ได้จากงานวิจัยของรักชนก (2549) สายพันธุ์ละ 4 สายต้น คือ

กล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย ‘บอม17’ (*Dendrobium Sonia* ‘Bom 17’) จำนวน 4 สายต้น ซึ่งได้รับการถ่ายยีน ดังนี้

- สายต้น AB1 และ สายต้น AB2 ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ pCAMBIA 1301a*ACO1* ที่มี ยีน *ACO1* วางตัวแบบ antisense

- สายต้น AB3 และ สายต้น AB4 ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ pCAMBIA 13121a*ACO2* ที่มี ยีน *ACO2* วางตัวแบบ antisense

กล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย ‘เอียสกุล’ (*Dendrobium Sonia* ‘Earsakul’) จำนวน 4 สายต้น ซึ่งได้รับการถ่ายยีน คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4 โดยใช้ pCAMBIA 1301a*ACO1* ที่มี ยีน *ACO1* วางตัวแบบ antisense

1.3 ผักกาดหอมที่ใช้ในการทดสอบ คือ เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม พันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ของ บริษัท เพื่อนเกษตรกร จำกัด

2. เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ในการเตรียมตัวอย่างพืช

2.1 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างพืช ได้แก่ ตะกร้า ถังพลาสติก กรรไกร เป็นต้น

2.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.3 ตู้อบความร้อน (Hot air oven, Memmert)

3. เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ในการเตรียมอาหารเพาะเมล็ดและอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

3.1 เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ปีกเกอร์ กระบอกตวง แท่งแก้วคนสาร ปิเปต ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ เป็นต้น

3.2 ตู้อบความร้อน (Hot air oven, Memmert)

3.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)

3.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave machine)

3.5 เครื่องกวนสารเคมี (Magnetic stirrer) พร้อมแท่งแม่เหล็ก

3.6 เตาไมโครเวฟ

3.7 จานอาหารพลาสติกสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ ขนาด 9 x 1.5 ตารางเซนติเมตร (Plastic Petri-dish, Sterilin)

3.8 จานเพาะเมล็ดชนิด multi-dish plate ขนาดหลุม 3.5 x 1.5 ตารางเซนติเมตร (Multi-dish plate, Costar)

4. เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

4.1 ตู้ย่ายเนื้อเยื่อ (Laminar flow cabinet)

4.2 มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว แท่งแก้วอเกลียสสาร และตะเกียงแอลกอฮอล์

4.3 ชั้นวางจานอาหารเพาะเชื้อและชิ้นส่วนพืช

4.4 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Air-conditioner)

4.5 ไมโครปิเปต ขนาดต่างๆ

5. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเมล็ด

5.1 จานเพาะเมล็ดชนิด multi-dish plate ขนาดหลุม 3.5 x 1.5 ตารางเซนติเมตร (Multi-dish plate, Costar)

5.2 กระถางพลาสติกทรงมาตรฐาน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว สำหรับการเพาะเมล็ดในโรงเรือนชีววิทย์

5.3 วัสดุปลูกกล้วยไม้ คือ กาบมะพร้าวที่ผ่านการใช้ปลูกกล้วยไม้สกุลหวายแต่ละสายพันธุ์มาแล้วเป็นระยะเวลานาน 1 ปี

5.4 วัสดุปลูกพักกาดหอม ได้แก่ ดินผสมทรายละเอียด เป็นต้น

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์สารอัลลีโลพาติก

6.1 อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการสกัดสารอัลลีโลพาติก ได้แก่

- อุปกรณ์บดตัวอย่างพืช ได้แก่ โกร่ง ช้อนตักสาร เป็นต้น
- เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ ปีกเกอร์ กรวยแก้ว กระบอกตวงสาร ขวดแก้วสีชาขนาด 10 มิลลิลิตร เป็นต้น
- เครื่อง sonicators (Ultra-sonic bath, Elma รุ่น Transsonic 460/H)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- เครื่องกวนตะกอน (Vortex)
- ตู้บ่ม (Incubater Shaker)
- ไมโครปิเปตขนาดต่างๆ

6.2 อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารอัลลีโลพาติก ได้แก่ แผ่นกรองชนิด nylon ขนาดช่อง 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร (สำหรับกรอง 0.01% trifluoroacetic acid) แผ่นกรองชนิด PTFE ขนาดช่อง 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 และ 47 มิลลิเมตร (สำหรับกรองสารสกัดตัวอย่างและ methanol ตามลำดับ), syringe holder, หลอดฉีดยา, ขวดแก้วเล็ก (vial) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร พร้อม septum และฝาปิด, insert vial ขนาด 1 มิลลิลิตร, ไมโครปิเปต ขนาด 1000 ไมโครลิตร ชุดเครื่องกรองสารละลายแบบสุญญากาศ

6.3 เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น Waters (Waters 2998 Photodiode Array Detector, Waters 600 Controller, Waters 717 Autosampler, Waters Associates, Harrow, UK USA) พร้อมขวดใส่สารละลายตัวพา และคอลัมน์ชนิด Luna 5U C18 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร และขนาดอนุภาคที่บรรจุ 5 ไมโครเมตร)

7. สารเคมี

7.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเมล็ดในการทดลอง sandwich method

7.2 สารเคมีและสารปฏิชีวนะสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ อาหาร PTYG (สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีท) อาหาร OGYE (สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อรา) (ภาคผนวก) สารปฏิชีวนะ Tetracycline

7.3 สารเคมีสำหรับการสกัดและการวิเคราะห์สารอัลลีโลพาทิก ได้แก่ น้ำกลั่น 18 เมกะ โอห์ม (18 MΩ distilled water), 0.01% trifluoroacetic acid, acetonitrile (HPLC grade), methanol (HPLC grade)

7.4 สารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ (pH 7.0) (ภาคผนวก)

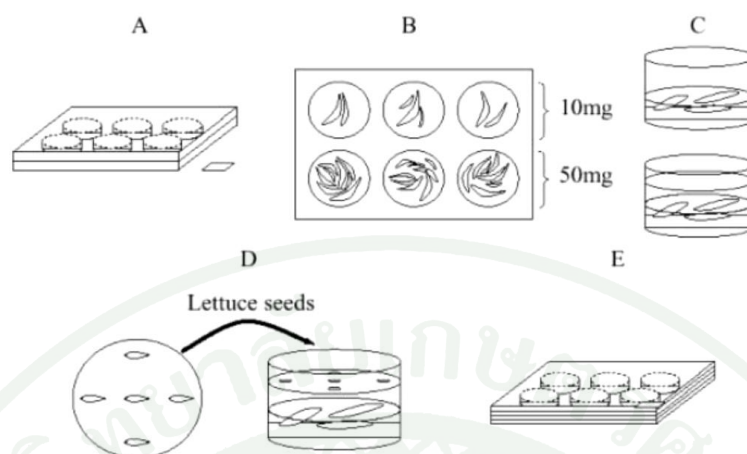
7.5 สารเคมีสำหรับปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้แก่ hydrochloric acid (HCl) และ sodium hydroxide (NaOH)

วิธีการ

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุกรรมต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม ด้วยวิธี sandwich method

ศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีต่อการเจริญเติบโตของพืชปลูกตามหลัง (sequencial crop) ในกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน สายพันธุ์เอียสกุลและบอม 17 ในการทดลองนี้สุ่มตัวอย่างกล้วยไม้สายต้นละ 5 ต้น โดยใช้ตัวอย่างใบแก่ใบล่างสุดในลำที่มีอายุมากที่สุด และตัวอย่างดอกบานโดยสุ่มคละจากดอกที่บาน 5 ดอกในแต่ละช่อ นำมาอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน

ใส่ตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดให้มีขนาดเล็กลงประมาณ 2 ตารางมิลลิเมตร ลงใน multi-dish plate ชนิด 6 หลุม โดยแต่ละตัวอย่างทดสอบน้ำหนัก 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อหลุม ดวงสารละลายวุ้นชั้นแรก ความเข้มข้น 0.5% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงใน multi-dish plate ชนิด 6 หลุม ปลอ่ยทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัว จากนั้นเติมสารละลายวุ้นชั้นที่สอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดทับบนตัวอย่างพืช ปลอ่ยทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัว วางเมล็ดผักกาดหอม 5 เมล็ดต่อหลุมบนผิวหน้าวุ้น ปิดฝา plate และเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน ดังภาพที่ 2 และเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (external control) คือ การเพาะเมล็ดผักกาดหอมบนอาหารวุ้นที่ไม่เติมตัวอย่างกล้วยไม้ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 หลุม และบันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ความยาวของ radicle และ hypocotyls ทำการทดลอง 3 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2555 ครั้งที่ 2 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 และครั้งที่ 3 เดือนตุลาคม 2556 แล้ววิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 2 การทดสอบผลทางอัลลิโลพาตีโดยวิธี sandwich method: (A) multi-dish plate ชนิด 6 หลุม (B) ใส่ตัวอย่างพืชน้ำหนัก 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อหลุม (C) ตวงสารละลายวันชั้นแรก และชั้นที่สอง ชั้นละ 5 มิลลิลิตร เติมลงใน multi-dish plate ชนิด 6 หลุม ปิดทับบนตัวอย่างพืช (D) วางเมล็ดผักกาดหอม 5 เมล็ดต่อหลุมบนผิวหน้าวุ้น (E) ปิดฝา plate และเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน

ที่มา: Fujii *et al.* (2003)

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีของวัสดุปลูกกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม ด้วยวิธี soil germination method

สุ่มตัวอย่างก้ามมะพร้าวเก่าที่ใช้ปลูกกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมและจากกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งใช้ปลูกกล้วยไม้มาแล้วเป็นเวลา 1 ปี สายต้นละ 5 กระถาง นำมาผสมในวัสดุเพาะเมล็ดผักกาดหอม โดยใช้อัตราส่วนดินผสม ทราายและก้ามมะพร้าว 5 : 1 : 1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันและใส่ในกระถางพลาสติกทรงมาตรฐานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว เพาะเมล็ดผักกาดหอมกระถางละ 5 เมล็ด

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และลักษณะของต้นผักกาดหอม หลังการปลูก 1 เดือน วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบผลของวัสดุปลูกกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมที่มีต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ คือ เชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท ในน้ำสกัดก้ามมะพร้าว ด้วยวิธี plate cultivation method

ทำการตรวจสอบผลของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมที่มีต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในน้ำสกัดก้ามมะพร้าว เทียบกับกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Yu *et al.* (2013) โดยสุ่มตัวอย่างก้ามมะพร้าวที่ใช้ปลูกกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ที่ผ่านการใช้งานมาแล้วประมาณ 1 ปี สายต้นละ 5 กระถาง แยกเชื้อจุลินทรีย์จากวัสดุปลูกโดยนำตัวอย่างก้ามมะพร้าว 30 กรัม ละลายในสารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 270 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 160 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำส่วนใสมาเจือจางสารแขวนลอยลงครั้งละ 10 เท่า (serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-5} คูดสารละลายที่ได้ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงตรงกลางจานอาหารวุ้นสูตร Peptone Tryptone Yeast Extract Glucose (PTYG) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีท และอาหารสูตร Oxytetracycline Glucose Yeast Extract (OGYE) สำหรับเลี้ยงเชื้อรา แล้วเกลี่ยให้ทั่วบนจานอาหารด้วยแท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อ

แล้ว ทิ้งไว้ให้แห้ง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเชื้อราใช้ระยะเวลาบ่ม 3 วัน ส่วนเชื้อแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีทใช้ระยะเวลาบ่ม 7 วัน

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 จานอาหารเพาะเชื้อ บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนโคโลนีของเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท แล้วรายงานผลเป็น colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิลิตร โดยที่จำนวนโคโลนีที่นับได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อต้องอยู่ระหว่าง 20-200 โคโลนีต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อ การคำนวณจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร ทำโดยใช้สูตร

$$\text{จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่อ 1 มิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร}}{\text{ความเจือจางของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ}}$$

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์รอบรากกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุ์กรรมด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

การทดลองที่ 4 การศึกษารูปแบบของโครมาโทแกรมสารสกัดจากกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุ์กรรมและกล้วยไม้สกุลหวายปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC)

ศึกษาในกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยใช้ตัวอย่างใบแก่ใบล่างสุดในลำที่มีอายุมากที่สุด และตัวอย่างดอกบานโดยสุ่มละจากดอกที่บาน 5 ดอกในแต่ละช่อ สุ่มตัวอย่างกล้วยไม้สายพันธุ์ละ 5 ต้น

การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) จากกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO และจากต้นกล้วยไม้สกุลหวายปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ที่มีอายุประมาณ 1 ปี ด้วยวิธีการตัดแปลงจากวิธีของ Yang *et al.* (2006) โดยนำใบและดอกกล้วยไม้อบแห้งในตูบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน (จนกระทั่งแห้ง น้ำหนักคงที่) บันทึกน้ำหนักแห้ง แล้วบดส่วนของใบและดอกกล้วยไม้ประมาณ 0.25 กรัม ให้ละเอียดแล้วใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายเมทานอลต่อน้ำอัตราส่วน 8 : 2 โดยปริมาตร

ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำไปแช่ในเครื่อง sonicator เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองสารสกัดตัวอย่างผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ลงในขวดสีชาขนาดเล็ก จากนั้นกรองสารสกัดตัวอย่างผ่านแผ่นกรองที่มีช่องขนาด 0.45 ไมโครเมตร ซ้ำอีกครั้ง แล้วย้ายใส่ลงใน insert vial เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC โดยใช้ detector ชนิด photodiode array detector และคอลัมน์ชนิด Luna 5U C18 ใช้ acetonitrile และ 0.01% trifluoroacetic acid ในอัตราส่วน 32 : 68 เป็นสารละลายตัวพา กำหนดอัตราการไหลของสารละลายตัวพาเป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดโดยใช้ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบ โครมาโทแกรมจากกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

สถานที่ทำการทดลอง

การศึกษาผลทางอัลลีโลพาตีของกล้วยไม้สกุลหวายคัดแปลงพันธุกรรมต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน และโรงเรียนชีวนิรุกษ์ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

การตรวจสอบผลของกล้วยไม้สกุลหวายคัดแปลงพันธุกรรมที่มีต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ส่วนการศึกษารูปแบบของโครมาโทแกรมสารสกัดจากกล้วยไม้สกุลหวายคัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้สกุลหวายปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) ทำการทดลอง ณ หน่วยวิเคราะห์วิจัยพฤกษเคมี ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่ เดือนตุลาคม พ.ศ. 2555 สิ้นสุดการทดลอง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2557

ผลและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม ด้วยวิธี sandwich method

การศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์เอียสกุล จำนวน 4 สายต้น คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4 และพันธุ์บอม 17 จำนวน 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 เปรียบเทียบกับกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (AEC และ ABC) โดยศึกษาทั้งในส่วนของใบและดอกกล้วยไม้ซึ่งนำมาอบแห้งแล้วทดสอบผลที่มีต่อการงอกของเมล็ดผักกาดหอม ด้วยวิธี sandwich method ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Fujii *et al.* (2003) โดยเปรียบเทียบผลทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนกับกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่มีต่อพืชทดสอบ คือ ผักกาดหอม พันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทำการศึกษา 3 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2555 ครั้งที่ 2 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 และครั้งที่ 3 เดือนตุลาคม 2556 โดยศึกษาผลเปอร์เซ็นต์การงอก การเจริญเติบโตของ radicle และ hypocotyl ของต้นกล้าผักกาดหอมบนอาหารวุ้น โดยมีผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1-6

1.1 การศึกษาในกล้วยไม้สายพันธุ์เอียสกุล ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1 และ 2

ผลการศึกษาครั้งที่ 1

เมื่อทดสอบผลทางอัลลีโลพาทีของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ ‘เอียสกุล’ 4 สายต้น คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม พันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 โดยวิธี sandwich method ที่น้ำหนักตัวอย่าง 10 และ 50 มิลลิกรัม ครั้งที่ 1 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2555 พบว่า การใช้ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุลทั้งที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีน น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอม โดยทำให้ผักกาดหอมมีเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวของ radicle และความยาวของ hypocotyl ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการเพาะในวุ้นเปล่า

อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบเฉพาะกรณีของการใช้ตัวอย่างใบและดอกกล้วยไม้เติมลงในอาหารวุ้นที่เพาะเมล็ดผักกาดหอมนั้น พบว่า ในกรณีกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมสายต้น AE1-AE4 นั้น การใช้ตัวอย่างดอกส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดผักกาดหอมลดลงโดยสายต้น AE3 และ AE4 ส่งผลกระทบบมากที่สุด

สำหรับผลต่อความยาวของ radicle และ hypocotyl นั้น ส่วนของใบกล้วยไม้มีผลทำให้มีการเจริญเติบโตลดลงมากกว่าการใช้ส่วนของดอก อย่างไรก็ตาม ในกรณีใบและดอกของกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนก็พบว่า มีผลทำให้ความยาวของ radicle และ hypocotyl ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับความยาว radicle และ hypocotyl ของเมล็ดผักกาดหอมบนอาหารวุ้นไม่มีการเติมตัวอย่างกล้วยไม้ (external control) ด้วยเช่นกัน ในทำนองเดียวกันที่กล่าวแล้วข้างต้นนี้เห็นได้ชัดเจนมากขึ้นเมื่อใช้ตัวอย่างน้ำหนักแห้งมากขึ้นเป็น 50 มิลลิกรัม ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอมมากขึ้น

ผลการศึกษครั้งที่ 2

เมื่อทดสอบผลทางอัลลีโลพาตีของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ 'เอียสกุล' 4 สายต้น คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม พันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 โดยวิธี sandwich method ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งตรวจสอบผลในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 มีผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกับการตรวจสอบครั้งแรก กล่าวคือ ทั้งใบและดอกของกล้วยไม้ทุกสายต้นมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอม โดยส่วนใบส่งผลเชิงลบมากกว่าการใช้ส่วนดอก และกล้วยไม้ทุกสายต้น ไม่ว่าจะเป็นต้นปกติหรือต้นที่ได้รับการถ่ายยีนให้ผลในทำนองเดียวกัน และมีผลการยับยั้งใกล้เคียงกัน

ผลการศึกษครั้งที่ 3

จากการทดสอบผลทางอัลลีโลพาตีของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ 'เอียสกุล' 4 สายต้น คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม พันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 โดยวิธี sandwich method ซึ่งการศึกษาในครั้งแรกและครั้งที่ 2 แม้ว่าจะมีแนวโน้มในภาพรวมเป็นไปในทำนองเดียวกัน แต่ยังคงมีความแตกต่างอยู่บ้าง จึงได้ทำการศึกษาครั้งที่ 3 เพื่อยืนยันซ้ำผลการทดลอง โดยในการศึกษครั้งที่ 3 นี้ ทำในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2556 ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1 และตารางที่ 2

ผลการทดลองในภาพรวมเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการศึกษาครั้งที่ 1 และ 2 แต่ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตน้อยกว่าการศึกษาในครั้งที่ 2 แต่ใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งที่ 1 ซึ่งสรุปผลได้ดังตารางที่ 3

จากการศึกษาทั้ง 3 ครั้งนี้มีข้อควรพิจารณาคือ การศึกษาครั้งที่ 1 และ 3 ทำในช่วงเดือนตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงต้นฤดูหนาว ในขณะที่การตรวจสอบครั้งที่ 2 ทำในเดือนมิถุนายน ซึ่งเป็นช่วงกลางฤดูฝนที่มีสภาพอากาศชื้น ทำให้มีปัญหาเรื่องการควบคุมโรคในกล้วยไม้มากกว่าในช่วงต้นฤดูหนาว จึงมีการฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืชหลายชนิดในระยะเวลาถี่ขึ้น คือ ฉีดพ่นทุกสัปดาห์ ในขณะที่ช่วงต้นฤดูหนาว ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชทุก 2 สัปดาห์เท่านั้น ดังนั้นผลการยับยั้งการเจริญเติบโตต้นกล้าผักกาดหอมที่พบว่าการยับยั้งมากในการศึกษาครั้งที่ 2 นั้น อาจเป็นผลยับยั้งที่เกิดเนื่องมาจากสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้มากขึ้น และมีผลตกค้างอยู่ที่ส่วนใบและดอกของกล้วยไม้ที่นำมาใช้ทดสอบ

ตารางที่ 1 ผลทางอัลลีโลพาตีจากส่วนของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ ‘เอียสกุล’ ต้นปกติ (AEC) และสายต้นดัดแปลงพันธุกรรม 4 สายต้น คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทดสอบ โดยวิธี sandwich method ใช้น้ำหนักตัวอย่างแห้งของกล้วยไม้ 10 มิลลิกรัม ในการศึกษาครั้งที่ 1 ตุลาคม 2555 ครั้งที่ 2 มิถุนายน 2556 และครั้งที่ 3 ตุลาคม 2556

สายต้น	ผลจากส่วนของใบ									ผลจากส่วนของดอก								
	การงอก (%)			ความยาว Radicle (%) ^{1/}			ความยาว Hypocotyl (%) ^{2/}			การงอก (%)			ความยาว Radicle (%) ^{1/}			ความยาว Hypocotyl (%) ^{2/}		
	ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
AEC	93.3 ^{a/a}	68.9	91.1	50.7 ^{bc/cd}	15.3 ^{/c}	23.3 ^{/c}	71.3 ^{bc/c}	31.0 ^{/b}	70.5 ^{bc/b}	84.4 ^{a/a}	66.7	93.3	80.7	29.3 ^{b/cd}	55.0 ^{/b}	82.3 ^{/bc}	44.0 ^{/bc}	87.5
AE1	93.3 ^{a/a}	62.2	97.8	43.3 ^{c/d}	16.0 ^{/c}	40.3 ^{/b}	68.7 ^{c/c}	33.3 ^{/b}	92.2 ^{a/a}	86.7 ^{a/a}	68.9	97.8	82.0	39.3 ^{a/bc}	55.0 ^{/b}	83.0 ^{/bc}	46.0 ^{/bc}	82.3
AE2	68.9 ^{ab/ab}	57.8	93.3	60.0 ^{ab/bc}	21.3 ^{/b}	34.7 ^{/bc}	77.7 ^{ab/bc}	35.0 ^{/b}	92.6 ^{a/a}	97.8 ^{a/a}	60.0	97.8	100.0	25.7 ^{b/d}	67.0 ^{/b}	86.3 ^{/b}	39.0 ^{/c}	91.7
AE3	51.1 ^{b/b}	80.0	95.6	59.7 ^{ab/bc}	15.0 ^{/c}	32.3 ^{/bc}	70.7 ^{bc/c}	31.0 ^{/b}	85.4 ^{ab/ab}	51.1 ^{b/b}	53.3	95.6	90.3	21.7 ^{b/d}	58.0 ^{/b}	74.7 ^{/c}	34.3 ^{/c}	96.1
AE4	77.8 ^{ab/ab}	55.6	95.6	73.3 ^{a/b}	14.0 ^{/c}	28.0 ^{/bc}	82.7 ^{a/b}	36.7 ^{/b}	69.1 ^{c/b}	46.7 ^{b/b}	68.9	100.0	87.2	43.7 ^{a/b}	56.3 ^{/b}	73.3 ^{/c}	55.3 ^{/b}	92.4
F-test (1)	*	ns	ns	*	ns	ns	**	ns	*	**	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	20.9	20.7	7.3	14.6	16.0	19.9	4.6	14.3	10.2	13.5	16.7	5.3	9.7	17.9	8.9	9.9	16.9	7.9
Ext. Ctr.	93.3 ^{/a}	82.2	91.1	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	93.3 ^{/a}	82.2	91.1	100.0	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0
F-test (2)	*	ns	ns	**	**	**	**	**	*	**	ns	ns	ns	**	**	**	**	ns
C.V. (%)	18.4	18.3	6.9	11.6	8.2	17.9	6.6	9.5	11.4	11.8	14.7	5.2	10.9	13.9	14.7	7.9	12.8	11.4

ตารางที่ 1 (ต่อ)

^{1/} เปอร์เซ็นต์ความยาวของ radicle และ ^{2/} เปอร์เซ็นต์ความยาวของ hypocotyl ของผักกาดหอม เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

/ ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย F-test (1) ซึ่งไม่คิดรวมชุดการทดลองควบคุม (external control: Ext. Ctr.) คือ อาหารวัวที่ไม่เติมตัวอย่างกล้วยไม้

และ F-test (2) ซึ่งคิดรวมชุดการทดลองควบคุม

ตารางที่ 2 ผลทางอัลลีโลพาตีจากส่วนของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ ‘เอียสกุล’ ต้นปกติ (AEC) และสายต้นดัดแปลงพันธุกรรม 4 สายต้น คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทดสอบ โดยวิธี sandwich method ใช้น้ำหนักตัวอย่างแห้งของกล้วยไม้ 50 มิลลิกรัม ในการศึกษาครั้งที่ 1 ตุลาคม 2555 ครั้งที่ 2 มิถุนายน 2556 และครั้งที่ 3 ตุลาคม 2556

สายต้น	ผลจากส่วนของใบ									ผลจากส่วนของดอก								
	การงอก (%)			ความยาว Radicle (%) ^{1/}			ความยาว Hypocotyl (%) ^{2/}			การงอก (%)			ความยาว Radicle (%) ^{1/}			ความยาว Hypocotyl (%) ^{2/}		
	ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
AEC	95.6 ^{a/a}	64.4 ^{/ab}	93.3	45.7 ^{/bc}	13.7 ^{/b}	15.0 ^{/c}	64.7 ^{a/b}	22.7 ^{/b}	42.0 ^{d/d}	86.7 ^{a/a}	57.8 ^{/b}	95.6	74.0 ^{ab/b}	19.3 ^{ab/bc}	25.0 ^{b/c}	72.0 ^{/bc}	34.7 ^{ab/bc}	61.0 ^{/b}
AE1	84.4 ^{ab/ab}	60.0 ^{/ab}	93.3	39.3 ^{/c}	14.3 ^{/b}	27.7 ^{a/b}	52.7 ^{b/c}	27.3 ^{/b}	79.3 ^{a/b}	80.0 ^{a/a}	48.9 ^{/b}	84.4	62.9 ^{bc/bc}	26.0 ^{a/b}	19.7 ^{b/c}	71.0 ^{/bc}	43.0 ^{a/b}	59.3 ^{/b}
AE2	82.2 ^{ab/ab}	53.3 ^{/b}	86.7	52.0 ^{/b}	10.7 ^{/b}	25.3 ^{a/b}	66.3 ^{a/b}	23.7 ^{/b}	69.7 ^{b/b}	88.9 ^{a/a}	62.2 ^{/b}	93.3	92.6 ^{a/a}	15.0 ^{b/c}	40.7 ^{a/b}	77.7 ^{/b}	28.0 ^{b/c}	73.0 ^{/b}
AE3	53.3 ^{c/c}	40.0 ^{/b}	97.8	46.0 ^{/bc}	12.7 ^{/b}	19.7 ^{b/c}	65.7 ^{a/b}	23.7 ^{/b}	55.3 ^{c/c}	53.3 ^{b/b}	51.1 ^{/b}	88.9	57.6 ^{bc/bc}	12.3 ^{b/c}	27.0 ^{b/c}	50.7 ^{/d}	25.7 ^{b/c}	69.3 ^{/b}
AE4	66.7 ^{bc/bc}	48.9 ^{/b}	95.6	49.3 ^{/bc}	13.0 ^{/b}	19.7 ^{b/c}	67.3 ^{a/b}	24.0 ^{/b}	57.0 ^{c/c}	31.1 ^{c/c}	66.7 ^{ab}	97.8	48.9 ^{c/c}	27.3 ^{a/b}	21.3 ^{b/c}	63.3 ^{/c}	46.0 ^{a/b}	65.0 ^{/b}
F-test (1)	*	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	**	**	ns	ns	**	**	**	ns	*	ns
C.V. (%)	18.3	26.6	6.1	13.4	17.1	8.8	6.8	18.7	6.4	14.9	18.9	7.5	16.3	20.9	15.3	14.3	20.3	13.0
Ext. Ctr.	93.3 ^{/a}	82.2 ^{/a}	91.1	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	93.3 ^{/a}	82.2 ^{/a}	91.1	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}
F-test (2)	*	*	ns	**	**	**	**	**	**	**	*	ns	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	16.1	22.4	5.9	11.3	7.9	8.7	7.9	11.4	9.0	12.9	16.4	7.1	14.3	13.2	12.8	10.2	15.7	13.0

ตารางที่ 2 (ต่อ)

^{1/} เปอร์เซ็นต์ความยาวของ radicle และ ^{2/} เปอร์เซ็นต์ความยาวของ hypocotyl ของผักกาดหอม เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

/ ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย F-test (1) ซึ่งไม่คิดรวมชุดการทดลองควบคุม (external control: Ext. Ctr.) คือ อาหารรุ่นที่ไม่เติมตัวอย่างกล้วยไม้

และ F-test (2) ซึ่งคิดรวมชุดการทดลองควบคุม

ตารางที่ 3 สรุปการศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายคัดแปลงพันธุกรรม สายพันธุ์
เย็บสกุลที่มีต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม ศึกษาด้วยวิธี sandwich method

สายต้น	ครั้งที่ ทดสอบ	ผลจากส่วนของใบ			ผลจากส่วนของดอก		
		การงอก	Radicle	Hypocotyl	การงอก	Radicle	Hypocotyl
AEC	1	E/E	N/N	N/N	E/E	E/N	N/N
	2	E/E	N/N	N/N	E/E	N/N	N/N
	3	E/E	N/N	N/N	E/E	N/N	E/N
AE1	1	E/E	N/N	N/N	E/E	E/N	N/N
	2	E/E	N/N	N/N	E/E	N/N	N/N
	3	E/E	N/N	E/N	E/E	N/N	E/N
AE2	1	E/E	N/N	N/N	E/E	E/E	N/N
	2	E/N	N/N	N/N	E/N	N/N	N/N
	3	E/E	N/N	E/N	E/E	N/N	E/N
AE3	1	N/N	N/N	N/N	N/N	E/N	N/N
	2	E/N	N/N	N/N	E/N	N/N	N/N
	3	E/E	N/N	E/N	E/E	N/N	E/N
AE4	1	E/N	N/N	N/N	N/N	E/N	N/N
	2	E/N	N/N	N/N	E/N	N/N	N/N
	3	E/E	N/N	N/N	E/E	N/N	E/N

E ค่าเฉลี่ยทางสถิติ (เทียบจากตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดังจากตารางที่ 1 และ 2) ใกล้เคียง
กับชุดการทดลองควบคุม (external control: Ext. Ctr.) คือ อาหารวุ้นที่ไม่เติมตัวอย่าง
กล้วยไม้

N ค่าเฉลี่ยทางสถิติน้อยกว่า Ext. Ctr.

/ ค่าเฉลี่ยทางสถิติจากการใช้ตัวอย่างแห้ง 10 มิลลิกรัม/50 มิลลิกรัม

1.2 การศึกษาในกล้วยไม้สายพันธุ์ บอม 17 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 และ 5

ผลการศึกษาครั้งที่ 1

เมื่อทดสอบผลทางอัลลีโลพาทีของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุ์กรรมสายพันธุ์ ‘บอม 17’ 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม พันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 โดยวิธี sandwich method ที่น้ำหนักตัวอย่าง 10 และ 50 มิลลิกรัม ครั้งที่ 1 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2555 (ตารางที่ 4 และ ตารางที่ 5) พบว่า การใช้ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์บอม 17 ทั้งที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีน น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ส่งผลทั้งในด้านการยับยั้งและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอม โดยทำให้ผักกาดหอมมีเปอร์เซ็นต์การงอก และความยาวของ hypocotyl ลดลง แต่ความยาวของ radicle เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการเพาะในวุ้นเปล่า

เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบเฉพาะกรณีของการใช้ตัวอย่างใบและดอกกล้วยไม้เดิมลงในอาหารวุ้นที่เพาะเมล็ดผักกาดหอมนั้น พบว่า ในกรณีกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุ์กรรม สายต้น AB1-AB4 นั้น การใช้ตัวอย่างใบและดอกกล้วยไม้ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดผักกาดหอมใกล้เคียงกับกล้วยไม้ปกติ และเมื่อใช้ตัวอย่างน้ำหนักแห้งมากขึ้นเป็น 50 มิลลิกรัม ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอมมากขึ้น ดังตารางที่ 5

ส่วนผลต่อความยาวของ radicle และ hypocotyl นั้น ส่วนของใบกล้วยไม้ไม่มีผลทำให้มีการเจริญเติบโตลดลงมากกว่าการใช้ส่วนของดอก อย่างไรก็ตาม ในกรณีใบและดอกของกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนก็พบว่า มีผลทำให้ความยาวของ hypocotyl ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับความยาว hypocotyl ของเมล็ดผักกาดหอมบนอาหารวุ้น ไม่มีการเติมตัวอย่างกล้วยไม้ (external control) ในทำนองเดียวกันที่กล่าวแล้วข้างต้นนี้เห็นได้ชัดเจนมากขึ้นเมื่อใช้ตัวอย่างน้ำหนักแห้งมากขึ้นเป็น 50 มิลลิกรัม ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอมมากขึ้น แต่ที่น่าสนใจ คือ ในส่วนของดอกกล้วยไม้ทุกสายต้นมีแนวโน้มในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดหอมด้านความยาวของ radicle ทั้งการใช้ตัวอย่างกล้วยไม้ปกติและตัดแปลงพันธุ์กรรม

ผลการศึกษารั้งที่ 2

เมื่อทดสอบผลทางอัลลีโลพาทีของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุ์กรรมสายพันธุ์ ‘บอม 17’ 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม พันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 โดยวิธี sandwich method ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งตรวจสอบผลในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 (ตารางที่ 4 และ ตารางที่ 5) พบว่า ทั้งใบและดอกของกล้วยไม้ทุกสายต้นทั้งต้นปกติและตัดแปลงพันธุ์กรรมมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอมใกล้เคียงกันโดยส่วนใบส่งผลเชิงลบมากกว่าการใช้ส่วนดอก

ผลการศึกษารั้งที่ 3

จากการทดสอบผลทางอัลลีโลพาทีของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุ์กรรมสายพันธุ์ ‘บอม 17’ 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม พันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 โดยวิธี sandwich method ซึ่งการศึกษานี้ครั้งแรกและครั้งที่ 2 มีความแตกต่างกันจึงทำการศึกษารั้งที่ 3 เพื่อยืนยันซ้ำผลการทดลอง ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2556 ผลการทดลองในภาพรวมเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการศึกษารั้งที่ 2 คือ ทั้งใบและดอกของกล้วยไม้ทุกสายต้นทั้งต้นปกติและตัดแปลงพันธุ์กรรมมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอม แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การงอกที่มีค่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์การงอกของผักกาดหอมบนอาหารวุ้นไม่มีการเติมตัวอย่างกล้วยไม้ (external control)

ตารางที่ 4 ผลทางอัลลีโลพาตีจากส่วนของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ ‘บอม 17’ ต้นปกติ (ABC) และสายต้นดัดแปลงพันธุกรรม 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทดสอบโดยวิธี sandwich method ใช้น้ำหนักตัวอย่างแห้งของกล้วยไม้ 10 มิลลิกรัม ในการศึกษาครั้งที่ 1 ตุลาคม 2555 ครั้งที่ 2 มิถุนายน 2556 และครั้งที่ 3 ตุลาคม 2556

สายต้น	ผลจากส่วนของใบ									ผลจากส่วนของดอก								
	การงอก (%)			ความยาว Radicle (%) ^{1/}			ความยาว Hypocotyl (%) ^{2/}			การงอก (%)			ความยาว Radicle (%) ^{1/}			ความยาว Hypocotyl (%) ^{2/}		
	ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ABC	90.7	53.3	97.8	98.6 ^{b/b}	15.7 ^b	33.0 ^b	71.0 ^c	27.0 ^b	73.7 ^b	92.9	68.9	97.8	140.6 ^b	23.0 ^{b/c}	67.3 ^{a/b}	87.72 ^{bc}	28.3 ^c	86.0
AB1	90.9	66.7	95.6	140.5 ^{a/a}	18.0 ^b	29.7 ^b	89.7 ^{ab}	31.7 ^b	71.3 ^b	66.7	55.6	97.8	147.1 ^b	35.7 ^{a/b}	62.3 ^{ab/bc}	85.6 ^c	45.3 ^b	85.3
AB2	84.2	66.7	93.3	114.1 ^{b/b}	20.7 ^b	28.0 ^b	78.7 ^{bc}	37.3 ^b	69.3 ^b	75.1	75.6	93.3	174.5 ^{ab}	30.7 ^{ab/bc}	39.7 ^{d/d}	102.5 ^{ab}	40.3 ^{bc}	71.3
AB3	91.1	64.4	95.6	106.5 ^{b/b}	17.3 ^b	35.0 ^b	85.3 ^{abc}	33.7 ^b	72.0 ^b	95.3	73.3	93.3	194.1 ^a	39.3 ^{a/b}	51.7 ^{c/cd}	103.6 ^a	48.7 ^b	76.7
AB4	95.1	62.2	95.6	102.8 ^{b/b}	15.3 ^b	32.3 ^b	79.0 ^{bc}	30.3 ^b	83.0 ^b	86.7	71.1	97.8	145.7 ^b	31.0 ^{ab/bc}	55.7 ^{bc/bc}	88.3 ^{bc}	44.3 ^b	75.0
F-test (1)	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	ns	ns	ns
C.V. (%)	13.6	22.7	5.7	12.7	19.8	10.8	8.6	19.4	11.0	28.3	19.0	5.4	16.2	15.3	8.1	12.2	19.2	8.5
Ext. Ctr.	93.3	82.2 ^a	91.1	100.0 ^b	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^a	93.3	82.2	91.1	100.0 ^c	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^{abc}	100.0 ^a	100.0
F-test (2)	ns	ns	ns	*	**	**	*	**	*	ns	ns	ns	**	**	**	*	**	ns
C.V. (%)	12.3	19.8	5.5	12.5	11.7	12.1	9.6	12.3	13.4	25.3	16.9	5.2	12.3	11.3	12.3	8.4	13.2	13.4

ตารางที่ 4 (ต่อ)

^{1/} เปอร์เซ็นต์ความยาวของ radicle และ ^{2/} เปอร์เซ็นต์ความยาวของ hypocotyl ของผักกาดหอม เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

/ ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย F-test (1) ซึ่งไม่คิดรวมชุดการทดลองควบคุม (external control: Ext. Ctr.) คือ อาหารรุ่นที่ไม่เติมตัวอย่างกล้วยไม้

และ F-test (2) ซึ่งคิดรวมชุดการทดลองควบคุม

ตารางที่ 5 ผลทางอัลลีโลพาทีจากส่วนของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ ‘บอม 17’ ต้นปกติ (ABC) และสายต้นดัดแปลงพันธุกรรม 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทดสอบโดยวิธี sandwich method ใช้น้ำหนักตัวอย่างแห้งของกล้วยไม้ 50 มิลลิกรัม ในการศึกษาครั้งที่ 1 ตุลาคม 2555 ครั้งที่ 2 มิถุนายน 2556 และครั้งที่ 3 ตุลาคม 2556

สายต้น	ผลจากส่วนของใบ									ผลจากส่วนของดอก								
	การงอก (%)			ความยาว Radicle (%) ^{1/}			ความยาว Hypocotyl (%) ^{2/}			การงอก (%)			ความยาว Radicle (%) ^{1/}			ความยาว Hypocotyl (%) ^{2/}		
	ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่			ครั้งที่		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ABC	75.6 ^{/abc}	44.4 ^{/b}	97.8	62.0 ^{/bc}	12.0 ^{/c}	23.0 ^{/b}	56.0 ^{/bc}	24.7 ^{/b}	49.3 ^{/b}	66.7 ^{/ab}	62.2 ^{/b}	93.3	81.7 ^{bc/bc}	15.0 ^{/b}	31.0 ^{a/b}	69.0 ^{b/bc}	29.0 ^{/b}	56.7 ^{/b}
AB1	80.0 ^{/abc}	53.3 ^{/b}	95.5	65.7 ^{/b}	18.0 ^{/b}	20.3 ^{/b}	70.0 ^{/bc}	27.3 ^{/b}	38.3 ^{/b}	44.4 ^{/b}	60.0 ^{/bc}	93.3	71.7 ^{cd/d}	26.0 ^{/b}	27.7 ^{ab/bc}	70.0 ^{b/bc}	34.7 ^{/b}	65.3 ^{/b}
AB2	60.0 ^{/c}	48.9 ^{/b}	93.3	67.3 ^{/b}	11.7 ^{/c}	21.0 ^{/b}	73.3 ^{/b}	22.0 ^{/b}	48.0 ^{/b}	62.2 ^{/ab}	62.2 ^{/b}	84.4	109.2 ^{ab/b}	21.0 ^{/b}	20.3 ^{b/c}	79.7 ^{ab/b}	32.7 ^{/b}	54.0 ^{/b}
AB3	71.1 ^{/bc}	53.3 ^{/b}	88.9	45.7 ^{/cd}	12.7 ^{/c}	24.7 ^{/b}	59.0 ^{/bc}	23.7 ^{/b}	54.0 ^{/b}	68.9 ^{/ab}	44.4 ^{/c}	84.4	131.1 ^{a/a}	14.3 ^{/b}	32.7 ^{a/b}	93.3 ^{a/a}	22.3 ^{/b}	65.0 ^{/b}
AB4	95.3 ^{/a}	48.9 ^{/b}	88.9	43.0 ^{/d}	11.3 ^{/c}	21.0 ^{/b}	45.7 ^{/c}	24.0 ^{/b}	51.3 ^{/b}	86.7 ^{/a}	55.6 ^{/bc}	88.9	56.7 ^{d/d}	19.3 ^{/b}	25.3 ^{ab/bc}	64.7 ^{b/c}	33.3 ^{/b}	55.0 ^{/b}
F-test (1)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	*	*	ns	ns
C.V. (%)	17.4	18.9	4.9	20.4	19.4	12.8	23.4	17.2	13.3	28.7	16.0	7.5	13.7	36.1	16.5	12.7	22.1	10.5
Ext. Ctr.	93.3 ^{/ab}	82.2 ^{/a}	91.1	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	93.3 ^{/a}	82.2 ^{/a}	91.1	100.0 ^{/bc}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}	100.0 ^{/a}
F-test (2)	*	**	ns	**	**	**	**	**	**	*	**	ns	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	15.3	15.9	4.8	15.1	10.4	8.2	20.7	10.5	13.7	24.5	13.8	7.0	9.5	19.5	11.5	7.6	15.4	11.6

ตารางที่ 5 (ต่อ)

^{1/} เปอร์เซ็นต์ความยาวของ radicle และ ^{2/} เปอร์เซ็นต์ความยาวของ hypocotyl ของผักกาดหอม เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

/ ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย F-test (1) ซึ่งไม่คิดรวมชุดการทดลองควบคุม (external control: Ext. Ctr.) คือ อาหารวัวที่ไม่เติมตัวอย่างกล้วยไม้

และ F-test (2) ซึ่งคิดรวมชุดการทดลองควบคุม

ตารางที่ 6 สรุปการศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายคัดแปลงพันธุกรรม สายพันธุ์ บอม 17 ที่มีต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม ศึกษาด้วยวิธี sandwich method

สายต้น	ครั้งที่ทดสอบ	ผลจากส่วนของใบ			ผลจากส่วนของดอก		
		การงอก	Radicle	Hypocotyl	การงอก	Radicle	Hypocotyl
ABC	1	E/E	E/N	N/N	E/E	P/E	E/N
	2	E/N	N/N	N/N	E/N	N/N	N/N
	3	E/E	N/N	N/N	E/E	N/N	E/N
AB1	1	E/E	P/N	E/N	E/N	P/N	E/N
	2	E/N	N/N	N/N	E/N	N/N	N/N
	3	E/E	N/N	N/N	E/E	N/N	E/N
AB2	1	E/N	E/N	N/N	E/E	P/E	E/N
	2	E/N	N/N	N/N	E/N	N/N	N/N
	3	E/E	N/N	N/N	E/E	N/N	E/N
AB3	1	E/E	E/N	E/N	E/E	P/P	E/E
	2	E/N	N/N	N/N	E/N	N/N	N/N
	3	E/E	N/N	N/N	E/E	N/N	E/N
AB4	1	E/N	E/N	N/N	E/E	P/N	E/N
	2	E/N	N/N	N/N	E/N	N/N	N/N
	3	E/E	N/N	N/N	E/E	N/N	E/N

E ค่าเฉลี่ยทางสถิติ (เทียบจากตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งจากตารางที่ 4 และ 5) ใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม (external control: Ext. Ctr.) คือ อาหารวุ้นที่ไม่เติมตัวอย่างกล้วยไม้

P ค่าเฉลี่ยทางสถิติมากกว่า Ext. Ctr.

N ค่าเฉลี่ยทางสถิติน้อยกว่า Ext. Ctr.

/ ค่าเฉลี่ยทางสถิติจากการใช้ตัวอย่างแห้ง 10 มิลลิกรัม/50 มิลลิกรัม

เมื่อพิจารณาในภาพรวมของผลทางอัลลีโลพาธิของกล้วยไม้สกุลหวาย สายพันธุ์ เอียสกุล (ตารางที่ 3) และสายพันธุ์ บอม 17 (ตารางที่ 6) กล้วยไม้ทั้งที่คัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนทุกสายต้นมีระดับอัลลีโลพาธิที่ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดหอมในระดับใกล้เคียงกัน

รายงานผลการเป็นอัลลีโลพาธิที่เกิดขึ้นในกล้วยไม้ แสดงในตารางที่ 1-6 พบว่า ในทริทเมนต์ที่มีตัวอย่างกล้วยไม้ส่งผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอมมากกว่าทริทเมนต์ที่เป็นอาหารวุ้นที่ไม่มีตัวอย่างกล้วยไม้ (external control) โดยทริทเมนต์ที่มีตัวอย่างกล้วยไม้ส่งผลให้อัตราการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอมลดลง สอดคล้องกับรายงานการตรวจสอบผลทางอัลลีโลพาธิในพืชวงศ์ Orchidaceae คือ *Vanilla fragrans* ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับกล้วยไม้ (Fujii *et al.*, 2003) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ตัวอย่างส่วนของใบและดอกกล้วยไม้แสดงกิจกรรมทางอัลลีโลพาธิ โดยพบว่า มีความแปรปรวนของระดับอัลลีโลพาธิระหว่างสายต้น และสายพันธุ์กล้วยไม้ทั้ง 2 สายพันธุ์เล็กน้อย ซึ่งความแปรปรวนของระดับอัลลีโลพาธิดังกล่าว ไม่เพียงแต่อาจเกิดจากลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่างกัน ส่งผลให้เกิดผลของระดับการผลิต metabolic substance ที่ต่างกัน แต่อาจเกิดจากการถ่ายยีนที่แต่ละสายต้นมีจำนวนชุดยีนที่ได้รับแตกต่างกัน หรืออาจเกิดจากตำแหน่งของยีนที่ถ่ายเข้าไปในกล้วยไม้แต่ละสายต้นที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีการแสดงออกไม่เท่ากัน (Aida *et al.*, 1998)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลทางอัลลีโลพาธิที่มีต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอม พบว่า ใบและดอกกล้วยไม้ไม่ว่าจะเป็นต้นปกติหรือต้นที่ได้รับการถ่ายยีนส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอม เมื่อเทียบกับการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอมในอาหารวุ้นเปล่า ทั้งนี้อาจเป็นไปได้จาก 2 กรณี คือ การที่กล้วยไม้มีการสร้างสารบางชนิดออกมาส่งผลยับยั้งการเจริญของต้นกล้า ซึ่งมีความเป็นไปได้ในระดับหนึ่ง เพราะมีรายงานการใช้ต้นกล้วยไม้เป็นยาสมุนไพร (Kong *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2012) รวมทั้งมีรายงานเกี่ยวกับการพบสารประกอบฟีนอลิกในกล้วยไม้สกุลหวาย (Yang *et al.*, 2006) แม้ว่าจะต่างสายพันธุ์กับที่ใช้ในการทดลองนี้ก็ตาม

อย่างไรก็ตามกรณีของการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอมยังอาจเกิดเนื่องจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งอาจมีส่วนหลงเหลือติดมากับใบและดอกกล้วยไม้ที่นำมาทดลอง และส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าได้เช่นกัน

เมื่อเปรียบเทียบปฏิสัมพันธ์ของผลทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์เอียสกุล (ตารางที่ 7) และสายพันธุ์บอม 17 (ตารางที่ 8) ต่ออัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอมโดยวิธี sandwich method ที่ระดับความเข้มข้นตัวอย่างใบและดอกของกล้วยไม้ 10 และ 50 มิลลิกรัม เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ปกติ โดยวิเคราะห์จากผลรวมของการศึกษาทั้ง 3 ครั้ง พบว่า ผลทาง อัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายทุกสายต้นทั้งที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนที่มีต่อค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบความปลอดภัยทางชีวภาพในยูคาลิปตัสทนเค็ม โดยวิธี sandwich method ซึ่งพบว่าการเจริญของยอดและรากผักกาดหอมไม่มีความแปรปรวนระหว่างการตรวจสอบผลทางอัลลีโลพาทีของสายต้นยูคาลิปตัสดัดแปลงพันธุกรรมและไม่ดัดแปลงพันธุกรรม (Kikuchi *et al.*, 2006, 2009)

ปัจจุบันมีรายงานการผลิต การประเมินความเสี่ยง และการทดสอบในแปลงของพืชดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งมักเกิดข้อกังวลว่าอาจมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม (McLean and Charrest, 2000) อัลลีโลพาทีซึ่งเป็นผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมของพืชหนึ่งที่มีต่อพืชชนิดอื่นในบริเวณใกล้เคียง จึงมีความสำคัญเพื่อช่วยอธิบายให้เข้าใจผลของการถ่ายยีนต่อกิจกรรมทางอัลลีโลพาทีโดยมีการรายงานการศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชอื่น (Fujii *et al.*, 2003; Golisz *et al.*, 2007) การประเมินผลกิจกรรมทางอัลลีโลพาทีของพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยทั่วไปแล้วนิยมใช้เทคนิค sandwich method ในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ ประเมินผลทางอัลลีโลพาทีของการชะล้างจากใบแห้ง (Fujii *et al.*, 2003, 2004) โดยการตรวจสอบการเจริญเติบโตของเมล็ดผักกาดหอมบนอาหารวุ้น ซึ่งวิธีนี้ใช้ประเมินผลทางอัลลีโลพาทีของยูคาลิปตัสดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *codA* (Kikuchi *et al.*, 2006, 2009) และยีน *mangrin* (Yu *et al.*, 2013)

ดังนั้น เทคนิค sandwich method นี้จึงเหมาะสำหรับใช้ตรวจสอบตัวอย่างปริมาณมาก มีประโยชน์ต่อการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชและไม้น้ำต้น สามารถทำได้ง่าย มีความน่าเชื่อถือในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม และผลการศึกษาสามารถประกอบประกอบสนับสนุนการพัฒนางานวิจัยในอนาคตได้ด้วย

ตารางที่ 7 สรุปผลปฏิสัมพันธ์ของผลทางอัลลีโลพาที่จากส่วนของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ ‘เอียสกุล’ ต้นปกติและสายต้นดัดแปลง พันธุกรรม 4 สายต้น คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทดสอบ โดยวิธี sandwich method ทดสอบโดยใช้น้ำหนักตัวอย่างแห้งของกล้วยไม้ 10 และ 50 มิลลิกรัม ในการศึกษา 3 ครั้ง

น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)	สายต้น	ผลจากส่วนของใบ			ผลจากส่วนของดอก		
		การงอก (%) ^{1/}	Radicle (%) ^{2/}	Hypocotyl (%) ^{3/}	การงอก (%) ^{1/}	Radicle (%) ^{2/}	Hypocotyl (%) ^{3/}
10	AEC	94.6	29.8	57.6	92.2	55.0	71.3
	AE1	94.7	33.2	64.7	92.0	58.8	70.4
	AE2	82.2	38.7	68.4	94.5	64.2	72.3
	AE3	85.7	35.7	62.4	85.7	56.7	68.4
	AE4	85.3	38.8	62.8	75.8	49.4	73.7
	F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns
50	AEC	94.4	24.8	43.1	92.0	39.4	55.9
	AE1	88.6	27.1	53.1	83.8	36.2	57.8
	AE2	82.7	29.3	53.2	87.5	49.4	59.6
	AE3	71.1	26.1	48.2	67.8	32.3	48.6
	AE4	78.6	27.3	49.4	66.8	32.5	58.1
	F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns

^{1/} เปอร์เซ็นต์การงอกของผักกาดหอม, ^{2/} เปอร์เซ็นต์ความยาวของ radicle ของผักกาดหอม, ^{3/} เปอร์เซ็นต์ความยาวของ hypocotyl ของผักกาดหอม
ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT
ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 สรุปผลปฏิสัมพันธ์ของผลทางอัลลีโลพาที่จากส่วนของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ ‘บอม 17’ ต้นปกติและสายต้นดัดแปลง พันธุกรรม 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 ทดสอบ โดยวิธี sandwich method ทดสอบโดยใช้น้ำหนักตัวอย่างแห้งของกล้วยไม้ 10 และ 50 มิลลิกรัม ในการศึกษา 3 ครั้ง

น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)	สายต้น	ผลจากส่วนของใบ			ผลจากส่วนของดอก		
		การงอก (%) ^{1/}	Radicle (%) ^{2/}	Hypocotyl (%) ^{3/}	การงอก (%) ^{1/}	Radicle (%) ^{2/}	Hypocotyl (%) ^{3/}
10	ABC	89.8	49.1	57.2	96.9	77.0	67.3
	AB1	94.5	62.7	64.2	82.2	81.7	72.1
	AB2	91.2	54.3	61.8	91.6	81.6	71.4
	AB3	93.6	52.9	63.7	97.9	95.0	76.3
	AB4	94.2	50.1	64.1	95.6	77.5	69.2
	F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns
50	ABC	80.8	32.3	43.3	83.2	42.6	51.6
	AB1	85.1	34.7	45.2	74.4	41.8	56.7
	AB2	74.5	33.3	47.8	78.3	50.2	55.5
	AB3	79.5	27.7	45.6	73.5	59.4	60.2
	AB4	86.4	25.1	40.3	86.0	33.8	51.0
	F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns

^{1/} เปอร์เซ็นต์การงอกของผักกาดหอม, ^{2/} เปอร์เซ็นต์ความยาวของ radicle ของผักกาดหอม, ^{3/} เปอร์เซ็นต์ความยาวของ hypocotyl ของผักกาดหอม
ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT
ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีของวัสดุปลูกกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุกรรมต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม ด้วยวิธี soil germination method

การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชตัดแปลงพันธุกรรมภายใต้สภาพโรงเรือนเป็นสิ่งสำคัญต่อการประเมินความเสี่ยงอันอาจเกิดขึ้นได้ต่อพืชปลูกตามหลัง ซึ่งในการทดลองนี้พืชปลูกตามหลังที่ใช้ทดสอบ คือ ผักกาดหอม โดยตรวจสอบด้วยวิธี soil germination method ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ยอมรับใช้ในการประเมินผลทางอัลลีโลพาทีที่มีการปลดปล่อยออกจากรากพืช โดยเน้นการศึกษาผลของวัสดุปลูกกล้วยไม้ซึ่งในประเทศไทยใช้กาบมะพร้าวเป็นหลัก ที่อาจส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอม

จากการสุ่มตัวอย่างกาบมะพร้าวเก่าที่ใช้ปลูกกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุกรรมและจากกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์เอียสกุล และสายพันธุ์บอม 17 ซึ่งใช้ปลูกกล้วยไม้มาแล้วเป็นระยะเวลา 1 ปี นำมาผสมในวัสดุปลูกผักกาดหอม และศึกษาการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอม โดยบันทึกผลเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และลักษณะของต้นผักกาดหอม ดังตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอก ความสูง ความกว้างใบ และน้ำหนักสดของต้นผักกาดหอม ซึ่งปลูกด้วยส่วนผสมของวัสดุปลูกกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรม (AE1-AE4 และ AB1-AB4) เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (AEC และ ABC) พบว่า ผักกาดหอมที่ปลูกโดยใช้กาบมะพร้าวเก่าที่ใช้ปลูกต้นกล้วยไม้สายพันธุ์เอียสกุลมาเป็นเวลา 1 ปี มีเปอร์เซ็นต์การงอกและการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนผักกาดหอมที่ปลูกโดยใช้กาบมะพร้าวเก่าจากการปลูกกล้วยไม้สายพันธุ์บอม 17 มาเป็นเวลา 1 ปี เป็นส่วนผสมในวัสดุปลูกนั้นมีเปอร์เซ็นต์การงอกไม่ต่างกัน แต่มีการเจริญเติบโตด้านความสูงและน้ำหนักสดต่างกันทางสถิติ และที่น่าสนใจคือ ผักกาดหอมที่ปลูกในวัสดุปลูกเก่าที่ใช้ปลูกกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์บอม 17 ทุกสายต้น มีการเจริญเติบโตดีกว่าที่ปลูกโดยใช้กาบมะพร้าวจากต้นกล้วยไม้ปกติผสมในวัสดุปลูก

ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาการงอกของเมล็ดผักกาดหอมในวัสดุปลูกที่มีเศษซากต้นคาร์เนชันตัดแปลงพันธุกรรมที่มีการแสดงออกของยีน *flavonoid 3', 5'-hydroxylase* เป็นส่วนผสม พบว่า ผักกาดหอมที่ปลูกด้วยวัสดุปลูกทั้งที่มีซากต้นคาร์เนชันปกติและตัดแปลงพันธุกรรมมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน (Kikuchi *et al.*, 2008)

ตารางที่ 9 การประเมินเปอร์เซ็นต์การงอก และการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอมเมื่อปลูกทดสอบในดินปลูกที่มีส่วนผสมของกาบมะพร้าวเก่าที่ใช้ปลูกกล้วยไม้สายพันธุ์เอียสกูล และบอม 17 ทั้งที่ตัดแปลงพันธุ์กรรมและกล้วยไม้ปกติ มาแล้วเป็นเวลา 1 ปี

สายพันธุ์	สายต้น	การงอก และ การเจริญเติบโตของผักกาดหอม			
		การงอก (%) ^{1/}	ความสูง (ซม.) ^{2/}	ความกว้างใบ (ซม.) ^{3/}	น้ำหนักสด (ก.) ^{4/}
เอียสกูล	AEC	80.0	32.2	6.8	13.5
	AE1	88.0	31.1	6.1	12.5
	AE2	80.0	30.8	6.2	10.0
	AE3	58.0	26.4	5.9	9.1
	AE4	64.0	29.1	6.3	8.4
	F-test	ns	ns	ns	ns
	C.V. (%)	2.2	1.2	0.5	1.7
บอม 17	ABC	88.0	18.5 ^c	4.7	2.6 ^d
	AB1	74.0	23.9 ^{bc}	5.8	5.2 ^{cd}
	AB2	76.0	29.0 ^{ab}	6.2	5.5 ^c
	AB3	72.0	26.2 ^{ab}	6.1	8.8 ^b
	AB4	72.0	32.1 ^a	6.8	12.9 ^a
	F-test	ns	*	ns	**
	C.V. (%)	1.9	1.0	0.9	1.4

^{1/} เปอร์เซ็นต์การงอก, ^{2/} ความสูงลำต้นวัดจากส่วนเหนือรากถึงปลายใบ, ^{3/} ความกว้างใบโดยวัดจากบริเวณกลางใบ, ^{4/} น้ำหนักสดทั้งต้นรวมราก

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบผลของวัสดุปลูกกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุกรรมที่มีต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ คือ เชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท ด้วยวิธี plate cultivation method

การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์รอบรากกล้วยไม้สกุลหวายด้วยวิธีการเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการ (plate cultivation method) เป็นวิธีวิเคราะห์ทางชีวภาพวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชตัดแปลงพันธุกรรม การทดลองนี้ได้ทดลองกับกล้วยไม้ 2 กลุ่ม คือ กล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* จำนวน 2 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 4 สายต้น และกล้วยไม้สกุลหวายปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 2 สายพันธุ์ คือ เอียสกุล และ บอม 17 การทดลองทำโดยการสุ่มตัวอย่างกาบมะพร้าวที่ใช้ปลูกกล้วยไม้สกุลหวายที่ผ่านการใช้งานมาแล้วเป็นระยะเวลาประมาณ 1 ปี มาแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยการสกัดด้วยสารละลาย phosphate buffer แล้วนำสารละลายที่ได้มาเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นสูตร Peptone Tryptone Yeast Extract Glucose (PTYG) เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท และอาหารสูตร Oxytetracycline Glucose Yeast Extract (OGYE) เพื่อตรวจสอบเชื้อรา

การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำสกัดวัสดุปลูกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลและ บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* และกล้วยไม้สกุลหวายปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (AEC และ ABC) ภายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งแสดงดังตารางที่ 10 พบว่า ในกล้วยไม้สายพันธุ์เอียสกุล ปริมาณแบคทีเรียรอบรากกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้ปกติ มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียรอบรากอยู่ในช่วง $25.3-60.0 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เชื้อรา $3.3-5.0 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีจำนวนแอคติโนมัยซีทอยู่ในช่วง $2.3-21.0 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่า ค่าเฉลี่ยประชากรจุลินทรีย์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ส่วนการประเมินผลกระทบของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์บอม 17 ที่ได้รับการตัดแปลงพันธุกรรมต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์รอบราก เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ผลการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รอบรากกล้วยไม้ พบว่า มีปริมาณเชื้อรารอบรากอยู่ในช่วง $2.0-5.0 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติสำหรับแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีทนั้น พบว่า มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียรอบรากอยู่ในช่วง $16.0-101.7 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และแอคติโนมัยซีทตรวจพบ $1.0-10.0 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งแม้ว่าค่าเฉลี่ยประชากรจุลินทรีย์จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละสายต้น แต่เมื่อพิจารณาโดยละเอียดจะพบว่า สายต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีจำนวนประชากรจุลินทรีย์อยู่

ในช่วงค่ากลางของประชากรจุลินทรีย์ในสายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้รับการถ่ายยีน และพบความแตกต่างนี้ เฉพาะในกล้วยไม้สายพันธุ์ บอม 17 เท่านั้น

เมื่อวิเคราะห์ในภาพรวมถึงผลของกล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้สกุลหวายปกติที่มีผลต่อประชากรจุลินทรีย์แล้วอาจกล่าวได้ว่า กล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้สกุลหวายปกติในสายพันธุ์เอียสกุล ส่งผลกระทบต่อปริมาณจุลินทรีย์รอบรากใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ จากผลปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รอบรากกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนดังกล่าวนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ไม่พบความแตกต่างของแบคทีเรียรอบรากพืชตัดแปลงพันธุกรรมชนิดอื่นด้วยเช่นกัน (Juraj and Faragova, 2010)

สำหรับในกล้วยไม้สกุลหวาย สายพันธุ์บอม 17 ซึ่งพบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รอบรากกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีความแตกต่างทางสถิติ แต่สายพันธุ์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีจำนวนประชากรจุลินทรีย์อยู่ในช่วงค่ากลางของประชากรจุลินทรีย์ในสายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้รับการถ่ายยีนนั้น ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวนี้เป็นไปในทำนองเดียวกับงานวิจัยของ Griffiths *et al.* (2000) ซึ่งพบว่า มันฝรั่งตัดแปลงพันธุกรรมซึ่งแม้ว่าจะมีผลลดจำนวนประชากรโปรโตซัว และแบคทีเรีย ต่างกัน ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อประชากรจุลินทรีย์ในภาพรวม และจากการศึกษาของ Griffiths *et al.* (2007) พบว่า ระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดส่งผลต่อประชากรและชนิดของแบคทีเรียรอบรากข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรมมากกว่าการตัดแปลงพันธุกรรมข้าวโพดด้วยยีน *Bt*

อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์รอบรากพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่พบว่ามี ความแตกต่างจากพืชปกติอยู่บ้าง อาจเกิดได้จากการที่พืชตัดแปลงพันธุกรรมมีลักษณะที่แสดงออก และลักษณะทางพันธุกรรมบางประการที่มีผลทางอ้อมทำให้โครงสร้างและชนิดของแบคทีเรียรอบรากแตกต่างไปจากพืชปกติ ดังเช่นการศึกษาของ Fang *et al.* (2007) ซึ่งพบว่า ต้นข้าวโพดที่ได้รับการถ่ายยีน *Bt* มีเปอร์เซ็นต์ลิกนินสูงกว่าต้นข้าวโพดปกติ มีผลทำให้อัตราส่วนของลิกนินต่อไนโตรเจนสูงขึ้น ส่งผลทางอ้อมให้ประชากรแบคทีเรียรอบรากเพิ่มมากขึ้น และ Lupwayi *et al.* (2007) ยังมีการรายงานไว้ว่า แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียรอบรากพืช น่าจะเกิดจากสถานที่ปลูก ระยะฟักตัวดิน ชนิดพืชปลูก และการจัดการแมลงศัตรูพืชที่ต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์มากกว่าผลจากการปลูกพืชตัดแปลงพันธุกรรม

ตารางที่ 10 ปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำสกัดวัสดุปลูกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล และบอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO และกล้วยไม้สกุลหวายปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (AEC และ ABC) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี plate cultivation method

สายพันธุ์	สายต้น	จำนวนประชากรจุลินทรีย์ (x 10 ⁴ เซลล์/มิลลิลิตร)		
		แบคทีเรีย	เชื้อรา	แอคติโนมัยซีท
เอียสกุล	AEC	54.7	4.0	7.7
	AE1	53.3	3.3	4.0
	AE2	25.3	4.0	2.3
	AE3	38.0	5.0	8.7
	AE4	60.0	5.0	21.0
	F-test	ns	ns	ns
	C.V. (%)	2.5	4.0	9.5
บอม 17	ABC	30.7 ^{bc}	2.0	4.3 ^{ab}
	AB1	16.0 ^c	2.0	1.0 ^b
	AB2	70.3 ^{ab}	2.0	1.3 ^b
	AB3	69.7 ^{ab}	2.3	3.3 ^b
	AB4	101.7 ^a	5.0	10.0 ^a
	F-test	**	ns	**
	C.V. (%)	2.5	6.1	5.4

AEC และ ABC คือ สายต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

AE1-AE4 และ AB1-AB4 คือ สายต้นที่ได้รับการถ่ายยีน

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันตามแนวดิ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น

99 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ในการศึกษาเพื่อประเมินการผลิตสารอัลลีโลพาติกจากกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรม โดยการศึกษาในประเด็นหลักคือ ผลทางอัลลีโลพาติต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอมและกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นการศึกษาที่มีความจำเป็นในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพในครั้งนี้ อาจกล่าวได้ว่า กล้วยไม้สกุลหวายตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ เอียสกุล และ บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* ไม่ผลิตสารที่ส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของผักกาดหอมและประชากรจุลินทรีย์ดิน แต่ยังคงพบว่า ในบางสายต้นส่งผลให้มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของประชากรจุลินทรีย์ดิน ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมบางสายต้น ไม่มีการผลิตสารที่มีผลลดจำนวนประชากรจุลินทรีย์ ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kowalchuk *et al.* (2003) ที่ได้ประเมินการตอบสนองของจุลินทรีย์ดินต่อพืชตัดแปลงพันธุกรรม สรุปว่า ผลกระทบของพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่อาจมีต่อจุลินทรีย์นั้นเป็นไปได้้น้อยมาก

การเกิดผลกระทบของพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่อาจมีต่อจุลินทรีย์นั้นหากจะเกิดขึ้นได้น่าจะเกิดใน 2 ลักษณะคือ พืชตัดแปลงพันธุกรรมอาจสร้างสารบางชนิดขึ้นแล้วสารดังกล่าวซึมผ่านออกมาทางรากของพืช แล้วส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งเกิดในกรณีที่พืชตัดแปลงพันธุกรรมนั้นถูกตัดแปลงให้มีการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชเพิ่มมากขึ้น (Kowalchuk *et al.*, 2003) หรืออาจเกิดจากกรณีที่การตัดแปลงพันธุกรรมของพืชอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพเนื้อเยื่อพืช และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืชดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ดินได้ (Escher *et al.*, 2000) นอกจากนี้ ในปี 2004 Dunfield และ Germida ได้รวบรวมงานวิจัยที่พิจารณาผลกระทบของพืชตัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธีการต่างๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนประชากรสิ่งมีชีวิตบริเวณรอบรากพืชตัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งผลสรุปได้ว่าการศึกษามากมายไม่แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของประชากรสิ่งมีชีวิตรอบรากของพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากพืชปกติ

ดังนั้น ผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า กล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล และบอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* ไม่น่าจะมีความเสี่ยงต่อความหลากหลายทางชีวภาพ ทั้งในด้านผลกระทบต่อพืชปลูกตามหลังและประชากรจุลินทรีย์ในวัสดุปลูก

การทดลองที่ 4 การศึกษารูปแบบของโครมาโทแกรมสารสกัดจากกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้สกุลหวายปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC)

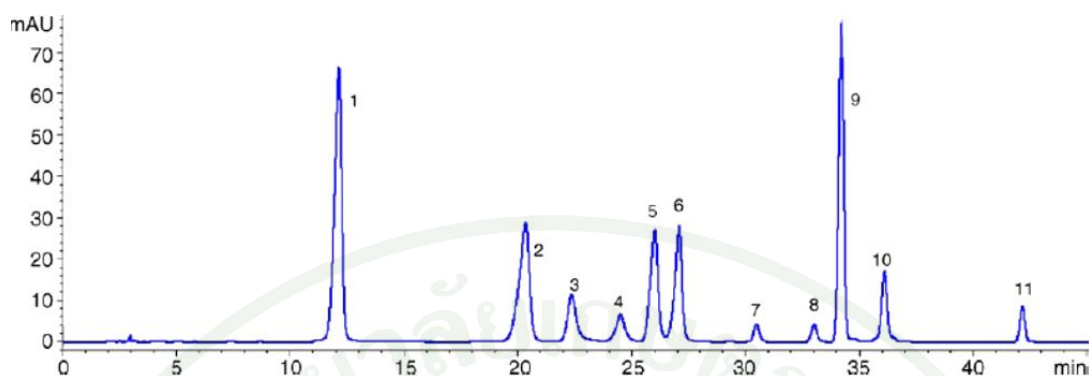
การวิเคราะห์โครมาโทแกรมของสารสกัดกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ทำโดยใช้ตัวอย่างใบแก่ใบล่างสุดในลำที่มีอายุมากที่สุด และจากดอกบานซึ่งสุ่มละจากดอกที่บานเต็มที่ 5 ดอกในแต่ละข้อ จากกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* และจากต้นกล้วยไม้สกุลหวายปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน อายุประมาณ 1 ปี ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ เอียสกุล และ บอม 17 ด้วยวิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Yang *et al.* (2006) แล้วทำการวิเคราะห์ผลด้วยวิธี high performance liquid chromatography โดยใช้ detector ชนิด photodiode array detector (HPLC-DAD) คอลัมน์ชนิด Luna 5U C18 ใช้ acetonitrile และ 0.01% trifluoroacetic acid ในอัตราส่วน 32 : 68 เป็นสารละลายตัวพา กำหนดอัตราการไหลของสารละลายตัวพาเป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดโดยใช้ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งองค์ประกอบของ HPLC mobile phase ใช้ส่วนผสมของ acetonitrile และ 0.01% trifluoroacetic acid ในน้ำเป็นสารละลายตัวพา ซึ่งรายงานการใช้พบว่า กรดช่วยให้ลักษณะของพีคมีความคมชัดมากขึ้น และช่วยส่งเสริมการแยกพีคสารทั้งหมดในกล้วยไม้สกุลหวาย (Yang *et al.*, 2006)

จากการทดลองนี้ สารสกัดจากส่วนใบและดอกของกล้วยไม้ถูกนำมาวิเคราะห์โดยวิธี HPLC-DAD เพื่อวิเคราะห์รูปแบบโครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีรายงานในปี 2006 โดย Yang *et al.* และ Zhang *et al.* ว่า กล้วยไม้สกุลหวายมีอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วย bibenzyls, phenanthrenes และ fluorenone เป็นองค์ประกอบหลัก และพบว่าสารบางชนิดมีสรรพคุณทางยา เช่น erianin และ moscatilin ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเนื้องอก การตกตะกอนของเกล็ดเลือด และช่วยควบคุมระบบภูมิคุ้มกันโรค ดังนั้นจึงสนใจศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในส่วนใบและดอกของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งโครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ในสารสกัดส่วนใบ และดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ เอียสกุล แสดงในภาพที่ 4 ส่วนผลการตรวจสอบในสายพันธุ์ บอม 17 แสดงในภาพที่ 5 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานในสารสกัดกล้วยไม้สกุลหวาย จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-DAD ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ภาพที่ 3) ซึ่งอ้างอิงจากงานวิจัยของ Yang *et al.* (2006) พบว่า กล้วยไม้สกุลหวายทุกสายพันธุ์แสดงการกระจายพีคของสารในลักษณะเดียวกัน ณ ค่า retention time ประมาณ 10 ถึง 35 นาที โดยสารสกัดจากใบแสดงพีคสารขนาดเล็กประมาณ 7 พีค ซึ่งเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Yang *et al.*

(2006) ให้ผลใกล้เคียงกับสาร 5 ชนิด คือ denchrysan A, moscatilin, gigantol, dengibsin และ moscatin ส่วนในสารสกัดจากดอกแสดงฟีดสารขนาดเล็กประมาณ 7 ฟีด และฟีดสารหลักอีก 3 ฟีด ที่มีค่าใกล้เคียงกับสาร 6 ชนิด คือ denchrysan A, erianthridin, moscatilin, confusarin, gigantol และ dengibsin แสดงให้เห็นว่า ในส่วนของดอกมีสารประกอบฟีนอลิกปริมาณสูงกว่าส่วนของใบกล้วยไม้ อย่างไรก็ตาม การระบุชนิดสารที่กล่าวแล้วนี้เป็นเพียงการเทียบเคียงกับงานที่มีมาก่อนแล้ว แต่ไม่สามารถระบุปริมาณสารที่แน่นอนได้ เนื่องจากการทดลองนี้ไม่มีค่าสารมาตรฐานที่ชัดเจน

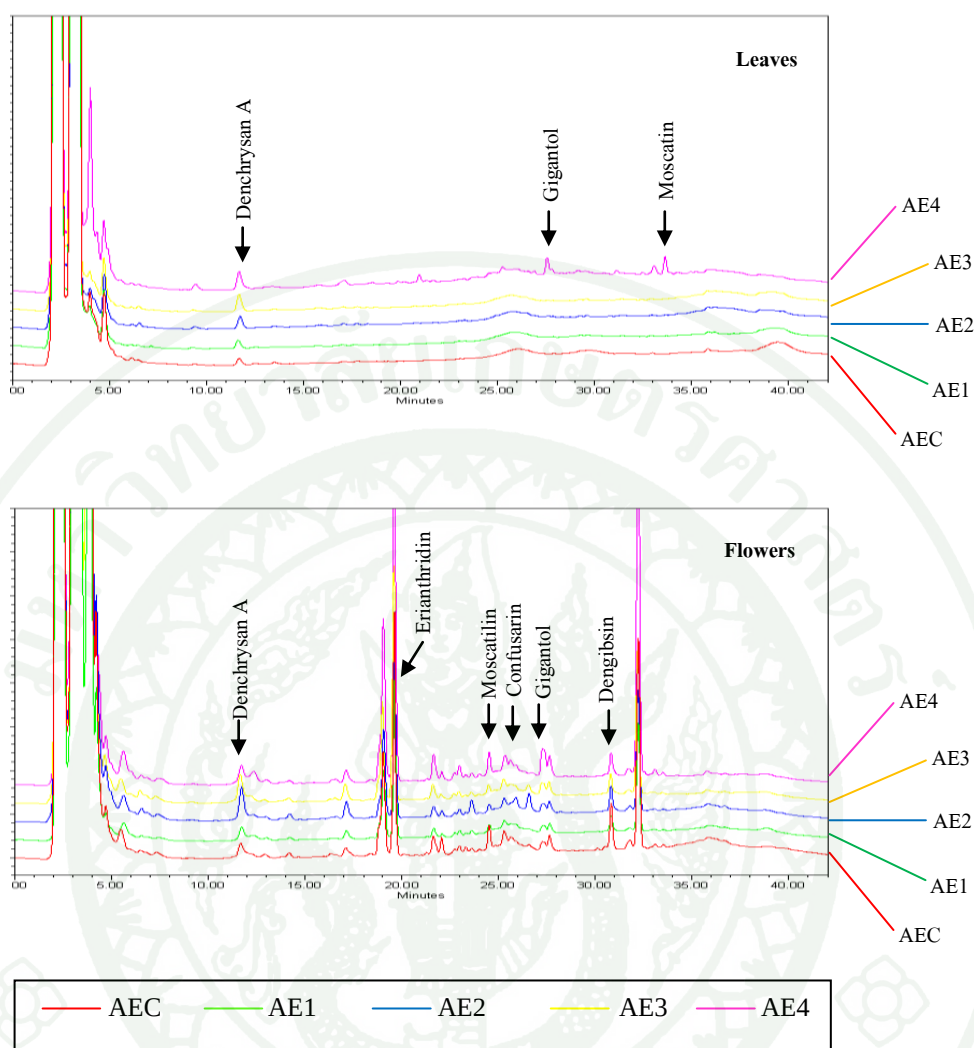
เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโครมาโทแกรมของกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า ลักษณะโครมาโทแกรมในแต่ละสายพันธุ์มีรูปแบบคล้ายกัน แสดงว่า มีองค์ประกอบและปริมาณของสารในกลุ่มฟีนอลิกที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวนี้สนับสนุนผลการทดลองที่ 1-3 ที่พบว่า เศษซากเนื้อเยื่อและวัสดุที่ใช้ปลูกของกล้วยไม้สกุลหวายคัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน antisense CPACO ไม่ส่งผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดหอมซึ่งใช้เป็นพืชปลูกตามหลัง และไม่ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์บริเวณรอบรากของกล้วยไม้

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ ประเทศไทยมีธุรกิจการค้าต้นกล้วยไม้สกุลหวายส่งออกไปยังประเทศจีน (Kong *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2012) โดยส่งออกเฉพาะส่วนลำต้นเทียม (pseudobulb) หรือที่ชาวสวนนิยมเรียกว่า ลำ เพื่อใช้ประโยชน์ในการนำไปสกัดสารบางชนิดซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัช ซึ่งการสกัดสารเหล่านี้ยังถูกปกปิดเป็นความลับทางการค้า แต่มีงานวิจัยบางงานที่มีการตีพิมพ์เผยแพร่ในกล้วยไม้สกุลหวายชนิดอื่นๆ เช่น การศึกษาใน *Dendrobium aurantiacum* var. *dennaeum* (Yang *et al.*, 2007) พบว่ามีสารประกอบกลุ่มฟีนอล ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญ ทั้งในพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก ได้แก่ moscatilin, gigantol, moscatin และ coumarin ดังนั้นในอนาคตหากสามารถวิเคราะห์รูปแบบโครมาโทแกรมจากส่วนของลำต้นเทียมได้ จะช่วยให้มีข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น ซึ่งนอกเหนือจากจะยืนยันว่า กล้วยไม้คัดแปลงพันธุกรรมที่ทดสอบนี้ไม่ส่งผลด้านลบในลักษณะของสารอัลลีโลพาติกแล้ว ยังเป็นข้อมูลเพื่อสนับสนุนการส่งออกต้นกล้วยไม้เพื่ออุตสาหกรรมยาอีกด้วย

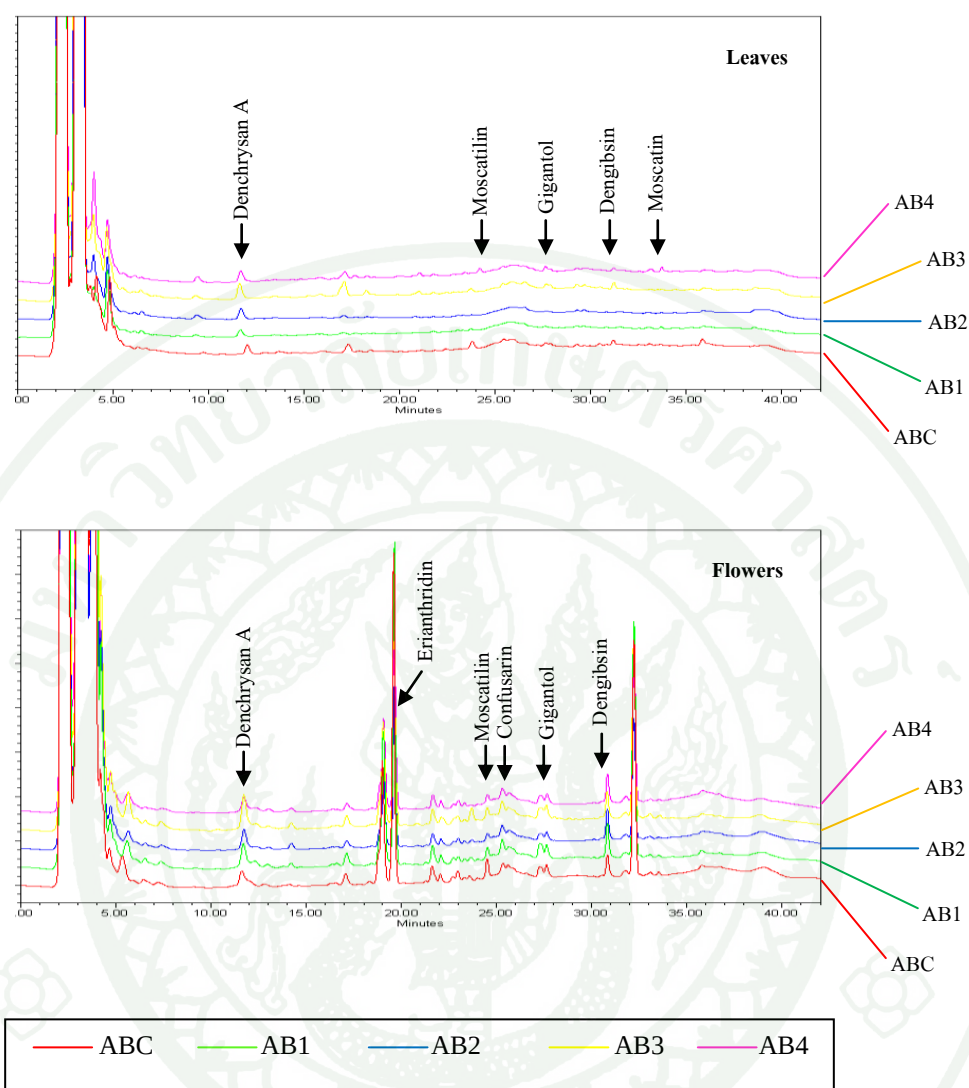


ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานในสารสกัดกล้วยไม้สกุลหวาย
จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC–DAD ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร:
(1) denchrysan A, (2) erianthridin, (3) dendroflorin, (4) moscatilin, (5) confusarin,
(6) gigantol, (7) dengibsin, (8) chrysotoxin, (9) moscatin, (10) erianin,
(11) chrysotobibenzyl

ที่มา: Yang *et al.* (2006)



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ในสารสกัดจากส่วนใบ และดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ เอียสกูล (AE) จากต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (AEC) และต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* จำนวน 4 สายต้น คือ AE1 AE2 AE3 และ AE4



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ในสารสกัดจากส่วนใบ และดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ บอม 17 (AB) จากต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ABC) และต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* จำนวน 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4

สรุปและข้อเสนอแนะ

การประเมินผลทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมเปรียบเทียบกับกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ เอียสกุล และบอม 17 ซึ่งเป็นวิธีการสำคัญประการหนึ่งของการตรวจสอบความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทั้งพืชปลูกตามหลัง และจุลินทรีย์รอบรากด้วยวิธีทางชีวภาพ พบว่า ในภาพรวมกล้วยไม้สกุลหวายมีผลทางอัลลีโลพาทียับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดหอม แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีนและกล้วยไม้สกุลหวายปกติ และปริมาณจุลินทรีย์รอบรากที่ตรวจนับได้จากทั้งทริทเมนต์ที่เป็นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่มีความแตกต่างกัน และเมื่อตรวจสอบลักษณะโครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิก พบว่ามีรูปแบบคล้ายกันด้วย ดังนั้น การถ่ายยีนไม่น่าจะมีผลต่อกิจกรรมทางอัลลีโลพาทีของกล้วยไม้ การมียีนไม่มีผลเด่นชัดต่อสิ่งมีชีวิตรอบรากกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมทุกสายต้น

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า กล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ เอียสกุล และบอม 17 ที่มียีน antisense CPACO นั้นมีระดับผลกระทบทางอัลลีโลพาทีต่อสิ่งแวดล้อมต่ำมาก อย่างไรก็ตาม การนำกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมออกปลูกในสภาพแวดล้อม จำเป็นต้องมีการประเมินความปลอดภัยในด้านต่างๆ อีกหลายด้าน เพื่อให้ได้ข้อมูลด้านการประเมินความปลอดภัยของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ครบถ้วนสมบูรณ์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กษมา ชูสังข์. 2550. การประเมินผลกระทบของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมต่อระบบนิเวศของเชื้อแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- คณะกรรมการเทคนิคด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ. 2556. แนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับการดำเนินงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่หรือพันธุวิศวกรรม (Biosafety Guidelines for Work Related to Modern Biotechnology or Genetic Engineering). พิมพ์ครั้งที่ 6. บริษัท พี.เอ. ลีฟวิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ.
- จรงค์ศักดิ์ พุมนวน และ มณฑินี ชีรารักษ์. 2555. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) ในการควบคุมหนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.). วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 30: 1-7.
- จรรยา มณีโชติ. 2544. อัลลีโลพาตี: ทางเลือกใหม่สำหรับควบคุมวัชพืช. วารสารวิทยาการวัชพืช: 17-25.
- ชาญ มงคล. 2536. ข้าว ตำราเอกสารวิชาการฉบับที่ 63. ภาคพัฒนาตำราและเอกสารวิชาการหน่วยศึกษานิเทศก์ กรมการฝึกหัดครู. โรงพิมพ์การศาสนา, กรุงเทพฯ.
- ดวงพร กันธโชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- ดวงพร สุวรรณกุล. 2543. ชีววิทยาวัชพืช: พื้นฐานการจัดการวัชพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2548. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- เบญญา ชุตินทราศรี. 2553. ปฏิบัติการเทคโนโลยีส่วนผสมอาหารสังเคราะห์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

ประธาน ประเสริฐวิทยาการ. 2543. จีเอ็มโอ: อาหาร ยา และพันธุกรรมบำบัดยุคใหม่. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, กรุงเทพฯ.

ปิยนุช ศรชัย. 2553. การแสดงออกของยีน *antisense papaya 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase* และการศึกษาลักษณะทางสรีระของกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รักษนก โคโต. 2549. การถ่ายยีน *antisense ACO* จากมะละกอเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริพรรณ สารินทร์. 2550. จุลชีววิทยาสังแวดล้อม. หจก. สามลดา, กรุงเทพฯ.

ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม. 2552. พันธุวิศวกรรม: วิธีการและการประยุกต์ใช้. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2551. พืชจีเอ็ม: คำถามแห่งศตวรรษ. ไทยเอฟเฟกต์สตูดิโอ, กรุงเทพฯ.

สมจินต์ สันถวัณย์. ม.ป.ป.. ประเทศไทยกับประเด็นยุทธศาสตร์ทางด้านพืช GMO. สถาบันยุทธศาสตร์การค้า. แหล่งที่มา:

http://www.seub.or.th/index.php?option=com_content&view=article&id=867:seubnews&catid=5:2009-10-07-10-58-20&Itemid=14, 19 สิงหาคม 2555.

สมชาติ หาญวงศา. 2542. ผลทางอัลลีโลพาธิของข้าวฟ่างและทานตะวันที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชปลูกและวัชพืชบางชนิดในระบบการปลูกพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2548. สารความรู้ อนุพันธุศาสตร์ (Essential Molecular Genetics) จีเอ็มโอ: สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม. บริษัทเท็กซ์แอนด์เจอร์นัลพับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

สายพิน ไชยนันท์. 2547. **จุลินทรีย์ดิน**. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2542. **พันธูวิศกรรมกับผลกระทบต่อสังคมไทย**. ศูนย์พันธูวิศกรรมและ เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. แหล่งที่มา:

<http://policy.biotech.or.th/web/db/attach/radF4237.pdf>, 7 เมษายน 2555.

Abdul-Rahman, A. and S.A. Habib. 2005. **Allelopathic Effect of Alfalfa (*Medicago sativa*) on Bladygrass (*Imperata cylindria*)**. Available source:

<http://www.springerlink.com/content/m025540744231436/>, December 1, 2013.

Ahmad, S., M. Arfan, A. L. Khan, R. Ullah, J. Hussain, Z. Muhammad, R. Khan, N. Khan and K. N. Watanabe. 2011. Allelopathy of *Teucrium royleanum* Wall. Ex Benth. from Pakistan. **J. Med. Plant. Res.** 5: 765-772.

Aida, R., K. Yoshida, K. Ichimura, G. Goto and M. Shibata. 1998. Extension of flower longevity in transgenic torenia plants incorporating *ACC oxidase* transgene. **Plant Sci.** 138: 91-101.

Anjum, A., U. Hussain, Z. Yousaf, F. Khan and A. Umer. 2010. Evaluation of allelopathic action of some selected medicinal plant on lettuce seeds by using sandwich method.

J. Med. Plant. Res. 4: 536-541.

Baruah, N.C., J.C. Sarma, N.C. Barua, S. Sarma and R.P. Sharma. 1994. Germination and growth inhibitory sesquiterpene lactones and a flavone from *Tithonia diversifolia*. **Photochem.** 36: 29-36.

Batish, D.R., K. Arora, H.P. Singh and R.K. Kohli. 2007. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. **Crop Protection** 26: 566-571.

- Conner, A.J., T.R. Glare and J.P. Nap. 2003. The release of genetically modified crops into the environment-Part II Overview of ecological risk assessment. **Plant J.** 33: 19-46.
- Dharmagadda, V.S.S., S.N. Naik, P.K. Mittal and P. Vasudevan. 2005. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. **Bioresour. Technol.** 96: 1235-1240.
- Diogo, L.C., R.S. Fernandes, S. Marcussi, D.L. Menaldo, P.G. Roberto, P.V.F. Matrangulo, P.S. Pereira, S.C. Franca, S. Giuliani, A.M. Soares and M.V. Lourenco. 2009. Inhibition of snake venoms and phospholipases A₂ by extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active coumestans. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 104: 293-299.
- Duke, S.O. and J. Lydon. 1993. **Natural Phytotoxins as Herbicides.** Amer Chem Soc. Washington DC.
- 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.
- _____. 2004. Impact of genetically modified crops on soil- and plant associated microbial communities. **J. Environ. Qual.** 33: 806-815.
- Escher, N., B. Kach and W. Nentwig. 2000. Decomposition of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize by microorganisms and woodlice *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). **Basic Appl. Ecol.** 1: 191-199.
- Fang, M., R.J. Kremer, P.P. Motavalli, R.J. Kremer and K.A. Nelson. 2007. Assessing changes in soil microbial communities and carbon mineralization in *Bt* and non-*Bt* corn residue-amended soils. **Appl. Soil Ecol.** 37: 150-160.

Fitter, A.. 2003. Making allelopathy respectable. **Science** 301: 1337-1338.

Fujii, Y.. 1994. Screening of allelopathic candidates by new specific discrimination and assessment methods for allelopathy, and the identification of L-dopa as the allelopathic substance from the most promising velvet bean (*Mucuna pruriens*).

Bull. Natl. Inst. Agro-Environ. Sci. Jpn. 10: 115-218.

_____, S.S. Parvez, M.M. Parvez, Y. Ohmae and O. Iida. 2003. Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. **Weed Bio. Manage.** 3: 233-241.

_____, T. Shibuya, K. Nakatani, T. Itani, S. Hiradate and M.M. Parvez. 2004. Assessment method for allelopathic effect from leaf litter leaches. **Weed Bio. Manage.** 4: 19-23.

Germida, J.. n.d.. **Microbial Communities Influenced by Transgenic Oilseed Rape.**

Department of Soil Science, University of Saskatchewan, Canada.

Golisz, A., B. Lata, S.W. Gawronski and Y. Fujii. 2007. Specific and total activities of the allelochemicals identified in buckwheat. **Weed Biol. Manage.** 7: 164-171.

Griffiths, B.S., I.E. Geoghegan and W.M. Roberson. 2000. Testing genetically engineered potato, producing lectins GNA and Con A, on non-target soil organisms and processes.

J. Appl. Ecol. 37: 159-170.

_____, L.H. Heckmann, S. Caul, J. Thompson, C. Scrimgeour and P.H. Krogh. 2007. Varietal effects of eight paired lines of transgenic *Bt* maize and near-isogenic non-*Bt* maize on soil microbial and nematode community structure. **Plant Biotechnol J.** 5: 60-68.

Hu, J.M., W.W. Fan, F. Dong, Z. Miao and J. Zhou. 2012. Chemical components of *Dendrobium chrysotoxum*. **Chin. J. Chem.** 30: 1327-1330.

- Inderjit, S. and S.O. Duke. 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta** 217: 529-639.
- James, C.. 2013. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013**. Available at: <http://www.isaaa.org/publications>, July 1, 2014.
- Jose, S. and A.R. Gillespie. 1998. Allelopathy in black walnut (*Juglans nigra* L.) alley cropping. II. Effects of juglone on hydroponically grown corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L. Merr.) growth and physiology. **Plant Soil** 203: 199-205.
- Joung, K.A. and I.M. Chung. 2000. Allelopathic potential of rice hulls on germination and seedling growth of barnyardgrass. **Agron. J.** 92: 1162-1167.
- Juraj, F. and N. Faragova. 2010. Community level physiological profiling of microorganism in the rhizosphere of transgenic plants-A review. **Nova Biotechnologica** 10: 137-156.
- Kaplan, S. and B. J. Garrick. 1981. On the quantitative definition of risk. **Risk Anal.** 1: 11-27.
- Kato-Noguchi, H.. 2003. Allelopathic substance in rice root exudates: rediscovery of momilactone B as an allelochemical. **Plant Physiol.** 161: 271-276.
- Kevin, L., C. Wang, L. Hai and R.E. Joseph. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell** 14: 131-151.
- Kikuchi, A., A. Kawaoka, T. Shimazaki, X. Yu, H. Ebinuma and K.N. Watanabe. 2006. Trait stability and environmental biosafety assessments on three transgenic eucalyptus lines (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, codA 12-5B, codA 12-5C, codA20-C) conferring salt tolerance. **Breeding Res.** 8: 17-26.

- _____, K.N. Watanabe, Y. Tanaka and H. Kamada. 2008. Recent progress on environmental biosafety assessment of genetically modified trees and floricultural plants in Japan. **Plant Biotechnol. J.** 25: 9-15.
- _____, X. Yu, T. Shimazaki, A. Kawaoka, H. Ebinuma and K.N. Watanabe. 2009. Allelopathy assessments for the environmental biosafety of the salt-tolerant transgenic *Eucalyptus camaldulensis*, genotypes codA 12-5B, codA 12-5C, and codA 20C. **Wood Sci. Technol.** 55: 149-153.
- Kong, J.M., N.K. Goh, L.S. Chia and T.F Chia. 2003. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. **Acta. Pharmacol. Sin.** 24: 7-21.
- Kowalchuk, G.A., M. Bruinsma and J.A. Veen. 2003. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants. **Trends Ecol. Evol.** 18: 403-410.
- Lorenzo, D., I. Loayza and E. Dellacassa. 2002. Composition of the essential oil of *Tagetes maxima* Kuntze from Bolivia. **Flavour Frag. J.** 17: 115-118.
- Lupwayi, N.Z., K.G. Hanson, K.N. Harker, G.W. Clayton, R.E. Blackshaw, J.T. O'Donovan, E.N. Johnson, Y. Gan, R.B. Irvine and M.A. Monreal. 2007. Soil Microbial biomass, Functional diversity and enzyme activity in glyphosate-resistant wheat-canola rotations under low-disturbance direct seeding and conventional tillage. **Soil Biol. Biochem.** 39: 1418-1427.
- McLean, M.A. and P.J. Charrest. 2000. The regulation of transgenic trees in North America. **Silvae Genet.** 49: 233-239.
- Mizutani, J.. 1989. Phytochemical ecology: allelochemicals, mycotoxins and insect pheromones and allomones, pp. 155–165. In C.H., Chou, G.R. Waller, eds. **Plant Allelochemicals and Their Roles**. Institute of Botany, Academia Sinica, Taipei.

- Morikawa, C.I.O., R.Miyaura, M.D. Figueroa, E.L. Salgado and Y. Fujii. 2012. Screening of 170 Peruvian plant species for allelopathic activity by using the sandwich method. **Weed Bio. Manage.** 12: 1–11.
- Nakamura, N., M. Fukuchi-Mizutani, Y. Katsumoto, J. Togami, M. Senior, Y. Matsuda, K. Furuichi, M. Yoshimoto, A. Matsunaga, K. Ishiguro, M. Aida, M. Tasaka, H. Fukui, S. Tsuda, S. Chandler and Y. Tanaka. 2011. Environmental risk assessment and field performance of rose (*Rosa x hybrida*) genetically modified for delphinidin production. **Plant Biotechnol. J.** 28: 251–261.
- Parejo, I., J. Bastida, F. Viladomat and C. Codina. 2005. Acylated quercetagenin glycosides with antioxidant activity from *Tagetes maxima*. **Phytochemistry** 66: 2356-2362.
- Pukclai, P. and H. Kato-Noguchi. 2010. Screening of allelopathy activity of eleven Thai medical plants on seedling growth of five test plant species. **Asian J. Plant Sci.** 9: 486-491.
- Putnam, A.R.. 1985. Weed allelopathy, pp. 131-155. In S.O. Duke, ed. **Weed Physiology, Reproduction and Ecophysiology**. Florida: CRC press, Inc.
- Qasem, J. R.and N. N. Issa. 2010. **Allelopathic effects of squash (*Cucurbita pepo* L. cv. scarlette) on certain common weed species in Jordan**. Available source: http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/1/2630_qasemj.htm, September 7, 2014.
- Rice, E.L.. 1984. **Allelopathy**. 2nd ed. Academic Press, New York.
- Rieger, A.M., C.Preston and B.S. Powles. 1999. Risks of gene flow from transgenic herbicide-resistant canola (*Brassica napus*) to weedy relatives in southern Australian cropping system. **Aust. J. Agric. Res.** 50: 115-128.

- Rizvi, S.J.H. and V. Rizvi. 1992. **Allelopathy Basic and Applied Aspect**. Chapman and Hall, London.
- Ronse, A., D. H. Pooter and M. Proft. 1997. Essential oils of *Otacanthus*. **Phytochemistry** 6: 1365-1368.
- Shiraishi, M., A. Sekiguchi, A.J. Oates, M.J. Terry and Y. Miyamoto. 2002. HOX gene clusters are hotspots of *de novo* methylation in CpG islands of human adenocarcinomas. **Oncogene** 21: 3659–3662.
- Siciliano, S.D. and J.J. Germida. 1999. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. **FEMS Microbiol. Ecol.** 29: 263-272.
- Soule, J.A.. 1993. *Tagetes minuta*: A potential new herbs from South America, pp. 649-654. In J. Janick and J.E. Simon, eds. **New Crops**. Wiley, New York.
- Taniguchi, T., Y. Ohmiya, M. Kurita, M. Tsubomura, T. Kondo, Y.W. Park, K. Baba, T. Hayashi. 2008. Biosafety assessment of transgenic poplars overexpressing xyloglucanase (AaXEG2) prior to field trials. **J. Wood Sci.** 54: 408-413.
- Tatsuzawa, F., T. Yukawa, K. Shinoda and N. Saito. 2005. Acylated anthocyanins in the flowers of genus *Dendrobium* section *Phalaenanth* (Orchidaceae). **Biochem. Syst. Ecol.** 33: 625-629.
- Tereschuk, M.L., M.V.Q. Riera, G.R. Castro and L.R Abdala. 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. **J. Ethnopharmacol.** 56: 227-232.
- Yang, L., Z.T. Wang and L.S. Xu. 2006. Simultaneous determination of phenols (bibenzyl, phenanthrene, and fluorenone) in *Dendrobium* species by high-performance liquid chromatography with diode array detection. **J. Chrome. A** 1104: 230-237.

- _____, Y. Wang, G. Zhang, F. Zhang, Z. Zhang, Z.T. Wang and L.S. Xu. 2007. Simultaneous quantitative and qualitative analysis of bioactive phenols in *Dendrobium aurantiacum* var. *denneanum* by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry and diode array detection. **Biomed. Chromatogr.** 21: 687–694.
- Yu, X., A. Kikuchi, T. Shimazaki, A. Yamada, Y. Ozeki, E. Matsunaga, H. Ebinuma and K.N. Watanabe. 2013. Assessment of the salt tolerance and environmental biosafety of *Eucalyptus camaldulensis* harboring a *mangrin* transgene. **J. Plant Res.** 126: 141-150.
- Zhang, G., F. Zhang, L. Yang, E. Zhu, Z.T. Wang, L. Xu and Z. Hu. 2006. Simultaneous analysis of *trans*- and *cis*-isomers of 2-glucosyloxycinnamic acids and coumarin derivatives in *Dendrobium thyrsiflorum* by high-performance liquid chromatography (HPLC)-photodiode array detection (DAD)-electrospray ionization (ESI)-tandem mass spectrometry (MS). **Anal. Chim. Acta.** 571:17–24.



ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสูตร Peptone Tryptone Yeast Extract Glucose (PTYG)
สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีท

องค์ประกอบ	กรัมต่อลิตร
Bacto Peptone	0.25
Bacto Tryptone	0.25
Yeast Extract	0.50
Glucose	0.50
MgSO ₄ 7H ₂ O	30 mg/ml
CaCl ₂ 2H ₂ O	3.5 mg/ml
Bacto Agar	15

ที่มา: Yu *et al.* (2013)

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบของอาหารสูตร Oxytetracycline Glucose Yeast Extract (OGYE)
สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อรา

องค์ประกอบ	กรัมต่อลิตร
Yeast Extract	5
Glucose	20
Biotin	0.1 mg/ml
Bacto Agar	12
Tetracycline	50 mg/ml

ที่มา: Yu *et al.* (2013)

ตารางผนวกที่ 3 การเตรียมสารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (acidity)	15 mM
Na_2HPO_4	15mM
ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย NaOH	

ที่มา: Yu *et al.* (2013)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวชมภูณัฐ ลีประสาท
วัน เดือน ปี ที่เกิด 1 กันยายน พ.ศ. 2532
สถานที่เกิด จังหวัดนครปฐม
ประวัติการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร)
เกียรตินิยมอันดับ 1 ปีการศึกษา 2553
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ทุน/การสนับสนุนการศึกษาที่ได้รับ

บัณฑิตผู้ช่วยวิจัย ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถึง เดือนตุลาคม
พ.ศ. 2555
ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ