รายงานความก้าวหน้าการวิจัยครั้งที่ 1

ตุลาคม พ.ศ. 2555 ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2555

แผนงานวิจัย

การพัฒนาคุณภาพของผลมะละกอสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศไทย

Fruit quality development of economical papaya varieties in Thailand

กลุ่มทุนเรื่อง การเพิ่มมูลค่าสินค้าการเกษตรเพื่อการส่งออกและนำเข้า
แผนงาน การวิจัยที่เกี่ยวกับการเพิ่มมูลค่าสินค้าทางการเกษตรและเพิ่มผลผลิตภาคการผลิตเพื่อพัฒนาศักยภาพการส่งออกในกลุ่มสินค้าที่สร้างรายได้หลักจากการส่งออกและสร้างรายได้ให้กับชุมชน

คณะผู้วิจัย

นางปาริชาติ เบิร์นส	**ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ**
นายธนพล ไชยแสน	**ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน**
นางสาวสิริกุล วะสี	**ศูนย์พืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน**
นางสาวเกียรติสุดา เหลืองวิลัย	**ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน**
นายจริงแท้ ศิริพานิช	**ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ พศ. ๒๕๕๕

รายงานความก้าวหน้าของการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) ความหลากหลายของยีนในกระบวนการสร้างสีในมะละกอสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางการค้า

(ภาษาอังกฤษ)Genetic diversity of colour related genes in commercial varieties of *Carica papaya* L.

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 จำนวนเงิน 820,500 บาท

ระยะทำการวิจัย 1 ปี เริ่มทำงานวิจัยเมื่อ ตุลาคม พ.ศ. 2555 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2556

รายงานควมก้าวหน้าของการวิจัย ครั้งที่ 1 ระหว่าง ตุลาคม พ.ศ. 2555 ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2555

ชื่อหัวหน้าโครงการและคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ ดร. ปาริชาติ เบิร์นส

ตำแหน่ง นักวิจัย

หน่วยงาน ห้องปฏิบัติการวิจัยด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

โทรศัพท์ (034)282494 ต่อ 601 โทรสาร (034)282494 ต่อ 601

E-mail p.burns@biotec.or.th

ผู้ร่วมงานวิจัย 1

ชื่อ ดร. ธนพล ไชยแสน

ตำแหน่ง นักวิจัย

หน่วยงาน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ถนนมาลัยแมน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

โทรศัพท์ (034)282494 ต่อ 321 โทรสาร (034)282498

E-mail: kpstpc@ku.ac.th

ผู้ร่วมงานวิจัย 2

ชื่อ ดร.สิริกุล วะสี

ตำแหน่ง หัวหน้าศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน

หน่วยงาน ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

โทรศัพท์ 034-281509, 034-281389 โทรสาร 034-351393

E-mail: rdisrw@ku.ac.th

ปาริชาติ เบิร์นส

หัวหน้าโครงการ

23/11/2555

บทคัดย่อ

สารในกลุ่มคาโรทีนอยด์เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้ผลไม้มีสี และเพิ่มคุณค่าทางอาหาร การสร้างสารคาโรทีนอยด์มีหลายขั้นตอน และผลิตสาร อาทิ ไลโคปีน เบต้าคาโรทีน ซึ่งชนิดและปริมาณสารที่พบทำให้เกิดความแตกต่างของสีเนื้อผลในมะละกอ ในการศึกษาความหลากหลายของยีน รวบรวมและวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในกระบวนการสร้างสารคาโรทีนอยด์ โดยการเปรียบเทียบกับจีโนมของมะละกอ Genbank database และ protein database โดยใช้โปรแกรม BLAST ผลการศึกษาแสดงว่ายีนในกระบวนการสร้างสารคาโรทีนอยด์ส่วนใหญ่ปรากฏเพียง 1 ตำแหน่งในจีโนมของมะละกอ ข้อมูลที่ได้นำไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำนวน 59 คู่

Abstract

Carotenoids are important components in fruits and contributing to its colour and nutrient content. There are several steps in carotenoid biosynthetic pathway producing several molecules such as lycopene and beta-carotene. The presence and concentration of these molecules are directly influent the flesh color of papaya fruit. In order to investigate the polymorphism, carotenoid DNA sequences were retrieved. They were analyzed by comparing with sequences in papaya genome database, genbank database and protein database using BLAST. The results suggested that all carotenoid synthetic genes except one presented as a single copy in papaya genome. The outcome was used to design fifty-nine pairs of primers.

รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

1. ความเป็นมาหลักการ เหตุผล และวัตถุประสงค์

มะละกอ (*Carica papaya* Linn.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ในปี 2551ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตมะละกอเป็นอันดับ 9 ของโลก และจากข้อมูลในปี 2550 พบว่ามะละกอมีพื้นที่ปลูกทั้งหมด 33,036 ไร่ และมีผลผลิตรวม 124,525 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร 2549) ซึ่งผลผลิตที่ได้นี้ยังไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาด โดยผลผลิตมากกว่า 90% ถูกใช้ในประเทศ และที่เหลือถูกส่งออกทั้งในรูปผลสดและแปรรูป (ประมาณ 4,000 ตัน) ซึ่งการส่งออกมะละกอนั้นมีมูลค่ากว่า 100 ล้านบาท (กรมศุลกากร, 2550) อย่างไรก็ตาม มะละกอที่ใช้ในทางการค้า ยังขาดมาตรฐานของสายพันธุ์ และคุณภาพที่สม่ำเสมอของผลผลิต โดยเฉพาะสีเนื้อของมะละกอ ซึ่งความต้องการของตลาดเป็นสีแดง และสีเหลือง นอกจากนั้นข้อมูลองค์ประกอบที่สำคัญทางโภชนาการที่มีรายงานเป็นของมะละกอสายพันธ์ต่างประเทศ (Wall, 2006) แต่สำหรับประเทศไทยข้อมูลเหล่านี้ยังมีอยู่น้อยมาก (Puwastien et al, 2000) มะละกอที่ปลูกต่างพื้นที่และมีสีเนื้อที่ต่างกันถูกเรียกชื่อต่างกัน ทั้งๆ ที่มีจีโนมิกส์ดีเอ็นเอชุดเดียวกัน หรือมีการปลูกมะละกอต่างสายพันธุ์ในพื้นที่เดียวกันและมีสีของเนื้อมะละกอที่เหมือนกันแต่คนในพื้นที่ใช้ชื่อพันธุ์ทั้งสองเป็นพันธุ์เดียวกัน ซึ่งในปัจจุบันพบว่าก็ยังไม่มีมาตรฐานที่ใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์นอกจากลักษณะสัณฐาน และปัญหาเหล่านี้ได้กระทบต่อความสม่ำเสมอของคุณภาพของผลมะละกอ ราคา และทำให้เกิดความล่าช้าและยากลำบากในการปรับปรุงพันธุ์

การศึกษาครั้งนี้มีเป้าหมายในการค้นหาความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคาโรทีนอยด์ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับการสร้างสีเนื้อมะละกอ ที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์มะละกอ และเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นมานี้ยังสามารถนำมาใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์มะละกอ ให้มีลักษณะสีเนื้อที่ตรงกับความต้องการของตลาดการส่งออกและการแปรรูปในอนาคต โดยเป็นการเพิ่มมูลค่าของไม้ผลไทย เพื่อตอบสนองยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550 -2554) คือยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุลและยั่งยืนเป็นการปรับโครงสร้างการผลิตเพื่อเพิ่มผลิตภาพ และคุณค่าของสินค้าและบริการบนฐานความรู้และความเป็นไทย รวมทั้งตอบสนองนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2555 – 2559) ในยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 2 การสร้างศักยภาพและความสามารถเพื่อการพัฒนาทางเศรษฐกิจ โดยใช้กลยุทธการสร้างมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรและการพัฒนาศักยภาพในการแข่งขันและการพึ่งพาตนของสินค้าเกษตร ของผลไม้ และเป็นการรักษาคุณภาพและการจัดการผลผลิต

2. ผลการดำเนินงานที่ได้ทำไปแล้ว

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์มะละกอ

รวบรวมสายพันธุ์มะละกอจากแหล่งปลูกทั่วประเทศและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง นำมาปลูกในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ.นครปฐม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ทำการปลูกมะละกอสายพันธุ์ละ 5 ต้น จำนวน 15 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) นอกจากนั้นยังใช้สายพันธุ์เม็กซิโก จากศูนย์ไม้ผลเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ใน

การศึกษาด้วย ดังนั้นสำหรับการศึกษาครั้งนี้ มีมะละกอทั้งหมด 16 สายพันธุ์ ที่นำมาใช้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม และลักษณะสีของเนื้อมะละกอ

นำมะละกอสายทุกสายพันธุ์จากตารางที่ 1 มาเพาะปลูกโดยการเพาะเมล็ดมะละกอในดินผสม ขุยมะพร้าว ดินและมูลวัว อัตรา 1:1:1 และย้ายปลูกเมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 4 สัปดาห์ เมื่อต้นกล้ามะละกอมีใบจริงประมาณ 7 - 5 ใบ หรืออายุประมาณ 2 - 1 เดือน ให้ปุ๋ยสูตร 0-0-46 ในช่วงบำรุงต้น และใช้ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ในช่วงเริ่มติดผล จำนวน 2 ครั้ง/เดือน ทำการปลูกมะละกอ โดยเว้นระยะห่างระหว่างต้น 2 เมตร ตามระยะการปลูกจริงของเกษตรกร ช่วงแรกให้ปุ๋ยสูตรเสมอ (15-15-15) เมื่อมะละกอออกดอกเปลี่ยนเป็นสูตร (24-24-8) ดูแลให้ได้น้ำสม่ำเสมอ แต่ไม่ท่วมขัง เมื่อพบต้นมะละกอที่เป็นโรคทำการกำจัดทิ้ง เก็บผลมะละกอเพื่อทำการเก็บข้อมูลลักษณะสีของเนื้อมะละกอของแต่ละสายพันธุ์

ตารางที่ 1 สายพันธุ์มะละกอที่ทำการรวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย

ลำดับที่	**สายพันธุ์**	**เฉดสีของเนื้อผลสุก* (เหลือง/ส้ม/ส้มแดง)**
1	เร็ดเลดี้	ส้มแดง
2	ฮวนโกล	เหลือง
3	แขกดำ	ส้มแดง
4	แขกนวล	ส้ม
5	ครั่งเหลือง	เหลือง
6	ครั่ง	ส้ม
7	ปลักไม้ลาย	ส้ม
8	เร็ดคาริเบียน	ส้มแดง
9	โกโก้	ส้มแดง
10	กลางดง	ส้ม
11	ขอนแก่น80	ส้มแดง
12	เม็กซิโก-เกษตร	ส้มแดง
13	ซันเซ็ตโซโล	ส้มแดง
14	พันธุ์ป่าก้านเขียว**	ส้มแดง
15	พันธุ์ป่าก้านม่วง***	ส้มแดง

*ประเมินด้วยสายตา

** และ *** เป็นสายพันธุ์ที่รวบรวมโดย ดร.สิริกุล วะสี และคณะ

2.1.2 การรวบรวมข้อมูลสายดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล และการวิเคราะห์สายดีเอ็นเอต้นแบบ

2.1.2.1 รวบรวมข้อมูลสายดีเอ็นเอของยีนในกระบวนการสร้างคาโรทีนอยด์ของมะละกอ

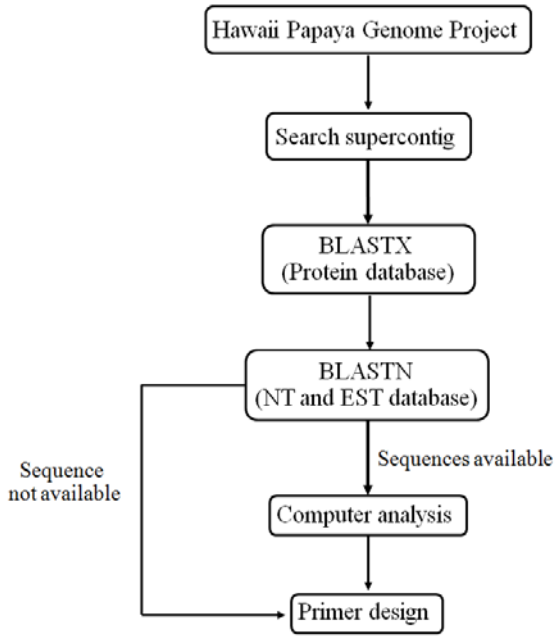
โดยใช้ฐานข้อมูลพันธุกรรม Hawaii Papaya Genome Project (www.phytozome.net/papaya.php) และ ตรวจสอบความถูกต้องของยีนเป้าหมาย ว่าสามารถสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในกระบวนการสร้างสีในผลมะละกอหรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ Genbank Database (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

2.1.2.2 ค้นหาสายดีเอ็นเอของมะละกอในฐานข้อมูล NT และ EST (NCBI)

หาสายดีเอ็นเอของมะละกอจากสายพันธุ์ต่างๆ ตรงตำแหน่งเดียวกับสายดีเอ็นเอเป้าหมายที่คัดเลือกมาจาก Hawaii Papaya Genome Project ด้วย BLASTN analysis (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เปรียบเทียบสายดีเอ็นเอเป้าหมายกับสายดีเอ็นเอที่ได้จากการค้นหาในฐานข้อมูล NT และ EST ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อค้นหาตำแหน่งที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม CodonCode Aligner เมื่อพบตำแหน่งที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมบนสายดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำการออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม เพื่อจำลองดีเอ็นบริเวณดังกล่าวสำหรับการตรวจสอบความถูกต้อง (ภาพที่ 1)

2.1.2.3 ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้สำหรับการจำลองสายดีเอ็นเอในมะละกอ

ข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะละกอ โดยการออกแบบไพรเมอร์นั้น ไพรเมอร์แต่ละตัวต้องมี Tm (melting temperature) ที่สูงกว่า 48 °C แต่ไม่สูงเกิน 68 °C และคู่ของไพรเมอร์ต้องมีความแตกต่างของ Tm ไม่เกิน 2 °C การออกแบบไพรเมอร์จะใช้โปรแกรม Generunner หลังจากออกแบบไพรเมอร์เสร็จแล้ว นำลำดับดีเอ็นเอของไพร์เมอร์แต่ละตัวไปตรวจสอบกับข้อมูลจีโนมิกดีเอ็นเอของมะละกอ (www.phytozome.net/papaya.php) เพื่อให้แน่ใจว่าไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบจะมีความจำเพาะกับสายดีเอ็นเอเป้าหมายเท่านั้น ในกรณีที่ไม่พบสายดีเอ็นเอตรงตำแหน่งเป้าหมายจากฐานข้อมูล NT และ EST ทำการออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย เพื่อทำการจำลองสายดีเอ็นเอเพื่อค้นหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยวิธี re-sequencing



ภาพที่ 1 การวิเคราะห์สายดีเอ็นเอต้นแบบที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกับการสร้างสีมะละกอ และการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม

2.1.3 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบมะละกอ

เก็บตัวอย่างใบอ่อนมะละกอสายพันธุ์ต่าง ๆ สายพันธุ์ละ 4 ซ้ำ เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ ทำการบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว และทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNeasy Plant mini kit (QAIGEN, Germany) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยวิธี gel eletrophoresis และ spectrophotometry

2.2 ผลการทดลอง

2.2.1 การคัดเลือกสายพันธุ์มะละกอ

คัดเลือกสายพันธุ์มะละกอจำนวน 15 สายพันธุ์ นำมาปลูกลงในแปลงทดลองโดยนำเมล็ดมาเพาะในดินผสม (ขุยมะพร้าว ดิน และมูลวัว อัตราส่วน 1:1:1) เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 1 เดือนทำการย้ายลงปลูกในถุงดำ และเมื่ออายุประมาณ 2 เดือนจึงทำการย้ายลงแปลงปลูก (ภาพที่ 2) เพื่อเก็บข้อมูลลักษณะคุณภาพผลหลังการเก็บเกี่ยว

ภาพที่ 2 แสดงการปลูกมะละกอสายพันธุ์ต่าง ๆ สำหรับเก็บข้อมูลลักษณะสีเนื้อมะละกอ

2.2.2 การรวบรวมข้อมูลสายดีเอ็นเอต้นแบบจากฐานข้อมูลจีโนมของมะละกอ

จากการรวบรวมข้อมูลสายดีเอ็นเอจาก Hawaii Papaya Genome Project ซึ่งเป็นฐานข้อมูลจีโนมิกดีเอ็นเอของมะละกอที่ได้การการทำ whole genome sequencing ของมะละกอพันธุ์ Sunup พบว่ามีสายดีเอ็นเอทั้งหมด 8 ชุดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสีในเนื้อมะละกอ (ตารางที่ 2) โดยแต่ละเอ็นไซม์จะพบดีเอ็นเอเป้าหมายเพียง 1 ตำแหน่งบนจีโนมมะละกอ ยกเว้นเอนไซม์ 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase

ตารางที่ 2 สายดีเอ็นเอเป้าหมายจาก Hawaii Papaya Genome Project ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสีในผลมะละกอ

Enzyme	DNA sequences from Hawaii Papaya Genome Project
9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	Supercontig 77
	Supercontig 90
Beta carotene hydroxylase	Supercontig 107
Lycopene beta cyclase	Supercontig 195
Lycopene epsilon cyclase	Supercontig 28
Violaxanthin de-epoxidase	Supercontig 51
Zeaxanthin epoxidase	Supercontig 55
Zeta carotene desaturase	Supercontig 117

เมื่อตรวจสอบหาจำนวนซ้ำของสายดีเอ็นเอเป้าหมายเหล่านี้บนจีโนมของมะละกอ โดยการเปรียบเทียบสายดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้จากฐานข้อมูลของมะละกอ พบว่า สายดีเอ็นเอเป้าหมายมีบางส่วนที่มีความเหมือนกับสายดีเอ็นเอตรงบริเวณอื่นบนจีโนมของมะละกอ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ตำแหน่งบนจีโนมของมะละกอที่มีลำดับเบสเหมือนกับสายดีเอ็นเอเป้าหมาย

Supercontig	Duplicate sequence	E. value	Identity
Supercontig 77	Supercontig 246	0.0	72.8% (1064/1461)
Supercontig 90	Supercontig 246	1.89e-3	88.9% (32/36)
Supercontig 107	Supercontig 37	3.21e-4	67.7% (128/189)
Supercontig 195	Supercontig 34	1.1e-43	86.7% (130/150)
Supercontig 28	Supercontig 17	1.9e-67	76.4% (259/339)
Supercontig 51	Supercontig 63	2.1e-19	77.0% (114/148)
Supercontig 55	-	-	-
Supercontig 117	Supercontig 40	4e-176	82.5% (520/630)

อย่างไรก็ตาม สายดีเอ็นเอที่มีความเหมือนกับสายดีเอ็นเอเป้าหมาย เป็นเพียงสายดีเอ็นเอสั้น ๆ ไม่เกิน 100 คู่เบส ยกเว้นตำแหน่งที่เหมือนกันระหว่าง supercontig 77 กับ supercontig 246 ที่มีความยาวเกิน 1,000 คู่เบส และตำแหน่งที่เหมือนกันระหว่าง supercontig 117 กับ supercontig 40 ที่มีความยาวเกิน 500 คู่เบส จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี BLASTX analysis เพื่อยืนยันว่าสายดีเอ็นเอ

เป้าหมายและที่สายดีเอ็นเอมีมีความเหมือนกับสายดีเอ็นเอเป้าหมายนั้น เป็นส่วนที่สร้างเอ็นไซม์ตามตารางที่ 3

2.2.3 การตรวจสอบการแสดงออกของสายดีเอ็นเอเป้าหมายด้วย BLASTX analysis

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสายดีเอ็นเอที่รวบรวมมาจาก Hawaii Papaya Genome Project (ตารางที่ 2) รวมถึง supercontig 246 และ40 ที่เป็นสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคล้ายกับ supercontig 77 และ 117 ว่าเป็นสายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอ็นไซม์สำหรับกระบวนการสร้างสีในผลมะละกอหรือไม่ โดยนำข้อมูลสายดีเอ็นเอทั้ง 10 ชุด ไปตรวจสอบกับ Protein database (NCBI) ด้วย BLASTX analysis (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์สายดีเอ็นเอต้นแบบด้วย BLASTX analysis เปรียบเทียบกับ Protein database

	Accession	Description	E-value	Identity
Supercontig 77	AER70359.1	Putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3 (*Citrus Vinifera*)	0.0	82%
	ABC26013.1	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3 (*Citrus clementina*)	0.0	82%
	AFP28804.1	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3 (*Vitis vinifera*)	0.0	80%
Supercontig 246	ABC26010.1	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 5 (*Citrus clementina*)	0.0	80%
	BAE92962.1	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (*Citrus limon*)	0.0	79%
	BAE92960.1	9-cis-epoxycarotenoid-dioxygenase (*Citrus unshiu*)	0.0	79%
Supercontig 90	ABC26011.1	Carotenoid cleavage dioxygenase 4a (*Citrus clementina*)	0.0	78%
	XP_002519944.1	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, putative (*Ricinus communis*)	0.0	78%
	AFJ94675.1	Carotenoid cleavage dioxygenase 4a	0.0	77%
Supercontig 107	ADZ14893.1	Beta-carotein hydroxylase (*Carica papaya*)	9e-81	100%
	AFI09272.1	Beta-carotein hydroxylase (*Gardenia Jasminoides*)	5e-38	96%
	XP_002513654.1	Beta-carotein hydroxylase, putative (*Ricinus communis*)	3e-36	100%
Supercontig 195	ACR61334.1	Lycopene beta-cyclase 2 (*Carica papaya*)	0.0	100%
	ACR61335.1	Lycopene beta-cyclase 2 (*Carica papaya*)	0.0	100%
	XP_00252387.1	Capsanthin/capsorubin synthase (*Ricinus communis*)	0.0	79%
Supercontig 28	BAF79549.1	Lycopine epsilon-cyclase (Chrysanthemum x *morifolium*)	7e-26	95%
	AAG10428.1	Epsilon cyclase (*Taqetes erecta*)	9e-27	92%
	AAM45382.1	Epsilon cyclase (*Taqetes erecta*)	7e-27	92%
Supercontig 51	XP_002267152.1	Violaxanthin de-epoxidase (*Vitis vinifera*)	2e-85	94%
	AFP28802.1	Violaxanthin de-epoxidase 1 (*Vitis vinifera*)	6e-85	94%
	CAN76137.1	Hypothetical protein (*Vitis vinifera*)	1e-84	94%
Supercontig 55	XP_002523587.1	Zeaxanthin epoxidase (*Ricinus communis*)	2e-47	95%
	O81360.1	Zeaxanthin epoxidase	3e-43	92%
	BAI79260.1	Zeaxanthin epoxidase (*Citrus sinensis*)	3e-41	95%
Supercontig 117	ACO40527.1	Zeta-carotene desaturase (*Carica papaya*)	9e-68	100%
	ABG72803.2	Zeta-carotene desaturase protein (*Carica papaya*)	1e-67	100%
	AFP28797.1	Zeta-carotene desaturase 1 (*Vitis vinifera*)	2e-62	93%
Supercontig 40	-	No significant similarity found	-	-

จากตารางที่ 4 พบว่า สายดีเอ็นเอที่ได้จากการรวบรวมมาจาก Hawaii Papaya Genome Project เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สร้างเอ็นไซม์เป้าหมาย ยกเว้น supercontig 90 ที่คาดหมายว่าจะสังเคราะห์เอ็นไซม์ 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase แต่ผลจาก BLASTX analysis พบว่า supercontig 90 เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์เอนไซม์ carotenoid cleavage dioxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสีในผลมะละกออีกชนิดหนึ่ง นอกจากนั้น BLASTX analysis ยังแสดงให้เห็นว่า supercontig 246 ที่มีลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอคล้ายกับ supercontig 77 เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่สร้างเอ็นไซม์ 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase ส่วน supercontig 40 ที่มีลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอคล้ายกับ supercontig 117 นั้น ไม่สามารถระบุได้ว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์หรือโปรตีนชนิดใด ดังนั้นในขั้นตอนการค้นหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย จะทำการตรวจสอบทุก supercontig ยกเว้น supercontig 40 ซึ่งเป็นสายดีเอ็นเอที่ไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนที่สังเคราะห์ได้

2.2.4 การตรวจสอบความแปรปรวนของสายดีเอ็นเอเป้าหมาย

รวบรวมข้อมูลสายดีเอ็นเอตรงตำแหน่งเดียวกันกับสายดีเอ็นเอเป้าหมายจากฐานข้อมูล Nucleotide และ EST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) ด้วยโปรแกรม BLASTN โดยการคัดเลือกนั้นจะใช้ความเหมือนของสายดีเอ็นเอที่มากกว่า 95% และมีความยาวเกินกว่า 100 คู่เบส เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก (Chaisan et al. 2012) จากการรวบรวมข้อมูลจากฐานข้อมูลทางพันธุกรรมพบว่า ข้อมูลสายดีเอ็นเอของมะละกอในฐานข้อมูล Nucleotide และ EST มีเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ supercontig 195 เท่านั้น ซึ่งเป็นสายดีเอ็นเอที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ lycopene beta-cyclase ส่วนสายดีเอ็นเอเป้าหมายอื่น ๆ ไม่สามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ เนื่องจากข้อมูลจากฐานข้อมูลทางพันธุกรรม Nucleotide และ EST มีไม่เพียงพอ

จากการรวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรมของมะละกอที่มีลำดับสายดีเอ็นเอเหมือนกับ supercontig 195 ใน Nucleotide collection database พบทั้งหมด 4 accession ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับสายดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่า 90% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ข้อมูลทางพันธุกรรมของมะละกอที่มีลำดับสายดีเอ็นเอเหมือนกับ supercontig 195

Accession	Cultivar	E-value	Identity
GQ478573.2	AU9	0.0	100%
FJ839872.1	Tainung	0.0	100%
GQ478572.2	Sunup	0.0	99%
FJ839871.1	Hybtid 1B	0.0	99%

สายดีเอ็นเอทั้ง 4 Accession numbersได้มาจากการทำ DNA sequencing จากมะละกอ 4 สายพันธุ์ คือ AU9, Hybrid 1B, Sunup และ Tainung โดย สายดีเอ็นเอจาก 4

accession จะนำมาใช้ในการค้นหาตำแหน่งที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วย computer analysis และจากการตรวจสอบด้วยโปรแกรม Codon Code Aligner พบตำแหน่งที่เป็น candidate SNP ที่ลำดับเบสที่ 17194, 17547 และ 17548 (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ชนิดและตำแหน่งของ Candidate SNPs ของมะละกอบน Supercontig 195

	Position in the sequence alignment (bp)		
	17,194	17,547	17,548
Supercontig 195	A	T	T
Sunup	A	T	T
Tainung	A	T	T
AU9	C	-	-
Hybrid 1B	C	-	-
Summary	(A/C)	(T/-)	(T/-)

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสายดีเอ็นเป้าหมาย โดยอ้างอิงจากฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของมะละกอ สามารถตรวจสอบความแปรปรวนของ supercontig 195 โดยตรวจสอบพบ candidate SNP ชนิด (A/C) และพบ deletion ชนิด (TT/--) บน supercontig 195 โดยความแปรปรวนทางพันธุกรรมนี้จะมีการพิสูจน์ความถูกต้องด้วยอีกครั้งด้วยการทำ DNA sequencing บริเวณเป้าหมายที่ค้นพบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

สำหรับสายดีเอ็นเอเป้าหมายอื่น ๆ ที่ไม่สามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากฐานข้อมูลทางพันธุกรรม จะทำการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี re-sequencing โดยใช้สายดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นสายดีเอ็นเออ้างอิงสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อทำการจำลองสายดีเอ็นเป้าหมายทั้งเส้น และทำการหาลำดับเบสของสายดีเอ็นเป้าหมายจากมะละกอสายพันธุ์ต่างๆ และนำข้อมูลลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเปรียบเทียบเพื่อหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่อไป

2.2.5 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสายดีเอ็นเอเป้าหมาย

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสายดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยโปรแกรม Generunner โดยออกแบบให้ไพรเมอร์ครอบคลุมทั้งส่วนของ exon และ intron บนสายดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์แต่ละตัวจะต้องมี Tm (melting temperature) สูงกว่า 48 °C และคู่ของไพรเมอร์ต้องมีความแตกต่างของ Tm ไม่เกิน 2 °C หลังจากการออกแบบไพร์เมอร์ นำลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับสายดีเอ็นเอในฐานข้อมูลพันธุกรรมของมะละกอ (www.phytozome.net/papaya.php) เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ เนื่องจากสายดีเอ็นเอเป้าหมายแต่ละเส้น มีส่วนคล้ายกับสายดีเอ็นเอบริเวณอื่นในจีโนมของมะละกอ ถ้าไพร์เมอร์ตัวไหนจับกับจีโนมของมะละกอได้มากกว่า 1 ตำแหน่ง ให้ตัด

ไพรเมอร์ตัวนั้นออกจากการทดลอง เนื่องจากไพรเมอร์ดังกล่าวไม่มีความจำเพาะต่อสายดีเอ็นเอเป้าหมาย

จากการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Generunner โดยใช้ supercontig 77, 90, 246, 107, 195, 28, 51, 55 และ 117 เป็นสายดีเอ็นเอต้นแบบ สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 59 คู่ (ตารางที่ 7) โดยไพรเมอร์ที่ได้นี้จะนำไปใช้ในการจำลองสายดีเอ็นเอเป้าหมาย ของมะละกอสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และนำไปตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ polyacrylamide gel เป็นตัวกลางในการแยกความแตกต่าง จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างละเอียดด้วยวิธีการ re-sequencing

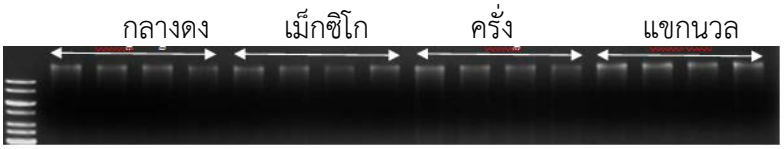
ตารางที่ 7 ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ suppercontig เพื่อนำมาใช้ในการค้นหา SNPs

Contig	Primer name	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)
Supercontig 77	Contig 77_1	TGCGCCTACTTCTACTACTTGG	CGTAGACGCCTTGAATGC	509
	Contig 77_2	TAACGGAGCTAACCCACTTCAC	TCAACCGGAATTTCAACATC	555
	Contig 77_3	GATCAACCCACAATGATG	CCGCCAGAGCTAAATATG	475
	Contig 77_4	AACTTAGAAGCAGGGATG	AGTACTTACAGAGTAAATGGTG	500
	Contig 77_5	CCAGAACCAGTCACTACC	AAAGCTAAGCTAGTATTTGC	575
	Contig 77_5	TTGGCGAATCAGATCTTCC	CTAACATCACTATTTCGTTTCC	501
	Contig 77_5	AAGACGATGGAAACGAAATAG	ATAGCCTAAGAAGGTCAGTTTC	555
Supercontig 246	Contig 246_1	AAAGTTCCATGAAACCCGTAAG	TGGGAAGAACCAGAAACAGAGG	527
	Contig 246_2	TGTTTCTGGTTCTTCCCAAG	CGTCGATCACAGAAACGG	553
	Contig 246_3	GACGATTGTTGAAGAAGAC	GAACGTCAATACCCACTTC	451
Supercontig 90	Contig 90_1	TCTCTTCTTCATTTCTCCCTAC	AAACGGCTGCAAAGTGTAG	535
	Contig 90_2	AGCTACACTTTGCAGCCGTTTC	GGATTCATCCCGATCTGTATG	543
	Contig 90_3	CTCTCTTTGCCGACATAC	AGGTAACTCACCAAATACC	595
Supercontig 107	Contig 107_1	CGCCGCCATTACCCTTAAATCC	TTACAGCGGCACCAACGGAG	520
	Contig 107_2	GGTACATTTGCTCTCTCCG	GTCTGAAATATCTTCCAACAAC	493
	Contig 107_3	CTTAAGACCTCTTCCCTTC	ACTGTAACTAATCTACCACACC	539
Supercontig 195	Contig 195_1	ATTTCGTCACAGAATCTCAG	AACCAAATCCACTTGCATC	539
	Contig 195_2	AGTACGATAAGCCAAGGAATTG	CAATCCCTGAATTCCCAC	400
	Contig 195_3	GAATTCAGGGATTGTTCAC	AAAGGGTTGCAGAGCAAG	433
Supercontig 28	Contig 28_1	GAGCTCGGAACTTTGCAGC	AACAATAAACGGAAATCACTCG	537
	Contig 28_2	TCGAGTGATTTCCGTTTATTG	CAACCAAAGCTTATTCTATGTC	589
	Contig 28_3	GAATAAGCTTTGGTTGTGC	AAATATCATCTTCACAGGC	537
	Contig 28_4	CCTTAATGTAGACAATTTGC	CACCTGAAATTGCGAGAG	531
	Contig 28_5	TTTCTCTCGCAATTTCAGGTG	CAATGAAGGTTGCTGGACC	535
	Contig 28_6	GATGACCTAGATAGCATGTC	AGATTATGAGATTCAGCCTC	525
	Contig 28_7	TCAATGAAGAAATGACTGGG	GAACCTGGTACATTTCAGTAAG	539
	Contig 28_8	TGATTATCTGCCATTCATTG	ACCTTGCATTGAGATGTTC	520
	Contig 28_9	TTCGAACCTTTATATCTCG	GAAGAAGTTTCTAGCTTGATG	535
	Contig 28_10	TCAAAGTTTCTTCAAAGAGC	CTAGAAATGCTAGTCAGCAAG	525
	Contig 28_11	TTTATATTCTAGAGGATGCAGC	TCTTGAATGTATCTTCCTAGTC	554
	Contig 28_12	AGGTGAAGTTGAATAACTAGTG	CATATCATTTGGTGCTATG	600
Supercontig 51	Contig 51_1	ATGGCATTGACGACATGTTC	TACCTGCATTCCTTTAATAAGC	535
	Contig 51_2	AACCTGTGCCTGCTTATTAAAG	CCTCCCACCTCCATCCTATC	509
	Contig 51_3	CAATCTCTTTGATGCTCG	TCCCTTCATGTATTTATAGG	506
	Contig 51_4	TGATCATGCTGATGATAACC	CCACTTCCCGCTGAAATC	514
	Contig 51_5	GTTTATAACCAGCGGCTTGAAC	TTGCATCAGAATTACCAGATTC	512
	Contig 51_6	TTAGTGATAAATCGCTAGCC	GGGTTTGACTTGCGATTC	535
	Contig 51_7	TTGCAGGTATATTCTATCATCC	CTATCTCAGTTTCCGAATTG	508
Supercontig 55	Contig 55_1	CTCTGCAACTCAATCAACCC	CACCGAAACAGATTTATGAAGC	549
	Contig 55_2	TGGTTAATTGATTGATGTGTGC	GAACACCTAACTGCCCTGCTG	530
	Contig 55_3	GCAGTTAGGTGTTCCGAG	ACCTTATTTCCATCATCCTC	556
	Contig 55_4	TAGATGCATTTGGAAACTG	CCCAAGAATACTCGGTAC	562
Supercontig 55	Contig 55_5	TATTCTTGGGCCACAAAC	AAATGAAGTTATGCTGCTG	584
	Contig 55_6	TGAGGGTTGGTGTGACAATGTG	CCATGACCTCACCTGTGAAAG	560
	Contig 55_7	GAGGTCATGGTTGATTCTCC	GAAACAACATCAACAGGATTTC	552
	Contig 55_8	ATGCAGAAAGGAAGAATATG	TAAAGAATCTCCCACCAACTC	577
	Contig 55_9	GATCTTTGGAGAAATTCAAG	GGTAGTAAGAACCACCTGC	582
	Contig 55_10	ATGACAATGTTGTTTCTACAGC	CTTCCCTCGTTACTGTAAAG	518
	Contig 55_11	GGAAGGAGGTACCAGGTGTC	ACACTTCCTGAAGTATTCCAC	428

Supercontig 117	Contig117_1	GGCTCAGGTGAAGCAACAGAG	ATGGCTTGAGATTAGGAAACTG	563
	Contig117_2	TCCTAATCTCAAGCCATAC	ATATCCACCTGAAAGTAGC	562
	Contig117_3	AGGTGGATATATACGACTGTAG	CAAACAAACTAATTGAGTGC	556
	Contig117_4	AGTTTGTTTGTCCTGTCC	CCACAAGTCTTGTCCAATC	498
	Contig117_5	TCTCTGATATATTTCCCTTG	TCCATGCAGAGAATAATG	528
	Contig117_6	CATGTTAGAGCTGAACGAGTC	TCAAGTAAACATCTGGTGAAC	525
	Contig117_7	AAATACATCACAGATAGAGGAG	CTGAATAAGATGGAAGAATC	530
	Contig117_8	CTTATTCAGGCTACTAACAAG	GAAGTGAACCTTGTCCCTC	557
	Contig117_9	GGTTCACTTCTCCAGTAAG	AACTATGAGAACAAGCTCG	524
	Contig117_10	GCGAGCTTGTTCTCATAG	ATACAACACTCAACTCATCAG	540

2.2.6 การสกัด Genomic DNA จากมะละกอ

สกัด Genomic DNA จากใบอ่อนของมะละกอสายพันธุ์ต่างๆโดยใช้ plant genomic DNA extraction kit (QIAGEN) สำหรับใช้ในการศึกษาเพิ่มปริมาณยีนในลำดับต่อ ๆ ไป ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ genomic DNA จากมะละกอสายพันธุ์ต่างๆ โดยวิธี Spectrophotometer ที่ 260 และ 280 นาโนเมตร และ 1% Agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 3) โดยจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากมะละกอแต่ละสายพันธุ์ จะนำไปใช้เป็นสายดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR เพื่อนำไปใช้ในการตรวจหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะละกอบนดีเอ็นเอเป้าหมายต่อไป



ภาพที่ 3 ตัวอย่าง Genomic DNA ของมะละกอสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา

2.3 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมบนยีนใน Caroenoid pathway ครั้งนี้ได้ใช้ข้อมูลจีโนมิกดีเอ็นเอจากมะละกอสายพันธุ์ Sunup เป็นสายดีเอ็นเอต้นแบบในการศึกษา เนื่องจากในปัจจุบันข้อมูลทางพันธุกรรมของมะละกอจาก Hawaii Papaya Genome Project เป็นข้อมูลจีโนมิกของมะละกอพันธุ์ Sunup และข้อมูลดังกล่าวได้เปิดให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นการนำเอาสายดีเอ็นเอของมะละกอสายพันธุ์ Sunup เป็นสายดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำ re-sequencing จะสามารถลดระยะเวลาและเพิ่มความถูกต้องในการทำงานวิจัย

สายดีเอ็นเอต้นแบบที่รวบรวมได้จาก Hawii Papaya Genome Project พบ 9 supercontig ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอ็นไซม์ใน caroenoid pathway แต่จากการตรวจสอบด้วย BLASTN เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของสายดีเอ็นเอจาก supercontig กับฐานข้อมูลจาก Hawii Papaya Genome Project พบว่า สาย

ดีเอ็นเอบางส่วนของแต่ละ supercontig มีความเหมือนกับสายดีเอ็นเอบริเวณอื่นบนจีโนมของมะละกอ ดังนั้น เพื่อไม่ให้เกิดความผิดพลาดในการคัดเลือกสายดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล NT และ EST สำหรับการนำมาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม สายดีเอ็นเอของแต่ละ supercontig จะนำมาใช้เป็นสายดีเอ็นเอต้นแบบในการคัดเลือกสายดีเอ็นเอของมะละกอสายพันธุ์อื่น ๆ จากฐานข้อมูล NT และ EST ด้วยโปรแกรม BLASTN (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเกินกว่า 95% และความยาวของส่วนที่เหมือนเกิน 100 คู่เบสเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก ผลจากการทำ BLASTN analysis พบว่ามีเพียง supercontig 195 เท่านั้นที่มีข้อมูลเพียงพอสำหรับการหาความแตกต่างทางพันธุกรรมบน ส่วน supercontig อื่น ๆ ไม่มีข้อมูลเพียงพอสำหรับการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม ดังนั้นการค้นหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของ supercontig อื่นที่เหลือจึงต้องอาศัยการทำ re-sequencing โดยใช้ สายดีเอ็นเอของแต่ละ supercontig เป็นต้นแบบสำหรับการออกแบบไพรเมอร์

หลังจากการออกแบบไพรเมอร์ ลำดับเบสของไพรเมอร์ทุกตัวต้องมีการตรวจสอบความจำเพาะต่อสายดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการทำ BLASTN analysis เทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของมะละกอ (phytozome.net/papaya.php) เนื่องจากการทำ re-sequencing ต้องการ PCR product เพียงเส้นเดียว ถ้า PCR product มีมากกว่า 1 เส้น อันเนื่องมาจากไพรเมอร์ไม่มีความจำเพาะต่อสายดีเอ็นเอเป้าหมาย จะส่งผลให้คุณภาพของสายดีเอ็นเอที่ได้ต่ำ และไม่สามารถนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางพันธุกรรมได้

ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบครั้งนี้ จะนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเป้าหมายของมะละกอสายต่าง ๆ แล้วนำมาตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะละกอด้วยวิธี electrophoresis และ sequencing โดยการตรวจสอบทั้งสองวิธีนี้ จะนำไปสู่การค้นพบความแตกต่างทางพันธุกรรมบนยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ใน carotenoid pathway ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์มะละกอในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. กรมศุลกากร .(2550). สถิติการส่งออกมะละกอปี 2550.

2. กรมส่งเสริมการเกษตร .(2549). สถิติการปลูกมะละกอรายจังหวัดปีการเพาะปลูก 2546.

3. Puwastien P, Burlingame B, Raroengwichi M and Sungpuag P. (2000). ASEAN Food Composition Table of Nutrition, Mahidol University, Thailand

4. Wall MM. (2006). Ascorbic acid, vitamin A and mineral composition of banana (Musa sp.) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. J of Food Compos Anal 19: 434-445

3. ตารางเปรียบเทียบผลการดำเนินงานตามแผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้กับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริง

การเปรียบเทียบผลการดำเนินงานตามแผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้กับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริงได้แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลการดำเนินงานตามแผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้กับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริง

กิจกรรม (ตามแผนการดำเนินงาน)	**เดือน**											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.รวบรวมข้อมูลสายดีเอ็นเอของยีนในกระบวนการสร้างคาโรทีนอยด์จากมะละกอและพืชอื่นๆจากฐานข้อมูลพันธุกรรม												
กิจกรรม (ตามที่ได้ดำเนินการจริง)												
1. รวบรวมข้อมูลสายดีเอ็นเอของยีนในกระบวนการสร้างคาโรทีนอยด์จากมะละกอจากฐานข้อมูลพันธุกรรม												
2. วิเคราะห์จำนวนซ้ำของยีนเป้าหมายจาก Hawaii Papaya Genome Project												
3. ตรวจสอบการแสดงออกของยีนเป้าหมายโดยเทียบกับ Protein database												
4. เก็บตัวอย่างใบมะละกอจาก 13 สายพันธุ์และสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ												
5. การออกแบบไพรเมอร์												

4. งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มโครงการ

รายรับ 311,790 บาท (งวดที่ 1)

รายจ่าย 9140 บาท (ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย)

คงเหลือ 302,650 บาท

5. งานตามโครงการที่จะทำต่อไป

หลังจากเสร็จสิ้นการดำเนินการวิจัยหลังเดือนที่ 2 ทางคณะวิจัยจะดำเนินการวิจัยตามที่แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงถึงงานตามโครงการที่จะดำเนินการต่อไปหลังจากเสร็จสิ้นงานในเดือนที่สอง

กิจกรรม	**เดือน**									
	3	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
1. การตรวจสอบ gene duplication อย่างละเอียด										
2. การออกแบบไพรเมอร์เพิ่มเติมเพื่อให้คลอบคลุมทุกส่วนของยีนเป้าหมาย										
3. การตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะละกอด้วยวิธี electrophoresis										
4.DNA sequencing										
5.การค้นหา SNP รวมถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมอื่นๆ บนยีนเป้าหมายของมะละกอ										

6. อุปสรรคหรือปัญหา

ไม่มี

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2555

รายงานความก้าวหน้าของการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) อิทธิพลของพันธุ์ และแหล่งปลูก ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ใน กระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในมะละกอสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางการค้า

(ภาษาอังกฤษ) The effect of varieties and location on enzymes activity involved the carotenoid biosynthesis of economical papaya *Cairca papays L*.varieties in Thailand

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 จำนวนเงิน 820,500 บาท
ระยะทำการวิจัย 1 ปี เริ่มทำงานวิจัยเมื่อ ตุลาคม พ.ศ. 2555 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2556
รายงานควมก้าวหน้าของการวิจัย ครั้งที่ 1 ระหว่าง ตุลาคม พ.ศ. 2555 ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2555

ชื่อหัวหน้าโครงการและคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ ดร. เกียรติสุดา เหลืองวิลัย
ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
1 ถนนมาลัยแมน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
โทรศัพท์ 034-281084 ต่อ 147
โทรสาร 034-281086
E-mail address: agrkdl@ku.ac.th

ผู้ร่วมงานวิจัย 1

ชื่อ ศาสตราจารย์ ดร. จริงแท้ ศิริพานิช
ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
1 ถนนมาลัยแมน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
โทรศัพท์ 034-281084 ต่อ 125
โทรสาร 034-281086
E-mail address: jingtair.s@ku.ac.th

เกียรติสุดา เหลืองวิไล
หัวหน้าโครงการ
23/11/2555

บทคัดย่อ

มะละกอพันธุ์การค้าที่ปลูกในประเทศไทยมีความหลากหลายทางด้านสีเนื้อ ซึ่งรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีแดง ส้ม และเหลืองของเนื้อมะละกอนั้นเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ เช่น ไลโคปีน และเบต้าแคโรทีน การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณไลโคปีน และเบต้าแคโรทีนอยด์ของมะละกอพันธุ์การค้าของไทย โดยทำการศึกษาในมะละกอ 3 พันธุ์ที่เป็นตัวแทนของมะละกอเนื้อสีแดง สีส้ม และสีเหลือง ในระยะผลดิบ แต้ม และผลสุก ที่ปลูกในจังหวัดนครปฐม จากผลการศึกษาพบว่า พบว่าปริมาณ ไลโคปีน และเบต้าแคโรทีน เพิ่มขึ้นตามระยะความบริบูรณ์เพิ่มมากขึ้น ในมะละกอพันธุ์แขกดำมีปริมารสาร ไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน มากที่สุด โดยสัดส่วนของไลโคปีนต่อเบต้าแคโรทีนลดลง เมื่อมะละกอสุก พันธุ์ปลักไม้ลายมีสัดส่วนของปริมาณไลโคปีนต่อเบต้าแคโรทีนคงที่ ทั้งในระยะแต้มและระยะสุก ส่วนพันธุ์ครั่งเหลือง สารแคโรทีนอยด์ที่พบ ส่วนใหญ่คือเบต้าแคโรทีน ส่วนไลโคปีนพบน้อยมาก

Abstract

Economical papaya varieties in Thailand varied in flesh color ranging from red, orange and yellow. The principle pigments responsible for those color diversities belong to carotenoids including lycopene and beta carotene. Therefore the objective of this study was to determine lycopene and beta-carotene contents in 3 ripening stages i.e. mature green breaker and ripe stages of 3 papaya cultivars grown in Nakon Pathom province, representing orange red, orange and yellow flesh color name Khak dam, Plug Mai Lai and Krang. The result showed that lycopene and beta-carotene contents increased as the fruit ripe. Among all three cultivars studied, Khak dam had hightest amount of lycopene and beta-caroten. Interestingly, the lycopene:beta-carotene ratio of Khak dam fruit during ripe stage was lower than that at breaker stage. In contrast, this ratio of lycopene and beta-carotene was constant at all stage of maturity in Plug Mai Lai. Krung fruit accumulate only beta-carotene with very low, if at all, amount of lycopene at all stages of fruit ripening.

รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

1. ความเป็นมาหลักการ เหตุผล และวัตถุประสงค์

มะละกอเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยที่ปลูกเพื่อการบริโภคผลสดภายในประเทศ การแปรรูป และการส่งออก พื้นที่ปลูกมะละกอที่สำคัญในเขตภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ ราชบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี สมุทรสาคร นนทบุรี สระบุรี ปทุมธานี นครราชสีมา อุบลราชธานี มุกดาหาร และศรีสะเกษ ในปี 2550 มีพื้นที่การผลิต 33,036 ไร่ และผลผลิตรวม 124,525 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550) ผลผลิตมากกว่า 90% ใช้เพื่อบริโภคภายในประเทศ และส่งออกทั้งในรูปผลสด และอีก 10% ใช้สำหรับแปรรูปเพื่อการส่งออก คิดเป็นมูลค่ากว่า 100 ล้านบาท (กรมศุลกากร, 2550) การปลูกมะละกอในประเทศไทย มีการปลูกแบบเชิงเดี่ยวและปลูกผสมผสาน โดยพันธุ์ที่นิยมปลูกคือ พันธุ์แขกดำ คิดเป็นร้อยละ 60% ของพันธุ์มะละกอที่ปลูกในประเทศไทย ตามมาด้วยพันธุ์แขกนวล และพันธุ์ปลักไม้ลาย ส่วนพันธุ์อื่นๆ ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่กลายมาจากพันธุ์แขกดำ หรือนำเข้าจากต่างประเทศ เช่นพันธุ์ฮาวาย เรดเลดี้ เป็นต้น ซึ่งพบว่า ลักษณะประจำพันธุ์ของมะละกอ โดยเฉพาะพันธุ์แขกดำ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีเนื้อสีแดง มีลักษณะผันแปรไปจากลักษณะดั้งเดิมมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พบว่าลักษณะสีแดงของเนื้อ ปริมาณน้ำตาล และความแน่นเนื้อ มีค่าลดลง ทั้งนี้ส่วนหนึ่งอาจเกิดเนื่องจาก เกษตรกรส่วนใหญ่ เก็บเมล็ดพันธุ์ด้วยตัวเอง หรือรับเมล็ดพันธุ์จากผู้รับซื้อผลมะละกอหรือบริษัทเมล็ดพันธุ์ จากข้อมูลของ สำนักงานกองทุนสนันสนุนงานวิจัย (สกว) ระบุว่า มะละกอที่ปลูกในประเทศไทย มีสีเนื้อที่ได้เป็นสีส้มแดง ซึ่งต่ำกว่าสีแดงที่เป็นที่ต้องการของตลาด นอกจากนั้นบางตัวอย่างยังพบว่ามีสีเหลืองด้วย ซึ่งแสดงถึงความไม่แน่นอนหรือความแปรปรวนของพันธุ์มะละกอไทยเป็นอย่างมาก ซึ่งข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นในการคัดและปรับปรุงพันธุ์มะละกอไทยให้ได้พันธุ์ดี สม่ำเสมอ และไม่กลายพันธุ์

อย่างไรก็ตาม ผลมะละกอที่ผลิตได้ยังไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาด และยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศในบางฤดูกาล ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการผลิตมะละกอ คือ คุณภาพสีเนื้อไม่สม่ำเสมอ สารสีที่พบในมะละกอเนื้อสีแดงส่วนมากประกอบไปด้วย ไลโคปีน ซึ่งพบมากถึง 65% ของสารคาโรทีนอยด์ทั้งหมด, รองลงมาคือ β -cryptoxanthin, β -carotene, และ ς-carortene ในทางตรงกันข้ามกลุ่มมะละกอเนื้อสีเหลืองจะไม่พบ lycopene แต่พบ β -cryptoxanthin, β –carortene สะสมเป็นปริมาณมากถึง 75% ของคาโรทีนอยด์ทั้งหมด ปริมาณสารในกลุ่มคาโรทีนอยด์ที่พบในมะละกอนอกจากจะถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมแล้ว ยังขึ้นอยู่กับแหล่งที่ปลูกด้วย ดังได้มีรายงานว่ามะละกอเนื้อสีแดง พันธุ์ sunrise ที่ปลูกบนเกาะ Kapoho เปรียบเทียบกับ มะละกอพันธุ์เดียวกันที่ปลูกบนเกาะ Moloaa พบว่า มะละกอจากเกาะ Moloaa มีปริมาณ ไลโคปีน มากกว่ามะละกอจากเกาะ Kapoho ถึง 3 เท่า (Wall, 2006) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาสภาพดินบนเกาะพบว่า ดินบริเวณเกาะ Moloaa ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นดินประเภท Oxisol ส่วนดินบนเกาะ Kapoho เป็นดิน Histosol โดยลักษณะเด่นของดิน Oxisol คือดินจะมีสีออกแดงเนื่องจากมีแร่เหล็กออกไซด์สูง ดินประเภทนี้มีพัฒนาการสูง มักมี pH ต่ำกว่า 7 ซึ่งดินดังกล่าว พบมากบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ดังนั้นพันธุกรรมและสภาพแปลงปลูกอาจมีผลต่อความสม่ำเสมอของคุณภาพสีเนื้อ การแก้ปัญหาดังกล่าว อาจทำได้โดยการพัฒนาสายพันธุ์ดีที่มีสีแดงในทุกสภาพพื้นที่ปลูก แต่เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลพื้นฐานว่าปัจจัยข้างต้นมีผลอย่างไรต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ควบคุมการเกิดสีแดง ทำให้การปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีสีแดงทำได้ล่าช้าและขาดความถูกต้อง

แม่นยำ ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาอิทธิพลของพันธุ์ และแหล่งปลูก ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ควบคุมการเกิดสีแดงและสีเหลืองของเนื้อมะละกอ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกสายพันธุ์หรือในการปรับปรุงพันธุ์มะละกอให้มีสีตามความต้องการของผู้บริโภคและภาคอุตสาหกรรมต่อไป

จากการสำรวจพบว่าโรงงานแปรรูปและผู้ส่งออกต้องการพันธุ์ที่มีเนื้อสีแดง แต่ปัจจุบันพบว่าไม่มีสายพันธุ์มะละกอที่มีเนื้อสีแดง แต่สายพันธุ์ที่มีเนื้อสีแดงอมส้มมีอยู่เป็นจำนวนมาก ทั้งนี้การปรับปรุงพันธุ์และการคัดเลือกพันธุ์ให้ได้สีแดงนั้นทำได้ช้าหรือมีความไม่แน่นอน ทั้งนี้อาจเกิดจากการขาดข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการควบคุมการพัฒนาสีเนื้อในระดับกิจกรรมของเอนไซม์และปัจจัยภายนอก เช่น แหล่งปลูกที่มีผลต่อการเกิดสีของผลมะละกอพันธุ์การค้าที่สำคัญของไทย และได้เลือกมะละกอพันธุ์ที่มีเนื้อสีส้มและสีเหลือง มาวิเคราะห์ในการศึกษาในครั้งนี้ด้วย เพราะการที่มะละกอเนื้อสีแดงมีความแปรผันของสีไปเป็นสีอื่น อาจมีการปนเปื้อนจากการปลูกมะละกอหลายพันธุ์ไว้ในแปลงเดียวกันของเกษตรกร ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบชนิดและปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ที่ควบคุมการเกิดสีแดงในมะละกอ ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการทำให้เกิดความรวดเร็วและแม่นยำในการปรับปรุงพันธุ์มะละกอให้มีสีตามที่ตลาดต้องการ โดยในช่วง 2 เดือนแรกของงานวิจัย เพื่อจัดหาพันธุ์มะละกอที่เป็นตัวแทนของเนื้อสีส้มแดง จำนวน 2 สายพันธุ์ และมะละกอที่มีเนื้อสีเหลืองจำนวน 1 สายพันธุ์ จากแหล่งปลูก 2 แหล่งเพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีแดงต่อไป

2. ผลการดำเนินงานที่ได้ทำไปแล้ว

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์มะละกอ

สุ่มเก็บมะละกอพันธุ์โกโก้ รางนายร้อย สายน้ำผึ้ง-แขกดำ แก้มแหม่ม และพันธุ์แขกดำ ในระยะแต้ม ทำการวัดสีเนื้อโดยผ่ามะละกอตามความกว้างของผล แล้วเลือกใช้บริเวณส่วนกลางผลเพื่อวัดสีเนื้อ ทำการวัดสีเนื้อเฉพาะบริเวณที่มีสีแดงด้วยเครื่องวัดสี KONICAMINOLTA CHROMA METER (รุ่น CR-400) เป็นค่า L*, a* และ b* ดังนี้

ค่า L = 0 ค่าความสว่างเป็นสีดำ ค่า L = 100 ค่าความสว่างเป็นสีขาว
ค่า (+) a = ค่าความเป็นสีแดง ค่า (-) a = ค่าความเป็นสีเขียว
ค่า (+) b = ค่าความเป็นสีเหลือง ค่า (-) b = ค่าความเป็นสีน้ำเงิน

นำชิ้นมะละกอบริเวณส่วนที่ทำการวัดสีเนื้อมาสับเป็นเนื้อมาสับ แล้วมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 0.2 กรัม ใส่ในหลอด falcon tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม hexane: acetone: ethanol อัตราส่วน 2:1:1 (HEA)ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อหลอด จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenized (รุ่น Polytron PT 2100) เติม HEA ปริมาณ 15 มิลลิลิตรต่อหลอด ปิดฝาแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ปิดฝาตั้งทิ้งไว้อีก 15 นาที นำส่วนที่เป็นสารละลายด้านบนวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer (รุ่น Genesys 10S UV-VIS) ที่ความยาวคลื่น 444 471 503 นาโนเมตร (nm) โดยใช้ Hexane เป็น blank แล้วคำนวณหาค่าตามสูตร ดังนี้

ไลโคปีน (mg/kg) = (6.95×Abs.503) - (1.59×Ab.444) ×295.35 ×V/W

เบต้าแคโรทีน (mg/kg) = (9.38×Abs.444) - (6.70×Ab.503) ×295.35 ×V/W

เมื่อ Abs.503 คือ ความยาวคลื่นที่ 503 นาโนเมตร

Abs.444 คือ ความยาวคลื่นที่ 444 นาโนเมตร

V คือ ปริมาณสารละลาย

W คือ น้ำหนักเนื้อมะละกอ

2.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณ ไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน

วิเคราะห์หาปริมาณ ไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน ในมะละกอ 3 พันธุ์ 3 ระยะวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) ประกอบด้วย 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ ครั่งเหลือง พันธุ์ปลักไม้ลาย พันธุ์แขกดำ แต่ละพันธุ์มี 3 ระยะการเก็บเกี่ยว คือ ระยะดิบ สีเปลือกมีเขียวไม่ขึ้นแต้ม เมื่อจิกให้ยางไหลจะเป็นสีขาวขุน ระยะแต้ม เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของสีเปลือกขึ้นแต้มคิดเป็น 10-15% ของพื้นที่ผิว เมื่อจิกให้ยางไหล ยางมีสีขาวขุ่นใสกว่าระยะดิบ ระยะสุก สีเปลือกพัฒนาเป็นสีเหลืองส้มประมาณ 70-85% ของพื้นที่ผิวทุกผลก่อนนำไปทำการทดลองหาปริมาณไลโคปีนและเบต้าแคโรทีน จะทำการวิเคราะห์หาสีเนื้อ ความแน่นเนื้อ และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ เพื่อยืนยันระยะเก็บเกี่ยวที่สม่ำเสมอ โดยให้แต่ละระยะของแต่ละพันธุ์มีค่าสีเนื้อ ความแน่นเนื้อ และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ใกล้เคียงกัน

2.1.3 การศึกษาลักษณะทางคุณภาพอื่นๆ

2.1.3.1 สีเนื้อ ทำการวัดเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.1.3.2 วัดความแน่นเนื้อ ผ่ามะละกอตามความกว้างของผล แล้วเลือกใช้บริเวณส่วนกลางผลเพื่อวัดแรงกดทะลุเนื้อ ด้วยเครื่อง fruit firmness tester (รุ่น Bohrstander DS53) ใช้หัวกดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 เซนติเมตร วัดค่าแรงกดเป็น กิโลกรัม

2.1.3.3 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids; TSS) นำเนื้อมะละกอบริเวณกลางผลมา 5 กรัม แล้วคั้นน้ำที่ได้จากเนื้อมะละกอ 1-2 หยด หยดลงบนเครื่อง Hand refractometer มีหน่วยเป็น องศาบริกซ์

2.1.3.4 ปริมาณกรดที่สามารถไทเทรตได้ (Titratable Acidity ; TA) นำน้ำที่คั้น 2 มิลลิลิตร มาไทเทรตด้วย NaOH 0.1 โดยใช้ phenophalein ความเข้มข้น 1% เป็น indicator ไทเทรต เมื่อน้ำคั้นมีสีแดงมากให้เติมน้ำกลั่น (น้ำกลั่นไม่มีผลต่อการไทเทรต) เพื่อเจือจางก่อนการไทเทรตให้สีอ่อนลงตามความเหมาะสม ง่ายต่อการดู ถึงจุดยุติเมื่อมีการเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน นำผลที่ได้มาคำนวณปริมาณกรดที่ได้ ตามสูตร ดังนี้

TA(%)=(N NaOH × มิลลิลิตร NaOH × Meq.Wt.กรดซิตริก)/มิลลิลิตรน้ำคั้นที่ใช้× 100

เมื่อ N NaOH คือ Normality ของสารละลายด่างมาตรฐาน NaOH

มิลลิลิตร NaOH คือ ปริมาณของสารละลายด่างที่ใช้ไปในการไทเทรต

Meq.Wt.กรดซิตริก คือ 0.064

2.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทั้งสามพันธุ์ที่ระยะต่างกันที่ $p<0.05$ ด้วยวิธี Duncan multiple range test ด้วยโปรแกรม SAS

2.2 ผลการทดลอง

2.1.1 คัดเลือกพันธุ์มะละกอที่จะนำมาใช้เป็นตัวแทนในการทดลอง

จากผลการวัดสีเนื้อ วิเคราะห์หาปริมาณ ไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน ในมะละกอพันธุ์เนื้อสีแดงส้ม ได้แก่ โกโก้ รางนายร้อย สายน้ำผึ้ง-แขกดำ แก้มแหม่ม และแขกดำ ที่ปลูกในอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม พบว่า ทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบมีค่า a* ซึ่งเป็นค่าที่บอกความเป็นสีแดง ปริมาณไลโคปีน และเบต้าแคโรทีน ใกล้เคียงกัน คือ มีค่า a อยู่ระหว่าง 27.3-32.6 ปริมาณไลโคปีน อยู่ระหว่าง 44-67 มก/กก และปริมารณเบต้าแคโรทีนอยด์ อยู่ระหว่าง 22-31 มก/กก ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสาร ไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน ของมะละกอแต่ละพันธุ์ที่เป็นเนื้อสีแดง

พันธุ์	n[1]	a*[2]	ไลโคปีน[2] (มก/กก)	เบต้าแคโรทีน[2] (มก/กก)
โกโก้	13	29.1±3.2	48.4±10.7	31.2±5.0
รางนานร้อย	4	27.3±1.6	44.6± 8.7	22.3±5.0
สายน้ำผึ้ง-แขกดำ	2	30.7±1.3	53.7±19.3	29.9±12.8
แก้มแหม่ม	17	32.6±2.5	63.6±11.3	31.2±6.4
แขกดำ	29	31.8±3.6	52.3±17.1	31.1±9.4

[1] จำนวนผลมะละกอที่นำมาวิเคราะห์มีจำนวนตั้งแต่ 2-29 ผล

[2] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากข้อมูลเบื้องต้น เลือกพันธุ์แขกดำเป็นตัวแทนของเนื้อมะละกอพันธุ์สีแดงในการทดลองนี้ เพราะในปริมาณสีที่ใกล้เคียงกัน พันธุ์แขกดำมีความแปรปรวนที่ค่อนข้างมาก หาได้ง่าย ส่วนพันธุ์เนื้อสีส้มและเนื้อสีเหลือง ได้เลือกพันธุ์ปลักไม้ลายเป็นตัวแทนมะละกอในกลุ่มเนื้อสีส้ม และเลือกใช้พันธุ์ครั่งเหลืองเป็นตัวแทนเนื้อสีเหลือง เนื่องจากความหลากหลายของมะละกอทั้งสองพันธุ์มีไม่มาก นอกจากนี้ ทั้งสองพันธุ์จัดเป็นพันธุ์การค้าที่เป็นที่รู้จักของไทยด้วย

2.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณ ไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน ในมะละกอ

วิเคราะห์หาปริมาณ ไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน ในมะละกอ 3 พันธุ์ 3 ระยะบริบูณ์ เพื่อยืนยันระยะความบริบูรณ์ของมะละกอพันธุ์แขกดำ (เนื้อสีส้มแดง) พันธุ์ปลักไม้ลาย (เนื้อสีส้ม) และพันธุ์ครั่ง (เนื้อสีเหลือง) ได้ทำการวัดความแน่นเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และปริมาณกรดที่สามารถไทเทรตได้ ในมะละกอทั้ง 3 พันธุ์ที่เลือกมาใน 3 ระยะความบริบูรณ์ คือ ดิบเขียว แต้ม (เนื้อมีสีเหลืองปรากฏน้อยกว่า 50%) และระยะสุก (เนื้อมีสีแดงทั้งหมด) พบว่า ในระยะดิบของทั้งสามพันธุ์มีค่าความแน่นเนื้อ ในระยะดิบและแต้มใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ย 0.8-1.2 กิโลกรัม ในขณะที่ในระยะสุก ความแน่นเนื้อลดลงเหลือ 0.25 0.39 และ 0.46 ในพันธุ์ปลักไม้ลาย พันธุ์ครั่ง และ พันธุ์แขกดำ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้ง 3 พันธุ์ทั้ง 3 ระยะบริบูรณ์ พบว่าในพันธุ์ ครั่งเหลือง มี TSS เฉลี่ย 6.0 9.8 และ 11.6 องศาบริกซ์ ในระยะดิบ แต้ม และ สุก ตามลำดับ พันธุ์ปลักไม้ลาย มี TSS เฉลี่ย 8.5 17.5 และ 18.1 องศาบริกซ์ ในระยะดิบ แต้ม และ สุก ตามลำดับ และพันธุ์แขกดำ มี TSS เฉลี่ย 6.6, 10.2 และ 10.1 องศาบริกซ์ ในระยะดิบ แต้ม และ สุก ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ปริมาณกรดที่สามารถไทเทรตได้ทั้ง 3 พันธุ์ทั้ง 3 ระยะบริบูรณ์ พบว่าในพันธุ์ ครั่งเหลือง และแขกดำ มี TA เฉลี่ย 0.1% ในทั้งระยะดิบ แต้ม และ สุก ส่วนพันธุ์ปลักไม้ลาย มี TA เฉลี่ย 0.4% ในระยะดิบ และ 0.3% ในระยะแต้มและสุก (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความแน่นเนื้อ ของมะละกอทั้ง 3 พันธุ์และ 3 ระยะบริบูรณ์

ระยะ	ความแน่นเนื้อ(กิโลกรัม)		
	ครั่ง	ปลักไม้ลาย	แขกดำ
ดิบ	1.1b[1]	1.2c[1]	0.8b[1]
แต้ม	0.8b	0.8b	0.8b
สุก	0.4a	0.3a	0.5a
F-test	*	*	*

* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น

[1] ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์เฉลี่ยโดยวิธี Duncan' new multiple range test ที่ความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) ของมะละกอทั้ง 3 พันธุ์และ 3 ระยะ

ระยะ	ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (องศาบริกซ์)		
	ครั่ง	ปลักไม้ลาย	แขกดำ
ดิบ	6.0a[1]	8.5a[1]	6.6a[1]
แต้ม	9.6b	17.5b	10.2b
สุก	11.8c	18.1b	10.1b
F-test	*	*	*

* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น

[1] ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์เฉลี่ยโดยวิธี Duncan' new multiple range test ที่ความเชื่อมั่น 95 %

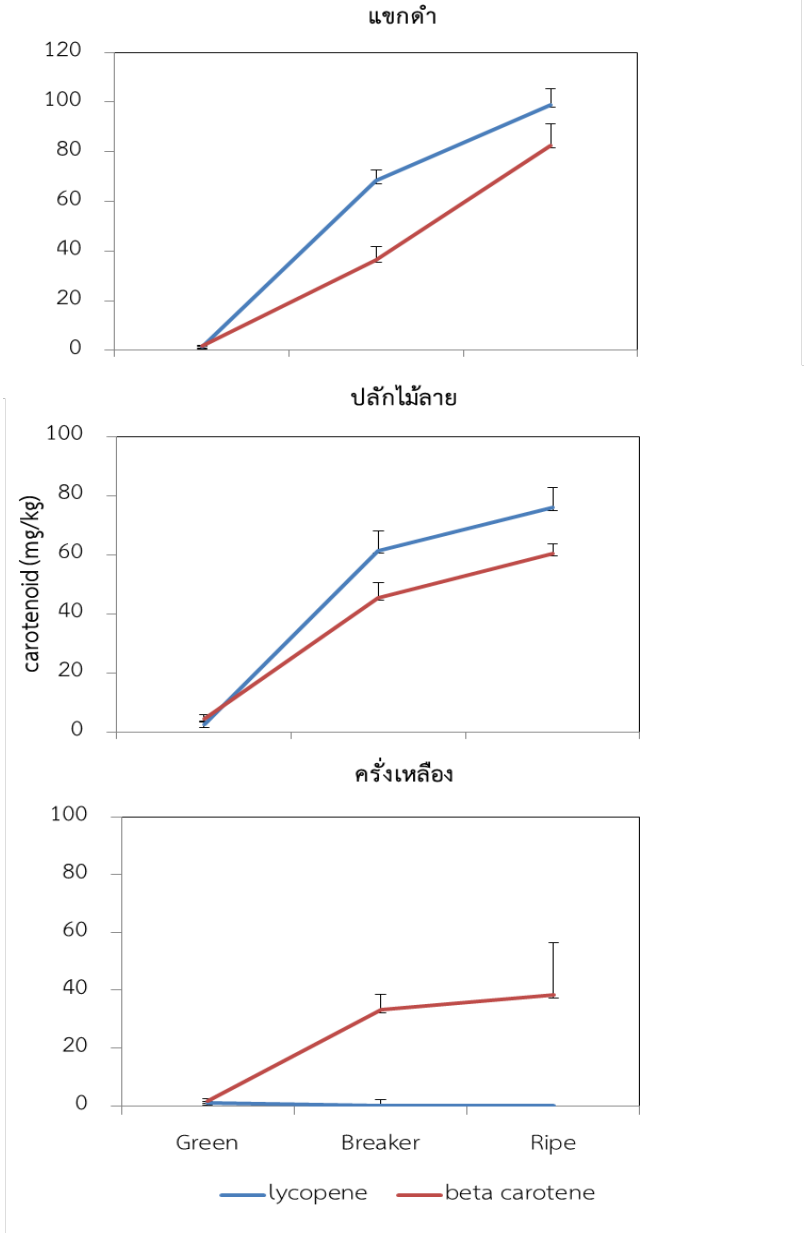
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดที่สามารถไทเทรตได้ (TA) ของมะละกอทั้ง 3 พันธุ์และ 3 ระยะบริบูรณ์

ระยะ	ความแน่นเนื้อ		
	ครั่ง	ปลักไม้ลาย	แขกดำ
ดิบ	0.1b[1]	0.4b[1]	0.1a[1]
แต้ม	0.1b	0.3a	0.1a
สุก	0.1a	0.3a	0.1a
F-test	*	*	*

* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น

[1] ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์เฉลี่ยโดยวิธี Duncan' new multiple range test ที่ความเชื่อมั่น 95 %

ในระยะดิบ(green) มะละกอทั้งสามพันธุ์มีปริมาณสารไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน มีอยู่เพียงเล็กน้อย และค่าที่ใกล้เคียงกันในแต่ละพันธุ์ ปริมาณสารไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน มีเพิ่มมากขึ้น ในระยะแต้ม(breaker) โดยพันธุ์แขกดำ มีการเพิ่มของปริมาณสาร ไลโคปีน มากกว่าเพิ่มของ เบต้าแคโรทีน เกือบเท่าตัว ในขณะที่พันธุ์ปลักไม้ลายมีการเพิ่มของปริมาณสาร ไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน ส่วนในพันธุ์ครั่งเหลืองในระยะแต้ม จะมีปริมาณสาร ไลโคปีนน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณเบต้าแคโรทีน และไม่มีไลโคปีนเลยเมื่อเข้าสู่ระยะสุก(ripe) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงปริมาณสาร ไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน ในมะละกอพันธุ์แขกดำ ปลักไม้ลาย และครั่งเหลือง 3 ระยะบริบูรณ์

2.3 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาวิจัย เป็นเวลา 2 เดือน เรื่องปริมาณไลโคปีน และเบต้าแคโรทีน ซึ่งเป็นสารแคโรทีนอยด์ที่พบมากในมะละกอ 3 สามพันธุ์ที่มีเนื้อสีส้มแดง และเหลือง ที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดนครปฐม สรุปได้ว่า ปริมาณ ไลโคปีน และเบต้าแคโรทีน เพิ่มขึ้นตาม ระยะความบริบูรณ์เพิ่มมากขึ้น ในมะละกอพันธุ์แขกดำมีปริมารสาร ไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน มากสุด โดยสัดส่วนของไลโคปีนต่อเบต้าแคโรทีนลดลง เมื่อมะละกอสุก พันธุ์ปลักไม้ลายมีสัดส่วนของปริมาณไลโคปีนต่อเบต้าแคโรทีนคงที่ ทั้งในระยะแต้มและระยะสุก ส่วนพันธุ์ครั่งเหลือง สารแคโรทีนอยด์ที่พบ ส่วนใหญ่คือเบต้าแคโรทีน ส่วนไลโคปีนพบน้อยมาก ข้อมูลที่จะได้จาก

การทดลองนี้ มีประโยชน์ในการเลือกพันธุ์ที่จะทำการเปรียบเทียบจาก 2 แหล่งปลูก รวมทั้งได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการเลือกระยะบริบูรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างในอนาคต

เมื่อเปรียบเทียบกับตารางระยะเวลาทำงานวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย พบว่า การดำเนินงานวิจัยเป็นไปตามแผนงานที่วางไว้ ในขั้นต่อไป คือการวิเคราะห์กิจกรรมปริมาณของ β- carotene, beta cryptoxantin และ lycopene ของมะละกอทั้งสามพันธุ์ที่ปลูกในจังหวัดนครปฐม เปรียบเทียบกับที่ปลูกอื่นๆ เช่นจังหวัดฉะเชิงเทรา หรือ ศรีษะเกษ ทั้งนี้ เนื่องจากความยากลำบากในการแยก beta carotene ออกจาก alpha carotene ทำให้สารมาตรฐาน alpha carotene ไม่มีจำหน่าย ดังนั้นในการทดลองในอนาคต ผู้วิจัย จะไม่ทำการวิเคราะห์ alpha carotene

2.4 เอกสารอ้างอิง

1. กรมศุลกากร .(2550). สถิติการส่งออกมะละกอปี 2550.
2. กรมส่งเสริมการเกษตร .(2549). สถิติการปลูกมะละกอรายจังหวัดปีการเพาะปลูก 2546.
3. จริงแท้ ศิริพานิช. 2552.ก. มะละกอไทย สถานภาพด้านสายพันธุ์ ระบบการผลิต และการตลาด.พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ. น. 21-88.

3. ตารางเปรียบเทียบผลการดำเนินงานตามแผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้กับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริง

การเปรียบเทียบผลการดำเนินงานตามแผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้กับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริงได้แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลการดำเนินงานตามแผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้กับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริง

กิจกรรม (ตามแผนการดำเนินงาน)	**เดือน**											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.เตรียมตัวอย่างผลมะละกอ 3 สายพันธุ์จาก 2 แหล่ง												
กิจกรรม (ตามที่ได้ดำเนินการจริง)												
1. เตรียมตัวอย่างผลมะละกอ												
2. วิเคราะห์หาปริมาณ ไลโคปีน และ เบต้าแคโรทีน ในมะละกอ												
3. การศึกษาลักษณะทางคุณภาพอื่นๆ												
4. การวิเคราะห์ข้อมูล												

4. งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มโครงการ

กำลังอยู่ระหว่างดำเนินการ ยังไม่มีการใช้จ่าย

5. งานตามโครงการที่จะทำต่อไป

หลังจากเสร็จสิ้นการดำเนินการวิจัยหลังเดือนที่ 2 ทางคณะวิจัยจะดำเนินการวิจัยตามที่แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงถึงงานตามโครงการที่จะดำเนินการต่อไปหลังจากเสร็จสิ้นงานในเดือนที่สอง

กิจกรรม	เดือน									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. เตรียมตัวอย่างผลมะละกอ 3 สายพันธุ์จาก 2 แหล่ง										
2. สกัดสารสกัดจากผลมะละกอและวิเคราะห์ปริมาณของ beta- and alpha-carotene, beta-cryptoxanthin and lycopene										
3. วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PDS, ZDS, LYCB and BCHX (HY-b) ในผลมะละกอ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer										
4. วิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย										
5. เขียนรายงาน ตีพิมพ์บทความ										

6. อุปสรรคหรือปัญหา

ปัญหาหนึ่งในการสุ่มตัวอย่างมะละกอเพื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างคือ ระยะบริบูรณ์ที่สม่ำเสมอ ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงใช้ค่าความแน่นเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และปริมาณกรดที่สามารถไทเทรตได้ ซึ่งเป็นค่าที่มีการเปลี่ยนแปลง สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเจริญเติบโตและการสุกของมะละกอ ร่วมกับการดูลักษณะสีผิว สีน้ำยาง และสีเนื้อ ซึ่งคาดว่าจะทำให้ตัวอย่างมีความสม่ำเสมอในเรื่องของระยะบริบูรณ์มากขึ้น นอกจากนี้ มะละกอพันธุ์แขกดำระยะแต้มมีสีแดงสดมาก แต่สีแดงลดลง และอมส้มในระยะสุก ทั้งนี้อาจเนื่องมากจากเมื่อเข้าสู่ระยะสุก มะละกอพันธุ์แขกดำมีการปริมาณสัดส่วนเบต้าแคโรทีน ต่อไลโคปีน มากกว่าในระยะแต้ม (ภาพที่ 1) สอดคล้องกับพันธุ์ปลักไม้ลายที่สัดส่วนของปริมาณเบต้าแคโรทีนต่อไลโคปีน เท่ากัน ทั้งในระยะแต้มและระยะสุก ทำให้สีเนื้อมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายแทบไม่เปลี่ยน เมื่อเปรียบเทียบระยะแต้มกับระยะสุก ส่วนมะละกอที่มีเนื้อสีเหลือง ไม่มีปริมาณไลโคปีนหรือมีอยู่น้อยมาก จึงทำให้สีเนื้อเป็นสีเหลืองนั่นเอง

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2555